

## EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PIGMENTO PRODUZIDO PELO FUNGO *TALAROMYCES COMPLEXO MINIOLUTEUS*

M. L. PEREIRA<sup>1</sup>, A. C. BADINO Jr.<sup>1</sup>, A. de BAPTISTA NETO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Química

<sup>2</sup> Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia

E-mail para contato: murilo13lucas@gmail.com

**RESUMO** – Pigmentos são substâncias de caráter histórico sendo utilizados desde os primórdios da humanidade. Atualmente, possuem grande aplicabilidade industrial passando pelos ramos alimentício, farmacêutico, têxtil, entre outros; sendo a produção sintética destes a mais comum. Devido aos correntes riscos apresentados por corantes sintéticos, o desenvolvimento de rotas alternativas à obtenção de pigmentos, em especial aquelas que envolvam fontes naturais, são imperativas e tem apresentado grande receptividade. Sendo assim, o presente projeto visa avaliar o processo de extração de pigmento produzido pelo fungo *Talaromyces complexus minioluteus* isolado no Cerrado da região de São Carlos, obtendo um composto mais puro a ser utilizado para a identificação estrutural do mesmo. Mais especificamente, avaliar-se-ão as condições dos processos para a extração de pigmento utilizando duas fases líquidas, estabelecendo parâmetros para esta operação unitária no processamento “downstream”. Além disso, com vista a otimizar os processos de identificação, testar-se-á técnicas de purificação do pigmento visando à obtenção de um grau de pureza, que será utilizado em outros trabalhos para a sua caracterização utilizando técnicas de RMN, espectrometria de massas e de infravermelho.

### 1. INTRODUÇÃO

Corantes e pigmentos são substâncias que permeiam as atividades humanas desde os seus primórdios, sendo as pinturas rupestres (uma das manifestações artísticas mais antigas da humanidade) evidências claras de suas remotas origens (Ebinuma, 2013; Ferreira, 2014). Atualmente, corantes e pigmentos possuem papel de destaque no meio industrial sendo utilizados nas indústrias têxtil, de alimentos, cosmética, farmacêutica etc., com vista a tornar seus produtos mais atraentes aos olhos do consumidor ou ainda conferir a estes funcionalidades ou propriedades especiais. É alta a gama de corantes existentes, sendo suas propriedades organolépticas advindas de diferentes estruturas moleculares. Por exemplo, a quantidade de instaurações da molécula é a principal responsável pela intensidade da cor manifestada.

Entretanto, quando os corantes são utilizados na indústria alimentícia ou para fins farmacêuticos, há uma preocupação quanto a seus efeitos na saúde humana. Há estudos de certos compostos, presentes, sobretudo nos corantes sintéticos (os mais utilizados atualmente), que podem ser prejudiciais à saúde, com potenciais carcinogênicos, mutagênicos

e tóxicos (Araújo e Antunes, 2000; Fuck *et al*, 2011). Com isso e com a crescente tendência mundial na procura de produtos mais saudáveis, os pigmentos produzidos por fontes naturais têm ganhado cada vez mais destaque (Celestino *et al*, 2014). Os processos de extração de corantes naturais de fungos filamentosos estão entre os mais estudados devido à variedade dos pigmentos por eles produzidos e de seu potencial uso industrial. Dentre as espécies mais utilizadas na produção de pigmentos estão as dos gêneros *Penicillium*, *Monascus* e *Aspergillus* (Ferreira, 2014),

Sendo os corantes produzidos por fungos compostos secundários de seus metabolismos, os mecanismos biológicos de sua síntese são por vezes incertos e variáveis, devendo ser estudados e controlados em vista a atingir a substância de interesse (Ferreira, 2014). Desta forma, o desenvolvimento dos processos de extração e purificação, escopo deste trabalho, são importantes para a utilização destes metabólitos, uma vez que diversos outros componentes podem ser coproduzidos durante o processo de fermentação. Algumas espécies do gênero *Talaromyces*, por exemplo, mostraram-se potenciais produtoras de pigmentos pelo fato de não apresentarem coprodução de micotoxinas associada.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho visa à avaliação da extração por solvente orgânico do pigmento vermelho produzido pelo fungo *Penicillium complexo minioluteum/Talaromyces complexo mineoluteus*, isolado por Romano (2014). Com isso pretende-se avaliar o processo de extração líquido-líquido no processamento “downstream”, além de contribuir no processo de isolamento do composto tratado.

Para tal serão avaliados o tipo de solvente utilizado, pH inicial da fase aquosa e proporção entre caldo de cultivo e solvente no processo de extração, visando obter o pigmento vermelho a partir do caldo de cultivo, além de serem testadas a re-extração com solvente orgânico e a solubilização do pigmento com solvente a baixa temperatura, com vista a aumentar o grau de pureza do pigmento.

## 3. METODOLOGIA

### 3.1. Produção de Pigmento

O cultivo do microrganismo visando a produção do pigmento de interesse foi realizado em duas etapas, sendo a primeira a preparação do inóculo e a segunda o cultivo, propriamente dito. O crescimento do inóculo foi feito em meio ISP2 (4 g/L de D-glicose, 2 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de extrato de malte, pH inicial igual a 5) que foram mantidos a 27°C por 24 horas em incubador rotativo (“shaker”) com agitação orbital de 250 rpm. Os esporos para esta etapa foram raspados de um tubo inclinado (“slant”). A etapa de cultivo do fungo foi realizada também em “shaker” à temperatura de 27°C e agitação orbital de 250 rpm, mas agora por 72 horas e utilizando o meio de cultivo complexo formado por 10 g/L de glicose, 4 g/L de Soytone e pH inicial igual a 5. O caldo proveniente desta última etapa foi então centrifugado e filtrado, formando o caldo bruto do pigmento.

### 3.2. Extração

A rotina de extração consistiu em transferir uma quantidade de caldo bruto do pigmento a um funil de separação, no qual foi adicionado solvente orgânico para a extração. A mistura foi então agitada e um tempo de 2 horas foi esperado para a formação das duas fases que foram prontamente separadas. Foram testados os pH's iniciais do caldo bruto de 3, 7 e 11; os solventes acetato de etila, n-butanol e hexano; e as proporções entre caldo bruto e solvente de 2:1 e 2:5. A análise da eficiência da extração foi medida utilizando-se técnicas de espectrofotometria de UV-visível e do teor de sólidos de cada fase extraída.

#### 4. RESULTADOS

Com relação ao cultivo do microrganismo *Talaromyces complexo mineoluteus* em meio líquido visando a produção sistemática de pigmento vermelho, notou-se uma grande influência da temperatura na síntese deste, sendo sua produção favorecida em temperaturas de 27°C. Na figura 1 vemos o resultado de um mesmo cultivo do microrganismo para as temperaturas em torno de 30, 29 e 27°C (da esquerda para a direita).

Figura 1 – Variações na produção de pigmento para diferentes temperaturas do “shaker” em um cultivo específico



Já tratando-se do espectro de absorção do visível do caldo bruto (figura 2), dois picos são bem distinguíveis, um a aproximadamente 420nm, típico de substâncias de coloração amarela, e um a 500nm, típico de substâncias de coloração vermelha (Skoog *et al.*, 2005). Tal característica mostrou-se sugestiva visto os resultados obtidos com os cultivos à temperatura de 30°C que produziram um caldo de coloração amarela, já que tal pico a 420nm no espectro de absorção pode indicar a presença de um outro pigmento no caldo bruto.

Analizando-se a capacidade do procedimento adotado em deslocar os compostos de interesse da fase aquosa para a fase orgânica, percebe-se que a extração parece ser mais efetiva para o n-butanol seguida do acetato de etila e do hexano, respectivamente. Com relação ao pH, a condição ácida se mostrou mais eficiente para os solventes acetato de etila e n-butanol, não havendo diferenças perceptíveis para o solvente hexano, muito provavelmente devido à sua já mencionada baixa eficiência na extração. Tais resultados estão de acordo com a metodologia de extração empregada por Sudha *et al.* (2016). Já em relação à quantidade de solvente utilizada, pôde-se perceber pelos gráficos da figura 2 uma diminuição da concentração relativa de pigmento quando compara-se o uso de cinco partes de solvente com

o uso de uma parte de solvente. Como tal diminuição é comparável ao aumento da quantidade de solvente (5 vezes mais solvente é colocado, diminuindo a concentração relativa da fase orgânica em 5 vezes, aproximadamente, em relação a fase orgânica obtida com apenas uma parte de solvente adicionada), o aumento da quantidade de solvente não parece influenciar na quantidade líquida de pigmento extraído. Na figura 3 observamos os resultados obtidos para a extração com n-butanol, pH inicial do caldo bruto igual a três e proporção entre caldo de cultivo e solvente de 2:1

Figura 2 – Perfil de absorbância do caldo bruto

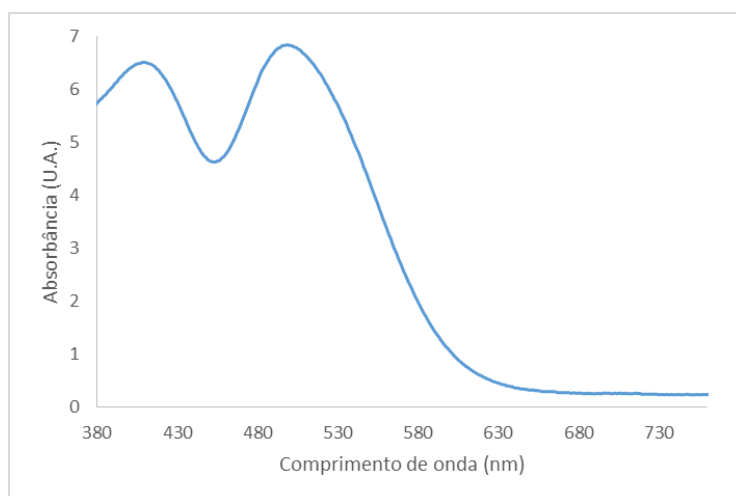
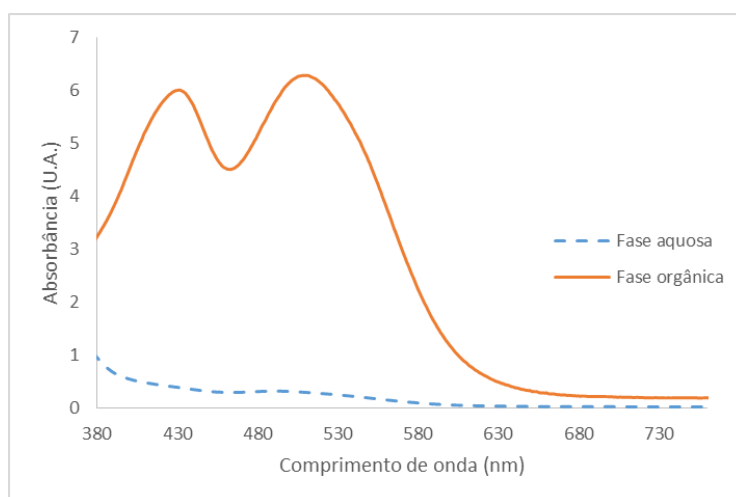


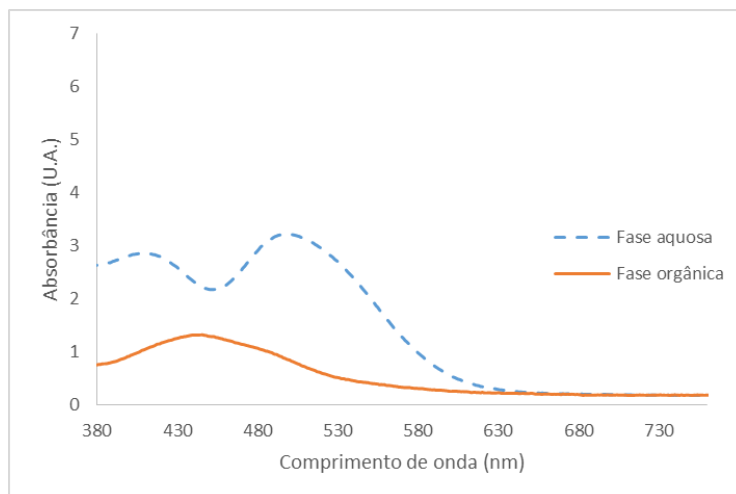
Figura 3 – Perfil de absorbância das fases orgânica e aquosa para a extração com solvente n-butanol, pH inicial do caldo bruto 3 e proporção de caldo bruto e solvente 2:1



A hipótese de uma possível presença de um outro pigmento de coloração amarela misturado ao pigmento vermelho no caldo bruto, como mencionado anteriormente, mostrou-se plausível ao se analisar a extração com o solvente acetato de etila, e pH inicial do caldo bruto igual a 7 na qual obteve-se na fase orgânica uma substância de coloração majoritariamente amarela, com visto na figura 4. Tal constatação vem a justificar o uso da re-

extração como método para se obter uma amostra pura de pigmento vermelho, facilitando assim os processos de identificação do mesmo

Figura 4 – Perfil de absorbância das fases orgânica e aquosa para a extração com solvente acetato de etila, pH inicial do caldo bruto 7 e proporção de caldo bruto e solvente 2:1



## 5. DISPOSIÇÕES FINAIS

Com relação à produção de pigmento o uso da metodologia, como descrita neste relatório mostrou-se, eficaz e reprodutível. No entanto, a análise dos fatores determinantes à produção de pigmento pelo fungo *Talaromyces complexo mineoluteus* ainda deve ser rigorosamente estudada, de modo a estabelecer condições ótimas de produção, bem como aumentar o conhecimento acerca da rota metabólica deste pigmento. Já se tratando dos processos de extração e purificação, menciona-se que um tratamento estatístico conveniente dos dados coletados há de ser realizado, de modo a se determinar parâmetros quantitativos da extração. Além disso, testar-se-ão a re-extração e a solubilização à baixa temperatura em solvente orgânico do pigmento, de modo a aumentar sua pureza e facilitar sua identificação estrutural.

## 6. REFERÊNCIAS

- ANTUNES, L.M.G.; ARAÚJO, M.C.P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais colorantes para alimentos. *Revista Nutrição*, Campinas, v.13, n. 2, p.81-88, maio/ago. 2000.
- CELESTINO, J. d. R. et al. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. *Process Biochemistry*, v.49, 569-575, 2014.
- DUFOSSE, L. et al. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. *Current Opinion in Biotechnology*, v.26, 56–61, 2014.
- EBINUMA, V. C. S. *Produção e extração de colorantes naturais de Penicillium purpurogenum* DPUA 1275. 2013. 223f. Tese (doutorado) - Departamento de Tecnologia Bioquímico-farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

- FERREIRA, A. G. *Estudo da produção de pigmentos por fungo endofítico em diferentes meios de cultura*. 48 f. Projeto de Pesquisa – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2014.
- FUCK, W.F.; GUTTERRES, M.; JESUS, M. A. de. *Desenvolvimento de biocorantes aplicados na produção de couros*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2011.
- ROMANO, L. H. *Bioprospecção de Microrganismos Endofíticos Isolados de Tabebuia spp. e Hymenaea courbaril e Identificação da Produção de Metabólitos de Interesse Biotecnológico*. 2014. 134f. Tese (doutorado), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.
- SKOOG, D., A. et al. *Fundamentos de Química Analítica*. 8 ed. Cengage Learning, 2005. p. 1124.
- SUDHA; GUPTA, C.; AGGARWAL, S. Dyeing wet blue goat nappa skin with a microbial colorant obtained from *Penicillium minioluteum*. *Journal of Cleaner Production*, v.127, 585–590, 2016.