

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR**

**Produção e Análise de Metabólitos Secundários de  
Fungos Filamentosos**

Fernanda Cortez Lopes  
(Farmacêutica UFRGS)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular da UFRGS como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador Prof. Dr. Adriano Brandelli

Porto Alegre, março 2011.

## CIP - Catalogação na Publicação

Cortez Lopes, Fernanda  
Produção e Análise de Metabólitos Secundários de  
Fungos Filamentosos / Fernanda Cortez Lopes. -- 2011.  
130 f.

Orientador: Adriano Brandelli.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia do Estado  
do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, BR-RS,  
2011.

1. Fungos Filamentosos. 2. Metabólitos  
Secundários. 3. Pigmentos. 4. Resíduos  
Agroindustriais. 5. Espectrometria de Massas. I.  
Brandelli, Adriano, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Parte do trabalho foi realizada no Laboratório de Parasitologia no Instituto de Ciências Básicas da Saúde, ambos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Durante o mestrado, obtive as bolsas financiadas pelas instituições de fomento CAPES por seis meses e CNPq por 18 meses.

*"A penicilina cura os homens, mas é o vinho que os torna felizes."*

Alexander Fleming

*"O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano."*

Isaac Newton

*"Nos campos da observação, o acaso favorece apenas as mentes preparadas."*

Louis Pasteur

Dedico a Omércio Lopes (*in memoriam*) patriarca da família Lopes, exemplo de vida, de amor e de dedicação à família. Descansa em paz e toma teu mate amargo com Deus.

*“Não tá morto quem luta, quem peleia, pois lutar é a marca do campeão.”*

Humberto Zanatta, Francisco Alves e Francisco Scherer

*“Porém mais vale pra um gaudério essa saudade, do que não ter saudade alguma pra sentir.”*

Os Serranos, Jorge Rodrigues e Luis Bastos

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por ser uma Universidade gratuita e de excelência. Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) por possibilitar a realização deste trabalho, em especial aos professores Alessandro de Oliveira Rios, Eduardo Cesar Tondo, Plinho Francisco Hertz e ao servidor Roberval Bittencourt de Souza por sempre disponibilizarem seus laboratórios para a realização dos experimentos. Ao funcionário Edgar pela manutenção dos diversos equipamentos que queimaram, devido às constantes faltas de energia elétrica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) por ser um programa de excelência, que me proporcionou grandes momentos e muitos ensinamentos, em especial com a participação no Curso de Férias. E também por ter disponibilizado toda a estrutura do UNIPROTE-MS para a realização das análises de massas e de HPLC. À Silvinha e ao Luciano, pela competência, simpatia e paciência.

Ao professor Adriano Brandelli pela orientação, pela confiança e por ser um exemplo de pesquisador. Ao professor Alessandro de Oliveira Rios pelo auxílio ao longo de todo mestrado, pela correção minuciosa da dissertação, pela disposição em responder dúvidas e principalmente pelos ensinamentos no HPLC.

Aos colegas do laboratório 218 por serem muito mais do que colegas, por terem sido verdadeiros amigos e companheiros de laboratório e por deixarem os dias muito mais fáceis, principalmente quando enfrentei dificuldades no trabalho. À Deise por ter sido meu braço direito e esquerdo, me ajudando muito na execução dos experimentos, na discussão dos resultados, com muita organização e competência. À Stela por ter “morado” comigo no laboratório, pelas conversas no fluxo, pelas trocas de ideias sempre produtivas e pela parceria em trabalhos. À Ana Paula e ao Daniel por sempre estarem dispostos a ajudar e discutir resultados (e pelo zimograma, nunca vou esquecer). À Renata e à Jamile por terem me ensinado quase tudo o que eu sei de biologia molecular. Ao Voltaire pelo chimarrão diário, pelas ideias para o trabalho e a criatividade que tanto nos faz rir. Às alunas de iniciação científica Virgínia, Juliana, Michele, Julise, Ana Paula Basso, Natália e Lívia por sempre me ajudarem nas horas de aperto. Aos meus ex-alunos de iniciação científica Maitê, Luiza e Adriano pelo auxílio valioso. Ao Lucas por sempre ser parceiro para trabalhos, para uma boa conversa e um

grande companheiro de congressos. À Lisianne pelo carinho, simpatia e pelas bactérias importantes para o trabalho. À Fernanda Leães, por ser minha companheira de programa e enfrentar todas as dificuldades junto comigo. À Roberta pelas conversas típicas de farmacêuticas (muito divertidas!!). À Silvana e Florência pelos ensinamentos e pelos exemplos como pesquisadoras. À Karla pelos trabalhos em conjunto (deixei ela com menos medo dos fungos) e pelas ótimas conversas no fluxo. À Patrícia, Simone, Cibele, Taís, Carlos e Carol pelo companheirismo e pela compreensão pelos longos tempos de cultivo. E por todos os colegas que passaram e foram importantes de certa forma para a realização deste trabalho.

Aos professores Carlos Termignoni (Centro de Biotecnologia), George Ortega (Faculdade de Farmácia) e Marisa da Costa (Instituto de Ciências Básicas da Saúde) por disponibilizar o liofilizador, para as inúmeras liofilizações requeridas. Aos professores Adelina Mezzari (Faculdade de Farmácia), Isa Beatriz Noll (ICTA) e Nelson Netto (UNICRUZ) pela doação de cepas fúngicas importantes para a realização do trabalho. Ao professor André Jablonski (Engenharia de Minas) por ter disponibilizado o HPLC e seu laboratório para as análises. Às professoras Patrícia da Silva Valente e Marilene Henning Vainsten (Centro de Biotecnologia) pelo auxílio constante no trabalho como minha comissão de acompanhamento, principalmente na realização de técnicas moleculares e nas sugestões muito pertinentes ao trabalho. À professora Fernanda Staniscuaski pelas correções minuciosas e detalhadas da dissertação.

Ao Ismael, pelo trabalho com as amebas, mas principalmente pela amizade, companheirismo e por deixar meu ano de 2010 muito (mas muito!) mais divertido. À Prof. Marilise Brittes por permitir a utilização do seu laboratório para a realização do trabalho e pelas dicas importantes.

À Michele e ao Tiago, pelos ensinamentos sobre fungos, principalmente sobre micotoxinas, por terem me ajudado tanto ao longo do mestrado.

Ao Jéferson pela disposição de trabalhar à noite e aos finais de semana, por responder a todas as perguntas infundadas e principalmente realizar diversas análises de massas em tão pouco tempo.

Ao Douglas, por ser a minha referência de pesquisador, por ser um exemplo de pessoa, por responder a todas as minhas perguntas (muito mais infundadas), por emprestar reagentes, vidrarias do seu laboratório, por topar fazer os experimentos mais malucos, por aguentar as minhas choradeiras, por me ensinar um pouco de química, por

entender sempre quando eu precisava estudar, pelo companheirismo no RU, mas principalmente por me amar incondicionalmente por mais de oito anos. Te amo muito.

À minha família querida, ao meu pai e minha mãe por terem me incentivado sempre a estudar e terem sempre me dado as melhores condições para isso. Por terem sempre me apoiado em todas as minhas escolhas, por sempre me levarem ao campus nos finais de semana e feriados, por aguentar todas as minhas choradeiras (que foram muitas) ao longo da faculdade e do mestrado, por serem exemplos de pessoas corretas, honestas, batalhadoras que sempre estão dispostos a ajudar. Por sempre terem facilitado a minha vida para que eu pudesse estudar. Ao meu irmão, que sempre me apoiou, que me diverte muito, que me consola quando estou triste e desanimada e que é o meu companheiro de estudo e de T10. Amo muito vocês.

# ÍNDICE

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	
2.1. Fungos	15
2.1.1. Fungos Filamentosos	17
2.2. Metabólitos Primários	19
2.3. Metabólitos Secundários	20
2.3.1. Pigmentos	22
2.3.2. Micotoxinas	29
2.3.3. Antibióticos	30
2.4. Uso de Resíduos Agroindustriais em Processos Fermentativos	35
2.4.1. Fermentação Submersa	36
2.4.2. Fermentação em Estado Sólido	38
2.5. Técnicas para Identificação de Metabólitos Secundários	39
<b>3 OBJETIVOS</b>	40
<b>4 CAPÍTULOS</b>	
4.1. Molecular identification of pigment-producing Fungi	41
<b>Dados Complementares 1:</b> Atividades Biológicas de Filtrados Fúngicos	65
4.2. Active Metabolites produced by <i>Penicillium chrysogenum</i> on agro-industrial residues	70
<b>Dados Complementares 2:</b> Identificação e quantificação de penicilina G produzida por <i>Penicillium chrysogenum</i> em resíduos agroindustriais	96
<b>5 ANEXO</b>	
5.1. Curvas de crescimento de fungos filamentosos	101
<b>6 DISCUSSÃO GERAL</b>	106
<b>7 CONCLUSÕES</b>	111
<b>8 PERSPECTIVAS</b>	112
<b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	113
<b>10 CURRICULUM VITAE</b>	126

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ATCC: American Type Culture Collection

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

Da: Daltons

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

ESI: Ionização por Electrospray

FDA: Food and Drug Administration

FT-IR: Espectroscopia no infravermelho associada com Transformada de Fourier

GRAS: Generally recognized as Safe (Geralmente reconhecido como Seguro)

HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A

HPLC: High Pressure Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

HPLC-DAD: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de diodo

ITS: Internal Transcribed Spacer (espaçador interno transcrito)

MIC: Minimum Inhibitory Concentration (Concentração mínima inibitória)

MS: Mass spectrometry (Espectrometria de massas)

PCR: Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

PDA: Potato Dextrose Agar (Ágar Batata Dextrose)

PDB: Potato Dextrose Broth (Caldo Batata Dextrose)

PEG: Polietilenoglicol

PenG: Penicilina G

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

Rpm: Rotações por minuto

SCP: Single-cell protein

SDS-PAGE: Eletroforese em Gel de Acrilamida Desnaturante utilizando SDS (Dodecil Sulfato de Sódio)

SmF: Fermentação Submersa

SSF: Fermentação em Estado Sólido

Tris: Hidroximetilaminometano

TSA: Ágar triptona de soja

## RESUMO

Fungos filamentosos produzem uma ampla diversidade de metabólitos secundários que tem significativo impacto na sociedade. Alguns metabólitos são explorados pela sua atividade como antibióticos e fármacos e outros estão envolvidos em doenças, na interação dos fungos com plantas e animais. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi obter metabólitos secundários como pigmentos e metabólitos biologicamente ativos produzidos por fungos filamentosos. Foram selecionadas cinco linhagens sendo elas *Diplodia* sp, *Fusarium graminearum*, *Monascus purpureus*, *Penicillium expansum* e *Penicillium* sp. Estes fungos foram selecionados devido à sua capacidade de produzir e secretar pigmentos em meio ágar batata dextrose. Para confirmação ou identificação em nível de espécie dos fungos, foram utilizados o sequenciamento parcial da região intergênica (ITS) do DNA ribossomal e uma região do gene da  $\beta$ -tubulina. Quatro dos cinco fungos foram identificados como *Fusarium graminearum*, *Monascus purpureus* e duas linhagens de *Penicillium chrysogenum* (linhagens 1 e 2), sendo os *primers* para região ITS mais adequados para a identificação em nível de espécie. As quatro linhagens produziram pigmentos em resíduos agroindustriais sob cultivo submerso. Devido à diversidade de metabólitos com atividades antibióticas produzidos por fungos filamentosos, estes filtrados coloridos foram testados contra fungos e bactérias, sendo que de quinze filtrados testados onze apresentaram inibição contra fungos e bactérias de importância médica, alimentar e agrônômica. Os filtrados de resíduo de uva e soro de queijo do fungo *Penicillium chrysogenum* 1 se destacaram, apresentando, também, atividade amebicida contra linhagem de *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461. Utilizando a técnica ESI-MS, foi realizado um perfil metabólico do filtrado de soro de queijo, sendo confirmada a presença de penicilina G, pela massa molar protonada e pelo perfil de fragmentação por ESI-MS/MS. Além disso, foi sugerida a presença dos metabólitos penicilina V e rugulosina, com comprovada atividade antibiótica. Portanto, o fungo *Penicillium chrysogenum* 1 foi selecionado para estudos futuros de caracterização dos pigmentos produzidos e análise mais detalhada dos metabólitos ativos, devido ao *status GRAS* atribuído a essa espécie, aos poucos estudos relacionados à produção de pigmentos e ao potencial de produzir metabólitos ativos em resíduos agroindustriais.

## ABSTRACT

Filamentous fungi produce a diverse array of secondary metabolites that have a remarkable impact on society. Some metabolites are exploited for their antibiotic and pharmaceutical activities, other are involved in diseases, due to the fungi interactions with plants or animals. In this context, the goal of this work was the obtention of secondary metabolites as pigments and biologically active metabolites produced by filamentous fungi. Five strains were selected *Diplodia* sp, *Fusarium graminearum*, *Monascus purpureus*, *Penicillium expansum* and *Penicillium* sp. These fungi were selected due to the ability to produce and secrete pigments on potato dextrose agar. To confirm and/or identify the fungi at species level, we used the partial sequencing of the intergenic region (ITS) of the ribosomal DNA and a region of the  $\beta$ -tubulin gene. Four of the five fungi were identified as *Fusarium graminearum*, *Monascus purpureus* and two strains of *Penicillium chrysogenum* (strains 1 and 2) and the primers to the ITS region were more suitable for the identification at species. The four strains produced pigments on agro-industrial residues under submerged culture. Because of the diversity of antibiotic activity metabolites produced by fungi, these coloured filtrates were tested against fungi and bacteria. From the fifteen tested filtrates, eleven showed inhibition against bacteria and fungi with medical, food and agronomical importance. The filtrates of grape waste and cheese whey of the fungus *Penicillium chrysogenum* 1 showed higher activity, including, amoebicidal activity against a strain of *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461. Using an ESI-MS approach, a metabolic profile was obtained for the cheese whey filtrate, being confirmed the presence of penicillin G, because of the protonated molar mass and the fragmentation profile by ESI-MS/MS. In addition, was suggested the presence of the metabolites penicillin V and rugulosin, all with proven antibiotic activity. Therefore, the fungus *Penicillium chrysogenum* 1 was selected for future studies as the characterization of the produced pigments and more detailed analysis of the active metabolites, due to the GRAS status attributed to this specie, to the few studies related to the pigments production and to the potential to produce active metabolites on agro-industrial residues.

## 1. INTRODUÇÃO

Fungos filamentosos são organismos metabolicamente ativos que são explorados comercialmente como fábricas celulares para a produção de enzimas e uma grande variedade de metabólitos. São conhecidas diversas fontes de compostos bioativos e a pesquisa para o isolamento de novos metabólitos fúngicos, que teve início há muitos anos atrás, ainda continua muito ativa (ARCHER *et al.*, 2008; SUN *et al.*, 2010). Produtos naturais de fungos tem sido fármacos revolucionários contra diversas doenças, e também tem servido como inspiração para fármacos inovadores (JIANG & AN, 2000). Alguns compostos incluem o antibiótico penicilina, o imunossupressor ciclosporina e o agente hipocolesterolemizante lovastatina. Um levantamento bibliográfico abrangendo mais de 23.000 produtos microbianos bioativos incluindo agentes antifúngicos, antibacterianos, antivirais, citotóxicos e imunossupressores, demonstra que as linhagens produtoras são principalmente pertencentes ao Reino Fungi (cerca de 42%), seguido por linhagens pertencentes ao gênero *Streptomyces* (32,1%) (BRAKHAGE & SCHROECKH, 2010).

Metabólitos fúngicos ainda pouco explorados são os pigmentos. A produção de pigmentos fúngicos é uma área nova, em expansão e apresenta um potencial biotecnológico muito atraente (DURÁN *et al.*, 2004). Fungos do gênero *Monascus* são conhecidos pela habilidade de produzir pigmentos amarelos, laranjas e vermelhos que tem sido utilizados tradicionalmente em países asiáticos como corantes de alimentos (FENICE *et al.*, 2000). Porém, os pigmentos podem apresentar outras atividades biológicas, além de atuarem como corantes. Há relatos que os pigmentos alaranjados de *Monascus* apresentam atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, alguns fungos filamentosos e leveduras (KIM *et al.*, 2006). Outras atividades biológicas também são reportadas aos pigmentos fúngicos, como propriedades antioxidantes e citotoxicidade a células tumorais.

A descoberta de novos metabólitos ativos de origem microbiana é um desafio que pode trazer benefícios substanciais. A desatenção a alguns micro-organismos específicos e aos seus *habitats*, juntamente com o desinteresse em fungos com crescimento lento, combinam para exacerbar a falta de estudos relacionados a estes micro-organismos. Por isso, muitos grupos taxonômicos e ecológicos de fungos não tem sido explorados sistematicamente para a busca por metabólitos secundários, mesmo

apresentando evidências diretas ou indiretas na literatura sobre seu potencial nessa área (GLOER, 2007). Além disso, a maioria dos metabólitos bioativos foram obtidos de micro-organismos cultiváveis (<1%) e isto significa que a grande maioria não foi estudada para a busca por metabólitos secundários. Com o desenvolvimento de tecnologias como a metagenômica será possível explorar esta biodiversidade para a produção de novas moléculas (SINGH & MACDONALD, 2010).

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante os fungos tornaram-se aptos a utilizar novas fontes de carbono e podem ser hospedeiros para a produção de proteínas heterólogas. Outro campo de pesquisa promissor é o das tecnologias denominadas “-ômicas”. Estas tecnologias são baseadas na análise global da expressão gênica (transcriptômica), de proteínas (proteômica) e da produção de metabólitos (metabolômica) ao nível do organismo completo (EL-ENSHASY *et al.*, 2007; SHU, 2007). Portanto, devido às novas tecnologias e à biodiversidade de fungos ainda inexplorada, à grande biodisponibilidade de recursos naturais, principalmente em um país como o Brasil, e às novas técnicas de fermentação disponíveis será possível realizar novos estudos de bioprospecção para a busca por novos fármacos ou protótipos, além de outros compostos de interesse industrial.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. FUNGOS

Os fungos são organismos muito importantes, não somente devido ao seu papel vital no ecossistema, mas também por causa da sua influência sobre os humanos e em atividades relacionadas. São seres eucarióticos heterotróficos, altamente eficientes na degradação de uma ampla gama de substratos. Ocorrem em associação com outras espécies, por exemplo líquens ou micorrizas, como patógenos de animais e plantas ou como espécies de vida livre. Sua nutrição é feita por absorção, graças à presença de enzimas, as quais são produzidas por eles e utilizadas para a degradação dos nutrientes (AZEVEDO, 1997; ESPOSITO & AZEVEDO, 2004; MUELLER & SCHMIT, 2007).

É difícil generalizar características dos fungos devido à diversidade ecológica, fisiológica e morfológica dentro do Reino Fungi, no qual são reconhecidos três grupos distintos: fungos filamentosos, leveduras e cogumelos, sendo os dois primeiros considerados fungos microscópicos e o último macroscópico. Constituem um reino muito grande e heterogêneo, sendo encontrados virtualmente em qualquer nicho ecológico. Segundo um levantamento realizado, estima-se que existam cerca de 1,5 milhões de espécies fúngicas, sendo que destas apenas foram descritas cerca de 74 mil. Excluindo-se os insetos, os fungos constituem os mais numerosos seres vivos existentes (JIANG & AN, 2000; ESPOSITO & AZEVEDO, 2004; ARCHER *et al.*, 2008).

Muitos dos fungos conhecidos tem um impacto negativo no bem estar humano como agentes que causam doenças em plantas, na biodeterioração e como patógenos de animais, tanto como produtores de micotoxinas quanto como causadores de micoses. Porém, entre as espécies microscópicas, os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Saccharomyces* são os mais conhecidos por seu impacto positivo para os humanos (BENNETT, 1998). Entre os fungos filamentosos, algumas espécies são importantes industrialmente como *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Acremonium chrysogenum* e *Penicillium chrysogenum*. Estes micro-organismos possuem o *status GRAS* (*Generally recognized as safe*) de acordo com o *FDA* (*Food and Drug Administration*), devido à longa história de uso por indústrias de alimentos e de bebidas, o que possibilitou a aquisição de experiência em sua manipulação (RADZIO & KÜCK, 1997; IWASHITA, 2002). Alguns exemplos de fungos filamentosos e sua produção de metabólitos ativos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Compostos de importância industrial produzidos por fungos filamentosos

Composto	Fungos Filamentosos	Principal área de aplicação
<b>Metabólitos primários</b>		
Ácido Cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	Indústria de alimentos e de bebidas
Ácido Itacônico	<i>A. terreus</i>	Indústria de polímeros
$\alpha$ -amilase	<i>A. niger, A. oryzae</i>	Processamento de amido e indústria de alimentos
Quimosina	<i>A. niger</i>	Indústria de alimentos
Celulase	<i>Trichoderma viride, T. reesei, Humicola insolens, Penicillium funiculosum</i>	Indústria têxtil e papelreira
Lipase	<i>A. niger, A. oryzae</i>	Indústria de alimentos e de detergentes
Protease	<i>A. niger, A. oryzae, A. melleus, Rhizopus delemar</i>	Indústria de alimentos e de detergentes
Renina	<i>Mucor miehei, M. pusillus</i>	Indústria de alimentos
<b>Metabólitos Secundários</b>		
Alcalóides do Ergot	<i>Claviceps purpurea</i>	Indústria farmacêutica (tratamento para enxaqueca)
Cefalosporina	<i>Acremonium chrysogenum</i>	Indústria farmacêutica (antibiótico)
Ciclosporina	<i>Tolypocladium nivenum</i>	Indústria farmacêutica (imunossupressor)
Giberelina	<i>Fusarium moniliforme</i>	Indústria agrônômica (hormônio de crescimento de plantas)
Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Indústria farmacêutica (agente antifúngico)
Lovastatina	<i>Monascus ruber, A. terreus</i>	Indústria farmacêutica (hipocolesterolemiante)
Penicilina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Indústria farmacêutica (antibiótico)

Fontes: BENNETT (1998); JIANG & AN (2000); MEYER (2008).

Entre os fungos microscópicos, as leveduras são os micro-organismos mais intensamente utilizados em indústrias. Estas são cultivadas visando à obtenção das células propriamente ditas, seus componentes celulares e os produtos finais durante a fermentação alcoólica. As células de leveduras são também empregadas na produção de pães e como fontes de alimentos, vitaminas e outros fatores de crescimento. A fermentação em larga escala realizada por leveduras é responsável pela produção de álcool para uso industrial; porém, são mais conhecidas por seu papel na produção de bebidas alcoólicas (MADIGAN *et al.*, 2004). Além disso, tem sido utilizadas desde o começo da década de 1980 para a produção heteróloga em larga escala de proteínas intra e extracelulares de humanos, animais e plantas (LIN CEREGHINO & CREGG, 1999). Devido à importância econômica dos processos biotecnológicos envolvendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, seja na panificação, na produção de cerveja, vinho e outras bebidas alcoólicas ou ainda na produção de um combustível alternativo e renovável (bioetanol), este micro-organismo pode ser considerado o eucarioto mais estudado e cujo metabolismo é o mais conhecido, recebendo, também, o *status GRAS* (GUIMARÃES, 2005).

Entre os fungos macroscópicos, estão em destaque os cogumelos comestíveis que sempre foram apreciados por seu valor gastronômico, nutricional e medicinal. Mundialmente, mais de 30 espécies são cultivadas ou vendidas comercialmente, apesar de cerca de 2.000 espécies serem consideradas comestíveis. A espécie *Agaricus bisporus* é a mais amplamente cultivada nos Estados Unidos, Europa e Australásia (ROUPAS *et al.*, 2010). Pesquisas recentes indicam atributos medicinais a diversas espécies de cogumelos, como efeitos antivirais, antibacterianos, antiparasitários, antitumorais, antihipertensivos, antiateroscleróticos, hepatoprotetores, antidiabéticos, antiinflamatórios e moduladores do sistema imune (PHILIPPOUSSIS, 2009). Contudo, algumas espécies destes fungos podem ser venenosas ou apresentar substâncias alucinógenas (EIRA, 2004).

### **2.1.1. FUNGOS FILAMENTOSOS**

A habilidade dos fungos filamentosos de crescer em substratos simples e de baixo custo, bem como sua capacidade de produzir diversos metabólitos, tem despertado o interesse para o uso biotecnológico desses micro-organismos (MEYER, 2008). Apresentam importantes propriedades que desempenham um papel significativo no estilo de vida humano e no ambiente pela participação na produção de alimentos, nos

produtos para saúde e na reciclagem de compostos na biosfera (HAJJAJ *et al.*, 2000). São usados em muitos processos industriais como na produção de enzimas, vitaminas, polissacarídeos, polióis, pigmentos, lipídios e glicolipídios. Alguns destes são comercializados, enquanto outros são potencialmente valiosos em biotecnologia (ADRIO & DEMAIN, 2003).

Com o desenvolvimento da engenharia genética e da biologia molecular, fungos filamentosos tem recebido maior atenção para sua utilização como produtores de proteínas recombinantes. As vantagens de utilizar fungos filamentosos como hospedeiro incluem a sua habilidade natural de secretar uma variedade de proteínas em grande quantidade e seu intensivo uso em bioprocessos. O gênero *Aspergillus*, em particular, tem sido utilizado com muito sucesso para a produção de proteínas recombinantes, tanto de origem fúngica como de outras fontes. Alguns exemplos são glicoamilase, quimosina bovina, lactoferrina humana, interleucina-6 humana e taumatina (WANG *et al.*, 2005; SHARMA *et al.*, 2009).

Micro-organismos podem ser utilizados como fonte de agentes ativos, uma vez que produtos naturais tem um papel importante no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de doenças de humanos. Muitos desses produtos são atualmente produzidos por fermentação microbiana ou são derivados de modificação química de um produto microbiano (SILVA *et al.*, 2004). Os fungos, em particular, são importantes fontes de novos metabólitos com pronunciada atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral. Uma grande vantagem da prospecção química de metabólitos fúngicos em relação às demais fontes é o fato de que micro-organismos podem ser cultivados em larga escala em fermentadores, não havendo prejuízo ao ecossistema, como pode ocorrer com a retirada de plantas e algas de áreas naturais, nem problemas éticos como os que podem advir da prospecção de metabólitos bioativos a partir de insetos, anfíbios e outras espécies animais. Entre os fungos microscópicos, certos gêneros como *Aspergillus* e *Penicillium* (conhecidos por sua ubiquidade e caracterizados geralmente pela formação abundante de esporos) tem sido utilizados para a busca de compostos bioativos, sendo que de aproximadamente 6.500 metabólitos bioativos de fungos microscópicos, mais de 30% foram obtidos destes dois gêneros (TAKAHASHI & LUCAS, 2008; SURYANARAYANAN *et al.*, 2009).

A diversidade química atualmente conhecida, provida pelos fungos filamentosos, é muito pequena. Os genomas completamente sequenciados sugerem que a habilidade biossintética para a produção de produtos naturais vai muito além do

esperado pela análise química prévia ao projeto genoma (SCHNEIDER *et al.*, 2008). Recentemente, novas abordagens, consideradas promissoras na busca de compostos bioativos a partir de micro-organismos, tem sido discutidas na literatura. Entre elas destacam-se o co-cultivo simultâneo de micro-organismos (co-culturas), o remodelamento epigenético da biossíntese através de agentes químicos, o estudo sobre moléculas sinalizadoras ou “*quorum sensing*” e o uso de métodos genômicos para acessar e manipular as vias biossintéticas (GUIMARÃES, 2009).

A partir do metabolismo fúngico, pode-se dispor de diversos compostos naturais apresentando atividades biológicas. O metabolismo dos fungos pode ser dividido em duas partes: primário, o qual fornece energia e precursores químicos às células, que são essenciais para o crescimento e reprodução dos organismos; e o secundário que não aparenta ter função óbvia no crescimento celular (BRAKHAGE *et al.*, 2010).

## **2.2. METABÓLITOS PRIMÁRIOS**

Metabólitos primários são as pequenas moléculas produzidas ao longo do crescimento vegetativo. São usados em indústrias alimentícias e de ração incluindo álcoois (etanol), aminoácidos (glutamato monossódico, lisina, treonina, fenilalanina, triptofano), nucleotídeos flavorizantes (ácido 5-guanílico, ácido 5-inosínico), ácidos orgânicos (acético, propiônico, fumárico, láctico), polióis (glicerol, manitol, xilitol), polissacarídeos (xantana), açúcares (frutose, ribose) e vitaminas (riboflavina, cianocobalamina, biotina) (DEMAIN, 2000; RAJASEKARAN *et al.*, 2008).

Estudos relacionados à otimização de processos industriais podem ser realizados utilizando ferramentas como a genômica funcional. A genômica funcional é o estudo da função dos genes através da medição paralela da expressão de genomas, cujo objetivo final é associar a função de cada gene de um determinado organismo com sua expressão em diferentes condições (CERQUEIRA, 2004). O estudo da função dos genes em fungos filamentosos é um campo de pesquisa que tem apresentado grandes avanços (WELD *et al.*, 2006). Assim, a genômica funcional colaboraria no conhecimento dos metabólitos produzidos, de acordo com a expressão de determinados genes, para assim, atuar na melhoria de processos industriais, visando à maior produção de determinado metabólito, como por exemplo, a produção de um importante metabólito primário, o etanol.

### 2.3. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Metabólitos secundários são sintetizados quando o crescimento microbiano está na fase estacionária, são freqüentemente bioativos e de baixa massa molecular. Apresentam grande importância à humanidade, devido às atividades antibióticas e de importância farmacêutica, bem como atividades imunossupressoras e tóxicas. Estes não são normalmente derivados do substrato utilizado para o crescimento celular, sendo sintetizados a partir de um metabólito primário. Em geral, esses metabólitos parecem ser formados quando grandes quantidades de precursores de metabólitos primários, tais como aminoácidos, acetato, piruvato e outros, são acumulados. Apresentam algumas características como: distribuição taxonômica restrita - nem todas as linhagens de uma mesma espécie são capazes de produzir determinado metabólito-; não são essenciais para o crescimento e reprodução do organismo; condições de cultivo, especialmente a composição do meio, controlam a formação destes metabólitos; são produzidos como um grupo de estruturas intimamente relacionadas; podem ser superproduzidos e são codificados por conjuntos de genes dispensáveis (JAY, 2005; KELLER *et al.*, 2005; MARTÍN *et al.*, 2005; YU & KELLER, 2005; NIGAM, 2009).

Na natureza, metabólitos secundários são importantes para os organismos que os produzem, funcionando como (i) hormônios sexuais, (ii) ionóforos, (iii) “armas” competitivas contra bactérias, fungos, amebas, insetos e plantas, (iv) agentes de simbiose, (v) efetores de diferenciação e (vi) atividades desconhecidas (DEMAIN & ADRIANO, 2008). Metabólitos secundários são usualmente separados em cinco grupos: derivados de aminoácidos, peptídeos não ribossômicos, policetídeos, derivados de ácidos graxos e híbridos de policetídeos-peptídeos (KEMPKEN & ROHLFS, 2010; ROZE *et al.*, 2011).

Os genes para a biossíntese de metabólitos secundários são usualmente organizados em *clusters* nas linhagens produtoras. Estes *clusters* incluem, além dos genes que codificam as enzimas biossintéticas e as proteínas regulatórias, genes para resistência à ação tóxica dos metabólitos secundários (para evitar o suicídio das espécies produtoras) e genes para a secreção desses metabólitos (MARTÍN *et al.*, 2005). É usual que diferentes espécies de fungos tenham um ou mais metabólitos secundários em comum, sendo muitos deles produzidos por fungos filogeneticamente muito diferentes. Assim, mesmo que alguns *clusters* de genes para muitos destes metabólitos pareçam ter sido transferidos lateralmente, outros provavelmente tenham surgido de forma independente (FRISVAD *et al.*, 2008).

A síntese de metabólitos secundários pode garantir ao fungo vantagem em *habitats* no qual este necessita competir com outros micro-organismos. Portanto, muitos desses metabólitos apresentam efeitos tóxicos ou inibitórios em outros organismos (KHALDI *et al.*, 2010). Devido a essas propriedades bioativas, muitos destes tem sido adotados para o uso farmacêutico como os antibióticos, agentes hipocolesterolemiantes, inibidores tumorais e imunossupressores, sendo que, poucos metabólitos secundários de sucesso não apresentam atividade antibiótica. Outros produtos naturais de fungos tem impacto negativo para a sociedade, incluindo micotoxinas e compostos que causam aumento da virulência, que são produzidos por fungos patogênicos (DEMAIN, 1999; SHWAB & KELLER, 2008). O acoplamento do metabolismo secundário com o desenvolvimento morfológico dos fungos parece ser uma constante universal em fungos filamentosos e pode indicar mecanismos evolucionários subjacentes importantes na sobrevivência dos fungos e possivelmente em aspectos de patogênese (YU & KELLER, 2005).

Devido à distribuição inconsistente destes metabólitos por todo o Reino Fungi, esta se torna uma característica importante para a classificação e a identificação de fungos. A Quimiotaxonomia em fungos baseada em metabólitos secundários tem sido utilizada com sucesso em diversos gêneros de Ascomicetos como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Hypoxylon*, *Penicillium*, *Stachybotrys*, *Xylaria* e em poucos gêneros de Basidiomicetos, mas não em Zigomicetos e Quitridiomicetos (FRISVAD *et al.*, 2008). Na Figura 1, estão demonstradas, esquematicamente, as áreas de estudos envolvendo metabólitos primários e secundários.

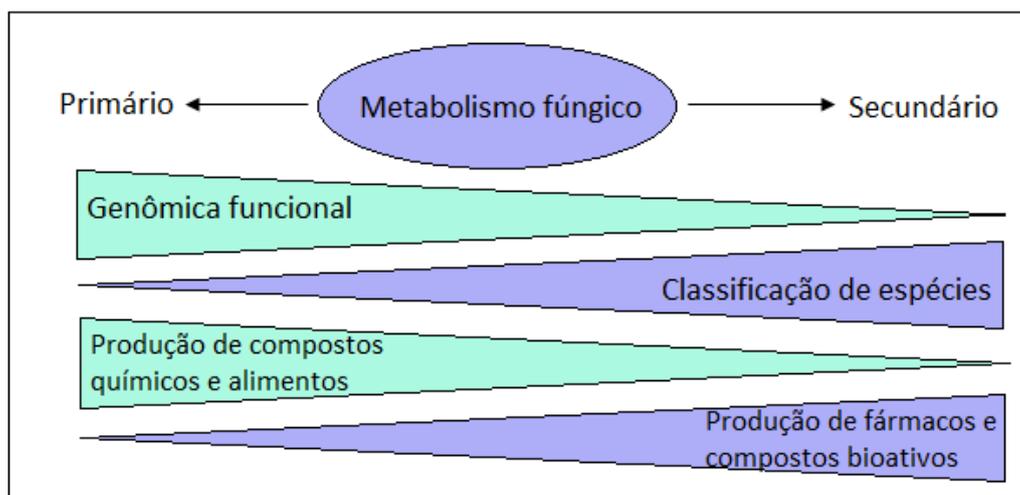


Figura 1: Direções na pesquisa do metabolismo fúngico. Adaptado de JEWETT *et al.*, 2006.

### 2.3.1. PIGMENTOS

Há um grande interesse mundial no desenvolvimento de processos para a produção de pigmentos de origem natural, devido a sérios problemas de segurança de muitos corantes artificiais sintéticos, que tem sido largamente utilizados nas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas (CHO *et al.*, 2002). Corantes sintéticos tendem a ser considerados indesejáveis e prejudiciais, sendo relatadas reações alérgicas e intolerância aos mesmos, além de outros efeitos tóxicos como mutagenicidade e potencial carcinogênico. Corantes sintéticos provenientes de indústrias têxteis e de tintas são liberados em grande quantidade para o ambiente. O despejo desses efluentes coloridos em rios e lagos interfere na penetração da luz solar na água, retardando a fotossíntese, inibindo o crescimento da biota aquática e interferindo com a solubilidade de gases nos corpos de água (CHANDER & ARORA, 2007; COUTO, 2009). Pigmentos naturais são menos prejudiciais ao ambiente, podendo exibir melhor biodegradabilidade e geralmente apresentando maior compatibilidade com o meio ambiente (NAGIA & EL-MOHAMEDY, 2007).

Pigmentos microbianos são uma alternativa promissora em relação a outros aditivos extraídos de animais ou vegetais, porque não apresentam problema de sazonalidade e podem ser superproduzidos (WISSGOTT & BORTLIK, 1996; MEINICKE, 2008). Além disso, alguns dos pigmentos microbianos podem ser produzidos a partir de resíduos agroindustriais, o que torna o processo mais favorável em termos financeiro e ambiental (BABITHA, 2009).

Fungos, particularmente ascomicetos, basidiomicetos (muitos cogumelos) e líquens (associação simbiótica de fungo com um organismo fotossintetizante, usualmente algas verdes ou cianobactérias), são conhecidos por sintetizar e secretar diversas classes de pigmentos que possuem uma grande variedade de cores. Cogumelos e líquens apresentam dificuldades de cultivo em condições laboratoriais, além disso, não são apropriados para produção em larga escala devido ao seu crescimento lento. Contudo, muitos ascomicetos são mais adequados para a produção de pigmentos, pois estes podem ser cultivados a fim de produzir grandes quantidades destes compostos. Microalgas também são conhecidas por produzir uma diversa gama de pigmentos hidrossolúveis, porém a baixa produtividade de culturas de algas, muitas vezes, tem sido um empecilho para a comercialização destes pigmentos (MAPARI *et al.*, 2005; MAPARI *et al.*, 2010).

Fungos filamentosos sintetizam pigmentos, pois estes tem uma função ecológica e são valiosos para o produtor. Estes pigmentos apresentam diversas funções como ação protetora contra foto-oxidação (carotenóides), proteção contra estresse ambiental (melaninas) e atuação como cofatores em catálise enzimática (flavinas) (BABITHA, 2009). Anteriormente, os pigmentos produzidos por fungos eram utilizados como ferramenta taxonômica para a identificação e diferenciação de espécies, não sendo estudados como potenciais corantes naturais (MAPARI *et al.*, 2005).

Os fungos pertencentes ao gênero *Monascus* vem sendo estudados por muitos anos como produtores de pigmentos naturais e tais compostos são usados como corantes de alimentos, em países orientais (TSENG *et al.*, 2000). Além do fungo *Monascus* sp, outros micro-organismos como os pertencentes ao gênero *Paecilomyces* sp também produzem pigmentos em tonalidades vermelhas, amarelas e violetas. Os fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* tem sido estudados como potenciais produtores de pigmentos naturais (MÉNDEZ-ZAVALA *et al.*, 2007) e, por isso, necessitam-se mais estudos acerca desses micro-organismos.

Os principais fatores que influenciam o crescimento e a produção de pigmentos são: composição do meio de cultivo, temperatura, presença de oxigênio, aeração, pH, fonte de nitrogênio e umidade (RODRIGUEZ, 2009). De acordo com BABITHA *et al.* (2008) estudos do efeito da luz sobre a produção de pigmentos indicam que a incubação no escuro foi mais efetiva em induzir a produção de pigmentos. Comportamento semelhante foi descrito por VELMURUGAN *et al.* (2010) que verificaram o efeito de luz na produção de pigmentos intra- e extracelulares e a produção de biomassa pelos fungos, revelando que a incubação em total escuro foi mais efetiva seguida pelas cores vermelha, azul e branca.

A notoriedade que os corantes naturais vem assumindo deve-se não só à tendência mundial de consumo de produtos naturais, mas também às propriedades funcionais atribuídas a alguns desses pigmentos. Os pigmentos de fungos podem ser ativos contra bactérias, leveduras, fungos, o protozoário *Leishmania braziliensis* e os insetos *Calliphora erythrocephala*. A atividade citotóxica de naftoquinonas contra leucemia em camundongos e células *HeLa* também tem sido relatada (DURÁN *et al.*, 2002; RODRIGUEZ, 2009).

A primeira história de sucesso na produção de pigmentos por micro-organismos na Europa foi a utilização do fungo filamentoso *Blakeslea* para a produção de  $\beta$ -caroteno. Esta fonte natural foi liberada em 1995 pelo Food Ingredients Europe

(DUFOSSE *et al.*, 2005). Segundo BABITHA (2009) a vantagem apresentada pelo  $\beta$ -caroteno de origem microbiana, que é uma mistura dos isômeros *cis* e *trans*, é o fato de apresentar efeitos terapêuticos contra o câncer, diferentemente do  $\beta$ -caroteno sintético (predominantemente *cis*) o qual não apresenta tais efeitos.

Outros pigmentos produzidos por micro-organismos e utilizados comercialmente são riboflavina (vitamina B2, um pigmento vermelho permitido em muitos países) por *Eremothecium ashbyii* e *Ashbya gossypi* e carotenóides produzidos por diversos micro-organismos. Contudo, os carotenóides comercializados são produzidos somente por microalgas, como o  $\beta$ -caroteno (por *Dunaliella salina* e *D. bardawil*), astaxantinas (por *Haematococcus pluvialis*) e ficobiliproteína como a ficocianina (um pigmento azul usado em alimentos e cosméticos) produzidos por *Spirulina* sp (CARVALHO, 2004). A aprovação recente de carotenóides, derivados de fungos filamentosos, como corantes de alimentos destaca o potencial da classe dos corantes policetídicos que é uma área de pesquisa ainda relativamente não explorada, com a exceção dos pigmentos de *Monascus* que são populares na Ásia (MAPARI *et al.*, 2010).

Para selecionar fungos como potenciais produtores de pigmentos estes devem satisfazer alguns critérios como: capacidade de utilizar uma grande variedade de fontes de carbono e nitrogênio, apresentar tolerância a diferentes valores de pH, temperaturas e minerais e produzir pigmentos em quantidade razoável. Além disso, não devem co-produzir micotoxinas nas condições de cultivo em questão, não devem ser patogênicos ao homem e devem ser de fácil manipulação genética (RAJASEKARAN *et al.*, 2008). Portanto, é necessário, primeiramente, conhecer a correta identificação do fungo que será estudado como produtor de pigmentos, para que assim seja possível o prévio conhecimento de possíveis metabólitos produzidos e de características do fungo que irão auxiliar em estudos posteriores.

### **2.3.1.1. POLICETÍDEOS**

Os policetídeos de origem fúngica constituem uma classe de metabólitos secundários, os quais apresentam uma grande diversidade estrutural incluindo diferentes tipos de pigmentos fúngicos não-carotenóides. Os policetídeos são biossintetizados por um conjunto de enzimas usualmente denominadas de policetídeo sintases (MAPARI *et al.*, 2006; PASTRE *et al.*, 2007). Muitos desses compostos, ou seus derivados são usados como fármacos, por exemplo o agente causador da diminuição do colesterol, lovastatina. Porém, muitos policetídeos causam danos severos à indústria de alimentos,

agricultura e à saúde humana. Importantes exemplos são a toxina-T, fumonisinas e aflatoxinas (SCHÜMANN & HERTWECK, 2006).

Além dos pigmentos de *Monascus*, diversos pigmentos não-carotenóides são produzidos por fungos filamentosos, exibindo uma grande diversidade estrutural e química e com uma extraordinária diversidade de cores. Biossinteticamente, a maioria são do tipo policetídeo (MAPARI *et al.*, 2009). Estes variam em estrutura de tetracetídeos a octacetídeos, que apresentam quatro ou oito unidades de C<sub>2</sub> que contribuem para a cadeia policetídica. Classes representativas incluem antraquinonas, hidroxiantraquinonas, naftoquinonas e azafilonas, cada qual exibindo uma variedade de nuances de cores (MAPARI *et al.*, 2010).

### **2.3.1.2. O GÊNERO *Monascus***

O gênero *Monascus* inclui três principais espécies (*M. pilosus*, *M. purpureus* e *M. ruber*), cuja característica mais importante é a habilidade de produzir metabólitos secundários com estrutura policetídica, principalmente pigmentos (CARVALHO *et al.*, 2005). Pigmentos de *Monascus* constituem um grupo de metabólitos chamados de azafilonas, os quais são sintetizados a partir de policetídeos cromóforos e β – cetoácidos por esterificação (SILVEIRA *et al.*, 2008). Os pigmentos de *Monascus* são compostos de mais de dez componentes, seis dos quais são bem conhecidos, incluindo os amarelos como monascina e ankaflavina, os laranjas como monascorubina e rubropunctatina e os vermelhos monascorubramina e rubropunctamina (KIM *et al.*, 2006). Além desses metabólitos conhecidos e estruturalmente caracterizados, novos metabólitos e pigmentos tem sido isolados. A estrutura química destes compostos foi caracterizada como ankalactona, monascolidona, monascopiridina, monasfluore, monaspurpurona, monarubrina, rubropunctina, xantomonasina A e B e monankarinas (MAPARI *et al.*, 2008a; MUKHERJEE & SINGH, 2011). Os pigmentos livres são insolúveis em água, mas quando complexados com proteínas e peptídeos no meio de cultura, tornam-se solúveis em meio aquoso (WATANABE & TERABE, 2000).

Pigmentos de *Monascus* são tradicionalmente utilizados nos países orientais asiáticos, principalmente no sul da China, Taiwan, Japão e Indonésia. O fungo é utilizado na fermentação de produtos tradicionais da culinária oriental como o arroz vermelho fermentado, em produtos à base de soja e algumas bebidas. Já os pigmentos tem sido utilizados para colorir o vinho de arroz vermelho, queijo de soja vermelho, produtos de pescado e comidas vermelhas. Devido ao seu potencial de aplicação na

coloração de vários alimentos, tem sido intensivamente pesquisados nas últimas décadas. Atualmente esses pigmentos estão substituindo os sais de nitrito, precursores das nitrosaminas, as quais são altamente tóxicas a sistemas biológicos - são utilizadas em ratos de laboratório para induzir câncer- (HAJJAJ *et al.*, 2000; RODRIGUEZ, 2009) Em humanos, o consumo de nitrito de sódio tem forte correlação com tumores cerebrais, leucemia e cânceres do trato digestório (BABITHA, 2009). Outros metabólitos de espécies de *Monascus*, como álcoois, ácidos orgânicos, agentes antimicrobianos, substâncias com atividade terapêutica e enzimas tem sido descritos (DAROIT *et al.*, 2007). Alguns compostos bioativos incluem monacolina K (lovastatina), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e antioxidantes (SHINZATO *et al.*, 2009).

A espécie *Monascus ruber* produz monacolina K (lovastatina, mevinolina) sob fermentação submersa. A lovastatina revolucionou o tratamento da hipercolesterolemia, sendo um potente inibidor competitivo da HMG-CoA redutase, a enzima limitante na biossíntese de colesterol. Ela é ativa na inibição da biossíntese de colesterol não somente *in vitro*, mas também *in vivo* para a diminuição dos níveis de colesterol plasmático em humanos e animais. A lovastatina também tem sido produzida por outras espécies de *Monascus*, além de *Aspergillus terreus*, algumas espécies de *Penicillium*, *Hypomyces*, *Doratomyces*, *Phoma*, *Eupenicillium*, *Gymnoascus* e *Trichoderma*. Sendo que, comercialmente, esta substância é produzida pelos fungos *Aspergillus terreus* e *Monascus ruber* (CHANG *et al.*, 2002; SERAMAN *et al.*, 2010).

O uso dos corantes produzidos por espécies de *Monascus* ainda não é regulamentado na União Européia, Estados Unidos e Brasil, entre outras regiões. Linhagens de *Monascus* podem produzir uma micotoxina denominada citrinina, que é uma substância nefrotóxica e que também apresenta propriedades antibióticas de largo espectro, principalmente contra bactérias gram-positivas (CARVALHO *et al.*, 2005).

A atividade biológica dos extratos pigmentados de *Monascus purpureus* inclui sua atividade antibiótica contra bactérias, leveduras e fungos filamentosos, bem como sua embriotoxicidade, teratogenicidade, propriedades imunossupressivas e antioxidantes. Estas atividades dependem da presença dos componentes alaranjados (monascorubrina e rubropunctatina). Em certas condições de cultivo os pigmentos vermelhos (monascorubramina e rubropunctamina) retêm certa atividade biológica. Já quando estudadas as atividades biológicas de pigmentos de outras espécies de *Monascus*, estes apresentaram forte atividade contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, uma fraca atividade contra *Escherichia coli* e *Streptomyces griseus* e não

apresentaram atividade contra fungos filamentosos, leveduras e *Sarcina flava* (DURÁN *et al.*, 2002; MUKHERJEE & SINGH, 2011).

Portanto, fungos do gênero *Monascus* são promissoras fontes de corantes naturais e de redutores do colesterol. Contudo, antes de efetivamente utilizar *Monascus* em alimentos ou em suplementos dietéticos, é importante selecionar e controlar as condições de fermentação para obter grandes quantidades das substâncias requeridas como pigmentos ou lovastatina, porém com baixa concentração ou ausência de citrinina (PATTANAGUL *et al.*, 2007).

### 2.3.1.3. IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS

Tradicionalmente, a identificação de fungos filamentosos está baseada principalmente em características morfológicas, microscópicas e macroscópicas. No entanto, esse método exige tempo e nem sempre apresenta resultados precisos, o que pode levar, muitas vezes, a diagnósticos e interpretações incorretas dos resultados. O fato de alguns analistas não possuírem conhecimento específico e experiência para identificar fungos pelos métodos convencionais, contribui para este quadro (HORISAWA *et al.*, 2009, WACULICZ-ANDRADE, 2009).

Devido à sua especificidade e sensibilidade, a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é um método importante para a identificação de fungos. A identificação molecular em nível de espécie tem sido baseada, na maioria das vezes, no uso da região ITS do DNA ribossômico. O DNA que codifica para o RNA ribossomal apresenta-se como um *cluster* gênico, no qual se tem o gene 18S, o gene 5,8S e o gene 28S. Estes genes são separados por regiões denominadas ITS1 e ITS2, as quais são transcritas e processadas para dar origem ao RNA ribossômico maduro (Figura 2). O fato desse *cluster* gênico apresentar algumas regiões altamente conservadas e outras variáveis, tem permitido a análise de variação de diferentes níveis taxonômicos. As regiões ITS evoluem rapidamente e, então, são apropriadas para discriminar espécies relacionadas ou até mesmo variedades de uma mesma espécie. O fato das regiões ITS serem flanqueadas por segmentos conservados, serem relativamente curtas (500 a 800 pb) e aparecerem em grande número de cópias no genoma, permitem que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade. Como consequência disso, é grande o número de seqüências ITS de diferentes fungos que estão atualmente disponíveis nos bancos de dados de seqüências de nucleotídeos (FUNGARO, 2000; MICHAELSEN *et al.*, 2006).

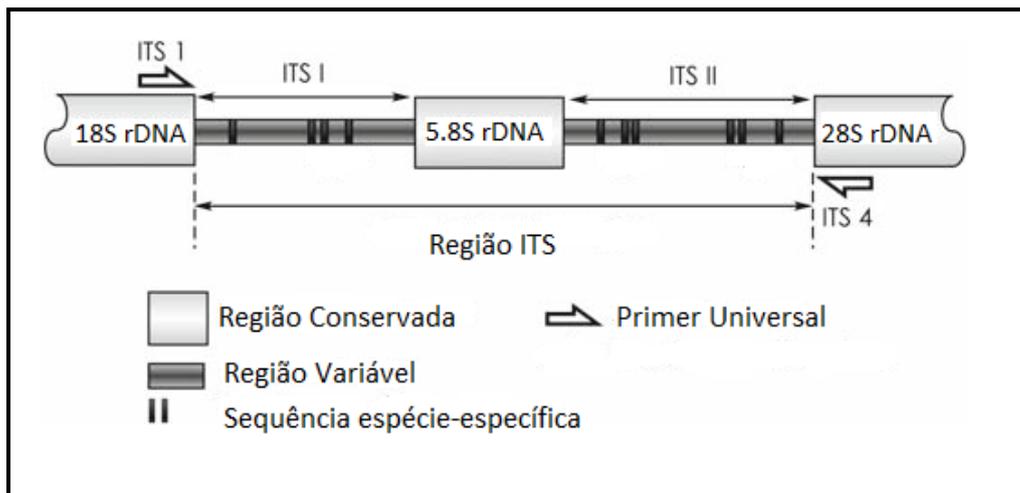


Figura 2: Diagrama esquemático da região ITS que inclui ITS 1, ITS 2 e 5.8S rDNA. Os *primers* universais ITS1 e ITS4 também estão demonstrados. Adaptado de HORISAWA *et al.*, 2009.

Além da região ITS, o gene da  $\beta$ -tubulina está entre os mais proeminentes genes utilizados para o diagnóstico fúngico. Contudo, os bancos de dados para sequências desse gene não são tão abundantes quanto do DNA ribossomal (BRUNNER *et al.*, 2007). Os genes para  $\beta$ -tubulina estão recebendo maior atenção na investigação de relações evolutivas, pois as tubulinas apresentam um alto grau de conservação em nível de aminoácidos e nucleotídeos, porém um alto grau de variabilidade nas regiões intrônicas (EINAX & VOIGT, 2003; LOPPNAU & BREUIL, 2003). As posições dos íntrons dentro dos genes de  $\beta$ -tubulina podem fornecer algumas pistas a respeito das relações evolutivas entre as espécies (MSISKA & MORTON, 2009). Além disso, genes codificantes de proteínas acumulam poucas mutações e são menos variáveis entre as poucas cópias que a maioria dos genomas contém (EINAX & VOIGT, 2003). Na Figura 3 está demonstrada a estrutura genômica do gene da  $\beta$ -tubulina de *Neurospora crassa*.

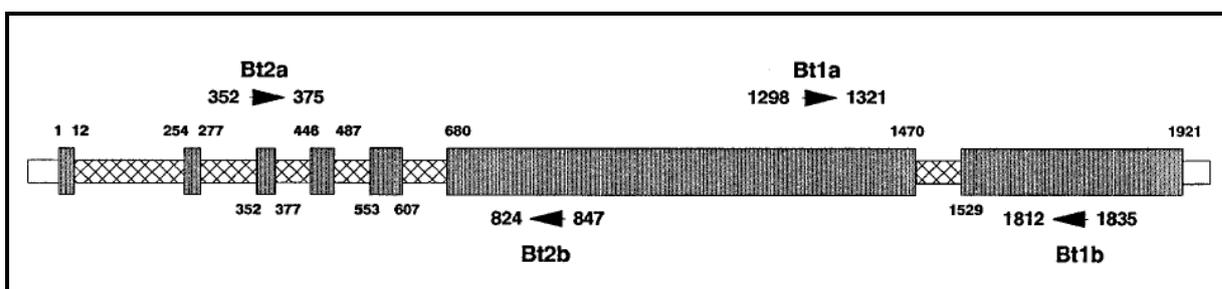


Figura 3: Estrutura genômica do gene da  $\beta$ -tubulina de *Neurospora crassa*. As regiões sombreadas denotam éxons e as regiões hachuradas denotam íntrons. As regiões brancas

denotam sequências em torno da região codificadora de proteína de cada gene. Bt2a e b, Bt1a e b são pares de *primers* comumente utilizados para a identificação de fungos. Retirado de GLASS & DONALDSON, 1995.

Atualmente, outros métodos são empregados para identificar fungos como a espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF ICMS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Intact Cell Mass Spectrometry). O diferencial desta técnica, é que as massas moleculares observadas variam entre 2.000 e 20.000 Da, onde poucos metabólitos aparecem, o que se torna uma vantagem, pois esses metabólitos podem ser utilizados como biomarcadores (SANTOS *et al.*, 2010). Outras técnicas citadas por HORISAWA *et al.* (2009) são SDS-PAGE para determinar perfis protéicos, métodos imunológicos e espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR). A última técnica tem sido descrita como uma ferramenta sensível para a detecção de biomoléculas ou metabólitos, com rapidez, efetividade e sem a necessidade de utilização de reagentes. Além disso, é aplicável a todos os micro-organismos e requer pequena quantidade de biomassa (SANTOS *et al.*, 2010a).

### 2.3.2. MICOTOXINAS

Algumas espécies de fungos produzem substâncias químicas causadoras de efeitos tóxicos quando ingeridas por animais e humanos por meio de alimentos. Essas substâncias são denominadas de micotoxinas, que são metabólitos secundários extremamente tóxicos, podendo ocorrer em grãos como: arroz, amendoim, milho e algodão. São produzidas por muitas espécies dos fungos *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Estes estão associados à produção de aflatoxinas, ocratoxina, esterigmatocistina, patulina, rubratoxina B, ácido penicílico, citrinina, zearalenona e tricotecenos (PASTORE & MACEDO, 2004).

Devido ao grande número de metabólitos produzidos por fungos, ficou definido que para uma substância ser caracterizada como micotoxina, esta deve satisfazer os seguintes critérios: ser causadora de doença em homens ou animais, ocorrer na natureza, ser produzida por fungo e ser aguda ou cronicamente tóxica. Em estudos toxicológicos comprovou-se que algumas toxinas possuem a dose letal menor que 5 mg/kg de peso corpóreo, causando uma grande variedade de desordens, dependendo da natureza da toxina, da dose ingerida, do fungo associado à sua produção, da idade e do estado nutricional do intoxicado (ONO *et al.*, 2004; PASTORE & MACEDO, 2004). Alguns

dos problemas de saúde relatados são danos ao fígado, rins e sistema nervoso, além de imunossupressão e carcinogênese (XU *et al.*, 2006). Mesmo que a verdadeira toxicidade de muitas micotoxinas ainda não tenha sido demonstrada para humanos, o efeito desses compostos em animais de laboratório e em ensaios *in vitro* deixa poucas dúvidas a respeito de sua toxicidade potencial (JAY, 2005).

Alguns fatores no cultivo interferem na produção de micotoxinas, segundo CARVALHO (2004), a fonte de nitrogênio usada pode influenciar na produção de citrinina: para a mesma cepa de *M. ruber* em meio sintético com etanol, a produção de citrinina vai de 0 mg/L usando metionina como fonte de nitrogênio até 100 mg/L usando nitrato de amônio. HAJJAJ *et al.* (2000), relataram que em condições de alto suplemento de oxigênio, a produção de citrinina foi favorecida. O cultivo sob luz branca demonstrou diminuir a produção de micotoxinas em *Aspergillus flavus* e em uma linhagem mutante de *Aspergillus parasiticus*. Já a luz azul causou a inibição das micotoxinas alternariol e alternariol monometiléter, ambos policetídeos produzidos por *Alternaria alternata* (HÄGGBLÖM & UNESTAM, 1979).

### 2.3.3. ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos são os metabólitos secundários mais conhecidos. Esta notável classe de compostos forma um grupo heterogêneo de moléculas biologicamente ativas com diferentes estruturas e modos de ação. Atuam sobre DNA, RNA, síntese de proteínas, na função da membrana plasmática, no transporte de elétrons, esporulação, germinação e muitos outros alvos (DEMAIN, 2000).

Os primeiros relatos do uso de antibióticos pelo homem são muito antigos, como a descrição do uso de sapatos mofados por chineses para curar feridas infeccionadas nos pés (3000 anos a.C.). Porém, a apreciação científica da importância dos metabólitos secundários de fungos apresentou expansão na década de 1940 devido ao massivo impacto que a penicilina causou à saúde humana. Esta substância é produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, cuja capacidade de inibição do crescimento bacteriano foi descoberta acidentalmente por Fleming, em 1928. Seu emprego em larga escala no início da década de 1940, fruto dos esforços dos pesquisadores ingleses Florey e Chain, levou à redução do índice de mortalidade de soldados de 39% durante a Primeira Guerra Mundial para 3,9%, na Segunda Guerra. O grande impacto do uso da penicilina motivou sua produção industrial, sendo este o primeiro medicamento produzido em grande escala, originando, portanto, a indústria farmacêutica. Embora diversos antibióticos

disponíveis hoje no mercado sejam produtos de síntese ou semi-síntese, a maioria dos antibióticos usados na terapêutica atual tiveram como modelo, produtos naturais de micro-organismos (TAKAHASHI & LUCAS, 2008).

Com o advento da era dos antibióticos, a possibilidade de que as doenças infecciosas poderiam ser erradicadas foi levantada. Contudo, infecções continuam sendo a principal causa de morte no mundo todo. A eliminação dessas doenças tem sido dificultada por diversas razões: i) novos patógenos humanos tem sido descobertos e transmitidos; ii) micro-organismos conhecidos estão mutando para formas mais virulentas; iii) micro-organismos estão desenvolvendo resistência aos antibióticos; iv) novos fármacos mais potentes apresentam efeitos adversos prejudiciais aos pacientes, dificultando a adesão ao tratamento farmacológico; v) pacientes com doenças crônicas que apresentam um sistema imune debilitado e vi) falta de tratamentos farmacológicos não tóxicos e efetivos (ECKERMAN & GRAHAM, 2000).

Novas abordagens para o desenvolvimento de novos antibióticos tem sido realizadas, como ferramentas de química combinatória. Porém apenas poucos novos antibióticos tem sido produzidos pelas indústrias farmacêuticas atualmente. Outras estratégias incluem a síntese orgânica, modificações farmacocinéticas usando nanotecnologia e a busca por moléculas com mecanismos de ação ainda não explorados (TAKAHASHI *et al.*, 2008). Portanto, a busca por novos antibióticos continua a fim de combater patógenos emergentes, bactérias, fungos resistentes e micro-organismos previamente suscetíveis que desenvolveram resistência, para melhorar as propriedades farmacológicas e para descobrir compostos mais seguros, potentes e de amplo espectro. Dentre todos os fatores que justificam a necessidade por novas classes de antibióticos, talvez o mais sério seja a demanda por novos agentes antifúngicos, mais eficientes e de ação mais rápida, uma vez que existem estimativas que mostram que cerca de 40% de todas as mortes por infecções hospitalares nos últimos 20 anos tenham sido causadas por fungos (DEMAIN & ADRIO, 2008; TAKAHASHI & LUCAS, 2008).

### **2.3.3.1. ANTIBACTERIANOS**

Por volta de 90-95 % das linhagens de *Staphylococcus aureus* ao redor do mundo são resistentes à penicilina e nos países da Ásia 70-80 % das mesmas linhagens são meticilina resistentes. Há consideráveis relatos do progresso da resistência a antibióticos de última linha de defesa, o que tem levado a busca por formas de controle de *Enterococcus* e *S. aureus* resistentes a vancomicina e *S. aureus* resistentes à

metecilina (HEMAISWARYA *et al.*, 2008). Portanto, devido ao aumento global da resistência das bactérias patogênicas aos antibióticos existentes, há a necessidade de pesquisas para a busca de novos e eficientes compostos antibacterianos (SANTOS *et al.*, 2010b). O sequenciamento do genoma completo de espécies de bactérias tem progredido nas últimas décadas, produzindo um grande número de alvos para a descoberta de novos fármacos antibacterianos (CHRISTENSEN *et al.*, 2001).

Agentes antibacterianos são produzidos, em sua maior parte, por fungos e bactérias, principalmente do gênero *Streptomyces* e também do gênero *Bacillus*. Alguns exemplos de antibacterianos produzidos por fungos são as penicilinas G e V (*Penicillium chrysogenum*), cefalosporina C (*Acremonium chrysogenum*) e ácido fusídico (*Acremonium fusidioides*). Outros antibacterianos comercializados produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces* são a cicloheximida, a eritromicina, a neomicina, a estreptomicina e a tetraciclina. Alguns antibióticos apresentam um espectro de ação estreito e, por isso, é necessária a realização de semi-síntese, para que ocorra uma ampliação do espectro de ação, como no caso das penicilinas naturais que somente tem ação sobre bactérias gram-positivas. Entretanto, as penicilinas semi-sintéticas já apresentam também atividade contra bactérias gram-negativas (MADIGAN *et al.*, 2004; EL-ENSHASY, 2007).

Frutas, verduras, grãos e alimentos em geral podem ser contaminados por vários micro-organismos e seus perigosos metabólitos. Enterotoxinas produzidas por *Escherichia coli*, *Staphylococcus pyogenes* e espécies dos gêneros *Salmonella*, *Yersinia* e *Clostridium* são responsáveis por intoxicações do trato intestinal, causando vômito e diarreia (DEMIRCI *et al.*, 2008). Outra bactéria de importância alimentar é *Listeria monocytogenes*, responsável pela grave doença listeriose. A maioria dos relatos de listeriose são associados ao consumo de alimentos como laticínios e carnes processadas ou curadas (OWEN & PALOMBO, 2007).

### **2.3.3.2. ANTIFÚNGICOS**

Infecções por fungos oportunistas tem se tornado um grande problema entre pacientes imunocomprometidos. O número de indivíduos imunossuprimidos continua a aumentar devido a fatores como maior expectativa de vida, um aumento de pacientes infectados com HIV, transplantados de órgãos e de medula óssea ou pacientes com câncer tratados com fármacos citotóxicos. Muitos fármacos utilizados para o tratamento de infecções fúngicas tem baixa biodisponibilidade ou são muito tóxicos para o uso

prolongado. Além do fato de que muitas linhagens fúngicas estão adquirindo resistência devido ao elevado tempo de tratamento das infecções. Os mais importantes patógenos fúngicos são *Candida albicans* e outras espécies, *Cryptococcus neoformans* e o fungo filamentosso *Aspergillus fumigatus* (ECKERMAN & GRAHAM, 2000; MORSCHHÄUSER, 2010).

Substâncias com atividade antibiótica também tem amplo emprego na agricultura, em especial, os antibióticos com atividade fungicida, pois prejuízos econômicos devido a perdas de lavouras, de grãos e frutas armazenados, causados pela presença de fungos, são preocupantes (TAKAHASHI & LUCAS, 2008).

Muitos agentes antimicóticos tem sido isolados de fungos. As equinocandinas, uma nova classe de compostos antifúngicos com uso clínico em expansão, são derivados semi-sintéticos de hexapeptídeos cíclicos provenientes de fungos. Caspofungina, micafungina e anidulafungina são ativos contra *Candida* spp. e *Aspergillus* ssp., porém são ativos contra outros poucos fungos (DENNING & HOPE, 2010). Proteínas com atividade antifúngica tem sido isoladas de ascomicetos, um grupo de proteínas ricas em cisteína, altamente básicas e de baixo peso molecular (5.8–6.6 kDa), denominadas AFP de *Aspergillus giganteus*, PAF de *Penicillium chrysogenum*, Anafp de *Aspergillus niger* e AcAFP de *Aspergillus clavatus* (RODRÍGUEZ-MARTÍN et al., 2010). Além disso, a griseofulvina é um composto fungistático ativo contra dermatófitos e foi isolado primeiramente de *Penicillium griseofulvum* Dierckx (DASU et al., 2003). Segundo SHU (2007) a ciclosporina um imunossupressor produzido pelo fungo *Tolypocladium inflatum* também apresenta atividade antifúngica, aliada às atividades antiparasitária e antiinflamatória.

Nem todos os novos agentes antifúngicos devem ter um amplo espectro de atividade, mas é requerida uma excelente atividade contra *Candida* e *Aspergillus*. A terapia antifúngica das síndromes alérgicas a fungos também requer mais estudos (DENNING & HOPE, 2010).

### **2.3.3.3. ANTIPARASITÁRIOS**

Doenças parasitárias são ainda um dos principais problemas de saúde pública em países em desenvolvimento, afetando muitas pessoas ao redor do mundo. Como estes parasitas são eucariotos, eles compartilham muitas características em comum com os hospedeiros mamíferos, tornando o desenvolvimento de medidas efetivas e de fármacos seletivos uma tarefa difícil (HERNÁNDEZ-NÚÑEZ et al., 2009). A quimioterapia

contra as doenças como giardíase, amebíase, tricomoníase, leishmaniose e tripanossomíase é limitada pela existência de poucos fármacos no mercado, muitos dos quais são de baixa eficácia, apresentando efeitos colaterais tóxicos, e frequentemente, conduzindo ao aparecimento de linhagens resistentes. Isto reflete na necessidade de continuar a procura por novos e melhores fármacos antiprotozoários (NAVA-ZUAZO et al., 2010)

Doenças infecciosas produzidas por amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* foram recentemente reconhecidas. *Acanthamoeba* é a ameba mais comum, sendo possivelmente o protozoário mais encontrado em amostras de solo e água, podendo existir como trofozoítos móveis e cistos com dupla parede. Algumas das espécies patogênicas ao homem são *Acanthamoeba cultbersoni*, *A. polyphaga*, *A. rhysodes*, *A. divionensis*, *A. castellanii*, *A. hatchetti* e *A. healyi*. Infecções por *Acanthamoeba* foram caracterizadas como infecções oportunistas, como encefalite granulomatosa crônica, infecções de pele e ceratite (infecção na córnea). A ceratite causada por *Acanthamoeba* é preocupante, pois os casos de infecções oculares por espécies desses gêneros estão crescendo e o número de pessoas infectadas tem aumentado drasticamente desde o primeiro caso relatado em 1975. Os tratamentos dessas infecções oculares são frequentemente mal sucedidos, geralmente envolvendo o uso de múltiplos antibióticos e/ou cirurgia (RODRÍGUEZ-ZARAGOZA, 1999; SCHUSTER & VISVESVARA, 2004; ONDARZA et al., 2006; VISVESVARA & SCHUSTER, 2008).

Usuários de lentes de contato são os mais afetados por ceratite ulcerativa, particularmente em países desenvolvidos. A associação entre ceratite causada por *Acanthamoeba* e usuários de lentes de contato é firmemente estabelecida, sendo mais de 95 % dos casos reportados uma combinação desses dois fatores. Antes da popularização do uso de lentes de contatos, a ceratite causada por *Acanthamoeba* era extremamente rara (IBRAHIM et al., 2009).

A erradicação desses protozoários dos locais da infecção é dificultada, pois sob condições adversas as amebas encistam e a terapia medicamentosa é geralmente menos efetiva contra cistos em relação a trofozoítos (GOZE et al., 2009). Fumagilina é um antibiótico natural produzido por *Aspergillus fumigatus*, que é ativo contra várias espécies de amebas e microsporídeos, sendo de uso veterinário. Contudo, há estudos que demonstram que a fumagilina apresenta potencial genotóxico em mamíferos (STANIMIROVIC et al., 2007).

## 2.4. USO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS EM PROCESSOS FERMENTATIVOS

O Brasil detém cerca de 20% da biodiversidade mundial, principalmente na floresta Amazônica, a maior do planeta e fonte inestimável de matérias-primas nos mais variados setores. Além disso, a economia brasileira é uma das mais importantes economias baseadas em agricultura no mundo, produzindo café, cana-de-açúcar, soja, mandioca, frutas, entre outros. A exportação de quase toda produção agrária brasileira representa uma excelente contribuição para o desenvolvimento econômico. Entretanto, essa grande produção é responsável pela geração de grandes quantidades de resíduos diariamente, a partir de diversas atividades econômicas como práticas agrícolas e industriais. Estes resíduos representam umas das fontes mais ricas de energia renovável do planeta. O acúmulo dessa biomassa em grandes quantidades resulta não apenas na deterioração do meio ambiente, como também na perda de materiais potencialmente valiosos. Essas razões, aliadas ao baixo custo destas matérias-primas, tem causado o aumento do interesse na utilização destes resíduos como substratos em processos biotecnológicos. A utilização de resíduos agroindustriais como substrato para cultivo pode representar um valor adicional para a indústria e, além disso, vai de encontro com a consciência crescente de conservação de energia (SOCCOL & VANDENBERGHE, 2003; SOUZA *et al.*, 2004; DAROIT *et al.*, 2007).

Em processos fermentativos, matérias-primas complexas podem ser utilizadas como os resíduos: bagaço de mandioca, bagaço de cana-de-açúcar, polpa de beterraba, polpa/pele de café, tortas de óleos, polpa de maçã entre outros. Essas matérias-primas fornecem um excelente substrato para o crescimento de micro-organismos suprindo os nutrientes essenciais para os mesmos. Diversos processos tem sido desenvolvidos com a utilização dessas matérias-primas como a produção de etanol, de *single-cell protein* (SCP)-células ricas em proteínas-, cogumelos, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos e metabólitos secundários ativos (SINGHANIA *et al.*, 2008). Na Tabela 2, é possível visualizar a utilização de resíduos para a produção de metabólitos secundários ativos por processos fermentativos.

Na obtenção de produtos de fermentação são utilizados, basicamente, dois tipos de processos, conforme a quantidade de água no meio:

- processo submerso, caracterizado pela presença de água livre e,

- processo em estado sólido, também denominado processo semi-sólido, caracterizado pela ausência de água livre (SILVEIRA & MOLINA, 2002).

#### **2.4.1. FERMENTAÇÃO SUBMERSA (SmF)**

Fermentação submersa é definida como um processo fermentativo com excesso de água, sendo o sistema mais empregado industrialmente para a obtenção de uma variedade de importantes metabólitos produzidos por fungos filamentosos (GIBBS et al., 2000). Fermentações submersas são normalmente utilizadas em processos industriais por causa de sua facilidade de manuseio, de escalonamento e de controle de parâmetros de bioprocessos (NIGAM, 2009).

Tabela 2: Produção de metabólitos secundários utilizando resíduos agroindustriais

Resíduo agroindustrial	Fungos Filamentosos	Metabólito secundário	Tipo de fermentação	Referência
Bagaço de oliva	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Ácido Giberélico	SmF	HERNÁNDEZ & MENDOZA, 1976
Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Claviceps purpurea</i>	Alcalóides do Ergot	SSF	HERNANDEZ <i>et al.</i> , 1993
Bagaço de mandioca e farinha de soja	<i>Rhizopus oryzae</i>	Aromas	SSF	BRAMORSKI <i>et al.</i> , 1998
Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicilina	SSF	BARRIOS-GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 1988
Farelo de trigo	<i>Penicillium brevicompactum</i>	Ácido Micofenólico	SSF	SADHUKHAN <i>et al.</i> , 1999
Farelo de trigo	<i>Aspergillus niger</i>	Nigerloxina	SSF	SEKHAR RAO <i>et al.</i> , 2005
Farelo de trigo	<i>Aspergillus flavipes</i>	Lovastatina	SSF	VALERA <i>et al.</i> , 2005
Resíduo de uva	<i>Monascus purpureus</i>	Pigmentos	SmF	SILVEIRA <i>et al.</i> , 2008
Farelo de trigo hidrolisado e torta de óleo de coco	<i>Tolypocladium inflatum</i>	Ciclosporina A	SSF	SURVASE <i>et al.</i> , 2009
Milhocina, farelo de soja e farinha de semente de algodão	<i>Acremonium chrysogenum</i>	Cefalosporina C	SmF	LEE <i>et al.</i> , 2010

## 2.4.2. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (SSF)

A fermentação semi-sólida é designada como um processo fermentativo que utiliza materiais não-solúveis que atuam tanto como suporte físico quanto fonte de nutrientes na ausência ou quase na ausência de água livre. O baixo conteúdo de umidade limita o número de micro-organismos capazes de realizar essa fermentação, sendo principalmente leveduras e fungos filamentosos. Além disso, algumas bactérias também tem sido utilizadas para essa finalidade (COUTO & SANROMÁN *et al.*, 2006). Portanto, estes dois processos apresentam em função de suas características, vantagens e desvantagens, as quais são apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Comparação das características da SSF e SmF

SSF	SmF
<b>Desvantagens</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>* Menor gama de produtos obtidos e de micro-organismos aptos a crescer nessas condições;</li><li>* Maior dificuldade no controle do processo;</li><li>* Dificuldade na coleta de amostras representativas durante o processo, devido a não homogeneidade.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>* Quando operando com elevadas concentrações de substrato, podem ocorrer problemas reológicos no sistema;</li><li>* Maior demanda energética associada à esterilização do meio e à remoção de produto do meio fermentado;</li></ul>
<b>Vantagens</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>* Menor possibilidade de contaminação devido à ausência de água livre;</li><li>* O extrato é três a quatro vezes mais concentrado em comparação com SmF, com maior produtividade;</li><li>* Menor volume de resíduos líquidos gerados;</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>* A purificação de moléculas ativas é facilitada pela ausência ou baixa concentração de substrato;</li><li>* O alto teor de água e a natureza diluída do meio facilitam o controle da temperatura, reduzindo a degradação dos produtos;</li><li>* Processos difusionais e de mistura são facilitados devido ao caráter homogêneo do sistema;</li></ul>

Fonte: Adaptado de BIANCHI *et al.*, 2001; SILVEIRA & MOLINA, 2002; CASTRO & PEREIRA JR, 2010.

## 2.5. TÉCNICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

A triagem química e físico-química é a procura por novos compostos independente das atividades biológicas. O primeiro passo é a separação de compostos de um extrato complexo por métodos cromatográficos. Um segundo passo, é analisar a reatividade química ou as propriedades físico-químicas por métodos espectroscópicos, como espectrofotometria em comprimentos de onda da região do ultravioleta e visível, espectrometria de massas (MS), ressonância magnética nuclear (RMN) ou por detecção utilizando reagentes especiais em CCD (cromatografia em camada delgada). O desenvolvimento de sistemas como HPLC-DAD (acoplado com detector de diodo)-MS permite a detecção específica de um único composto em uma mistura complexa (por exemplo, um extrato), independente da presença dos outros metabólitos. A comparação com bancos de dados permite a identificação de estruturas conhecidas (SCHWEDER *et al.*, 2005). Há um crescente número de técnicas analíticas que são empregadas para estabelecer um perfil de metabólitos secundários e a seleção de um método específico é usualmente uma relação entre sensibilidade, seletividade e rapidez (SUMNER *et al.*, 2007).

O perfil de metabólitos representa uma ferramenta que encontra aplicações nos aspectos de descoberta, entendimento e utilização e portanto, representa um ponto importante em estudos da taxonomia e fisiologia de fungos (SMEDSGAARD & NIELSEN, 2005). Um dos métodos mais rápidos e efetivos para traçar um perfil de metabólitos produzidos emprega a MS – extratos de fungos são injetados diretamente em um espectrômetro de massas, utilizando a técnica de ionização por electrospray (ESI) (MAPARI *et al.*, 2005). A limitada fragmentação em ESI/MS pode ser vantajosa quando extratos brutos contendo compostos com diferentes massas são analisados por injeção direta. Para a maioria dos compostos menores que 1.000 Da, o espectro ESI/MS demonstrará somente o íon molecular protonado ( $M+H^+$ ) e em alguns casos o íon sódico ( $M+Na^+$ ). O espectro de massas resultante representa um perfil de compostos na amostra, separados pela sua massa molecular protonada, podendo ser tratado como um perfil de massas contida da amostra. Porém, não é possível realizar a identificação do analito utilizando somente ESI/MS, mas estes dados podem ser utilizados como um indicativo da produção destes metabólitos. A identificação completa requer outros conhecimentos a respeito da composição da amostra ou a utilização de outras técnicas analíticas, por exemplo técnicas cromatográficas (SMEDSGAARD & FRISVAD, 1996; SMEDSGAARD & FRISVAD, 1997).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

- Este trabalho propõe a obtenção e identificação de metabólitos secundários de fungos filamentosos.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Selecionar fungos filamentosos produtores de pigmentos hidrossolúveis;
- Padronizar protocolos para a identificação dos fungos selecionados utilizando técnicas moleculares;
- Cultivar os fungos em resíduos agroindustriais diversos para verificar a produção de pigmentos em meios de baixo custo;
- Analisar espectrofotometricamente a produção de pigmentos;
- Realizar ensaios dos filtrados coloridos contra bactérias e fungos de importância médica, alimentar e agronômica;
- Selecionar o fungo que obteve produção de metabólitos ativos inibindo o crescimento dos micro-organismos testados;
- Avaliar atividade amebicida nos filtrados coloridos do fungo selecionado;
- Padronizar protocolos de extração do metabólitos secundários e realizar a identificação dos compostos ativos presentes por HPLC e espectrometria de massas.

## **4. CAPÍTULOS**

### **4.1. CAPÍTULO 1**

#### **MOLECULAR IDENTIFICATION OF PIGMENT-PRODUCING FUNGI**

Fernanda Cortez Lopes, Deise Michele Tichota, Jamile Queiroz Pereira, Alessandro de  
Oliveira Rios, Adriano Brandelli

Artigo a ser submetido ao periódico **Biotechnology Letters**

## **Molecular Identification of pigment-producing Fungi**

Fernanda Cortez Lopes, Deise Michele Tichota, Jamile Queiroz Pereira, Alessandro de Oliveira Rios, Adriano Brandelli \*

Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Departamento de Ciência de Alimentos (ICTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre Brazil

\* Corresponding author: fax: +5551 3308 7048; e-mail: [abrand@ufrgs.br](mailto:abrand@ufrgs.br)

## **Abstract**

The search for new sources of natural pigments has increased, mainly because of the toxic effects caused by synthetic dyes used in food, pharmaceutical, textile and cosmetic industries. Fungi provide a readily available alternative source of natural pigments that could be easily produced in high yields. The fungi *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium graminearum*, *Monascus purpureus* and *Diplodia* sp were selected as pigments producers. The fungal identification was performed using ITS and part of the  $\beta$ -tubulin gene sequencing. Almost all fungi were able to grow and produce pigments on agro-industrial residues, with the exception of *Diplodia* sp that produced pigments only on potato dextrose broth. The production of yellow pigments was predominant and the two strains of *Penicillium chrysogenum* were the largest producers, followed by *Diplodia* sp on potato dextrose broth, showing the importance of glucose as a carbon source. Due to its generally recognized as safe status, the few studies about pigments and the ability to use agro-industrial residues as nutrient sources, the fungus *Penicillium chrysogenum* shows potential as natural pigments producer.

**Keywords:** natural pigments, filamentous fungi, ITS,  $\beta$ -tubulin, phylogenetic analysis.

## **Introduction**

Microorganisms have been traditionally used to produce several substances with industrial application. Filamentous fungi have proved to be extremely useful, because of their ability to produce primary and secondary metabolites such as peptides, enzymes, organic acids, heterologous proteins, antibiotics and pigments (Radzio and Kück 1997; Hajjaj *et al.* 1998). There is a growing preference for natural colorants among consumers because of their advantages over synthetic colorants in terms of both health and the environment (Mapari *et al.* 2008). Microbial pigments are a promising alternative in relation to other additives extracted from animals and plants. The advantages of producing pigments from microorganisms include independence from weather conditions, ease and fast growth, colours of different shades and growth on inexpensive substrates (Rajasekaran *et al.* 2008).

The first requirement for a potential producer of pigments is that it must be non-toxicogenic under the broader range of production conditions, and non-pathogenic to humans. The co-production of mycotoxins by industrially useful strains is a major bottleneck in their approval by the legislative authorities (Mapari *et al.* 2009). In addition, it is very important to know the species, subgenus or genus of the fungi in study, because it will provide information on their bio- and chemodiversity, ecology and the secondary metabolites possibly produced by them. However, the identification at the species level is often very difficult (Nielsen and Smedsgaard 2003).

Historically, fungal isolates have been identified based on microscopic examination of their morphological characteristics and cultivation requirements. It is generally accepted that these methods are extremely time-consuming and also inaccurate. These conditions may lead to misidentification and an underestimation of the number of different organisms that constitute the microbial community (Dean *et al.*

2005). Polymerase chain reaction (PCR)-based molecular methods offer a fast and sensitive alternative to conventional cultivation techniques, being used for the detection and, in some cases, quantification of microorganisms (Haugland *et al.* 1999; Möhlenhoff *et al.* 2000). Therefore, our purpose was to select and to identify strains of filamentous fungi as a potential and safe pigment producer, using a PCR-based technique.

## **Materials and Methods**

### *Microorganisms and Screening of Pigment-producing Fungi*

The fungi used for the screening belong to the mycology collection of the Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology (UFRGS). The fungi were maintained on Potato Dextrose Agar (PDA) tubes covered with mineral oil at 4 °C and subcultured periodically.

The fungi were inoculated in the center of the potato dextrose agar plates using a bacteriological needle. The plates were incubated for 7 days, at 30 °C. Fungi that produced and excreted pigments on PDA were selected (Mapari *et al.*, 2005).

### *DNA isolation*

Genomic DNA was extracted according to Casali *et al.* (2003) with modifications. A culture of 5 days on PDB (potato dextrose broth) were vortexed and transferred to a microtube containing 0.5 mL of extraction buffer (2% Triton X-100 / 1 mM EDTA/ 200 mM NaCl / 10 mM Tris-HCl Buffer pH 7.5 / 1% SDS ) and 0.2 mL of glass beads (200 µm). This mixture was vortexed for 4 cycles of 2 min alternating with ice bath of 30 s. Then, 0.5 mL of chloroform were added, vortexed for 30 s and centrifuged for 15 min at 13.000 x g. The aqueous phase was washed again with chloroform. The nucleic acids

were precipitated with 2 vol of absolute ethanol and 200 mM NaCl. The microtubes were incubated at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  overnight and centrifuged for 15 min at  $13.000 \times g$ . The precipitate was washed with 0.2 mL ethanol 70 %. After the evaporation of ethanol, the precipitate was resuspended in 20  $\mu\text{L}$  MilliQ water. Extracted DNA was analyzed on a 0.9 % agarose gel.

### *PCR assay*

Fungal identification was based on the partial sequencing of the intergenic region of the rDNA ITS and part of the  $\beta$ -tubulin gene. An ITS region was selected as a target sequence for PCR using universal primers ITS 1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') as a forward primer and ITS 4 (5'- TCCTCCGCTTTATTGATATGC- 3') as a reverse primer. Each 25  $\mu\text{L}$  PCR reaction mix contained 2.5  $\mu\text{L}$  Taq buffer 10x, 1.0  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  25 mM, 0.5  $\mu\text{L}$  dNTPs 25 mM, 0.2  $\mu\text{L}$  Platinum Taq DNA polymerase 5 U/mL (Invitrogen), 2.5  $\mu\text{L}$  primer 20 mM, 50 ng genomic DNA and 13.3  $\mu\text{L}$  Milli-Q water. PCR was conducted with the following parameters: an initial denaturation of 5 min at  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 cycles of 30 s at  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  for denaturation, 30 s at  $46\text{ }^{\circ}\text{C}$  for annealing ( $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  for *Diplodia* sp), 80 s at  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  for extension and a final extension of 7 min at  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  according to Horisawa *et al.* (2009) with modifications.

The primers used for the  $\beta$ -tubulin gene were Bt2a (5'- GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') and Bt2b (5'- ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') as forward and reverse, respectively. The conditions were 32 cycles of  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  for denaturation for 1 min,  $58\text{ }^{\circ}\text{C}$  for annealing for 1 min,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  for extension for 1 min and a final extension for 10 s at  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Glass and Donaldson 1995). The PCR products were analyzed on a 0.9 % agarose gel and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### *DNA sequencing*

Samples were sequenced in the ACTGene Laboratory (*Centro de Biotecnologia*, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil) using the automatic sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armed with 50 cm capillaries and POP6 polymer (Applied Biosystems). DNA templates (30 to 45 ng) were labeled with 3.2 pmol of the primer 5'-NNNNNNNNNNNNNN-3' and 2  $\mu$ L of BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) in a final volume of 10  $\mu$ L. Labeling reactions were performed in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) thermocycler with an initial denaturing step of 96 °C for 3 min followed by 25 cycles of 96 °C for 10 s, 55 °C for 5 s and 60 °C for 4 min. Labeled samples were purified by isopropanol precipitation followed by 70% ethanol rinsing. Precipitated products were suspended in 10  $\mu$ L formamide, denatured at 95 °C for 5 min, ice-cooled for 5 min and electroinjected in the automatic sequencer. Sequencing data were collected using the software Data Collection v 1.0.1 (Applied Biosystems) programmed with the following parameters: Dye Set "Z"; Mobility File "DT3100POP6{BDv3}v1.mob"; BioLIMS Project "3100\_Project1"; Run Module 1 "StdSeq50\_POP6\_50cm\_cfv\_100"; and Analysis Module 1 "BC-3100SR\_Seq\_FASTA.saz".

The sequences were edited using the software BioEdit Sequence Alignment Editor (1997-2005 Tom Hall). After edition, the search for homologous sequences was performed in the NCBI databank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

### *Phylogenetic analysis*

For phylogenetic reconstruction, a fragment of 585 bp of the ITS region and a fragment of 485 bp of the  $\beta$ -tubulin gene were used. The sequences obtained were edited in the software BioEdit, compared with those from Genbank and data matrix aligned in the

ClustalX software. The ATCC strains were used for comparisons, when available in the NCBI database. The phylogenetics trees were constructed by the Neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987) according to the Kimura's-two-parameter model of nucleotide evolution (Kimura 1980) using MEGA 5.01 software. To access the confidence limits of the branching, 1000 Bootstrap replications were performed.

#### *Media and Conditions Culture*

The selected fungi were cultivated on agroindustrial residues. The residues tested were feather meal, soy protein, fish meal, chicken feather, pig hair, cheese whey, grape waste, rice husk and soybean meal. All residues were used at 10 g/L concentration. The fungi were also cultured on potato dextrose broth. Cultivations were performed for 7 days, at 30 °C and 125 rpm in 250 mL erlenmeyer containing 50 mL of the medium. The inoculum contained  $10^6$  conidia/mL and was prepared according to Dedavid e Silva *et al.* (2009). Cultures were filtered through Whatman filter nº 1 to separate the mycelium.

#### *Pigments analysis*

The filtrates were analyzed in a spectrophotometer (UV-mini 1240, Shimadzu, Tokyo, Japan). A scan was performed from 400 to 700 nm to determine the wavelength of maximum absorption. The results were expressed in units of absorbance (UA) at a given wavelength ( $\lambda$ ), multiplied by the dilution factor. A blank with the autoclaved media was used to discount the own colour of the culture media, being necessary a previous centrifugation for the insoluble media.

## Results and Discussion

### *Screening of pigment-producing fungi*

Fungi were selected as producer of pigments according to their ability to produce and excrete pigments to the PDA medium. Five strains of fungi that produced pigments on potato dextrose agar, *Diplodia* sp, *Fusarium graminearum*, *Monascus purpureus*, *Penicillium expansum* and *Penicillium* sp were selected (Fig. 1). Among the selected fungi, only *Monascus purpureus* is a traditional producer of pigments. Species of the genus *Monascus* are used in Asia for centuries as a source of pigments for the colouring of traditional foods. This genus is subject of several studies, mainly due to the growing interest in natural pigments to be used in the food industry (Daroit *et al.* 2007). Velmurugan *et al.* (2009) reported the screening of pigments producers and among 153 isolates, four fungi were selected on its ability to produce different shades (red, reddish brown, pink and yellow) of pigments. The four isolates were identified as *Isaria* spp., *Emericella* spp., *Fusarium* spp. and *Penicillium* spp. The genera *Penicillium* and *Fusarium* were also found in this present work.

Some species of the genus *Penicillium* have been reported as pigment producer. *Penicillium aculeatum* and *P. pinophilum* were discovered to produce azaphilone pigments and/or their amino acid derivatives (Mapari *et al.* 2010). In addition, a new food colorant called Arpink Red™, which is produced by a variety of *P. oxalicum*, is manufactured by ASCOLOR BIOTECH in the Czech Republic (Qiu *et al.* 2010). Species of *Fusarium* such as *Fusarium oxysporum* are pigment producers, which produces anthraquinones (Nagia and El-Mohamedy 2007). In addition, Velmurugan *et al.* (2009a) reported the production of yellow pigments by *Fusarium verticillioides*.

New sources of natural pigments are necessary due to the several problems associated with synthetic dyes. Several artificial pigments were banned from the list of

permitted color additives in the last few years, because of suspected toxicity or allergenicity (Carvalho *et al.* 2007). Moreover, there are reports of allergic reactions caused by the presence of these colorants in food and the use of synthetic dyes is also a problem in the wastewater treatment from textile and dyestuff industries. This is due to complex aromatic molecular structures which make them more stable and more difficult to be biodegraded. In contrast, natural pigments exhibit better biodegradability and higher compatibility with the environment, and therefore need to be further investigated (Fu and Viraraghavan 2001; Velmurugan *et al.* 2009).

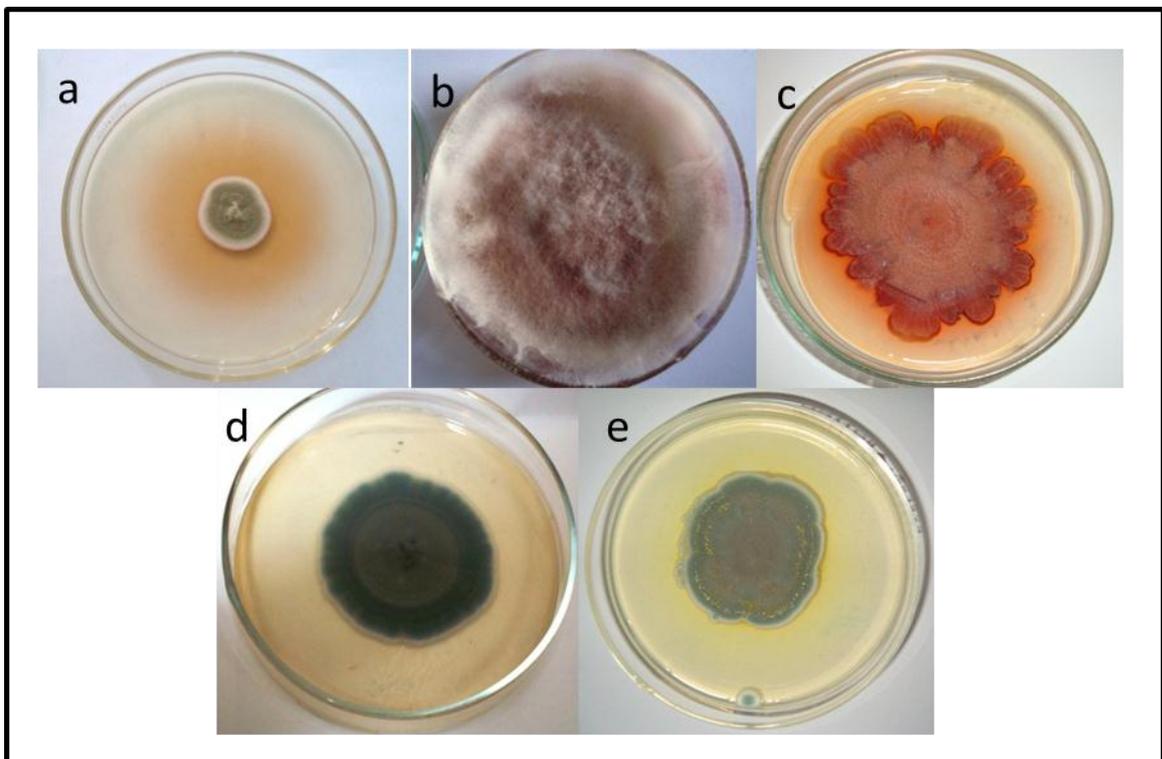


Fig. 1: Pigment-producing fungi on Potato dextrose agar. a) *Diplodia* sp, b) *Fusarium graminearum*, c) *Monascus purpureus*, d) *Penicillium expansum* and e) *Penicillium* sp.

The identification of a natural pigment producing fungus is important for industrial application. This way, a better knowledge of the fungus will enable the search for known metabolites produced by this strain, including mycotoxins.

### *Fungi Identification*

The fungal identification is summarized in Table 1. The two *Penicillium* strains were identified as *Penicillium chrysogenum* with 100% of identity for both primers used. The fungus previously identified as *Penicillium expansum* was misidentified. According to Fischer *et al.* (2003) the two species *P. chrysogenum* and *P. expansum* are very common and are likely to be often misidentified, due to researchers limited mycological experience, and similarities in micro-morphological structures may lead to inconsistent species determination. *P. expansum* is one of the most common foodborne fungi on fruit and an important producer of the mycotoxins patulin and citrinin (Andersen *et al.* 2004; Pitt & Hocking 2009). On the other hand, *P. chrysogenum* has the GRAS (Generally recognized as safe) status by the US Food and Drug Administration (Rodríguez-Martín *et al.* 2010).

The problem of misidentification is a vital issue for several reasons, Mapari *et al.* (2005) reported that *Penicillium marneffe* produces large amounts of extracellular red pigments and one of the pigments was identified as monascorubramine, the red *Monascus* pigment. Although *P. marneffe* produces no known mycotoxins, this fungus is one of the most dangerous human pathogen known.

Table 1: Molecular identification based in the ITS region and part of the  $\beta$ -tubulin gene

Fungi	ITS-identification/Identity	Fragment (bp)	$\beta$ -tubulin-identification/Identity	Fragment(bp)
<i>Diplodia</i> sp	No similarity found	150 bp	<i>Penicillium vasconiae</i> (GU981653)* 94%	480 bp
<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Gibberella zeae</i> (HQ176433)* 100%	489 bp	<i>Fusarium</i> sp. (DQ459642)* 100%	330 bp
<i>Monascus purpureus</i>	<i>Monascus sanguineus</i> (AY498586)* 100%	540 bp	<i>Monascus purpureus</i> (EU014110)* 81%	505 bp
<i>Penicillium expansum</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i> 2 (HQ026731)* 100%	533 bp	<i>Penicillium chrysogenum</i> 2 (EU128560)* 100%	457 bp
<i>Penicillium</i> sp	<i>Penicillium chrysogenum</i> 1 (HQ026731)* 100%	537 bp	<i>Penicillium chrysogenum</i> 1 (EU128571)* 100%	450bp

\* The number of access refers to the specie which showed greater similarity with the sequences obtained in this work.

The fungus of the genus *Monascus* was identified as *Monascus sanguineus* using the ITS primers and as *Monascus purpureus* using  $\beta$ -tubulin gene (Table 1). Park and Jong (2003) reported that *M. sanguineus* and *M. purpureus* differed by two nucleotides in the D1/D2 regions (regions of the large subunit rDNA genes) and the sequence deposited as *Monascus purpureus* ATCC 16436 (access number AF364994) was identical to *M. sanguineus*. Then, the identification of *Monascus purpureus* was maintained due to morphological features of the fungus.

The fungus *Fusarium graminearum* had the identification confirmed using the ITS primers, with 100% identity to *Gibberella zeae*, the teleomorph of *Fusarium graminearum* (asexual vegetative growth forms). However, it was not possible to determine the species using the sequencing of the  $\beta$ -tubulin gene. The sequenced region of the  $\beta$ -tubulin is shorter than the other fungi sequences, as demonstrated in Fig. 2.

The sequencing of the ITS region of *Diplodia* sp had no similarity, showing a very short sequence of 150 bp and the  $\beta$ -tubulin gene had a 94% identity to the fungus *Penicillium vasconiae*. In this case, it was not possible to confirm the genus of this strain using neither primers. In spite of existing bands in the agarose gel, there was no adequate sequence to edit and submit to the BLAST algorithm, being necessary more studies to provide the correct identification of this fungus.

The use of the ITS primers was more efficient to determine the species of the strains comparing with the  $\beta$ -tubulin primers. The ITS region is more variable than the coding protein genes, as  $\beta$ -tubulin. According to Fungaro (2000), the ITS regions evolve rapidly and then are suitable for discriminating closely related species or even varieties of the same species. In addition, genes encoding proteins accumulate fewer mutations and are less variable (Einax and Voigt 2003).

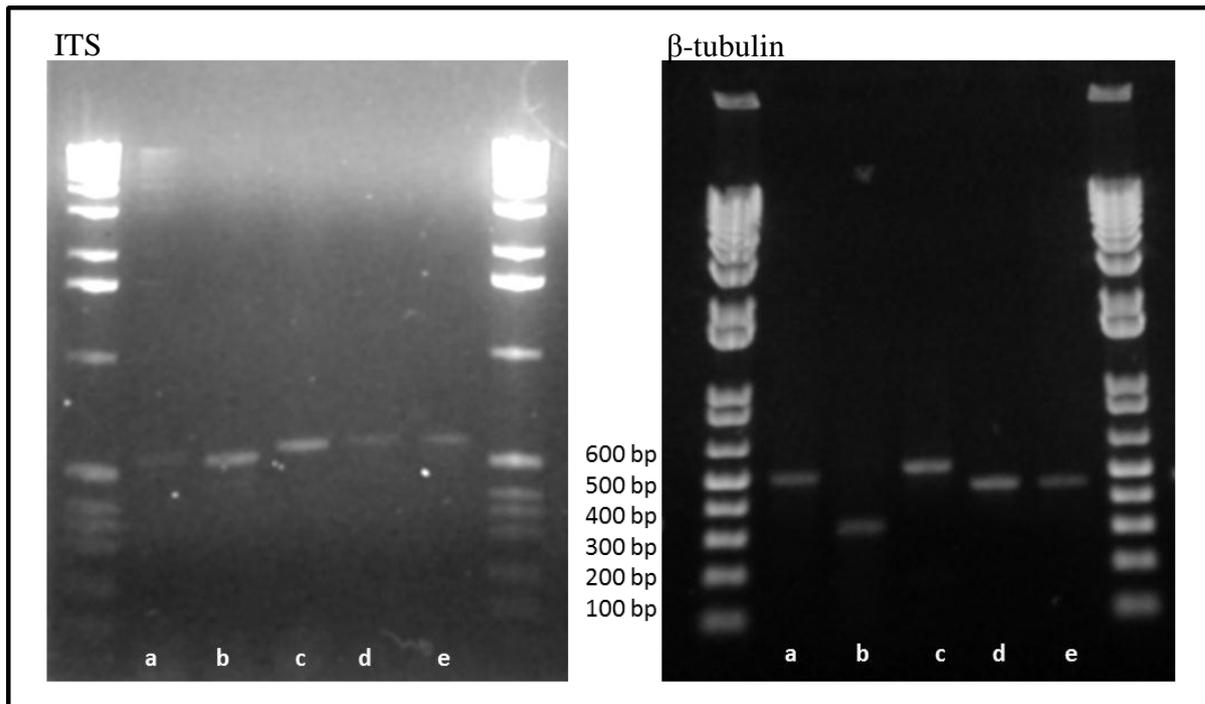


Fig. 2: Agarose gel electrophoresis showing the purified PCR products of the ITS region (left) and the partial  $\beta$ -tubulin gene (right). a) *Diplodia* sp, b) *Fusarium graminearum*, c) *Monascus purpureus*, d) *Penicillium expansum*, e) *Penicillium* sp Molecular ladder marker 1kb Plus (Invitrogen).

### *Phylogenetic Analysis*

The ITS region is used as a molecular target for differentiation of fungal species and the sequence variation within this area has also proved to be useful in phylogenetic studies of many different fungi (Bastola et al. 2004). To obtain more precise phylogenetic trees, analyses of multiple gene sequences, like protein genes, have been required (Inuma et al. 2007). The phylogenetic tree of the ITS sequences is shown in Fig. 3. The phylogenetic tree of the  $\beta$ -tubulin sequences are not shown due to the low resolution obtained in this study. It is possible to observe that the fungi of the genera *Penicillium* and *Monascus* show higher similarity comparing with the fungus of the genus *Fusarium*. Strains of *Penicillium* and *Monascus* have a common ancestor. This can

explain the production of the *Monascus* pigments by some strains of *Penicillium* reported in literature. Mapari *et al.* (2008a) hypothesized that *Monascus* or *Monascus*-like azaphilone pigments are likely to be produced by species in the *Penicillium* subgenus *Biverticillium* that produce significant amounts of red to orange-red pigments.

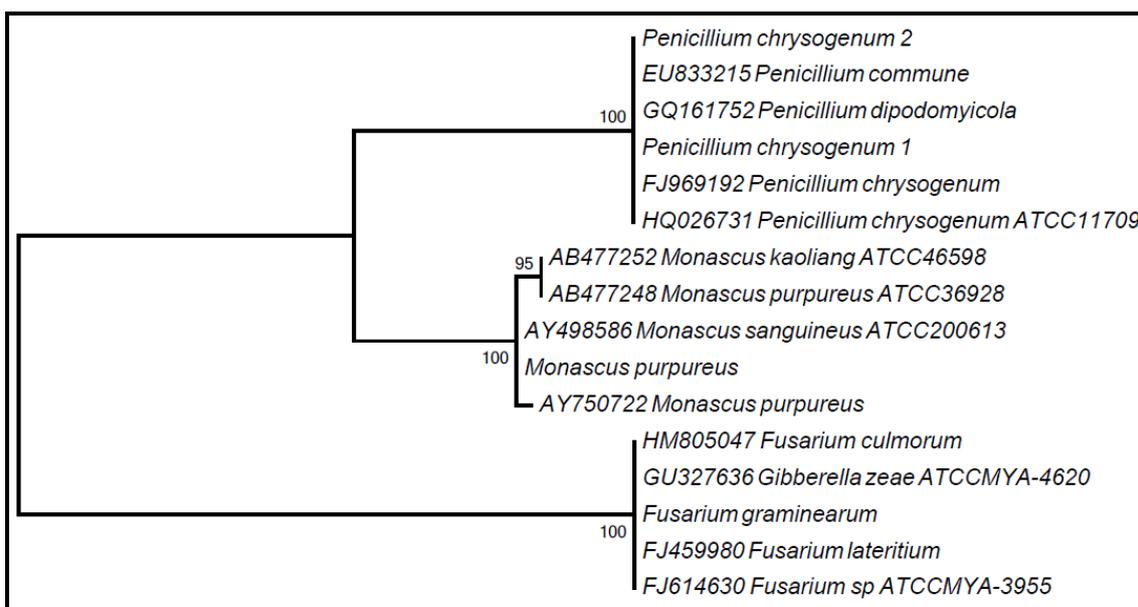


Fig. 3. The neighbor-joining tree inferred from the partial sequence of the ITS region data set using Mega 5.0 according to Kimura two-parameter Modell. Bootstrap values from 1000 replications are indicated at the nodes.

#### *Production of pigments on agro-industrial residues*

The fungi were cultured on different residues to verify the production of pigments in inexpensive substrates. This is an important feature for a future industrial application, showing also the capability of the fungi to grow in a wide variety of nutrients sources. The media used and the maxima absorbances are presented in Table 2. The fungi *Monascus purpureus* and *Fusarium graminearum* showed the production of pigments in a larger number of residues than the other fungi. *Diplodia* sp produced pigments only on potato dextrose broth. The predominant colours of the pigments produced were yellow,

as observed by the maxima absorption in wavelengths around 400 nm. The strain of *Monascus* also produced red pigments on soy protein and cheese whey media. According to Mapari *et al.* 2006, there is a great potential in the extraordinary color range of pigments produced by ascomycetous fungi in the red and the yellow spectra.

Table 2: Determination of the maxima absorption of the coloured filtrates in seven days cultures

Filamentous fungi	Culture Medium	Wavelength and maximum absorption (A)
<i>Penicillium chrysogenum</i> (1)	Grape waste	400 nm: 0.930
	Cheese whey	403 nm: 1.494
	Potato Dextrose Broth	400 nm: 2.790
<i>Penicillium chrysogenum</i> (2)	Cheese whey	403 nm: 1.563
	Potato Dextrose Broth	400 nm: 2.741
<i>Fusarium graminearum</i>	Soybean meal	400 nm: 0.469
	Feather meal	406 nm: 1.200
	Soy protein	400 nm: 0.356
	Potato Dextrose Broth	400 nm: 1.863
<i>Monascus purpureus</i>	Soybean meal	400 nm: 0.429
	Cheese whey	509 nm: 0.074
	Soy protein	430 nm:0.412/514 nm: 0.419
	Rice Husk	400 nm: 0.144
	Potato dextrose Broth	405 nm: 0.526
<i>Diplodia</i>	Potato dextrose Broth	400 nm: 2.060

The strains of *Penicillium chrysogenum* showed a difference in pigment production. There was no production of pigments on the media grape waste by *P.*

*chrysogenum* 2, as observed for *P. chrysogenum* 1. Glucose showed to be an important carbon source for pigment production, because there was a higher pigment production in PDA than in the other media.

#### *Fungal Pigments and mycotoxins*

The first report of the pigments production by *Penicillium chrysogenum* was by Wolf *et al.* (1960). Until today there are few reports on pigments produced by this species, because the pigments were usually used as a chemotaxonomic tool. Mapari *et al.* 2009 reported that *P. chrysogenum* produces the yellow pigments sorbicillin and xanthocillins. The production of pigments by *Fusarium graminearum* are also reported in the same work, where the reddish pigments rubrofusarin and aurofusarin were found. *Monascus purpureus* produces a wide variety of pigments and, at least six molecular structures are known: rubropunctatin, monascorubrin, rubropunctamine, monascorubramine, monascine and ankaflavine (Silveira *et al.* 2008). To our knowledge there are no reports about the production of pigments by species of the genus *Diplodia*.

All the species selected may produce mycotoxins in certain conditions. The main mycotoxins produced are roquefortine C by *Penicillium chrysogenum*, butenolide, fusarin C, trichotecenes and zearalenone by *Fusarium graminearum* and citrinin by *Monascus purpureus* (Carvalho *et al.* 2005, Mapari *et al.* 2009). Further studies are necessary to verify the presence of mycotoxins in the conditions of pigment production used, to ensure the safety of each filtrate. According to Paterson *et al.* (2006), roquefortine has very low importance as a mycotoxin, justifying the safe status of *P. chrysogenum*.

## Conclusions

Four selected fungi produced pigments during growth on agro-industrial residues. *P. chrysogenum* shows potential for future studies on pigment production, due to its GRAS status and the few studies on pigments of this species. This fungus has been extensively investigated since Fleming's discovery, but the studies are based on antibiotics metabolites, mainly penicillins, then this new approach is necessary.

## Acknowledgements

Authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

## References

- [1] Andersen B, Smedsgaard J, Frisvad JC (2004) *Penicillium expansum*: Consistent Production of Patulin, Chaetoglobosins, and Other Secondary Metabolites in Culture and Their Natural Occurrence in Fruit Products. *J. Agric. Food Chem.* 52 8: 2421-2428.
  
- [2] Bastola DR, Out HH, Doukas SE, Sayood K, Hinrichs SH, Iwen PC (2004) Utilization of the relative complexity measure to construct a phylogenetic tree for fungi. *Mycol. Res.* 108 2: 117–125.
  
- [3] Carvalho JC, Oishi BO, Pandey A, Soccol CR (2005) Biopigments from *Monascus*: Strains Selection, Citrinin Production and Color Stability. *Braz. arch. biol. technol.* 48 6: 885-894.

- [4] Carvalho JC, Oishi BO, Woiciechowski AL, Pandey A, Babitha S, Soccol CR (2007) Effect of substrates on the production of *Monascus* biopigments by solid-state fermentation and pigment extraction using different solvents. *Indian J. Biotechnol* 6 2: 194-199.
- [5] Casali AK, Goulart L, Rosa e Silva LK, Ribeiro AM, Amaral AA, Alves SH, Schrank A, Meyer W, Vainstein MH (2003) Molecular typing of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolates in the Brazilian state Rio Grande do Sul, *FEMS Yeast Res.* 3:405-415.
- [6] Daroit DJ, Silveira ST, Hertz PF, Brandelli A (2007) Production of extracellular  $\beta$ -glucosidase by *Monascus purpureus* on different growth substrates, *Process Biochem.* 4 2:904–908.
- [7] Dean TR, Roop B, Betancourt D, Menetrez MY (2005) A simple multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of four environmentally relevant fungal contaminants. *J. Microbiol. Methods* 61:9 – 16.
- [8] Dedavid e Silva LA, Lopes FC, Silveira ST, Brandelli A (2009) Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus phoenicis* in grape waste using response surface methodology. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 152 2: 295-305.
- [9] Einax E, Voigt K (2003) Oligonucleotide primers for the universal amplification of  $\beta$ -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. *Org. Divers. Evol.* 3: 185–194.

- [10] Fischer G, Braun S, Dott W (2003) Profiles of microfungi – *Penicillium chrysogenum* and *P. expansum*. *Int J. Environ. Health* 206:65-67.
- [11] Fu Y, Viraraghavan T (2001) Fungal decolorization of dye wastewaters: a review, *Bioresour. Technol.* 79:251-262.
- [12] Fungaro MHP (2000) PCR na micologia. *Biotechnologia cienc desenvolv.* 3:12-16. 2000.
- [13] Glass NL, Donaldson GC (1995) Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 4:1323-1330.
- [14] Hajjaj H, Blanc PJ, Goma G, François J (1998) Sampling techniques and comparative extraction procedures for quantitative determination of intra- and extracellular metabolites in filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 164: 195-200.
- [15] Haugland RA, Vesper SJ, Wymer LJ (1999) Quantitative measurement of *Stachybotrys chartarum* conidia using real time detection of PCR products with the TaqMan<sup>TM</sup> fluorogenic probe system. *Mol Cell Probes* 13 5: 329-340.
- [16] Horisawa S, Sakuma Y, Dio S (2009) Qualitative and quantitative PCR methods using species-specific primer for detection and identification of wood rot fungi, *J Wood Sci.* 55:133–138.

- [17] Inuma T, Khodaparast SA, Takamatsu S (2007) Multilocus phylogenetic analyses within *Blumeria graminis*, a powdery mildew fungus of cereals. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44:741–751.
- [18] Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences, *J. Mol. Ev.* 16 2: 111–120.
- [19] Mapari SAS, Hansen ME, Meyer AS, Thrane U (2008a) Computerized Screening for Novel Producers of *Monascus*-like Food Pigments in *Penicillium* Species. *J. Agric. Food Chem.* 56:9981–9989.
- [20] Mapari SAS, Meyer AS, Thrane U (2006) Colorimetric Characterization for Comparative Analysis of Fungal Pigments and Natural Food Colorants, *J. Agric. Food Chem.* 54:7027-7035.
- [21] Mapari SAS, Meyer AS, Thrane U (2008) Evaluation of *Epicoccum nigrum* for growth, morphology and production of natural colorants in liquid media and on a solid rice medium, *Biotechnol Lett*, 30:2183–2190.
- [22] Mapari SAS, Meyer AS, Thrane U, Frisvad J (2009) Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale. *Microbial Cell Factories* 8:24 1-15.

- [23] Mapari SAS, Nielsen KF, Larsen TO, Frisvad JC, Meyer AS, Thrane U (2005) Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16:231-238.
- [24] Mapari SAS, Thrane U, Meyer A (2010) Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants. *Trends Biotechnol* 28 6:300-307.
- [25] Möhlenhoff P, Müller L, Gorbushina AA, Petersen K (2000) Molecular approach to the characterization of fungal communities: methods for DNA extraction, PCR amplification and DGGE analysis of painted art objects, *FEMS Microbiol. Lett.* 195: 169-173.
- [26] Nagia FA, El-Mohamedy RSR (2007) Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from *Fusarium oxysporum* Dyes *Pig.* 75:550-555.
- [27] Nielsen KF, Smedsgaard J (2003) Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardized liquid chromatography –UV- mass spectrometry methodology *J. Chromatogr. A* 1002:111–136.
- [28] Park HG, Jong SC (2003) Molecular characterization of *Monascus* strains based on the D1/D2 regions of LSU rRNA genes. *Mycoscience* 44:25–32.
- [29] Paterson RRM, Venâncio A, Lima N (2006) A practical approach for identifications based on mycotoxins characters of *Penicillium*. *Rev Iberoam Micol* 23:

155-159.

[30] Pitt JI, Hocking AD. (2009) *Fungi and Food Spoilage*. Springer Science + Business Media, London pp 313-14.

[31] Qiu M, Xie R, Shi Y, Chen H, Wen Y, Gao Y, Hu X (2010) Isolation and identification of endophytic fungus SX01, a red pigment producer from *Ginkgo biloba* L. *World J Microbiol Biotechnol* 26:993–998.

[32] Radzio R, Kück U (1997) Synthesis of biotechnologically relevant heterologous proteins in filamentous fungi, *Process Biochem.* 32:6 529-539.

[33] Rajasekaran R, Chandrasekaran R, Muthuselvam M (2008) Microbial Biotechnology: Rapid Advances in an area of massive impact. *Advanced Biotech* 19-25.

[34] Rodríguez-Martín A, Acosta R, Liddell S, Núñez F, Benito MJ, Asensio MA (2010) Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. *Peptides* 31:541–547.

[35] Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees *Mol. Biol. Evol.* 4 4: 406–425.

[36] Silveira ST, Daroit DJ, Brandelli A. Pigment production by *Monascus purpureus* in grape waste using factorial design. *LWT* 41:17-174.

[37] Velmurugan P, Chae JC, Lakshmanaperumalsamy P, Yun BS, Lee KJ, Oh BT (2009a) Assessment of the dyeing properties of pigments from five fungi and anti-bacterial activity of dyed cotton fabric and leather. *Color. Technol.* 125: 334–341.

[38] Velmurugan P, Kamala-Kannan S, Balachandar V, Lakshmanaperumalsamy P, Chae JC, Oh BT (2009) Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. *Carbohydr. Polym.* doi:10.1016/j.carbpol.2009.07.058.

[39] Wolf FT, Kim YT, Jones EA (1960) Spectral studies on chrysogenin, a pigment produced by *Penicillium chrysogenum*. *Physiologia Plantarum* 13: 621-627.

## **DADOS COMPLEMENTARES 1: ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE FILTRADOS FÚNGICOS**

Micro-organismos tem sido utilizados para a produção de uma variedade de substâncias importantes para as indústrias farmacêuticas e de alimentos. A descoberta e o desenvolvimento de antibióticos foi um dos maiores avanços na medicina no século 20 (SILVA *et al.*, 2004). O reino Fungi é uma importante fonte de recursos naturais bioativos, sendo que metabólitos fúngicos de várias origens biossintéticas tem produzido produtos farmacêuticos e agrícolas inovadores durante os últimos anos (JIANG & AN, 2000). Portanto, foram determinadas as atividades antibacteriana e antifúngica dos filtrados coloridos obtidos nos cultivos em caldo batata dextrose e resíduos agroindustriais (Vide tabela 2, capítulo 1).

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **Atividade antibacteriana**

A atividade antibacteriana dos filtrados coloridos foi determinada de acordo com o método de difusão em ágar segundo MOTTA & BRANDELLI (2002) com adaptações. As bactérias indicadoras testadas foram *Salmonella Typhimurium* ATCC 14078, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 9801 e *Pseudomonas aeruginosa* (isolado ambiental). Os filtrados liofilizados foram ressuspensos a fim de se obter uma concentração de 100 mg/mL em água e foram filtrados em unidades filtrantes de 0,22 µm, para promover a esterilização dos filtrados. Foram preparadas suspensões das bactérias indicadoras em salina (solução de NaCl 0,85%), sendo padronizadas em espectrofotômetro a 600 nm, para se obter uma concentração de 10<sup>8</sup> UFC/mL. A partir das suspensões, foram preparados tapetes em placas de TSA (Tryptic Soy Agar), utilizando swabs estéreis. Após o preparo dos tapetes, foram adicionados 15 µL dos filtrados sob os tapetes. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A verificação da atividade antibacteriana foi avaliada pela formação de halos ou pela presença de inibições parciais. Os halos foram representados segundo KIM *et al.* (2006), +: halo até 8mm; ++: halo entre 9 e 15mm; +++: halo maior que 15mm; IP: inibição parcial.

### **Atividade Antifúngica**

Para atividade antifúngica, as amostras foram preparadas da mesma forma e na mesma concentração. Os fungos testados foram *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (isolado ambiental), *Aspergillus flavus* (isolado de alimentos), *Aspergillus fumigatus* (isolado ambiental) e *Candida tropicalis* (isolado clínico)

Foram preparadas suspensões de esporos de cada fungo. Com exceção da levedura *Candida tropicalis*, que foi preparada pelo mesmo método utilizado no teste de atividade antibacteriana. Após o preparo das suspensões de esporos, foi adicionado volume suficiente para obter uma concentração final de  $10^6$  esporos por mL ao ágar batata, à temperatura de aproximadamente 50 °C. O meio de cultura contendo esporos foi vertido em placas estéreis. Após solidificação do meio, 15 µL dos filtrados foram adicionados. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas (ROUSE *et al.*, 2008)

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

É possível visualizar que alguns dos filtrados apresentaram bioatividade, em destaque para o filtrado de caldo batata do fungo *Diplodia* sp que foi ativo contra todos os micro-organismos testados (Tabela 1), inclusive contra as bactérias gram-negativas que são mais dificilmente inibidas. Ocorreu a inibição dos patógenos alimentares como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* e *Escherichia coli*, que não foram inibidas pelos outros filtrados testados, bem como os patógenos de importância clínica *Aspergillus fumigatus* e *Candida tropicalis*.

O gênero *Diplodia* apresenta muitas espécies, algumas saprófitas e outras parasitas facultativas, as quais podem causar doenças em plantas, levando a escassez de estudos visando à produção de metabólitos ativos por esses fungos. Contudo, pelo fato das constantes interações com outros micro-organismos, podem ser potenciais produtores de substâncias com atividade antimicrobiana. Segundo NOGUEIRA *et al* (2006), o *screening* para a atividade antibacteriana de fungos fitopatogênicos não tinha sido descrito ainda na literatura. O estudo demonstrou que extratos de acetato de etila de cultivo de *D. maydis* inibiram bactérias como *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Staphylococcus aureus* sendo algumas linhagens multiresistentes a antibióticos.

Já os filtrados dos fungos *Fusarium graminearum* e *Monascus purpureus*, inibiram o fungo *Fusarium oxysporum*, que foi o mais sensível dos fungos testados. Há relatos da atividade antifúngica de extratos pigmentados do fungo *Monascus*, como

descrito por DURÁN *et al.* (2002), principalmente pela presença dos pigmentos alaranjados. Os filtrados do fungo *Penicillium chrysogenum* 2, diferentemente de *P. chrysogenum* 1, inibiram apenas parcialmente a bactéria *Bacillus cereus*.

Portanto, o fungo do gênero *Diplodia* mostra potencial para o estudos futuros de compostos com atividade antibiótica, devido aos escassos trabalhos na área e aos excelentes resultados obtidos no *screening* realizado.

Tabela 1: Atividades antimicrobiana dos filtrados pigmentados.

Meio de cultura Micro-organismos	<i>P. chrysogenum 1</i>			<i>P. chrysogenum 2</i>		<i>Diplodia sp</i>
	Resíduo de Uva	Soro de Queijo	Caldo batata	Soro de Queijo	Caldo Batata	Caldo Batata
<b>Bactérias Gram positivas</b>						
<i>Bacillus cereus</i>	++	++	++	IP	IP	++
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++	++	++	-	-	+
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-	+
<b>Bactérias Gram negativas</b>						
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	+	-	-	++
<i>Salmonella Typhimurium</i>	-	-	-	-	-	++
<b>Levedura</b>						
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-	-	-	+
<b>Fungos Filamentosos</b>						
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	+	-	-	-	+
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	-	-	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	-	-	-	+

Tabela 1: Atividades antimicrobiana dos filtrados pigmentados (cont.).

Meio de cultura Micro-organismos	<i>Monascus purpureus</i>			<i>Fusarium graminearum</i>	
	Caldo Batata	Soro de Queijo	Proteína de Soja	Farelo de Soja	Farinha de Pena
<b>Bactérias Gram positivas</b>					
<i>Bacillus cereus</i>	IP	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	-	-
<b>Bactérias Gram negativas</b>					
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-
<i>Salmonella Typhimurium</i>	-	-	-	-	-
<b>Levedura</b>					
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-	-	-
<b>Fungos Filamentosos</b>					
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	++	++	IP	IP
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-	-	-	-

## 4.2. CAPÍTULO 2

### **ACTIVE METABOLITES PRODUCED BY *Penicillium chrysogenum* ON AGRO-INDUSTRIAL RESIDUES**

Fernanda Cortez Lopes, Deise Michele Tichota, Ismael Pretto Sauter, Stela Maris Meister Meira, Jéferson Segalin, Marilise Brittes Rott, Alessandro de Oliveira Rios, Adriano Brandelli

Artigo a ser submetido ao periódico **Biotechnology Progress**

## **Active Metabolites produced by *Penicillium chrysogenum* on agro-industrial residues**

Fernanda Cortez Lopes<sup>1</sup>, Deise Michele Tichota<sup>1</sup>, Ismael Pretto Sauter<sup>2</sup>, Stela Maris Meister Meira<sup>1</sup>, Jéferson Segalin<sup>3</sup>, Marilise Brittes Rott<sup>2</sup>, Alessandro de Oliveira Rios<sup>1</sup>, Adriano Brandelli<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Departamento de Ciência de Alimentos (ICTA), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre Brazil.

<sup>2</sup> Laboratório de Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Paulo Gama 110, CEP 90040-060, Porto Alegre Brazil.

<sup>3</sup> UNIPROTE-MS, Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre Brazil.

\* Corresponding author: fax: +5551 3308 7048; e-mail: [abrand@ufrgs.br](mailto:abrand@ufrgs.br)

## **Abstract**

Microbial extracts continue to be a productive source of new molecules with biotechnological importance. The fungi of the genus *Penicillium* are known to produce biologically active secondary metabolites. In this work, *Penicillium chrysogenum* produced active metabolites growing on the agro-industrial residues grape waste and cheese whey. The 7-day cultures showed antimicrobial activities against bacterial, fungi and amoeba, strains of food, medical and agronomical importance. The cheese whey filtrates inhibited the growth of the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa*, the fungus *Fusarium oxysporum* and the amoebae *Acanthamoeba polyphaga*. Due to the greater antimicrobial activity of the cheese whey filtrate, a footprinting profile was carried out using the ESI-MS and ESI-MS/MS techniques. The presence of penicillin G, which is a traditional metabolite produced by this specie was confirmed, and other metabolites that have antimicrobial activity such as penicillin V and rugulosin can be also suggested. In addition, there was no production of roquefortine C, a mycotoxin commonly produced by this fungus. *P. chrysogenum* was able to produce a wide variety of antimicrobial compounds on agro-industrial residues, which makes the process ecologically-friendly.

**Keywords:** *Penicillium chrysogenum*, agro-industrial residues, secondary metabolites, antimicrobial activity, ESI-MS.

## Introduction

Infectious diseases caused by bacteria, viruses, parasites and fungi are the major cause of death and morbidity. Resistance to antibiotics has led to the emergence of new and the reemergence of old infectious diseases. The continued development and spread of antimicrobial resistance creates an urgent need for the development of new antimicrobials and the appropriate use of currently available agents<sup>1,2</sup>. Food-borne illnesses resulting from the consumption of contaminated foods have been of great concern for public health. There is an increased consumer concern and a demand for more natural and minimally processed food<sup>3,4</sup>. In addition, infectious diseases have led to important economic losses worldwide in agriculture. To face these problems, producers have become increasingly dependent on agro-chemicals. However, the intensive use of chemicals in conventional crop management has led to the emergence of frequent problem of resistance microbial pathogens and has also caused serious problems affecting not only human health but also the quality of the environment<sup>5</sup>.

The success of filamentous fungi for the industrial production of biotechnological products is largely due to the metabolic versatility of these microorganisms. Industry exploits their biosynthetic capabilities to produce pharmaceuticals and other products through fermentation<sup>6,7</sup>. A large number of fungal extracts and/or extracellular products have antimicrobial activity, mainly related to *Penicillium* species. Since the discovery of penicillin, the micromycetes have been famous as producers of secondary metabolites with biological activity, including antibacterial, antifungal, immunosuppressants, cholesterol-lowering agents and also potent mycotoxins<sup>8,9</sup>. *Penicillium chrysogenum*, which is one of the most widespread fungal species, is known to produce a great variety of natural products. The fungus has

the ability to synthesize penicillin and related  $\beta$ -lactam antibiotics in addition to several other secondary metabolites<sup>10,11</sup>.

There is a continued need to find new pharmaceuticals, and hence for the development of rapid and efficient methods for the screening of large numbers of microbial cultures for the production of biologically active metabolites<sup>6</sup>. One of the fastest and most effective profiling methods employs mass spectrometry — microbial extracts are injected directly into a mass spectrometer applying the electrospray ionization technique<sup>12</sup>. Mass spectrometry (MS) has become the method of choice in structural characterization of small molecules and proteins, due to MS not only measure the molecular mass of compound, but also provide structural information by fragmentation studies via tandem MS/MS<sup>13</sup>. The mass profile can be obtained within a few minutes of analysis and can be used to reject or strengthen a hypothesis whether a specific metabolite is present in the sample or not<sup>14</sup>.

Agro-industrial residues can be used as a natural bioresource for the production of bioactive compounds, because they are inexpensive, abundant and their use may result in environmental and economic benefits<sup>15,16</sup>. Hence, the objective of this work was verify the production of antimicrobial metabolites against bacteria, fungi and amoeba by the filamentous fungi *Penicillium chrysogenum* using agro-industrial residues as the sole source of nutrients.

## **Materials and Methods**

### *Microorganism*

The fungus *Penicillium chrysogenum* belongs to the collection of the Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology (Porto Alegre, Brazil). This isolate was previously identified by sequencing the ITS region rDNA and part of the  $\beta$ -tubulin gene

(unpublished results). The fungus was maintained on Potato Dextrose Agar (PDA) slants covered with mineral oil at 4 °C and subcultured periodically.

#### *Culture media and growth conditions*

The conidia suspension was performed according to<sup>17</sup>. The fungus was cultivated on cheese whey and grape waste (10 g/L), in erlenmeyers of 250 mL containing 50 mL of medium. The conditions were 7 days, at 30 °C, 120 rpm. The samples were filtered through Whatman n° 1 filter. The filtrates were lyophilized and then resuspended in distilled water to obtain a 100 mg/mL. Samples were sterilized through 0.22 µm filters previously to the analyses of biological activities. These samples were used to determine the antibacterial, antifungal and amebicidal activities.

#### *Antibacterial activity*

The antibacterial activity was determined using the agar diffusion method according to<sup>18</sup> with minor modifications. The bacteria tested were *Salmonella Typhimurium* ATCC 14078, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Staphylococcus aureus* ATCC 9801 and *Pseudomonas aeruginosa* (environmental isolate).

Bacterial suspensions were prepared with sterile saline (8.5 g/L NaCl), being standardized in spectrophotometer at 600 nm, to obtain a concentration of 10<sup>8</sup> CFU/mL. These bacteria were inoculated on TSA (Tryptic Soy Agar) plates with a swab that was previously submerged in the suspensions. An aliquot of 15 µL filtrates was applied on the plates, which were incubated for 24 h at 30 °C. The antibacterial activity was determined by the presence of inhibition haloes. The minimum inhibitory concentration

(MIC) was determined using the concentrations of 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 and 1.56 mg/mL of the filtrates and an aliquot of each dilution was applied on the plates.

#### *Antifungal Activity*

The filamentous fungi *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (environmental isolate), *Aspergillus fumigatus* (environmental isolate), *Aspergillus flavus* (food isolate), *Penicillium expansum* (food isolate) and the yeast *Candida tropicalis* (clinical isolate) were used. The fungi were cultivated on Potato Dextrose Agar (PDA) dishes for 5 days at 30 °C. After the conidia suspension was prepared, as previously mentioned for *P. chrysogenum*, it was added to the PDA at 50 °C in an enough volume to provide a final concentration of  $10^6$  conidia/mL. The medium was poured in plates and after the solidification 15 µL of the filtrates were added. The plates were incubated at 30 °C for 48 h and subsequently observed for inhibitory activity against the fungal indicator (adapted from<sup>19</sup>). Activity against *C. tropicalis* and the MIC were developed by similar protocols described for the antibacterial activity.

The effect of the filtrates on the spore germination according to<sup>20</sup> was determined.  $10^6$  spores were suspended in 15 µL of the filtrates, incubated for 2 h at 28 °C and then inoculated onto the PDA-containing Petri dishes. The plates were incubated for 48 h at 30 °C. The effect of the filtrates was assessed by visual comparison of the mycelial development with the control group.

#### *Amebicidal Activity*

The amebicidal activity was determined according to<sup>21</sup>. Concentrations of 50, 25, 10, 5, 2.5 and 1 mg/mL of the filtrates were tested against the strain of *Acanthamoeba polyphaga* ATCC 30461. For the assessment of amebicidal activity, 100 µL of *A.*

*polyphaga* ( $8 \times 10^3$  trophozoites/mL) cultures and 100  $\mu$ L of each test solution were inoculated into a 96-well plate. The plate was sealed and incubated at 30 °C, monitored by means of an inverted microscope, and counted in a Fuchs-Rosenthal counting chamber after 24, 48 and 72 h. The controls used were sterile water and culture media. The experiments were performed in triplicate on three different days.

#### *Extraction of metabolites*

The extraction was performed according to<sup>22</sup> with modifications. The lyophilized filtrates were extracted twice in 3 mL acetonitrile and 2 mL 1% formic acid in ethyl acetate and ultrasonicated for 10 min. The solvents were evaporated and the residue was resuspended in 1% formic acid aqueous solution and passed through a 0.2  $\mu$ m disposable filter before TOF-MS analysis.

#### *TOF-MS conditions*

A Waters Q-TOF micro was used to determine the mass profile of the cheese whey extract. The instrument is equipped with a nano-electrospray ionization (nano-ESI) source. Data were analyzed with the Waters MassLynx software. MS spectra were processed using background subtract followed by smoothing the spectrum with Savitzky-Golay smoothing, and measuring the peak top with a centroid top of 80%. The direct injection with 1  $\mu$ L/min flow was performed. The conditions of ESI MS and ESI MS/MS were according to<sup>22</sup> and are given in Table 1. The standard Penicillin G with purity  $\geq 98.0\%$  (Sigma) was used to confirm the presence of this metabolite in the extract.

**Table 1: LC/TOF-MS operation conditions in ESI+ ion mode**

Parameter	MS and MSMS
Capillary Voltage (V)	3300
Tof flight tube (V)	5630
MS Cone Voltage (V)	50
Sample Cone Voltage (V)	50
Collision Gas	Argon
Collision Energy (eV)	6 and 25
Source Temperature (°C)	100
Reflectron (V)	1780

## Results and Discussion

### *Determination of biological activities*

The lyophilized samples were assayed against gram positive and gram negative bacteria and the inhibition occurred predominantly on gram positive bacteria, *B. cereus* and *S. aureus* (Table 2). Due to the fact that *P. chrysogenum* is able to produce  $\beta$ -lactam antibiotics, which are active mainly against gram positive bacteria, it is possible that the inhibition could be caused by the presence of penicillins in the filtrates. However, it is important to highlight the inhibition of the gram negative bacteria *P. aeruginosa*. As gram negative bacteria are naturally resistant to penicillins, the presence of another metabolite with antibacterial activity can be suggested. Gram negative microorganisms are typically more resistant to antimicrobials than gram-positive, and this has been explained by the presence of the outer-membrane permeability barrier, which limits access of the antimicrobial agents to their targets in the bacterial cell<sup>23</sup>.

*S. aureus* is a versatile organism with several virulent characteristics and resistance mechanisms. It is also a significant cause of a wide range of infectious diseases in humans<sup>24</sup>. *P. aeruginosa* is also a pathogen associated with a broad spectrum of human infections<sup>25</sup>. Infections caused by these bacteria may be associated with significant morbidity and mortality and therapeutic options are becoming increasingly limited with the continued emergence and spread of multiresistant strains. For this reason, there is a need to develop alternative fighting methods to antibiotic therapy<sup>26</sup>.

*B. cereus* has been implicated in many foodborne outbreaks involving several products such as rice, pasta, meat, vegetables and dairy products. Several *B. cereus* strains have been identified as the causative agent of two different types of food poisoning: the emetic type and the diarrheal type, and both can occasionally be fatal<sup>27</sup>. The application of these filtrates in food, besides promoting the inhibition of pathogens like *B. cereus*, could be also used as natural colorants, because of their yellow pigmentation (unpublished results). However, it is clear that further studies for the characterization of these pigments are necessary, mainly on their toxicity before they can be used as food colorant.

**Table 2: Growth inhibition caused by filtrates of *Penicillium chrysogenum* on different culture media**

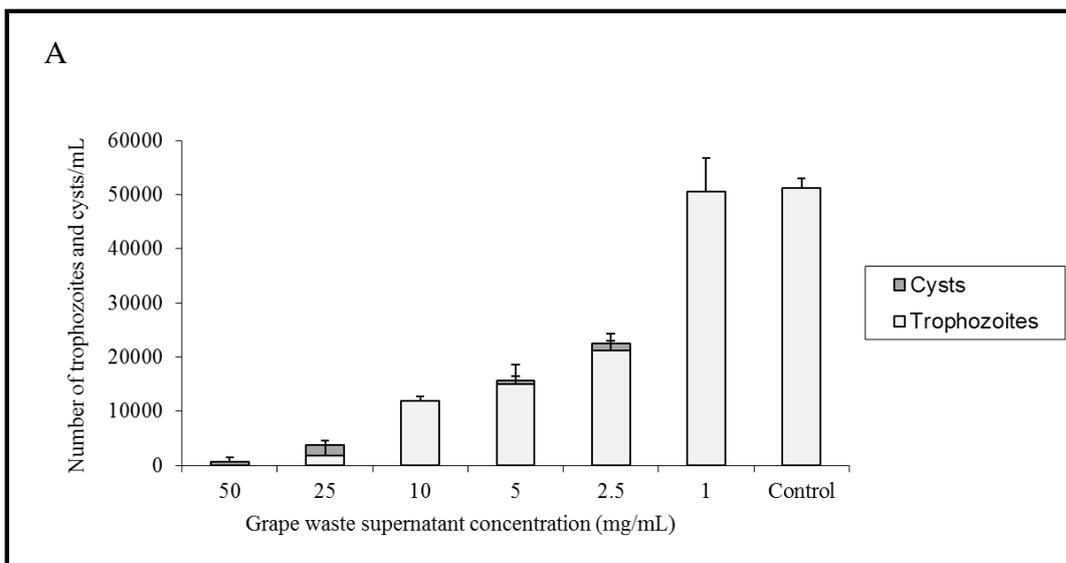
Culture Medium	Grape waste	Cheese whey
Microorganisms		
<b>Gram positive Bacteria</b>		
<i>Bacillus cereus</i>	++ (25)	++ (12.5)
<i>Staphylococcus aureus</i>	+++ (25)	++ (50)
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-
<b>Gram negative Bacteria</b>		
<i>Escherichia coli</i>	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+ (50)
<i>Salmonella Enteritides</i>	-	-
<b>Yeast</b>		
<i>Candida tropicalis</i>	-	-
<b>Filamentous fungi</b>		
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	+ (50)
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	-

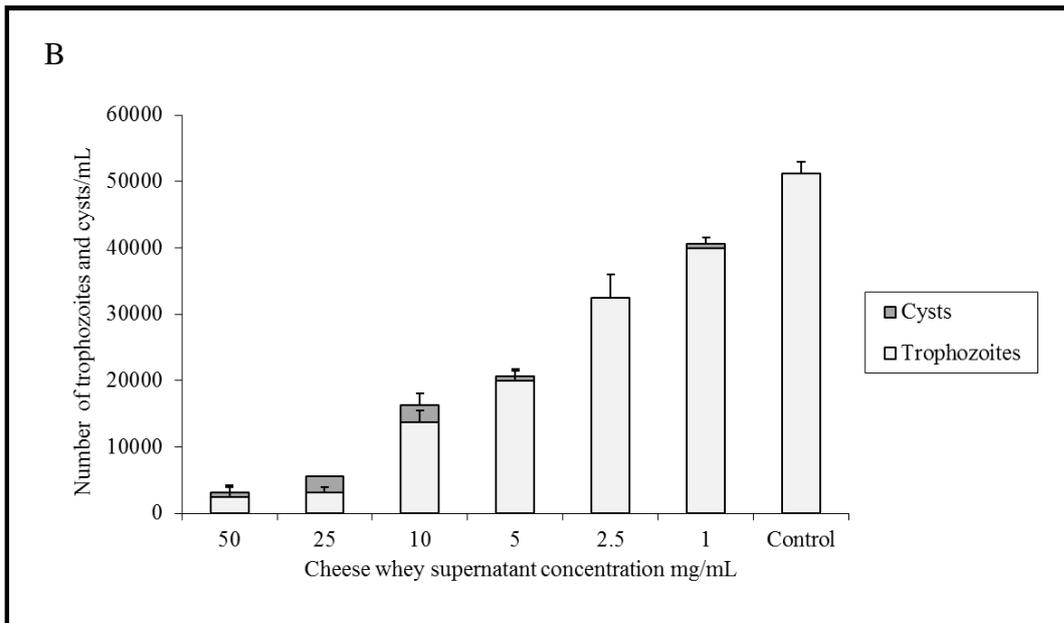
-: No inhibition; +: inhibition halo until 8mm; ++: inhibition halo between 9 and 15mm; +++: inhibition halo larger than 15mm (according to<sup>28</sup>). The values indicate the minimum inhibitory concentration for each filtrates tested.

The phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* was inhibited by the cheese whey filtrates. Some strains of this fungus are responsible for severe vascular wilt or root rot diseases in many plants<sup>29</sup>. *Fusarium* wilt caused by the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* is one of the most devastating diseases of tomato<sup>30</sup>. Synthetic chemical fungicides have long been used to reduce the incidence of plant diseases. However, the disadvantages of the chemical fungicides have high costs,

causing environmental pollution, and inducing pathogen resistance<sup>31</sup>. Novel natural antifungal compounds are necessary to be discovered, being the filamentous fungi valuable sources of small-size antifungal peptides, like the peptide PAF produced by *Penicillium chrysogenum*<sup>32</sup>. In addition, other secondary metabolites with antifungal activity could be produced. None of the filtrates caused inhibition of fungal sporulation.

The filtrates were also tested against a strain of *Acanthamoeba polyphaga* (Fig. 1). *Acanthamoeba* causes: granulomatous amebic encephalitis, a chronic fatal brain infection that occurs mostly in immunodeficient individuals; amebic keratitis, a sight-threatening corneal infection related to contact lens misuse, and cutaneous, nasopharyngeal and systemic infections<sup>33</sup>.





**Fig. 1: Susceptibility of *A. polyphaga* to a) grape waste filtrates and b) cheese whey filtrates.** These graphs show 72 hours of treatment and the control. The cysts are shown in dark bars and the trophozoites in grey bars.

Both filtrates showed amoebicidal activity, being more efficient in 72 h of treatment and at higher concentrations, when the cyst formation occurred. All concentrations of the cheese whey filtrates caused a decrease of trophozoites in 72 h. In the same period, the grape waste filtrate showed absence of trophozoites in the concentration of 50 mg/mL, while in the same concentration cheese whey showed a reduction to 2% of trophozoites in relation to control group. Trophozoites encyst in double cellulose walls under adverse environmental conditions such as starvation, desiccation, extreme temperatures, and exposure to antimicrobial agents<sup>34</sup>.

Most literature report the amoebicidal activity of plant extracts from *Salvia staminea* and *Salvia caespitosa*<sup>35</sup>, *Allium scrodoprosum* subsp. *rotundum*<sup>36</sup>, *Allium sativum*<sup>37</sup> and *Solidago virgaurea*, *Solidago graminifolia*, *Rubus chamaemorus* and *Pueraria lobata*<sup>38</sup>. Few reports on fungal metabolites with amoebicidal activity are

available. According to<sup>34</sup> his group has provided the first evidence that the metabolic product obtained from *Fusarium* sp Tlau3, an endophytic fungus isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl., a Thai medicinal plant, can effectively kill *Acanthamoeba* trophozoites *in vitro*.

#### *Footprinting of metabolites and Penicillin G identification*

A mass profile of the cheese whey filtrate was generated to investigate the metabolites produced by *P. chrysogenum*. The footprinting of the most abundant metabolites is shown in Fig. 2. Initially, a screening for metabolites commonly produced by this fungus was performed including roquefortine C, chrysogine<sup>39</sup>, penicillins, PR toxin, secalonic acids<sup>40</sup>, cyclopiazonic acid<sup>41</sup>, meleagrins, xanthocillins, sorbicillins, questiomycin, chrysogenin, negapillin, notatin, PAF and fungisporin<sup>42</sup>. There are reports on the production of ochratoxin A, penicillic acid and patulin by some strains of *P. chrysogenum*<sup>43</sup>. Then, it was also performed the search for another metabolites produced using mass databases as found in<sup>44,45</sup>.

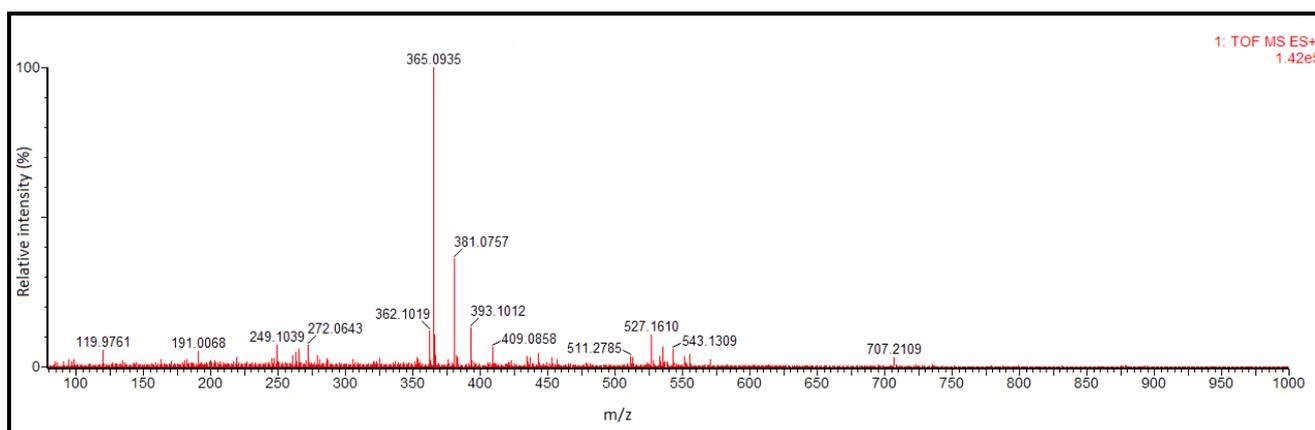


Fig. 2: ESI Q-TOF MS fingerprinting of produced metabolites by *Penicillium chrysogenum* on cheese whey. The spectrum shows the more abundant metabolites using an energy collision of 6V. The detailed spectrum is shown in supplementary material.

The protonated masses were compared with the literature data and are displayed in Table 3. The biological activities described for these metabolites are also listed in the table.

**Table 3: Protonated masses found in the cheese whey extract and compared with masses of the literature**

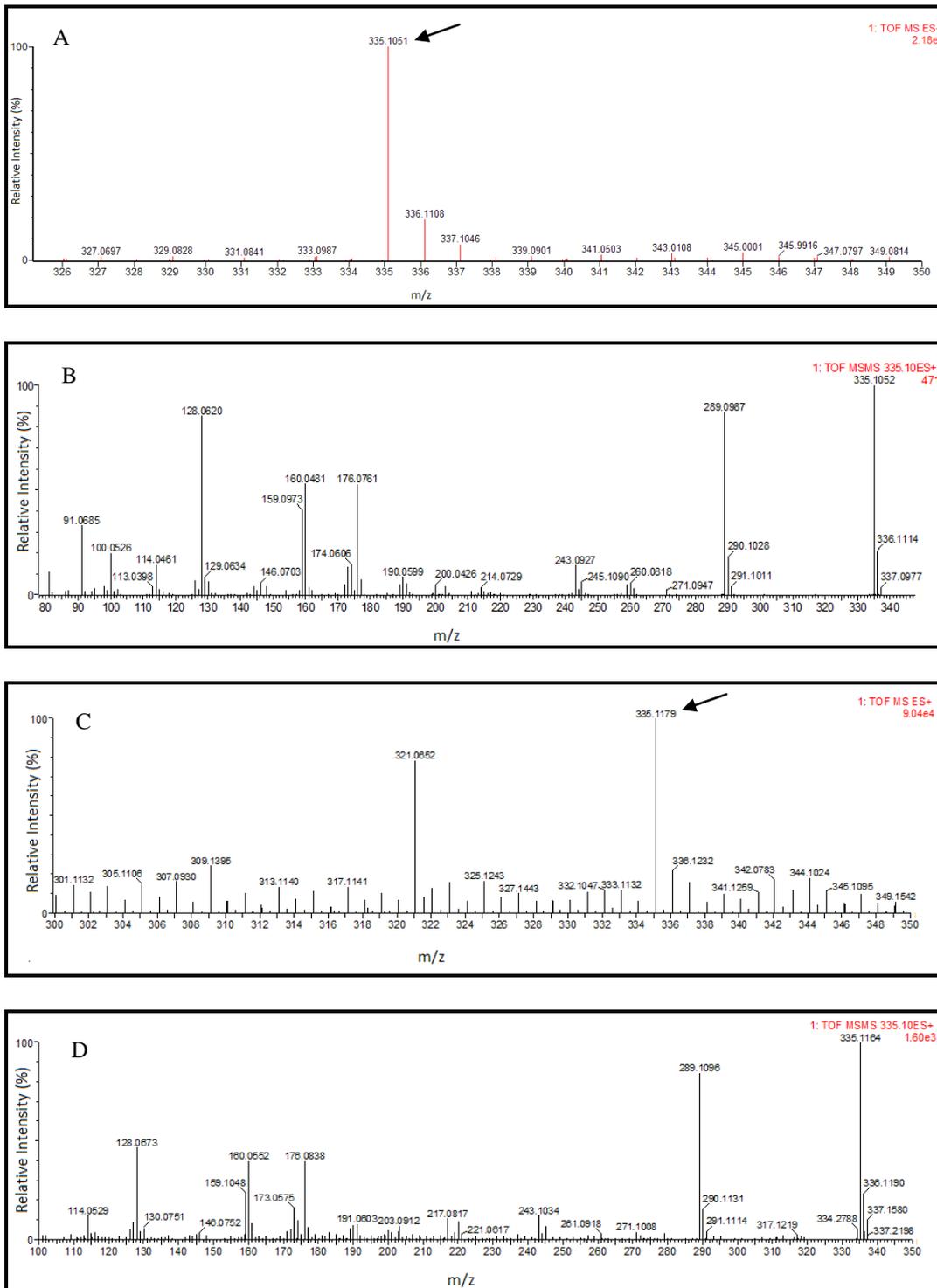
Sample	Literature	Compounds	Biological	Reference
Da	Da	(M+H <sup>+</sup> )	Activity	
325.13	325.12	Formyl-xanthocilin X	Antiviral	Smedsgaard et al, 2004 <sup>39</sup>
335.12	335.11	Penicillin G	Antibiotic	Smedsgaard et al, 2004 <sup>39</sup>
337.17	337.16	Cyclopiazonic acid	Mycotoxin	Smedsgaard et al, 2004 <sup>39</sup>
351.18	351.20	Penicillin V	Antibiotic	Smedsgaard et al, 2004 <sup>39</sup>
543.13	543.13	Rugulosin	Antibiotic	Brunati et al., 2009 <sup>46</sup>

Molecular masses of some mycotoxins as roquefortine C, secalonic acid, ochratoxin A, citrinin, PR toxin and patulin were not found in this extract. The presence of the mycotoxin ciclopiazonic acid was evidenced in the extract. Cyclopiazonic acid is a mycotoxin that has been isolated from numerous species of *Aspergillus* and *Penicillium*<sup>47</sup>. This toxin has been found as a natural contaminant of corn and peanuts as well as of cheese colonized with *P. camemberti* or other *Penicillium* species. This fact could explain the presence of this mycotoxin on cheese whey. Despite the production of mycotoxins, <sup>40</sup> reported that *P. chrysogenum* does not appear to be a serious source of mycotoxins. In addition, there is a possibility to control the production of mycotoxins, trying to decrease or not producing them, by changing cultivation parameters.

Rugulosin was first described in *Penicillium rugulosum* and has been reported as a toxic substrate to *Drosophila melanogaster* and to ovarian cells of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. It has been reported by many authors as an antibiotic to both Gram positive and Gram negative bacteria, also showing moderately antifungal activity<sup>48</sup>. The production of rugulosin by *P. chrysogenum* IWW 1053 was reported and no cytotoxicity was found in extracts containing rugulosin<sup>46</sup>.

*Penicillium chrysogenum* has the ability to produce Penicillin G (PenG) and V, and both were found in the extract. The presence of PenG in the grape waste and cheese whey filtrates was investigated. PenG was produced in both media as demonstrated by HPLC (data not shown). The filtrate was initially submitted to aqueous two-phase extraction using PEG and ammonium sulphate solutions, and a HPLC analysis was performed with the PEG phase. The amount of PenG on grape waste and cheese whey was 1.6 mg and 0.5 mg in a 50 mL culture, respectively. The presence of PenG on cheese whey extract was also evidenced in the analysis of ESI-MS and ESI-MS/MS (Fig. 3). The presence of the mass of 335.1179 in the crude extract (c) and the same pattern of fragmentation of the penicillin standard (d) confirm the identity of this metabolite.

There are few studies about xanthocillins. Xanthocillin X dimethylether and mono-methylether, which showed antiviral activity against Newcastle disease virus, vaccinia and herpes simplex viruses, are produced by *Aspergillus* sp and *Penicillium notatum* (synonymized as *Penicillium chrysogenum*). There are also reports of the antibacterial activity of these compounds<sup>49</sup>.



**Fig. 3:** Spectra in a) TOF MS of penicillin standard with the mass 335.1051 (arrow); b) TOF MS/MS of penicillin standard; c) TOF MS *Penicillium chrysogenum* on cheese whey extract showing the presence of penicillin with the mass 335.1179 (arrow) and d) pattern of fragmentation using TOF MS/MS of the penicillin found in the sample.

*P. chrysogenum* produces a number of unidentified metabolites. None of the ions can be explained as protonated ions or sodium adducts from known metabolites or background ions. Background ions and ions from primary metabolites can be found in all extracts. These ions might represent metabolites produced by the organisms and can be used in the search of new metabolites in combinations with other analytical methods such as HPLC or ESI MS/MS<sup>14</sup>.

This fungus produced active metabolites with antibacterial, antifungal and amoebicidal activities. Some metabolites previously shown to display insecticidal and antifungal activities were also detected, showing that despite of the long time of study on *P. chrysogenum*, there are potential new metabolites to be used as drugs or prototypes. Unexpected functions of known secondary metabolites are being unraveled and they have interesting applications in many life-threatening diseases such as prion diseases, Alzheimer's disease, cancer (hepatoma, breast, hematopoietic, colorectal, gastric, pancreatic, leukemia, renal cell and other carcinomas, and fibrosarcoma), pulmonary disease, cardiovascular disease, parasitic diseases and viral diseases such as AIDS<sup>50</sup>.

## **Conclusions**

*P. chrysogenum* is able to produce active metabolites on agro-industrial residues. This fungus produced PenG on inexpensive media such as grape waste and cheese whey and other metabolites with interesting activities were also detected. These substances could be used as successful compounds in medical and food industries and possible application in agriculture. More studies are necessary to isolate the active compounds and to study each one individually.

## Acknowledgements

Authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

## References

- [1] Hemaiswarya S, Kruthiventi AK, Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*. 2008; 15: 639–652.
- [2] Song J. Introduction: the goals of antimicrobial therapy, *Int J infect Dis*. 2003; 7: 51-54.
- [3] Serra AT, Matias AA, Nunes AVM, Leitão MC, Brito D, Bronze R, Silva S, Pires A, Crespo MT, San Romão MV, Duarte CM. In vitro evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food, *Innovative Food Sci. Emerg. Technol*. 2008; 9: 311–319.
- [4] Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation, *Int. J. Food Microbiol*. 2001: 71 1–20.
- [5] Pérez-Garcia A, Romero D, Vicente A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture, *Curr. Opin. Biotechnol*. 2011; 22:1–7.
- [6] Goodacre R, Trew S, Wrigley-Jones C, Saunders G, Neal MJ, Porter N, Kell DB. Rapid and quantitative analysis of metabolites in fermentor broths using pyrolysis mass spectrometry with supervised learning: application to the screening of *Penicillium chrysogenum* fermentations for the overproduction of penicillins, *Analytica Chimica Acta*. 1995; 313: 25-43.
- [7] El-Enshasy HA. Filamentous Fungal Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications. In: Yang, ST (Editor). *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*. Elsevier, 2007:225-261.

- [8] Petit P, Lucas EMF, Abreu LM, Pfenning LH, Takahashi JA. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian cerrado soil, *Electron. J. Biotechnol.* 2009; 4:1-9.
- [9] Rancic A, Sokovic M, Karioti A, Vukojevic J, Skaltsa H. Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity, *Environ Toxicol Pharmacol.* 2006; 22:80–84.
- [10] Jami MS, Barreiro C, García-Estrada C, Martín JF. Proteome Analysis of the Penicillin Producer *Penicillium chrysogenum*, *Mol. Cell. Proteomics* 9.6, DOI 10.1074/mcp.M900327-MCP200, 2010.
- [11] Bringmann G, Lang G, Gulder TAM, Tsuruta H, Mühlbacher J, Maksimenka K, Steffens S, Schaumann K, Stöhr R, Wiese J, Imhoff JF, Perovic-Ottstadt S, Boreiko O, Müller WEG. The first sorbicillinoid alkaloids, the antileukemic sorbicillactones A and B, from a sponge-derived *Penicillium chrysogenum* strain, *Tetrahedron.* 2005; 61: 7252–7265.
- [12] Mapari SAS, Nielsen KF, Larsen TO, Frisvad JC, Meyer AS, Thrane U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005; 16:231-238.
- [13] Chen G, Pramanik BN, Liu YH, Mirza U. Applications of LC/MS in structure identifications of small molecules and proteins in drug discovery, *J. Mass spectrom.* 2007; 42:270-287.
- [14] Smedsgaard J, Frisvad JC. Using direct electrospray mass spectrometry in taxonomic and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts, *J. Microbiol.Meth.* 1996; 25: 5-17.
- [15] Nigam PS. Production of bioactive secondary metabolites. In: Poonam Singh nee' Nigam, Ashok Pandey (Ed), *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization*, Springer Science+ Business Media, 2009.

- [16] Nigam PS, Gupta N, Anthwal A. Pre-treatment of Agro-Industrial Residues, *In: Poonam Singh nee' Nigam, Ashok Pandey (Ed), Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization, Springer Science+ Business Media, 2009.*
- [17] Dedavid e Silva LA, Lopes FC, Silveira ST, Brandelli A. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus phoenicis* in grape waste using response surface methodology, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2009; 152:295-305.
- [18] Motta AS, Brandelli A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*, *J. Appl. Microbiol.* 2002; 92:63-71.
- [19] Rouse S, Harnett D, Vaughan A, van Sinderen D. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *J. Appl. Microbiol.* 2008; 104: 915–923.
- [20] Becker-Ritt AB, Martinelli AHS, Mitidieri S, Feder V, Wassermann GE, Santi L, Vainstein MV, Oliveira JTA, Fiuza LM, Pasquali G, Carlini CR. Antifungal activity of plant and bacterial ureases, *Toxicon.* 2007; 50: 971–983.
- [21] Ródio C, Vianna DR, Kowalski KP, Panatieri LF, von Poser G, Rott MB. In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (*Asteraceae*) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*, *Parasitol Res.* 2008; 104:191–194.
- [22] Senyuva HZ, Gilbert J, Öztürkoglu S. Rapid analysis of fungal cultures and dried figs for secondary metabolites by LC/TOF-MS, *Analytica chimica Acta.* 2008; 617:97-106.
- [23] Poole K. Multidrug resistance in Gram-negative bacteria, *Curr. Opin. Microbiol.* 2001; 4:500–508.
- [24] Kanafani ZA, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* Infections: New Challenges, from an Old Pathogen, *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006; 24:182-93.

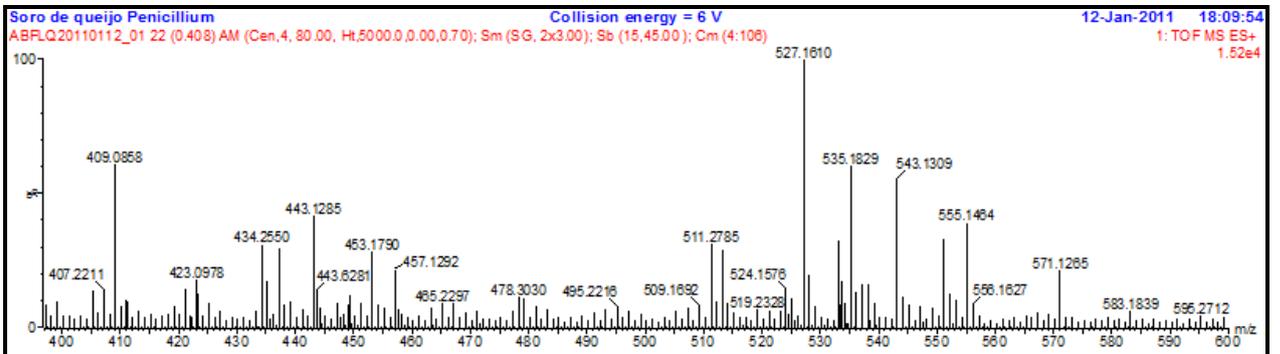
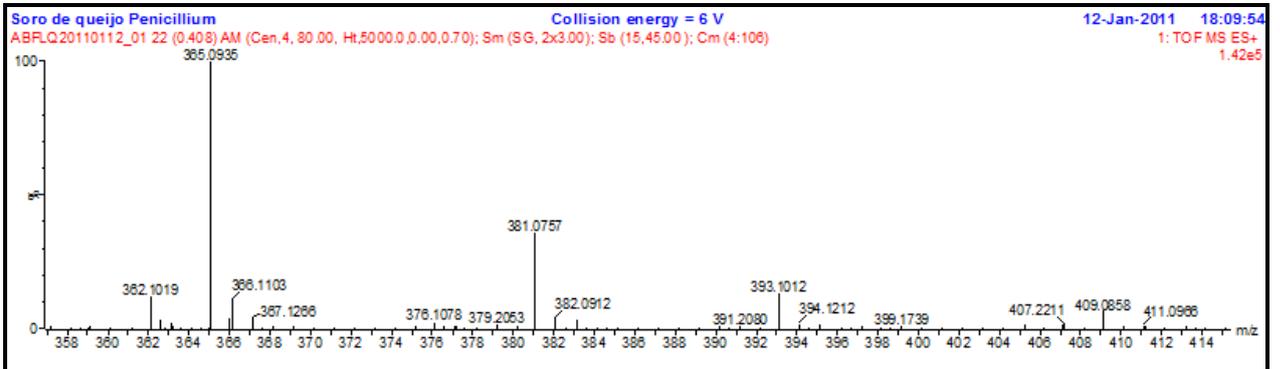
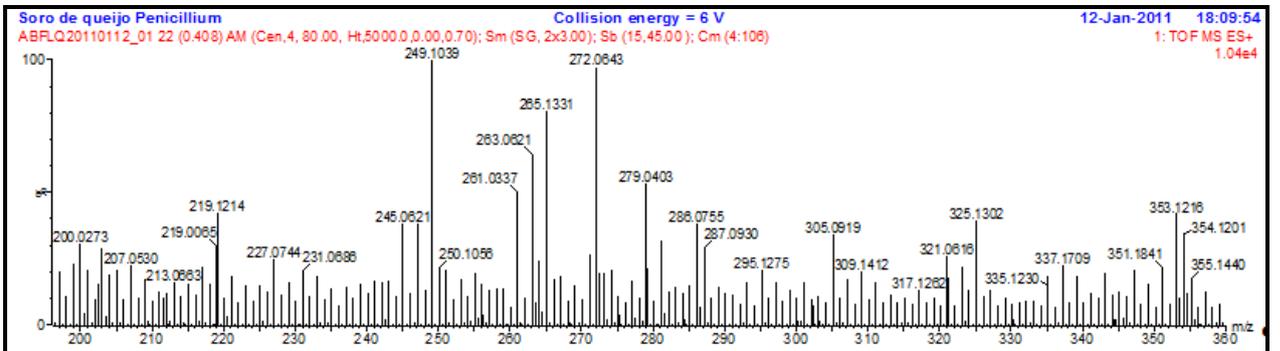
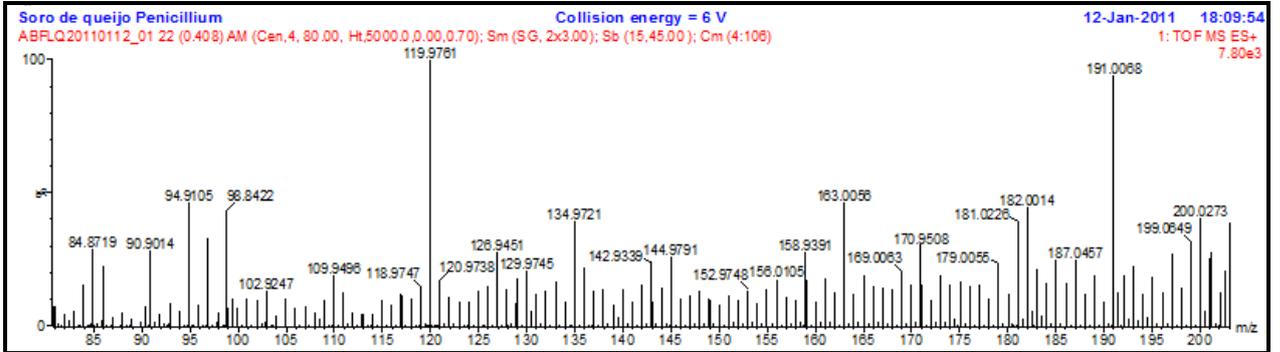
- [25] Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary, *J. Hosp. Infect.* 2009; 73:338-344.
- [26] Szpakowska M, Lasocki K, Grzybowski J, Graczyk A. A photodynamic activity of the haematoporphyrin derivative with rutin and arginine substituents (HpD-Rut2-Arg2) against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Pharmacol. Res.* 2001; 44, doi:10.1006/phrs.2001.0855.
- [27] Martínez-Blanch JF, Sánchez G, Aznar R. Development of a real-time PCR assay for detection and quantification of enterotoxigenic members of *Bacillus cereus* group in food samples, *Int. J. Food Microbiol.* 2009; 135:15–21.
- [28] Kim C, Jung H, Kim YO, Shin CS. Antimicrobial activities of amino acid derivatives of monascus pigments, *FEMS Microbiol Lett.* 2006: 117-124.
- [29] Edel V, Steinberg C, Gautheron N, Recorbet G, Alabouvette C. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* populations isolated from different soils in France, *FEMS Microbiol. Ecol.* 2001; 36: 61-71.
- [30] Mandal S, Mallick N, Mitra A. Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato, *Plant Physiol. Biochem.* 2009; 47: 642–649.
- [31] Wang SL, Yen YH, Tsiao WJ, Chang WT, Wang CL. Production of antimicrobial compounds by *Monascus purpureus* CCRC31499 using shrimp and crab shell powder as a carbon source, *Enzyme Microbial Technol.* 2002; 31:337–344.
- [32] Skouri-Gargouri H, Ali BM, Gargouri A. Molecular cloning, structural analysis and modeling of the AcAFP antifungal peptide from *Aspergillus clavatus*, *Peptides.* 2009; 30:1798–1804.
- [33] Benitez LB, Caumo K, Brandelli A, Rott MB. Bacteriocin-like substance from *Bacillus amyloliquefaciens* shows remarkable inhibition of *Acanthamoeba polyphaga*, *Parasitol. Res.* 2010, DOI 10.1007/s00436-010-2114-5.

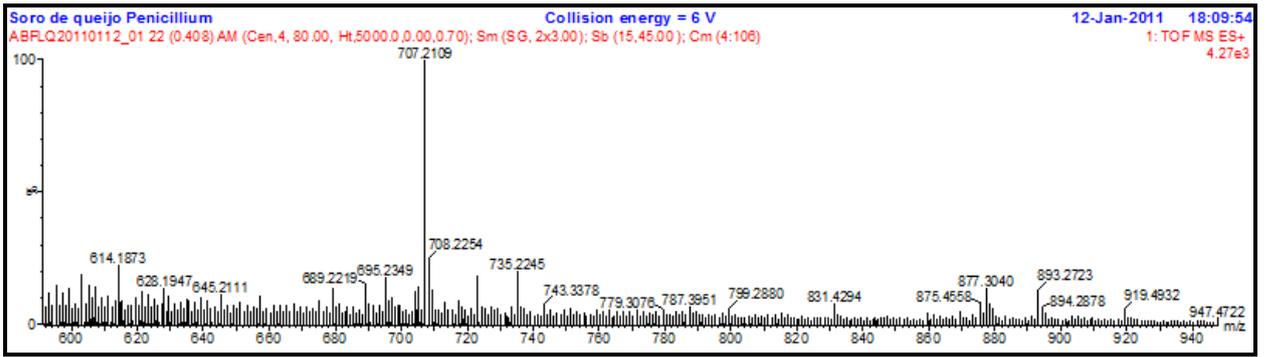
- [34] Boonman N, Wiyakrutta S, Sriubolmas N, Chusattayanond AD. Acanthamoebicidal activity of *Fusarium* sp. Tlau 3, and endophytic fungus from *Thunbergia laurifolia* Lindl, Parasitol. Res. 2008; 103:1083-1090.
- [35] Goze I, Alim A, Dag S, Tepe B, Polat ZA. In vitro amoebicidal activity of *Salvia staminea* and *Salvia caespitosa* on *Acanthamoeba castellanii* and their cytotoxic potentials on corneal cells, J Ocul Pharmacol Ther. 2009, DOI: 10.1089/jop.2008.0132.
- [36] Polat ZA, Vural A, Tepe B, Cetin A. In vitro amoebicidal activity of four *Allium* species on *Acanthamoeba castellanii* and their cytotoxic potentials on corneal cells, Parasitol Res. 2007; 101:397–402.
- [37] Polat ZA, Vural A, Ozan F, Tepe B, Özcelik S, Cetin A. In Vitro Evaluation of the Amoebicidal Activity of Garlic (*Allium sativum*) Extract on *Acanthamoeba castellanii* and its Cytotoxic Potential on Corneal Cells, J Ocul Pharmacol Ther. 2008; 24:8-14.
- [38] Derda M, Hadas E, Thiem B. Plant extracts as natural amoebicidal agents, Parasitol Res. 2009; 104:705–708.
- [39] Smedsgaard J, Hansen ME, Frisvad JC. Classification of Terverticillate *Penicillia* by Electrospray Mass Spectrometric Profiling, Studies in mycology. 2004; 49: 243-251.
- [40] Pitt JI, Hocking AD. Fungi and Food Spoilage. London New York: Springer Science + Business Media; 2009. p. 313-14.
- [41] Rundberget T, Skaar I, Flaoyen A. The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food wastes, Int. J. Food Microbiol.2004; 90: 181– 188.
- [42] Frisvad JC, Smedsgaard J, Larsen TO, Samson RA. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*, Studies in mycology.2004; 49:201-241.
- [43] Barkai-Golan R. *Penicillium* Mycotoxins, In: Mycotoxins in Fruits and Vegetables, Rivka Barkai-Golan and Nachman Paster (Ed), Elsevier, 2008.

- [44] Nielsen KF, Smedsgaard J. Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardized liquid chromatography–UV–mass spectrometry methodology, *J. Chromatogr. A.* 2003, 1002: 111–136.
- [45] Vishwanath V, Sulyok M, Labuda R, Bicker W, Krska R. Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry, *Anal Bioanal Chem.* 2009; 395:1355–1372.
- [46] Brunati M, Rojas JL, Sponga F, Ciciliato I, Losi D, Göttlich E, Hoog S, Genilloud O, Marinelli F. Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic mats of Antarctic lakes, *Marine Genomics.* 2009; 2: 43–50.
- [47] Monaci L, Arestaa A, Palmisano F, Viscontib A, Zambonina CG. Amino-bonded silica as stationary phase for liquid chromatographic determination of cyclopiazonic acid in fungal extracts, *J. Chromatogr. A.* 2002; 955:79–86.
- [48] Sumarah MW, Adams GW, Berghout J, Slack GJ, Wilson AM, Miller JD. Spread and persistence of a rugulosin-producing endophyte in *Picea glauca* seedlings, *Mycol. Res.* 2008; 112: 731 – 736.
- [49] Tatsuta K, Yamaguchi T. The first stereoselective total synthesis of antiviral antibiotic, xanthocillin X dimethylether and its stereoisomer, *Tetrahedron Lett.* 2005; 46:5017–5020.
- [50] Vaishnav P, Demain AL. Unexpected applications of secondary metabolites, *Biotechnol. Adv.* 2010; 29: 223–229.

## Supplementary Material

Expanded spectra of cheese whey ESI MS showing all the masses obtained in this study.





## **DADOS COMPLEMENTARES 2: IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PENICILINA G PRODUZIDA POR *Penicillium chrysogenum* EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

A penicilina é um antibiótico extremamente importante sendo a penicilina G (PenG) a matéria-prima para as penicilinas semi-sintéticas. PenG é comumente produzida através de fermentação submersa aeróbica por linhagens de *Penicillium chrysogenum*. Ao final da fermentação, a extração de PenG é realizada, tradicionalmente, por extração física com acetato de butila (HOSSAIN & DEAN, 2008). Porém, outras técnicas tem sido desenvolvidas incluindo extração por membrana líquida suportada, pela técnica de microfiltração, por extração por emulsão de membrana líquida, pela técnica da membrana hollow-fiber e por extração aquosa bifásica (BI *et al.*, 2009).

Sistemas aquosos bifásicos são comumente utilizados para a separação e purificação de materiais biológicos. Os mais famosos sistemas aquosos bifásicos são o sistema de dois polímeros, PEG/dextrana e o sistema PEG/sais, como exemplo PEG/sulfato de amônio. Tais sistemas tem sido amplamente utilizados para a separação de proteínas, aminoácidos, DNA, enzimas, antibióticos e outras macromoléculas. Uma das vantagens é a baixa tensão superficial entre as duas fases que causa um aumento da taxa de transferência de massa, além disso a separação de fases é facilmente obtida não sendo necessária a utilização de solventes orgânicos (YANG & CHU, 1990; BI *et al.*, 2009).

Após a identificação da linhagem *Penicillium* sp como *Penicillium chrysogenum* e devido à inibição de bactérias gram positivas dos filtrados obtidos a partir deste fungo nos meios resíduo de uva e soro de queijo (vide Tabela 1, capítulo 2), houve a necessidade de verificar a presença de PenG e, bem como realizar sua quantificação nos filtrados. Para isso, foi conduzida uma extração prévia por sistema aquoso bifásico do filtrado e após análise cromatográfica.

### **MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **Partição em Sistema Bifásico**

Inicialmente, foram preparadas soluções estoque de Polietilenoglicol (PEG) 4000 e sulfato de amônio com concentração de 50% (m/v). Foram misturados 2 mL do

filtrado e 4 mL da solução de sulfato de amônio. Após, 4 mL da solução de PEG foram adicionadas cuidadosamente. Realizou-se a homogeneização em vórtex por 15 s, seguida por centrifugação a 3.000 x g por 10 min a 4 °C. A fase superior, contendo PEG, foi coletada para análise por HPLC (segundo LIMA *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

### **Determinação de Penicilina G por HPLC**

As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido da marca Agilent, equipado com bomba quaternária, degaseificador on line, injetor automático, detector de UV-Visível e sistema de aquisição de dados ChemicalStation.

As condições cromatográficas empregadas foram coluna de fase reversa C18 com fase móvel de ácido fosfórico (50 mM v/v) e metanol na proporção 40:60 v/v, fluxo de 1 mL/min, volume de injeção de 10 µL, temperatura da coluna de 29 °C, comprimento de onda de detecção de 215 nm (BI *et al.*, 2009).

Foi utilizado padrão de penicilina G com pureza maior que 98% (Sigma) para construção da curva padrão, sendo realizadas cinco injeções em duplicata para cada diferente concentração. A curva de calibração resultou na equação:

$$y = 9023,6 x - 1,5663 (R^2 = 0,997),$$

onde y é a área do pico sob a curva e x é a concentração em mg/mL de PenG.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

De acordo com o cromatograma obtido para o meio resíduo de uva (Fig. 1), o tempo de retenção da PenG foi de 3,679 min e houve a produção de 0,032 mg/mL, logo 1,6 mg em 50 mL de cultivo. Já no cromatograma do meio soro de queijo (Fig. 2) houve a produção de 0,010 mg/mL, portanto 0,5 mg por cultivo. Houve uma produção três vezes maior de PenG no meio resíduo de uva em comparação com o meio soro de queijo. Tal fato, explicaria a maior atividade antibacteriana do filtrado de resíduo de uva, que proporcionou um maior halo de inibição (+++) em comparação com o filtrado de soro de queijo (++) sob a bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus* (Tabela 1, capítulo 2) e também pelos MIC apresentados pelo filtrado.

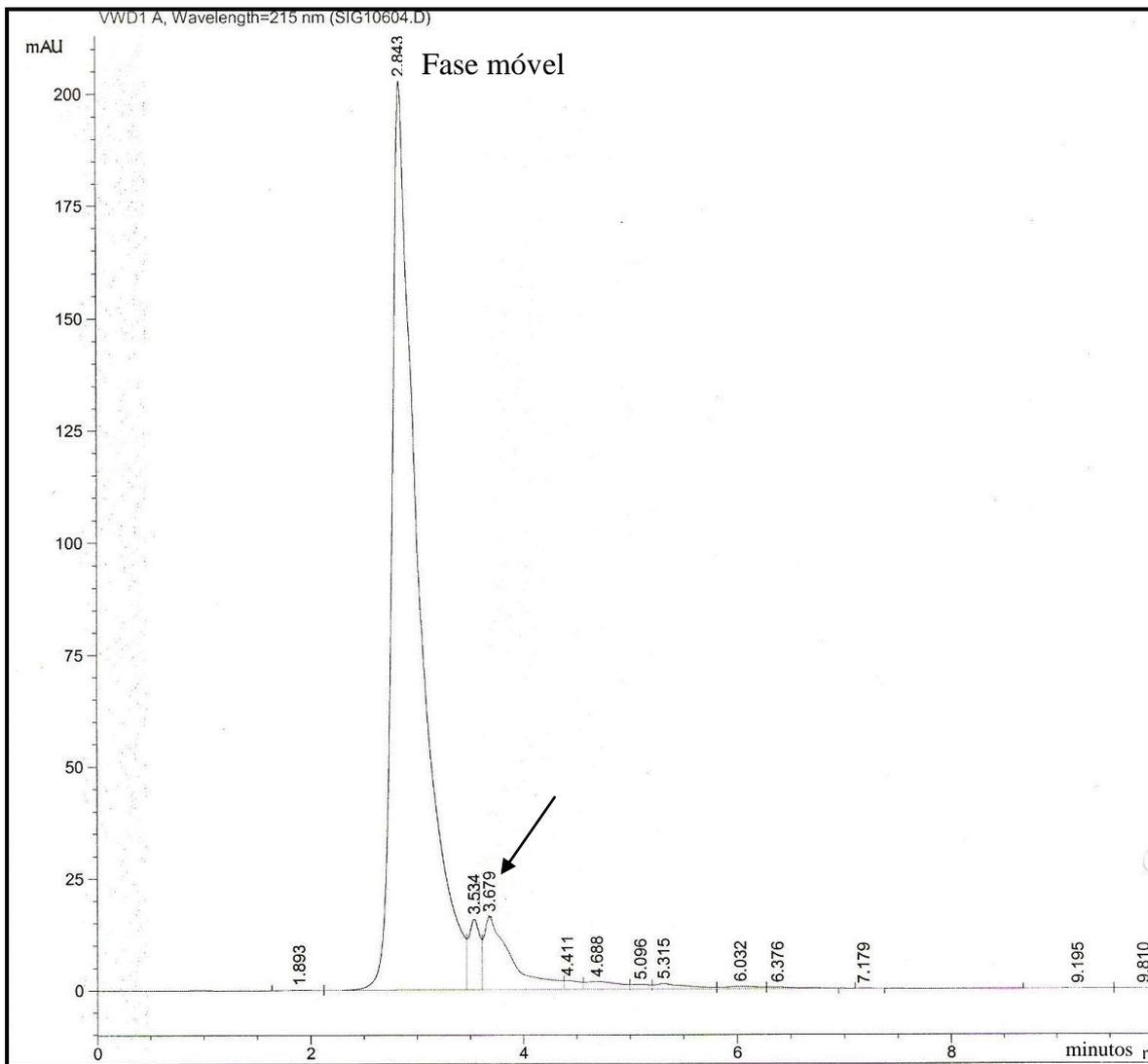


Fig 1.: Cromatograma do sobrenadante produzido a partir do meio resíduo de uva pelo fungo *Penicillium chrysogenum*. Condições cromatográficas: vide texto.

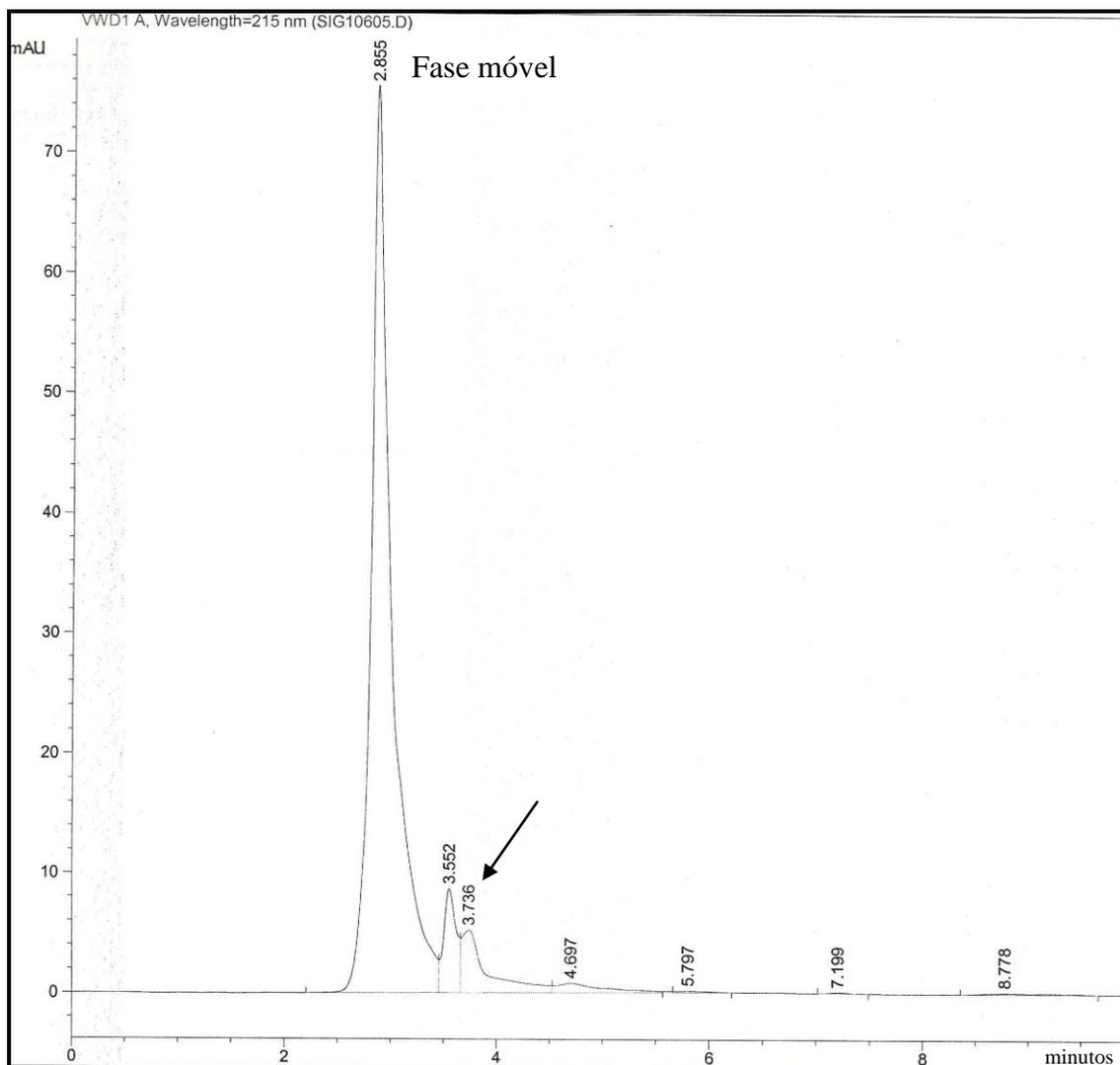


Fig 2.: Cromatograma do filtrado produzido a partir do meio soro de queijo pelo fungo *Penicillium chrysogenum*. Condições cromatográficas: vide texto.

Para verificar se houve interferência nas análises pelos solventes utilizados, devido ao pico formado no tempo de retenção de 2,8 min, foi injetado um branco contendo somente a fase móvel. Foi verificado que este pico era resultante da fase móvel segundo está demonstrado na Figura 3.

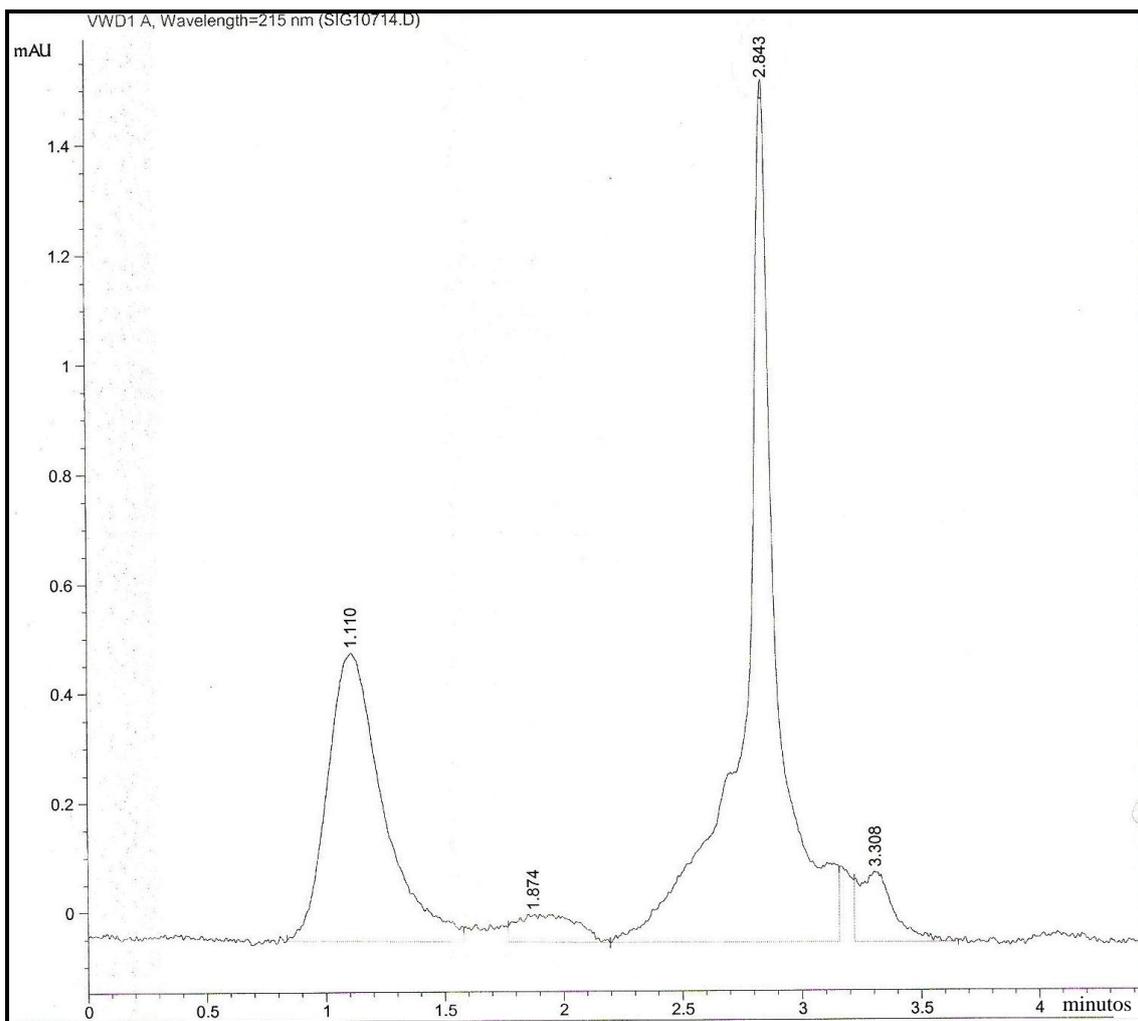


Figura 3: Cromatograma contendo somente os solventes da fase móvel: solução aquosa de ácido fosfórico (50 mM v/v) e metanol 40:60 v/v. Condições cromatográficas vide texto.

## **5. ANEXO**

### **5.1. CURVAS DE CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS**

É importante, dispor de métodos confiáveis e convenientes para medir o crescimento fúngico. Porém, o crescimento de fungos filamentosos não é tão fácil de quantificar, porque diferente de bactérias e leveduras, não crescem como células isoladas, mas como hifas, que não podem ser quantificadas através das técnicas usuais. Existe uma ampla variedade de métodos para medir o crescimento dos fungos, e um procedimento único não é aplicável para todas as situações. O crescimento de fungos filamentosos em meio líquido é usualmente medido pelo aumento da massa seca (LANGVAD *et al.*, 1999; GALVAGNO & FORCHIASSIN, 2004; TANIWAKI *et al.*, 2006). Dessa forma, para quantificar o crescimento fúngico foi utilizada a determinação de massa seca em caldo batata dextrose

#### **MATERIAIS E MÉTODOS**

##### **Determinação da Massa Seca**

Foram realizados cultivos em erlenmeyers de 250 mL em meio caldo batata, para os fungos *Diplodia* sp, *Fusarium graminearum*, *Monascus purpureus*, *Penicillium chrysogenum* 1 e *Penicillium chrysogenum* 2. Foram cultivados sete erlenmeyers, referentes aos tempos de cultivo, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas. Ao final do cultivo, o micélio foi filtrado utilizando papel filtro Whatman nº 1, lavado com água e seco em estufa a 60 °C até peso constante. Os experimentos foram realizados em duplicata segundo GALVAGNO & FORCHIASSIN, 2004 com modificações.

##### **Contagem de Células Viáveis**

A partir das alíquota de 100 µL de cada cultivo foram realizadas diluições seriadas em 900 µL salina. 20 µL de cada diluição foi adicionado a uma placa de BDA que foi incubada a 30 °C por 48 horas. Os resultados se expressam como Unidades Formadoras de Colônia (UFC) (GALVAGNO & FORCHIASSIN, 2004).

## **Turbidez ou Densidade Óptica**

Consiste na determinação da quantidade de luz difratada por uma suspensão de células. As alíquotas foram homogeneizadas em vórtex e lidas em espectrofotômetro a 550 nm (GALVAGNO & FORCHIASSIN, 2004).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A determinação da massa seca para medir o crescimento fúngico, mostrou ser o método mais adequado, pois o método turbidimétrico, utilizando espectrofotometria não foi adequado, mesmo como homogeneização prévia do micélio. Não sendo adequado, igualmente, o plaqueamento de células viáveis, utilizando a determinação de UFC (Unidade Formadora de Colônia) (dados não demonstrados). De acordo com GALVAGNO & FORCHIASSIN (2004), se as células tendem a se agregar formando micélio, é muito difícil separar as unidades e, de fato, uma UFC pode originar-se de mais de uma célula. Os fungos do gênero *Penicillium* formaram colônias passíveis de serem contadas, contudo o fungo *Fusarium graminearum*, não formou uma colônia definida, portanto desqualificando esta técnica para o acompanhamento do crescimento fúngico neste estudo. Além disso, segundo TANIWAKI et al (2006) a contagem de células viáveis usualmente reflete número de esporos ao invés de biomassa. Quando o crescimento fúngico consiste predominantemente de hifas, as contagens de células viáveis serão baixas, porém quando ocorre a esporulação, estas contagens geralmente aumentam rapidamente sem grande aumento da biomassa. Portanto, diferenças entre os fungos *Alternaria* e *Fusarium*, que produzem baixos números de esporos em relação ao crescimento da hifa, enquanto outros, como *Penicillium* que produzem um grande número de esporos, irão interferir na qualidade dos dados obtidos por essa técnica.

As curvas de crescimento dos fungos, baseadas na massa seca, estão demonstrados nas Figuras de 1 a 5. Todos os fungos, com exceção do fungo *Fusarium graminearum*, estão na fase estacionária ao final de 7 dias de cultivo, fase na qual são produzidos metabólitos secundários.

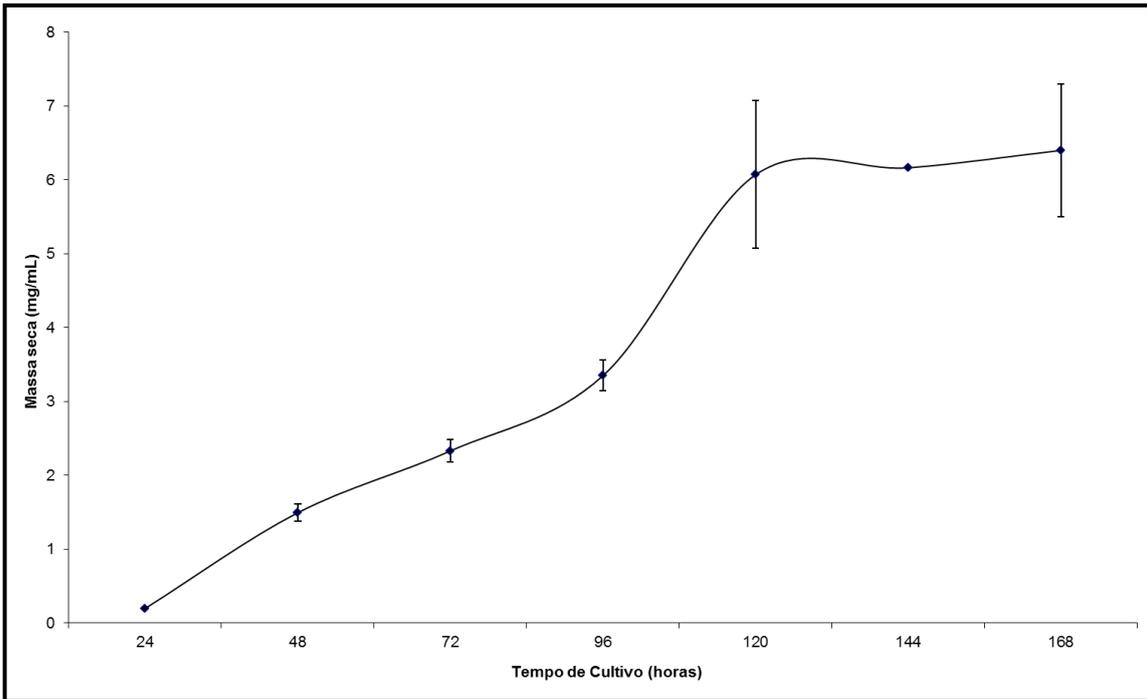


Fig 1: Curva de crescimento do fungo *Diplodia* sp em caldo batata dextrose.

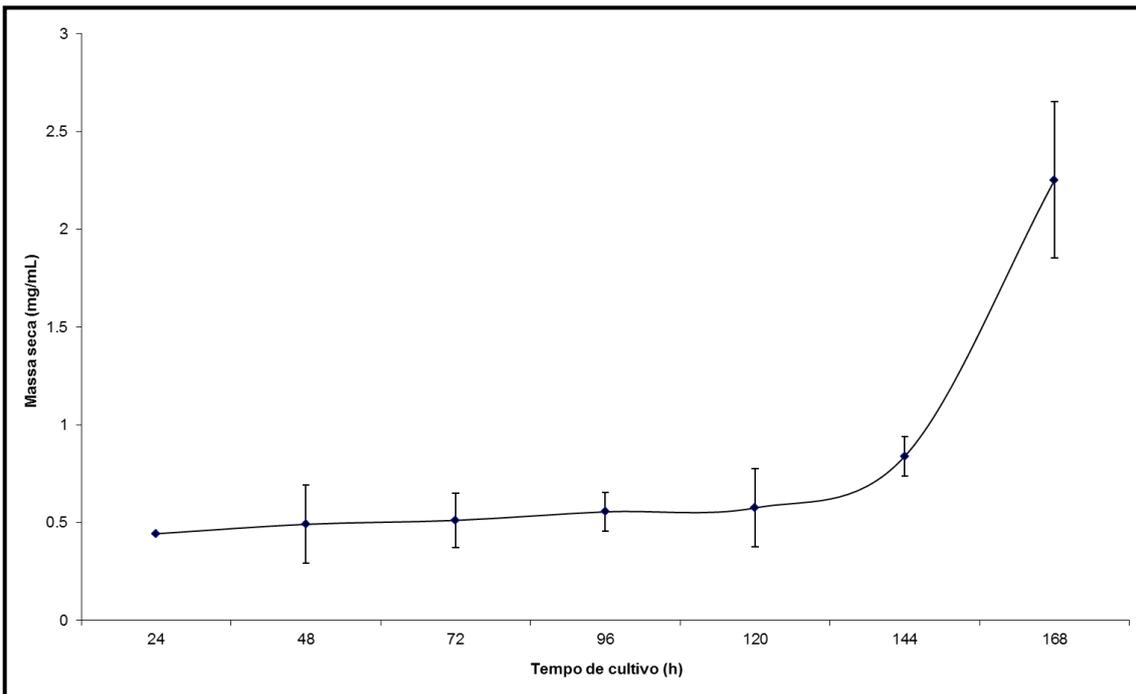


Fig 2: Curva de crescimento do fungo *Fusarium graminearum* em caldo batata dextrose.

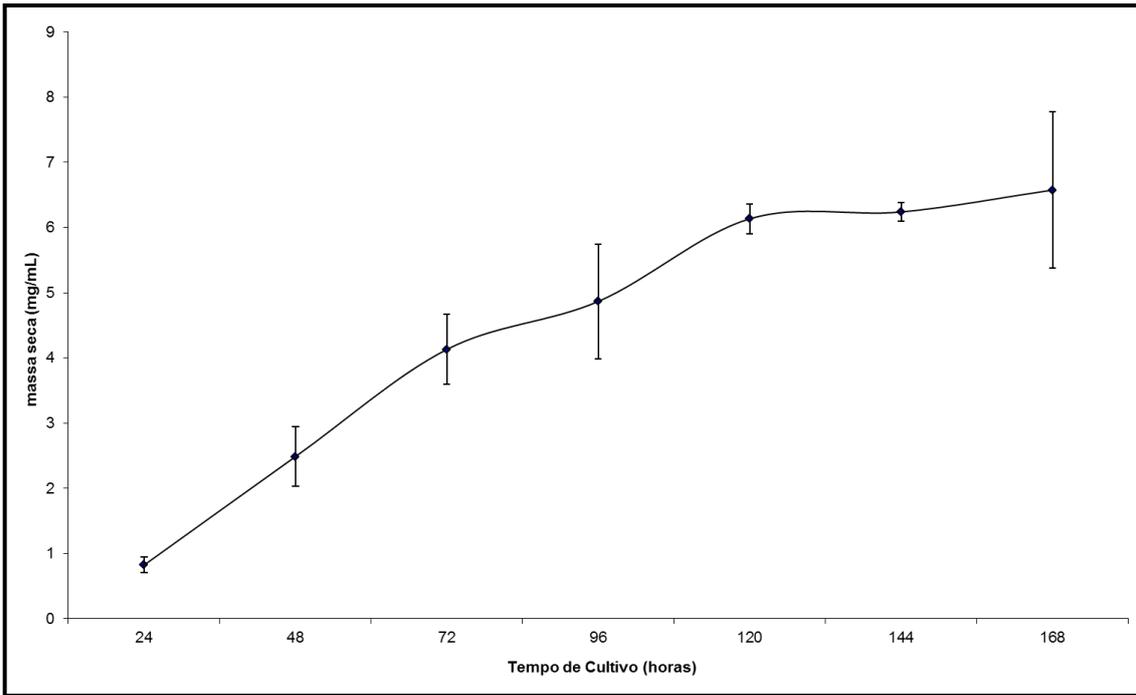


Fig 3: Curva de crescimento do fungo *Monascus purpureus* em caldo batata dextrose.

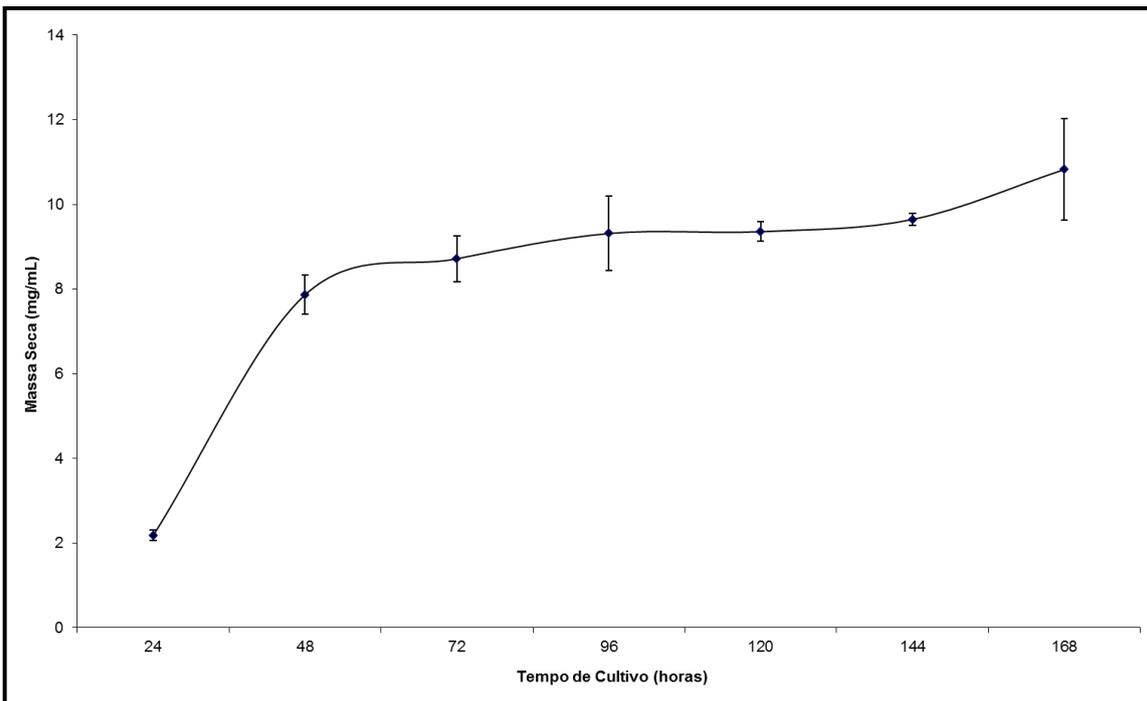


Fig 4: Curva de crescimento do fungo *Penicillium chrysogenum* 1 em caldo batata dextrose.

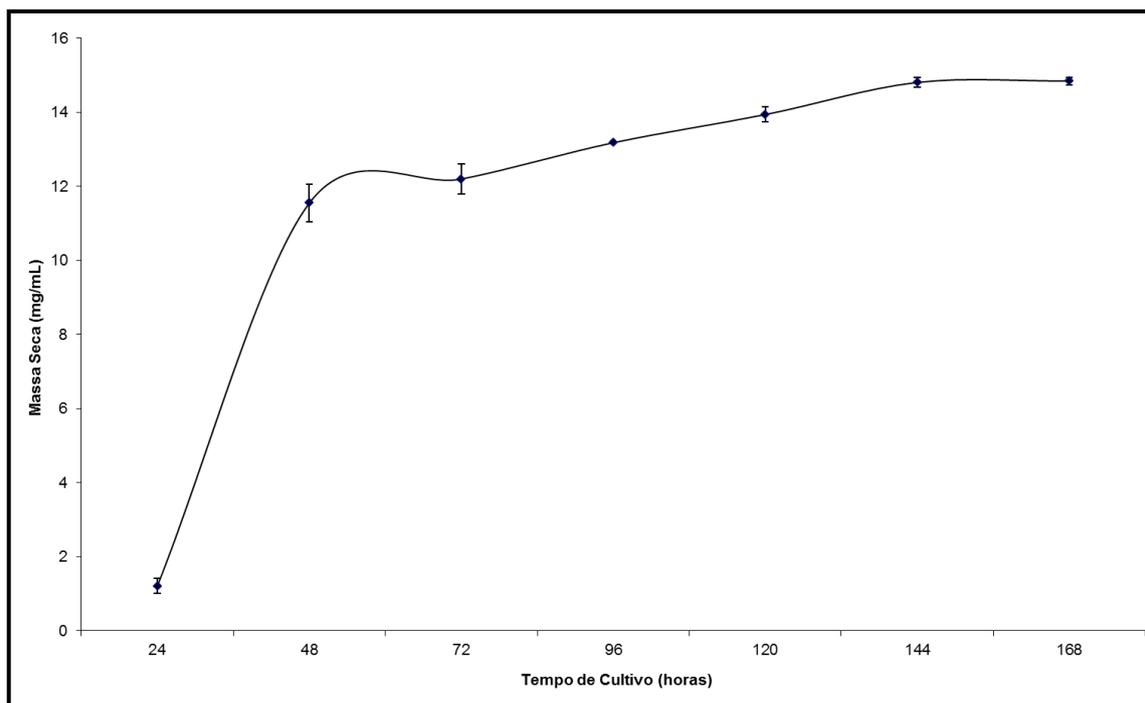


Fig 5: Curva de crescimento do fungo *Penicillium chrysogenum* 2 em caldo batata dextrose.

Os fungos do gênero *Penicillium* atingem a fase estacionária mais rapidamente, em comparação aos fungos do gêneros *Monascus* e *Diplodia*. Além disso, houve maior produção de biomassa pelos primeiros, em destaque o *P. chrysogenum* 2, com produção de aproximadamente 15 mg/mL de biomassa fúngica em 168 horas de cultivo. Portanto, este método mostrou-se adequado para comparar o crescimento fúngico e analisar em qual fase do crescimento cada fungo se encontra ao final do tempo de cultivo.

Contudo, uma das desvantagens da utilização de massa seca é não poder realizar a quantificação de biomassa quando o substrato é insolúvel, como no caso da utilização de resíduos agroindustriais, os quais são na sua grande maioria insolúveis em água. Uma alternativa é a determinação do crescimento fúngico através da quantificação de ergosterol. Segundo LAU *et al.* (2006) o ergosterol é esterol da membrana fúngica que é utilizado como biomarcador para a determinação de biomassa fúngica em solo, alimentos, sedimentos e material vegetal.

## 6. DISCUSSÃO GERAL

Fungos filamentosos produzem uma diversidade de metabólitos secundários com importante papel na vida humana. Neste trabalho, primeiramente foi realizada a busca por fungos produtores de pigmentos hidrossolúveis de acordo com os critérios estabelecidos por MAPARI *et al.* (2005). Anteriormente, pigmentos eram considerados como ferramentas taxonômicas para a identificação morfológica dos fungos. Contudo, devido aos problemas associados aos corantes sintéticos, houve a necessidade da busca por novos corantes de origem natural. Dentre os fungos filamentosos, os pigmentos produzidos por *Monascus* já são utilizados tradicionalmente nos países asiáticos (DAROIT *et al.*, 2007), porém há uma grande diversidade de fungos filamentosos capazes de produzir pigmentos. Devido ao fato que somente 5% da diversidade fúngica foi explorada até então, há um grande potencial na busca por novos produtores de pigmentos seguros (MAPARI *et al.*, 2010). Os fungos selecionados foram *Diplodia* sp, *Fusarium graminearum*, *Monascus purpureus*, *Penicillium expansum* e *Penicillium* sp pertencentes à micoteca do laboratório, a partir de cultivo de 7 dias em ágar batata dextrose. Para os fungos selecionados foi realizada uma curva de crescimento utilizando a determinação de massa seca para quantificar o crescimento fúngico ao longo dos 7 dias, segundo GALVAGNO & FORCHIASSIN (2004). As curvas de crescimento foram realizadas para verificar se os fungos se encontravam ao final da fase logarítmica ou na fase estacionária, quando ocorre a produção de metabólitos secundários. Foi verificado que todos os fungos, com exceção de *Fusarium graminearum*, estavam na fase estacionária ao final do tempo de cultivo. O fungo *Fusarium graminearum* ainda se encontrava na fase logarítmica, demonstrando cinética de crescimento mais lenta em comparação com as outras linhagens. Contudo, provavelmente encontrava-se ao final da fase logarítmica, já que houve a produção de pigmentos.

A identificação de fungos normalmente era realizada por técnicas morfológicas, micro- e macroscópicas; no entanto, esses métodos exigem tempo e nem sempre apresentam resultados precisos, levando a erros na identificação (HORISAWA *et al.*, 2009). Muitas vezes, erros podem levar o pesquisador a trabalhar com fungos potencialmente perigosos. Como descrito por MAPARI *et al.* (2005), o fungo *Penicillium marneffeii*, um potencial patógeno humano, é produtor de pigmentos vermelhos que também são produzidos por espécies do gênero *Monascus*, considerados

seguros. Entretanto, este fungo é um dos mais conhecidos patógenos humanos. Por isso, a identificação é uma etapa crucial na seleção de um potencial produtor de pigmentos. Neste trabalho, foi utilizada a técnica de PCR, que apresenta maior sensibilidade e precisão em relação à identificação morfológica. Portanto, para identificar e/ou confirmar as espécies das linhagens em estudo foi realizada a identificação molecular utilizando os *primers* para a região ITS do DNA ribossomal e parte do gene da  $\beta$ -tubulina. O sequenciamento da região ITS foi mais adequado para determinar a espécie dos fungos estudados, com exceção do fungo *Diplodia* sp que não apresentou sequências adequadas para a procura por sequências homólogas usando o algoritmo BLAST. Para os *primers* do gene da  $\beta$ -tubulina foi obtida uma sequência de 480 pares de bases, porém com baixa identidade (94%), sendo identificada como *Penicillium vasconiae*. Serão testados outros protocolos para a identificação deste fungo, pois os que foram testados não foram eficientes na confirmação do gênero do fungo e consequentemente não identificando a espécie do fungo em estudo. Os fungos foram identificados como duas linhagens de *Penicillium chrysogenum* (1 e 2), *Fusarium graminearum* e *Monascus purpureus*. Os *primers* para o gene da  $\beta$ -tubulina levaram à identificação da espécie apenas dos fungos do gênero *Penicillium*. Segundo WACULICZ-ANDRADE (2009) as regiões ITS acumulam maior variabilidade, pois evoluem rapidamente, apresentando alto polimorfismo (podendo variar intraespecificamente na sequência de bases e no comprimento), sendo mais utilizadas na diferenciação de espécies e entre linhagens da mesma espécie.

A análise filogenética para a região ITS, indicou que os fungos do gênero *Penicillium* e o fungo *Monascus purpureus*, apresentaram maior similaridade em relação à *Fusarium graminearum*, que apresenta maior distância evolutiva dos dois primeiros gêneros. A presença de um ancestral comum entre os gêneros *Monascus* e *Penicillium*, poderia justificar a presença de metabólitos que são produzidos por ambos gêneros como a micotoxina citrinina que é produzida tanto por *Penicillium citrinum* e espécies de *Monascus* (CARVALHO *et al.*, 2005), bem como os pigmentos produzidos por *Monascus* que também são produzidos por espécies de *Penicillium*. De acordo com MAPARI *et al.* (2008a) monascorubrina, xantomonasina A e derivados de treonina de rubropunctatina foram identificados no extrato de *Penicillium aculeatum* IBT 14263 e monascorubrina foi identificado no extrato de *Penicillium pinophilum* IBT 13104.

Os fungos foram cultivados em caldo dextrose batata e resíduos agroindustriais diversos para verificar se seriam capazes de crescer em resíduos e ainda produzir

pigmentos. A produção de pigmentos foi avaliada por espectrofotometria realizando uma varredura dos comprimentos de onda de 400 a 700 nm. Houve maior produção de pigmentos amarelados, devido aos máximos de absorção obtidos próximo a 400 nm. A linhagens de *Penicillium chrysogenum* apresentaram maior produção de pigmentos em caldo batata, bem como o fungo *Diplodia* sp que produziu um filtrado de um amarelo intenso. A glicose demonstrou ser uma importante fonte de carbono, proporcionando a maior produção de pigmentos, apesar de muitas vezes ser relatada como um repressor. De acordo com ADRIO & DEMAIN (2003), glicose usualmente é uma excelente fonte de carbono para o crescimento, porém frequentemente interfere na formação de metabólitos secundários. Por isso, polissacarídeos, oligossacarídeos e óleos são muitas vezes preferidos para fermentações com intuito de produzir metabólitos secundários. Assim, um meio contendo uma mistura de fontes de carbono rapidamente usadas com fontes de uso mais lento, é o ideal, pois primeiramente a glicose é utilizada para o crescimento celular e a fonte mais complexa seria utilizada durante a fase de produção de metabólitos secundários. Na verdade, é o que ocorre no caldo dextrose batata, que contém glicose e amido, explicando dessa forma a produção dos pigmentos mais tardiamente, ao longo do tempo de cultivo (dados não demonstrados). Os fungos *Monascus purpureus* e *Fusarium graminearum* produziram pigmentos em um maior número de resíduos testados, todavia, o fungo *Monascus* é o fungo mais estudado na área de pigmentos e o fungo *Fusarium graminearum* é potencial produtor de micotoxinas como butenolida, fusarina C, tricotecenos e zearalenona (CARVALHO *et al.*, 2005, MAPARI *et al.*, 2009). Sendo por isso, em estudos futuros, necessário garantir a segurança desta linhagem do gênero *Fusarium*, verificando a produção de micotoxinas nas condições e nos meios selecionados.

Portanto, devido a maior produção de pigmentos em caldo batata, a capacidade de crescer e produzir pigmentos em resíduo de uva e soro de queijo, ao status GRAS, aos poucos estudos na área da produção de pigmentos e por ser considerado um potencial produtor de metabólitos secundários ativos, *P. chrysogenum* foi selecionado para estudos futuros de isolamento e caracterização dos pigmentos.

Segundo RANCIC *et al.* (2006) um grande número de extratos ou produtos extracelulares de fungos apresentam atividade antimicrobiana, sendo que grande maioria dos antibióticos naturais são produzidos por fungos, por isso os filtrados coloridos obtidos do cultivo dos fungos em resíduos agroindustriais foram testados quanto às atividades antibacterianas e antifúngicas. O fungo *Penicillium chrysogenum* 1

se destacou com a inibição de bactérias gram positivas, inibindo *Staphylococcus aureus* fortemente, *Bacillus cereus* e a bactéria gram negativa *Pseudomonas aeruginosa*, além do fungo *Fusarium oxysporum*. O filtrado de caldo batata de *Diplodia* sp inibiu todas as bactérias e fungos testados, porém como houveram dificuldades na identificação deste fungo, não foi possível prosseguir com os experimentos. Contudo, o fungo *Diplodia* sp demonstrou grande potencial, tanto no estudo para a produção de pigmentos, quanto na produção de compostos com atividade antimicrobiana. Há poucos relatos de estudos com fungos deste gênero, pois algumas espécies são consideradas fitopatógenas. Porém, igualmente aos resultados obtidos neste trabalho, NOGUEIRA *et al.* (2006) obteve ótimos resultados, com inibições inclusive contra bactérias multiresistentes a antibióticos, demonstrando o potencial deste gênero, ainda pouquíssimo explorado. Os fungos *Monascus purpureus* e *Fusarium graminearum* inibiram fracamente o fitopatógeno *Fusarium oxysporum*.

De acordo com FRISVAD *et al.* (2004) *Penicillium* é um dos gêneros mais importantes, pois alguns dos mais relevantes metabólitos são produzidos por espécies desse gênero, as penicilinas são produzidas por *Penicillium chrysogenum*, ácido micofenólico produzido por *Penicillium brevicompactum* e compactinas produzidas por *Penicillium solitum*. Neste presente trabalho, o fungo *Penicillium chrysogenum* também se destacou como produtor de metabólitos secundários e por isso foi selecionado para outros estudos. Os filtrados de resíduo de uva e soro de queijo de *Penicillium chrysogenum* 1 foram selecionados para a determinação da atividade amebicida contra *Acanthamoeba polyphaga*. Ambos filtrados foram ativos contra as amebas, sendo que há poucos trabalhos relatando a atividade de metabólitos ativos de fungos. BOONMAN *et al.* (2008) foram o primeiro grupo a relatar um metabólito do fungo endofítico do gênero *Fusarium* capaz de matar efetivamente trofozoítos de *Acanthamoeba*.

Devido à habilidade de produzir penicilinas por *P. chrysogenum*, foi realizada a identificação de Penicilina G utilizando espectrometria de massas com ionização por electrospray (ESI MS) e a fragmentação por ESI MS/MS e a quantificação por HPLC. A quantificação foi realizada em dois filtrados, sendo que a concentração de penicilina no meio resíduo de uva era três vezes maior em relação ao meio contendo soro de queijo. Contudo, devido ao maior espectro de inibição do filtrado contendo soro de queijo, este foi selecionado para estudos do perfil metabólico por espectrometria de massas. Estudos de perfil metabólico são úteis nos aspectos de entendimento da fisiologia, na descoberta de novos metabólitos e na utilização como ferramenta

taxonômica (SMEDSGAARD & NIELSEN, 2005). O estudo do perfil metabólico, ou no caso “*footprinting*”, sendo realizado o perfil somente dos metabólitos extracelulares, sugeriu a produção de metabólitos biologicamente ativos como penicilina, rugulosina, xantocilina X formilada e a micotoxina ácido ciclopiazônico. Estes são apenas alguns dos metabólitos produzidos por este fungo, pois com a disposição de bancos de dados mais completos e com a utilização de técnicas de separação associadas será possível desvendar muitos metabólitos que estão sendo produzidos.

Portanto, apesar de todos os anos de estudo acerca do fungo *Penicillium chrysogenum*, ainda há muitos metabólitos a serem descobertos, principalmente devido às tecnologias cada mais avançadas à disposição. Dessa forma, este fungo ainda apresenta muitos estudos em potencial, principalmente na área de metabólitos secundários, incluindo os pigmentos, por muitos anos pouco explorados.

## 7. CONCLUSÕES

- Fungos filamentosos produziram pigmentos hidrossolúveis sob cultivo submerso, incluindo meios de baixo custo contendo resíduos agroindustriais como soro de queijo, resíduo de uva, farelo de soja e farinha de pena;
- A identificação de fungos utilizando técnicas moleculares como a PCR mostrou-se adequada, principalmente com a utilização dos *primers* universais ITS1 e ITS 4 para a região intergênica do DNA ribossomal que apresentou resolução suficiente para a identificação em nível de espécie;
- Fungos filamentosos tem a habilidade de produzir metabólitos com atividade, principalmente antimicrobiana, sendo que todos os fungos testados apresentaram atividade contra bactérias e/ou fungos;
- A determinação do perfil metabólico por espectrometria de massas utilizando a técnica de ionização por electrospray apresentou importância na determinação dos metabólitos produzidos, da segurança de extratos fúngicos (indicando a presença de micotoxinas) e como ferramenta taxonômica.
- *Penicillium chrysogenum* produziu pigmentos, penicilinas e metabólitos ativos contra fungos e amebas em resíduos agroindustriais. Foi sugerida a produção de metabólitos previamente descritos como antivirais, inseticidas e antibióticos, além de uma micotoxina.

## 8. PERSPECTIVAS

- Identificação molecular do fungo *Diplodia* sp modificando parâmetros na etapa de sequenciamento do DNA;
- Verificar a produção de micotoxinas pelos fungos selecionados como produtores de pigmentos em ágar batata por ESI-MS e ESI-MS/MS;
- Realizar a técnica de HPLC-DAD a fim de identificar os compostos sugeridos por ESI-MS;
- Utilizar Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) para a otimizar a produção dos metabólitos;
- Realizar técnicas de co-cultivo e verificar a produção de metabólitos como pigmentos e metabólitos com atividade antimicrobiana.

## 9. REFERÊNCIAS

- [1] ADRIO, J.L.; DEMAIN, A.L. Fungal biotechnology. *International Microbiology*, 6: 191–199, 2003.
- [2] ARCHER, D.B.; CONNERTON, I.F.; MACKENZIE, D.A. Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 111: 99-147, 2008.
- [3] AZEVEDO, J.L. Fungos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 1:12-15, 1997.
- [4] BABITHA, S. Microbial Pigments, *In: Nigam, P.S.; Pandey, A. Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization*, Springer Science+ Business Media, 2009.
- [5] BABITHA, S.; CARVALHO, J.C.; SOCCOL, C.R.; PANDLEY, A. Effect of light on growth, pigment production and culture morphology of *Monascus purpureus* in solid-state fermentation, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24:2671–2675, 2008.
- [6] BARRIOS-GONZALEZ J., TOMASSINI A., VINIEGRA-GONZALEZ G., LOPEZ L., Penicillin production by solid state fermentation, *Biotechnology Letters*, 10:793–798, 1988.
- [7] BENNETT, J.W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology, *Journal of Biotechnology*, 66:101–107, 1998.
- [8] BI, P.; LI, D.; DONG, H. A novel technique for the separation and concentration of penicillin G from fermentation broth: aqueous two-phase flotation. *Separation and Purification Technology*, 69:205-209, 2009.
- [9] BIANCHI, V.L.; MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F. Fermentação em estado sólido. *In: Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. Biotecnologia Industrial*, 2, Ed. Edgard Blücher, São Paulo, 2001.
- [10] BOONMAN, N.; WIYAKRUTTA, S.; SRIUBOLMAS, N.; CHUSATTAYANOND, A.D. Acanthamoebicidal activity of *Fusarium* sp. Tlau 3, and endophytic fungus from *Thunbergia laurifolia* Lindl, *Parasitology Research*, 103:1083-1090, 2008.
- [11] BRAKHAGE, A.A.; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters, *Fungal Genetics and Biology*, DOI:10.1016/j.fgb.2010.04.004, 2010.
- [12] BRAMORSKI, A.; CHRISTEN, P.; RAMIREZ, M.; SOCCOL, C.R., REVAH, S. Production of volatile compounds by the edible fungus *Rhizopus oryzae* during solid state cultivation on tropical agro-industrial substrates, *Biotechnology Letters*, 20 (4): 359–362, 1998.

- [13] BRUNNER, K.; ZEILINGER, S.; MACH, R.L. Molecular Approaches for Studying Fungi in the Environment, *In*: Kubicek, C.P.; Druzhinina, I.S. Environmental and Microbial Relationships, 2nd Edition, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 2007.
- [14] CARVALHO, J.C. Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de pigmentos a partir de *Monascus* por fermentação em substrato sólido, Tese de doutorado, Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- [15] CARVALHO, J.C.; OISHI, B.O.; PANDLEY, A.; SOCCOL, C.R. Biopigments from *Monascus*: Strains Selection, Citrinin Production and Color Stability. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48 (6):885-894, 2005.
- [16] CASTRO, A.M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais, *Química Nova*, 33(1):181-188, 2010.
- [17] CERQUEIRA, L.B. Avaliação genômica funcional do impacto das diferenças genéticas entre hospedeiros na infecção por *Leishmania amazonensis*, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- [18] CHANDER, M.; ARORA, D.S. Evaluation of some white-rot fungi for their potential to descolourise industrial dyes, *Dyes and Pigments*, 72:192-198, 2007.
- [19] 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*, 30:889–894, 2002.
- [20] 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*, 95:13–23, 2002.
- [21] CHRISTENSEN, D.J.; GOTTLIN, E.B.; BENSON, R.E.; HAMILTON, P.T. Phage display for target-based antibacterial drug discovery, *Drug Discovery Today*, 6: 721-727, 2001.
- [22] COUTO, S.R. Dye removal by immobilized fungi, *Biotechnology Advances*, 27: 227–235, 2009.
- [23] COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry – a review, *Journal of Food Engineering*, 76: 291–302, 2006.
- [24] DAROIT, D.J.; SILVEIRA, S.T.; HERTZ, P.F.; BRANDELLI, A. Production of extracellular  $\beta$ -glucosidase by *Monascus purpureus* on different growth substrates, *Process Biochemistry*, 4 (2): 904–908, 2007.
- [25] DASU, V.V.; PANDA, T.; CHIDAMBARAM, M. Determination of significant parameters for improved griseofulvin production in a batch bioreactor by Taguchi's method, *Process Biochemistry* 38: 877-880, 2003.

- [26] DEMAIN, A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52:455-63, 1999.
- [27] DEMAIN, A.L. Small bugs, big business: The economic power of the microbe, *Biotechnology Advances*, 18: 499–514, 2000.
- [28] DEMAIN, A.L., ADRIO, J.L. Contributions of microorganisms to industrial biology, *Molecular Biotechnology*, 38:41–55, DOI 10.1007/s12033-007-0035-z, 2008.
- [29] DEMIRCI, F.; GUVEN, K.; DEMIRCI, B.; DADANDI, M.Y.; BASER, K.H.C. Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens, *Food Control*, 19:1159–1164, 2008.
- [30] DENNING, D.W.; HOPE, W.W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities, *Trends in Microbiology*, 18 (5): 195-204.
- [31] DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P.; YARON, A.; ARAD, S.M.; BLANC, P.; MURTHY, K.N.C.; RAVISHANKAR, G.A. Microorganism and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends in Food Science & Technology*, 16: 389–406, 2005.
- [32] DURÁN, N.; TEIXEIRA, M.F.S.; CONTI, R.D.; ESPOSITO, E. Ecological-Friendly Pigments from Fungi. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42 (1):53-66, 2002.
- [33] DURÁN, N.; TEIXEIRA, M.F.S.; ESPOSITO, E. Pigmentos fúngicos e seu potencial biotecnológico. In: Esposito, E.; Azevedo J.L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia, EDUCS. Caxias do Sul, 2004.
- [34] ECKERMAN, S.J.; GRAHAM, K.J. Using chemical ecology to locate new antifungal natural products, In: Rahman, A. *Studies in Natural Products Chemistry*, 55-92, 2000.
- [35] EINAX, E.; VOLGT, K. Oligonucleotide primers for the universal amplification of  $\beta$ -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi, *Organisms Diversity & Evolution*, 3:185–194, 2003.
- [36] EIRA, A.F. Fungos Comestíveis, In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia, EDUCS. Caxias do Sul, 2004.
- [37] EL-ENSHASY, H.A. Filamentous Fungal Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications, In: Yang, S.T., *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, Elsevier, 2007.
- [38] ESPOSITO, E., AZEVEDO, J.L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. EDUCS. Caxias do Sul, 2004.

- [39] FENICE, M.; FEDERICI, F.; SELBMANN, L.; PETRUCCIOLI, Repeated-batch production of pigments by immobilized *Monascus purpureus*, *Journal of Biotechnology*, 80:271–276, 2000.
- [40] FRISVAD, J.C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. *Mycological research*, 112:231 – 240, 2008.
- [41] FUNGARO, M.H.P. PCR na micologia. *Biotecnologia: Ciência & Desenvolvimento*, 3:12-16. 2000.
- [42] GALVAGNO, M.A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: crescimento, morfologia e diferenciação, *In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*, EDUCS. Caxias do Sul, 2004.
- [43] GIBBS, P.A.; SEVIOUR, R.J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions, *Critical Reviews in Biotechnology*, 20(1):17–48, 2000.
- [44] GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes, *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (4): 1323-1330, 1995.
- [45] GLOER, G.B. Applications of Fungal Ecology in the Search for New Bioactive Natural Products, *In: Kubicek, C.P.; Druzhinina, I.S. Environmental and Microbial Relationships*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007.
- [46] GOZE, I.; ALIM, A.; DAG, S.; TEPE, B.; POLAT, Z.A. In vitro amoebicidal activity of *Salvia staminea* and *Salvia caespitosa* on *Acanthamoeba castellanii* and their cytotoxic potentials on corneal cells. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*, DOI: 10.1089/jop.2008.0132, 2009.
- [47] GUIMARÃES, D.O. Produtos naturais de fungos endofíticos associados a espécies de Asteraceae e ensaio antibiótico no modelo de infecção *Caenorhabditis elegans*, Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- [48] GUIMARÃES, T.M. Isolamento, identificação e seleção de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- [49] HÄGGBLUM, P.; UNESTAM, T. Blue light inhibits mycotoxins production and increases total lipids and pigmentation in *Alternaria alternate*, *Applied and environmental microbiology*, 1074-1077, 1979.
- [50] HAJJAJ, H., BLANC, P., GROUSSAC, E., URIBELARREA, J.L., GOMA, G., LOUBIERE, P. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. *Enzyme and Microbial Technology*, 27:619–625, 2000.

- [51] HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A.K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases, *Phytomedicine* 15, 639–652, 2008.
- [52] HERNÁNDEZ, E.; MENDOZA, M.D. Producción de ácido giberélico por *Gibberella fujikuroi* em substratos que contienen pulpa de aceituna aceite de oliva o subproductos de la extracción de este último, *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 16:357-366, 1976.
- [53] HERNANDEZ, M.R.T., LONSANE, B.K., RAIMBAULT, M., ROUSSOS, S. Spectra of ergot alkaloids produced by *Claviceps purpurea* in solid state system – influence of the composition of liquid medium used for impregnating sugar cane bagasse. *Process Biochemistry*, 28:23–27, 1993.
- [54] HERNÁNDEZ-NÚÑEZ, E.; TLAHUEXT, H.; MOO-PUC, R.; TORRES-GÓMEZ, H.; REYES-MARTÍNEZ, R.; CEDILLO-RIVERA, R.; NAVA-ZUAZO, C.; NAVARRETE-VASQUEZ, G. Synthesis and in vitro trichomonocidal, giardicidal and amebicidal activity of N-acetamide(sulfonamide)-2-methyl-4-nitro-1H-imidazoles, *European Journal of Medicinal Chemistry* 44:2975–2984, 2009.
- [55] HORISAWA, S.; SAKUMA, Y.; DOI, S. Qualitative and quantitative PCR methods using species-specific primer for detection and identification of wood rot fungi, *Journal of Wood Science*, 55:133–138, 2009.
- [56] HOSSAIN, M.; DEAN, J. Extraction of penicillin G from aqueous solutions: Analysis of reaction equilibrium and mass transfer. *Separation and Purification Technology*, 62:437–443, 2008.
- [57] IBRAHIM, Y.W.; BOASE, D.L.; CREE, I.A. How could contact lens wearers be at risk of *Acanthamoeba* infection? A Review, *Journal of Optometry*, 2:60-66, 2009.
- [58] IWASHITA, K. Recent studies of protein secretion by filamentous fungi, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 94(6):530-535, 2002.
- [59] JAY, J.M. Micotoxinas. In: *Microbiología de alimentos*. 6 ed, Artmed, Porto Alegre, 2005.
- [60] JEWETT, M.C.; HOFMANN, G.; NIELSEN, J. Fungal metabolite analysis in genomics and phenomics, *Current Opinion in Biotechnology*, 17:191–197, 2006.
- [61] JIANG, Z.D.; AN, Z. Bioactive fungal natural products through classic and biocombinatorial approaches, *Studies in Natural Products Chemistry*, 22:245-72, 2000.
- [62] KELLER, N.P.; TURNER, G.; BENNETT, J. Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics, *Nature Reviews Microbiology*, 3: 937-47, 2005.
- [63] KEMPKEN, F.; ROHLFS, M. Fungal secondary metabolite biosynthesis – a chemical defense strategy against antagonistic animals? *Fungal Ecology*, 3:107-114, 2010.

- [64] KHALDI, N.; SEIFUDDIN, F.T.; TURNER, G.; HAFT, D.; NIERMAN, W.C.; WOLFE, K.H.; FEDOROVA, N.D. SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genetics and Biology*, 47:736–741, 2010.
- [65] KIM, C.; JUNG, H.; KIM, Y.O.; SHIN, C.S. Antimicrobial activities of amino acid derivatives of monascus pigments. *FEMS Microbiology Letters*, 117-124, 2006.
- [66] LANGVAD, F. A rapid and efficient method for growth measurement of filamentous fungi, *Journal of Microbiological Methods*, 37: 97–100, 1999.  
LAU, A.P.S.; LEE, A.K.Y.; CHAN, C.K.; FANG, M. Ergosterol as a biomarker for the quantification of the fungal biomass in atmospheric aerosols, *Atmospheric Environment*, 40: 249–259, 2006.
- [67] LEE, H.H.; SONG, Y.S.; KIM, S.W. Improvement of cephalosporin C production by *Acremonium chrysogenum* M35 in submerged culture with glass beads or silicone rubber, *Korean Journal of Chemical. Engineering*, 27(2):570-575, 2010.
- [68] LIMA, A.S.; ALEGRE, R.M.; MEIRELLES, A.J.A. Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. *Carbohydrate Polimers*, 50:63-68, 2002.
- [69] LIN CEREGHINO, G.P.L.; CREGG, J.M. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis, *Current Opinion in Biotechnology*, 10:422–427, 1999.
- [70] LOPPNAU, P.A.; BREUIL, C. Species level identification of conifer associated *Ceratocystis* sapstain fungi by PCR-RFLP on a  $\beta$ -tubulin gene fragment, *FEMS Microbiology Letters*, 222:143-147, 2003.
- [71] MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. Biologia Celular eucariótica e microrganismos eucarióticos, *In: Microbiologia de Brock*, Prentice Hall, 10 ed, São Paulo, 2004.
- [72] 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*, 56: 9981–9989, 2008a.
- [73] 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*, 54:7027-7035, 2006.
- [74] MAPARI, S.A.S.; MEYER, A.S.; THRANE, U. Evaluation of *Epicoccum nigrum* for growth, morphology and production of natural colorants in liquid media and on a solid rice medium, *Biotechnology Letters*, 30: 2183–2190, 2008.
- [75] MAPARI, S.A.S.; MEYER, A.S.; THRANE, U.; FRISVAD, J. Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale, *Microbial Cell Factories*, 8 (24):1-15, 2009.

- [76] 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* 16: 231-238, 2005.
- [77] MAPARI, S.A.S.; THRANE, U.; MEYER, A. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants, *Trends in Biotechnology*, 28 (6), 300-307, 2010.
- [78] MARTÍN, J.F.; CASQUEIRO, J.; LIRAS, P. Secretion systems for secondary metabolites: how producer cells send out messages of intercellular communication, *Current Opinion in Microbiology*, 8:282–293, 2005.
- [79] MEINICKE, R.M. Estudo da produção de pigmentos por *Monascus ruber* CCT 3802 utilizando glicerol como substrato em cultivo submerso. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- [80] MÉNDEZ-ZAVALA, A., CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C., LARA-VICTORIANO, F., RODRIGUÉZ-HERRERA, R., AGUILAR, C.N. Producción fúngica de un pigmento rojo empleando la cepa xerofílica *Penicillium purpurogenum* GH-2. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6: 267-273, 2007
- [81] MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi – Progress, obstacles and future trends, *Biotechnology Advances*, 26: 177-85, 2008.
- [82] MICHAELSEN, A.; PINZARI, F.; RIPKA, K.; LUBITZ, W.; PIÑAR, G. Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonising paper material, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 58: 133–141, 2006.
- [83] MORSCHHÄUSER, J. Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi, *Fungal Genetics and Biology*, 47:94–106, 2010.
- [84] MOTTA, A.S., BRANDELLI, A. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology*, 92:63-71, 2002.
- [85] MSISKA, Z.; MORTON, J.B. Isolation and sequence analysis of a  $\beta$ -tubulin gene from arbuscular mycorrhizal fungi, *Mycorrhiza*, 19:501–513, 2009.
- [86] MUELLER, G.M.; SCHMIT, J.P. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodiversity and Conservation*, 16:1–5, 2007.
- [87] MUKHERJEE, G.; SINGH, S.K. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation, *Process Biochemistry* 46: 188–192, 2011.
- [88] NAGIA, F.A.; EL-MOHAMEDY, R.S.R. Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from *Fusarium oxysporum*, *Dyes and Pigments*, 75:550-555, 2007.

- [89] NAVA-ZUAZO, C.; ESTRADA-SOTO, S.; GUERRERO-ÁLVAREZ, J.; LÉON-RIVERA, I.; MOLINA-SALINAS, G.M.; SAID-FERNÁNDEZ, S.; CHAN-BACAB, M.J.; CEDILLO-RIVERA, R.; MOO-PUC, R.; MIRÓN-LÓPEZ, G.; NAVARRETE-VASQUEZ, G. Design synthesis, and in vitro antiprotozoal, antimycobacterial activities of N-{2-[(7-chloroquinolin-4-yl)amino]ethyl}ureas, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18:6398–6403, 2010.
- [90] NIGAM, P.S. Production of bioactive secondary metabolites. *In: Nigam, P.S.; Pandey, A. Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization*, Springer Science+ Business Media, 2009.
- [91] NOGUEIRA, M.A.; DIAZ, G.; ANDRIOLI, W.; FALCONI, F.A.; STANGARLIN, J.R. Secondary metabolites from *Diplodia maydis* and *Scerotium rolfsii* with antibiotic activity, *Brazilian Journal of Microbiology*, 37, 14-16, 2006.
- [92] OLIVEIRA, L.A. et al. Partition of trypsin in aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and cashew-nut tree gum. *Process Biochemistry*, 38:693-699, 2002.
- [93] ONDARZA, R.N.; ITURBE, A.; HERNÁNDEZ, E. *In vitro* antiproliferative effects of neuroleptics, antimycotics and antibiotics on the human pathogens *Acanthamoeba polyphaga* and *Naegleria fowleri*, *Archives of Medical Research*, 37: 723–729, 2006.
- [94] ONO, E.Y.S.; MENDES, A.M.; MEIRELLES, P.G.; HIROOKA, E.Y.; ONO, M.A. Micotoxinas em Alimentos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 32, 2004.
- [95] OWEN, R.J.; PALOMBO, E.A. Anti-listerial activity of ethanolic extracts of medicinal plants, *Eremophila alternifolia* and *Eremophila duttonii*, in food homogenates and milk, *Food Control*, 18:387–390, 2007.
- [96] PASTORE, G.M.; MACEDO, G.A. Utilização de fungos na indústria de alimentos. *In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*, EDUCS. Caxias do Sul, 2004.
- [97] PASTRE, R.; MARINHO, A.M.R.; RODRIGUES-FILHO, E.; SOUZA, A.Q.L.; PEREIRA, J.O. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. *Química Nova*, 30 (8): 1867-71, 2007.
- [98] PATTANAGUL, P.; PINTHONG, R.; PHIANMONGKHOL, A.; LEKSAWASDI, N. Review of Angkak production (*Monascus purpureus*), *Chiang Mai Journal of Science*. 34(3): 319-328, 2007.
- [99] PHILIPPOUSSIS, A.N. Production of mushrooms using agro-industrial residues as substrates, *In: Nigam, P.S.; Pandey, A. Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization*, Springer Science+ Business Media, 2009.
- [100] RADZIO, R.; KÜCK, U. Synthesis of biotechnologically relevant heterologous proteins in filamentous fungi, *Process Biochemistry*, 32 (6):529-539, 1997.

- [101] RAJASEKARAN, R., CHANDRASEKARAN, R., MUTHUSELVAM, M. Microbial Biotechnology: Rapid Advances in an area of massive impact. *Advanced Biotech*, 19-25, 2008
- [102] RANCIC, A.; SOKOVIC, M.; KARIOTI, A.; VUKOJEVIC, J.; SKAL TSA, H. Isolation and structural elucidation of two secondary metabolites from the filamentous fungus *Penicillium ochrochloron* with antimicrobial activity, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22: 80–84, 2006.
- [103] RODRIGUEZ, D.D.P. Obtenção de pigmentos naturais a partir do cultivo de *Monascus* sp. *Microbiologia in foco*, 2009.
- [104] RODRÍGUEZ-MARTÍN, A.; ACOSTA, R.; LIDDELL, S.; NÚÑEZ, F.; BENITO, M.J.; ASENSIO, M.A. Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*, *Peptides*, 31:541–547, 2010.
- [105] RODRÍGUEZ-ZARAGOZA, S.; ORDAZ, C.; AVILA, G.; MUÑOZ, J.L.; ARCINIEGAS, A.; VIVAR, A.R. In vitro evaluation of the amebicidal activity of *Buddleia cordata* (Loganiaceae, H.B.K.) on several strains of *Acanthamoeba*, *Journal of Ethnopharmacology*, 66: 327–334, 1999.
- [106] ROUPAS, P.; KEOGH, J.; NOAKES, M.; MARGETTS, C.; TAYLOR, P. Mushrooms and agaritine: A mini-review, *Journal of Functional Foods*, doi:10.1016/j.jff.2010.04.003, 2010.
- [107] ROUSE, S.; HARNETT, D.; VAUGHAN, A.; VAN SINDEREN, D. Lactic acid bacteria with potential to eliminate fungal spoilage in foods. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 915–923, 2008.
- [108] ROZE, L.V.; CHANDA, A.; LINZ, J.E. Compartmentalization and molecular traffic in secondary metabolism: A new understanding of established cellular processes, *Fungal Genetics and Biology*, 48: 35–48, 2011.
- [109] SADHUKHAN, A.K.; RAMANA MURTHY, M.V.; AJAYA KUMAR, R.; MOHAN, E.V.S.; VANDANA, G.; BHAR, C.; VENKATESWARA RAO, K. Optimization of mycophenolic acid production in solid state fermentation using response surface methodology; *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 22: 33–38, 1999.
- [110] SANTOS, C.; FRAGA, M.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts, *Research in Microbiology*, 161:168-175, 2010a.
- [111] SANTOS, C.; PATERSON, R.R.M; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Journal of Applied Microbiology*, 108: 375-385, 2010.

- [112] SANTOS, O.C.S.; PONTES, P.V.M.L.; SANTOS, J.F.M.; MURICY, G.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; LAPORT, M.S. Isolation, characterization and phylogeny of sponge-associated bacteria with antimicrobial activities from Brazil, *Research in Microbiology*, 161: 604-612, 2010b.
- [113] SCHNEIDER, P.; MISIEK, M.; HOFFMEISTER, D. In vivo and In vitro production options for fungal secondary metabolites, *Molecular Pharmaceutics*, 5 (2): 232-242, 2008.
- [114] SCHÜMANN, J.; HERTWECK, C. Advances in cloning, functional analysis and heterologous expression of fungal polyketide synthase genes, *Journal of Biotechnology*, 124: 690–703, 2006.
- [115] SCHUSTER, F.L.; VISVESVARA, G.S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals, *International Journal for Parasitology*, 34: 1001–1027, 2004.
- [116] SCHWEDER, T.; LINDEQUIST, U.; LALK, M. Screening for new metabolites from marine microorganism, *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* 96: 1-48, 2005.
- [117] SEKHAR RAO, K.C.; KARANTH, N.G.; SATTUR, A.P. Production of nigerloxin, an enzyme inhibitor and a free radical scavenger, by *Aspergillus niger* using solid state fermentation, *Process Biochemistry*, 40: 2517–2522, 2005.
- [118] SERAMAN, S.; RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. Statistical optimization of anticholesterolemic drug lovastatin production by the red mold *Monascus purpureus*, *Food and bioproducts processing*, 88: 266–276, 2010.
- [119] SHARMA, R.; KATOCH, M.; SRIVASTAVA, P.S.; QAZI, G.N. Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25:2083–2094, 2009.
- [120] SHINZATO, N.; NAMIHIRA, T.; TAMAKI, Y.; TSUKAHARA, M.; MATSUI, T. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis coupled with microchip electrophoresis for high-resolution identification of *Monascus* strains, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82:1187–1193, 2009.
- [121] SHU, C.H. Fungal Fermentation for Medicinal Products, *In: Yang, S.T. Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, Elsevier, 2007.
- [122] SHWAB, E.K.; KELLER, N.P. Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes, *Mycological research*, 112: 225 – 230, 2008.
- [123] SILVA, M.G.; FURTADO, N.A.J.C.; PUPO, M.T.; FONSECA, M.J.V.; SAID, S.; SILVA, A.A.F.; BASTOS, J.K. Antibacterial activity from *Penicillium corylophilum* Dierckx, *Microbiological Research*, 159: 317-322, 2004.

- [124] SILVEIRA, M.M.; MOLINA, M.A.B. Fermentação: forma de valorização de resíduos agrícolas e agroindustriais. *In: Serafini, L.A.; Barros, N.M.; Azevedo, J.L. Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*, EDUCS, Caxias do Sul, 2002.
- [125] SILVEIRA, S.T.; DAROIT, D.J.; BRANDELLI, A. Pigment production by *Monascus purpureus* in grape waste using factorial design, *LWT*, 41:17-174, 2008.
- [126] SINGH, B.K.; MACDONALD, C.A. Drug Discovery from uncultivable microorganisms, *Drug Discovery Today* 15(17/18), 2010.
- [127] SINGHANIA, R.R.; SOCCOL, C.R.; PANDLEY, A. Application of tropical agro-industrial residues as substrate for Solid-state fermentation processes, *In: Current Developments in Solid-State fermentation*, Springer Science+Business Media, 2008.
- [128] SMEDSGAARD J.; FRISVAD J.C. Terverticillate penicillia studied by direct electrospray mass spectrometric profiling of crude extracts: I. Chemosystematics. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25: 51-64, 1997.
- [129] SMEDSGAARD, J.; FRISVAD, J.C. Using direct electrospray mass spectrometry in taxonomic and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts, *Journal of Microbiological Methods*, 25: 5-17, 1996.
- [130] SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, J. Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics, *Journal of Experimental Botany*, 56 (410): 273–286, 2005.
- [131] SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil, *Biochemical Engineering Journal*, 13: 205–218, 2003.
- [132] SOUZA, A.Q.L.; SOUZA, A.D.L.; ASTOLFI FILHO, S.; BELÉM PINHEIRO, M.L.; SARQUIS, M.I.M.; PEREIRA, J.O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham, *Acta Amazonica*, 34(2): 185 – 195, 2004.
- [133] STANIMIROVIC, Z.; STEVANOVIC, J.; BAJIC, V.; RADOVIC, I. Evaluation of genotoxic effects of fumagillin by cytogenetic tests *in vivo*, *Mutation Research*, 628: 1–10, 2007.
- [134] SUMNER, L.W.; HUHMANN, D.V.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; LEI, Z. Methods, applications and concepts of metabolite profiling: Secondary metabolism, *Plant Systems Biology*, 195-212, 2007.
- [135] SUN, R.; GAO, Y.X.; SHEN, K.Z.; XU, Y.B.; WANG, C.R.; LIU, H.Y.; DONG, J.Y. Antimicrobial metabolites from the aquatic fungus *Delitschia corticola*, *Phytochemistry Letters*, doi:10.1016/j.phytol.2010.12.001, 2010.
- [136] SURYANARAYANAN, T.S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M.B.; SASSE, F.; JANSEN, R.; MURALI, T.S. Fungal endophytes and bioprospecting, *Fungal Biology Reviews*, 23: 9-19, 2009.

- [137] SURVASE, S.A.; SHALIGRAM, N.S.; PANSURIYA, R.C.; ANNAPURE, U.S.; SINGHAI, R.S. A novel medium for the enhanced production of cyclosporin A by *Tolyposcladium inflatum* MTCC 557 using solid state fermentation, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(5): 462–467, 2009.
- [138] TAKAHASHI, J.A.; LUCAS, E.M.F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica, *Química Nova*, 31 (7) 1807-1813, 2008.
- [139] TAKAHASHI, J.A.; MONTEIRO DE CASTRO, M.C.; SOUZA, G.C.; LUCAS, E.M.F.; BRACARENSE, A.A.P.; ABREU, L.M.; MARRIEL, I.E.; OLIVEIRA, M.S.; FLOREANO, M.B.; OLIVEIRA, T.S. Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*, *Journal de Mycologie Médicale*, 18:198—204, 2008.
- [140] TANIWAKI, M.H.; PITT, J.I.; HOCKING, A.D.; FLEET, G.H. Comparison of hyphal length, ergosterol, mycelium dry weight, and colony diameter for quantifying growth of fungi from foods, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 571:49-67, 2006.
- [141] TSENG, Y.Y.; CHEN, M.T.; LIN, C.F. Growth, pigment production and protease activity of *Monascus purpureus* as affected by salt, sodium nitrite, polyphosphate and various sugars. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 31–37, 2000.
- [142] VALERA, H.R.; GOMES, J.; LAKSHMI, S.; GURURAJA, R.; SURYANARAYAN, S.; KUMAR, D. Lovastatin production by solid state fermentation using *Aspergillus flavipes*, *Enzyme and Microbial Technology*, 37: 521–526, 2005.
- [143] 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*, 109 (4): 346–350, 2010.
- [144] VISVESVARA, G.S.; SCHUSTER, F.L. Opportunistic free-living amoebae, part I. *Clinical Microbiology Newsletter*, 30 (20): 151-158, 2008.
- [145] WACULICZ-ANDRADE, C.E. Variabilidade genética de fungos do gênero *Colletotrichum* de plantas cítricas e da vegetação espontânea, Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.
- [146] WANG, L.; RIDGWAY, D.; GU, T.; MOO-YOUNG, M. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in fungal fermentations, *Biotechnology Advances*, 23: 115–129, 2005.
- [147] WATANABE, T.; TERABE, S. Analysis of natural food pigments by capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 880: 311–322, 2000.

[148] WELD, R.J.; PLUMMER, K.M.; CARPENTER, M.A.; RIDGWAY, H.J.; Approaches to functional genomics in filamentous fungi, *Cell Research*, 16: 31-44, 2006.

[149] WISSGOTT, U.; BORTLIK, K. Prospects for new natural food colorants, *Trends in food science & Technology*, 7: 298-302, 1996.

[150] XU, H.Z.; SUN, G.J.; WANG, H.K.; CHEN, G.W.; SHENG, J.L.; WANG, J.S. Determination of aflatoxins and fumonisins in the corn and peanut from market. *Journal of Environmental and Occupational Medicine*, 23:217-219, 2006.

[151] YANG, W.; CHU, I. Extraction of penicillin-G by aqueous two-phase partition. *Biotechnology Techniques*, 4(3): 191-194, 1990.

[152] YU, J.H. & KELLER, N. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology.*, 43: 437-58, 2005.

## 10. CURRICULUM VITAE

**LOPES, F.C.**

### DADOS PESSOAIS

**Nome:** Fernanda Cortez Lopes

**Local e data de nascimento:** Porto Alegre, Rio Grande do Sul 03/08/1984

**Endereço profissional:** Avenida Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43.212  
Laboratório 218, Campus do Vale CEP: 91501-970

**Telefone profissional:** +55 51 3308-6249

**E-mail:** [fernandacortezlopes@gmail.com](mailto:fernandacortezlopes@gmail.com)

### FORMAÇÃO:

- **2004-2008:** Graduação em Farmácia (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)
- **2008-actual:** Habilitação em Análises Clínicas (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)
- **2009-2011:** Curso de Pós-Graduação *stricto sensu* (mestrado) em Biologia Celular e Molecular (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

### ESTÁGIOS:

- **Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada (Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos/UFRGS)**

Bolsa: Voluntário

Período: fevereiro 2009 – maio 2007

Orientador: Adriano Brandelli

- **BioPlus Desenvolvimento Biotecnológico Ltda (Incubadora Cbiot)**

Bolsas: CNPq (ITI-RHAE) e FAPERGS

Período: abril 2007 – março 2005

Orientador: Sydnei Mitidieri Silveira

- **Monitoria disciplina Tecnologia Bioquímica (Faculdade de Farmácia/UFRGS)**

Bolsa: Voluntário

Período: janeiro 2005 – abril de 2004

Orientador: José Carlos Germani

### **PRÊMIOS E DISTINÇÕES**

- 2006: Trabalho destaque na sessão de Microbiologia do Salão de Iniciação Científica UFRGS

**LOPES, F.C.**; FERREIRA-LUZ, F ; VAINSTEN, M. H. ; MITIDIERI, S. Desenvolvimento de Detergente enzimático para limpeza de ordenhadeiras. Livro de resumos do XVIII Salão de Iniciação Científica UFRGS, Porto Alegre: Editora UFRGS, 2006.

### **EXPERIÊNCIA DIDÁTICA**

- 2009: Monitoria Curso de Férias: Microrganismos – mocinhos ou bandidos? (60 horas).
- 2010: Monitoria Curso de Férias: Você conhece a célula? (60 horas).

### **ARTIGO COMPLETO PUBLICADO**

- DEDAVID E SILVA, L.A.; **LOPES, F.C.**; SILVEIRA, S.T.; BRANDELLI, A. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus phoenicis* in grape waste using response surface methodology, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 152 (2): 295-305.

### **ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO**

- CORREA, A.P.; DAROIT, D.J.; COELHO, J.; MEIRA, S.M.M.; **LOPES, F.C.**; SEGALIN, J.; RISSO, P.; BRANDELLI, A. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease, *Journal of the Science of Food and Agriculture*.

### **RESUMOS E TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS**

- **LOPES, F.C.**; TICHOTA, D.M.; VOLTOLINI, R.V ; PEREIRA, J.Q.; RIOS, A. O.; BRANDELLI, A. Padronização de técnicas moleculares para a identificação de fungos produtores de pigmentos. IV Simpósio de Microbiologia Aplicada I

Encontro Latino-Americano de Microbiologia Aplicada, 2010, Porto Alegre. CD de Resumos expandidos, 2010.

- PEREZ, K.J.; **LOPES, F.C.**; CRISPINI, S.M.; BRANDELLI, A.; DRUMMOND, R.M.N. Identificação e atividade antimicrobiana de *Bacillus* sp isolados de puba, um produto fermentado de mandioca. IV Simpósio de Microbiologia Aplicada I Encontro Latino-Americano de Microbiologia Aplicada, 2010, Porto Alegre. CD de Resumos expandidos, 2010.
- TICHOTA, D.M.; **LOPES, F.C.** ; DEDAVID E SILVA, L. A.; BRANDELLI, A. Produção de xilanases por *Aspergillus niger*. IV Simpósio de Microbiologia Aplicada I Encontro Latino-Americano de Microbiologia Aplicada, 2010, Porto Alegre. CD de Resumos expandidos, 2010.
- PEREIRA, J.Q.; UTPOTT, M.; **LOPES, F.C.**; MEDINA, L.F.C.; BRANDELLI, A. Diversidade de microorganismos queratinolíticos cultiváveis do continente antártico com potencial utilização industrial. IV Simpósio de Microbiologia Aplicada I Encontro Latino-Americano de Microbiologia Aplicada, 2010, Porto Alegre. CD de Resumos expandidos, 2010.
- **LOPES, F.C.**; SAUTER, I.P.; TICHOTA, D.M.; RIOS, A.O.; ROTT, M.B.; BRANDELLI, A. Suscetibilidade de *Acanthamoeba polyphaga* a metabólitos produzidos por *Penicillium chrysogenum*. XX Congresso Latinoamericano de Microbiología e IX Encuentro Nacional de Microbiólogos, 2010, Montevideo. Libro de Resúmenes, 2010. p. 215.
- **LOPES, F.C.** ; TICHOTA, D.M. ; RIOS, A.O.; BRANDELLI, A. Metabólitos de *Diplodia* sp com atividade antimicrobiana. XX Congresso Latinoamericano de Microbiología IX Encuentro Nacional de Microbiólogos, 2010, Montevideo. Libro de Resúmenes, 2010. p. 194.
- MEIRA, S.M.M.; HELFER, V.E.; **LOPES, F.C.**; BRANDELLI, A. Efeito Antifúngico de Lactobacilos isolados de leite e queijo de ovelha. XX Congresso

Latinoamericano de Microbiología IX Encuentro Nacional de Microbiólogos, 2010, Montevideo. Libro de Resúmenes, 2010. p. 79.

- PEREIRA, J. Q.; LOPES, F.C.; TICHOTA, D.M.; MEDINA, L.F.C.; BRANDELLI, A. Isolamento de microrganismos queratinolíticos provenientes do continente antártico com potencial utilização pela indústria avícola. XX Congresso Latinoamericano de Microbiología IX Encuentro Nacional de Microbiólogos, 2010, Montevideo. Libro de Resúmenes, 2010. p. 68.
- TICHOTA, D.M.; LOPES, F.C.; PEREIRA, J.Q.; RIOS, A. O.; BRANDELLI, A. Utilização de resíduos para a produção de metabólitos ativos de *Penicillium chrysogenum*. XX Congresso Latinoamericano de Microbiología IX Encuentro Nacional de Microbiólogos, 2010, Montevideo. Libro de Resúmenes, 2010. p. 55.
- TICHOTA, D.M.; LOPES, F.C.; RIOS, A.O.; BRANDELLI, A. Produção de Pigmentos por *Monascus purpureus* utilizando resíduos agroindustriais. XX Congresso Latinoamericano de Microbiología IX Encuentro Nacional de Microbiólogos, 2010, Montevideo. Libro de Resúmenes, 2010. p. 55.
- HONAISSER, L.P.; LOPES, F.C.; RIOS, A.O.; BRANDELLI, A. Avaliação de extrato pigmentado de *Penicillium expansum*. 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas. Livro de Resumos do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009. v. 1190-1.
- LOPES, F.C.; HONAISSER, L.P.; RIOS, A.O.; BRANDELLI, A. Produção de Pigmentos hidrossolúveis por fungos filamentosos. 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de Galinhas. Livro de Resumos do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009. v. 1190-2.
- LOPES, F.C.; HONAISSER, L.P.; RIOS, A. O.; BRANDELLI, A. Atividade antibacteriana de extratos pigmentados produzidos por fungos filamentosos. III Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2009, Porto Alegre. Anais do III Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2009. p. 143-145.

- **LOPES, F.C.**; DEDAVID E SILVA, L. A.; BRANDELLI, A. Seleção de meio de cultura para a produção de uma protease com atividade queratinolítica por *Aspergillus phoenicis*. 2º Simpósio de Segurança Alimentar, 2008, Bento Gonçalves. Anais do 2º Simpósio de Segurança Alimentar, 2008. v. OU027.
- DEDAVID E SILVA, L. A.; **LOPES, F.C.** ; CÔRREA, A. P. F. ; BRANDELLI, A. Caracterização parcial de enzimas celulásicas produzidas por *Aspergillus phoenicis* em resíduo de uva. 2º Simpósio de Segurança Alimentar, 2008, Bento Gonçalves. Anais do 2º Simpósio de Segurança Alimentar, 2008. v. OU001.
- DEDAVID E SILVA, L. A; **LOPES, F.C.** ; BRANDELLI, A. Utilização de casca de acácia negra tratada para a produção de enzimas celulásica e hemicelulásicas por *Aspergillus phoenicis*. VIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2008, Rio de Janeiro. VIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2008. p. 112-115.