

PRODUÇÃO DE CORANTES NATURAIS INOVADORES PELA DIVERSIFICAÇÃO METABÓLICA DE *Penicillium sclerotiorum*.

Marília A. F. e Moura^{1*}, Paulo V. M. Lima², Jacqueline A. Takahashi³

1. Doutoranda da Faculdade de Farmácia da UFMG

2. Estudante de IC do Departamento de Química da UFMG

3. ICEx-UFMG - Departamento de Química / Orientador

Resumo:

Penicillium sclerotiorum produz corantes naturais para uso alimentar e cosmético de grande importância industrial. O presente trabalho objetivou estudar a modulação do metabolismo do fungo em condições de cultura capazes de estimular a diversificação metabólica. *P. sclerotiorum* foi submetido a onze condições fermentativas diferentes e os extratos obtidos foram submetidos à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Como resultado, foram determinadas as condições adequadas para a obtenção de uma ampla diversificação metabólica de *P. sclerotiorum*, ou seja, condições em que corantes foram produzidos com altos rendimentos. As condições fermentativas empregadas também promoveram modulação do metabolismo secundário em relação à produtividade de esclerotiorina, tendo sido determinadas as condições ótimas para sua máxima produtividade pelo fungo.

Autorização legal: CNPq nº 010661/2012-3.

Palavras-chave: *Penicillium sclerotiorum*; esclerotiorina; OSMAC.

Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Introdução:

A modulação do metabolismo secundário de micro-organismos é uma estratégia promissora para a obtenção de novos produtos naturais bioativos, os quais são considerados alternativas ambientalmente corretas à atual produção de diversos compostos químicos sintéticos (Akilandeswari e Pradeep, 2016).

Em particular, fungos do gênero *Penicillium* são reconhecidos pela produção de metabólitos secundários com diversidade química e estrutural de vasta aplicação

industrial farmacêutica (anticolesterolêmicos e antibióticos), alimentícia (queijos e carnes fermentadas), têxtil (enzimas), dentre outras (Knob e Carmona, 2009; Grijseels *et al.*, 2016), além de serem empregados em processos de biotransformação de substâncias conhecidas visando à obtenção de novos compostos (Xin *et al.*, 2017).

P. sclerotiorum é uma espécie de fungo filamentosos, isolada pela primeira vez a partir de amostras de ar, na Indonésia (Rivera e Seifert, 2011). Essa espécie é produtora de uma azafilona denominada esclerotiorina, de coloração alaranjada, que possui diversas atividades biológicas importantes associadas à diminuição de problemas relacionados a disfunções causadas pela alimentação. Sua coloração intensa e sua atividade biológica sugerem o uso desta substância como fármaco e como aditivo natural, com propriedades farmacológicas. As azafilonas de *P. sclerotiorum* têm sido alvo de estudos visando à sua aplicação como corante na indústria de alimentos por nosso grupo de pesquisa (Corrêa e Takahashi, 2016).

Estudos recentes demonstram que muitos *clusters* gênicos podem permanecer silenciados sob as condições de cultivo tradicionalmente utilizadas em laboratório, indicando que o potencial de produção de metabólitos fúngicos é ainda maior do que o observado grande parte das vezes (Bertrand *et al.*, 2014). Desta forma, a constante busca por inovação tecnológica tem incentivado cientistas a pesquisarem novos compostos naturais, utilizando-se a abordagem OSMAC - do inglês, *one strain, many compounds*, que significa “uma cepa, vários compostos”. Segundo essa abordagem, novos metabólitos podem ser obtidos, modificando-se diferentes aspectos das condições de cultivo de micro-organismos, permitindo-se diversificar ou intensificar essa produção (Bode *et al.*, 2002).

O objetivo deste trabalho foi determinar condições adequadas para a diversificação ou intensificação do perfil metabólico de *P. sclerotiorum* quando cultivado em meios de cultura com diferentes

concentrações de nutrientes.

Metodologia:

O fungo da espécie *P. sclerotiorum*, pertencente à coleção do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios do Departamento de Química da UFMG, foi utilizado no preparo de uma suspensão de esporos padronizada em câmara de Neubauer.

Para o cultivo do fungo, foram preparados onze meios de cultura, contendo quantidades variáveis de glicose, peptona e cloreto de sódio e quantidades fixas de fosfato monopotássico e sulfato de magnésio, segundo planejamento estatístico.

Os meios de cultura foram preparados na quantidade de 200 mL para cada frasco, esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min e, após atingirem temperatura ambiente, foi adicionado 1 mL da suspensão de esporos em cada frasco.

Os frascos foram mantidos sobre a bancada, à temperatura ambiente, em condições estáticas, por 23 dias para desenvolvimento da biomassa fúngica e produção de metabólitos.

Após esse período de tempo, os meios de cultura fermentados foram filtrados para remoção da biomassa. Os filtrados foram submetidos à partição líquido-líquido com o solvente acetato de etila e, posteriormente, à rotaevaporação para concentração dos metabólitos, dando origem aos extratos que foram utilizados nas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Foram preparadas soluções a partir dos extratos dos caldos fermentados, diluindo-se os mesmos em metanol (1 mg/mL). As soluções foram injetadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (coluna C18 – 3 x 250 mm, partícula 5 µm, detector UV de lâmpada de deutério), obtendo-se os perfis cromatográficos no comprimento de onda de 370 nm.

Resultados e Discussão:

O cromatograma da substância esclerotiorina (1 mg/mL), quando injetada nas mesmas condições das demais amostras, apresentou um único pico no tempo de retenção de 40 min (Figura 1), indicando que os picos que aparecem nesse mesmo tempo de retenção nas amostras, correspondem a essa substância.

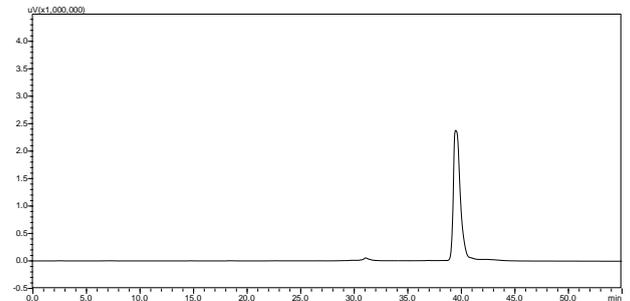


Figura 1 – Cromatograma (370 nm), obtido por CLAE, da substância esclerotiorina purificada.

Os extratos, preparados sob onze diferentes condições, apresentaram variações nos perfis cromatográficos, em resposta às alterações presentes nos diferentes meios de cultura fermentados (Figura 2).

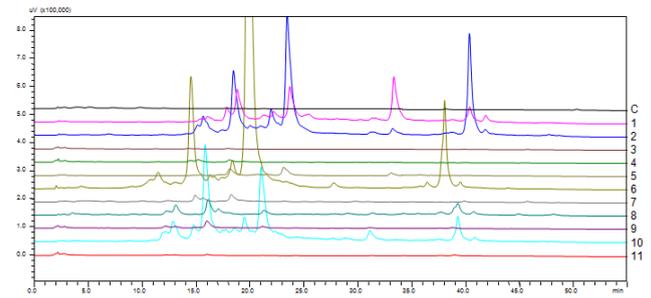


Figura 2 – Perfis cromatográficos (370 nm), obtidos por CLAE, dos extratos fúngicos dos onze meios de cultura do primeiro cultivo (de cima para baixo: controle e meios 1 a 11).

Foram detectadas diferenças nos perfis cromatográficos em relação ao aparecimento de novos picos em tempos de retenção distintos e também em relação ao tamanho de picos que apareceram em um mesmo tempo de retenção, indicando que determinadas substâncias foram produzidas em maior quantidade em alguns meios do que em outros. Desta forma, as condições fermentativas empregadas geraram alterações qualitativas (diversificação metabólica) e quantitativas (intensificação metabólica), mostrando novas possibilidades para a obtenção de corantes distintos da esclerotiorina (tempo de retenção 40 min, Figura 1), bem como para maximização da produção deste corante. O cromatograma referente ao meio de cultura 6 apresentou maiores picos nos tempos de retenção de 15 e 20 min, quando comparado aos demais, sendo, portanto, a melhor condição fermentativa para a produção de novos corantes por *P. sclerotiorum*. Destaca-se também o meio de cultura 1, cujo cromatograma apresentou um pico predominante no tempo de retenção próximo aos 34 min, quando comparado aos demais, indicando produzir de forma mais seletiva, um corante distinto. Já o cromatograma referente ao meio de cultura 2 apresentou o maior pico

no tempo de retenção próximo aos 40 min, sendo a melhor condição para a maximização do processo produtivo de esclerotiorina.

Conclusões:

Neste trabalho, foram determinadas condições seletivas para maximização da produção de corantes naturais da classe das azafilonas por meio da modulação metabólica de *P. sclerotiorum*. Estudos posteriores serão conduzidos visando verificar a estabilidade dos corantes e sua adequação à legislação vigente para uso como corantes naturais em alimentos e cosméticos. A substituição de corantes artificiais por corantes naturais é uma tendência atual e a produção dos mesmos a partir de fungos é uma alternativa inovadora, fácil de ser escalonada e bastante sustentável. Sendo um processo com grande aderência à química verde, já que a produção envolveu poucos reagentes e de baixa toxicidade, com geração mínima de resíduos, possui grande e real potencial de rápida aplicação industrial.

Referências bibliográficas

Akilandeswari, P.; Pradeep, B.V. Exploration of industrially important pigments from soil fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2016) 100:1631-1643.

Bertrand, S.; Bohni, N.; Schnee, S.; Schumpp, O.; Gindro, K.; Wolfender, J.L. Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology Advances* (2014) v.32, p. 1180-1204.

Bode, H. B.; Bethe, B.; Höfs, R.; Zeeck, A. Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity. *ChemBioChem*, 2002, 3, 619-627.

Corrêa, D.G.; Takahashi, J. A. Sequential fungal fermentation-biotransformation process to produce a red pigment from sclerotiorin. *Food Chemistry* v. 210 (2016) p. 355-361.

Grijseels, S.; Nielsen, J.C.; Randelovic, M.; Nielsen, J.; Nielsen, K.F.; Workman, M.; Frisvad, J. C. *Penicillium arizonense*, a new genome sequenced fungal species, reveals a high chemical diversity in secreted metabolites. *Nature* (2016) *Scientific Reports* 6:35112.

Knob, A.; Carmona, E.C. Cell-associated acid β -xylosidase production by *Penicillium sclerotiorum*. *New Biotechnology*, v. 26 (2009)

p. 60-67.

Lucas, E.M.F.; Castro, M.C.M./ Takahashi, J.A. Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromophilone VI and pencolide, metabolites from a Brazilian cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* Van Beyma. *Brazilian Journal of Microbiology* (2007) 38:785:789.

Medina, A.; Schmidt-Heydt, M.; Rodríguez, A.; Parra, R.; Geisen, R.; Magan, N. Impacts of environmental stress on growth, secondary metabolite biosynthetic gene clusters and metabolite production of xerotolerant/xerophilic fungi. *Curr. Genet.*(2015) 61: 325-334.

Rivera, K.G.; Seifert, K.A. A taxonomic and phylogenetic revision of the *Penicillium sclerotiorum* complex. *Studies in Mycology* 70: 139-158. 2011.

Xin, X.L.; Wang, Y.; Fan, G.J.; Chen, L.; Sun, C.P. Biotransformation of capsaicin by *Penicillium janthinellum* AS 3.510. *Phytochemistry Letters*, v. 19 (2017) p.210-214.