UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO TECNOLÓGICO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE MESTRADO

NELSON ROSA FERREIRA

MICOTECNOLOGIA APLICADA À PRODUÇÃO DE 5-HIDROXI-2-HIDROXIMETIL-ɔ-PIRONA: USO POTENCIAL NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

BELÉM
2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO TECNOLÓGICO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE MESTRADO

NELSON ROSA FERREIRA

MICOTECNOLOGIA APLICADA À PRODUÇÃO DE 5-HIDROXI-2-HIDROXIMETIL-ɔ-PIRONA: USO POTENCIAL NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Alberdan Silva Santos

BELÉM
2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO TECNOLÓGICO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

NELSON ROSA FERREIRA

MICOTECNOLOGIA APLICADA À PRODUÇÃO DE 5-HIDROXI-2-HIDROXIMETIL-ɔ-PIRONA: USO POTENCIAL NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

DATA DA AVALIAÇÃO: ____/____/____

CONCEITO:_____

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dr. Alberdan Silva Santos
(DQ/CCEN/UFPA - Orientador)

_____
Prof. Dr. Lourivaldo da Silva Santos
(DQ/CCEN/UFPA ï Membro)

_____
Prof. Dr. Hervé Louis Ghislain Rogez
(DEQAL/CT/UFPA ï Membro)

À Alice Rosa (minha princesinha),

com todo meu amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado saúde, perseverança e tranqüilidade nos momentos difíceis.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Alberdan Silva Santos, que me mostrou o ñcaminho das pedrasòe pela contribuição para minha formação profissional.

Ao Dr. Francisco Airton Nogueira, Coordenador Regional do Laboratório Nacional Agropecuário no Pará (LANAGRO/PA), pelo apoio incondicional durante a realização deste trabalho.

Aos colegas do LANAGRO/PA: Lílian, Fabiane, Riziane, Lígia, Elias e Helena pelo apoio.

Aos colegas do LabIsisBio: Diana, Fábio, Ingrid, José Luiz e Cleyton pelo companheirismo e assistência laboratorial.

À servidora da UFPa Sônia Pamplona, pelo auxílio nas análises de IV.

À Dra. Maria Inês de M. Sarquis, do Laboratório de Coleção de Fungos, Fiocruz pela identificação do fungo.

À EMBRAPA ï Amazônia Oriental, na pessoa do Dr. Sérvio Alves, pelas análises de IV.

À minha mãe Elisabete (Betinha), minhas avós Adalgisa (Dadá) e Maria Luiza, e tia Goretti pela educação dada, apoio e compreensão.

Ao meu pai Prof. Moreira Gomes e meu avô Albino, pela educação dada, apoio e compreensão.

À minha esposa Adriana, pela compreensão e companheirismo.

A todas as pessoas ou instituições que de alguma forma, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Aspergillus flavus (IOC 3974), foi selecionado entre diversas linhagens de fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Aspergillus* no laboratório de coleção de fungos do Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz ï RJ. Este microrganismo foi utilizado na produção do metabólito secundário, denominado 5-hidroxi-2-hidroximetil-ɔ-pirona, que pertence ao grupo das ɔ-pironas, sendo conhecido como ñácido kójicoò e tendo aplicações em diversos segmentos industriais. Na indústria de alimentos, apresenta grande potencial como inibidor da polifenoloxidase (PFO), responsável pelo escurecimento enzimático de produtos agrícolas. Apresenta estrutura química, que de um modo genérico, poderá ser convertida em precursora de potencializador de aromas a exemplo do maltol ou etil maltol, os quais já são aplicados em alimentos. Em função do grande potencial metabólico deste microorganismo, o presente trabalho refere-se ao estudo de um processo biotecnológico para otimizar a produção do 5-hidroxi,2-hidroximetil-ɔ-pirona.

Aspergillus flavus foi cultivado em frascos de 250 mL contendo 100mL de meio líquido Czapek, variando-se a concentração da fonte de carbono desde 30g L^{-1} até 360g L^{-1}, seguido da regulação por nitrogênio inorgânico [$NaNO_3$/$(NH_4)_2SO_4$], sendo o pH ajustado para 3,5 no início do processo. Os frascos foram mantidos a 28 ºC durante 16 dias e sob agitação constante de 120 rpm. Alíquotas de 1mL foram retiradas a cada 24h e analisadas quanto à produção do metabólito, teor de açúcar residual, pH e biomassa. Estes estudos permitiram planejar estratégias para induzir a produção do metabólito através da determinação dos parâmetros cinéticos da produção do metabólito, produção de biomassa e consumo da sacarose utilizada como fonte de carboidrato. A extração e o isolamento do 5-hidroxi-2-hidrometil-ɔ-pirona foram realizados utilizando MeOH/ACoEt (1:1) e cristalização em ambiente com temperatura controlada.

Os resultados obtidos mostraram que a regulação por carbono e nitrogênio influenciou na produção do metabólito, de modo que a relação C/N (200:1) apresentou 15,5 g de metabólito por litro de meio de cultura num período de 35 dias. A utilização de diferentes concentrações de sacarose mostrou que 120g L^{-1} apresentou melhor condição de biotransformação atingindo uma produção de 16g do metabólito por litro de meio de cultura num período de 15 dias. A extração do metabólito por meio de solvente orgânico e posterior cristalização permitiu obter o

produto puro com um rendimento de 6,96% m/m tendo como base o substrato inicial. Os resultados confirmaram que o processo apresenta grande potencial para obtenção do metabólito de modo a gerar quantidades adequadas para os estudos de transformação e aplicação em escala piloto. Métodos físicos de análises foram realizados para identificar e confirmar a estrutura do 5-hidroxi-2-hidroximetil-ɔ-pirona.

ABSTRACT

Aspergillus flavus (IOC 3974), was selected among several stream of filamentous fungi belonging to the genus Aspergillus from the laboratory of fungi collection of the Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruzï RJ. This microorganism was used in the production of the secondary metabolite named 5-hidroxy-2-hidroxymethyl-ɔ-pirone, hat belongs to the ɔ-pirone group. This substance is also known as ñkojic acidò and it does have application in several industrial segments. In the industry of food, it presents great potential as inhibiter of poliphenoloxidase (PFO), responsible for the enzymatic darkening of agricultural products. Besides presenting chemical structure that in a generic way can be converted in precursory substance of flavor enhancer as maltol or etil maltol, which are already applied in food. As a function of the great metabolic potential of this microorganism, the present work does refer to the study of a biotechnological process optimization to produce the 5-hidroxy-2-hidroxymethyl-ɔ-pirone.

Aspergillus flavus was cultivated in conical flasks of 250 mL containing 100mL of Czapekk liquid medium, using different concentration of the carbon source from 30g L^{-1} up to 360g L^{-1}, following by the regulation for inorganic nitrogen source [NaNO3/(NH4)2SO4]. The pH was adjusted to 3,5 in the beginning of the process. The flasks were maintained at 28 ºC for 16 days and under constant agitation of 120 rpm. Brackets of 1mL were withdraw to each 24 h, and the production of the metabolite, residual sugar, pH and biomass were analyzed. These studies allowed to plan strategies to induce the production of the metabolite through the determination of the kinetic parameters of the metabolite production, biomass production and consumption of the sucrose used as carbohydrate source. The extraction and the isolation of the 5-hidroxy-2-hidroxymethyl-ɔ-pirone was accomplished through partition with MeOH/ACoEt (1:1) and the crystallization was realized in atmosphere pressure with controlled temperature.

The results showed that the regulation for carbon and nitrogen influenced the metabolite production, so that the relationship C/N (200:1) presented 15,5 g of metabolite per liter of culture medium in a period of 35 days. The use of different sucrose concentrations showed that 120g L^{-1} presented better biotransformation process condition, reaching a production of 16g of the metabolite per liter culture medium in a period of 15 days. The extraction of the metabolite through organic

solvent and subsequent crystallization allowed to obtain the pure product with a yield of 6,96% w/w, referred by the initial substratum. The results confirmed that the process presents great potential for obtaining the metabolite with great amounts of the metabolite in a pilot scale. Physical methods of analyses were applied to identify and to confirm the structure of the 5-hidroxy, 2-hidroxmethyl-ɔ-pirone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Influência dos efeitos internos e externos sobre a expressão celular.....	Pág. 20
Figura 2	Etapas gerais de um processo fermentativo.....	Pág. 22
Figura 3	Algumas formas de crescimento de fungo filamentoso.....	Pág. 28
Figura 4	Efeito da concentração de oxigênio sobre a velocidade de absorção específica de oxigênio(Q) de um microrganismo.....	Pág. 33
Figura 5	Fotomicrografia eletrônica de conidiósforos de *Aspergillus*.....	Pág. 36
Figura 6	Efeito do pH e temperatura sobre a velocidade de crescimento radial de *A. flavus*.	Pág. 38
Figura 7	Produção de 5-hidroxi-2-hidroximetil-ɔ-pirona por cultura selvagem e cultura modificada.....	Pág. 41
Figura 8	Estrutura molecular do ácido kójico.....	Pág. 42
Figura 9	Ligação peptídica em derivados do ácido kójico e as possíveis combinações de aminoácidos.....	Pág. 44
Figura 10	Mecanismo da reação de formação do lauriol de ácido kójico.....	Pág. 45
Figura 11	Formação da ligação glicosídica.....	Pág. 48
Figura 12	Rotas biossintéticas propostas para o ácido kójico em cultivo de *Aspergillus flavus*.....	Pág. 50
Figura 13a	Hidrólise enzimática da sacarose.....	Pág. 53
Figura 13b	Conversão da frutose em glicose.....	Pág. 54
Figura 13c	Etapas da biossíntese do ácido kójico.....	Pág. 54
Figura 14	Suspensão de *A flavus*.	Pág. 58
Figura 15	Filtração a vácuo do meio após obtenção da biomassa.....	Pág. 59
Figura 16	Filtração do meio de cultura após 72 horas de cultivo de *A. flavus*	Pág. 60
Figura 17	Cultivo de fungo filamentoso em diferentes concentrações de sacarose.....	Pág. 61

Figura 18 Placas de Petri com quadrante estabelecidos para o estudo da cinética de crescimento do fungo filamentoso..... Pág. 65

Figura 19.1 Perfis de crescimento em diferentes concentrações de sacarose..... Pág. 68

Figura 19.2 Curvas de progressão de crescimento do fungo filamentoso *Aspergillus flavus* em diferentes concentrações de sacarose e meio de cultura..... Pág. 69

Figura 20 Biomassa obtida durante a fermentação da sacarose em cultivo de fungo filamentoso após 72 horas..... Pág. 72

Figura 21 Curva de quantificação do ácido kójico..... Pág. 74

Figura 22 Curva de quantificação dos açúcares redutores..... Pág. 74

Figura 23 Espectro UV/VIS do meio de cultura antes e após a inoculação..... Pág. 75

Figura 24a Espectro de RMN de carbono 13 ï amostra..... Pág. 76

Figura 24b Espectro de RMN de carbono 13 - padrão..... Pág. 76

Figura 24c Espectro de RMN de hidrogênio ï amostra..... Pág. 77

Figura 24d Espectro de RMN hidrogênio ï padrão..... Pág. 77

Figura 25 Espectro na região do IV da amostra purificada e do padrão autêntico..... Pág. 79

Figura 26 Curva de progressão de formação do produto em diversas concentrações de sacarose..... Pág. 80

Figura 27 Perfil de crescimento do fungo filamentoso expresso em biomassa seca..... Pág. 81

Figura 28 Parâmetros de produção do ácido kójico, consumo dos açúcares redutores totais e pH..... Pág. 82

Figura 29 Curva de progressão do metabólito em diferentes concentrações de nitrogênio..... Pág. 85

Figura 30 Consumo do substrato em diferentes concentrações de nitrogênio. Pág. 86

Figura 31 Amostra bruta liofilizada..... Pág. 87

Figura 32 Extrações realizada a partir da amostra bruta liofilizada..... Pág. 87

Figura 33 5-hidroxi-2-hidroximetil-ɔ-pirona apresentada na forma de cristais..... Pág. 88

Figura 34 Possível estrutura do produto isolado..... Pág. 88

Figura 35 Meio de cultura Czapek-Dox utilizado para o cultivo de *A. flavus* sem adição de EDTA e após adição..... Pág. 89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Temperatura e atividade de água requerida para o desenvolvimento de algumas espécies de *Aspergillus*..... Pág. 38

Tabela 2 Atividade enzimática no micélio de *A. flavus* em meio YES..... Pág. 50

Tabela 3 Efeito de diferentes fontes de carboidratos na produtividade do ácido kójico..... Pág. 51

Tabela 4 Parâmetros cinéticos do perfil de crescimento de *A. flavus* em meio de cultura sólido com 12% de sacarose..... Pág. 70

Tabela 5 Quantidade de biomassa seca e úmida adicionada nas padronizações utilizadas..... Pág. 72

Tabela 6 Deslocamento químico da amostra e do padrão em RMN ^{13}C..... Pág. 78

Tabela 7 Deslocamento químico da amostra e do padrão em RMN ^{1}H..... Pág. 78

Tabela 8 Resultados da fermentação por batelada simples..... Pág. 83

Tabela 9 Velocidades específicas calculadas a partir da tabela 8..... Pág. 83

Tabela 10 Comparação dos resultados obtidos por Ariff et al. e o experimento atual, utilizando processo descontínuo..... Pág. 84

Tabela 11 Valores de atividade antioxidante TEAC (mM) de algumas substâncias..... Pág. 90

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Principais ácidos orgânicos de importância comercial produzidos por fungos filamentosos..... Pág. 30

Quadro 2 Substratos naturais e os microrganismos produtores de ácido kójico..... Pág. 39

Quadro 3 Composição química dos meios de culturas para cultivo de *A. flavus* e transformações microbiológicas..... Pág. 57

SUMÁRIO

Pág

Introdução..... 16

1. Revisão da Literatura..... 19

Capítulo 1: Fermentação..... 19

1.1 Generalidades..... 19

1.2 Fatores que afetam o processo fermentativo..... 20

1.3 Etapas do processo fermentativo..... 21

1.4 Cinética das fermentações..... 22

1.5 Fermentação no estado sólido (FES)..... 24

1.6 Fermentação submersa..... 26

Capítulo 2: Utilização de fungos filamentosos em processos biotecnológicos..... 28

2.1 Introdução..... 28

2.2 Produção de ácidos orgânicos..... 29

2.3 Influência dos parâmetros de processo na morfologia e produtividade fúngica..... 30

2.3.1 Inóculo..... 30

2.3.2 Potencial hidrogeniônico e sua influência no meio de cultura..... 31

2.3.3 Composição do meio de cultura..... 32

2.3.4 Influência da temperatura no meio de cultura..... 34

Capítulo 3: Gênero *Aspergillus*..... 36

3.1 Introdução..... 36

3.2 Aspectos sobre as condições de cultivo do *Aspergillus*..... 37

3.3 Tipos de ambientes propícios para o desenvolvimento de fungos do gênero *Aspergillus*..... 37

Capítulo 4: Fungos produtores de ácido kójico..... 39

Capítulo 5: Ácido Kójico..... 42

5.1 Aspectos estruturais e bioquímicos..... 42

5.2 Estudos toxicológicos e atividades antibióticas..... 43

Capítulo 6: Transformações do ácido kójico..... 44

Capítulo 7: Biossíntese do ácido kójico..... 47

7.1 Monossacarídeo como fonte de carboidrato..... 47

7.2 Reações de biossíntese..... 48

2. Materiais e Métodos..... 56

2.1 Obtenção do microrganismo e preparação dos meios de cultura..... 56

2.2 Cultivo do *Aspergillus* flavus para obtenção de conídios..... 57

2.3 Cultivo de *A. flavus* para produção de *pellets*..... 58

2.3.1 Procedimento 1..... 58

2.3.2 Procedimento 2..... 59

2.4 Padronização do inóculo e produção do ácido kójico na presença de diferentes concentrações de sacarose 60

2.5 *Scale up* do processo..... 60

2.6 Efeito da concentração da fonte de carbono sobre a produção do ácido kójico..... 61

2.7 Efeito da relação carbono/nitrogênio sobre a produção do ácido kójico..... 61

2.8 Obtenção e isolamento do ácido kójico a partir do meio de cultivo..... 62

2.9 Cristalização do 5-hidroxi-2-hidroximetil-ɔ-pirona..... 62

2.10 Procedimento para identificação do 5-hidroxi-2-hidroximetil-ɔ-pirona..... 62

2.10.1 Espectroscopia de infravermelho (IV)..... 62

2.10.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13..... 63

2.10.3 Espectrofotometria UV/VIS..... 63

2.11 Procedimentos para a identificação e quantificação do ácido kójico..... 63

2.11.1 Construção da curva de quantificação do ácido kójico..... 63

2.11.2 Determinação da absorvância do meio fermentado..... 64

2.11.3 Quantificação dos açúcares redutores totais..... 64

2.11.4 Construção da curva de quantificação dos açúcares redutores totais..... 64

2.11.5 Determinação do pH do meio de cultura..... 65

2.12 Determinação dos parâmetros cinéticos..... 65

2.12.1 Cinética de crescimento do *Aspergillus flavus* em meio sólido... 65

2.12.2 Cinética de crescimento do *Aspergillus flavus* em meio líquido.. 66

2.12.3 Cinética de produção do metabólito..... 66

2.13 Avaliação do potencial antioxidante do 5-hidroxi-2-hidroximetil-ɔ-pirona.. 66

3. Resultados e Discussão..... 68

3.1 Perfil do crescimento micelial do *Aspergillus* flavus em meio sólido..... 68

3.2 Obtenção de conídios e padronização dos inóculos..... 69

3.3 Análises de quantificação do ácido kójico..... 73

3.4.Curva de quantificação dos açúcares redutores totais..... 74

3.5 Caracterização estrutural do produto..... 75

3.5.1 Espectrofotometria UV/VIS..... 75

3.5.2 Resultado das análises de RMN ^{13}C e RMN ^{1}H..... 76

3.5.3 Espectroscopia no infravermelho..... 79

3.6 Efeito da concentração da fonte de carbono na produção do ácido kójico..... 80

3.7 Investigação dos parâmetros cinéticos..... 81

3.8 *Scale up* do processo..... 85

3.9 Efeito da relação carbono / nitrogênio sobre a produção do metabólito..... 85

3.10 Concentração e isolamento da substância biotransformada..... 87

3.11 Obtenção e rendimento do produto isolado..... 88

3.12 Atividade antioxidante do 5-hidroxi-2-hidroximetil-ɔ-pirona..... 90

Conclusão..... 92

Referências..... 94

INTRODUÇÃO

O uso de microrganismos em processos biotecnológicos tem demonstrado grande potencial na realização de conversões altamente específicas. Neste trabalho, o desenvolvimento de um processo biotecnológico para geração de uma substância que apresenta características químicas de atuar como precursora de potencializador de aroma, surge como uma alternativa de desenvolvimento tecnológico para diversos seguimentos industriais, principalmente para a indústria de alimentos. Por outro lado, a produção de substâncias que atuem na inibição de polifenoloxidases (PFO) é de grande importância na prevenção do escurecimento de produtos alimentícios e clareamento da pele. Desta maneira, a principal meta deste trabalho é gerar uma substância produzida por microrganismo que apresente estas características.

O microorganismo identificado como *Aspergillus flavus* (IOC 3974), utilizado neste trabalho é um fungo filamentoso que apresenta grande potencial de produção de enzimas pertencentes aos grupos das oxidoredutases e hidrolases, que estão presentes no metabolismo de geração de diversos metabólitos secundários que apresentam atividade antibiótica, entre estes metabólitos, destaca-se o 5-hidroxi-2-hidroximetil-ɔ-pirona. Em função da capacidade e habilidade desta linhagem de *A flavus* em biotransformar sacarose em substância contendo o grupo ɔ-pirona, foi desenvolvido um processo biotecnológico para cultivar esta linhagem de fungo identificada e autenticada pelo Laboratório de Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz-RJ, e está disponível no laboratório de Biotecnologia do Departamento de Química do CCEN/UFPA, sob a responsabilidade do Professor Alberdan Santos. Este microrganismo permanece disponível para o trabalho de otimização do processo de produção desta substância, a qual apresenta grande interesse científico e tecnológico.

O processo biotecnológico foi desenvolvido em cultivo submerso utilizando sacarose como fonte de carbono devido sua facilidade de obtenção e aspecto econômico envolvido. A transformação da sacarose em 5-hidro-2-hidroximetil-ɔ-pirona envolve poucas etapas químicas, algumas das quais já são bem conhecidas. Por este motivo, a obtenção do produto se apresenta de maneira clara e com resultados bastantes favoráveis ao *scale up* do processo. A relevância deste processo baseia-se no fato de que o Brasil ainda não apresenta pedido de patente

na produção a nível piloto desta substância. O 5-hidroxi-2-hidroximetil-ɔ-pirona tem várias aplicabilidades industriais. É estudado na medicina como agente de atuação antiinflamatório, é indicado como precursor de um potencializador de aromas (ARIFF et al., 1996), e como agente antioxidante, inibindo a atuação de polifenoloxidases.

Desta maneira, o objetivo deste trabalho é desenvolver um processo biotecnológico de produção do 5-hidroxi-2-hidroximetil-ɔ-pirona através de cultivo submerso de *Aspergillus flavus*, tendo como fonte de carboidrato a sacarose.

REVISÃO DA LITERATURA

CAPÍTULO 1: FERMENTAÇÃO

1.1 Generalidades

Segundo Sloat (1980), a fermentação microbiana é um fenômeno onde a glicose é transformada em piruvato e a NADH é re-oxidada. As enzimas produzidas pelos microrganismos são necessárias para que ocorra esta transformação, e em seguida a conversão de piruvato a outros produtos. É importante observar que a fermentação só acontece se o microrganismo for capaz de obter energia necessária para este processo. Os microrganismos podem ser cultivados em bioreatores em meio líquido ou sólido para converter substâncias orgânicas em biomassa e em produtos. O meio de cultura sofre transformações e são formados produtos como conseqüência de atividades catabólicas e anabólicas. Santos (2005) define fermentação como ñprocesso biotecnológico utilizando células vegetais ou microbianas principalmente, para gerar substâncias de interesse a partir de carboidratos que obrigatoriamente possam ser metabolizados por via glicolítica, havendo necessariamente respiraçãoò.

O uso de processos microbiológicos para obtenção de produtos que posteriormente possam ser utilizados, certamente não é novo. Há milhares de anos o homem utiliza os microrganismos sem mesmo ter consciência de sua existência. A fabricação de pão, vinho e cervejas antecedem a era cristã. Registros indicam a produção de alimentos fermentados datados em 1.000 a.C, como o molho de soja, bastante consumido no continente asiático. Neste mesmo período, alguns produtos eram obtidos pela modificação enzimática do meio utilizando-se um complexo enzimático produzido por *Aspergillus oryzae* a partir de uma massa umidificada de cereal cozido conhecida como ñkojiò (HESSELTINE, 1987; RALPH, 1976).

Em 1857, Pasteur apresentou o resultado de seus estudos da conversão de açúcar para ácido lático. Ele concluiu que as transformações eram ocasionadas por células vivas, em condições anaeróbias e observou que as fermentações naturais podiam ser ocasionadas por células diferentes, entretanto cada tipo de fermentação era executado por células distintas (WOLFE, 1999).

A fermentação microbiana utiliza a potencialidade dos microrganismos adaptados às condições ambientais capazes de produzir um número elevado de diferentes produtos cujas aplicações estão cada vez mais abrangentes.

Historicamente os primeiros produtos obtidos da fermentação foram: etanol, ácido acético e ácido lático. Até metade do século XX a exploração econômica da fermentação era concentrada na produção de bebidas alcoólicas. Atualmente, abrange áreas mais amplas, como a estabilização de detritos orgânicos, obtenção de alimentos fermentados, proteínas, vitaminas, hormônios, antibióticos e esteróis (HAHN, 1968; LIMA, AQUARONE, BORZANI, 1982).

1.2 Fatores que afetam o processo fermentativo

Os fatores internos estão relacionados com a dotação genética intrínseca que o microrganismo possui e também com seus mecanismos de regulação metabólica. A mutação induzida do microrganismo é um recurso que pode ajudar na melhoria da produtividade do processo de fermentação. As cepas podem ser submetidas a tratamentos químicos ou físicos de mutação visando aumentar ou suprimir a produção do metabólito.

Os fatores externos de natureza física estão relacionados com as condições de operação dos reatores, como por exemplo, temperatura, agitação, aeração e alimentação. Estas são variáveis que se fixam ou se programam no curso do processo de produção (fig. 1).

Os fatores externos de natureza química são representados pelos componentes dos meios de fermentação, incluindo a presença ou ausência de O_2. Outro efeito externo de natureza química que inibe a formação de alguns produtos, como antibióticos, é a presença do íon fosfato. Alguns estudos indicam que em concentrações acima de 1 M, há inibição da síntese de alguns antibióticos (FIECHTER, 1984).

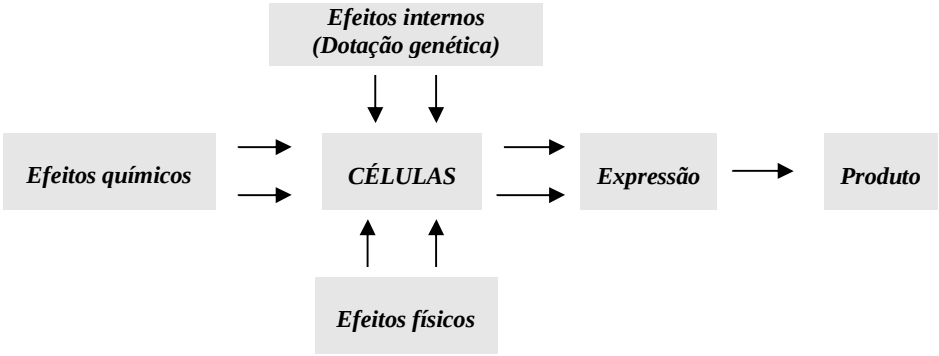


Figura 1. Influência dos efeitos internos e externos sobre a expressão celular.

A quebra da glicose constitui uma das etapas do processo de fermentação, onde um par de elétrons é fornecido pela NADH na forma de hidrogênio de alta energia. Este par de elétrons pode ser usado na respiração para atender 2-3 moléculas de ATP. Entretanto, algumas vezes a respiração não é possível devido o sistema não existir para o organismo em decorrência à carência de oxigênio. Nestas condições, o hidrogênio reduz outra molécula. Esta molécula é o resultado da fermentação (DOKKER, SCHMIDT, 1992).

1.3 Etapas de um processo fermentativo

O processo de fermentação começa com a propagação dos cultivos realizados geralmente em tubos de ensaios contendo colônias de microrganismo de interesse, previamente selecionado (fig. 2). Esse material microbiológico constitui o ponto de partida para a obtenção de grandes quantidades de produtos ou biomassa. O aumento da concentração celular acontece de forma gradativa com sucessivas passagens em frascos de volumes crescentes até alcançar o tanque de inóculo e posteriormente um fermentador industrial cujo volume varia de acordo com o produto que se deseja obter, compreendido normalmente na concentração entre 10 a 10.000 litros (FIECHTER, 1984; SHREVE, BRINK, 1974).

A qualidade de uma cepa de microrganismo é determinada pela real capacidade de produção no fermentador. Entretanto, é necessário que o produto não seja de difícil separação e purificação, como acontece com o *Penicillium chrysogenum* que tem seu uso restrito devido produzir pigmentos que encarecem as etapas de purificação.

As etapas de separação e purificação dos produtos de forma geral seguem a seguinte ordem: a) separação de insolúveis por filtração, centrifugação ou decantação; b) separações primárias por extração, absorção, adsorção ou ultrafiltração; c) purificação por extração líquido-líquido, extração das fases aquosas ou cromatografia de afinidade d) isolamento do produto (FIECHTER, 1984).

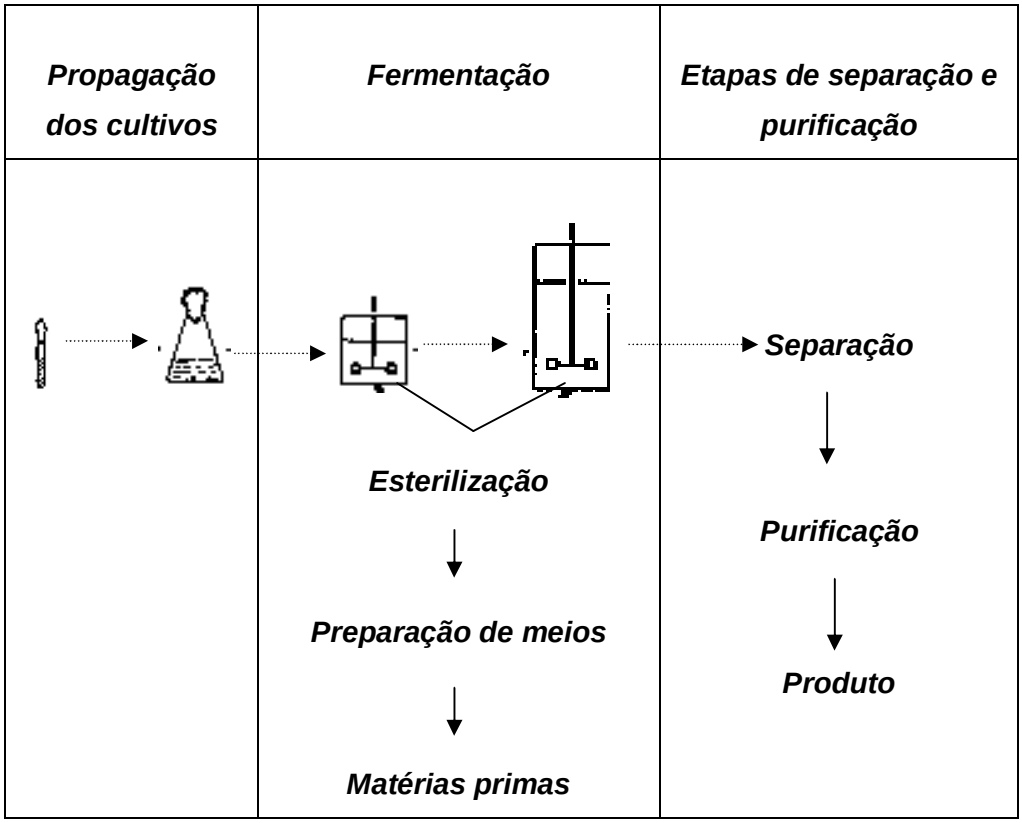


Figura 2. Etapas gerais de um processo de fermentação

Fonte: Adaptado de FIECHTER, 1984.

1.4 Cinética das fermentações

O desenvolvimento dos microrganismos pode ser descrito por 4 fases (fase de adaptação, fase exponencial, fase estacionária e fase de declínio). O crescimento celular durante a fase exponencial está relacionado com a seguinte equação:

$$\ln C_b = \ln c_0 + \mu t$$

Onde, c_o = concentração celular inicial, C_b = concentração celular depois do tempo t (biomassa produzida), $\boldsymbol{\varepsilon}$ (h^{-1}) = taxa de crescimento específico e t = tempo de fermentação. Graficamente, o logaritmo natural da concentração celular em relação ao tempo, produz uma linha reta, o declive desta reta está relacionado com a coeficiente de crescimento específico ($\boldsymbol{\varepsilon}$), este coeficiente alcança o valor máximo na fase logarítmica e diminui devido o esgotamento de nutrientes ou o acúmulo de metabólitos. A redução do coeficiente de crescimento específico está relacionada à

concentração residual do substrato na equação de Monod: (FELLOWS, 2000; LIMA et al., 2001).

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S_r}{(K_s + S_r)}$$

Onde, $\boldsymbol{\varepsilon}_{max}$ (h^{-1}) = coeficiente específico de crescimento máximo, S_r (mg L^{-1}) = concentração residual de substrato e K_s (mg L^{-1}) = consumo constante de substrato. K_s é uma medida de afinidade do microrganismo com um substrato em particular. Uma alta afinidade produz um baixo valor de K_s.

A taxa de produção de metabólitos é determinada segundo a equação:

$$q_p = Y_{p/s}\mu$$

Onde, q_p = coeficiente específico de formação do produto, $Y_{p/s}$ = rendimento do produto em relação à quantidade de substrato consumido e μ = coeficiente de crescimento específico. Desta maneira, observa-se que o coeficiente específico para formação de metabólitos varia com o coeficiente específico de crescimento.

O coeficiente de produção de metabólitos secundários que são produzidos na fase estacionária do crescimento não varia desta forma, podendo permanecer constante ou variando de forma mais complexa (FELLOWS, 2000).

A produtividade de uma cultura é a quantidade de biomassa produzida em uma unidade de tempo (normalmente hora), segundo a equação abaixo:

$$P_b = \frac{(c_{\max} - c_0)}{t_1 - t_2}$$

Onde, P_b (g L^{-1} h^{-1}) = Produtividade, c_{max} = máxima concentração celular durante a fermentação, c_o = concentração celular inicial, t_1 *(h)* = tempo no coeficiente de crescimento máximo específico, t_2 (h) = duração da fermentação quando as células não estão crescendo no coeficiente de crescimento máximo.

Nas culturas em que o crescimento das células é limitado pelo substrato, a produtividade aumenta se o substrato for continuamente adicionado e a biomassa e os produtos são continuamente removidos na mesma taxa. Nestas condições as células permanecem na fase logarítmica de crescimento (FELLOWS, 2000; LIMA et al., 2001). O Processo deixa de ser batelada simples e passa a ser batelada extendida.

A taxa em que o substrato é adicionado é expressa pela equação abaixo:

$$D = \frac{F}{V}$$

Onde, D (h^{-1}) = taxa de diluição, F ($L\ h^{-1}$) = taxa de fluxo do substrato e V (L) = volume do fermentador.

A taxa de diluição máxima que pode ser usada em uma dada cultura é controlado por $\boldsymbol{\varepsilon}_{max}$ e é influenciada pela utilização permanente do substrato e o fator de rendimento.

A quantidade de carbono necessária em condições aeróbia pode ser determinada a partir do coeficiente de rendimento de biomassa (γ_C), como é demonstrado abaixo:

$$\gamma_c = \frac{\textit{Biomassa produzida (g)}}{\textit{Substrato de carbono utilizado (g)}}$$

1.5 Fermentação no Estado Sólido (FES)

Entre 1940 e 1950 a indústria da fermentação se desenvolveu muito rapidamente e o primeiro antibiótico clinicamente útil, a penicilina, era produzida por FES ou por culturas submersas.

De acordo com Hesseltine (1987), fermentações no estado sólido são aquelas que todo substrato ou parte dele é sólido. Durand, Brolse e Blachére (1988) definiram fermentação em estado sólido como processos relacionados à cultura de microrganismo dentro ou sobre uma matriz sólida onde o conteúdo líquido ligado a esta matriz possui um nível de atividade de água que assegure o metabolismo e crescimento das células e que também não exceda à máxima capacidade de ligação

da água com a matriz sólida. Estes tipos de fermentações são mais comuns que as fermentações líquidas, pois elas representam a maior parte das fermentações por microrganismos selvagens. Enquanto alguns gêneros de bactérias e leveduras crescem em meio líquido, um grande número de outros microrganismos cresce agregados no substrato sólido.

As bactérias se desenvolvem em matrizes sólidas no solo, nas raízes, no interior das plantas e nas superfícies das folhas. Embora a maioria das bactérias da natureza cresçam em matrizes sólidas, algumas estão livres e se desenvolvem em meios líquidos como água, leite e sangue.

Fungos filamentosos crescem principalmente em substrato sólido; poucos estão livres na água como aqueles do gênero *Aspergillus* que crescem tipicamente em cereais.

As leveduras crescem e se reproduzem livremente em sucos de frutas contendo carboidratos, mais também podem crescer em substratos sólidos (HESSELTINE,1987).

As fermentações de substrato sólido podem ocorrer de acordo com variações na matriz sólida utilizada e o conteúdo líquido. Desta forma, uma classificação geral pode ser feita, como segue: a) A matriz sólida é um material inerte. Como exemplo, tem-se a solução de sacarose ou melaço (conteúdo líquido) umedecendo sabugo de milho ou bagaço de cana (matriz sólida inerte). Neste caso o substrato não tem que ser necessariamente insolúvel em água (DURAND et al, 1988). b) A matriz sólida é o próprio substrato. O Koji é tipicamente preparado combinando arroz ou trigo cozido com flocos de soja. Estes são misturados depois da inoculação de *Aspergillus oryzae*, sendo ocasionalmente homogeneizados para manter as condições de umidade uniforme e conseqüente produção de um complexo enzimático com atividade diastática (HESSELTINE, 1987; HEMITT et al., 2001). c) O material sólido é disposto em colunas e o meio líquido circula por ele. Este processo é utilizado para transformar o açúcar da cana em etanol (BIANCHI, MORAES, CAPALBO, 2001).

A determinação direta da biomassa em fermentação de substrato sólido se torna difícil devido à dificuldade de separar os microrganismos do substrato. Este fato é particularmente verdadeiro para fermentações envolvendo fungos filamentosos, devido o micélio penetrar e vincular-se no substrato. Portanto, metodologias indiretas têm sido adotadas para determinação desta biomassa.

A medida do consumo de oxigênio ou de produção de CO_2 são métodos para estimar o desenvolvimento do microrganismo no processo fermentativo. Não obstante, em fermentações sem aeração, componentes celulares específicos como: glicosamina, ácidos nucleotídicos e proteínas poderão ser medidas a fim de estimar a biomassa. Porém determinações de concentrações de componentes das células são freqüentemente susceptíveis à interferência por componentes do substrato (TEREBIZNIK, PILOSOF, 1999).

Fatores nutricionais limitam o crescimento de fungos em FES. Esta limitação é muito mais importante devido à taxa de difusão limitada do substrato. Um importante indicador da regulamentação nutricional é a relação carbono/nitrogênio. Uma relação favorável varia entre 10 a 100 ou mais altos em alguns processos. Todavia, a disponibilidade de carbono e nitrogênio pode ser mais importante que a relação entre eles. Na maioria dos sistemas FES o carbono disponível vem de fontes naturais de amido ou celulose, enquanto que para o nitrogênio, as fontes mais comuns são NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3, uréia e extrato de levedura (ZHENG, SHETTY, 1999).

1.6 Fermentação Submersa

Quando cultivados em culturas submersas, os fungos apresentam formas morfológicas diferentes variando de dispersos filamentos miceliais até micélios densamente entrelaçados chamados de ñ*pellets*ò. A forma que é apresentada é determinada não somente pelo material genético da espécie de fungo mais também pelas condições de cultivo. A mudança da morfologia durante o crescimento afeta o consumo de oxigênio em culturas submersas. Neste contexto, a forma do crescimento morfológico pode ter efeito significante na reologia do meio de cultura de fermentação e deste modo a performance no bioretor. O crescimento de filamentos resulta em meios de culturas altamente viscosos. A alta viscosidade tem um impacto negativo nas propriedades de transferência de massa, especialmente na taxa de transferência da massa gás-líquido. De outro modo, o desenvolvimento de *pellets* resulta em meios de culturas com baixa viscosidade se aproximando desta forma dos fluidos Newtonianos (PAPAGIANNI, 2004).

Quantidade maior de energia é necessária para que os filamentos dispersos alcancem uma taxa de transferência de oxigênio adequada, se comparada com os *pellets*. Entretanto, freqüentemente a região central dos *pellets* maiores sofrem

autólises como resultado da falta de nutrientes. Esta autólise pode ter efeito significante no metabolismo e síntese dos produtos celulares. Assim, *pellets* pequenos são mais desejáveis no desenvolvimento de fermentações por fungos (PAPAGIANNI, 2004).

CAPÍTULO 2: UTILIZAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

2.1 Introdução

Os bioprocessos que usam fungos filamentosos como agentes bioquímicos para a produção de metabólitos, utilizam principalmente culturas submersas. Os fungos filamentosos podem crescer na forma de micélios espalhados ou na forma de *pellets* (fig. 3).

Algumas formas intermediárias podem crescer de forma granular, onde o termo ñclumpò pode ser usado para qualquer uma descrição de pequenos micélios agregados soltos no meio de cultivo ou para massas grandes e pesadas de micélios agregados.

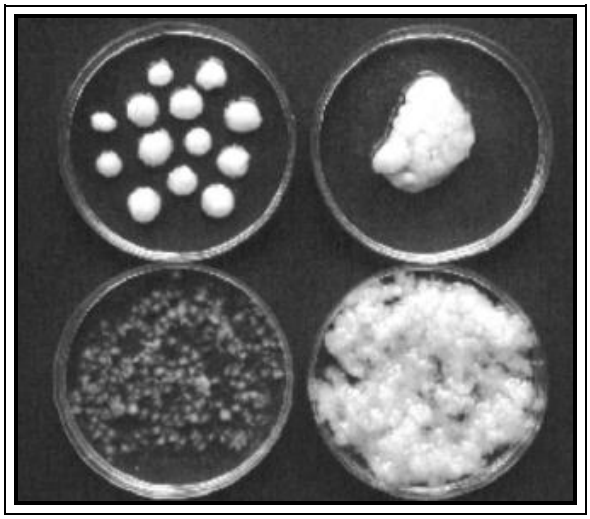


Figura 3. Algumas formas de crescimento de fungos filamentosos.

Fonte: ZNIDARSIC; PAVKO, 2001.

A morfologia de um micélio é determinada pelos mecanismos que regulam a polaridade e o crescimento das hifas e a freqüência que elas ramificam. Cálcio e nucleotídeos cíclicos estão envolvidos nos mecanismos que regulam a distensão e ramificação das hifas (ZNIDARSIC; PAVKO, 2001).

Em condições adequadas, o micélio vegetativo evolui para um micélio reprodutivo e conseqüentemente há formação de esporos. A germinação dos esporos resulta em hifas, cujo início do crescimento é sustentado por mobilização e utilização de um

estoque de componentes no esporo. O desenvolvimento das hifas contribui para as rotas biossintéticas e o metabolismo dos nutrientes do meio (PAPAGIANNI, 2004).

A taxa de crescimento e morfologia das hifas são sensíveis à influência da concentração intracelular e atuação de quelantes de Ca^{2+}, transporte e introdução de tampões no citoplama. O Ca^{2+} citoplasmático livre, está obrigatoriamente presente e envolvido no crescimento ativo. A regulamentação do gradiente de cálcio modula as propriedades do componente actina-base, este componente controla a extensibilidade e a síntese de novas hifas (ZNIDARSIC; PAVKO, 2001; PAPAGIANNI, 2004).

2.2 Produção de ácidos orgânicos

Historicamente, trabalhos com a produção de ácidos orgânicos produzidos por fungos foram iniciados com três espécies escolhidas: *Aspergillus niger, Aspergillus terreus* e *Rhizopus oryzae*, por que eles exibiam habilidades de produzir grandes quantidades de ácidos orgânicos.

Em seus habitais naturais (geralmente solos), estes fungos encontram, freqüentemente, pequenas quantidades de açúcares livres e, por conseguinte, não poderiam evoluir na produção de ácido. Todavia, quando colocados em substrato com teor adequado de carboidratos e condições adequadas de cultivos, estes consomem parte do substrato para a produção de ácidos. De outra forma, pode-se dizer que a acidicidade do meio, também favorece uma vantagem competitiva destes fungos para sua própria sobrevivência. Acidificação inibe o crescimento de competidores, como espécies bacterianas em pH abaixo de 3. A propriedade quelante de alguns ácidos possibilita uma diminuição na solubilidade da maioria dos metais, permitindo o desenvolvimento de fungos com baixas concentrações de metais ou em estado insolúvel (MAGNUSON; LASURE, 2004).

A produção de ácidos orgânicos pode refletir diferentes estratégias para competir com outros microrganismos. Muitas espécies de fungos podem baixar o pH do ambiente oxidando glicose fora da parede celular, convertendo-o para ácido glucônico pela via da enzima glicose oxidase. Outras espécies podem sintetizar o ácido no interior celular e posteriormente serem exportados da célula, podendo ser absorvidos como fonte de carbono (MAGNUSON; LASURE, 2004).

Atualmente, o número de produtos comercialmente produzidos por fungos filamentosos está em ascensão. O quadro 1 apresenta importantes classes de fungos filamentosos e os ácidos produzidos por estes.

Quadro 1. Principais ácidos orgânicos de importância comercial produzido por fungos filamentosos.

Ácido orgânicos	**Microrganismo**
Ácido cítrico	*Aspergillus citricus, A. clavatus, A. niger, A. phoenicis, Penicillum decumbens, P. isariiforme, Trichoderma viride.*
Ácido fumárico	*Rhizopus oryzae, R. stolonifer*
Ácido glucônico	*A. carbonarius, A. niger, A. oryzae, A. wentii, Eupenicillium. javanicum, P. chrysogenum, P. luteum, P. simplicissimum*
Ácido itacônico	*A. itaconicus, A. terreus*
Ácido kójico	*A. candidus, A. flavus, A. oryzae, A. parasiticus, A. tamarii, P. jensenii, R. microsporus, R. oryzae, R. stolonifer*
Ácido D-lático	*R. oryzae*
Ácido L-málico	*A. atroviolaceus, A. citricus, A. flavus, A. niger, A. ochraceus, A. oryzae, A. wentii, R. oryzae*
Ácido eritórbico	*P. griseoroseum*

Fonte: PAPAGINNI, 2004

2.3 Influência dos principais parâmetros de processos na morfologia e produtividade fúngica

2.3.1 Inóculo

Entre os fatores que determinam a morfologia e o curso geral da fermentação; a quantidade, o tipo de esporo e a idade do inóculo, são de fundamental importância. Concentrações altas da suspensão de esporos não garantem o êxito na fermentação, como exemplo, *A. niger* somente forma *pellets* em inóculo com concentração abaixo de 10^8 esporos/mL (PAPAGIANNI, 2004).

A técnica que faz uso de micélios filamentosos como pré-cultura para inóculo, rende *pellets* pequenos com boa distribuição e tamanhos homogêneos. A formação dos *pellets* não é simplesmente determinada pela probabilidade de contato físico entre as hifas. Alguns autores demonstraram que poucos *pellets* são formados em

altas concentrações de esporos e outros observaram que em concentrações altas de esporos haverá formação de grandes *pellets* (PAPAGIANNI, 2004).

Os esporos são usados em um inóculo desenvolvido ou como semeadura em fermentações submersas e sólidas. A quantidade de esporos varia de 10^6 a 10^7 esporos/mL e depende do tipo de fermentação. Tradicionalmente para escala em laboratório, os esporos são produzidos em tubos inclinados, placas de Petri ou em frascos com substrato quimicamente definido. Estes processos em geral são caros e laboriosos e de difícil ajuste para escala industrial (MAGNUSON; LASURE, 2004).

A produção em larga escala de esporos usando suporte natural ou inerte tem sido bastante estudado. Substratos naturais usados como suporte provêem nutrição, considerando que o material inerte somente fornece suporte para produção de esporos. O esporo inoculado exige um período para germinação, enquanto que o inóculo com *pellets* pode exigir um certo grau de rompimento mecânico. A adaptação do microrganismo inclui síntese de enzimas necessárias para utilização do substrato (PAPAGIANNI, 2004; MAGNUSON; LASURE, 2004).

A concentração do inóculo também é importante em culturas imobilizadas. Quando altas concentrações de esporos imobilizado (10^3-10^4 esporos/εL) de *P. chrysogenum* são utilizados, a produção de biomassa é baixa e localizada na periferia. A redução da carga de esporos imobilizados em 50 vezes, resulta no aumento da biomassa em 4 vezes. Foi estabelecido que *pellets* maiores estão associados com atividades específica da glucoamilase e *pellets* menores, associados a atividades específicas da protease (PAPAGIANNI, 2004).

2.3.2 O potencial hidrogeniônico e sua influência no meio de cultura

O pH é um dos fatores que influenciam a formação de *pellets*. Deste modo, a adequação do pH possibilita a obtenção de *pellets* uniformes, com tamanho e composição desejada. Como exemplo, tem-se a produção de ácido fumárico utilizando *Rhizopus oryzae,* que pode variar devido modulações morfológicas induzidas por um valor de pH inicial e traços de metais. Nas condições adequadas de pH e composição do substrato; *pellets* com diâmetro de 1-1,5 mm poderão ser formados, favorecendo uma maior produção deste ácido (ZNIDARSIC; PAVKO, 2001).

Diferentes proporções de fosfatos ácido e básico podem ser usadas para obter valores de pH entre 6,0 a 7,6 aproximadamente, sendo que a capacidade da solução

tampão é limitada pelas quantidades dos seus reagentes ácidos e básicos, e conseqüentemente, pela sua força iônica. Os fungos geralmente podem tolerar até 5g L^{-1} de fosfatos de potássio (KAMPEN, 1997).

O pH do meio afeta os estados iônicos dos componentes e a superfície celular exterior. Alteração no pH afeta o crescimento pela influência na atividade da enzima permease na membrana citoplasmática ou enzimas associadas com a parede celular. O pH afeta a solubilidade da proteína que poderá coagular ou precipitar em seu ponto isoelétrico.

Embora o pH seja um dos fatores críticos, a sua monitoração e controle durante a fermentação no estado sólido normalmente não é controlada. É difícil controlar e monitorar o pH nesta modalidade, devido à ausência de água livre necessária para ativação do eletrodo (ZNIDARSIC; PAVKO, 2001).

Em valores de pH acima de 5,5 a parede da célula da maioria dos microrganismos ficam negativamente carregadas, causando desta forma, uma separação destas células devido à repulsão eletrostática. Isto pode ser suprimido por um acréscimo na força iônica ou unindo células com Ca^{2+}. A adição de cátions geralmente induz à agregação, e a adição de ânions reduz. Os conídios podem crescer em alta variação do pH, tolerando valores de 4 a 9. Entretanto a esporulação máxima acontece em pH neutro (KAMPEN, 1997; ZNIDARSIC; PAVKO, 2001).

Além da influência no crescimento e na morfologia, o pH influencia na síntese de enzimas. A produção de Ŭ-amilase por fungos filamentosos tem sua produção máxima em pH próximo de 6,0 (ZNIDARSIC; PAVKO, 2001).

2.3.3 Composição do meio de cultura

Os conídios requerem água, oxigênio molecular, fonte orgânica de carbono, fonte de nitrogênio e vários outros elementos. Os principais elementos são: oxigênio, carbono, hidrogênio, nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre, magnésio (macronutrientes) e manganês, ferro, zinco, cobre e molibdênio (micronutrientes) (PAPAGIANNI, 2004).

A composição elementar da maioria dos microrganismos é muito similar, isto pode ser utilizado como referência para elaborar um meio de cultivo ótimo . Os valores típicos para C, H, O, N, e S em base seca são 45%, 7%, 33%, 10% e 2,5 %, respectivamente. Alguns microrganismos necessitam de nutrientes específicos como aminoácidos, vitaminas ou nucleotídeos. Os microrganismos que não necessitam de

suplementos, têm freqüentemente velocidade de crescimento maior em meios não complexos. Os fatores de crescimento podem ser adicionados ao meio de cultura na forma de compostos químicos puros. Por exemplo, biotina para obter ácido glutâmico. Praticamente em todas as fermentações industriais, o carbono fornece energia para o crescimento e para a biossíntese.

O crescimento microbiano a partir de substratos com dois átomos de carbono se efetua mediante a uma variedade de rotas oxidativas de acordo com o estado inicial de oxidação/redução do substrato.

A demanda global de oxigênio no metabolismo é influenciada pela concentração de oxigênio dissolvido no meio. A relação entre a quantidade de oxigênio dissolvido e a velocidade de absorção específica de oxigênio segue a equação típica de Michaelis-Menten. Para manter a produção da biomassa ao máximo e favorecer a produção de metabólitos, o nível de oxigênio dissolvido deve estar acima da concentração crítica (fig. 4). De outra forma, para a produção de metabólitos a partir fosfoenolpiruvato e piruvato, é necessário que as concentrações de oxigênio dissolvido sejam inferiores a $C_{crit.}$.

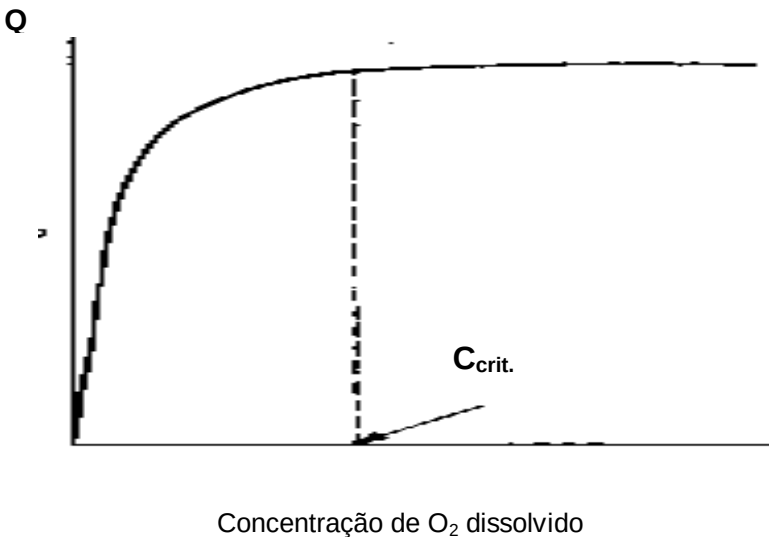


Figura 4. Efeito da concentração de oxigênio sobre a absorção específica de oxigênio (*Q*) de um microrganismo.

Fonte: WARD, 1990

Em concentrações de glicose superiores a 250-300g L^{-1} nas condições anaeróbias, as enzimas oxidantes do ciclo dos ácidos carboxílicos dos sistemas citocromos são reprimidas pelos catabólitos e o rendimento da biomassa é baixo ao converter a maior parte de açúcar em álcool (WARD, 1990).

O nitrogênio pode ser fornecido como amônia, como nitrato ou em combinações orgânicas como aminoácidos e proteínas e desempenha papel fundamental para a produção de metabólitos.

A retirada total de nitrogênio no meio afeta significantemente o crescimento dos fungos e a produção de metabólitos. O micélio tem atividade metabólica baixa e as hifas aparecem mal formadas assim como para a formação de *pellets* (TREVAN et al., 1990).

Em alguns estudos com fungos *Rhizopus chinesis,* a utilização de diferentes fontes de nitrogênio favoreceu uma variação significante na morfologia em termos de comprimento da hifa e o grau de ramificação. Quando sulfato de amônio foi usado como fonte de nitrogênio, os *pellets* formados se tornaram mais compactos com superfície lisa, porém com baixa produtividade de metabólitos (PAPAGIANNI, 2004).

2.3.4 *Influência da temperatura no meio de cultura*

As reações químicas, enzimáticas e o crescimento celular variam em função da temperatura. Dentro de cada classe, a velocidade de crescimento específica aumenta com a temperatura segundo a equação de Arrhenius.

$$\varepsilon = Ae^{ï\, Ea/RT}$$

Onde: A = constante de velocidade de Arrhenius, Ea = energia de ativação (Kcal mol^{-1}), R = constante universal dos gases e T = temperatura absoluta (WARD, 1990).

Embora a temperatura seja um parâmetro de fácil controle, variações na temperatura produzem simultâneas mudanças em outras variáveis. Um aumento na temperatura de incubação dentro da capacidade fisiológica incrementa a taxa de crescimento. Valores de Q_{10} (fator pelo qual há um aumento da taxa de mortalidade com acréscimo de 10 ºC na temperatura) de 2 a 30 são mais citados na literatura.

A tensão de oxigênio varia inversamente com a temperatura. Desta forma, o aumento de temperatura poderá influenciar na provisão de oxigênio, tornando o ambiente inadequado para a formação dos *pellets*.

A taxa de evaporação média também é afetada pela temperatura, especialmente em culturas contínuas. Se a evaporação não é acompanhada ou compensada, erros podem acontecer, particularmente em taxas de diluições baixas.

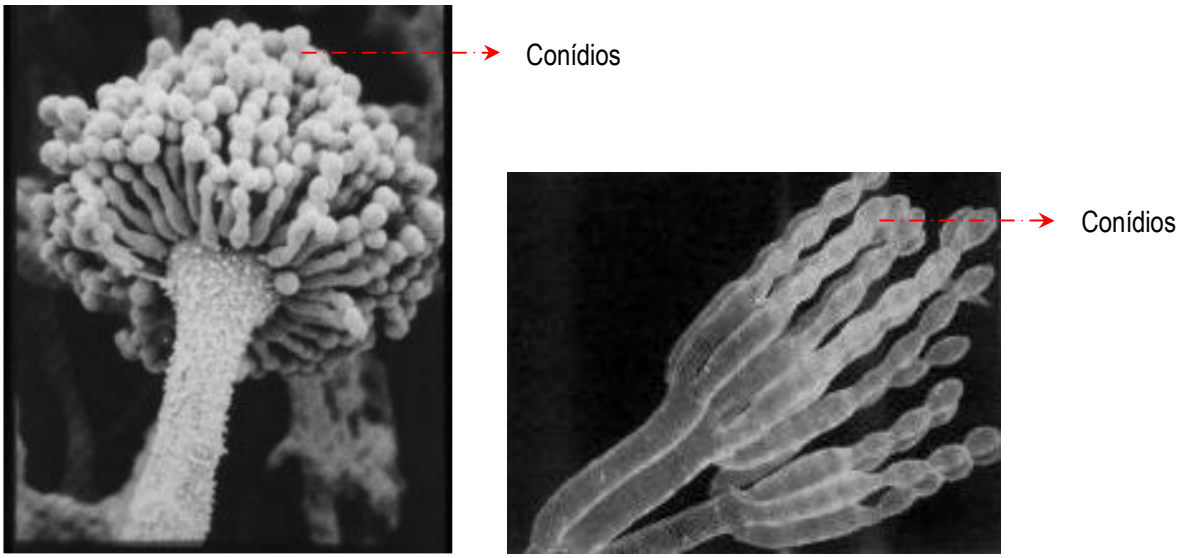
Os fatores que determinam a temperatura mínima de crescimento parecem ser: a inativação do sistema de transporte de soluto e a formação de gradiente de prótons que resultam da membrana protoplasmática (ZNIDARSIC, PAVKO, 2001; PAPAGIANNI, 2004).

CAPÍTULO 3: GÊNERO *Aspergillus*

3.1 Introdução

O gênero *Aspergillus* pertence à classe dos Deuteromicetos, onde os fungos do gênero *aspergillus* são capazes de utilizar vários tipos de substratos devido a um grande número de enzimas usadas para o seu desenvolvimento.

Aspergillus são caracterizados pela produção assexual de esporos (conídios) em uma estrutura especializada chamada de Aspergillum (fig. 5).



a **b**

Figura 5. Fotomicrografia eletrônica de conidiósforos de *Aspergillus*. Fig 5a: Cabeça semiesférica. Fig. 5b: Cadeias de esporos em colunas.
Fonte: GARTENBAU, 1997

Os fungos do gênero *Aspergillus*, causam deteriorações em muitos produtos alimentícios. Os produtos metabólicos da invasão fúngica podem ser muito tóxicos, tanto para o homem como para os animais. Todavia, algumas espécies de *Aspergillus* são de interesse industrial ou são utilizadas na fermentação de alimentos de certas regiões (GARTENBAU, 1997).

A cor é a principal característica macroscópica para a identificação dos grupos de *Aspergillus.* Possuem distintos tons de verde, amarelo, vermelho, cinza e negro. As cabeças conidiais apresentam quatro formas básicas: esférica, radial, colunar e claviforme.

As características macro e micromorfológicas, tais como; a cor dos conídios, a forma da extremidade, a superfície e a dimensão dos conidióforos, a forma e textura dos esporos possibilitam sua classificação em grupos (GARTENBAU, 1997; CARRILLO, 2004).

3.2 Aspectos sobre as condições de cultivo de *Aspergillus*

A maioria das espécies crescem no meio Czapek, porém os *aspergillus* osmofílicos se desenvolvem em Czapek com 20% de sacarose. A temperatura normalmente é 25 ºC, porém para alguns membros *fumigati* é recomendada a temperatura de 37 ºC. As formações dos conídios variam com a idade e em uma ou duas semanas os esporos estão totalmente maduros.

Para o isolamento, são usados meios seletivos com inibidores da proliferação bacteriana e do desenvolvimento demasiado de alguns fungos competidores.

O volume do meio colocado na placa de Petri tem influência sobre o diâmetro da colônia e outras características macroscópicas. Por exemplo: em Czapek, uma espessura maior fará que *Aspergillus flavus* produza mais metabólitos, enquanto que o *A. terreus* produz menos esporos. Alguns dos motivos para tal comportamento são uma maior disponibilidade de nutrientes e uma variação na atividade de água e pH.

Com a finalidade de comprovar que os meios utilizados são adequados para observar a velocidade de crescimento e as características macro e microscópicas, é conveniente semear cepas obtidas de uma cultura de referência. A degeneração das cepas é um problema de muitos fungos, os quais sofrem mudanças morfológicas como colônias algodanosas, redução da esporulação e modificações nos conidióforos, associado a perda da capacidade de produzir metabólitos (CARRILLO, 2004).

3.3 Tipos de ambientes propícios para o desenvolvimento de fungos do gênero *Aspergillus*

Aspergillus spp. tem capacidade de crescer em diferentes temperaturas em substratos com diferentes teores de umidade. Durante o armazenamento de grãos, a proliferação de *Aspergillus* e outros fungos aumentam de forma exponencial quando a umidade relativa se eleva para 70%. A faixa de temperatura para o crescimento vai desde 0-5 ºC para *A. glaucus* até 50-55 ºC para *A. fumigatus,* estando o ótimo

entre 30-33 ºC para a maioria das espécies. A figura 6 mostra o crescimento de *A. flavus* em função da temperatura.

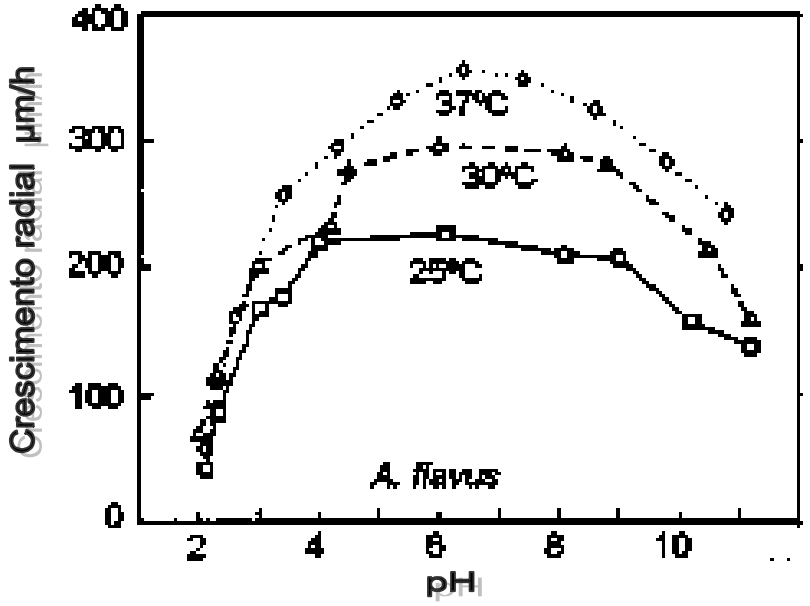


Figura 6. Efeito do pH e temperatura sobre a velocidade de crescimento radial de Aspergillus flavus.
Fonte: CARRILLO, 2004

Na tabela 1 são indicados os valores da temperatura e da atividade de água para o crescimento de algumas espécies de *Aspergillus*.

Tabela 1. Temperatura e atividade de água requerida para o desenvolvimento de algumas espécies de *Aspergillus.*

Espécies	Temperatura ºC		Atividade de água	
	Faixa	Ótimo	Mínimo	Ótimo
A. flavus A. parasictus	6-45	35-37	078	0,95
A. candidus	3-44	25-32	0,75	0,90-0,98
A. fumigatus	10-55	40-42	0,85	0,98-0,99
A. restrictus	9-40	30	0,71	0,96

Fonte: CARRILLO, 2004

CAPÍTULO 4: FUNGOS PRODUTORES DE ÁCIDO KÓJICO

O ácido kójico foi divulgado pela primeira vez em 1907 por Saito durante seus estudos da fermentação de arroz com *Aspergillus oryzae*. Desde então, vários trabalhos foram realizados para a descoberta de novos microrganismos e de substratos que possam ser utilizados na produção desta substância. Além de ser produzido por microrganismos em seu ambiente natural (quadro 2) o ácido kójico pode ser produzido por vários organismos em laboratório a partir de fontes de carboidratos em fermentação aeróbia (BURDOCK; SONI; CABIN, 2001).

Quadro 2. Substratos naturais e os microrganismos produtores de ácido kójico.

Fonte natural	Microrganismo
Farelo de trigo	*Aspergillus flavus*
Arroz	*Aspergillus spp.*
Soja triturada	*A. flavus*
Alimentação animal	*A. flavus, A.oryzae, A. fumigatus*
Alimentos fermentados (Japão)	*A. flavus, A.oryzae, A. tamarii*
Milho	*A. flavus*
Queijo Dinamarquês azul	*A. fumigatus*
Polpa de nozes	*Penicillium spp.*
Amido de sagu	*A. flavus*

Fonte: Adaptado de BURDOCK, 2001

Kharchenko (1999), demonstrou a habilidade de 98 linhagens de *Aspergillus flavus* em produzir ácido kójico, sendo 14 com alta atividade de síntese onde a máxima formação de ácido aconteceu na fase de crescimento exponencial. Fontes de carboidratos como sacarose, glicose, maltose e galactose forneceram o maior rendimento.

O ácido kójico é produzido industrialmente por fermentação aeróbica de *Aspergillus spp.* A possibilidade de diferentes modos de operações fermentativas, assim como os parâmetros de controle como pH, temperatura, tensão de oxigênio e composição do meio tem sido estudado extensivamente.

A aeração é necessária para iniciar a fermentação e potencializar a produção das enzimas que são muito importantes no catabolismo da glicose durante a fase de

crescimento. Todavia, o excesso de suplemento de oxigênio durante a fermentação do ácido kójico não favorece a produção máxima deste metabólito (ARIFF, 1996).

A produção de ácidos por *A. flavus* pode ser divida em duas fases: a fase de crescimento e a fase de produção. O desenvolvimento do micélio, e uma ótima habilidade de síntese do ácido kójico podem ser alcançada de duas maneiras: limitação do oxigênio (< 17% de saturação) ou alto nível da demanda de oxigênio total (DOT) (>70% saturação). Em fermentação descontínua; máxima concentração de ácido kójico, melhor produtividade e rendimento foram obtida com DOT controlado a 80% durante a fase de crescimento e 30% durante a fase de produção (ARIFF, 1996).

Os efeitos da utilização da xilose por *A. flavus* como fonte de carbono para produção de ácido kójico, foram descritos inicialmente por Smits e Barham (1936). A xilose foi quase exclusivamente transformada em ácido kójico onde um mínimo de 150 gramas de xilose por litro foi necessário para um bom rendimento da fermentação.

Rosfarizan e Ariff (2000), estudaram o efeito de diferentes tipos de fontes de carbono e nitrogênio na produção de ácido kójico por *Aspergillus flavus* em cultivo com frascos agitados. A melhor produção de ácido kójico foi conseguida com os monossacarídeos glicose e xilose, respectivamente. Houve um incremento na produção de ácido kójico com o aumento da concentração de glicose até 70g L^{-1}. Uma redução na produção foi observada em concentrações acima de 100g L^{-1}, embora a concentração de ácido correspondente à variação de 70-200g L^{-1} não tenha sido significantemente diferente. Entretanto, ocorreu uma drástica redução na produção de ácido kójico em concentração a 250g L^{-1}, indicando que as reações enzimáticas são inibidas em altas concentrações de glicose.

O aumento proporcional da taxa de reação com a concentração do substrato (glicose), sugere que a produção do ácido kójico por sistema de células em suspensão segue o modelo cinético enzimático de Michaelis-Menten (ROSFARIZAN e ARIFF, 2000).

A produção de ácido kójico por *Aspergillus parasiticus* UNBF A12 (isolada do ar no Distrito Federal, Brasil) foi estudada por LIN et al. (1976) com objetivo de alcançar alta concentração de ácido kójico, suficiente para precipitar como cristais em baixas temperaturas e utilizando também, nas mesmas condições, *Aspergillus flavus* NRRL 3251 e *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. Nas condições descritas, não houve

produção de cristais pelas duas espécies de NRRL. Todavia, a espécie UNBF A12 produziu 15,2 mg de cristais por mL de cultura filtrada em 7 dias.

A melhoria das espécies de *Aspergillus* por ñrandom screeningò após mutação pode ser aplicada para aumentar o rendimento e produtividade do ácido kójico (FUTAMURA, 2001). Wan et al. (2004) induziram a mutação de *Aspergillus oryzae* usando N-metil-N-nitrosoguanina (NTG) e radiação UV em protoplasta previamente preparado, chegando a alcançar 41 g de ácido kójico por litro em frascos agitados. A figura 7 mostra a diferença na produção de ácido kójico de uma cultura selvagem e uma cultura modificada.

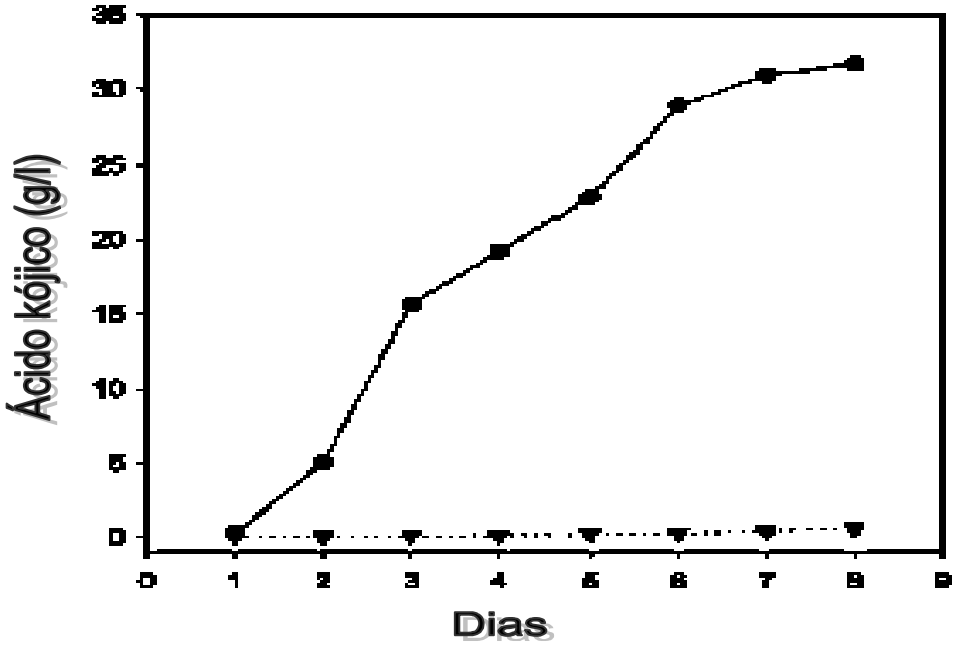


Figura 7. Produção de 5-hidroxi-2-hidroximetil-ɔ-pirona (Ɛ) cultura selvagem e (ŏ) cultura modificada.
Fonte: WAN,2004

CAPÍTULO 5: ÁCIDO KÓJICO

5.1 Aspectos estruturais e bioquímicos

O ácido kójico (fig.8). Possui fórmula empírica $C_6H_6O_4$ e peso molecular de 142,11 g/mol. Apresenta-se como cristais em forma de agulhas. O ponto de fusão é 153-154 ºC e tem pK_a no valor de 8,03. É solúvel em água, etanol e acetona.

Após sua produção por fermentação, o ácido kójico pode ser recuperado por vários métodos: (1) precipitação com sal de cobre, (2) extração com acetato de etila, (3) extração contínua com éter, (4) redução do volume por evaporação e cristalização a 0 ºC, (5) extração com clorofórmio ou (6) absorção em carbono ativado seguido de eluição com acetato de butila saturado com amônia (BURDOCK et al., 2001).

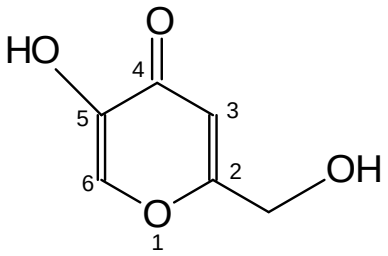


Figura 8. Estrutura molecular do ácido kójico

As polifenol oxidases - PFOs (EC 1.14.18.1) são enzimas consideradas economicamente importantes devido causar escurecimento em produtos agrícolas. Embora o escurecimento seja inócuo para o consumidor, rende produtos com baixa aceitação. PFO catalisa a formação da melanina a partir da tirosina via 3,4-dihidroxifenilanina (DOPA) e dopaquinona (HAMMER, 1993).

Chen et al. (1991) demonstraram o efeito inibitório do ácido kójico em batatas, maçãs e crustáceos na atuação das PFOs. Na diminuição do escurecimento destes produtos, o ácido kójico limitou a melanólise impedindo a ação do CO_2 requerido no escurecimento enzimático. Métodos espectrométricos e cromatográficos demonstraram que o ácido kójico foi capaz de reduzir *o*-quinonas para difenóis. Segundo Klein e Olsen (1970), o ácido kójico também inibiu a oxidação de D-aminoácidos, xantina, L-fenilalanina e L-metionina em fígado de cobaias *in vitro*.

5.2 Estudos toxicológicos e atividades antibióticas

O potencial cancerígeno do ácido kójico foi investigado em camundongos por Fujimoto et al. (1998), onde três grupos de machos e fêmeas foram alimentados com dieta contendo 0; 1,5 e 3% de ácido kójico por 20 meses. Exceto na tiróide, não existiram significantes diferenças entre os grupos referentes ao tamanho dos órgãos. Os resultados indicaram que altas doses de ácido kójico introduzidas na alimentação induziram adenomas na tiróide em camundongos machos e fêmeas, presumidamente pelo mecanismo envolvendo decréscimo do hormônio L-triiodotironina sódica (T_3) e acréscimo do hormônio estimulante da tiróide (TSH ï *thyroid stimulating hormone*).

O desenvolvimento de adenomas em roedores pela contínua alimentação de altas doses de ácido kójico levanta uma importante questão. Entretanto, estudos realizados na população do Japão não evidencia esta relação, onde historicamente é consumido constantemente ácido kójico em produtos fermentados como soyu, miso e saquê.

O ácido kójico também é utilizado como componente de cosméticos atuando como agente clareador da pele. Estudos foram realizados com 107 pacientes com melanodermia ou melasma, onde estes aplicaram um creme contendo 2,5% de ácido kójico duas vezes ao dia, durante um período de 9 meses, duas pessoas desenvolveram dermatite facial presumidamente devido a sensibilidade ao creme. Todavia, nenhuma sensibilidade foi detectada quando foi usado creme com concentração a 1% de ácido kójico com resultados satisfatórios na atuação de clareamento da pele (BURDOCK et al., 2001).

Marwaha e Sohi (1994) estudaram a inibição de vários gêneros de bactérias pelo ácido kójico, incluindo *Aerobacter, Bacillus, Clostridium, Diplococcus, Escherichia, Micrococcus, Pseudomonas, Salmonella, Staphylococcus e Vibrio.* Esta substância ofereceu uma promissora base para o desenvolvimento de derivados antibióticos potentes, principalmente através da formação de complexos de ácido kójico com alguns metais, onde apresentou grande efeito sobre microrganismos patogênicos como *E. coli, Salmonella typhy, Pseudomonas seruginosa, e Staphylococcus aureus*.

CAPÍTULO 6: TRANSFORMAÇÕES DO ÁCIDO KÓJICO

Brien, Patterson e Meadow (1962) utilizaram ácido kójico em reações com aminoácidos. Estas reações não foram simples de serem executadas, como as reações com outros tipos de aminas, devido cada aminoácido ter características distintas, conseqüência de sua estrutura química.

Em geral, é mais fácil substituir somente um átomo de hidrogênio do grupo amino por um substituinte do ácido kójico. Isto é verdade nas reações do ácido kójico com DL-valina, DL-leucina, DL-isoleucina e DL-prolina. Todavia, no caso da glicina e taurina, derivados do ácido kójico foram obtidos pela substituição em ambos átomos de hidrogênio do grupo amino. Glicina e sarcosina são exemplos de aminoácidos que reagem melhor com ácido kójico e formam produtos que são facilmente isolados.

Para melhorar a atividade de inibição da tirosinase e a estabilidade durante a estocagem de produtos elaborados com ácido kójico, Kim et al. (2004) produziram ligação peptídica-ácido kojico (fig. 9) a partir da reação de ácido kójico com aminoácidos; para isso, foi necessário primeiro converter o ácido em éster. Segundo os autores, isto proporcionou a proteção seletiva da Ŭ-hidroxi cetona, conhecidamente essencial para a inibição da tirosinase. Os produtos obtidos apresentaram um acréscimo de 50-100 vezes na atividade inibitória da tirosinase quando comparado com ácido kójico e um aumento de 14 dias em sua estabilidade de estocagem nas mesmas condições estabelecidas.

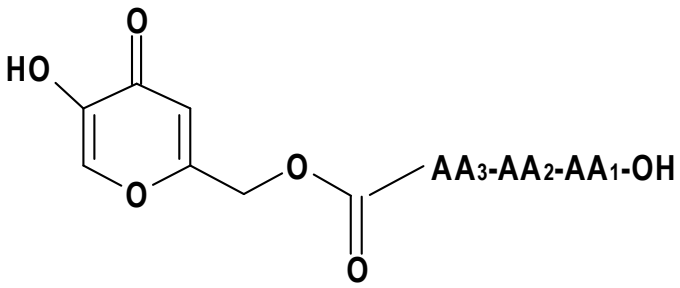


Figura 9. Ligação peptídica em derivados do ácido kójico e as possíveis combinações de aminoácidos.

Com o objetivo de tornar o ácido kójico mais lipossolúvel, e assim melhorar sua utilização em alimentos e medicamentos com base oleosa, Kobayashi et al. (2001) realizaram uma reação de acilação do ácido kójico, catalisada pela lipase, com ácido láurico obtendo o lauriol de ácido kójico (fig. 10).

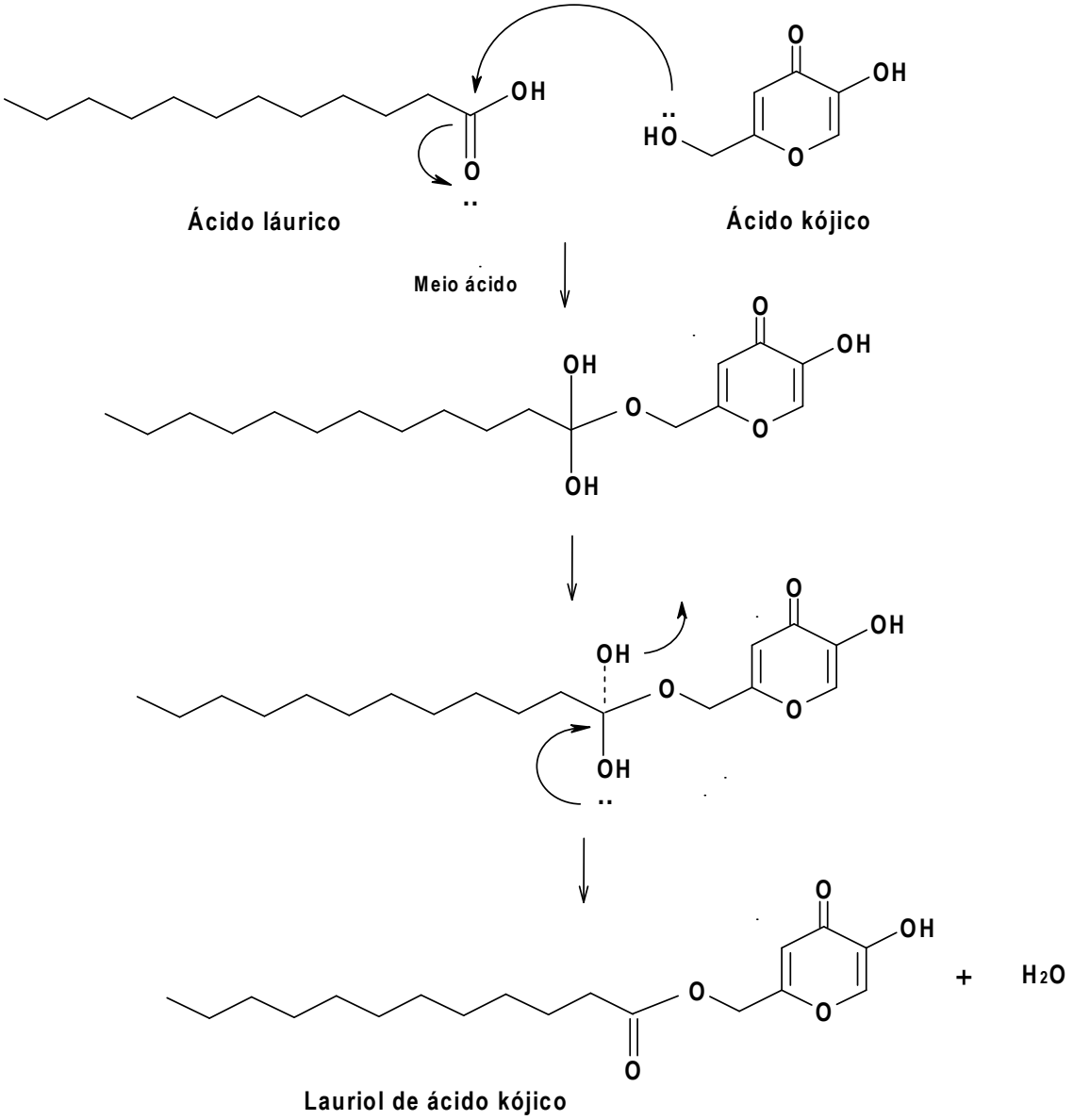


Figura 10. Mecanismo da reação de formação do lauriol de ácido kójico.

A solubilidade do lauriol de ácido kójico foi 190 vezes maior quando comparado com ácido kójico a 20 ºC em hexano. Em óleo de soja a 20 ºC o acréscimo foi de 10 vezes.

Kamino, Kuramochi e Kobayashi (2003) demonstraram o grande potencial para síntese de derivados de ftalatos e estaminas a partir do ácido kójico pela introdução de vários substituintes no C-5. Segundo os autores, as ɔ-pironas substituidas apresentam atividade em sistemas biológicos pela mediação na formação de precursores de tricetonas, dentre estas, algumas com atividade anti-*Candida albicans*.

Ácido kójico sofre acetilação a 100 ºC com anidrido acético na presença de acetato de sódio para formar diacetato. Pode ser obtida a mesma substância pela acetilação de acordo com o procedimento de Woods que utiliza anidrido acético e cloreto de zinco a 135-140 ºC. Um éster monocapróico pode ser obtido a partir do ácido kójico se for tratado com ácido capróico e cloreto de zinco a 130 ºC (HURD; SINS, 1949).

CAPÍTULO 7: BIOSSÍNTESE DO ÁCIDO KÓJICO

7.1 Monossacarídeos como fonte de carboidratos

Embora a estrutura linear dos monossacarídeos seja bastante conhecida, ela está presente em apenas 1% na solução aquosa. Estudos de ressonância magnética nuclear (RMN) e modelagens, demonstraram que a estrutura tipo ñcadeiraò é termodinamicamente mais favorável para anéis com mais de 6 membros, comparado com a estrutura alifática do mesmo tamanho.

Os anômeros α e β dos monossacarídeos possuem rotações óticas diferentes. Cristais de α-D-glicopiranose em solução aquosa possuem rotação específica $[\alpha]$ = +112 º. A rotação específica de cristais de β-D-glicopiranose em solução aquosa é $[\alpha]$ = +19º.

Quando cristais de α ou β-D-glicose são dissolvidos em água, a rotação específica sofre variações até chegar no valor de $[\alpha]$=+52º, solução em equilíbrio que deve possuir 64% na forma β e 36% na forma α. Este fenômeno é chamado de *mutarotação.* A relação estrutural entre L- e D-isômeros, α- e β-anômeros, anéis de piranose e furanose, aldose e cetose açúcares, não são facilmente controladas (COULTATE, 1999).

Pesquisas têm avançado na síntese de inúmeros derivados de monossacarídeos, porém, somente poucos ocorrem naturalmente ou têm aplicação significativa em alimentos. Como exemplo, tem-se a oxidação dos grupos carbonila dos açúcares que leva a formação de uma série de açúcares ácidos. A enzima glicose oxidase catalisa a formação de D-glicanolactona que é hidrolisada para a formação de ácido D-glucônico, esta enzima é altamente específica para o β-anômero da D-glicose.

A redução de grupos carbonila para uma hidroxila, favorece a formação de açúcares álcoois como xilitol e sorbitol. Estas substâncias embora com propriedade adoçante não são absorvidas pelo intestino (BEMILLER, 1999).

Os mais importantes derivados de monossacarídeos são aqueles que o ñhemiacetalò ou grupo redutor, forma um ñacetalò ou ligação glicosídica com um grupo hidroxila ou outra substância orgânica. A figura 11 mostra um exemplo desta reação.

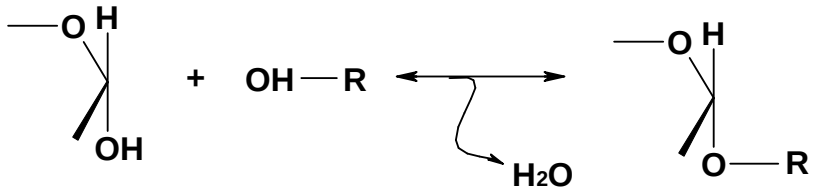


Figura 11. Formação da ligação glicosídica.

As ligações glicosídicas são estáveis sob condições normais, porém são rapidamente hidrolisadas em condições ácidas ou na presença de hidrolases. A formação da ligação glicosídica fixa a estrutura hemiacetal em outra α ou β configuração, e deste modo, evita a mutarotação. Embora muitas substâncias possuam este tipo de ligação, o termo é geralmente usado para classe de substâncias que ocorrem naturalmente nas plantas (COULTATE, 1999; FENNEMA, 2000).

7.2 Reações de biossíntese

O ácido kójico é biosintetizado por conversão direta da glicose por diversas reações enzimáticas. Enzimas como glicose-6-fosfato desidrogenase, hexoquinase e gluconato desidrogenase, estão envolvidas na biossíntese do ácido kójico. Estas enzimas são muito estáveis em micélios suspensos em solução de glicose com tampão fosfato a pH 6,4 (ARIFF, 1996).

May et al. (1931) observaram uma intensa coloração vermelha com adição de solução de cloreto férrico em culturas líquidas de *A.flavus* utilizando xilose e dextrose na composição do meio de cultura, possivelmente devido à formação do complexo do ferro com o ácido kójico. Corbellini e Grerorini (1930) estudaram a produção do ácido kójico utilizando várias fontes de carbono por diferentes espécies de *A. flavus* e concluíram que as pironas eram sintetizadas a partir de sustâncias que continham uma cadeia de três átomos de carbono resultado da fragmentação de moléculas maiores como pentoses e hexoses. Segundo Rosfarizan e Ariff (2000), estudos do mecanismo para a produção de ácido kójico a partir de várias fontes de carbono revelaram que este metabólito secundário é sintetizado via intermediários fosforilados.

A rota biosintética do ácido kójico ainda não está totalmente esclarecida, entretanto, sabe-se que enzimas produzidas pelo fungo filamentoso são responsáveis pela biotransformação da glicose em ácido kójico.

Com o objetivo de elucidar o mecanismo de biossíntese do AK; Arnstein e Bentley (1953) obtiveram esta substância em cultivo de *A. flavus* e *A. oryzae* a partir de glicose com marcação isotópica (1-^{14}C ou 3:4-$^{14}C_2$) presente no meio de cultura. O ácido kójico foi isolado por método que possibilitou determinar a incorporação de ^{14}C em cada átomo de carbono. A conversão da glicose para ácido kójico utilizando duas espécies de *Aspergillus* demonstrou que entre 70 e 90% do total radioativo isolado no AK foram provenientes dos isótopos de carbono marcados a partir da glicose, indicando que a principal via de formação do AK é a direta conversão da glicose sem a quebra da cadeia de carbono.

Baseados nestes estudos, Arnstein e Bentley (1953) estabeleceram que a conversão de AK a partir da glicose deve envolver no mínimo duas etapas; oxidação de um grupo hidroxila secundário, e a perda de uma molécula de água com introdução de duas duplas ligações:

Bajpai, Agrawala e Vishwanathan (1981) realizam análises preliminares do perfil enzimático em micélios de *A. flavus* em estado natural, que indicou a presença de glicose oxidase, glicose desidrogenase, gluconato desidrogenase, hexoquinase, glicose-6-fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase, evidenciando, de maneira geral que estas enzimas participam da biossíntese do ácido kójico. Estudos cromatográficos evidenciaram a formação de ácido glucônico-ŭ-lactona, glicose 6-fosfato e ácido 6-fosfoglucônico.

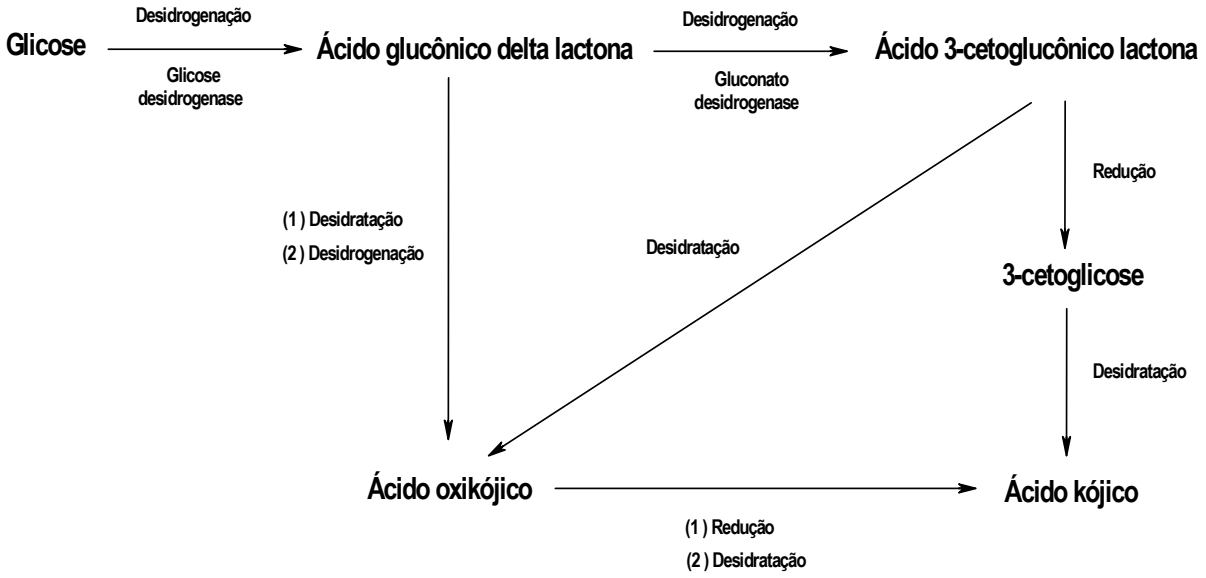
Durante a fase de crescimento micelial em meio YES, as atividades específicas da hexoquinase, glicose desidrogenase e gluconato desidrogenase alcançaram valor máximo após o décimo dia de cultivo, como mostra a tabela 2.

Tabela 2. Atividade enzimática no micélio de *A. flavus* em meio YES. As atividades são expressas como unidades (mg de proteína). Uma unidade representa a conversão de 1 μmol de substrato por minuto.

	Período de incubação (dias)			
Enzimas	**3**	**7**	**10**	**15**
Glicose oxidase	0,050	0,040	0,030	0,020
Glicose desidrogenase	0,050	0,285	0,610	0,270
Gluconato desidrogenase	0,090	0,370	0,990	0,440
Hexoquinase	9,890	18,04	19,83	9,90
Glicose-6-fosfato desidrogenase	0,250	0,240	0,160	0,090
6-fosfogluconato desidrogenase	0,240	0,200	0,130	0,086

Fonte: Adaptado de Bajpai, Agrawala e Vishwanathan (1981)

As atividades apresentadas pelas diferentes enzimas foram comparadas com a produção do ácido kójico. Desta forma, foi verificado que a produção máxima de ácido kójico ocorreu no décimo dia, coincidindo com máxima atividade da glicose desidrogenase, gluconato desidrogenase e hexoquinase. Baseados nos resultados experimentais obtidos, Bajpai, Agrawala e Vishwanathan (1981), propuseram três alternativas para a rota biossintética do ácido kójico (figura 12).



,

Figura 12. Rotas biossintéticas propostas por Bajpai, Agrawala e Vishwanathan (1981) para o ácido kójico em cultivo de *A. flavus.*

Embora as evidências da participação da glicose desidrogenase e gluconato desidrogenase sejam bastante fortes, isto não exclui a participação de intermediários fosforilados na biossíntese do ácido kójico. Se tais intermediários forem envolvidos, as rotas biossintéticas propostas ainda são possíveis, desde que o ácido glucônico delta lactona e intermediários posteriores sejam substituídos por ácido 6-fosfoglucônico e outros derivados fosforilados (BAJPAI, AGRAWALA e VISHWANATHAN, 1981) como foi descrito por Rosfarizan e Ariff (2000).

O microrganismo pode utilizar diversas fontes de sacarídeos para a conversão de glicose para AK. A fonte de carbono pode ser usada tanto para produção do metabólito quanto para o desenvolvimento da biomassa. Dependendo do objetivo do experimento, é possível direcionar a rota bioquímica do microrganismo para maior obtenção de um ou outro através da regulação dos nutrientes, principalmente a regulação carbono/nitrogênio (SANTOS, 2005). Rosfarian e Ariff (2000), estudaram os efeitos de diferentes fontes de carbono no crescimento de *Aspergillus flavus* e produção do AK. A tabela 3 mostra a produção do metabólito no mesmo período de tempo para todos os sete diferentes sacarídeos.

Tabela 3. Efeito de diferentes fontes de carboidratos na produtividade do ácido kójico.

Fonte de carbono	***Concentração celular (g L^{-1})***	***Produção AK (g de ácido kójico g cel^{-1})***	***Produtividade (g L^{-1} h^{-1})***
Glicose	*11,59*	*39,90*	*0,083*
Xilose	*12,60*	*35,10*	*0,070*
Sacarose	*14,83*	*22,98*	*0,046*
Frutose	*6,34*	*4,10*	*0,008*
Lactose	*4,40*	*0,0*	*0,000*
Maltose	*12,20*	*11,13*	*0,022*
Amido	*15,02*	*23,14*	*0,046*

Fonte: Adaptado de ROSFARIAN e ARIFF (2000).

As maiores concentrações celulares foram obtidas quando glicose, xilose, sacarose, maltose e amido foram usados como fonte de carbono. As maiores produções de AK foram alcançadas com os monossacarídeos glicose e xilose.

Embora as maiores concentrações celulares tenham sido alcançadas quando foram utilizados amido e sacarose como fonte de carbono, a produtividade foi menor quando comparado com glicose e xilose. De forma geral, a glicose apresentou maior produção e produtividade na obtenção do metabólito de interesse. Isto evidencia que o ácido kójico é formado diretamente da glicose pela atuação de várias enzimas. A frutose apresentou baixa conversão em AK se comparada com outros monossacarídeos; isto pode ocorrer em função da dificuldade estereoquímica e a quantidade de energia utilizada para que a frutose (furanose) possa ser diretamente convertida em piranose (ROSFARIZAN; ARIFF, 2000; ROSFARIZAN et. al., 2002). A figura 13 apresenta as etapas gerais na biossíntese do ácido kójico propostas neste trabalho a partir da sacarose, com base em observações descritas por Arnstein e Bentley (1953). Apesar destas etapas da biossíntese do ácido kójico apresentarem menos rigor e diversidade que as propostas por Bajpai, Agrawala e Vishwanathan (1981), estas não entram em desacordo com a que foi proposta pelos referidos autores.

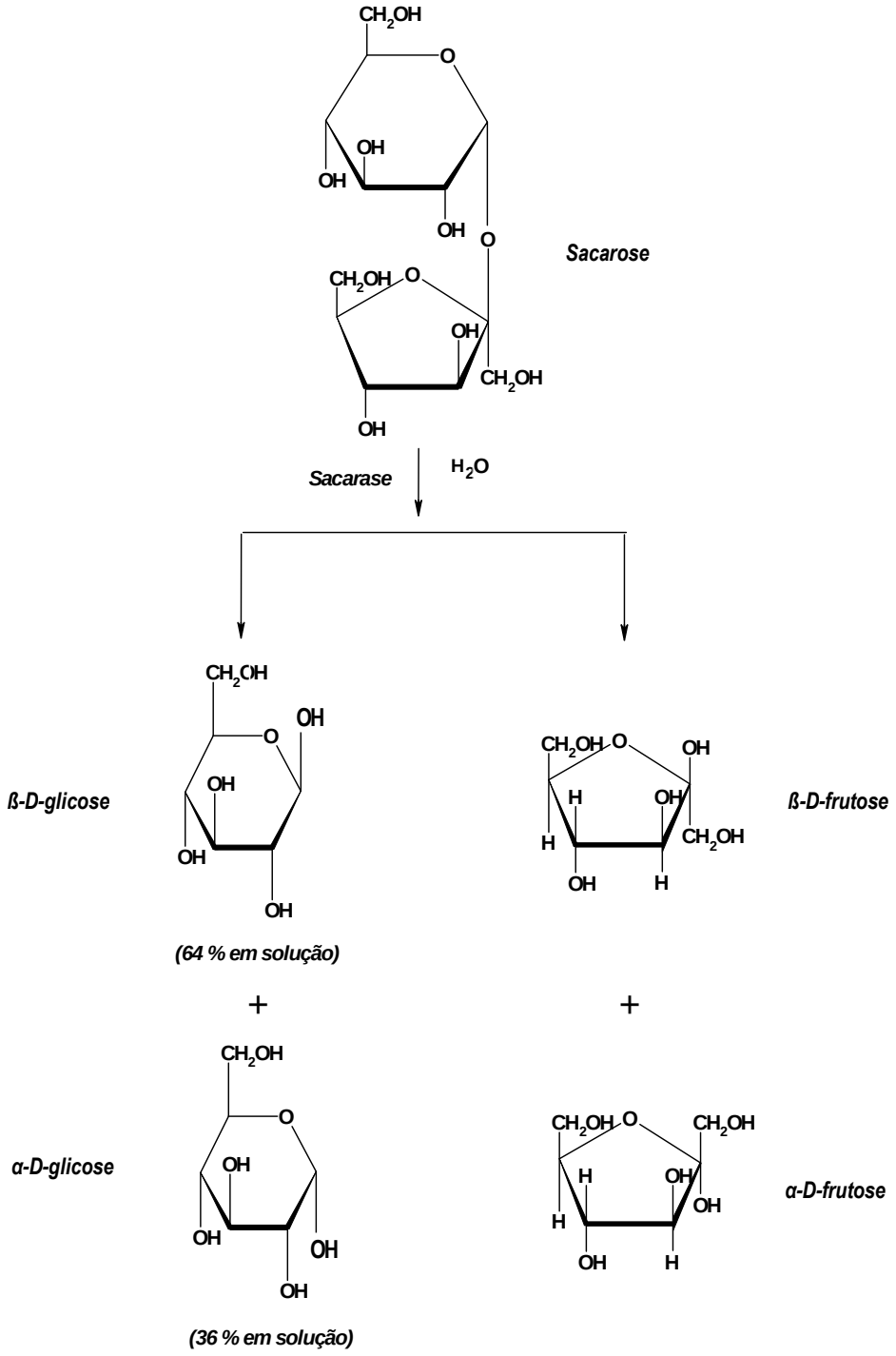


Figura 13a. Hidrólise enzimática da sacarose.

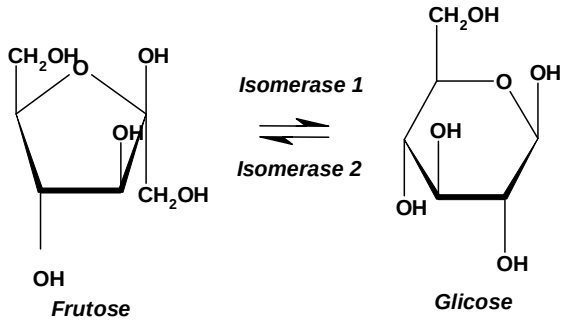


Figura 13b. Conversão da frutose em glicose

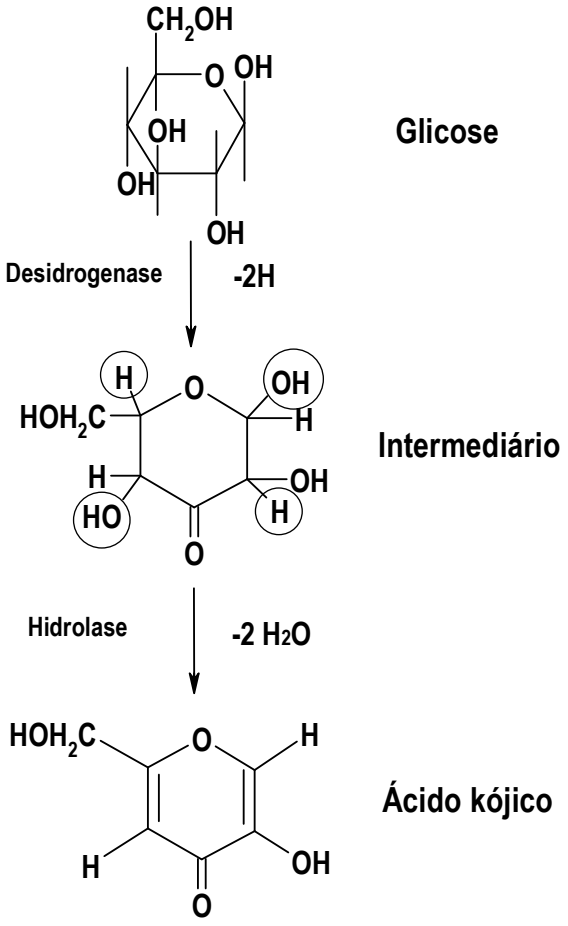


Figura 13c. Etapas da biossíntese do ácido kójico.

MATERIAS E MÉTODOS

2. MATERIAS E MÉTODOS

2.1 Obtenção do microrganismo e preparação dos meios de culturas

A linhagem do microrganismo, *Aspergillus flavus* IOC 3974 liofilizada, empregada neste trabalho foi obtida do laboratório de coleção de fungos do Instituto Osvaldo Cruz/Fiocruz-RJ. Os esporos do microrganismo liofilizado foram suspensos em solução estéril de NaCl 1% para ser usado como inóculo inicial. Os meios de culturas utilizados foram: Czapek Dox ágar (RAPER; FENNELL, 1965) , batata dextrose ágar e meio Sabouraud ágar (KELLER et al.,2003). A composição dos meios de culturas é mostrada no quadro 3.

A preparação dos meios foi realizada de acordo como descrito a seguir:

Meio Czapek Dox:

Os sais previamente pesados (quadro 3), foram transferidos analiticamente e dissolvidos em água destilada em um balão volumétrico e em seguida verificado o pH da solução utilizando pHmetro previamente calibrado. O pH da solução foi ajustado para 5,5 com NaOH 1 mol L^{-1} e adicionada a quantidade de sacarose definida. Na preparação do Czapek Dox ágar, adicionou-se ágar-ágar para solidificação do meio. Os meios de culturas foram esterilizados em autoclave a 121ºC (1Kgfcm^{-2}) durante 15 minutos.

O meio de cultura sólido ou líquido foi distribuído em condições assépticas em cabine de fluxo laminar, onde o meio líquido foi transferido para frascos menores de acordo com a estratégia utilizada no processo de fermentação. O meio sólido foi distribuído em placas de Petri com volume de 20 mL. Esperou-se a solidificação para uso posterior.

Meio Batata dextrose ágar:

O extrato foi obtido a partir de 200g da batata descascada cortadas em cubos e levada à ebulição por trinta minutos com 500 mL de água. Em seguida, foram adicionados 20g de ágar com mais 500 mL de água destilada no extrato filtrado. O pH da preparação foi ajustado com NaOH 1mol L^{-1} utilizando pHmetro previamente calibrado e cujo valor final foi 5,5. O meio BDA foi esterilizado em autoclave a 121ºC (1Kgfcm^{-2}) durante 15 minutos.

Quadro 3. Composição química dos meios de culturas para cultivo de *Aspergillus flavus* e transformações microbiológicas.

Componentes / Marca	Czapek Dox ágar (g)	Sabouraud ágar (g)	Batata dextrose ágar (g)
Sacarose / UNIÃO (Triturado e refinado)	30, 60, 120, 240 e 360	30, 60, 120, 240 e 360	30, 60, 120, 240 e 360
$NaNO_3$ / VETEC (P.A)	2	-	-
KH_2PO_4 / SIGMA (P.A)	1	-	-
$MgSO_4.7H_2O$ / VETEC (P.A)	1	-	-
$(NH_4)_2SO_4$ / VETEC (P.A)	0,01	-	-
$FeSO_4.7H_2O$ / SIGMA (P.A)	0,20	-	-
Peptona / VETEC (P.A)	-	10	-
Extrato de batata KELLER et al., 2003	-	-	4
Agar / VETEC (P.A)	20	20	15
Água deionizada q.s.p	1000 mL	1000 mL	1000 mL

Meio Sabouraud ágar:

A peptona foi diluída em água deionizada e a solução teve seu pH ajustado para 5,5 com NaOH 1 mol l^- utilizando pHmetro previamente calibrado. Em seguida foi adicionada a quantidade de sacarose definida e homogeneizada até dissolução completa. Adicionou-se ágar-ágar para solidificação do meio. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 121ºC (1Kgfcm^{-2}) durante 15 minutos.

2.2 Cultivo do *Aspergillus flavus* para obtenção de conídios

Alíquotas de 500 μL de uma suspensão inicial de esporos de *Aspergillus flavus* (± 10^8 conídios/ml) foram transferidas para placas de Petri contendo 20 mL de meio Czapek Dox ágar com uma concentração de sacarose de 30g L^{-1}. Em seguida as placas foram incubadas a 28 ºC durante 10 dias. No final desse período, 20 mL de uma solução salina (NaCl 1%) foram adicionados sobre as placas para retirada dos conídios e obtenção da suspensão (fig 14). Esta suspensão foi utilizada para a produção de biomassa, e em seguida para a formação de *pellets*. As placas foram preparadas em triplicatas. A manutenção dos esporos foi realizada em tubos de

ensaio (tamanho 15x150 mm), contendo aproximadamente 5 mL de meio Czapek Dox agar à 4º C.

Figura 14. Suspensão de *A. flavus*

2.3 Cultivo de *A. flavus* para a produção de *pellets*

2.3.1 Procedimento 1 (P_1)

Alíquotas de 1 mL da suspensão dos esporos, foram adicionados em 4 fracos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido Czapek (pH 5,5) com concentrações de 6%, 12%, 24% e 36% (m/v) de sacarose devidamente esterilizada a 121 ºC / 15 min . Os frascos foram colocados em incubadora com agitação fixada em 120 rpm e temperatura mantida em 28 ºC. Após 72 horas o cultivo foi interrompido.

O conteúdo de cada frasco foi submetido à filtração em bomba de vácuo *Marconi* modelo 057, utilizando-se funil de Büchner, papel de filtro quantitativo e frasco de Kitasato com capacidade para 1 litro (fig. 15). O material filtrado foi submetido ao congelamento e as respectivas biomassas foram submetidas à biometria para seleção e usos posteriores. Este processo visa a reutilização do microrganismo como agente de conversão da glicose em ácido kójico.

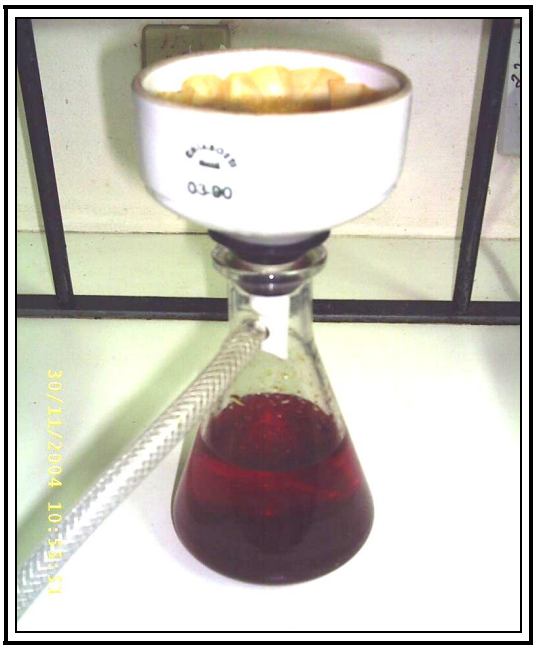


Figura 15. Filtração a vácuo do meio após obtenção da biomassa.O ácido kójico está presente na fase líquida.

2.3.2 Procedimento 2 (P_2)

Com objetivo de aumentar a produção do ácido kójico e verificar o comportamento do microrganismo utilizando frascos maiores, e conseqüentemente, volumes maiores de meio de cultura, alíquotas de 5 mL da suspensão dos esporos, foram adicionadas em 04 fracos de Erlenmeyer de 1000 mL contendo 500 mL de meio líquido Czapek-Dox (pH 5,5) em concentração de 6% (m/v) de sacarose devidamente esterilizada a 121 ºC / 15 min . Os frascos foram colocados em incubadora com agitação fixada em 120 rpm e temperatura mantida em 28 ºC. Após 72 horas o cultivo foi interrompido.

O conteúdo de cada frasco foi filtrado em peneira de polipropileno devidamente esterilizada com diâmetro médio da tela de 1,0 mm. A biomassa foi lavada três vezes com água deionizada estéril, em seguida, deixou-se escorrer o excesso de água (fig. 16). O material retido foi Transferido para placa de Petri estéril com auxílio de pinça também estéril. Uma parte deste material foi utilizada para a preparação dos inóculos e a outra parte, foi utilizada para verificar o teor de umidade.

Figura 16. Filtração do meio de cultura após 72 horas de cultivo de *A. flavus.*

2.4 Padronização do inóculo para produção do ácido kójico na presença de diferentes concentrações de sacarose

O inóculo utilizado para produção do metabólito foi padronizado utilizando-se uma quantidade fixa de massa na forma de *pellets* de 0,5g da biomassa obtida após filtração à vácuo, transferiu-se para frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura Czapek-Dox contendo 30, 60, 120, 240, 360 g de sacarose por litro. A filtração foi realizada em tempo padronizado e fixado de 20 segundos.

2.5 Scale up do processo (ScUP)

O inóculo para produção do ácido kójico, em volumes maiores de meio de cultura, foi padronizado utilizando-se uma quantidade fixa de 5,0g da biomassa obtida após filtração simples e adicionadas em frascos de Erlenmeyer de 1000 mL com 500 mL de meio de cultura Czapek-Dox, contendo 60g de sacarose por litro de meio. As filtrações foram realizadas em tempo padronizado e fixado em 2 minutos. A mudança de escala permitiu o aumento do volume de 4 vezes em relação ao recipiente e 5 vezes em relação ao volume ocupado.

2.6 Efeito da concentração da fonte de carbono sobre a produção do ácido kójico

Foram realizados estudos da produção do metabólito e consumo do substrato no meio de cultura. Uma bateria de 15 frascos de Erlenmeyer de 250 mL (3 frascos de cada concentração) contendo 100 mL de meio Czapek com 3%, 6%, 12%, 24%, 36% (m/v) de sacarose foi inoculada com 0,5g de biomassa, obtida a partir do cultivo do microrganismo em meio líquido. Os frascos foram mantidos a 120 rpm e 28 ºC durante 16 dias (figura 17). Alíquotas de 500 μL do meio isento de células, foram retiradas em intervalos de 24 horas para quantificar o produto formado e o substrato consumido.

Figura 17. Cultivo de fungo filamentoso em diferentes concentrações de sacarose. Observa-se a formação do metabólito pelo início da mudança de coloração.

2.7 Efeito da relação carbono/nitrogênio sobre a produção do metabólito

Foi avaliada o efeito da regulação por nitrogênio sobre a produção do metabólito através da modificação quantitativa das fontes de nitrogênio presentes no meio de cultura. Foram utilizados na primeira etapa do experimento, 04 frascos de Erlenmeyer de 1000 mL contendo 500 mL de meio líquido Czapek-Dox mantidos em incubadora com agitação fixada em 120 rpm a 28 ºC, apresentando as seguintes

relações C/N: 50, 100, 150 e 200. O experimento foi realizado com uma repetição. Alíquotas de 1 mL foram retiradas a cada 24 horas durante 35 dias e submetidas a análise. A Filtração da bioassa foi estabelecida de acordo com P_2, e a quantidade desta biomassa segundo ScUP.

2.8 Obtenção e Isolamento do ácido kójico a partir do meio de cultivo

A fase líquida obtida após 35 dias de cultivo foi submetida à liofilização para obtenção do material bruto concentrado. Foram transferidos aproximadamente 500 mL deste material, de forma equivalente, para 5 frascos de 250 mL, que seguiu para o congelamento total utilizando nitrogênio líquido. A secagem por liofilização foi realizada em equipamento *RIFICOR, modelo LM-8*.

A extração do 5-hidroxi-2-hidrometil-ɔ-pirona a partir do material bruto concentrado, foi realizada com acetato de etila (*VETEC*) e metanol (*Sinthy*) na proporção 1:1. Foram feitas 10 extrações consecutivas em tubos de ensaios utilizando-se 1,0 g do material liofilizado e 20 mL da solução de solventes para cada extração. Cada tubo foi agitado vigorosamente durante 30 segundos, e em seguida, deixados em repouso para facilitar a precipitação do material insolúvel. A fase líquida foi retirada cuidadosamente com auxílio de pipeta Pasteur e disposta em frasco devidamente lavado e seco. O sobrenadante retirado após a extração, foi submetido à filtração, com auxílio de vácuo, utilizando-se membranas *MILLIPORE 0,22 µm.*

2.9 Cristalização do 5-hidroxi-2-hidrometil-ɔ-pirona

A fase líquida proveniente da filtração foi concentrada em evaporador rotativo (*HEIDOLPH*) a uma temperatura de 50 ºC durante um tempo médio de 40 minutos. O líquido remanescente concentrado foi transferido para placa de Petri (10 X 20 cm) e mantido em sala refrigerada à 25 ºC durante 24 horas para a evaporação do solvente e cristalização do metabólito.

2.10 Procedimentos para identificação do 5-hidroxi-2-hidrometil-ɔ-pirona

2.10.1 Espectroscopia de Infravermelho (IV)

As análises de infravermelho (FTIR) da amostra e do padrão foram feitas em Espectrofotômetro *SHIMADZU, modelo IR-470* com objetivo de comparar as bandas características do padrão com a do metabólito obtido após a operação de

cristalização. Foram obtidos espectros de transmissão a partir de pastilhas de KBr na proporção de 1:400 (Amostra / KBr) e 1:600 (padrão / KBr).

2.10.2 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono 13.

A amostra purificada (30 mg) e o padrão (30 mg), foram dissolvidos em dimetil sulfóxido (DMSO) e submetidos às análises de RMN ^{1}H e RMN ^{13}C em equipamento *VARIAN / MERCURY* operando a 300 MHz.

2.10.3 Espectrofotometria UV/VIS

Foi realizada análise de varredura da amostra isolada por cristalização e do padrão em espectrofotômetro *GBC,* modelo *911A* , entre os comprimentos de onda de 200 ï 800nm para se determinar o $ə_{máx}$ da substância e em seguida, utilizar este valor para a construção das curvas de quantificação do metabólito.

Foi preparada uma solução com água desionizada contendo ácido kójico (*Sigma*) padrão na concentração de 10 μg/mL. A solução foi submetida à análise de varredura entre os comprimentos de onda de 200 ï 800nm. O mesmo procedimento foi utilizado para a amostra utilizando-se uma solução (50 µg/mL) do concentrado obtido

2.11 Procedimentos para a identificação e quantificação do ácido kójico

A quantificação do 5-hidroxi-2-hidrometil-ɔ-pirona no meio de cultura filtrado foi determinada por espectrofotometria UV/Vis. A análise de varredura, construção da curva de quantificação e a quantificação do metabólito foram realizadas em espectrofotômetro *GBC*, modelo *911A*. Para a construção da curva e quantificação dos açúcares foi utilizado espectrofotômetro *Quimis*, modelo Q798DP.

2.11.1 Construção da curva de quantificação do ácido kójico

A curva de quantificação foi construída pelas absorbâncias de diferentes concentrações de 5-hidroxi-2-hidrometil-ɔ-pirona, deste modo, foram preparadas soluções nas concentrações de 100, 200, 400, 600, 800, 1000 e 1200 μg/mL do padrão. As absorbâncias foram determinadas em triplicatas no comprimento de 269 nm. A curva de quantificação foi obtida utilizando-se o método de regressão linear, onde foram calculados o coeficiente de correlação e a equação da reta.

2.11.2 Determinação da absorvância no meio fermentado

Alíquotas de 50 μL das amostras foram diluídas em água deionizada em um volume final de 50 mL, estas foram retiradas em intervalos de 24 horas e analisadas quantitativamente através de espectrofotometria UV/Vis. A leitura das absorbâncias foi realizada a λ=269 nm imediatamente após a preparação das amostras.

2.11.3 Quantificação dos açúcares redutores totais

A dosagem dos acúcares com poder redutor foi realizada com base na redução do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS), em solução alcalina, resultando no ácido 3-amino-5-nitrossalicílico de cor vermelha-escura, onde ocorre a oxidação do grupo carbonila do açúcar, transformando-se em carboxílico. O comprimento de onda utilizado para a construção da curva de quantificação e a dosagem do substrato do meio de cultura foi de 540 nm. O reagente foi preparado com 5g do DNS, 100 mL de solução de hidróxido de sódio 2N e 150g de sal de la Rochelle completado com água destilada para um volume de 500 mL (MILLER, 1959).

Os procedimentos utilizados para obter a curva de quantificação foram repetidos nas soluções diluídas. Sendo que, foram retiradas alíquotas de 250 μL do meio de cultura fermentado e completada com água destilada para um volume de 50 mL. As absorbâncias obtidas situaram-se entre as absorbâncias das soluções utilizadas para traçar a curva de quantificação.

Paralelamente, foi verificada a possibilidade de reação do DNS com o ácido kójico, utilizando-se os mesmos procedimentos estabelecidos para determinação de açúcares redutores totais.

2.11.4 Construção da curva de quantificação dos açúcares redutores totais

Soluções aquosas de glicose foram preparadas em concentrações de 100, 200, 300, 400, 500, 600 e 1000 μg/mL. O padrão da linha base utilizado foi feito com 0,5 mL de água desionizada e 0,5 mL do reagente DNS que obteve o mesmo tratamento das soluções preparadas (MILLER, 1959).

As absorbâncias foram determinadas no comprimento de 540 nm em espectrofotômetro visível *Quimis,* modelo Q798DP. A curva de quantificação foi obtida utilizando-se o método de regressão linear, onde foram calculados o coeficiente de correlação e a equação da reta.

2.11.5 Determinação do pH do meio de cultura

A determinação do pH foi realizada em equipamento *Quimis* modelo Q400A com eletrodo combinado de vidro, temperatura de 28 ºC. Foi utilizado o recurso de compensação automática pH/temperatura, disponível pelo aparelho. A medida inicial foi realizada antes da inoculação, e o pH foi observado durante o percurso da fermentação. Volumes de 5 mL do meio fermentado foram dispensados em frascos de vidros com capacidade de 10 mL.

2.12 Determinação dos parâmetros cinéticos

O conhecimento dos parâmetros cinéticos é de fundamental importância para otimização do processo de obtenção do ácido kójico. Desta forma, dois experimentos foram realizados: utilizando-se meio sólido e meio líquido.

2.12.1 Cinética de crescimento de Aspergillus flavus em meio sólido

Foram realizados testes do perfil de crescimento microbiano pelo método biométrico dos eixos ortogonais (fig. 18). Onde inicialmente, alíquotas de 50 μL da suspensão de conídios foram adicionados sobre um disco de celulose de 5mm de diâmetro, centralizado na placa de Petri contendo os meios de culturas sólidos: BDA, Saboraud ou Czapek, com diferentes concentrações de sacarose: 3%, 6%, 12%, 24% e 36% (m/v) e mantidos a 28 ºC durante 10 dias. Os meios em conjunto com as concentrações de sacarose que apresentaram melhores perfis de crescimento do microrganismo até o décimo dia, foram utilizados como meio básico para a produção de esporos, os quais foram utilizados no preparo da suspensão.

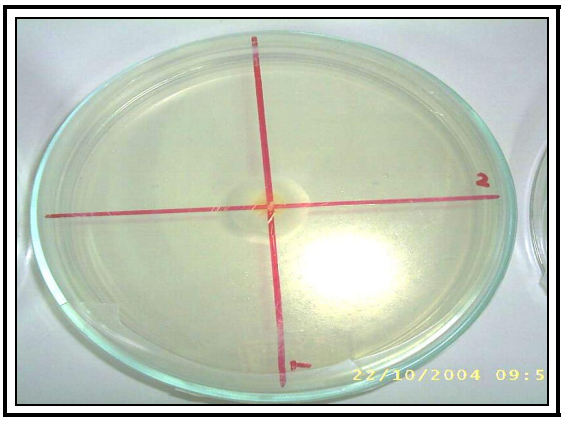


Figura 18. Placas de Petri com quadrantes estabelecidos para o estudo da cinética de crescimento do fungo filamentoso.

2.12.2 Cinética de crescimento de Aspergillus flavus em meio líquido

Para o estabelecimento dos parâmetros cinéticos da biomassa, foi realizada amostragem por sacrifício, onde 16 frascos de Erlenmeyer de 250 mL foram utilizados. Cada frasco continha 100 mL de meio líquido Czapek Dox com 6% (m/v) de sacarose. Foi utilizada 0,5g de biomassa como inóculo inicial. Os frascos de Erlenmeyer foram mantidos em incubadora com agitação fixada em 120 rpm a 28 ºC. Retirou-se diariamente um frasco da incubadora,e o material contido foi submetido à filtração à vácuo por 2 minutos. A fase líquida foi utilizada para quantificar o metabólito de interesse (produto) e os açúcares redutores totais (substrato). A fase sólida (biomassa) foi levada para estufa a 65ºC por 24 horas para determinação da biomassa seca.

2.12.3 Cinética de produção do metabólito

Alíquotas de 1 mL foram retiradas a cada 24 horas e analisadas quantitativamente através de espectrofotometria UV/Vis. Este procedimento teve como objetivo acompanhar o consumo do substrato e a formação do metabólito de interesse e conseqüentemente identificar o dia da máxima produção deste metabólito. Paralelo a isto foi realizado o estudo da cinética de crescimento da biomassa, onde pesagens consecutivas da biomassa produzida foram realizadas com o objetivo de verificar sua relação com o consumo de substrato e a produção do metabólito. A dosagem de açucares redutores foi realizado pelo método do DNS, segundo Miller (1959).

2.13 Avaliação do potencial antioxidante do ácido kójico

O potencial antioxidante do 5-hidroxi-2-hidroximetil-ɔ-pirona foi realizada segundo método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)$_{\text{FLUORESCEÍNA}}$ descrito por Silva et al. (2006), utilizando espectrofotômetro BIO-TEK Instruments, modelo FLX-800. Uma solução inicial contendo 40 mg L^{-1} do metabólito foi utilizada. O resultado foi comparado com valores da literatura.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

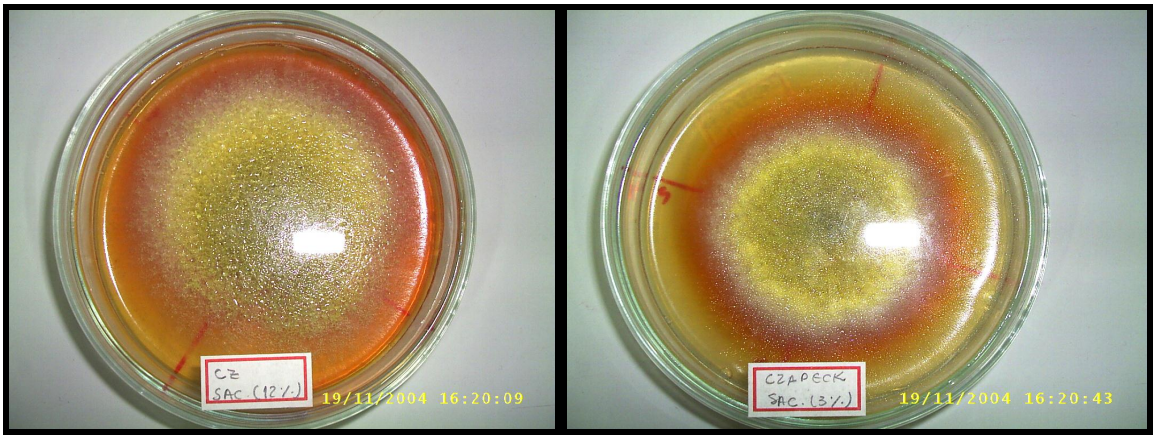
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Perfil do crescimento micelial de *A. flavus* em meio sólido

O método biométrico dos eixos ortogonais possibilitou avaliar a velocidade de crescimento nos meios de culturas: Czapek, batata dextrose ágar (BDA) e Sabouroud em diferentes concentrações de sacarose: 3, 6, 12, 24 e 36% (fig 19.1). Foi observado que as culturas do fungo filamentoso nos meios Czapek, Sabouroud e BDA na concentraçâo de 12% de sacarose apresentaram melhores perfil de crescimento (fig. 19.2).

As concentrações acima de 12% de sacarose produziram uma maior pressão osmótica no meio de cultura o que poderia ter influenciado significativamente no perfil de crescimento em todos os meios. Acredita-se que a menor adaptação do fungo filamentoso no meio BDA pode ter acontecido devido a ausência de sais minerais, principalmente fosfatos, importantes para rota glicolítica e o Ciclo de Krebs.

A concentração de 3% apresentou menor velocidade de crescimento micelial, possivelmente devido à privação da fonte de carbono, necessária na fase de crescimento exponencial.

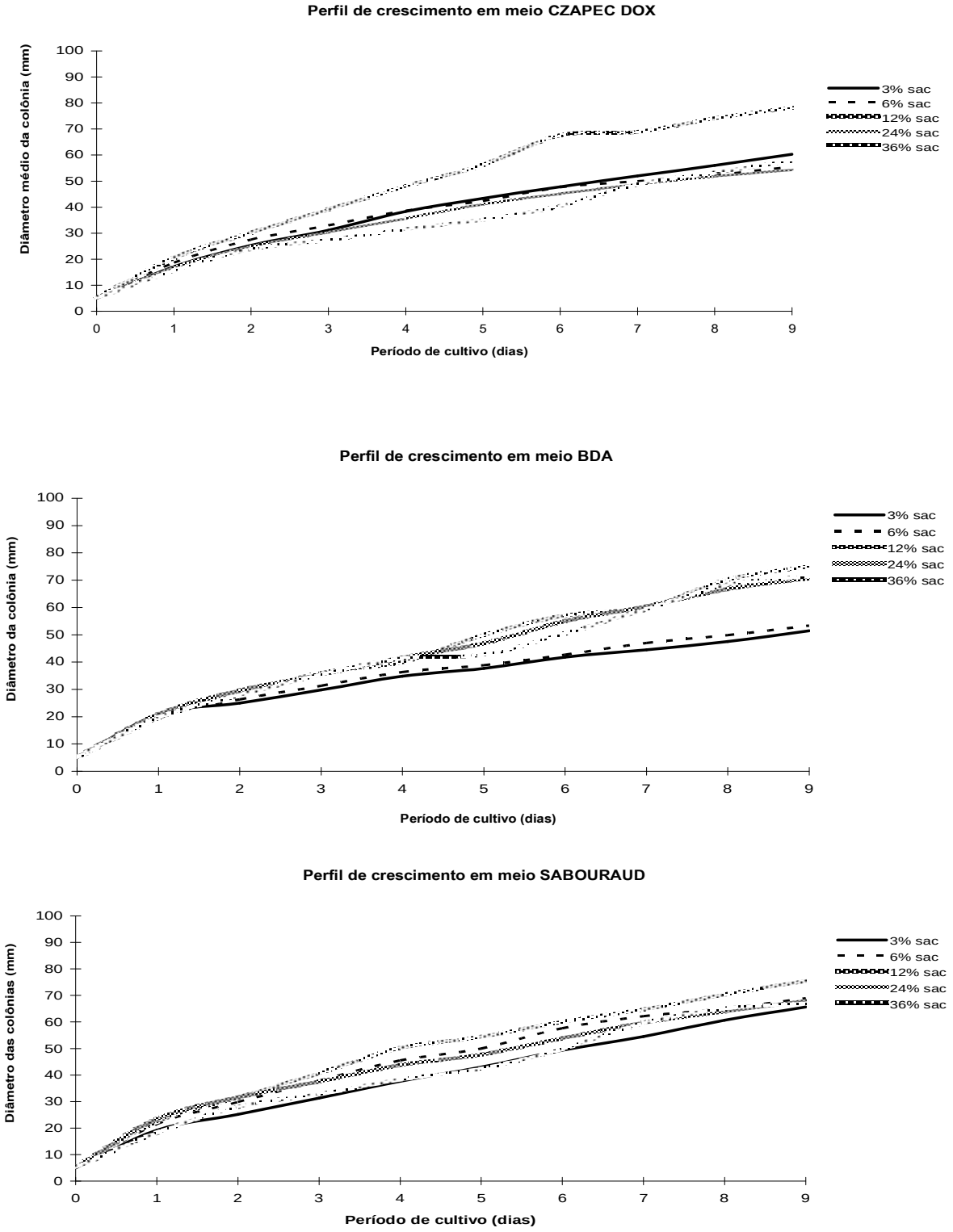


(a) ***(b)***

Figura 19.1. Perfis de crescimento, em diferentes concentrações de sacarose. Figura a. Meio czapek Dox ágar com 12% (m/v) sacarose. Figura b. Meio Czapek Dox ágar com 3% de sacarose (m/v) em um período de 9 dias.

3.2 Obtenção de conídios e padronização dos inóculos

O cultivo de *Aspergillus flavus* em meio nutritivo adequado permitiu o desenvolvimento micelial e o surgimento de uma quantidade de esporos (conídios) após 9 dias de cultivo.



Figuras 19.2 Curvas de progressão de crescimento do fungo *Aspergillus flavus* em diferentes concentrações de sacarose e meio de cultura.

Tabela 4. Parâmetros cinéticos do perfil de crescimento de *Aspergillus flavus* em meio de cultura sólido com 12% de sacarose. a) Meio Czapek, b) Meio BDA, c) Meio Sabouraud. Onde, D: diâmetro médio da colônia (mm), CV: coeficiente de variação (%), V: velocidade média de crescimento da colônia (mm/h) e µ: coeficiente de crescimento específico (= 1/D . dD/dt).

a) Czapek

Tempo (h)	D (mm)	CV(%)	V (mm/h)	µ (h^{-1})
0	5	0	0	0
24	21	8,02	**0,65**	**0,0315**
48	30	3,88	0,52	0,0134
72	39	5,46	0,47	0,0096
96	48	7,45	0,45	0,0077
120	56	3,27	0,43	0,0061
144	68	2,25	0,43	0,0070
168	69	7,43	0,38	0,0008
192	74	9,32	0,36	0,0029
216	78	9,63	0,34	0,0022

b) BDA

Tempo (h)	D (mm)	CV (%)	V (mm/h)	µ (h^{-1})
0	5	0	0	0
24	20	5,38	**0,63**	**0,0313**
48	29	7,61	0,50	0,0129
72	36	2,48	0,43	0,0081
96	40	5,55	0,36	0,0042
120	50	2,53	0,38	0,0083
144	57	4,57	0,36	0,0051
168	60	5,55	0,33	0,0021
192	70	7,01	0,34	0,0060
216	75	6,37	0,32	0,0028

c) SABOURAUD

Tempo (h)	D (mm)	CV (%)	V (mm/h)	µ (h^{-1})
0	5	0	0	0
24	23	4,66	**0,75**	**0,0326**
48	32	7,71	0,56	0,0117
72	41	2,01	0,50	0,0091
96	50	5,97	0,47	0,0075
120	54	7,78	0,41	0,0031
144	60	10,38	0,38	0,0042
168	65	11,48	0,36	0,0032
192	70	13,24	0,34	0,0030
216	76	14,43	0,33	0,0033

Os maiores valores das velocidades de crescimento (tabela 4) foram alcançadas em meio Sabouraud com 12% de sacarose nas primeiras 24 horas, e a partir deste período houve um decréscimo gradativo nestes valores, isto refletiu na velocidade específica de crescimento.

Durante o cultivo, foi observada que já no 5º dia é possível a obtenção de conídios, entretanto a quantidade não foi suficiente em virtude da pouca biomassa formada, o que foi possível no 10 º dia. Acreditava-se que seria melhor padronizar os inóculos a partir da suspensão de conídios, já que uma contagem utilizando câmara de New Bawer permitisse uma representação adequada da concentração de conídios na suspensão. Entretanto, a dificuldade na tomada das alíquotas não permite uma padronização adequada dos inóculos. Isto ocorreu em virtude do tempo de sedimentação dos conídios na solução salina ser muito pequeno, impedindo assim uma tomada precisa das alíquotas. Por esse motivo, optou-se por utilizar um inóculo a partir de *pellets*. Isto foi possível a partir do cultivo de conídios durante as primeiras 72 horas.

Após 72 horas, o cultivo foi suspenso e verificou-se que na concentração de 6% de sacarose os *pellets* apresentaram formatos mais esféricos e compactos, sem excesso na produção da biomassa, como ocorreu nas concentrações de 24 e 36%. Isto evidenciou que em concentrações maiores da fonte de carbono, o microrganismo utilizou o carboidrato principalmente para produção de energia e biomassa. Optou-se em utilizar os *pellets* na concentração de 6% de sacarose devido estes apresentarem diâmetros mais adequados (diâmetro médio ± 0,3 cm), para a realização da biotransformação em questão.

As estratégias utilizadas para padronização do inóculo favoreceram características diferenciadas da biomassa com relação ao estado de compactação da mesma. No procedimento 2 , a biomassa ficou mais compacta devido à utilização do sistema de vácuo (figura 20a). Esta característica facilitou sua manipulação durante a pesagem e a inoculação. Entretanto, acredita-se que ao retirar frações da biomassa para a inoculação, exista a possibilidade de seccionar os pelletes formados, e desta forma isto poderia ter acarretado a transferência incompleta de todas as informações genéticas necessárias para a produção do metabólito, influenciando na produção, na produtividade ou na sua rota biossintética (SARQUIS, 2005).

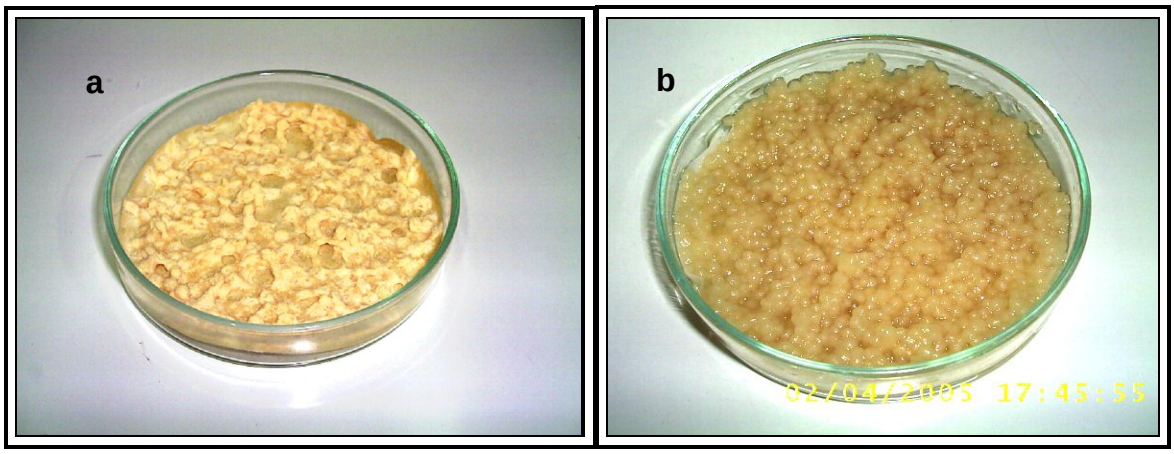


Figura 20. Biomassa obtida durante a fermentação da sacarose em cultivo de fungo filamentoso após 72 horas. a) Após filtração a vácuo (biomassa compacta). b) Após filtração simples através de peneira.

O procedimento P_2 permitiu a integridade dos pelletes formados, haja vista que, não houve seccionamento dos mesmos. A filtração simples favoreceu uma biomassa com maior teor de umidade e conseqüentemente menos compacta (figura 20b), possibilitando desta forma, a inoculação dos pelletes de forma integral.

A padronização do tempo de filtração nas duas estratégias foi de fundamental importância, pois teve influência direta no teor de umidade dos pelletes que foram inoculados e conseqüentemente na quantidade de biomassa inoculada. A tabela 5 demonstra a biomassa seca utilizada como inóculo.

O Procedimento P_1 proporcionou menor teor de umidade da biomassa, sendo que a quantidade de biomassa seca adicionada (BS) correspondeu a 14,20 % com relação a biomassa úmida (BU). Apesar de no P_2 ter sido adicionado maior quantidade de BU, o coeficiente de produção de BS em relação à BU ($Y_{BS/BU}$) foi maior no P_1.

Tabela 5. Quantidade de biomassa seca e úmida adicionada nas padronizações utilizadas.

	Nº de amostras	**Base seca (%)**	**CV (%)**	**Biomassa úmida (BU) adicionada (g / L de meio de cultura)**	**Biomassa seca (BS) adicionada (g / L de meio de cultura)**	$Y_{BS/BU}$
P_1	10	14,20	14,13	5,00	0,71	0,142
P_2	10	9,87	11,85	10,00	0,98	0,098

Este experimento demonstrou a necessidade de padronização do inóculo no que concerne às condições de filtração realizadas antes da inoculação. Os coeficientes de variações (CV) acima de 10% demonstraram que a etapa de filtração está sujeita à influência de vários fatores, tais como: tempo de filtração, tipo de filtro utilizado, temperatura de secagem e tamanhos dos *pellets*.

3.3 Análises de quantificação do ácido kójico

O método de determinação do ácido kójico por espectrofotometria no ultravioleta foi realizado no comprimento de onda onde ocorreu a máxima absorção da substância após análise de varredura entre 200 a 800 nm utilizando um padrão do 5-hidroxi-2-hidroximetil-ɔ-pirona (*Sigma*). O espectro de absorção mostrou a $\lambda_{máx}$ em 269 nm havendo concordância com o resultado obtido quando foi utilizado o padrão desta substância e em conformidade com Gomara et al. (2004).

A curva de quantificação (fig. 21), foi obtida pelas diferentes concentrações de ácido kójico e mostra que no intervalo de 2,0 a 20,0 mg/mL o método é linear, apresenta coeficiente de correlação (r) igual a 0,9997 e coeficiente de extinção molar igual a 17,08 L mg^{-1} cm^{-1}.

O metabólito obtido pelo processo biotecnológico apresentou coloração vermelho escuro, possivelmente devido a complexação do ácido kójico com Fe^{2+}, proveniente do sulfato ferroso presente na formulação do meio Czapek-Dox. Trabalhos realizados comprovam a capacidade de substâncias γ-pironas em formar complexos com alguns metais como mercúrio, cobre, ferro e alumínio (ANTIPOVA et al, 2004; BURDOCK; SONI; CABIN, 2001; MARWAHA; SOHI, 1994), o que o torna um indicador metalocromo.

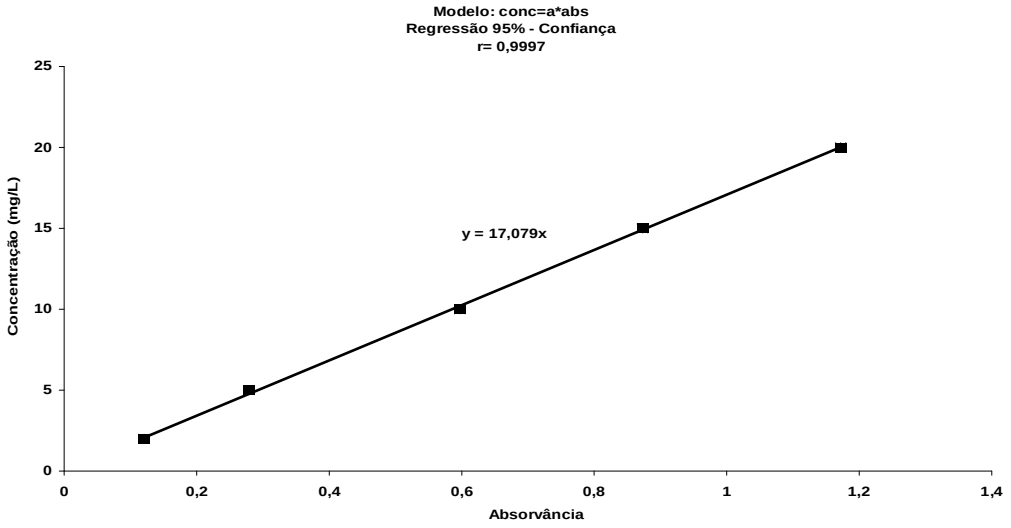


Figura 21. Curva de quantificação do ácido kójico

3.4 Curva de quantificação dos açúcares redutores totais

A curva de quantificação (figura 22). Foi obtida pelas diferentes concentrações de glicose e mostra que no intervalo de 0,1 a 1,0 mg/mL o método é linear e apresenta coeficiente de correlação (r) igual a 0,9999 e coeficiente de extinção molar (‘) igual a 1,44 L mg^{-1} cm^{-1}. O comprimento de onda na qual as análises foram realizadas foi de 540 (nm).

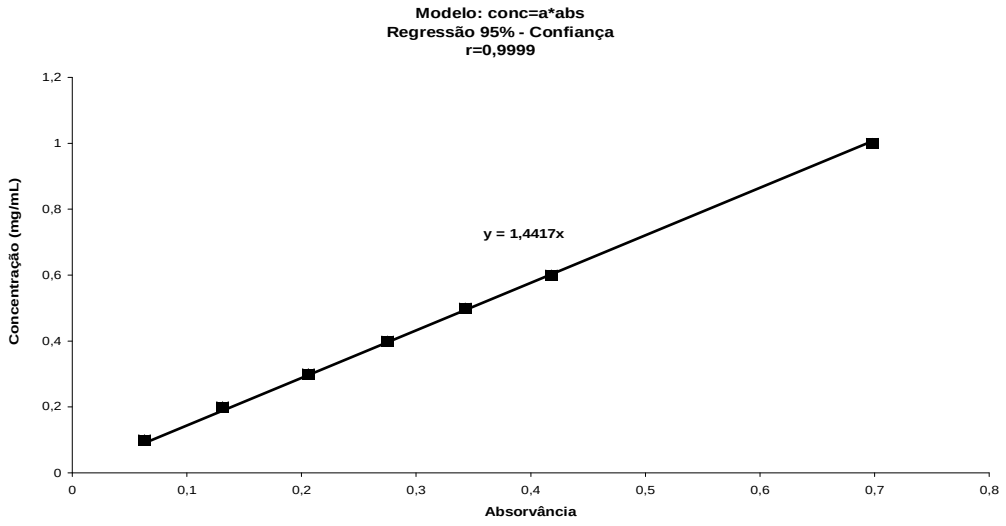


Figura 22. Curva de quantificação dos açúcares redutores

3.5 Caracterização estrutural do produto

3.5.1 Espectrofotometria Uv/Vis

O espectro correspondente ao do meio de cultura após o 16ª dia de cultivo indicou a presença do metabólito de interesse (figura 23a) quando comparado com o espectro do ácido kójico padrão (figura 23b). Desta forma, é possível observar os comprimento de onda máximos equivalentes que correspondem a presença de duplas ligações alternadas e pares de elétrons não covalente em sua estrutura.

A figura 23c demonstra o espectro do meio de cultura Czapek com 6% de sacarose (m/v) antes da inoculação, onde é possível observar que nenhuma substância presente na formulação do meio de cultura utilizado apresenta o espectro de absorção no ultravioleta na mesma região que o ácido kójico.

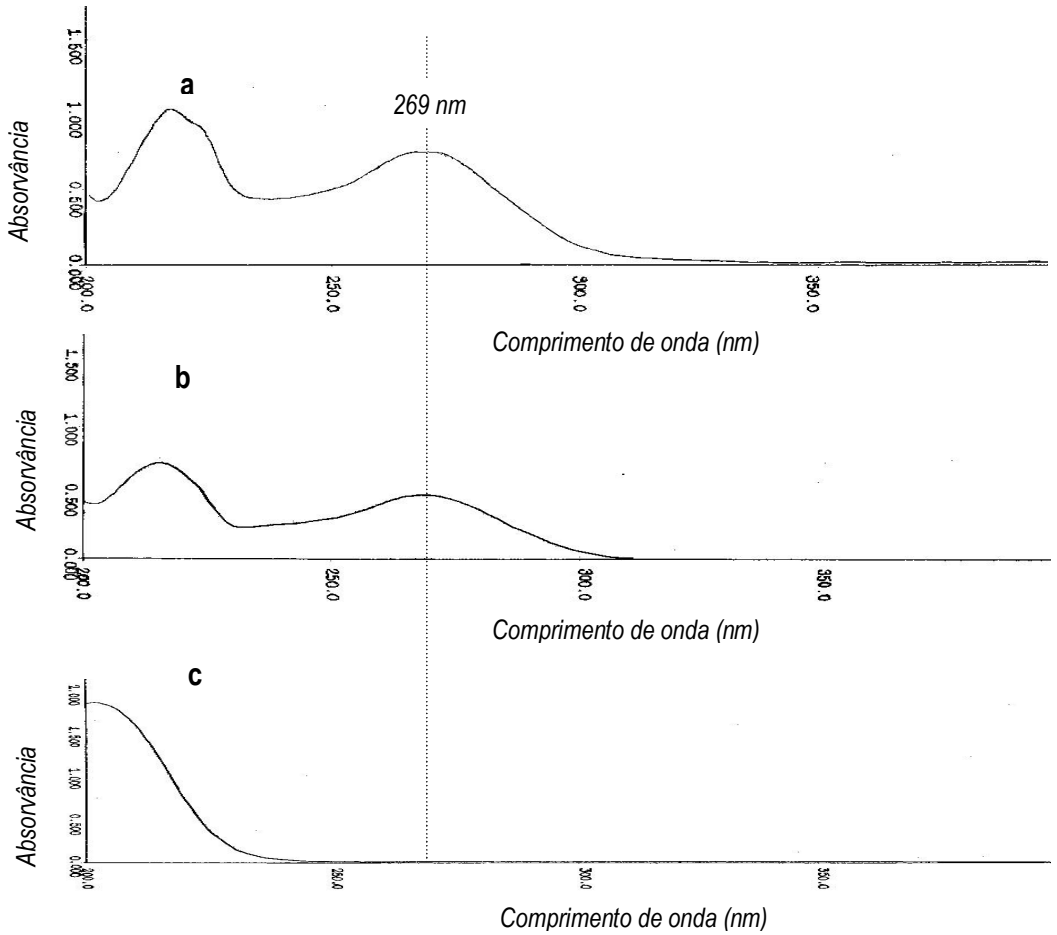


Figura 23. Espectro UV/Vis: a) Meio de cultura Czapek com 6% de sacarose (m/v) após 16 dias de cultivo. b) Solução aquosa com ácido kójico padrão. c) Meio de cultura Czapek com 6% de sacarose (m/v) antes da inoculação.

3.5.2. Resultado das análises de RMN ^{1}H e RMN ^{13}C

Foi realizada a caracterização preliminar do concentrado bruto liofilizado utilizando RMN de hidrogênio e carbono 13. Os espectros das amostras são comparados com padrões, como mostra a figura 24.

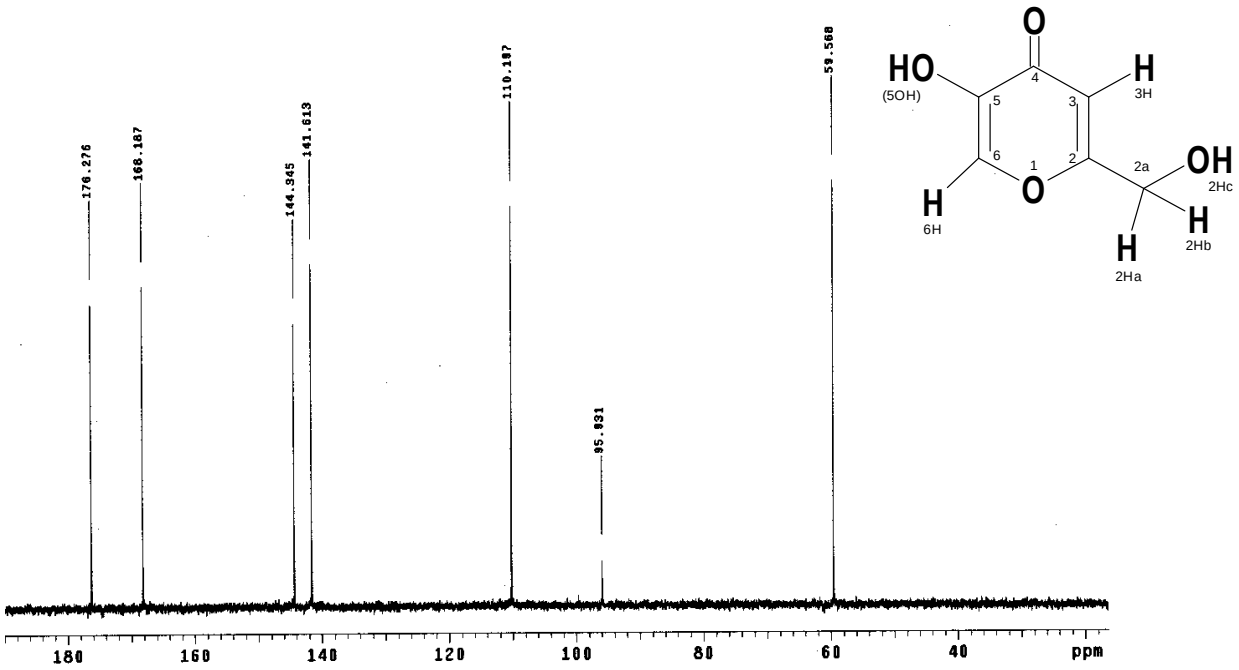


Figura 24a. Espectro de RMN ^{13}C ï amostra.

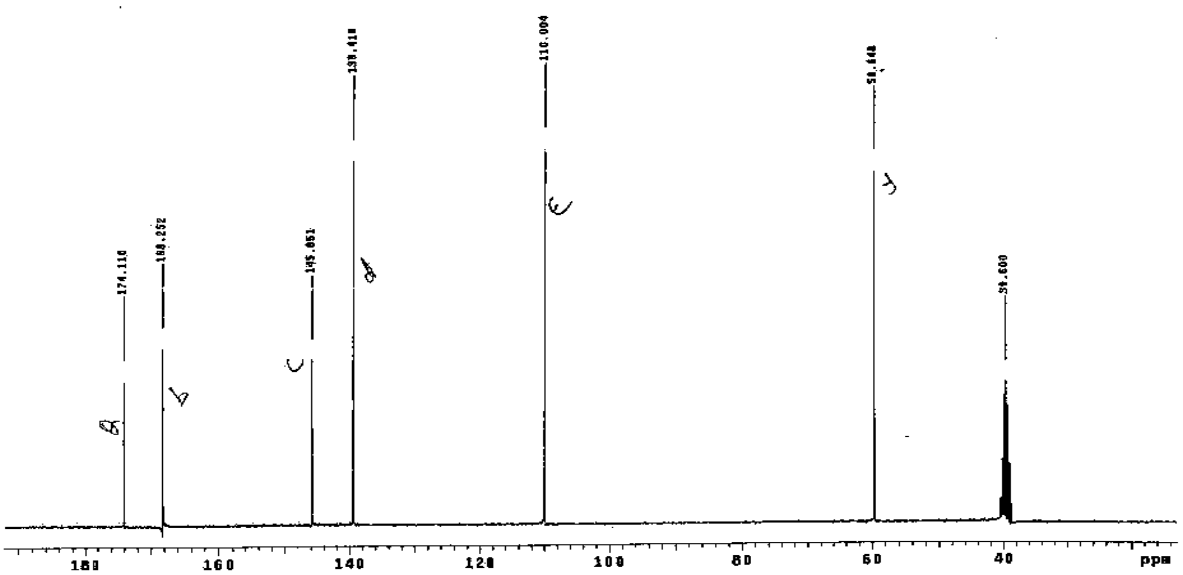


Figura 24b. Espectro de RMN ^{13}Cï padrão.

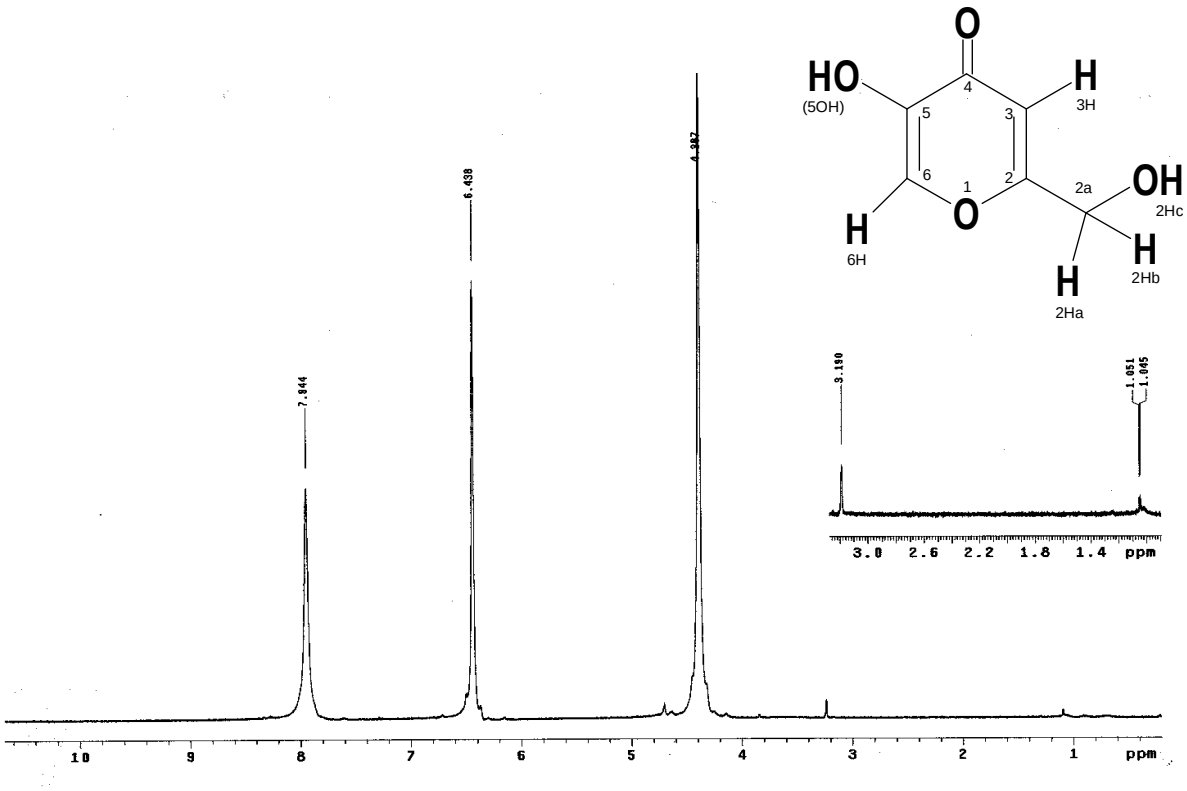


Figura 24c. Espectro de RMN ^{1}H - amostra

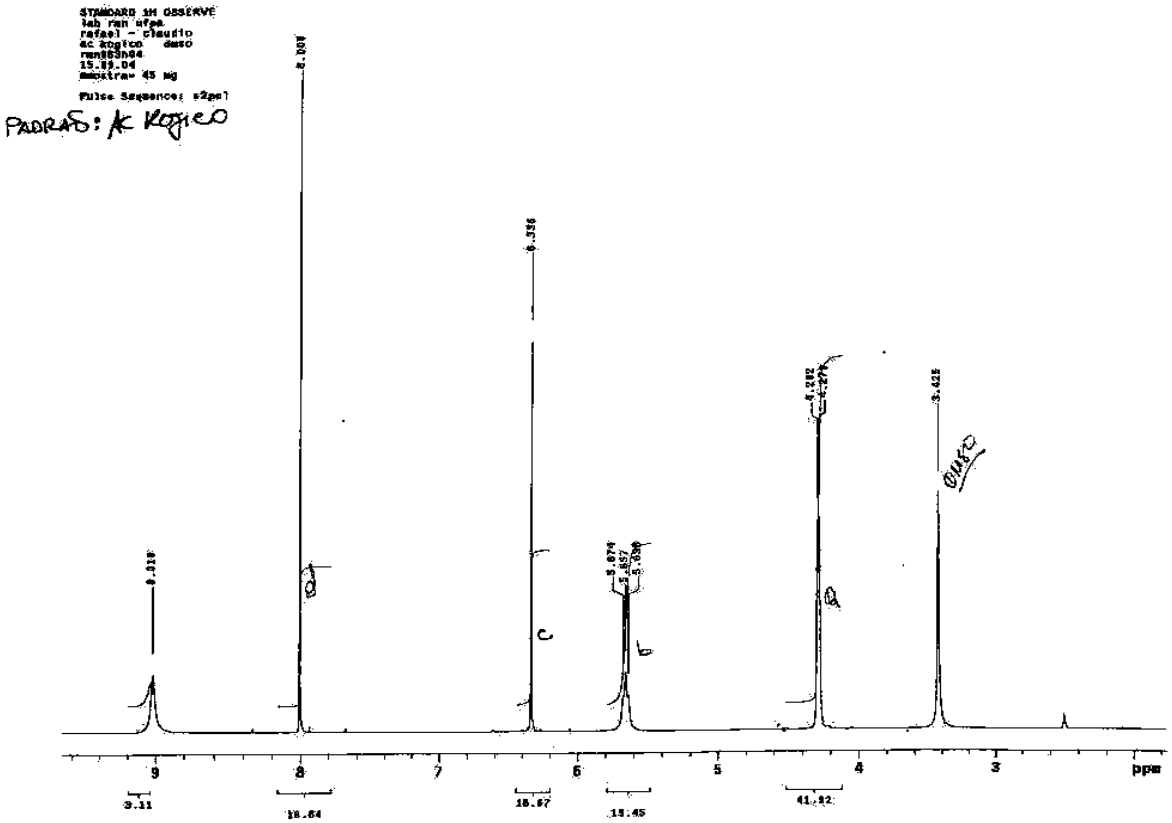


Figura 24d: Espectro de RMN ^{1}H ï padrão

As figura 24 que representam os espectros de RMNC^{13} apresentam sinais equivalentes de deslocamento químico, confirmando assim a autencidade da identificação da substância produzida como sendo o 5-hidroxi-2-hidroximetil-ɔ-pirona. Observa-se nas tabelas 6 e 7 que os deslocamentos dos sinais são praticamente os mesmos.

Tabela 6. Deslocamento químico da amostra e do padrão em RMN ^{13}C. Os deslocamentos químicos são medidos em relação ao tetrametilsilano (TMS).

C^{13}	**Amostra (ppm)**	**Padrão (ppm)**
2	141,61	139,34
3	145,77	144,34
4	176,27	174,19
5	110,19	109,92
6	168,18	168,14
2a	59,55	59,56

Tabela 7. Deslocamento químico da amostra e do padrão em RMN ^{1}H. Os deslocamentos químicos são medidos em relação ao tetrametilsilano (TMS).

H^{1}	**Amostra (ppm)**	**Padrão (ppm)**
$2H_a/2H_b$	4,387	4,292 e 4,279
3H	6,438	6,336
6H	7,944	8,006

10.5.3 Espectroscopia no Infravermelho (IV)

A figura 25 mostra os espectros de transmissão a partir de pastilhas de KBr na proporção de 1:400 (Amostra / KBr) e 1:600 (padrão / KBr).

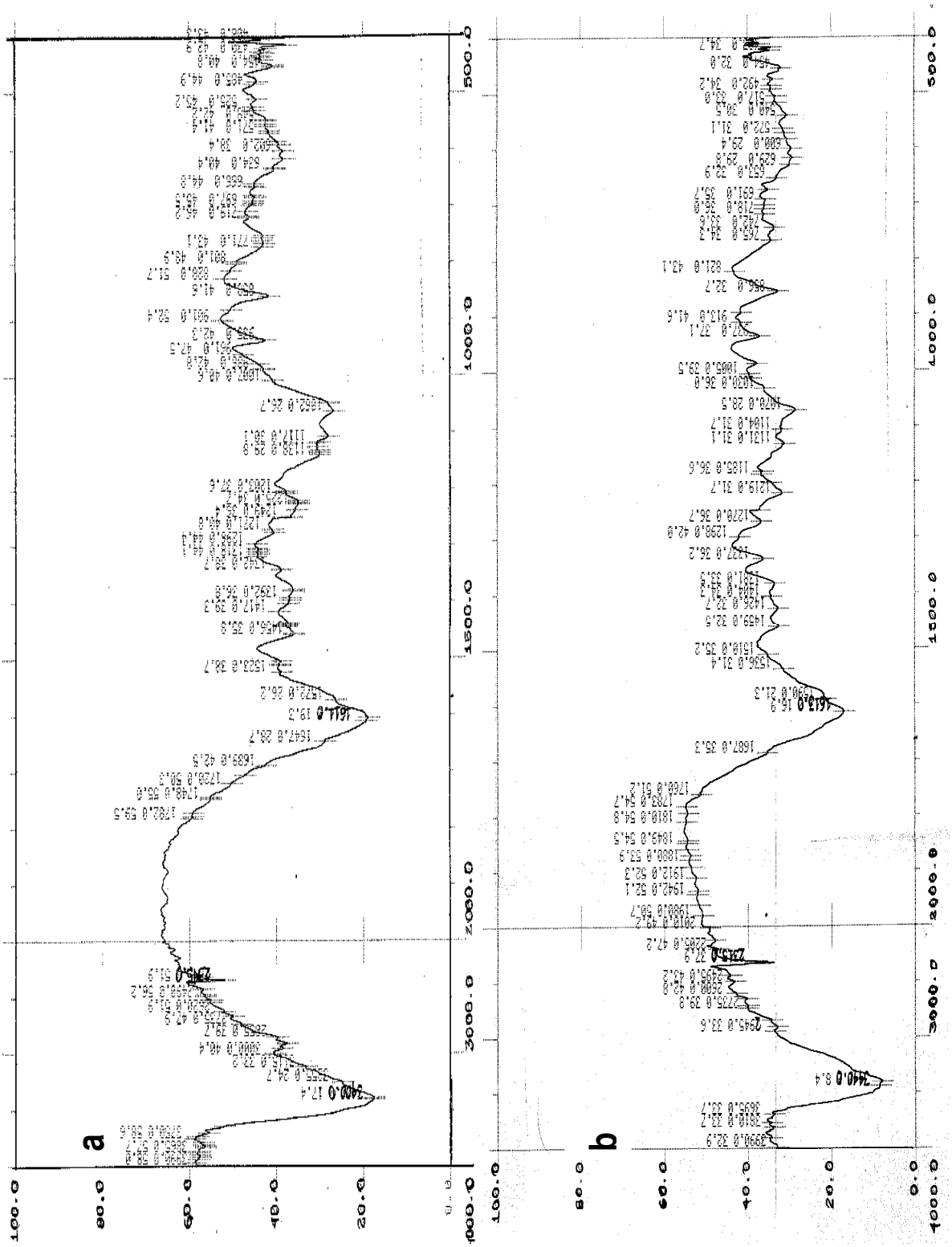


Figura 25. Espectro na região do infravermelho. a) amostra isolada. b) padrão.

As figuras 25a e 25b que representam o espectro de infra-vermelho, apresentam bandas de absorção bem definidas demonstrado que a amostra apresenta as mesmas características do padrão. De um modo específico, observa-se que a absorção em 3.400 nm refere-se à hidroxila, em 1611 nm refere-se a carbonila. Não foi observado absorção na região de aromáticos. As bandas estão bem definidas e descrevem a estrutura do 5-hidroxi-2metil-ɔ-pirona comparada com o padrão.

3.6 Efeito da concentração da fonte de carbono na produção do ácido kójico

A concentração da fonte de carbono adicionada no meio de cultura influenciou sensivelmente a produção do metabólito de interesse. A figura 26 demonstra que a produção mais significativa tem início a partir do 6º dia para todas as concentrações. Entretanto, as concentrações de 6 e 12% apresentaram melhor produção alcançando 13g L^{-1} e 16g L^{-1} respectivamente.

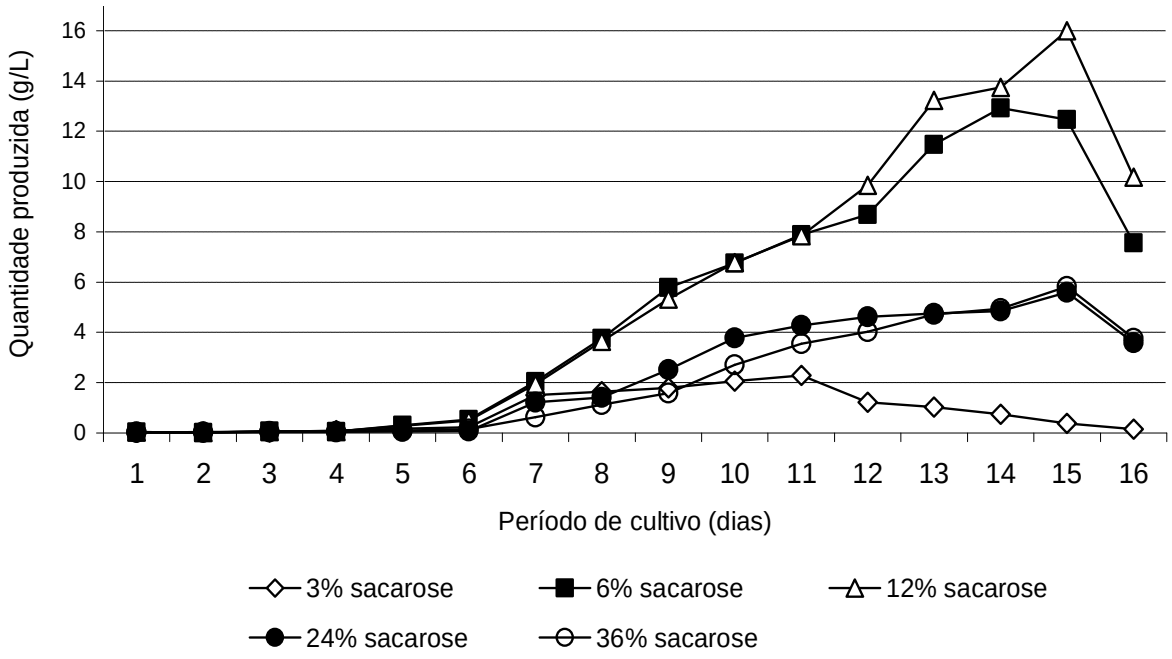


Fig. 26. Curva de progressão da formação do produto em diversas concentrações de sacarose.

Foi verificado no cultivo em meio sólido que 6 e 12% apresentaram melhor perfil de crescimento, e neste experimento em meio líquido, isto teve influência para melhorar a produção do metabólito. Em concentrações maiores que 12% considera-se que o aumento da viscosidade tenha aumentado a resistência física (pressão

osmótica) e também tenha influído em uma menor difusão do oxigênio molecular, influenciando desta forma na rota biossintética para produção do metabólito. A produção máxima foi alcançada após 14 e 15 dias do início da fermentação.

3.7 Investigação dos parâmetros cinéticos

Foi realizado o estudo da cinética de crescimento da biomassa. A figura 27 mostra o perfil de crescimento do microrganismo, onde pesagens consecutivas de biomassa seca foram realizadas com o objetivo de verificar sua relação com o consumo de substrato e a produção do metabólito (ARIFF et al.; 1996). A figura 28 demonstra as curvas inerentes a cada parâmetro.

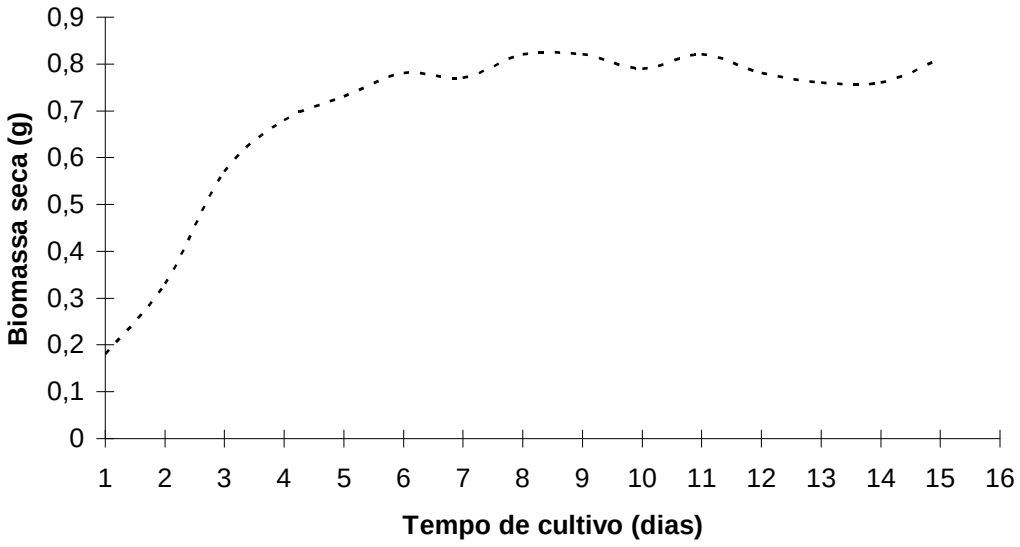


Fig. 27. Perfil do crescimento do fungo filamentoso expresso em biomassa seca

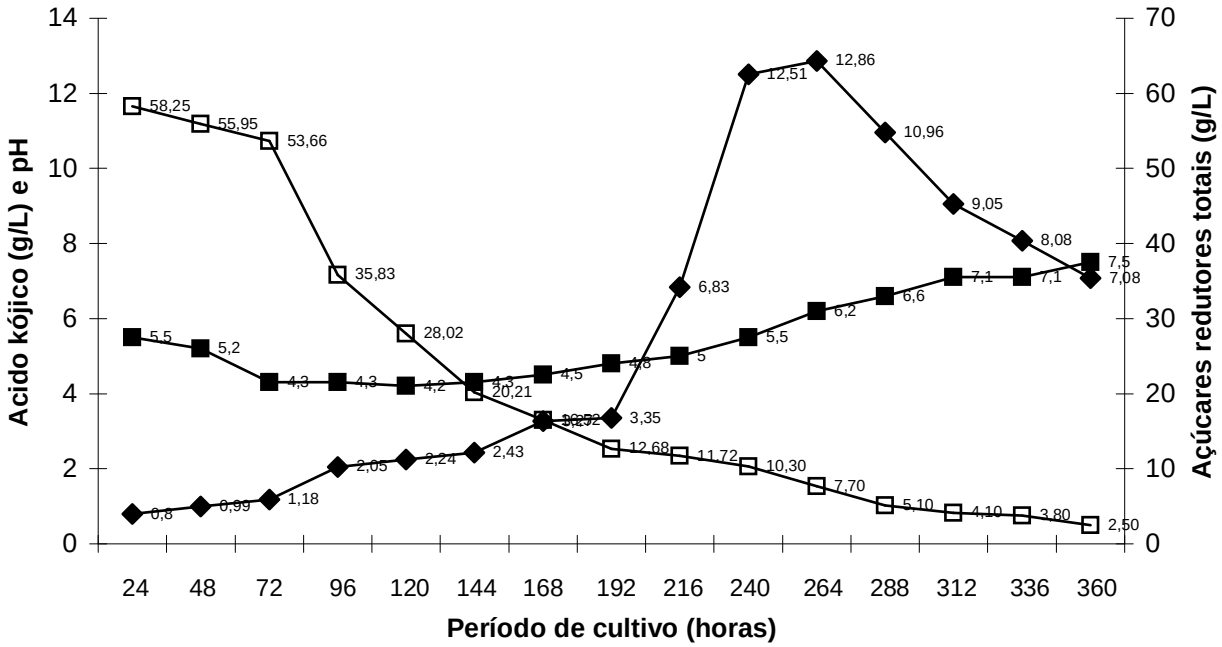


Figura. 28. Parâmetros da produção do AK (♦), consumo dos açúcares redutores totais ( ) e pH (y)

A figura 27 mostra que a inoculação utilizando a biomassa (*pellets*) não apresentou a fase de adaptação, evidenciando boa aceitação do fungo filamentoso ao meio liquido utilizado do experimento. Após o sexto dia, o microrganismo entra na fase estacionária, onde é alcançada a produção máxima do metabólito. A figura 28 demonstra que no início desta fase, o fungo filamentoso já havia consumido 56% da quantidade de sacarose inicial com um aumento de sua biomassa de até 4 vezes com relação ao que foi inoculado.

A produção do metabólito de interesse se torna mais evidente a partir de 192 horas de cultivo (8º dia), quando 79% da sacarose já havia sido consumida (figura 28). Há evidências de que no período decorrido até o início da produção do metabólito, o microrganismo direciona o seu mecanismo enzimático para produção de hidrolases e seqüencialmente de invertases para poder metabolizar os monossacarídeos presentes na sacarose. O pH demonstra uma queda inicialmente até o 3º dia, e a partir do 6º dia tende para o pH fisiológico, como mostra a figura 28.

Os parâmetros cinéticos para este experimento serão demonstrados nas tabelas 8,9 e 10 como segue abaixo.

Tabela 8. Resultados da fermentação por batelada simples. Produção do ácido kójico.

t (h)	X (g L^{-1})	S (g L^{-1})	P (g L^{-1})
0	0,18	60	0
24	0,33	58,25	0,8
48	0,57	55,95	0,99
72	0,68	53,66	1,18
96	0,73	35,83	2,05
120	0,78	28,02	2,24
144	0,77	20,21	2,43
168	0,82	16,52	3,27
192	0,82	12,68	3,35
216	0,79	11,72	6,83
240	0,82	10,3	12,51
264	0,78	7,7	12,86
288	0,76	5,1	10,96
312	0,76	4,1	9,05
336	0,81	3,8	8,08
360	0,81	2,5	7,08

X: Biomassa seca medida no meio de cultura. S e P: Concentração de açúcares redutores totais e ácido kójico, respectivamente, medida na fase líquida.

Tabela 9. Velocidades específicas calculadas a partir dos valores da tabela 8.

t (h)	μ_X (h^{-1})	μ_S (h^{-1})	μ_P (h^{-1})
0	0	0	0
24	0,0189	0,2210	0,1010
48	0,0175	0,1681	0,0139
72	0,0067	0,1403	0,0116
96	0,0029	1,0177	0,0497
120	0,0027	0,4172	0,0101
144	0,0005	0,4226	0,0103
168	0,0025	0,1875	0,0427
192	0,0000	0,1951	0,0041
216	0,0016	0,0506	0,1835
240	0,0015	0,0722	0,2886
264	0,0021	0,1389	0,0187
288	0,0011	0,1425	0,1042
312	0,0000	0,0548	0,1047
336	0,0026	0,0154	0,0499
360	0,0000	0,0669	0,0514

$$\mu_X = \frac{1}{X} \cdot \frac{dx}{dt} \qquad \mu_S = \frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt} \qquad \mu_P = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt}$$

Tabela 10. Comparação dos resultados obtidos por Ariff et al (2000) e o experimento atual, utilizando processo descontínuo.

	$X_{máx}$ (g L^{-1})	$P_{máx}$ (g L^{-1})	$Y_{P/X}$ (g ácido kójico. g biomassa^{-1})	$Y_{P/S}$ (g ácido kójico.g sacarose^{-1})	$Y_{X/S}$ (g biomassa. g sacarose^{-1})	Produtividade do produto (g $L^{-1}h^{-1}$)
Experimento atual	8,2	12,86	2,00	0,214	0,106	0,048
Rosfarizan e Ariff (2000)	14,83	22,98	1,55	0,544	-	0,046

Borzani (2003) mostrou que considerando o tempo *t* de fermentação, os correspondentes valores de *X, S* e *P* são relacionados entre si, através dos fatores de conversão definidos por:

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \qquad Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \qquad Y_{P/X} = \frac{P - P_0}{X - X_0}$$

No final da fermentação foi considerando que $X = X_m$ e $P = P_m$, desta forma, as três expressões anteriores podem ser aplicadas no tempo final, resultando:

$$Y_{X/S} = \frac{X_m - X_0}{S_0} \qquad Y_{P/S} = \frac{P_m - P_0}{S_0} \qquad Y_{P/X} = \frac{P_m - P_0}{X_m - X_0}$$

Rosfarizan e Ariff (2000), obtiveram em seu experimento resultados apresentados na tabela 10; foi utilizada sacarose como fonte de carbono na concentração de 100g L^{-1}. Foi observado que, apesar da produção do metabólito ter sido menor no experimento atual (12,86 gL^{-1}) quando comparado com o experimento de Rosfarizan e Ariff (2000) (22,98 gL^{-1}), a produtividade do produto foi maior no primeiro experimento citado, indicando uma melhor eficiência na bioconversão da sacarose em ácido kójico no mesmo intervalo de tempo.

3.8 *Scale up* do processo

O *scale up* do processo indicou um aumento na produção do metabólito na ordem de 24% quando utilizado igualmente 6% de sacarose (m/v). Entretanto, o período de cultivo foi 3,18 vezes maior quando comparado com o processo anterior. Estes resultados demonstram que é necessário adequar os parâmetros de cultivo para esta nova condição. Acredita-se que a quantidade total de sacarose, a difusão do oxigênio molecular (no experimento realizado pode ser alterado por meio da velocidade de agitação orbitalar), e a relação carbono/nitrogênio, sejam parâmetros que influenciem diretamente na produção do metabólito de interesse.

3.9 Efeito da relação carbono/nitrogênio sobre a produção do metabólito

O estudo da relação carbono/nitrogênio demonstrou uma produção máxima de 15,5g L^{-1} quando utilizado a relação C/N= 200. Produções menores foram observadas no mesmo período quando utilizadas as relações C/N=50, C/N=100 e C/N=150, respectivamente aos valores: 0,1g L^{-1}, 0,07g L^{-1}, 1,39g L^{-1}. Estudos preliminares mostraram que as relações C/N= 250, C/N=300, C/N=350 e C/N=400 favoreceram uma queda na produção máxima do metabólito de interesse no mesmo intervalo de tempo.

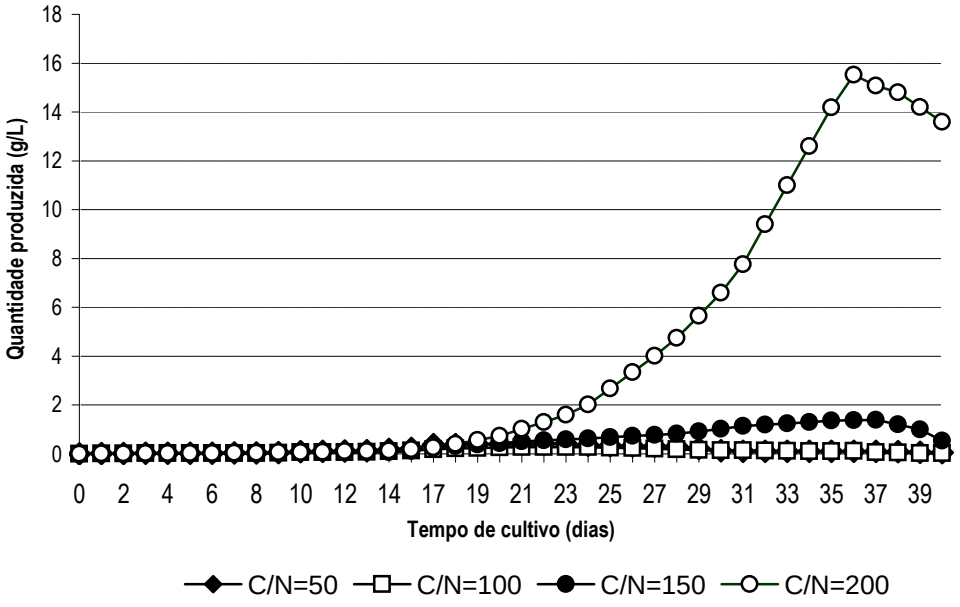


Figura 29. Curva de progressão da produção do metabólito em diferentes concentrações de nitrogênio.

A produção do metabólito secundário foi influenciada diretamente pela regulação da fonte de nitrogênio como mostra a figura 29. Acredita-se que esta via metabólica foi negativamente afetada pelo aumento de fontes de nitrogênio favorável ao crescimento micelial, como exemplo, os sais de amônio. Ômura e Tanaka (1984) em seus estudos sobre a influência de amônio livre na fermentação de alguns tipos de antibióticos reportaram que o íon amônio impede a síntese de aminoglicosídeos, assim como, outros efeitos regulatórios sobre a produção de metabólicos secundários.

O gráfico abaixo demonstra que houve um menor consumo gradativo do substrato utilizando a relação C/N=200. Comparando o gráfico de progressão da produção do metabólito com o gráfico do consumo do substrato, observa-se que a produção máxima do metabólito foi alcançada quando praticamente todo o substrato já havia sido consumido. Nas relações C/N=50, C/N=100 e C/N=150 o substrato foi totalmente consumido a partir 23º dia, enquanto que na relação C/N= 200 isto aconteceu a partir do 35 º dia.

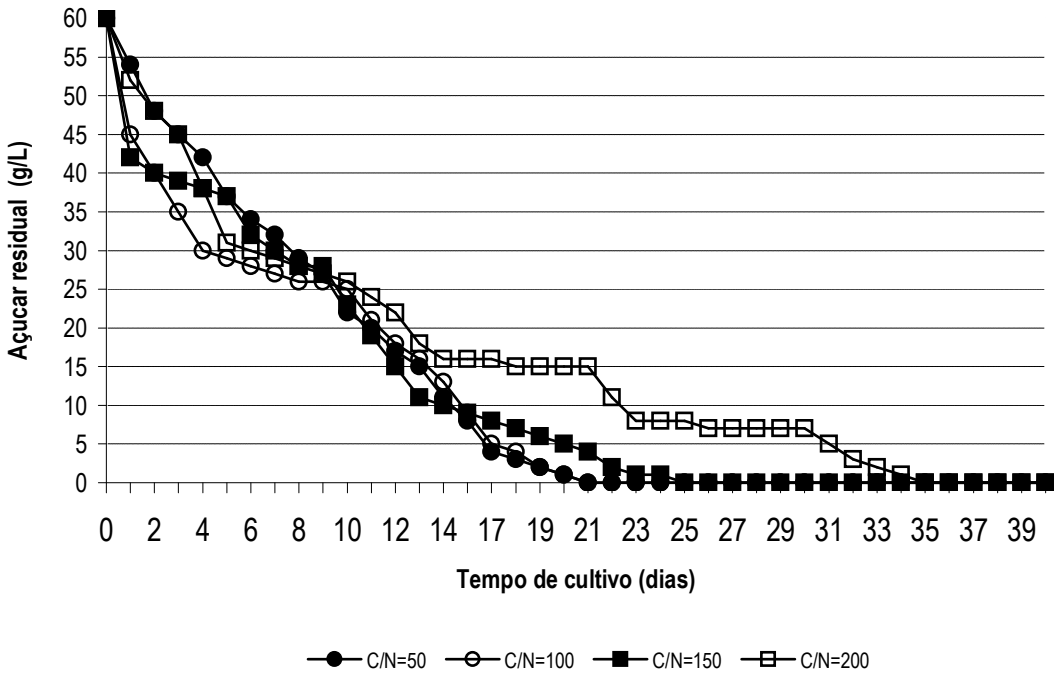


Figura 30. Consumo do substrato em diferentes concentrações de nitrogênio.

Observa-se que a relação C/N=150 apresentou maior velocidade de consumo de sacarose a partir do 12º dia, elevando assim o desenvolvimento de biomassa do

microrganismo. Este aspecto direcionou a fonte de carbono para a rota de produção micelial e não do metabólito de interesse. Por outro lado, a relação C/N=200 apresentou menor velocidade de declínio, demonstrando uma diminuição no consumo da sacarose a partir do 12º dia. Isto levou a uma maior produção do metabólito como apresentado na figura 29. Observa-se no 21º dia que o metabólito passa a ser produzido com maior taxa e depois mantém uma taxa de 15g L^{-1} estável a partir de 35 dias. A influência da relação C/N apresenta grande potencial na produção do metabólito, entretanto é necessário investigar a produção de enzimas responsáveis pela transformação, o que não foi realizado em nossa experiência.

3.10 Concentração e isolamento da substância biotransformada

A fase líquida obtida a partir das filtrações, apresentou aspecto granular após o processo de liofilização, e manteve a coloração vermelha devido à presença do ferro (fig. 31).

Figura 31. Amostra bruta liofilizada.

A extração do metabólito de interesse a partir do material bruto concentrado utilizando-se acetato de etila e metanol (1:1), possibilitou a extração do ácido kójico em fase líquida e a precipitação de proteínas. A figura 32 demonstra as fases líquidas de (10) dez extrações realizadas com a mesma amostra.

Figura 32. Extrações realizadas a partir da amostra bruta liofilizada, utilizando etanol e acetato de etila (1:1), para obtenção do ácido kójico.

3.11 Obtenção e rendimento do produto isolado

A utilização dos solventes orgânicos MeOH/AcoET (1:1) para a extração do produto a partir do meio de cultura liofilizado permitiu a obtenção do metabólito isento de impurezas (açúcares, micélio, sais inorgânicos). A cristalização do metabólito em sala refrigerada a 25 ºC permitiu a obtenção de cristais na forma de agulha com coloração vermelha (fig. 33a).

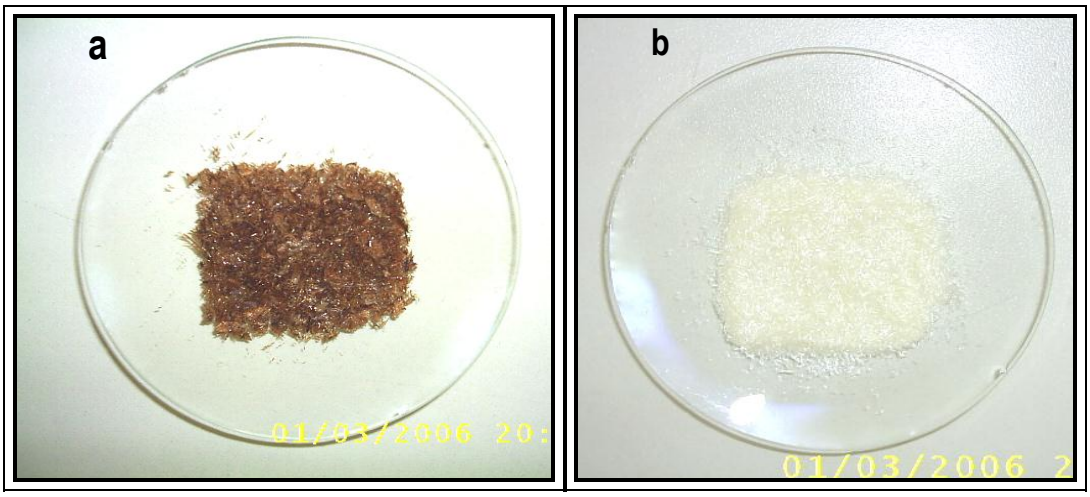


Figura 33. 5-hidroxi-2-hidroximetil-ɔ-pirona apresentado na forma de cristais a) Produto obtido b) padrão.

A diferença de coloração se deve à presença do Fe^{2+} complexado à estrutura do metabólito. Não se sabe a verdadeira complexidade da estrutura, entretanto se

supõem que seja idêntica a da figura 34, pois não foi possível realizar estudos nestes níveis. O Fe^{2+} é facilmente renovado pela adição de EDTA 0,1 N (fig. 35).

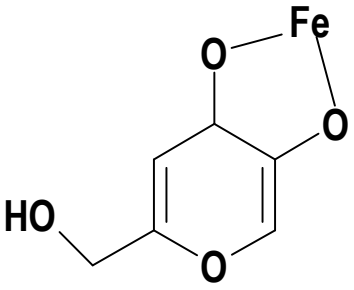


Figura 34. Possível estrutura do produto isolado

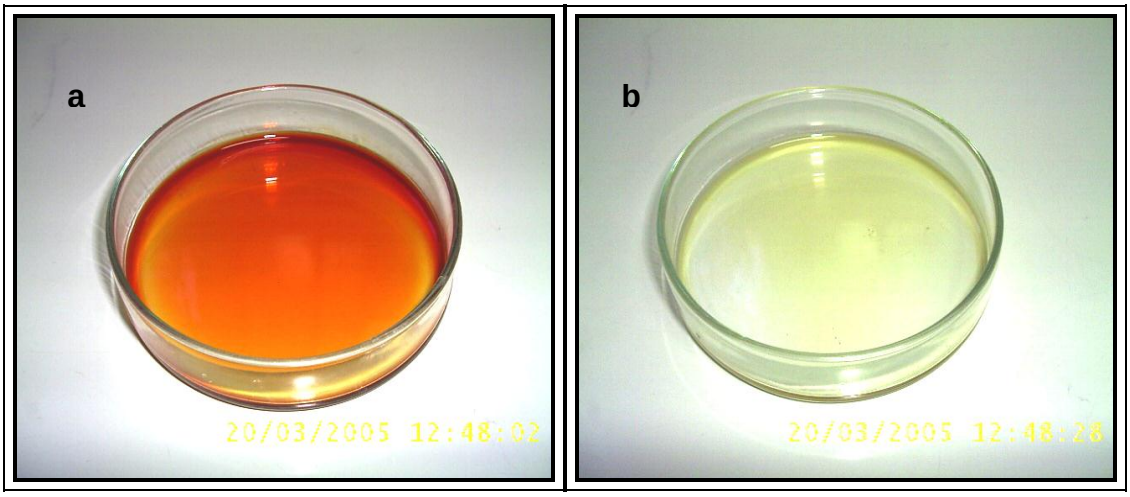


Figura 35. Meio de cultura Czapek-Dox utilizado para o cultivo do *A. flavus*. a) Coloração vermelha evidencia a produção do metabólito complexado com Fe^{2+} b) Após adição de EDTA 0,1N.

O cálculo do rendimento da obtenção dos cristais foi realizado com base na massa dos cristais obtidos em relação à quantidade de sacarose utilizada no meio de cultura como substrato, obtendo-se um rendimento de 6,96 %m/m. Este resultado demonstra a eficiência de execução do processo, já que não há relatos na literatura de rendimentos nem de quantidades obtidas em processos biotecnológicos. Desta forma, pode-se dizer que este é o primeiro processo otimizado por batelada, realizado com *A. flavus* em cultura submersa que permitiu obter cristais de ácido kójico puro a partir de sacarose.

3.12 Atividade antioxidante realizada com 5-hidroxi-2-hidroxi-ɔ-gama pirona

A obtenção da ɔ-pirona através de processo micotecnológico permitiu realizar ensaio da capacidade antioxidante pelo método $ORAC_{FLUORESCEÍNA}$ e compara-lo em unidade εmol Equivalente Trolox / ε mol amostra, com algumas substâncias ensaiadas pelo mesmo método disponibilizado na literatrura (DÁVALOS; GÓMEZ-CORDOVÉS; BARTOLOMÉ, 2004. OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001). O metabólito obtido apresentou um valor de 3,78 εmol ET/εmol amostra.

Tabela 11. Valores de atividade antioxidantes em $ORAC_{FLUORESCEÍNA}$ de algumas substâncias.

Substância	Segundo Davalos; Gomez-Cordovés; Bartolomé, 2004[a]	Segundo Ou; Hampsch-Woodill; Prior, 2001[a]
Quercetina	10,5	7,28
Catequina	14,9	-
Ácido ferúlico	4,47	4,37
BHA	2,43	-
Acido ascórbico	-	0,95

[a] Expressa em εmol ET/εmol amostra.

Comparando este resultado com os dados da literatura (tabela 11), observa-se que o 5-hidroxi,2-hidroximetil-ɔ-pirona, apresenta maior potencial quando comparado com BHA e ácido ascórbico, ficando abaixo da quercetina, catequina e ácido ferúlico.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

O fungo filamentoso utilizado apresentou grande potencial na produção de metabólitos secundários.

A estrutura gama pirona foi obtida em quantidade significativa a partir do cultivo de *Aspergillus flavus* que apresentou um grande potencial de transformação da sacarose.

As análises de caracterização estrutural não deixaram dúvidas com relação a obtenção do 5-hidroxi-2-hidroximetil-ɔ-pirona.

O procedimento de isolamento do metabólito demonstrou ser bastante eficiente, haja vista o grau de pureza obtido.

O ensaio realizado para verificar a atividade do 5-hidroxi-2-hidroximetil-ɔ-pirona como agente antioxidante demonstrou que esta substância apresenta alto potencial antioxidante, ficando acima de alguns agentes antioxidantes já conhecidos. Todavia, ainda é necessário realizar mais estudos para que possa ser efetivamente utilizada em uma matriz alimentícia.

De acordo com os resultados obtidos, este processo se mostra com viabilidade técnica favorável de modo a se estabelecer um processo em escala piloto da biotransformação da sacarose em 5-hidroxi-2-hidroximetil-ɔ-pirona por *Aspergillus flavus.*

REFERÊNCIAS

.

REFERÊNCIAS

1. ANTIPOVA, I.A.; MUKHA, S.A.; MEDVEDERA, S.A. Determination of composition and instability constants of maltol complexes with iron (III) ions. **Russian Chemical Bulletin.** v.53, p.780-784, 2004.

2. FF, A. B. et al. Aeration and yeast extract requirements for kojic acid production by *Aspergillus flavus* link. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 19, p. 545-550, 1996.

3. ARNSTEIN, H. R. V.; BENTLEY, R. The biosynthesis of kojic acid. 1. Production from [1-^{14}C] and [3:4-$^{14}C_2$] glucose and [2-^{14}C] ï 1: 3 - dihydroxyacetone. **Biochem. Journal** v. 54. p. 493-508, 1953.

4. BAJPAI, P.; AGRAWALA, P. K.; VISHWANATHAN, L. Enzymes relevant to kojic acid biosynthesis in *Aspergillus flavus*. **Journal of General Microbiology**. v. 127, p. 131-136, 1981.

5. BEMILLER, J.N. Carbohydrates: classification, chemistry, and labeling. In.: **Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology**. [s.l]: John Wiley & Sons, v.1-4, 1999, 2816 p.

6. BORZANI, WALTER. Calculation of fermentation parameters from the results of a batch test taking account of the volume of biomass in the fermenting medium. **Biotechnology Letters**. v. 25, p. 1953-1956, 2003.

7. BIANCHI, V.L.D.; MORAES, I.O.; CAPALBO, D.M.F. Fermentação em estado sólido.In.: LIMA, U. et al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgar Blücher. v. 3, 2001, 593 p.

8. BRIEN, G. O.; PATTERSON, J. M.; MEADOW, J.R. Amino acid derivatives of kojic acid. **Departament of Chemistry, University of Kentucky**, v. 27, p. 1711-1714, may. 1962.

9. BURDOCK, G. A.; SONI, M. G.; CABIN, I. G. Evaluation of health aspects of kojic acid in food. **Regulatory and Pharmacology**. v. 33, p. 80-101, 2001.

10. CARRILLO, Leonor. *Aspergillus*.in: **Los Hongos de los Alimentos y Forrajes**. Madri. 2004, p. 44-60.

11. CHEN, J. S.; WEI, C. I.; MARSALLI, M. R. (1991). Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. ***J. Agr. Food Chem***. v. 39, p.1897ï 1901, 1991.

12. CORBELLINI, A.; GREGORINI, **Gazz. chim. Ital**. v. 60, p. 244, 1930.

13. COULTATE, T. P. **Food: The Chemistry of Its Components**. London: RSC, 1999. 360 p.

14. DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC ï fluorescein) assay. **J. Agric. Food Chem**. v. 52, p. 48-54, 2004.

15. DOKKER, Lynn; SCHMIDT, Barry. **Fermentation in the food industry: An introduction to biotechnology**. Montgomery: University of Wisconsin ï River Falls, 1992.

16. DURAND, A., DE LA BROISE, D., BLACHÈRE, H. Laboratory scale bioreactor for solid state processes. **Journal of Biotechnolog.** v. 8, p.59-66, 1988.

17. FELLOWS, P. J. **Food Processing Technology: Principles and Practice**. [s.l]: Woodhead Publishing, 2000, 803 p.

18. FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 2000. 1258 p.

19. FIECHTER, A. Physical and chemical parameters of microbiology growth advances in biochemical engineering. **Springer Verlag**. v. 30, p. 7-60, 1984.

20. FUJIMOTO, N.; WATANABE, H.; NAKATAMI, T.; ROY, G. Induction of thyroid tumours in (C57BL/6N £ C3H/N)F1 mice by oral administration of kojic acid. **Food Chem. Toxicol**. v. 36, p. 697ï 703, 1998.

21. FUTAMURA, T. OKABE, M, TAMURA, T. TODA, K. MATSONUBU, T. Park, Y. Improvement of production of kojic acid by a mutant strain *Aspergillus oryzae*, MK107-39. **J. Biosci. Bioeng**. v. 91, p. 272ï 276, 2001.

22. GARTENBAU, Von dem Fachbereich. Factors aflotoxin producing to the distribution and incidence of aflotoxin producing fungi in stored maize in Benin. 1997. 182f. Tese de Doutorado ï Universität Hannover zur Erlangung.

23. GOMARA, F.L.; CORRER, C.J.; SATO, M.; PONTAROLO, R. Development and validation of a spectrophotometric method for the quantification of kojic acid. **Ars. Pharm.** v.45, p.145-153, 2004.

24. HAHN, Peter A. **Chemicals from fermentation**. New York: Doubleday e Company, 1968.

25. HAMMER, F. E. Oxidoreductases. in: **Enzymes in food processing.** Third Edition. California: Academic Press, Inc., 1993, p. 221-277.

26. HEMITT, T. et al**. Aerobic and anaerobic fermentation with varying stirring rates**. Carnegle Mellon University. Department of Chemical Engineering, 2001.

27. HESSELTINE, C. W. Solid state fermentation: An overview. **International Biodeterioration**. v. 23, p. 79-89, 1987.

28. HURD, C.; SINS, J. Derivates of kojic acid. **Chemical Laboratory of Northwestern University**. v. 71, p. 2040-2043, 1949.

29. KAMPEN, Willem H. Nutritional requirements in fermentation processes. in.: **Fermentation and Biochemical Engineering Handbook: Principles, Process Design and Equipment**. [s.l]: William Andrew Publishing, 1997, p. 122-160.

30. KAMINO, T.; KURAMOCHI, K.; KOBAYASHI, S. A concise approach to 5-substitued-4-pyronas from kojic acid. **Tetrahedron Lettes**. v. 44, p. 7349-7351, 2003.

31. KHARCHENKO, S.N. The biosynthesis of kojic acid by *Aspergillus flavus* Link starins isolated from feed. ***Mikrobiol. Zh***. v. 61**,** p. 15ï 21, 1999.

32. KELLER, F.A.; HAMILTON, J.E.; NGUYEN, Q.A. Microbial Pretreatment of Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 105, p. 27-41, 2003.

33. KIM, H.; CHOI, J.; CHO, J.; KIM, S. Y.; LEE, YOON-SIK. Solid-phase synthesis of kojic acid-tripeptides and their tyrosinase inhibitory activity, storage stability, and toxicity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 14, p. 2843-2846, 2004.

34. KLEIN, J. R.; OLSEN, N. S. (1970). Inhibitory effect of kojic acid upon oxidations mediated by liver and kidney. ***J. Biol. Chem*** . v. 170**,** p.151ï 157, 1970.

35. KOBAYASHI, T. et al. Semi-continuos production of lauloil kojic acid through lípase-catalyzed condensation in acetonitrile. **Biochemical Engineering Journal**. v.9, p. 85-89, 2001.

36. LIMA, U., AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia: Tecnologia das Fermentações**. São Paulo: Edgar Blücher. v.1, 1982, 285 p.

37. LIMA, U. et al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgar Blücher. v. 3, 2001, 593 p.

38. LIN, M. T. et al. High production of kojic acid crystals by *Aspergillus parasiticus* UNBF A12 in liquid medium. **Applied and Enviromental Microbiology**. v. 28, n.1, p 298-299, Aug. 1976.

39. MAGNUSON, J. K.; LASURE, L. L.; Organic acid production by filamentous fungi. in: **Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture and medicine**. [s.l]: Plenum Publishers, 2004, p. 307-340.

40. MARWAHA, S.; SOHI, G. Organomercury(II) Complexes of Kojic Acid and Maltol: Synthesis, Characterization, and Biological Studies. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 54, p.67-74, 1994.

41. MAY, O. E.; MOYER, A. J.; WELLS, P. A.; HERRICK, H. T. The production of kojic acid by *Aspergillus flavus*. **Chemistry and Soils**. n. 53, p. 774-782, 1931.

42. MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem**. v. 11, p. 426-428, 1959.

43. ÔMURA, S.; TANAKA Y. Control of ammonium ion level in antibiotic fermentation. In.: **Biological, biochemical, and biomedical aspects of actinomycetes**. Orlando: Academic Press, 1984. p. 367-379.

44. OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. Development and nalidation of absorbance capacity assay using fluorescein an the fluorescent probe. **J. Agric. Food Chem**. v. 49, p. 4619-4626, 2001.

45. SLOAT, M. J. Glycolosis and alcoholic fermentation. **Institute for Creation Research**. n. 90, Dec. 1980.

46. SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**. *no prelo*, 2006.

47. PAPAGIANNI, Maria. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**. v. 22, p. 189-259, 2004.

48. RALPH, B.J. Solid substrate fermentations. **Food Technology in Australia**. v. 28, p.247-251, 1976.

49. RAPER, K.B.; FENNELL, D.I.**The Genus *Aspergillus.*** Baltimore: The Williams & Wilking Company, 1965.

50. ROSFARIZAN, M.; ARIFF, A. B. Kinetics of kojic acid fermentation by *Aspergillus flavus* using different tipes and concentrations of carbon and nitrogen sources. **Journal of industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 25, p. 20-24, 2000.

51. ROSFARIZAN, M.; ARIFF, A.; HASSAN, M.; KARIM, M.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S**.** Importance of Carbon Source Feeding and pH Control Strategies for Maximum Kojic Acid Production from Sago Starch by *Aspergillus flavus*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 94, p. 99-105, 2002.

52. SANTOS, A.S. **Métodos de Separações Aplicados a Processos Biotecnológicos:** Disciplina do curso de mestrado, 03 de março de 2005 (Nota de aula).

53. SHREVE, R. N.; BRINK, J. A. **Indústria de processos químicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 717p. 1974.

54. SMITS, B. L.; BARHAM, H. N. Production of kojic acid from xylose by *Aspergillus flavs*. **Industrial and Engineering Chemistry**. n. 28, n. 5, p. 567-570, may. 1936.

55. TEREBIZNIK, M.R ; PILOSOF, A. M. R. Biomass estimation in solid state fermentation by modeling dry matter weight loss. **Journal of Biotecnology**. v. 13, p. 215-219, 1999.

56. TREVAN, M.D. et al. **Biotecnologia : Princípios Biológicos**. Zaragoza: Acribia S.A, 1990, 284 p.

57. SARQUIS, M. I. M. Informação verbal, 2005.

58. WAN, H. M. et al. Combining induced mutation and protoplasting for strain improvement of *Aspergillus oryzae* for kojic acid production. **Biotechnology Leters**. n. 26, p. 1163-1166, 2004.

59. WARD, Owen P. **Biotecnologia de la fermentacion**. Zaragoza: Acribia S.A, 1990, 275 p.

60. WOLFE, Ralph S. Guest comentary: Anaerobic life-a centennial view. **Journal of Bacteriology**. v. 181, n.11, p. 3317-3320, june 1999.

61. ZHENG, Zuoxing; SHETTY, Kalidas. Solid-state fermentation and value-added utilization of fruit and vegetable processing by-products. In: **Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology**. v.1-4, 1999, 2816 p.

62. ZNIDARSIC, Polona; PAVKO, Alekander. The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as bioprocess parameter. **Food Tecchnol. Biotechnol**. n. 39, p. 237-252, 2001.