



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**MAYRA DE LIMA MENDONÇA**

**Estudo da recuperação e purificação de bicaverina  
produzida por *Fusarium oxysporum* CCT7620**

**Study of the recovery and purification of bikaverin  
produced by *Fusarium oxysporum* CCT7620**

CAMPINAS  
2019

MAYRA DE LIMA MENDONÇA

**Estudo da recuperação e purificação de bicaverina produzida por *Fusarium oxysporum* CCT7620**

**Study of the recovery and purification of bikaverin produced by *Fusarium oxysporum* CCT7620**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra na Área de Ciência em Alimentos.

Dissertation presented to the Faculty of Food engineering of University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master in the area of Food Science.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À  
VERSÃO FINAL DE DISSERTAÇÃO  
DEFENDIDA PELA ALUNA MAYRA DE LIMA  
MENDONÇA E ORIENTADA PELO PROF.  
DR. JULIANO LEMOS BICAS

---

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

C523e Mendonça, Mayra de Lima, 1990-  
Estudo da recuperação e purificação de bicaverina produzida por *Fusarium oxysporum* CCT7620 / Mayra de Lima Mendonça. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Juliano Lemos Bicas.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. *Fusarium oxysporum*. 2. Policetídeo. 3. Biotecnologia. 4. Cromatografia. 5. Corante natural. I. Bicas, Juliano Lemos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Study of the recovery and purification of bikaverin produced by *Fusarium oxysporum* CCT7620

**Palavras-chave em inglês:**

*Fusarium oxysporum*

Polyketide

Biotechnology

Chromatography

Natural dye

**Área de concentração:** Ciência de Alimentos

**Titulação:** Mestra em Ciência de Alimentos

**Banca examinadora:**

Juliano Lemos Bicas [Orientador]

Marcus Bruno Soares Forte

Marcelo Perecin de Arruda Ribeiro

**Data de defesa:** 27-11-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Ciência de Alimentos

**Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)**

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-2327-9457>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8520644688244476>

## COMISSÃO EXAMINADORA

---

**Presidente: Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas**

(Universidade Estadual de Campinas)

---

**Titular: Marcus Bruno Soares Forte**

(Universidade Estadual de Campinas)

---

**Titular: Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro**

(Universidade Federal de São Carlos)

*Ata da defesa com as respectivas  
assinaturas dos membros encontra-se no  
SIGA/Sistema de fluxo de Dissertação e  
na secretaria do Programa da unidade.*

*“A mente que se abre a uma nova ideia,  
jamais voltará ao seu tamanho original”.*

*Albert Einstein*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela oportunidade de concluir mais uma etapa em meus estudos, me tornando a primeira mestra da família e podendo essa oportunidade ser transmitida em forma de orgulho para meus pais, que sempre me apoiaram incessantemente para que eu pudesse chegar até aqui. Devo tudo a vocês!

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas pela paciência, atenção, empatia e por todo o ensinamento durante o decorrer do meu mestrado e por todo o apoio desde o início dessa jornada.

Agradeço aos meus amigos, em especial o Lucas Caldeirão, pela ajuda e apoio, mesmo estando uma temporada em Portugal. A Letícia Cardoso e ao Viny Lanza pela ajuda incessante durante todo o mestrado. A Marina Cedran por todo o apoio e ajuda, sendo a melhor companheira de laboratório que eu poderia ter conhecido.

Ao Nadir e a Dalva, pelo companheirismo no laboratório.

Agradeço a UNICAMP, e aos professores do Programa de Ciência em Alimentos, onde tive a oportunidade de aprender com seus ensinamentos nas disciplinas ministradas. A professora Taícia Fill, do Instituto de Química, por todo o apoio, paciência e carinho.

Ao Laboratório de Biotecnologia em Alimentos, ao Laboratório de Bioaromas, ao Laboratório de Biologia Química Microbiana e ao Laboratório de Engenharia Metabólica e de Bioprocessos, onde se realizaram esse trabalho.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma direta ou indiretamente me ajudaram em alguma etapa ao decorrer do meu projeto, tanto como ajuda em análise e no laboratório, como em conselhos e paciência como um ombro amigo, minha eterna gratidão.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## LISTA DE ABREVIações

|                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>HPLC</b>             | High performance liquid chromatography      |
| <b>Abs500</b>           | Absorbância a 500 nanômetros                |
| <b>UV-Vis</b>           | Ultravioleta e visível                      |
| <b>LogP</b>             | Coeficiente de partição                     |
| <b>PTFE</b>             | Politetrafluoretileno                       |
| <b>DO<sub>500</sub></b> | Densidade óptica                            |
| <b>QTOF</b>             | Quadropole Time of Flight Mass Spectrometry |
| <b>RMN</b>              | Ressonância magnética nuclear               |

## RESUMO

Cada vez mais, os processos biotecnológicos estão sendo alvo de estudo e aplicação para os mais diversos fins. No setor de aditivos alimentares, por exemplo, esses estudos visam suprir a crescente demanda por produtos naturais e sustentáveis. Existem muitos estudos sobre a produção de pigmentos por microorganismos e avaliação de suas propriedades para além da pigmentação, o que também incentiva novas pesquisas. O *Fusarium oxysporum* é um fungo que vem sendo muito estudado em processos biotecnológicos e, no caso da produção de pigmentos, ele é reconhecido por produzir a bicaverina, um metabólito secundário, que além de ser um pigmento de coloração vermelha, possui propriedades biológicas como ação contra determinados protozoários, atividade antifúngica, anti-oomicetos e nematocida. O presente trabalho teve o objetivo de produzir a bicaverina a partir da fermentação submersa em meio arroz por *Fusarium oxysporum* CCT7620 e purificar testando diferentes métodos: cromatografia em coluna aberta (sílica gel), cromatografia em coluna aberta (sephadex), nanofiltração e HPLC semi-preparativo. Comparativamente, foi verificado que o melhor método de purificação da bicaverina foi através de cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa (HPLC semi-preparativo), onde a mesma apresentou grau de pureza equivalente ao padrão comercializado quando analisada em HPLC-DAD. Além do parâmetro cromatográfico de tempo de retenção, o extrato purificado foi caracterizado quanto ao perfil de espectro UV-vis que sugeriram a identidade da bicaverina, sendo confirmada por espectrometria de massas de alta resolução (Q-TOF/MS), em comparação com padrão comercial. O espectro de massas apontou fragmentos de razão massa-carga ( $m/z$ ) característicos da molécula (355, 340, 324, 219, 123), íon molecular protonado experimental de 383,0763 [M + H]<sup>+</sup> e massa calculada de 383.0766. Além do mais, foi feita uma análise técnica-econômica da obtenção do extrato bruto, onde o modelo contemplou parâmetros como custo das etapas de obtenção da bicaverina, mão de obra, depreciação de equipamentos, custo de produção por ciclos, etc, onde foi possível considerar que o ideal de extração sequencial (1:1, v/v) são de três ciclos com acetato de etila por 4 horas e 20 minutos à 25°C/200 rpm, sendo que na terceira extração, é possível extrair cerca de 75% do total de bicaverina produzida.

**Palavras-chave:** *Fusarium oxysporum*; Policetídeo; Biotecnologia; Cromatografia; Corante natural.

## ABSTRACT

Biotechnological processes are increasingly being studied and applied in several areas, such as the food additives sector, to meet the growing demand for natural and sustainable products. There are many studies on the production of pigments by microorganisms and the evaluation of their properties in addition to pigmentation, which has encouraged further research. *Fusarium oxysporum* is a fungus that has been widely studied in biotechnological processes and in the case of pigment production, it is recognized for producing bikaverin, a red pigment with action against certain protozoa and also with antifungal activity, anti-oomycetes and nematicide. In the present work had the objective of producing the bikaverin from the submerged fermentation in rice medium by *Fusarium oxysporum* CCT7620 and to purify it by testing different methods: open column chromatography (silica gel), open column chromatography (sephadex), nanofiltration and HPLC semi-preparative. Comparatively, it was found that the best method of purification of bikaverin was through semi-preparative high performance liquid chromatography (semi-preparative HPLC), where it presented a degree of purity equivalent to the standard sold when analyzed in HPLC-DAD. In addition to the retention time chromatographic parameter, the purified extract was characterized in terms of the UV-vis spectrum profile that suggested the identity of the bikaverin, being confirmed by high resolution mass spectrometry (Q-TOF / MS), in purchase with standard commercial. The mass spectrum showed fragments of the mass-charge ratio ( $m/z$ ) characteristic of the molecule (355, 340, 324, 219, 123), experimental protonated molecular ion of 383.0763  $[M + H]^+$  and calculated mass of 383.0766. In addition, a technical-economic analysis was made of obtaining the crude extract, where the model included parameters such as cost of the steps to obtain bikaverin, labor, depreciation of equipment, cost of production per cycle, etc., where it was possible consider that the ideal of sequential extraction (1: 1, v / v) is three cycles with ethyl acetate for 4 hours and 20 minutes at 25°C / 200 rpm, and in the third extraction, it is possible to extract about 75% of the total bikaverin produced.

**Keywords:** *Fusarium oxysporum*; Polyketide; Biotechnology; Chromatography, Natural dye.

## SUMÁRIO

|              |  |    |
|--------------|--|----|
| 1.           | INTRODUÇÃO .....                                   | 12 |
| 2.           | OBJETIVO .....                                     | 15 |
| 2.1.         | Objetivo geral .....                               | 15 |
| 2.2.         | Objetivo específico .....                          | 15 |
| 3.           | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                        | 16 |
| 3.1.         | CORANTES ALIMENTARES .....                         | 16 |
| 3.1.1.       | Mercado nacional de Corantes .....                 | 18 |
| 3.1.2.       | Corantes sintéticos .....                          | 20 |
| 3.1.3.       | Corantes naturais .....                            | 21 |
| 3.1.4.       | Micro-organismos produtores de corantes .....      | 23 |
| 3.1.5.       | Fungos produtores de corantes .....                | 28 |
| 3.1.5.1.     | Gênero <i>Fusarium</i> .....                       | 29 |
| 3.1.5.1.1.   | <i>Fusarium oxysporum</i> .....                    | 29 |
| 3.1.5.1.1.1. | Bicaverina .....                                   | 30 |
| 4.           | MATERIAL E MÉTODOS .....                           | 32 |
| 4.1.         | PRODUÇÃO DE BICAVERINA .....                       | 32 |
| 4.2.         | PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO .....                     | 33 |
| 4.2.1.       | Estudo do solvente extrator .....                  | 33 |
| 4.2.2.       | Cinética de extração .....                         | 34 |
| 4.2.3.       | Efeito de extrações sequenciais .....              | 34 |
| 4.2.4.       | Análise técnico-econômica .....                    | 34 |
| 4.3.         | PURIFICAÇÃO DA BICAVERINA .....                    | 35 |
| 4.3.1.       | Cromatografia em coluna aberta – Sílica gel .....  | 35 |
| 4.3.2.       | Separação em coluna aberta – Sephadex .....        | 35 |
| 4.3.3.       | Nanofiltração .....                                | 35 |
| 4.3.4.       | Purificação em sistema HPLC semi-preparativo ..... | 36 |

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 4.4.   | CONDIÇÕES ANALÍTICAS .....   | 37 |
| 4.4.1. | Monitoramento da quantidade de pigmento por espectrofotometria ..... | 37 |
| 4.4.2. | HPLC-DAD .....   | 37 |
| 4.4.3. | Espectrometria de massas (Q TOF-MS).....                             | 37 |
| 4.5.   | ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....                                   | 38 |
| 5.     | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 38 |
| 5.1.   | Extração da bicaverina .....   | 38 |
| 5.1.1. | Estudo do solvente extrator .....                                    | 38 |
| 5.1.2. | Cinética de extração .....   | 40 |
| 5.1.3. | Extrações sequenciais .....  | 40 |
| 5.1.4. | Análise técnico-econômica da obtenção do extrato bruto.....          | 41 |
| 5.2.   | PURIFICAÇÃO DA BICAVERINA .....                                      | 43 |
| 5.2.1. | Coluna aberta – Silica gel .....                                     | 43 |
| 5.2.2. | Coluna aberta - Sephadex .....                                       | 45 |
| 5.3.   | Nanofiltração.....   | 46 |
| 5.4.   | Purificação do extrato em sistema HPLC semi-preparativo.....         | 47 |
| 5.5.   | IDENTIFICAÇÃO DA BICAVERINA .....                                    | 48 |
| 5.5.1. | HPLC-QTOF-MS/MS.....   | 48 |
| 5.6.   | Curva de calibração de bicaverina .....                              | 50 |
| 5.6.1. | Caracterização físico-química da bicaverina purificada. ....         | 52 |
| 6.     | CONCLUSÃO .....  | 54 |
| 7.     | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                     | 56 |
| 8.     | ANEXOS .....   | 62 |

## 1. INTRODUÇÃO

Os corantes naturais são utilizados e comercializados desde a antiguidade para colorir diferentes materiais: paredes, fibras naturais (lã, algodão e seda), papel, couro, alimentos, cosméticos, além de serem empregados na produção de tintas. Tradicionalmente, os corantes naturais são extraídos de flores, frutos, raízes de plantas, insetos e microrganismos, por processos como maceração, destilação, fermentação, decantação, precipitação, filtração e etc. O uso de corantes naturais para fins alimentícios declinou após a descoberta de corantes sintéticos por William Perkin em 1856 (CRISTEA; VILAREM, 2006), mas sua demanda voltou a aumentar nos últimos anos em virtude da maior preocupação por parte da comunidade científica, e por conseguinte dos consumidores, com aspectos de segurança e sustentabilidade (BARANI, 2008).

Os corantes utilizados pelas indústrias, são substâncias com características complexas, como alta absorvidade, contendo centros cromóforos baseados em grupos funcionais (azo, antraquinona, polimetino, nitro, nitroso, xanteno, entre outros), podendo assim, serem classificados comercialmente como reativos, diretos, ácidos, sulforosos, branqueadores ópticos entre outros (ZANONI; YAMANAKA, 2016).

Especificamente para a indústria de alimentos, para além de sua função principal, que é colorir, alguns corantes naturais exibem também atividades biológicas e tecnológicas, tais como ação antioxidante, propriedades anticancerígenas e antibióticas, além de serem biodegradáveis. Já os pigmentos sintéticos podem causar danos ambientais e efeitos toxicológicos adversos, como no caso do vermelho 40 e do amarelo de tartrazina, por exemplo (MALIK; TOKKAS; GOYAL, 2012).

Dos corantes de origem vegetal, destacam-se o urucum (*Bixa orellana L.*), açafrão-da-terra (cúrcuma longa), açafrão (*Crocus sativus*), a páprica ou pimentão vermelho (*Capsicum annuum L.*), e o cravo-de-defunto (*marigold*). Dos de origem animal, o mais expoente é o corante carmim, que é extraído a partir de fêmeas dessecadas da cochonilha da espécie *Dactylopius coccus*. Já dos de origem mineral, destacam-se os pigmentos das classes dos sulfuretos, dos óxidos, dos carbonatos e dos silicatos (CRUZ, 2006). Comercialmente os corantes mais

empregados pelas indústrias alimentícias têm sido os extratos de urucum, carmim de cochonilha, curcumina, antocianinas e as betalaínas. Quanto aos pigmentos obtidos de microrganismos, eles apresentam certas vantagens pois sua produção não depende de fatores sazonais e climáticos, ocorre em condições otimizáveis e é ambientalmente amigável e são naturais seguindo portanto uma tendência comercial (AZEVEDO et al, 2016; GUPTA et al, 2011; TIBOR, 2007).

Dentre as classes de microrganismos produtoras de pigmentos, destacam-se os fungos que são hoje uma alternativa alternativa aos corantes sintéticos, especialmente quando se trata de corantes vermelhos. Alguns policetídeos específicos de espécies *Ascomycetous* demonstraram uma ampla gama de aplicações industriais em alimentos, cosméticos, têxtil e na concepção de produtos farmacêuticos (LEBEAU et al., 2017; LEBEAU et al, 2019). O *Fusarium oxysporum* é um fungo que pode ser utilizado para este fim. Ele pode ser encontrado nos solos, sendo algumas linhagens são patogênicas e responsáveis por contaminar várias espécies de plantas (fusariose), mas outras, não patogênicas, podem viver em plantas sem causar doenças. Ademais, diversas estirpes não patogênicas de *Fusarium oxysporum* foram selecionadas como potenciais agentes de controle biológico (GORDON; MARTYN, 1997; BENHAMOU; GARAND 2001; SHISHIDO et al., 2005).

Alguns gêneros de *Fusarium* produzem alguns compostos secundários, dentre eles, a bicaverina, um pigmento de coloração avermelhada que possui propriedades antibióticas contra determinados protozoários, atividade antifúngica especialmente contra fungos filamentosos, atividade anti-oomicetos e nematicida (CORNFORTH et al., 1971; BALAN et al., 1970; KWON et al., 2007; SON et al., 2008; LIMÓN E ORTIZ, 2010). A Bicaverina foi isolada pela primeira vez a partir de *Fusarium oxysporum sp. vasinfectum* e foi chamada de licopersina por causa de sua coloração vermelha (DESHMUKH et al., 2013).

Novas fontes de obtenção de pigmentos naturais, impulsionam novos trabalhos, otimização de processos, estudos toxicológicos e questões regulatórias (DUFOSSÉ, 2005).

A cromatografia é uma técnica muito importante que permite a separação, identificação e purificação dos componentes de uma mistura para análise qualitativa

e quantitativa, sendo nesse processo, fatores de separação que incluem características moleculares relacionadas à adsorção (líquido-sólido), partição (líquido-sólido) e afinidade ou diferenças entre seus pesos moleculares. Devido a essas diferenças, alguns componentes da mistura acabam possuindo maior afinidade com a fase estacionária, movendo-se lentamente na coluna, enquanto outros passam rapidamente para a fase móvel e deixam o sistema mais rápido (COSKUN, 2016).

Os métodos de separação utilizados no presente trabalho, foram utilizadas técnicas cromatográficas como cromatografia em coluna aberta (Sílica Gel), cromatografia em coluna aberta (Sephadex), HPLC-DAD e por técnica de Nanofiltração.

## 2. OBJETIVO

### 2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem por objetivo produzir, extrair e purificar o pigmento bicaverina obtido a partir do cultivo de *Fusarium oxysporum* CCT7620.

### 2.2. Objetivo específico

- Produzir a Bicaverina por *F. oxysporum* CCT7620 por meio de fermentação submersa utilizando extrato do arroz obtido;
- Testar diferentes solventes para extração do pigmento vermelho da biomassa microbiana (*F. oxysporum*);
- Avaliar o estudo cinético de extração com o solvente escolhido;
- Avaliar o efeito de extrações sequenciais no rendimento de extração do pigmento;
- Sugerir um procedimento de recuperação de bicaverina a partir da biomassa microbiana considerando os resultados obtidos;
- Avaliar o grau de pureza do extrato obtido empregando cromatografia em coluna aberta, cromatografia preparativa e nanofiltração;
- Apresentar um estudo econômico, mostrando o custo das etapas dos processos para a obtenção da Bicaverina, desde a sua produção (inóculo) até a etapa de recuperação (concentração) do pigmento, envolvendo equipamentos, insumos, mão de obra, depreciação dos equipamentos e ciclos de extração.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. CORANTES ALIMENTARES

Muitas vezes a cor desempenha um papel importante na escolha de alimentos e bebidas para os consumidores. Como característica sensorial, é uma base para a avaliação da qualidade, com base nesse ponto, a coloração é considerada uma característica sensorial crucial para a expectativa dos consumidores em alimentos, influenciando suas preferências, aceitabilidade e escolha final dos produtos (BRIDLE; TIMBERLAKE, 1997).

De acordo com a Resolução n. 44, de 25 de novembro de 1977, da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), do Ministério da Saúde, o corante alimentício é “a substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimento e/ou bebidas”. Sucos, extratos de vegetais e outros ingredientes utilizados na elaboração de alimentos que já possuam coloração própria, não estão classificados nessa categoria, com exceção quando essa substância é adicionada para intensificar a coloração própria do produto (BRASIL, 1977).

Pela Resolução - CNNPA nº 44, de 1977 da ANVISA, os corantes são classificados em:

a) corante orgânico natural: aquele obtido a partir de vegetal, ou eventualmente, de animal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado;

b) corante orgânico sintético: aquele obtido por síntese orgânica mediante o emprego de processo tecnológico adequado;

c) corante artificial: é o corante orgânico sintético não encontrado em produtos naturais;

d) corante orgânico sintético idêntico ao natural: é o corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural;

e) corante inorgânico: aquele obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados a seu emprego em alimento;

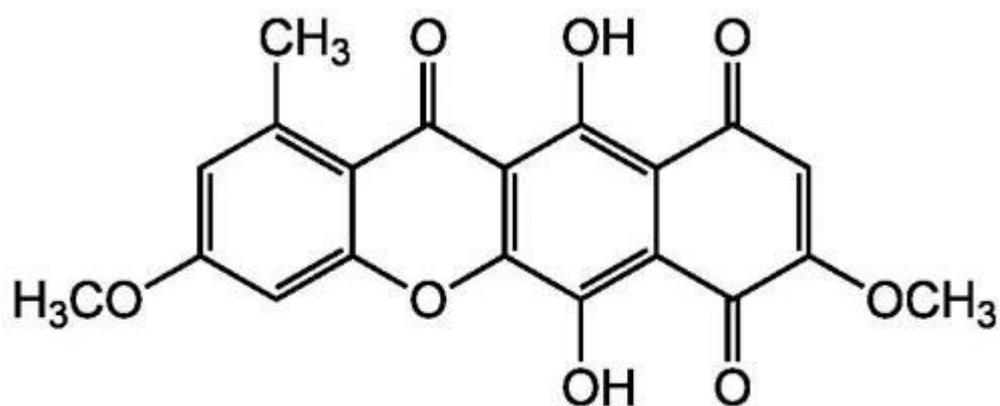
f) caramelo: o corante natural obtido pelo aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão;

g) caramelo (processo amônia): é o corante orgânico sintético idêntico ao natural obtido pelo processo amônia, desde que o teor de 4-metil, imidazol não exceda no mesmo a 200 mg.kg<sup>-1</sup>.

Para os corantes, a maneira mais apropriada de classificá-los, é através de sua estrutura química ou pelo seu grupo cromóforo, que é basicamente a estrutura responsável pela coloração apresentada pelo corante, possuindo característica de absorção na região ultravioleta e visível no espectro, particularmente devido as transições eletrônicas de um sistema conjugado de duplas ligações (ZANONI; YAMANAKA, 2016).

A produção industrial de pigmentos por fermentação atrai o interesse de pesquisadores e da indústria pela possibilidade de controle das condições de cultivo dos micro-organismos e sua produção ser previsível, otimizável, sustentável e independente de fatores sazonais (DUARTE, 2019). Adicionalmente, sua extração pode ser mais simples e há possibilidade de obtenção de maiores rendimentos (SANCHEZ; DEMAIN, 2002). Por isso, pesquisas com pigmentos microbianos devem ser intensificadas, principalmente na busca de um meio de crescimento barato e adequado que possa reduzir o custo e aumentar a sua aplicabilidade para a produção industrial (AHMAD et al, 2012).

Alguns gêneros de *Fusarium* produzem alguns compostos secundários, dentre eles, a bicaverina (Figura 1), um pigmento de coloração avermelhada que possui propriedades antibióticas contra determinados protozoários, atividade antifúngica contra fungos filamentosos, atividade anti-oomicetos e atividade nematicida. Quimicamente, a bicaverina é um policetídeo, compostos estes normalmente biossintetizados pela de condensação de unidades acetila ou malonila por enzimas especializadas, as policetídeo-sintases (CORNFORTH et al., 1971; BALAN et al., 1970; KWON et al., 2007; SON et al., 2008; LIMÓN E ORTIZ, 2010).



**Figura 1.** Fórmula estrutural da Bicaverina.

Na sequência serão apresentados mais detalhes sobre as diferentes classes de corantes (sintéticos, naturais e microbianos).

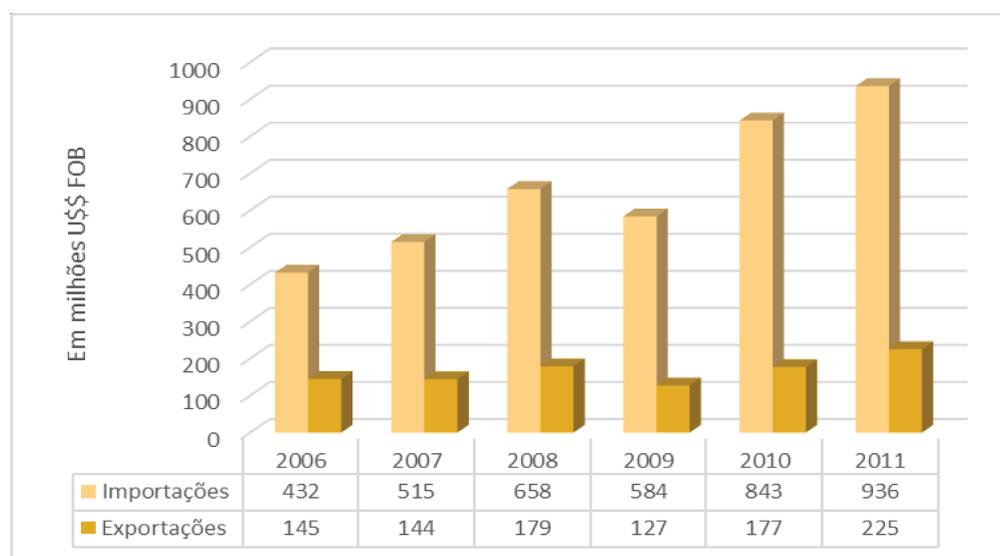
### **3.1.1. Mercado nacional de Corantes**

A coloração de um produto tem associação direta com a aparência, o valor final e com a aceitação deste pelo público consumidor. O reconhecimento dessa ferramenta comercial leva à intensificação de estudos sobre a cor e, conseqüentemente, a especialização nos métodos de coloração (CROMEX, 2001). Em relação ao mercado de corantes do Brasil, ainda é pequeno o número de empresas nacionais produtoras de corantes, conforme apresentado na Tabela 1 (ABIQUIM, 2012). Mesmo com a produção de corantes em crescimento, pode-se notar o que nível de importação ainda é bem maior comparado aos de exportação no Brasil, como visualizado na Figura 2.

**Tabela 1.** Empresas produtoras de corantes, pigmentos e branqueadores no Brasil.

| PRODUTOR            | PRODUTOS   |
|---------------------|--|
| A Chemical          | Corantes ácidos, corantes básicos e corantes diretos   |
| Bann Química        | Corantes à tina  |
| Basf                | Pigmentos orgânicos, corantes básicos, agentes de branqueamento óptico   |
| BrancoTex           | Pigmentos orgânicos  |
| Cabot               | Negro de Fumo  |
| Clariant            | Agentes de branqueamento óptico, corantes ácidos, corantes básicos, corantes à cuba, corantes diretos, corantes dispersos, corantes ao enxofre, corantes mordentes, corantes pré-metalizados, corantes reativos, pigmentos orgânicos |
| Columbian Chemicals | Negro de fumo  |
| Dry Color           | Pigmentos orgânicos  |
| DuPont              | Dióxido de titânio   |
| DyStar              | Corantes azóicos, brancos óticos e dispersão de pigmentos  |
| Lanxess             | Pigmentos inorgânicos  |
| Millennium/Cristal  | Dióxido de titânio   |

Fonte: ABIQUIM, 2012.

**Figura 2.** Importações e exportações brasileiras de corantes, pigmentos e branqueadores óticos.

Fonte: ABIQUIM, 2012.

### 3.1.2. Corantes sintéticos

Pela legislação atual, através das resoluções n. 382 e 388 da ANVISA, no Brasil é permitido o uso de apenas oito corantes artificiais: amarelo crepúsculo, tartrazina, azul brilhante, indigotina, bordeaux S (amaranto), eritrosina, ponceau 4R e vermelho 40, cujas propriedades estão resumidas na Tabela 2 (ANVISA, 2007). Os corantes inorgânicos que são aplicados nos alimentos têm seu emprego limitado sendo: carbonato de cálcio, dióxido de titânio, óxido e hidróxido de ferro, alumínio, prata e ouro (ANVISA, 2007).

**Tabela 2.** Corantes sintéticos permitidos e a ingestão diária aceitável.

| <b>NOME</b>            | <b>INS</b> | <b>COR</b>          | <b>IDA<br/>(mg/kg produto)</b> |
|------------------------|------------|---------------------|--------------------------------|
| Amaranto (Bordeaux S)  | E123       | Magenta             | 0,50                           |
| Vermelho de eritrosina | E127       | Pink                | 0,10                           |
| Vermelho 40            | E129       | Vermelho alaranjado | 7,00                           |
| Ponceau 4R             | E124       | Cereja              | 4,00                           |
| Amarelo crepúsculo     | E110       | Laranja             | 2,50                           |
| Amarelo tartrazina     | E102       | Amarelo limão       | 7,50                           |
| Azul indigotina        | E132       | Azul royal          | 5,00                           |
| Azul brilhante         | E133       | Azul turquesa       | 10,0                           |

Fonte: ANVISA, 2007.

Os aditivos sintéticos são severamente criticados e os consumidores mostram a restrição em relação a esses produtos (KOES; QUATTROCCHIO; MOL, 1994 e CSERHATI, 2006). Os aditivos podem causar irritação na pele (dermatite, urticária), problemas gastrointestinal (diarréia, dor abdominal, inchaço), respiratórios (falta de ar, exacerbações da asma, náusea) e cardiovascular (arritmias, palpitações, ataquecardia), portanto, há uma crescente demanda por corantes naturais, especialmente na indústria de alimentos (WILSON e BAHNA, 2005; ABEROUMAND, 2011).

### 3.1.3. Corantes naturais

Os corantes naturais permitidos para uso são: curcumina, riboflavina, ácido carmínico, urzela, clorofila, caramelo, carvão medicinal, carotenóides (alfa-caroteno, beta-caroteno, gama-caroteno, bixina, capsantina, licopeno), xantofilas (flavoxantina, luteína, criptoxantina, rubixantina, violaxantina, rodoxantina e cantaxantina), betanina, antocianinas (cianidina, peonidina, malvidina) (ANVISA, 2007).

Os corantes naturais possuem como principal limitação sua estabilidade. As antocianinas, por exemplo, são pigmentos vegetais responsáveis por uma diversidade de cores encontradas em muitos tipos de flores, frutos, algumas folhas, caules e raízes de plantas, que podem variar do vermelho vivo ao violeta/azul. Quimicamente, são compostos fenólicos pertencentes ao grupo dos flavonoides. São compostos solúveis em água e altamente instáveis em temperaturas elevadas, são sensíveis à oxidação, desbotam com dióxido sulfúrico e variam com o pH, limitando a sua aplicação em alimentos e bebidas ácidas (MAPARI et al., 2005).

Os carotenóides são pigmentos terpenóides, produzidos por bactérias, fungos, algas e plantas, e são encontrados em animais, que geralmente os obtêm através da dieta. Nas plantas, como em frutas e flores, possuem uma coloração marcante laranja, amarelo e vermelho e desempenham importantes funções metabólicas e fisiológicas (AVALOS e LIMÓN, 2015).

As betaninas, carotenóides e pigmentos de clorofila contêm hidrogênios lábeis e são facilmente descolorizados por oxidação, sendo sensíveis à luz, calor e oxigênio. Essas características limitam a utilização desses aditivos de cor durante o processamento, estocagem e aparência dos alimentos em que foram adicionados. A cúrcuma é o principal pigmento do açafrão da terra, sendo muito utilizada e seu interesse cresceu devido as propriedades benéficas que ela possui, como efeito antioxidante, antitumoral e antígenotóxica (MAPARI et al., 2005; MENDONÇA et al., 2009).

Os corantes naturais são extraídos de diversas fontes, como cascas de frutas, sementes ou raízes, tendo a condição de disponibilidade dessas fontes naturais para a extração do corante, podendo haver variação e o tipo de método aplicado para a extração de pigmento também pode afetar a coloração. Devido às

distintas fontes de cultivos, a composição química dos componentes e propriedades de estabilidade acabam variando. Um dos corantes naturais obtidos por via animal é o corante vermelho carmim (ácido carmínico), que é extraído de um inseto (*Dactylopius coccus*) à partir de corpos secos das fêmeas cochonilha, e para produzir 100 g de carmim são necessários aproximadamente 14.000 insetos. Por isso devem-se pesquisar outras fontes de obtenção de corantes (MAPARI et al., 2005; LEBEAU, et al., 2017).

Muitas propriedades dos corantes naturais foram reconhecidas apenas nas últimas décadas. Muitas plantas usadas para tintura, após extração é classificada como medicinal e demonstraram ter uma notável atividade antimicrobiana (HUSSEIN, et al., 1997). O corante de romã e outros corantes naturais comuns são relatados como potenciais agentes antimicrobianos devido à presença de uma grande quantidade de taninos. (SINGHA, 2005).

Apesar da haver uma gama de vegetais com diferentes cores, o número de pigmentos presentes em plantas ainda é pequeno. A faixa de cores verdes em folhas de vegetais é resultado da combinação de clorofilas e carotenóides. A cor vermelha da maioria das frutas, como as cerejas, é produzida principalmente por pigmentos antocianinas. Betalaínas, quinonas, alguns carotenóides e flavonóides e outra classe de pigmentos, incluindo fenalonas (curcumina), apresentam uma contribuição pouco significativa (WISSGOTT e BORTLIK, 1996).

A utilização de pigmentos naturais de fontes não convencionais (derivados de algas e micro-organismos) ou fontes convencionais (plantas e flores), para a parte alimentícia, reflete a importância do estudo de novos de obtenção de novas fontes (DUFOSSÉ, et al., 2014).

Entre as fontes não convencionais, alguns metabólitos secundários de fungos exibem atividades biológicas úteis e são de interesse para as indústrias farmacêutica, alimentícia e agroquímica. Um dos metabólitos secundários, produzidos pelo *Fusarium oxysporum*, é a bicaverina, um pigmento avermelhado e devido suas diversas atividades biológicas, tem tido um maior interesse biotecnológico (GUNATHILAKA, 2010).

### 3.1.4. Micro-organismos produtores de corantes

Os pigmentos naturais são provenientes de minérios, insetos, plantas e micro-organismos. Entre os micro-organismos, as bactérias têm muita relevância, devido sua potencial produção de diversos bioprodutos, sendo um deles os pigmentos. A produção e aplicação de pigmentos microbianos como corantes naturais tem sido investigada por alguns pesquisadores (JOSHI, et al., 2003; AHMAD, et al., 2012). Os fungos secretam diversas classes de pigmentos, chamados de metabólitos secundários, incluindo carotenóides, melaninas, flavinas, fenazinas e quinonas (DUFUSSE, et al, 2014; MAPARI, et al, 2010). Atualmente, vários pigmentos de origem microbiana (Figura 3) são utilizados como aditivos ou suplementos na indústria de alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos, ração para gado, dentre outras aplicações, tendo como tendência a o apelo natural (VENIL; ZAKARIA; AHMAD, 2013).

Pesquisas de linhagens microbianas que utilizam substratos baratos e renováveis ajudarão a viabilizar a produção dos pigmentos, fazendo com que sejam mais competitivos comparados aos pigmentos sintéticos. Embora o preço do pigmento microbiano seja relativamente maior em comparação com os corantes sintéticos, o custo de produção pode ser feito empregando resíduos agrícolas, como resíduos de abacaxi, cana-de-açúcar e melão (VENIL; ZAKARIA; AHMAD, 2013).

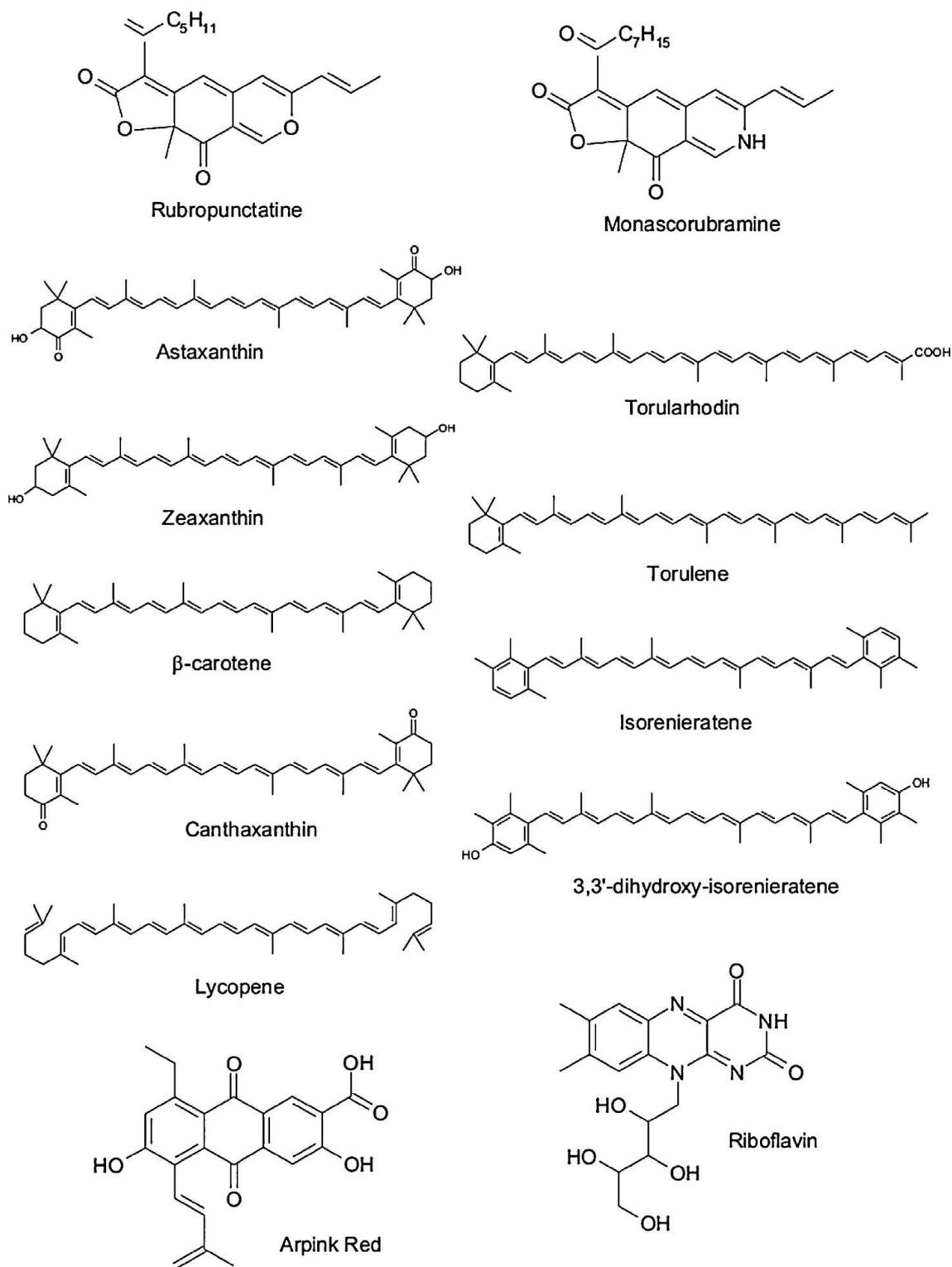
Os pigmentos por micro-organismos possuem várias aplicações industriais, sendo amplamente estudado por ser uma ótima fonte para corantes alimentares, possuindo atividades anticancerígenas, produção de pró-vitamina A e propriedades desejáveis, como estabilidade à luz, calor e pH além desses produzirem consorcialmente outros compostos como aminoácidos e enzimas (VENIL; LAKSHMANAPERUMALSAMY, 2009; JOSHI, et al., 2003; ABEROUMAND, 2011 e AHMAD, 2012).

Além de alguns corantes naturais apresentarem benéfico para a saúde dos seres humanos, são muito interessantes devido a preservação da biodiversidade do meio ambiente, comparados aos produtos químicos e sintéticos que são lançados no ambiente (NAGPAL, et al., 2011). Devido a algumas desvantagens dos corantes naturais, como a dependência do fornecimento de

matéria-prima, menor estabilidade térmica e pH e variação no processo de extração, os fungos são uma opção de fácil acesso para a obtenção dos corantes, pois produzem uma gama de pigmentos, sendo facilmente produzidos em condições industriais e tendo uma obtenção de rendimento mais elevado (MAPARI et al., 2005).

A utilização de fungo para produção de corante alimentar, como o *Monascus* spp, fez com que surgisse maior interesse na produção desses compostos por via biotecnológica. Ademais, com os avanços na tecnologia genética, poderá se utilizar a engenharia metabólica para criar fábricas microbiana de células, para a produção de corantes alimentares (MAPARI et al., 2005).

A quantidade e diversidade de metabólitos secundários de fungos, podem ter impactos positivos, devido a variação e facilidade do ambiente de crescimento. A otimização das condições de cultivos no cenário industrial, pode levar ao aumento da produção de um composto de interesse (VANDERMOLEN, et al., 2013).



**Figura 3:** Estrutura de pigmentos de qualidade alimentar microbiana.

Fonte: DUFOSSÉ, L., et al. 2006

Alguns pigmentos microbianos de qualidade alimentar já estão no mercado, como os pigmentos produzidos pelos micro-organismos *Monascus purpureus*, astaxantina de *Xanthophyllomyces dendrorhous*, Arpink Red de *Penicillium oxalicum*, riboflavina de *Ashbya gossypii* e caroteno de *Blakeslea trispora* (DUFOSSÉ, 2009).

Um dos pigmentos mais utilizados pela indústria é o beta-caroteno, que pode ser obtido a partir de algumas microalgas. A astaxantina é um pigmento vermelho com grande valor agregado, utilizado em alimentos para animais, produtos farmacêuticos e aquicultura, pode ser obtida por *Phaffia rhodozoa* e *Haematococcus pluvialis* (KUMARI et al., 2009). A capacidade de produzir pigmentos com alto rendimento inclui espécies e uma variedade de gêneros e cores obtidos de fontes microbianas (Tabela 3) como obtidos de *Monascus*, *Paecilomyces*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Penicillium herquei* e *Penicillium atrovenetum*, *Rhodotorula*, *Sarcina*, *Bacillus*, etc. Espécies de *Monascus*, produzem pigmentos que são muito usados na produção de alimentos tradicionais do Leste Asiático, como o vermelho Vinho de arroz e coalhada de feijão vermelho (KUMARI et al., 2009).

**Tabela 3.** Pigmentos obtidos por fontes microbianas.

| MICRO-ORGANISMO   | PIGMENTO/MOLÉCULA | COR/APARÊNCIA      |
|---|-------------------|--------------------|
| <b>BACTÉRIAS</b>  |                   |                    |
| <i>Agrobacterium aurantiacum</i>                                    | Carotenóide       | Vermelho           |
| <i>Paracoccus carotinifaciens</i>                                   | Carotenóide       | Vermelho           |
| <i>Bradyrhizobium sp.</i>   | Cantaxantina      | Vermelho intenso   |
| <i>Flavobacterium sp.</i> ,<br><i>Paracoccus zeaxanthin faciens</i> | Zeaxantina        | Amarelo            |
| <i>Achromobacter</i>  |                   | Creme              |
| <i>Bacillus</i>   |                   | Marrom             |
| <i>Brevibacterium sp.</i>   |                   | Amarelo alaranjado |
| <i>Corynebacterium insidiosum</i>                                   | Índigo-carmin     | Azul               |
| <i>Rugamonas rubra</i> ,<br><i>Alteromonas rubra</i>                | Prodigiosina      | Vermelho           |

|  |                   |                     |
|--|-------------------|---------------------|
| <i>Rhodococcus maris</i>   |                   | Vermelho Azulado    |
| <i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>   | Carotenóide       | Vermelho            |
| <i>Haloferax alexandrinus</i>  | Cantaxantina      | Vermelho intenso    |
| <i>Staphylococcus aureus</i>   | Estafiloxantina   | Dourado             |
| <i>Chromobacterium violaceum</i>   | Violaceína        | Roxo                |
| <i>Serratia marcescens</i> ,<br><i>Serratia rubidaea</i>   | Prodigiosina      | Vermelho            |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | Piocianina        | Azul esverdeado     |
| <i>Xanthomonas oryzae</i>  | Xanthomonadina    | Amarelo             |
| <i>Janthinobacterium lividum</i>   | Violaceína        | Roxo                |
| <b>Algas</b>   |                   |                     |
| <i>Dunaliella salina</i>   | $\beta$ -caroteno | Vermelho            |
| <i>Chlorococcum</i>  | Luteína           | Amarelo limão       |
| <i>Haematococcus</i>   | Cantaxantina      | Vermelho intenso    |
| <b>FUNGOS</b>  |                   |                     |
| <i>Aspergillus sp.</i>   |                   | Alaranjado          |
| <i>Aspergillus glaucus</i>   |                   | Vermelho intenso    |
| <i>Blakeslea trispora</i>  | $\beta$ -caroteno | Alaranjado          |
| <i>Helminthosporium centenarium</i>  |                   | Vermelho            |
| <i>Penicillium cyclopium</i>   |                   | Laranja             |
| <i>Penicillium nalgiovense</i>   |                   | Amarelo             |
| <i>Fusarium sporotrichioides</i>   | Licopeno          | Vermelho            |
| <i>Haematococcus pluvialis</i>   | Carotenóide       | Vermelho            |
| <i>Monascus purpureus</i>  | Monascina         | Amarelo             |
| <i>Monascus roseus</i>   | Cantaxantina      | Vermelho alaranjado |
| <i>Monascus sp.</i>  | Ankaflavina       | Amarelo             |
| <i>Penicillium oxalicum</i>  | Antraquinona      | Vermelho            |
| <i>Blakeslea trispora</i>  | Licopeno          | Vermelho            |
| <i>Cordyceps unilateralis</i>  | Naftoquinona      | Vermelho intenso    |
| <i>Ashbya gossypii</i>   | Riboflavina       | Amarelo             |
| <i>Mucor circinelloides</i> ,<br><i>Neurospora crassa</i> and<br><i>Phycomyces blakesleeanus</i> | $\beta$ -caroteno | Amarelo/Laranja     |
| <i>Penicillium purpurogenum</i><br>and <i>Paecilomyces sinclairii</i>                            |                   | Vermelho            |

|   |              |                     |
|---|--------------|---------------------|
| <i>Paecilomyces farinosus</i>                         | Antraquinona | Vermelho            |
| <b>LEVEDURAS</b>                                      |              |                     |
| <i>Cryptococcus sp.</i>                               |              | Vermelho            |
| <i>Saccharomyces neoformans</i> var. <i>nigricans</i> |              | Vermelho            |
| <i>Phaffia rhodozyma</i>                              | Carotenóide  | Vermelho alaranjado |
| <i>Rhodotorula sp.</i><br><i>Rhodotorula glutinis</i> | Torularodina |                     |
| <i>Yarrowia lipolytica</i>                            |              | Marrom              |
| <b>ACTINOMICETOS</b>                                  |              |                     |
| <i>Streptoverticillium rubrireticuli</i>              | Prodigiosina | Vermelho            |
| <i>Streptomyces echinoruber</i>                       | Rubrolina    | Vermelho            |

Fonte: MALIK, et al., 2012.

### 3.1.5. Fungos produtores de corantes

Os fungos são agentes patogênicos das plantas, muito estudados e importantes no ponto de vista econômico. São micro-organismos eucarióticos, heterotróficos, aclorofilados, aeróbios, crescendo em meio de cultura com pHs que variam de 2 a 9, são muito eficazes na degradação de diversos tipos de substratos. (GOLD; GARCÍA-PEDRAJAS; MARTÍNEZ-ESPINOZA, 2001 e ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Representam um grupo muito grande e heterogêneo encontrados em qualquer nicho ecológico. Estima-se que existam cerca de 1.5 milhões de espécies de fungos, sendo que destas apenas foram descritas cerca de 90 mil espécies. Excluindo os insetos, os fungos constituem os mais numerosos seres vivos existentes (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Os fungos são conhecidos por sua capacidade de produzir uma grande quantidade de produtos naturais, sendo responsáveis por uma produção muito importante de ácidos orgânicos como o ácido cítrico, pela produção de fármacos, alguns antibióticos, pela produção de enzimas de interesse industrial e elevado valor econômico, destacando-se as celulases, lacases, xilanases, pectinases e amilases, pelo controle biológico de insetos-pragas da agricultura, pelo controle de inúmeras

doenças que atacam plantações e pela produção de etanol (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

### **3.1.5.1. Gênero *Fusarium***

O gênero *Fusarium* é um habitante do solo e um dos micro-organismos mais distribuídos do solo. Pertence atualmente ao filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe Sordariomycetes, ordem Hypocreales, família Nectriaceae e tem sua fase teleomórfica desconhecida (GORDON; MARTYN, 1997; LESLIE; SUMMERELL, 2006).

É caracterizado devido seu rápido crescimento, exibindo atributos como características morfológicas, fisiológicas e ecológicas, com colônias com coloração pálidas e coloridas, ocorrendo na maioria dos nichos ecológicos, nas mais diversas regiões mundiais. Prolifera em locais de climas tropicais e subtropicais, sendo capazes de sobreviver entre as estações de cultivo como saprófitas em resto de plantas e por longos períodos no solo pela formação de clamidósporos, podendo colonizar muitas plantas (BURGUESS et al., 1997; AGRIOS, 2005, MILANESI, 2009).

#### **3.1.5.1.1. *Fusarium oxysporum***

O *Fusarium oxysporum* compreende mais de 120 cepas conhecidas ou "formas especiais" (*formae speciales*; f. Sp.), cada uma das quais é específica para um único hospedeiro vegetal em que causa doenças. Os esporos de *Fusarium oxysporum* sobrevivem latente no solo às vezes por 30 anos, são facilmente espalhados na água, na maquinaria e nas sementes e podem ocultar nos rizomas ou cortes vegetativos de plantas infectadas, não apresentando sintomas até serem transmitidos para outros indivíduos. Sendo essas características, que fazem deste fungo, uma praga agrícola importante e potencialmente devastadora (GONSALVES e FERREIRA, 1993; MILLER et al., 1996).

Tem ampla distribuição geográfica, ocorrendo em vários ambientes geográficos, predominante de regiões tropicais e subtropicais ou em regiões de climas frios das regiões temperadas (ALEXPOULOS et al, 1996).

O *Fusarium oxysporum* ataca seu hospedeiro entrando pela raiz. Cresce no xilema da planta, eventualmente bloqueando o sistema vascular. Isso evita o

transporte de água e nutrientes para o resto do hospedeiro, causando murchidão, descoloração e, finalmente, morte da planta (GONSALVES e FERREIRA, 1993).

O *Fusarium oxysporum* além de ter atividade patogênica em plantas, inclui também seres humanos, sendo um patógeno humano oportunista emergente, relatado como um dos agentes mais comuns que causam infecções fúngicas invasivas em pacientes imunocomprometidos. É resistente à maioria dos medicamentos antifúngicos disponíveis, essas infecções são graves e frequentemente fatais em mamíferos. Os cientistas propuseram o desenvolvimento de *F. oxysporum* como modelo universal para a compreensão da virulência fúngica (ORTONEDA et al., 2004).

#### **3.1.5.1.1.1. Bicaverina**

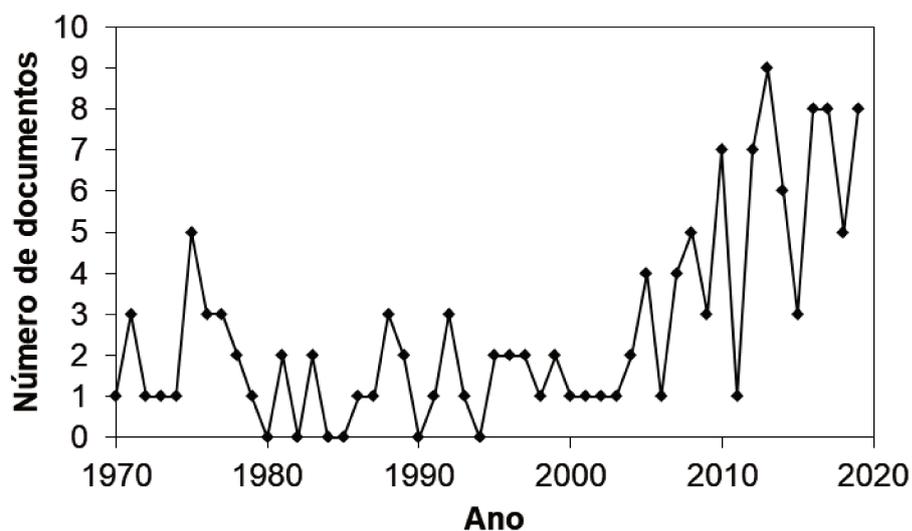
Bicaverina, anteriormente descrita como lycopersin, foi descoberta em 1949, como um pigmento de coloração avermelhada em culturas de *F. lycopersici* e *F. vasinfectum*. Posteriormente foi renomeada para bicaverina para que não fossem confundidos os pigmentos. Quimicamente, a bicaverina é um policetídeo com estrutura benzoxantônica tetracíclica, sendo um biopigmento avermelhado produzido por diversas espécies de fungos filamentosos, com propriedades biológicas, incluindo atividade antibióticas contra protozoário (*Leishmania brasiliensis*), atividade antifúngica contra fungos filamentosos, anti-oomicetos contra *Phytophthora infestans* e atividade nematicida contra parasita (*Bursaphelenchus xylophilus*) (BALAN et al., 1970; CORNFORTH et al., 1971; SON et al., 2008; KWON et al., 2007).

Pode ser encontrada quantidades menores de bicaverina em alguns fungos, sendo a produção desse metabólito por diferentes espécies de fungos, dependem das condições de cultivo, mas é principalmente afetado pela disponibilidade de nitrogênio, pH e fonte de carbono. Além da produção por via biotecnológica, a bicaverina, também pode ser obtida por síntese química (BELL et al.; BEKAERT et al. 1992).

Análises quantitativas feitas por Giordano e Domenech (1999) mostraram que a síntese de bicaverina depende da concentração de prótons no meio. Sendo que o mais alto rendimento ocorreu, quando a cultura de crescimento do micro-organismo estava em pH 4,5.

Apenas poucos relatos sobre a bicaverina têm sido publicados, mas recentemente tem-se observado um número crescente de publicações sobre ela (Figura 4).

**Figura 4.** Número de documentos contendo o termo “bikaverin” no título, resumo ou palavras-chave. O termo “lycopersin” aparece apenas uma vez nos anos de 1971, 1973 e 2016.



Fonte: SOCPUS, 2019.

Sua biossíntese é uma característica muito frequente em espécies do gênero *Fusarium* e dificilmente encontrada em outros fungos como visto na Tabela 4 (CHELKOWSKI et al. 1992).

**Tabela 4.** Fungos produtores de bicaverina.

| <b>FUNGOS</b>                       | <b>REFERÊNCIA</b>                                |
|-------------------------------------|--|
| <i>F. fujikuroi</i>                 | Balan et al. 1970; Kjaer et al. 1971             |
| <i>F. oxysporum</i>                 | Valadon and Chapman 1983; Chelkowski et al. 1992 |
| <i>F. Dlamini</i>                   | Chelkowski et al. 1992                           |
| <i>F. nygamai</i>                   | Chelkowski et al. 1992                           |
| <i>F. solani</i>                    | Chelkowski et al. 1992                           |
| <i>F. verticillioides</i>           | Chelkowski et al. 1992                           |
| <i>F. sacchari var subglutinans</i> | Chelkowski et al. 1992                           |
| <i>F. proliferatum</i>              | Chelkowski et al. 1992                           |
| <i>F. antholphilum</i>              | Chelkowski et al. 1992                           |
| <i>F. napiformi</i>                 | Chelkowski et al. 1992                           |
| <i>F. bulbigenum</i>                | Medentsev et al. 2005                            |
| <i>Mycogone jaapii</i>              | Terashima et al. 1972                            |
| <i>Verticillium agaricinum</i>      | Cornforth et al. 1971; Osman and Valadon 1984    |

Fonte: Chelkowski et al. 1992.

Considerando o aumento do interesse pela bicaverina e seu elevado preço (vendida pela Sigma-Aldrich a um preço próximo a R\$1.000/mg), o presente trabalho pretende descrever métodos eficientes para a recuperação e a purificação de bicaverina produzida por *F. oxysporum* a fim de possibilitar a produção desta substância em quantidades suficientes para testes de aplicação em alimentos e produtos afins, bem como ensaios para avaliação de suas propriedades biológicas.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

##### **4.1. PRODUÇÃO DE BICAVERINA**

Para a produção da bicaverina em fermentação submersa utilizou-se meio “caldo arroz” (10 g de arroz em 200 mL de água), preparados em Erlenmeyer de 500 mL. O meio foi previamente esterilizado em autoclave a 121°C/15 minutos.

Para o preparo do pré-inóculo, em meio arroz, cortou-se 1,5 cm<sup>2</sup> de uma cultura de *F. oxysporum* CCT7620 previamente crescida em meio PDA (potato, dextrose ágar) durante 72 horas a 30°C, e homogeneizado utilizando-se um Ultraturrax, em 200ml de meio arroz, previamente autoclavado a 121°C/15 minutos

em um Erlenmeyer 500ml. Os frascos foram incubados para fermentação a 30°C/200 rpm por 72h.

Posteriormente, 1 mL do pré-inóculo foi transferido a um novo Erlenmeyer contendo 200 mL de “caldo arroz”. A produção de pigmento ocorreu com a incubação a 30°C /200 rpm por 96h. Após este período, os meios foram centrifugados a 6.000 rpm por 5 minutos, onde se obteve a biomassa que foi utilizada para extrair a bicaverina (SILVA, 2013).

## **4.2. PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO**

Após obtida, conforme detalhado no item 4.1, a biomassa foi pesada (50g) em frascos com tampa para impedir a evaporação do solvente, sendo adicionada a mesma proporção biomassa:solvente (1:1, m/v). Esta mistura biomassa-solvente foi mantida a 25°C e 200 rpm de agitação orbital. As alíquotas em diferentes tempos (1 min, 3 min, 6 min, 12 min, 25 min, 50 min e 100) de solvente orgânico foram previamente centrifugadas a 3.200 rpm por 5 min antes da leitura em espectrofotômetro, a fim de identificar as condições ideais para esta extração. A leitura da densidade ótica (DO) a 500 nm de comprimento de onda foi realizada a fim de estimar a extração do corante vermelho (bicaverina) extraído.

### **4.2.1. Estudo do solvente extrator**

Foi feito um estudo com diferentes solventes para verificar qual a maior capacidade de extração de bicaverina. Os solventes utilizados e suas características físico-químicas estão descritos na Tabela 5.

**Tabela 5.** Características dos solventes utilizados na extração da Bicaverina.

| SOLVENTES        | FÓRMULA QUÍMICA                              | LogP   |
|------------------|--|--------|
| Metanol          | CH <sub>4</sub> O                            | - 0,77 |
| Etanol           | CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH           | - 0,31 |
| Acetato de etila | C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> | 0,73   |
| n-Butanol        | C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O             | 0,88   |
| Éter etílico     | C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O             | 0,89   |
| Diclorometano    | CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>              | 1,25   |
| Clorofórmio      | CHCl <sub>3</sub>                            | 1,97   |
| Hexano           | C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>               | 3,90   |
| Éter de Petróleo | Diversos Hidrocarbonetos                     | n.i.   |

Fonte: PubChem.

#### 4.2.2. Cinética de extração

A fim de verificar qual o tempo para saturar o solvente de bicaverina, um estudo cinético foi realizado utilizando acetato de etila como solvente extrator. Para tal, alíquotas foram retiradas nos tempos: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 e 512 minutos.

#### 4.2.3. Efeito de extrações sequenciais

A fim de verificar a possibilidade de extrair mais bicaverina da biomassa, sete extrações sequenciais foram feitas no tempo de 256 minutos. Após cada sequência de extração, o solvente contendo a bicaverina foi separado da biomassa, que passou por nova extração com a mesma quantidade de solvente fresco. O experimento foi conduzido em frascos Erlenmeyer em agitador orbital com temperatura controlada a 25°C e 200 rpm de agitação, em mistura biomassa-solvente (1:1).

#### 4.2.4. Análise técnico-econômica

Para a definição das condições ideais de extração, além da quantidade de extrato bruto obtido e da concentração de pigmento vermelho nos mesmos, sendo

esse último estimado pela densidade ótica do extrato a 500 nm de comprimento de onda, foi também considerado um estudo econômico. No modelo do estudo econômico, foi estimado o custo de produção do pigmento levando em consideração o custo de extração em cada condição, além de custos com reagentes e meios de cultivo, foi considerado também o custo de energia elétrica, equipamentos utilizados, tempo de utilização, vida útil e depreciação dos mesmos, bem como os custos referente à mão-de-obra (ANEXO V à XI).

### **4.3. PURIFICAÇÃO DA BICAVERINA**

Para a purificação da bicaverina, foi considerado o extrato obtido nas melhores condições de extração a partir dos estudos anteriores. O produto obtido da extração foi concentrado em rotaevaporador, aqui chamado extrato bruto, foi submetido a concentração em três sistemas distintos, como explicado a seguir.

#### **4.3.1. Cromatografia em coluna aberta – Sílica gel**

O extrato bruto evaporado foi ressuspendido em 0,5 mL de clorofórmio e adicionado em uma coluna de vidro (18 cm de altura, 2,5 cm de comprimento, 0,8 cm de largura) preenchida com sílica gel tipo H (Sigma). O sistema de eluição testado foi uma mistura de clorofórmio:metanol:ácido acético (94: 1: 5, v/v/v) como descrito por Giordano e Domenech (1999). Frações de 5 mL foram retiradas para posterior análise (item 4.4.2).

#### **4.3.2. Separação em coluna aberta – Sephadex**

O extrato bruto evaporado foi suspendido em 0,5 mL de metanol grau HPLC e adicionado em um coluna nas dimensões de 29,5 cm altura e diâmetro 3,5 cm empacotada com Sephadex <sup>TM</sup> – G-50 fine (GE Healthcare) utilizando metanol como fase móvel, em parceria com o Laboratório de Química Microbiana do Instituto de Química (UNICAMP). Frações de 8 mL foram coletadas para posterior análise (item 4.5.2).

#### **4.3.3. Nanofiltração**

A purificação do extrato bruto, antes da concentração em rotaevaporador, foi testada em sistema de filtração de alta pressão com membrana de nanofiltração em parceria com o Laboratório de Engenharia Metabólica e de Bioprocessos

(LEMeB). O aparato consiste em uma câmara de aço inoxidável, sem saída, agitado (agitador agnético), que simula um processo de fluxo cruzado, com uma célula de nanofiltração, onde a membrana (área  $1,52 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ ) é alocada, além de temperatura controlada por banho termostático ajustado em  $10^\circ\text{C}$ . Foi testada a membranas NF90 (poliamida aromática), conforme a tabela 6. Foi aplicado o gradiente de pressão com nitrogênio pressurizado.

**Tabela 6.** Características das membranas utilizadas.

| <b>MEMBRANA</b>   | <b>NF90</b>         |
|---|---------------------|
| <b>Material</b>   | Poliamida aromática |
| <b>MWCO<sup>a</sup> (Da)</b>                            | 180                 |
| <b>Faixa de pH</b>                                      | 2 à 11              |
| <b>Pressão Máxima (bar)</b>                             | 41                  |
| <b>Temperatura Máxima (<math>^\circ\text{C}</math>)</b> | 45                  |

#### 4.3.4. Purificação em sistema HPLC semi-preparativo

O extrato bruto evaporado foi suspenso em acetonitrila e 200  $\mu\text{L}$  foi injetado em HPLC semi-preparativo, com coluna Phenomenex Luna 5 de Phenyl-Hexyl (250 x 10 mm) utilizando uma bomba de HPLC binário Waters 1525, equipado com um detector de arranjo de diodo Waters 2998 e um coletor de frações Waters III, com UV-vis 254nm, no laboratório de Cromatografia Líquida do Departamento de Química (UNICAMP). Para fase móvel foi utilizada água ultrapura (A) acidificada com 0,1% (v / v) de ácido fórmico e acetonitrila (B), com taxa de fluxo de 4,7 ml/min-1. O perfil do eluente (A: B) foi: 0-50 min, gradiente de 60:40, 50-65 min, gradiente das 50:50, 65-70 min, gradiente 20:80, 70-75 min, gradiente 100 de acetonitrila, 75-82 min, gradiente 60:40.

#### **4.4. CONDIÇÕES ANALÍTICAS**

##### **4.4.1. Monitoramento da quantidade de pigmento por espectrofotometria**

As amostras provenientes do estudo dos solventes e do estudo cinético (frações orgânicas) foram lidas em espectrofotômetro a 500 nm (absorção máxima da bicaverina) em cubetas de vidro, sendo considerados os valores de absorbância entre 0,1 e 1,0, garantindo um grau de linearidade entre os valores de absorbância e a concentração de pigmentos (lei de Beer-Lambert). Amostras mais concentradas foram diluídas até atingir a faixa de leitura. O equipamento foi zerado com o respectivo solvente empregado na extração.

##### **4.4.2. HPLC-DAD**

O monitoramento das frações obtidas nos processos de purificação (itens 4.3) foi feito utilizando-se a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), no laboratório de Cromatografia Líquida do Instituto de Química (UNICAMP), com coluna Phenomenex Luna 5 de Phenyl-Hexyl (250 mm x 4,6 mm) utilizando um HPLC LC-20AT (SHIMADZU), equipado com módulo de comunicação CBM-20A, SPD-M20A e detector de arranjo de diodo (DAD) e com amostrador automático SIL-20A, com UV-vis 254nm. Para fase móvel foi utilizada água ultrapura (A) acidificada com 0,1% (v / v) de ácido fórmico e acetonitrila (B), com taxa de fluxo de 1,0 mL/min. O perfil do eluente (A: B) foi: 0-50 min, gradiente de 60:40, 50-60 min, gradiente das 50:50, 61-66 min, gradiente 100 acetonitrila, 67-77 min, 60:40. As amostras antes de serem injetadas, foram filtradas em filtro PTFE hidrofóbico, com diâmetro do filtro 13mm e do poro de 0,22 µm. A bicaverina foi identificada por comparação do tempo de retenção do padrão analítico comercial (Sigma Aldrich).

##### **4.4.3. Espectrometria de massas (Q TOF-MS)**

Para confirmação das moléculas presentes nas amostras, as mesmas foram analisadas usando um HPLC (Agilent 1200) acoplado a um espectrômetro de massas (Agilent iFunnel 6550 Q-ToF) no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas (ThoMSon) do Instituto de Química da UNICAMP. A fonte de ionização por eletropulverização, com modo positivo ESI (+), seguindo as condições de operação: temperatura do gás de nebulização: 290°C; tensão capilar: +3500 V; voltagem do

bocal: 320 V; fluxo de gás de secagem: 12 mL/min; pressão de gás de nebulização: 50 psi; temperatura do gás auxiliar: 350°C e fluxo de gás auxiliar: 12 mL/min. O tempo de voo do analisador (ToF) com intervalo  $m/z$  50–1500. Fórmula de energia de colisão (modo MS/MS automático):  $4 V (\text{inclinação}) * (m / z) / 100 + 5 V$  (deslocamento). Com volume de injeção de 2  $\mu\text{L}$  de amostra. Fase estacionária: coluna Thermo Scientific Accucore C18 2,6  $\mu\text{m}$ , 2,1 mm x 100 mm. Fase móvel utilizada água ultrapura (A) acidificada com 0,1% (v / v) de ácido fórmico e acetonitrila (B), com taxa de fluxo de 0,2 ml/min. O perfil do eluente (A: B): 0-10 min, gradiente de 95:5 a 2:98; 10-15 min, eluição isocrática com 2:98; 15-16,2 min, gradiente de 2:98 a 95: 5; 16,2-20 min, eluição isocrática com 95: 5. O espectro obtido, foi processado com o software Agilent Mass Hunter Workstation.

#### **4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS**

Os dados foram tratados no programa Excel, por meio de cálculos das médias e do desvio padrão além de ter sido utilizado como ferramenta para construção de todos os gráficos.

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1. Extração da bicaverina**

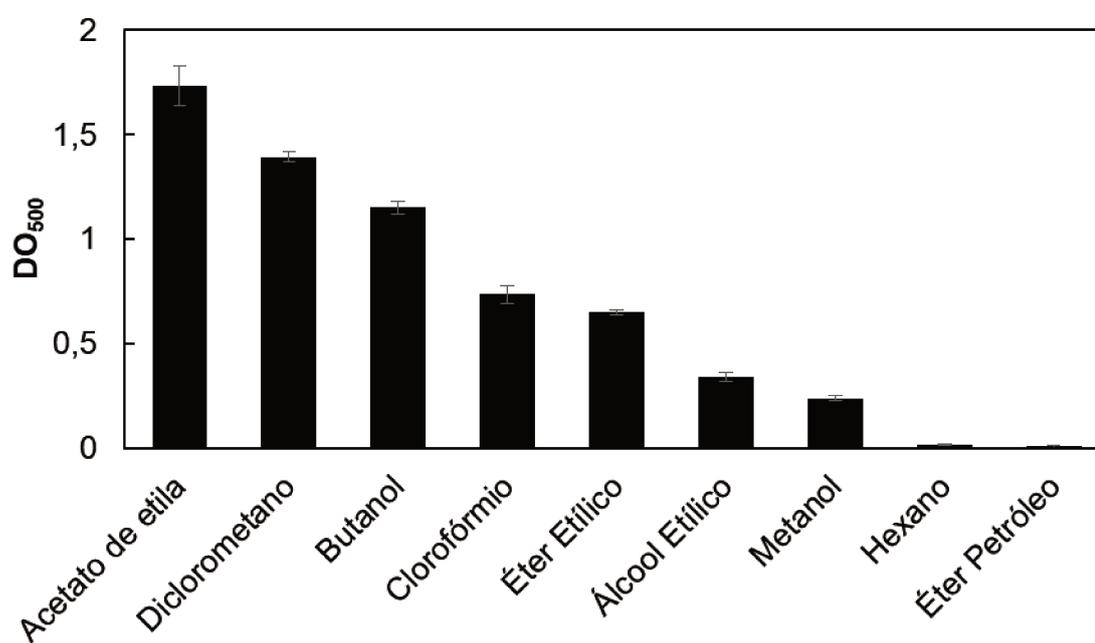
Para esse estudo, foi realizada a varredura de absorção em espectro UV-VIS, de 380 a 720 nm, sendo que o máximo de absorção foi observado em 500 nm (ANEXO I), portanto, esse comprimento de onda, foi utilizado para determinação para estimar a concentração de bicaverina.

##### **5.1.1. Estudo do solvente extrator**

Sabe-se que não existe um método de extração estabelecido para pigmentos derivados de policetídeos de biomassa micelial, no entanto, com base em trabalhos previamente descritos na literatura, o processo comumente utilizado envolve uma mistura de biomassa com algum solvente orgânico, geralmente acetato de etila ou clorofórmio (LEBEAU, 2017).

Foram testados solventes com diferentes polaridades a fim de se obter um perfil mais exaustivo da extração. A bicaverina foi extraída com os solventes conforme citados na Tabela 5 e analisadas em espectrofotômetro à 500 nm, dos solventes utilizados, o que apresentou melhor extração do pigmento, foi o acetato de etila (Figura 5).

**Figura 5:** Densidade óptica a 500nm ( $DO_{500}$ ) para o extrato obtido com diferentes solventes.

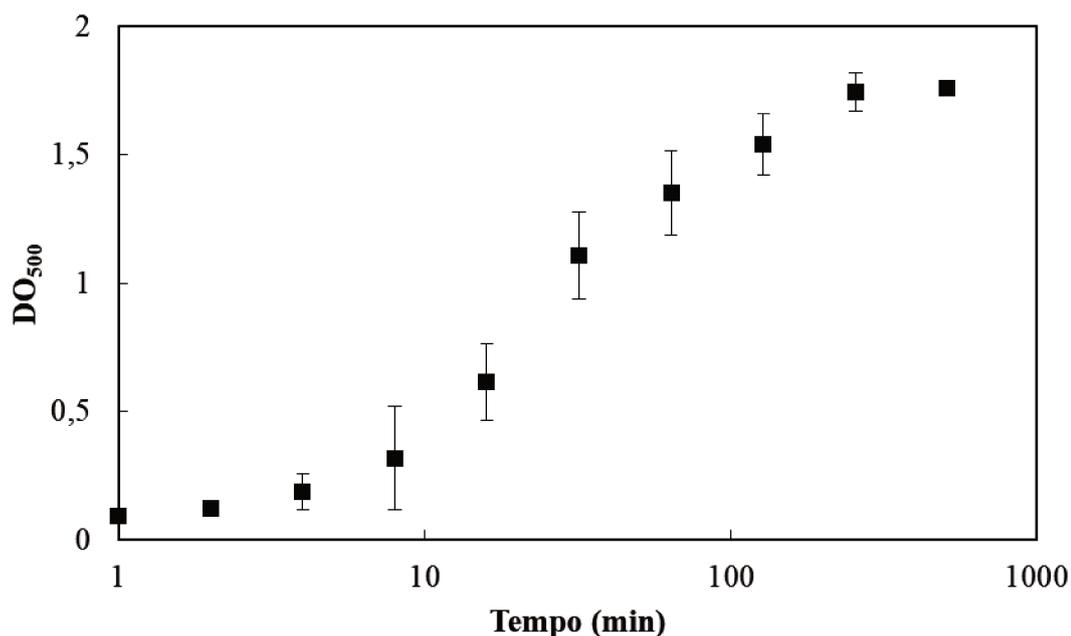


Os solventes acetato de etila e diclororometano, foram mais eficazes na extração do pigmento, porém o último, é um organoclorado, possuindo uma maior toxicidade, tem um custo mais alto que o acetato de etila e maior taxa de evaporação.

### 5.1.2. Cinética de extração

Sabendo-se qual solvente ideal para o processo de extração da bicaverina, foi feita uma cinética para identificar o tempo para saturação do acetato de etila com bicaverina. A Figura 6 mostra a mudança na quantidade de bicaverina extraída da biomassa em função do tempo de extração a 25°C/200rpm.

**Figura 6:** Cinética de extração da bicaverina por tempos.



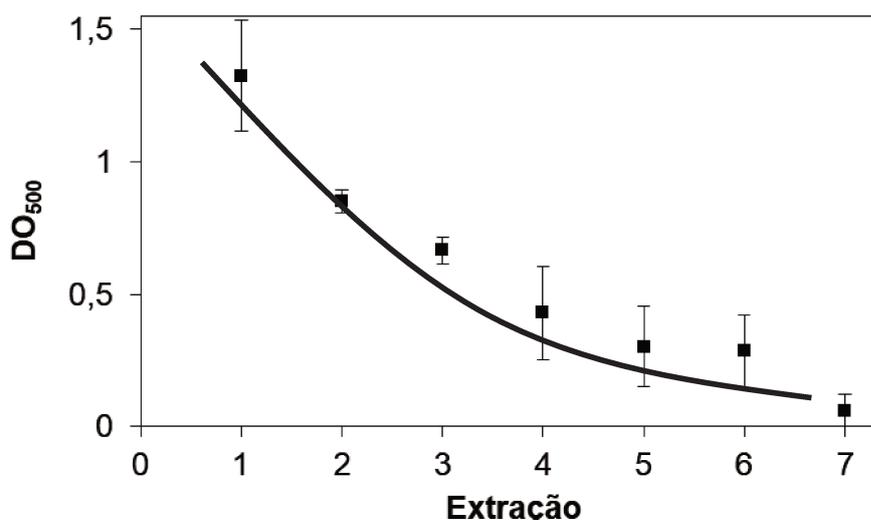
Os resultados demonstram que houve um aumento exponencial da quantidade de bicaverina extraída ao longo do tempo. Porém, a partir de 100min de extração já começa-se a notar uma saturação do solvente. Entre 256 e 512 minutos de extração não notou-se diferença na DO<sub>500</sub>, o que indica que naquele período o solvente já encontrava-se saturado. Por este motivo, nos ensaios posteriores optou-se por fixar o tempo de extração em 4h20min (260min).

### 5.1.3. Extrações sequenciais

Após o resultado acima verificado, foi feita uma análise para saber quanto de pigmento poderia ser recuperado em extrações sequenciais de 4h20min. Como mostrando na Figura 7, extrações sequenciais conseguem recuperar cerca de 2/3 do que foi recuperado na extração anterior, o que indica que uma quantidade considerável de bicaverina permanece na biomassa, que pode ser extraída

novamente. De fato, após a primeira extração, a biomassa ainda permanece com coloração vermelha pronunciada. Notou-se que mesmo após sete extrações sequenciais ainda há uma pequena quantidade de pigmento extraído e a biomassa ainda permanece com uma coloração rosa pálido (AXEXO II), indicando que a extração não foi completa. As amostras coletadas foram rotaevaporadas (ANEXO III), e ressuspendidas em acetonitrila para posteriores análises em HPLC – DAD.

**Figura 7:** Extração sequencial da biomassa por 4h20min a 25°C/200rpm.



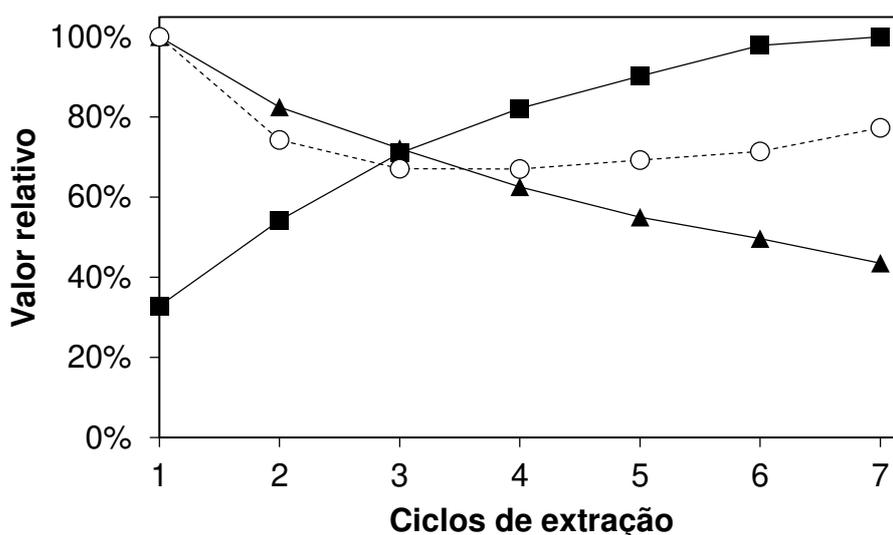
Para identificar o número ideal de extrações sequenciais a ser efetuado, foi proposto um estudo econômico, cujos resultados são apresentados na sequência.

#### **5.1.4. Análise técnico-econômica da obtenção do extrato bruto**

O sucesso de qualquer pigmento produzido por fermentação depende da sua aceitabilidade no mercado, aprovação regulamentar e do tamanho do investimento de capital necessário para colocar o produto no mercado (DUFOSSE, 2009). O estudo a seguir tem como base apenas a obtenção do extrato bruto de bicaverina e não leva em consideração as etapas de purificação subseqüentes.

No estudo econômico da produção da bicaverina do presente trabalho foram considerados os gastos com o consumo de energia dos equipamentos, a depreciação dos equipamentos, os recursos humanos (gastos com pessoal) e custo do meio de cultura. Assim, pode-se obter o custo de cada batelada (inóculo, fermentação, extração e concentração). Dessa forma, também foi possível calcular o custo de produção de bicaverina empregando uma ou mais extrações sequenciais (ANEXO IV). Os resultados são apresentados na Figura 8.

**Figura 8:** Escala do custo de bicaverina extraída (■), concentração de bicaverina nos extratos reunidos (▲) e custo específico da bicaverina (○) produzida após diferentes ciclos de extração.



Os resultados indicam que menos de 40% do total de bicaverina é recuperado após a primeira extração, mas a partir da terceira extração, quando já se extrai cerca de 75% do total, o incremento na quantidade extraída passa a ser menor. Conforme a quantidade aumenta, a concentração de bicaverina no extrato diminui, devido ao efeito diluente do solvente. Porém, no que se refere ao custo de produção de bicaverina, nota-se que ele decresce nos três primeiros ciclos de extração (passa de R\$6,94 no primeiro ciclo para R\$4,66 no terceiro), mas depois volta a subir a partir da quinta extração (passa de R\$4,81 no quinto ciclo para R\$5,37 no sétimo), o que pode ser exemplificado pelos altos gastos de extração e

concentração, que não são compensados por um aumento proporcional na quantidade de bicaverina recuperada ao final.

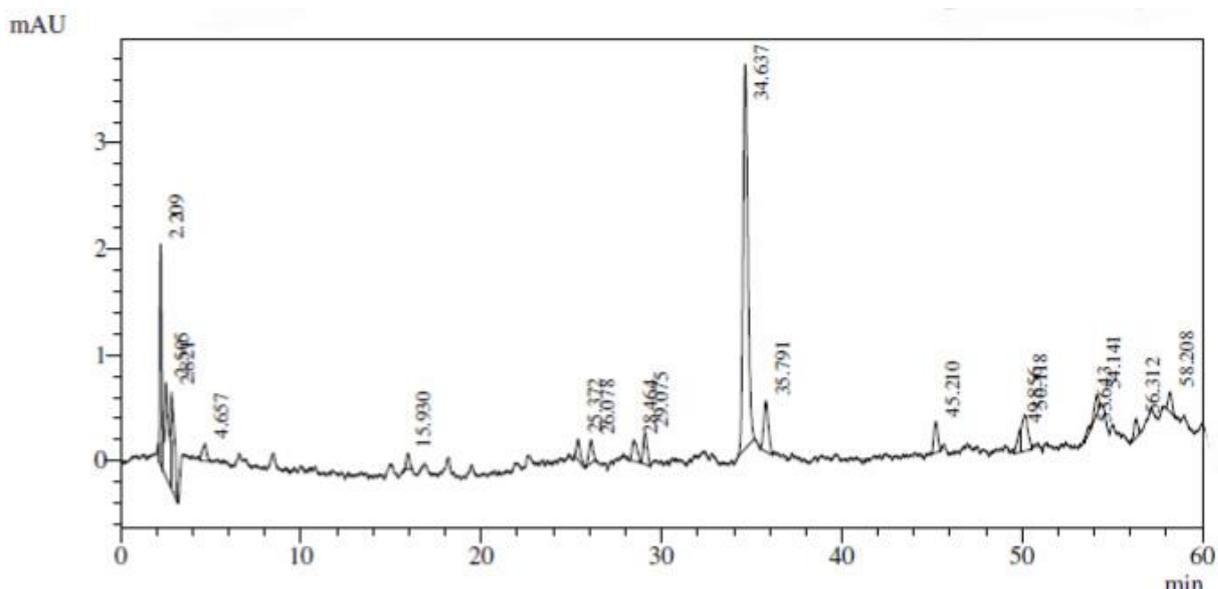
Diante do exposto, conclui-se que o processo ideal de extração de bicaverina presente na biomassa deve incluir três extrações sequenciais (1:1, v/v) com acetato de etila por 4h20min a 25°C/200rpm.

## 5.2. PURIFICAÇÃO DA BICAVERINA

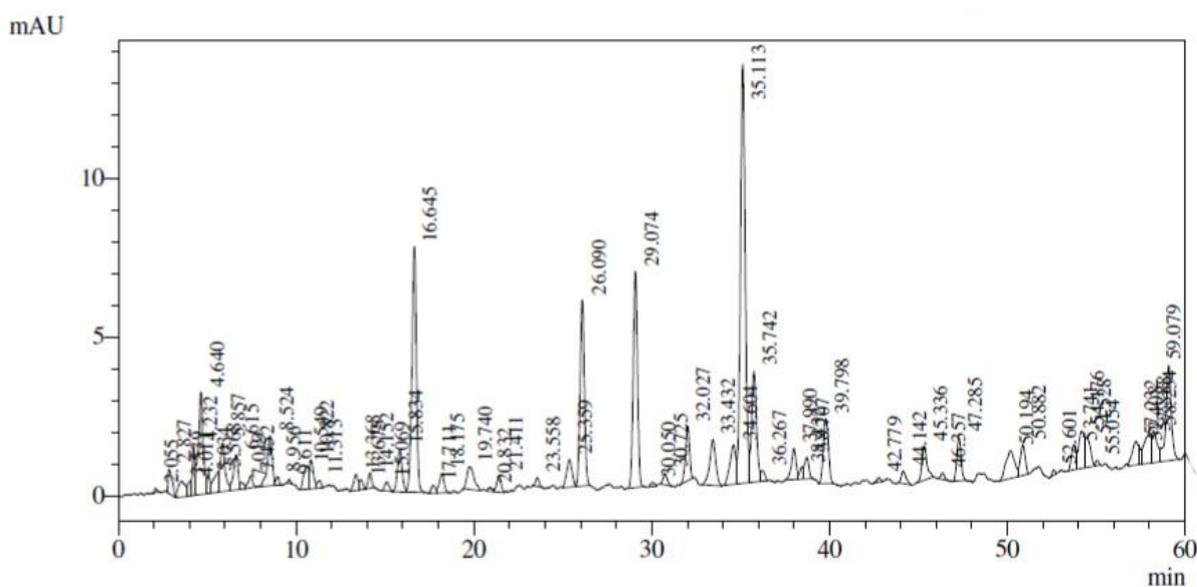
### 5.2.1. Coluna aberta – Silica gel

Com o extrato bruto obtido, foi feita uma serapação em coluna aberta a fim de realizar o isolamento e purificação da bicaverina. Foram coletadas 4 bandas - laranja, rosa, vermelho e lilás (ANEXO V) . A amostra vermelha (ANEXO VI) foi analisada em HPLC – DAD. Os resultados sugerem que após a análise em cromatografia em coluna aberta, houve uma concetração da bicaverina, porém, houve também, uma maior concentração de outros analitos, como pode ser observado nas Figuras 9 e 10. A coluna aberta recheada com sílica não foi portanto capaz de isolar o pigmento de interesse. Na figura 11 é apresentado um cromatograma de um padrão comercial de bicaverina que foi utilizado como referência para confirmação do tempo de retenção do composto.

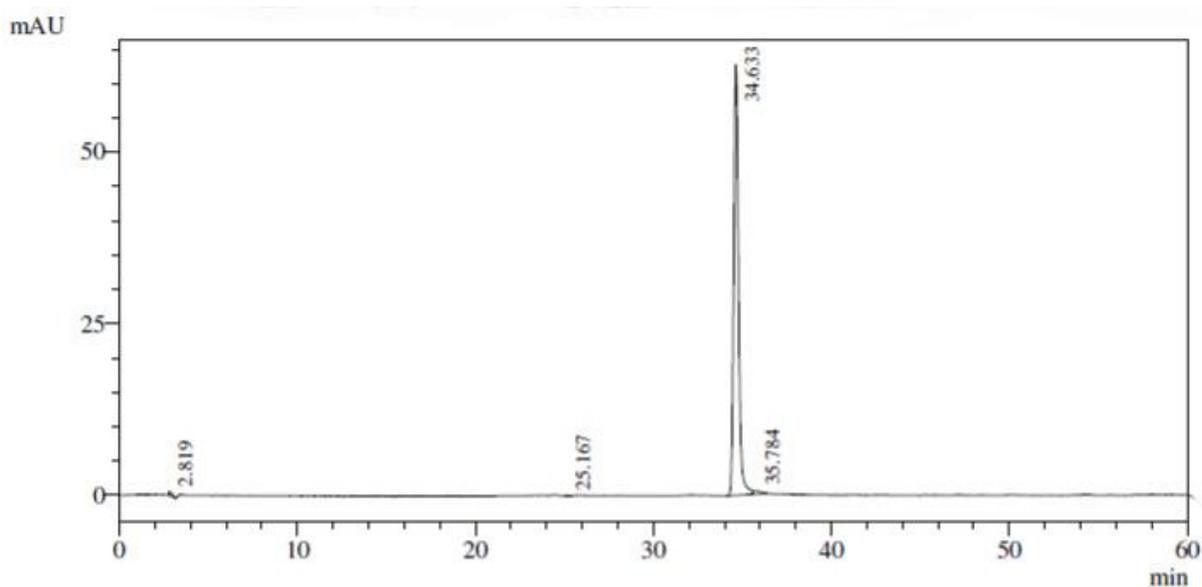
**Figura 9:** Cromatograma do extrato bruto.



**Figura 10:** Cromatograma do extrato vermelho após coluna aberta recheada com sílica.



**Figura 11:** Cromatograma do padrão comercial de bicaverina.



Kundu e colaboradores (2016) obtiveram cinco compostos, através de uma separação cromatográfica com acetato de etila, obtidos através de fermentação pelo *Fusarium oxysporum f. sp. Ciceris*, sendo a bicaverina, 3-O-metil-8-O-metil fusarubina, 8-O-metil fusarubina, anidrofusarubina e fusarubina, sendo posteriormente confirmadas por espectros detalhados de RMN e LC/ESI-MS.

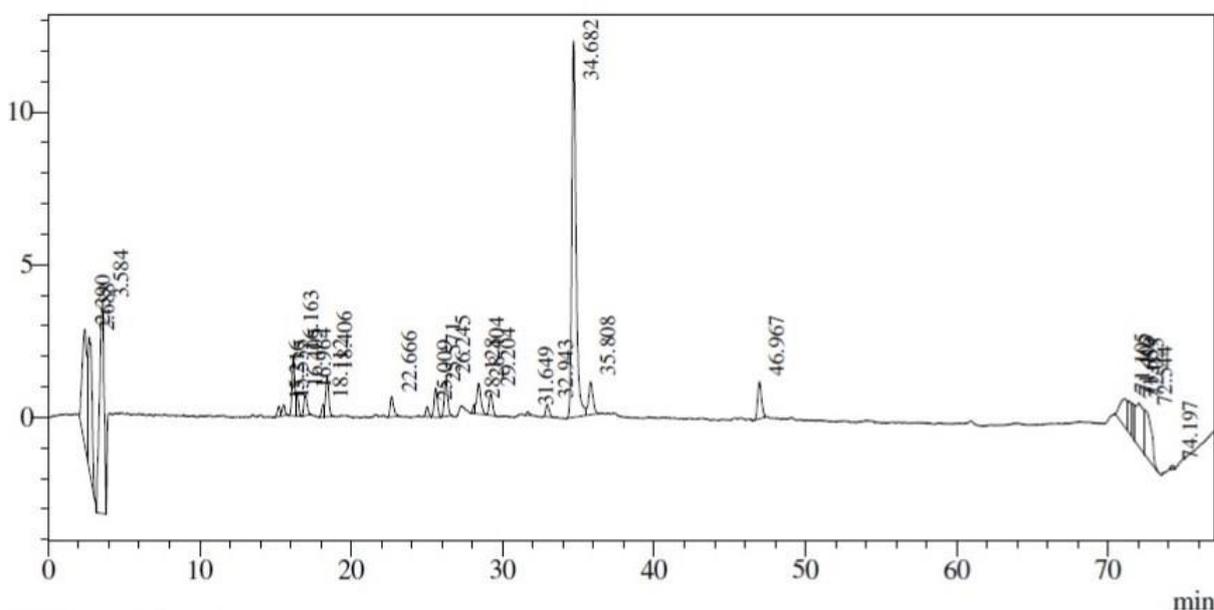
Os resultados do presente estudo indicaram que a purificação da bicaverina do extrato bruto em cromatografia em coluna aberta utilizando sílica gel não foi um método adequado. Por este motivo, um novo sistema foi proposto.

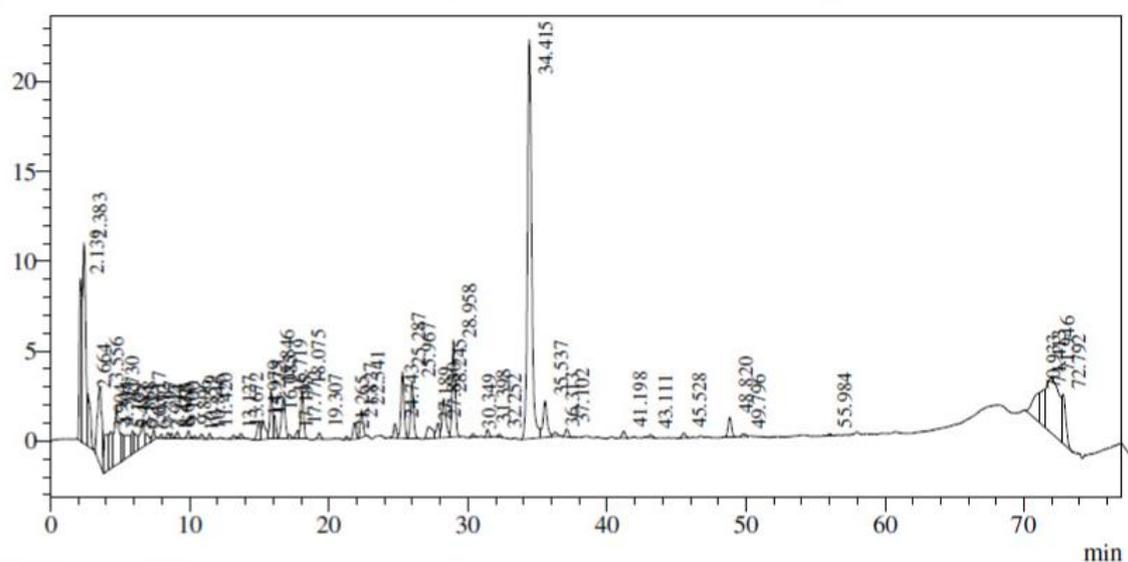
### 5.2.2. Coluna aberta - Sephadex

Desde a sua introdução em 1959, esses géis praticamente revolucionaram a ciência de separar moléculas biológicas. Devido à facilidade com que esses géis são comprimidos (Sosa, 1980). Seu uso em cromatografia de filtração rápida tem sido bastante limitado. O Sephadex ainda é o gel preferido para cromatografia por exclusão de tamanho.

Para tentar obter uma pré-purificação, o extrato bruto foi submetido a processo cromatográfico em coluna aberta contendo Sephadex™ – G-50 fine (GE Healthcare) como fase estacionária. Foram coletadas 4 bandas – amarelo, laranja, vermelho e lilás (ANEXO VII). Porém, já na etapa de eluição, foi observado que o pigmento possuía uma alta afinidade com a fase estacionária, dificultando, portanto, a separação e a purificação da bicaverina. Nas Figuras 12 e 13 são observados cromatogramas de frações obtidas da coluna.

**Figura 12:** Cromatograma da fração vermelha, antes da coluna - Sephadex.

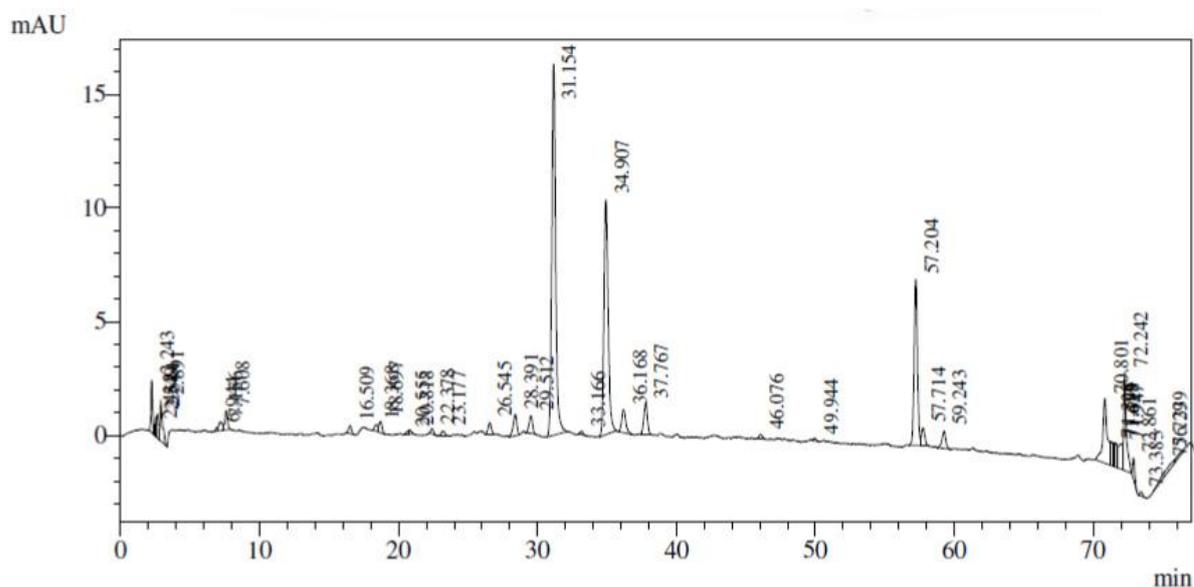


**Figura 13:** Cromatograma da fração após coluna - Sephadex.

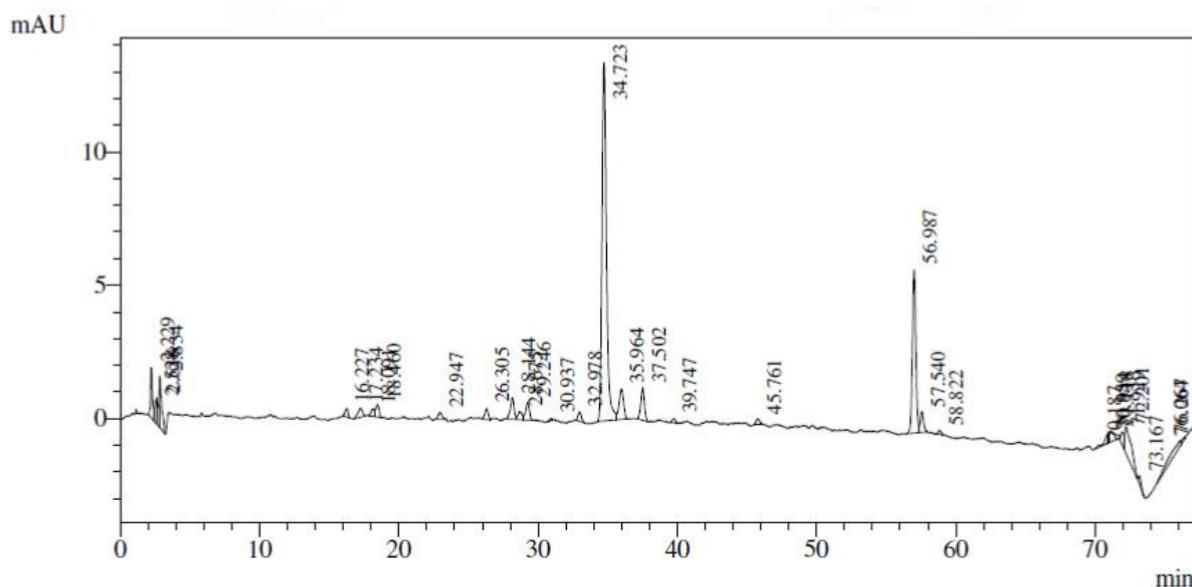
### 5.3. Nanofiltração

Como alternativa aos processos cromatográficos, este estudo também considerou concentrar a bicaverina contida no extrato bruto por meio de nanofiltração.

Pelo método de análise de nanofiltração, nas Figuras 14 e 15, observou-se que não foi eficiente em relação a pré-purificação da bicaverina, aparecendo mais analitos na amostra analisada em HPLC analítico.

**Figura 14:** Amostra de bicaverina produzida utilizando nanofiltração.

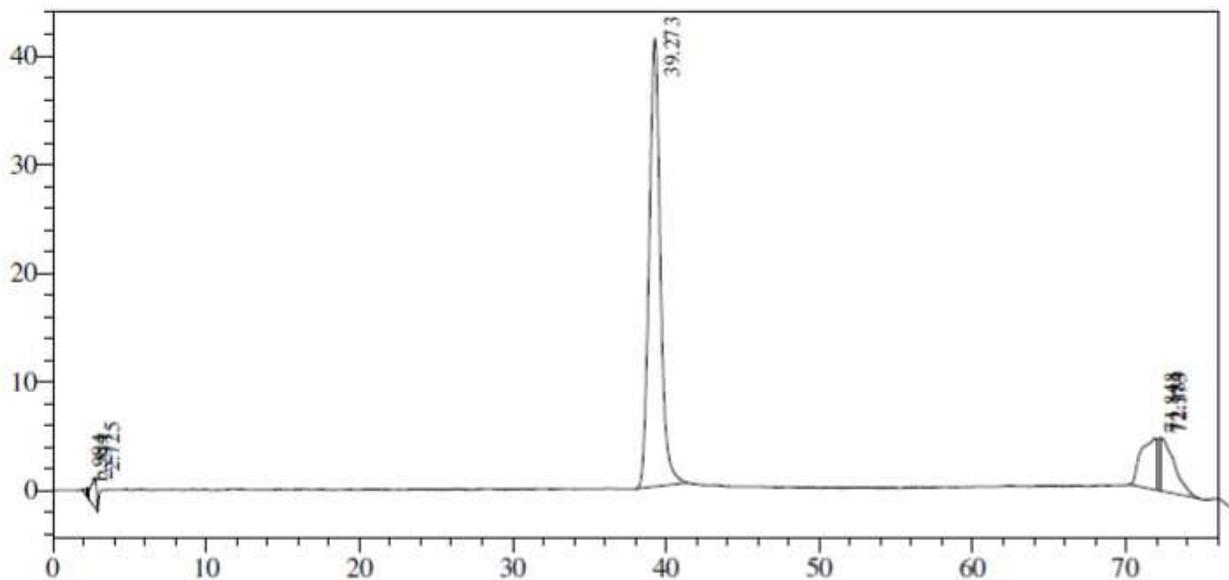
**Figura 15:** Amostra de bicaverina produzida sem nanofiltração.



#### 5.4. Purificação do extrato em sistema HPLC semi-preparativo

Como os métodos de pré-purificação em coluna aberta não foram eficientes, foi proposta a separação e purificação da bicaverina por cromatografia líquida de alta eficiência preparativa (HPLC semi-preparativo). Além da bicaverina, foram coletadas mais 7 compostos (ANEXO VIII) que não foram identificados. Todas as frações coletadas foram injetadas também em um HPLC-DAD a fim de avaliar suas purezas. A bicaverina purificada foi também quantificada por HPLC-DAD a partir da comparação com padrão comercial, utilizado para construção da curva de calibração (item 5.6.). Após o procedimento de purificação em HPLC semi-preparativo, pode-se confirmar que a bicaverina foi isolada, conforme ilustra o cromatograma da Figura 16.

**Figura 16:** Cromatograma de bicaverina purificada, pós semi-preparativo, analisada em HPLC analítico em 254nm.

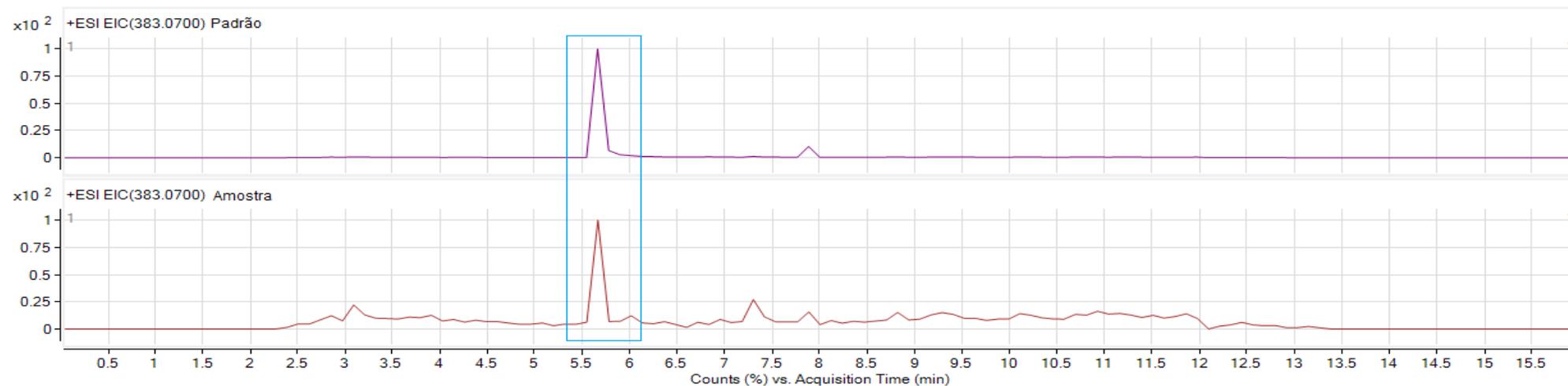
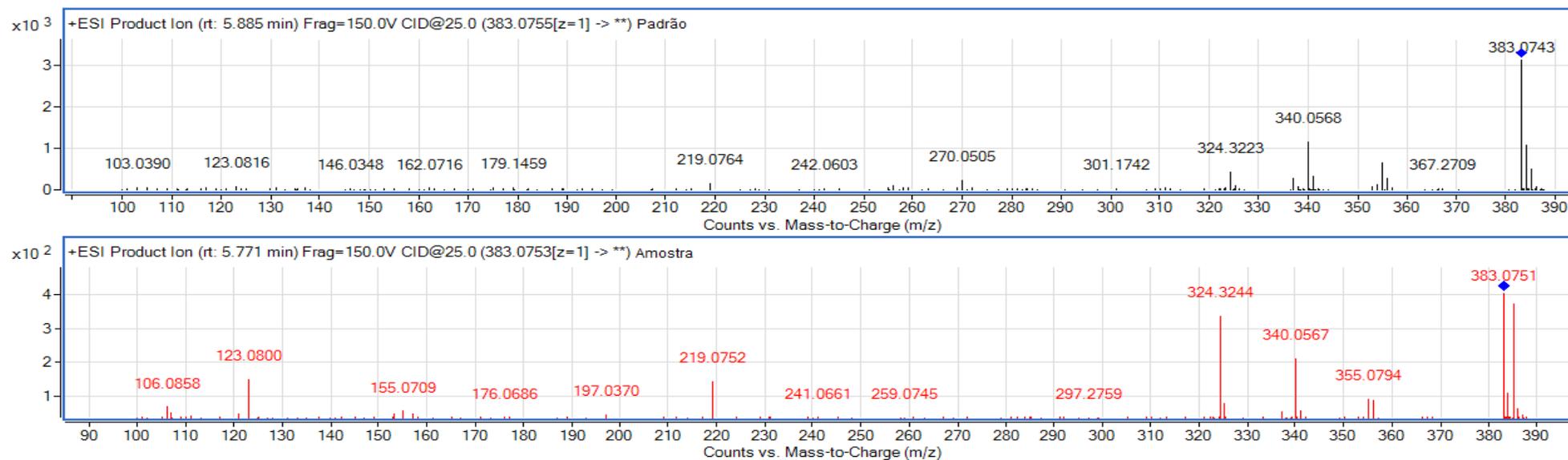


## 5.5. IDENTIFICAÇÃO DA BICAVERINA

### 5.5.1. HPLC-QTOF-MS/MS

As vantagens encontradas na separação por HPLC são combinados com o potencial de alta sensibilidade e seletividade na detecção de MS/MS. O potencial para alta seletividade em MS/MS vem de uma detecção baseado na filtragem de acordo com a massa para cobrar taxa do comportamento do íon analítico e da fragmentação resultante da dissociação induzida por colisão (BUSMAN et al, 2012)

A análise HPLC-QTOF-MS/MS revelou que a bicaverina produzida e isolada de *Fuzarium oxysporum* foi identificada utilizando HPLC semi-preparativo e comparada com a amostra padrão (Sigma), foi purificada comparando as fragmentações do padrão que também foi injetado, tendo o mesmo tempo de retenção: 5.6 minutos, m/z experimental: 383,0763 [M + H] +, massa calculada: 383.0766 e MS / MS fragmentos: 355, 340, 324, 219, 123. Erro (ppm): -0,7. Como pode ser observado nas Figura 17 e 18 a seguir:

**Figura 17:** Tempo de retenção da bicaverina produzida e do Padrão**Figura 18:** Fragmentos MS/MS da bicaverina produzida e do Padrão Sigma

A seletividade do método de detecção é baseada em tempo de retenção e aparência do íon parental ( $m/z$  383,0763) e íons fragmentos característicos da bicaverina após a ionização e espectrometria de massa. O analito foi considerado identificado, quando dois critérios de confirmação foram atendidos: primeiro, o analito apareceu no tempo de retenção esperado e os íons do fragmento e o íon parental residual foram detectados.

Tempo de retenção da bicaverina em LC/MS foi observada em 8,49min e espectros de massa exibiram pico íon  $m/z$  382 (KUNDU et al., 2016).

Geralmente pode-se melhorar o rendimento de pigmento por meio da melhoria do meio para crescimento do fungo ou acúmulo de pigmento intracelular. No entanto, a produção de biomassa e pigmento não são proporcionais, visto que quando se tem o aumento de nutrientes no meio, há maior produção de outros compostos e/ou tensões externas, como mecanismo de proteção do fungo.

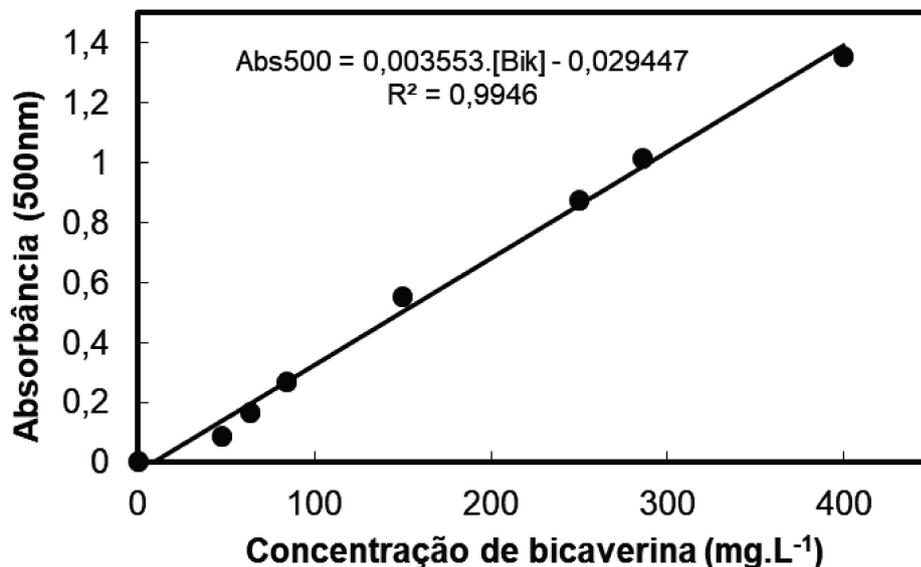
## **5.6. Curva de calibração de bicaverina**

Após produzir e purificar bicaverina em quantidade suficiente, foram feitas curvas de calibração da bicaverina para correlacionar tanto absorbância a 500nm com quantidade de bicaverina, bem como área do cromatograma e quantidade de bicaverina.

Linearidade é a capacidade de o procedimento produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. A faixa de trabalho linear da curva de calibração deve, necessariamente, contemplar a faixa de concentração esperada para a amostra de ensaio. Sempre que possível, o valor esperado para a amostra de ensaio deve se situar em torno do centro da curva de calibração.

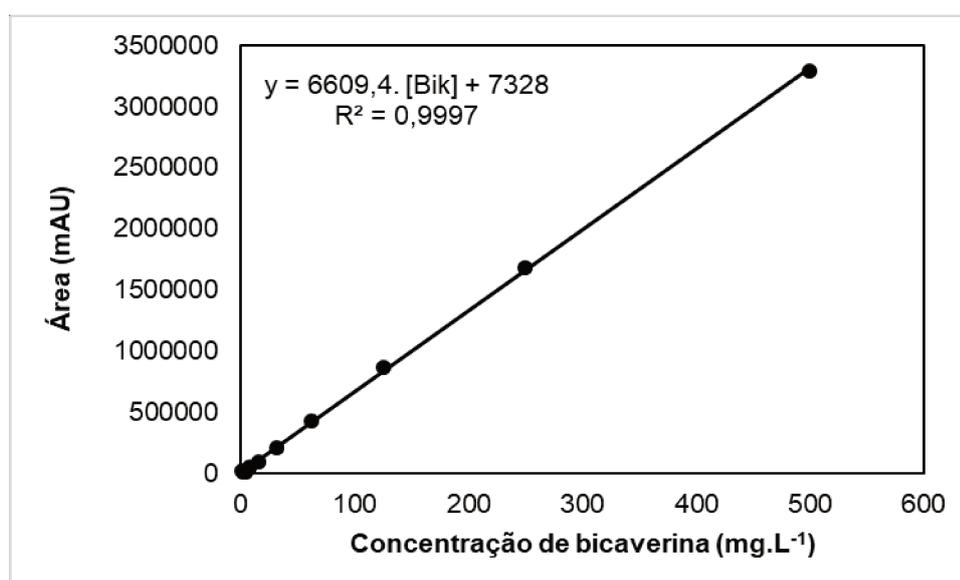
A curva de calibração em espectrofotômetro a 500nm é apresentada na Figura 19. Conforme pode ser observado, a faixa de linearidade se estendeu até além do valor 1,0 de absorbância a 500nm. Com esta curva foi possível quantificar a quantidade de bicaverina presente nos extratos, dado que a 500nm havia 97-98% da área em HPLC referente ao pico de bicaverina (ANEXO XVI), indicando não haver interferentes.

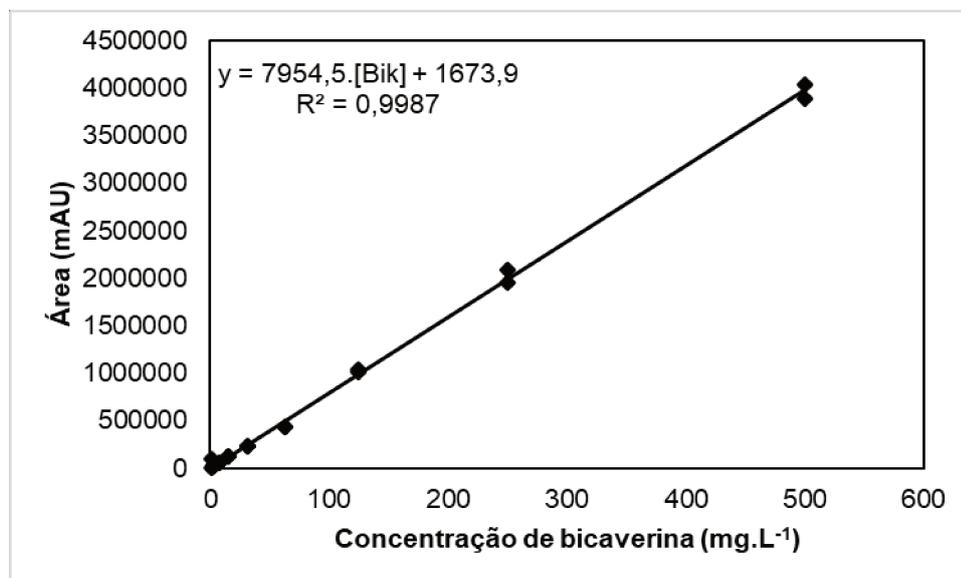
**Figura 19:** Curva de calibração da bicaverina produzida em espectrofotômetro a 500 nm.



Após purificação pelo método em HPLC semi-preparativo, a bicaverina foi pesada em balança de precisão de cinco casas decimais, na proporção 1:1, sendo analisada a bicaverina produzida e o Pardão Sigma em HPLC analítico, sendo posteriormente construída uma curva padrão de ambas as amostras, como mostra as Figuras 20 e 21 a seguir.

**Figura 20:** Curva de calibração do padrão comercial.



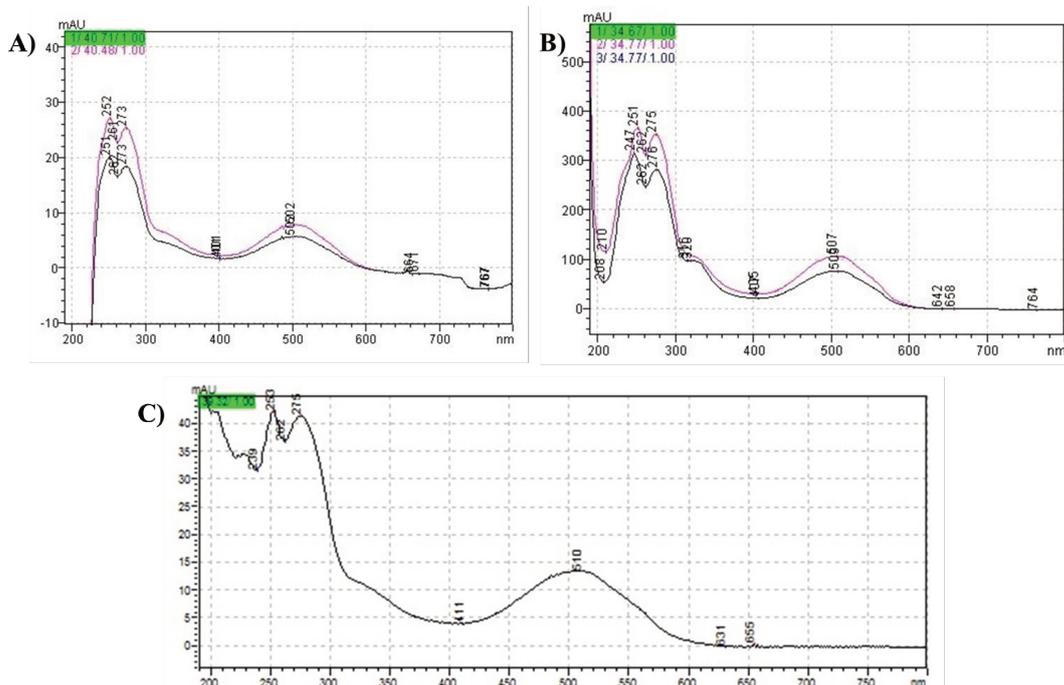
**Figura 21:** Curva de calibração da bicaverina produzida.

Pode-se verificar, a partir da equação da reta, a concentração de bicaverina produzida é de 100% (g/100g). Verificou-se também que a concentração de bicaverina no extrato bruto foi de 11,95% (g/100g).

#### 5.6.1. Caracterização físico-química da bicaverina purificada.

Pelo perfil de máxima de absorção da bicaverina, observou-se que ela possui maior absorbância em 500 nm, sendo assim, a única absorvida nessas condições no UV/VIS, no extrato bruto, como pode ser observado na Figura 22.

**Figura 22:** Espectro UV-vis do padrão comercial de bicaverina (A), extrato bruto (B), bicaverina purificada (C).



Para a caracterização da bicaverina, os resultados sugerem que o perfil máximo absorvido da bicaverina é de 500nm. Foi utilizado o comprimento de onda (254 nm) em análise em HPLC LC-20AT (SHIMADZU), para que pudesse ser observados outros compostos produzidos e extraídos no extrato bruto.

## 6. CONCLUSÃO

O presente trabalho conseguiu isolar e purificar a bicaverina produzida pelo *Fusarium oxysporum* CCT7620, através do método de purificação em HPLC semi-preparativo, avaliando que dos métodos estudados, ele foi o que teve maior eficiência, sendo possível isolar o pigmento com grau de pureza cromatográfico e através do método de massas HPLC-QTOF-MS/MS, identificar a bicaverina, em comparação com o padrão comercializado. Foi possível também saber qual a média do custo de produção da bicaverina, avaliando as etapas de produção, desde o inóculo, até a recuperação do pigmento, mostrando que a produção em laboratório é viável, visto que o padrão comercializado tem um custo muito alto para serem feitos novos estudos.

Até o momento, alguns estudos já foram feitos sobre a produção da bicaverina, mas este foi o primeiro estudo sistemático, avaliando a eficiência de extração do pigmento por diferentes solventes, o tempo de extração necessário e a quantidade de extrações sequenciais para a recuperação da mesma.

Para perspeção de estudos futuros, como a bicaverina é pouco estudada e possui algumas propriedades biológicas interessantes relatadas em estudos prévios, como atividade antibiótica contra protozoários, atividade antifúngica contra fungos filamentosos, atividade anti-oomicetos e atividade nematicida, podem ser feitos outros estudos para avaliação de suas atividade em outros micro-organismos. Além do mais, além de sua função principal de colorir, a bicaverina também tem potencial de coloração azul, visto que quando a mesma é autoclavada, ela altera sua coloração, podendo ser estudada uma outra opção de isolamento e recuperação.

Além disso, como verificado, além da bicaverina, outros compostos foram isolados, sendo desses, 7 compostos, 3 com coloração (amarelo e rosa) e 4 transparentes, que não foram identificados nesse trabalho, mas sugere-se que sejam caracterizados em estudos futuros, incluindo a identificação por espectroscopia por RMN, para saber se os mesmos já são compostos conhecidos, se possuem propriedades benéficas ou não, ou mesmo novas moléculas.

Portanto, o presente trabalho mostra uma nova metodologia que poderá ser usada para recuperar e purificar a bicaverina em estudos futuros, bem como a investigação da mesma, como um possível corante para aplicação na indústria alimentícia.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEROUMAND, A. A Review Article on Edible Pigments Properties and Sources as Natural Biocolorants in Foodstuff and Food Industry. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 6, n.1, p. 71-78, 2011.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4<sup>a</sup> ed. New York: J.W. & Sons, 1996.

AVALOS, J. LIMÓN, M.C. Biological roles of fungal carotenoids. **Current Genetics**, v. 61, n.1, p. 309-324, 2015.

AHMAD, W.A. et al. Application of bacterial pigments as colorant. **Springer Briefs in Molecular Science**, p. 57-74, 2012.

AZEVEDO, L. S. Corantes naturais e artificiais. **Revista de trabalhos acadêmicos**. n. 6, v. 2, 2016.

BALAN, J., et al. Bikaverin, an antibiotic from *Gibberella fujikuroi*, effective against *Leishmania brasiliensis*. **Folia Microbiologica**, v. 15, p. 479-484, 1970.

BARANI, H.; MONTAZER, M. A Review on Applications of Liposomes in Textile Processing. **Journal of Liposome Research**, v. 18, n. 3, p. 249-262, 2008.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Legislação/Alimentos. 2007. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos>>. Acesso em: 13/08/2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Resolução - CNNPA nº 44, de 1977**. Diário Oficial da União, Poder Executivo. Brasília: DF, 01 de fevereiro de 1978.

BENHAMOU, N.; GRAND, C. Cytological analysis of defense-related mechanisms induced in pea root tissues in response to colonization by the non-pathogenic *Fusarium oxysporum*, strain Fo47. **Phytopathology**, v. 91, p. 730-740, 2001.

BELL, A. A., et al. United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service studies on polyketide toxins of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*:

potential targets for disease control. **Pest Management Science**, v. 59, p. 736-747, 2003.

BEKAERT, A.; ANDRIEUX, J.; Plat, M. New total synthesis of bikaverin. **Tetrahedron Letters**, v. 33, p. 2805-2806, 2012.

BRIDLE, P.; TIMBERLAKE, C. F. Anthocyanins as natural food colours - selected aspects. **Food Chemistry**, v. 58, n. 12, 103-109, 1997.

CHELKOWSKI, J.; ZAJKOWSKI, P.; Visconti, A. Bikaverin production of *Fusarium* species. **Mycotoxin Res.**, v. 8, p. 73–76, 1992.

CORNFORTH, J. W. et al. Isolation and characterization of a fungal vacuolation factor (bikaverin). **J Chem Soc (C)**., v. 16, p. 2786-8, 1971.

COSKUN, O. **Separation techniques: Chromatography**. North Clin Istanbul. v. 3, n. 2, p. 156–160, 2016.

CRUZ, A. J. **Os Pigmentos Naturais Utilizados Em Pintura**. Disponível em: <<https://algharbconservacao.files.wordpress.com/2011/09/evora.pdf>> Acesso em: 12 jul 2017.

CRISTEA, D.; VILAREM, G. Improving light fastness of natural dyes on cotton yarn. **Dyes Pigments**., v. 70, p. 238-45, 2006.

DESHMUKH, R., MATHEW, A., PUROHIT H. J. Characterization of antibacterial activity of bikaverin from *Fusarium* sp. HKF15. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 117, n. 4, p. 443-448, 2014.

DUARTE, A. W. F. et al. Antarctic Fungi as Producers of Pigments. **Fungi of Antarctica**. Belo Horizonte: Springer, 2019. p. 305-318.

DUFOSSÉ, L. Microbial production of food grade pigments. **Food technology and biotechnology**. v. 44 (3), p. 313-321, 2006.

DUFOSSÉ, L. Pigments, microbial. **Encyclopedia Microbiol.**, v. 4, p.457-71, 2009.

DUFOSSÉ, L. et al. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 389-406, 2005.

DUFOSSÉ, L. et al. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Curr Opin Biotechnol.** v. 26, p. 56–61, 2014.

Giordano, W.; Domenech, C.E. *Aeration affects acetate destination in Gibberella fujikuroi*. **FEMS Microbiology Letters** v. 180 p. 111-116, 1999.

GONSALVES, A.K; FERREIRA, S.A. *Fusarium oxysporum*. **Crop Knowledge Master**, 1993.

GORDON, T. R.; MARTYN, R. D. The evolutionary biology of fusarium oxysporum. **Annual Reviews Phytopathol.** v. 35, p. 111-128, 1997.

GUNATILAKA, A. L. FUNGAL SECONDARY METABOLITES. **Office of Arid Lands Studies, Southwest Center for Natural Products Research and Commercialization**, The University of Arizona, Tucson, Arizona. 2010.

GUPTA, C. Microbes as potential source of biocolours. **Pharmacologyonline** 2. p. 1309-1318, 2011.

HUSSEIN, S. et al. Tannins from the leaves of punica granatum. **Photochemistry**, v. 45, p. 819-23, 1997.

JOSHI, V. K. et al. Microbial pigments. **Ind J Biotechnol.**, v. 2, p. 362-9, 2003.

KOES, R. K.; QUATTROCCHIO, F.; MOL, J. N. M. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. **BioEssays**, v. 16, p. 123-32, 1994.

KUMARI, M.H.P. et al. Safety evaluation of monascus purpureus red mould rice in albino rats. **Food Chem. Toxicol.**, v. 47, p. 1739-1746, 2009.

KUNDU, A. et al. Anti-nemic secondary metabolites produced by *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**. v.19, p. 631–636, 2016.

KWON, H. R. et al. Nematicidal activity of bikaverin and fusaric acid isolated from fusarium oxysporum against pine wood nematode, bursaphelenchus xylophilus. **J Plant Pathol.**, v. 23, p. 318-21, 2007.

LALE, G. J., GADRE, R. V. Production of bikaverin by a *Fusarium fujikuroi* mutant in submerged cultures. **AMB Express**. v. 6: 34, 2016.

LEBEAU, J. Production and new extraction method of polyketide red pigments produced by ascomycetous fungi from terrestrial and marine habitats. **Journal of Fungi**. 3 (3), 2017.

LEBEAU, J. et al. Isolation of two novel purple naphthoquinone pigments concomitant with the bioactive red bikaverin and derivatives thereof produced by *Fusarium oxysporum*. **Biotechnology Progress**. 35 e 2738, 2019.

LIMÓN, M. C.; RODRÍGUEZ-ORTIZ, R. Avalos j. Bikaverin production and applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 87, p. 21-29, 2010.

MALIK, K; TOKKAS, J; GOYAL, S. Microbial pigments: a review. **Int J Microbiol Res Technol.**, v. 1, n. 4, p. 361–5, 2012.

MAPARI, S. A. S. et al. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 231-238, 2005.

MAPARI, S. A. S., THRANE, U., MEYER A. S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants. **Trends Biotechnol.** v. 28, p. 300–307, 2010.

MATZ, C., DEINES, P., BOENIGK J. Impact of violacein-producing bacteria on survival and feeding of bacterivorous nanoflagellates. **Appl Environ Microbiol.**, v. 70, n. 3, p. 1593-9, 2004.

MENDONÇA, L. M. et al. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of curcumin in PC12 cells. **Mutation Research**. v. 675, p. 29-34, 2009.

MILLER, J.D. Food-born natural carcinogens: issues and priorities. **African Newsletter Occupational Health and Safety**, 6(suppl), p. 22-28. Institute of Occupation Health, Helsinki, Finland, 1996.

NAGPAL, N.; MUNJAL, N; CHATTERJEE, S. Microbial pigments with health benefits - a mini review. **Trends Biosci.**, v. 4, p. 157-160, 2011.

NORRED, W. P. et al. Effects of selected secondary metabolites of *Fusarium moniliforme* on unscheduled synthesis of DNA by rat primary hepatocytes. **Food Chem Toxicol.**, v. 30, p. 233-237, 1992.

ORTONEDA, M. et al. *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. **Infection And Immunity**, v. 72, n. 3, p. 1760-1766, mar 2004.

PubChem. **National Center for Biotechnology Information**, 2017. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 17 ago 2017.

RODRÍGUEZ-ORTIZ, R., et al. Stimulation of bikaverin production by sucrose and by salt starvation in *Fusarium fujikuroi*. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 85. p. 1991-2000, 2010.

SANCHEZ, S., DEMAIN, A. L. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme Microb. Technol.** v. 31, p. 895-906, 2002.

SILVA, W. Produção de pigmentos microbianos e seu uso no tingimento de tecidos. 2013. 56 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada). Universidade Federal de São João Del-Rei (UFSJ), Ouro Branco, 2013.

SINGHA, R., et al. Antimicrobial activity of some natural dyes. **Dyes and Pigments**, v. 66. p. 99-102, 2005.

SON, S. W. Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*. **J Appl Microbiol.**, v. 104, p. 692-8, 2008.

SHISHIDO, M. Biological control efficiency of *Fusarium* wilt of tomato by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo-B2 in different environments. **Phytopathology**, v. 95, p. 1072-1080, 2005.

TIBOR, C. Liquid chromatography of natural pigments and synthetic dyes. **J. Chromatography Library**, v. 71. p. 11-19, 2007.

VANDERMOLEN, K. M., et. al. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. **AMB Express**, v. 3, n. 71, 2013.

VELOSO, L. A. **Corantes e pigmentos - dossiê técnico**. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. Instituto de Tecnologia do Paraná, 2012.

VENIL, C. K.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. An insightful overview on microbialpigment: prodigiosin. **Electron J Biol.**, v. 5, n. 3, p. 49-61, 2009.

VENIL, C. K.; ZAKARIA, Z. A.; AHMADA, W. A. Bacterial pigments and their applications. **Process Biochemistry**, v. 48. p. 1065-1079, 2013.

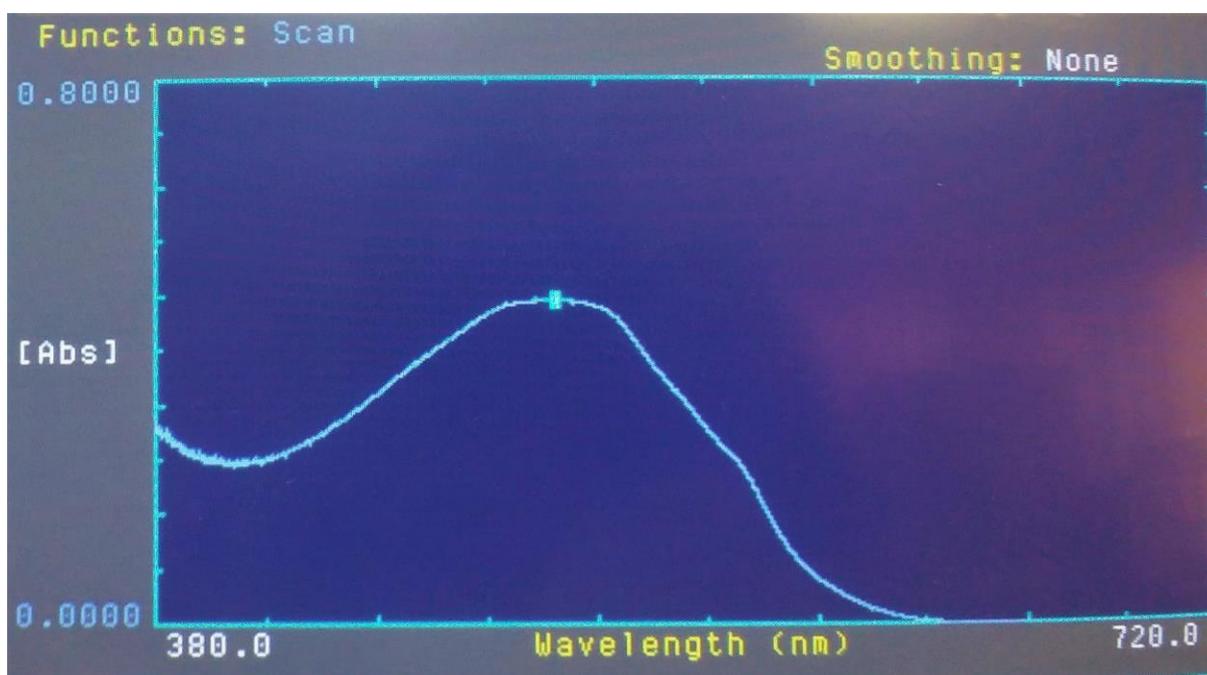
WILSON, B. G.; BAHNA, S. L. Adverse reactions to food additives. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 95. p. 499-507, 2005.

WISSGOTT, U.; BORTLIK, K. Prospects for new natural food colorants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, 1996.

ZANONI, M. V. B.; YAMANAKA, H. Corantes. Caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento. 1. Ed. São Paulo: Editora Unesp, 2016.

## 8. ANEXOS

ANEXO I – Espectro de varredura UV-vis, de 380 a 720 nm.



Anexo II – Bioamassa após processo de extração sequencial.



Anexo III – Extrato bruto rotaevaporado.



Anexo IV – Ciclos de extração, quantidade, concentração e custo de produção da bicaverina.

| Ciclos de extração | Quantidade de bicaverina |      | Concentração de bicaverina |      | Custo de produção da bicaverina |      |
|--------------------|--------------------------|------|----------------------------|------|---------------------------------|------|
|                    | mg                       | %    | mg/mL                      | %    | R\$/mg                          | %    |
| 1                  | 3812                     | 33%  | 381,2                      | 100% | 6,94                            | 100% |
| 2                  | 6289                     | 54%  | 314,4                      | 82%  | 5,16                            | 74%  |
| 3                  | 8243                     | 71%  | 274,8                      | 72%  | 4,66                            | 67%  |
| 4                  | 9538                     | 82%  | 238,4                      | 63%  | 4,65                            | 67%  |
| 5                  | 10473                    | 90%  | 209,5                      | 55%  | 4,81                            | 69%  |
| 6                  | 11357                    | 98%  | 189,3                      | 50%  | 4,96                            | 71%  |
| 7                  | 11606                    | 100% | 165,8                      | 43%  | 5,37                            | 77%  |

ANEXO V– Mão de obra

### Mão de obra

Bolsa de mestrado 1500 R\$/mês

Horas trabalhadas 176 h/mês

**Custo horário com mão de obra 8,522727 R\$/h**

## ANEXO VI – Equipamentos e energia elétrica.

| <b>Equipamentos/ Energia elétrica</b> | <b>Potência</b> |                |
|---------------------------------------|-----------------|----------------|
| <b>Estufa de cultura 002CB</b>        | 350             | W              |
|                                       | 0,35            | kWh/h          |
| preço do kWh                          | R\$/kWh         | 0,331          |
| <b>Valor por hora de utilização</b>   | <b>R\$/h</b>    | <b>0,11585</b> |
| <b>Shaker Innova 4335</b>             | 1400            | W              |
|                                       | 1,4             | kWh/h          |
| preço do kWh                          | R\$/kWh         | 0,331          |
| <b>Valor por hora de utilização</b>   | <b>R\$/h</b>    | <b>0,4634</b>  |
| <b>Autoclave SD137</b>                | 5000            | W              |
|                                       | 5               | kWh/h          |
| preço do kWh                          | R\$/kWh         | 0,331          |
| <b>Valor por hora de utilização</b>   | <b>R\$/h</b>    | <b>1,655</b>   |
| <b>Rotaevaporador MA-120</b>          | 1600            | W              |
|                                       | 1,6             | kWh/h          |
| preço do kWh                          | R\$/kWh         | 0,331          |
| <b>Valor por hora de utilização</b>   | <b>R\$/h</b>    | <b>0,5296</b>  |
| <b>Ultra-Turrax</b>                   | 500             | W              |
|                                       | 0,5             | kWh/h          |
| preço do kWh                          | R\$/kWh         | 0,331          |
| <b>Valor por hora de utilização</b>   | <b>R\$/h</b>    | <b>0,1655</b>  |

|                                     |              |                |
|-------------------------------------|--------------|----------------|
| <b>Fluxo Laminar</b>                | 1400         | W              |
|                                     | 1,4          | kWh/h          |
| preço do kWh                        | R\$/kWh      | 0,331          |
| <b>Valor por hora de utilização</b> | <b>R\$/h</b> | <b>0,4634</b>  |
| <b>Espectro DU640</b>               | 250          | W              |
|                                     | 0,25         | kWh/h          |
| preço do kWh                        | R\$/kWh      | 0,331          |
| <b>Valor por hora de utilização</b> | <b>R\$/h</b> | <b>0,08275</b> |
| <b>Centrífuga Mod. 206 BL</b>       | 300          | W              |
|                                     | 0,3          | kWh/h          |
| preço do kWh                        | R\$/kWh      | 0,331          |
| <b>Valor por hora de utilização</b> | <b>R\$/h</b> | <b>0,0993</b>  |
| <b>Centrífuga 460R</b>              | 600          | W              |
|                                     | 0,6          | kWh/h          |
| preço do kWh                        | R\$/kWh      | 0,331          |
| <b>Valor por hora de utilização</b> | <b>R\$/h</b> | <b>0,1986</b>  |

## ANEXO VII– Insumos de meio de cultura.

| Insumos                 | Valor de aquisição (R\$) | unidades | Valor unitário     |
|-------------------------|--------------------------|----------|--------------------|
| PDA em pó               | 260,00                   | 500 g    | 0,52 R\$/g         |
| Meio PDA                | -                        | -        | 19,24 R\$/L        |
| Arroz                   | 17,90                    | 5000 g   | 0,00358 R\$/g      |
| Meio arroz              |                          |          | 0,179 R\$/L        |
| Acetato de etila        | 21,35                    | 1000 mL  | 0,02135 R\$/mL     |
| Placa de petri          |                          |          | 0,5 R\$/unidade    |
| Placa de Petri com meio |                          |          | 0,8848 R\$/unidade |

## ANEXO VIII – Depreciação dos Equipamentos.

| <b>Depreciação dos Equipamentos</b>             |     |             |              |
|---|-----|-------------|--------------|
| Valor Estufa de cultura 002CB                   | R\$ | 2.900,00    |              |
| Vida útil                                       |     | 10          | anos         |
| <b>Valor da depreciação por h de utilização</b> |     | <b>0,03</b> | <b>R\$/h</b> |
| Valor Shaker Innova 4335                        | R\$ | 16.600,00   |              |
| Vida útil                                       |     | 10          | anos         |
| <b>Valor da depreciação por h de utilização</b> |     | <b>0,19</b> | <b>R\$/h</b> |
| Valor Autoclave SD137                           | R\$ | 8.500,00    |              |
| Vida útil                                       |     | 10          | anos         |
| <b>Valor da depreciação por h de utilização</b> |     | <b>0,10</b> | <b>R\$/h</b> |
| Valor Rotaevaporador MA-120                     | R\$ | 10.500,00   |              |
| Vida útil                                       |     | 10          | anos         |
| <b>Valor da depreciação por h de utilização</b> |     | <b>0,12</b> | <b>R\$/h</b> |
| Valor Fluxo Laminar                             | R\$ | 9.800,00    |              |
| Vida útil                                       |     | 10          | anos         |
| <b>Valor da depreciação por h de utilização</b> |     | <b>0,11</b> | <b>R\$/h</b> |
| Espectro DU640                                  | R\$ | 15.000,00   |              |
| Vida útil                                       |     | 10          | anos         |
| <b>Valor da depreciação por h de utilização</b> |     | <b>0,17</b> | <b>R\$/h</b> |
| Valor Centrífuga Mod. 206 BL                    | R\$ | 3.000,00    |              |
| Vida útil                                       |     | 10          | anos         |
| <b>Valor da depreciação por h de utilização</b> |     | <b>0,03</b> | <b>R\$/h</b> |
| Valor Centrífuga 460R                           | R\$ | 30.000,00   |              |
| Vida útil                                       |     | 10          | anos         |
| <b>Valor da depreciação por h de utilização</b> |     | <b>0,34</b> | <b>R\$/h</b> |
| Turrax  | R\$ | 7.000,00    |              |
| Vida útil                                       |     | 10          | anos         |
| <b>Valor da depreciação por h de utilização</b> |     | <b>0,08</b> | <b>R\$/h</b> |

## ANEXO IX – Custo total por batelada da produção do extrato bruto.

|                     | Utilização |            |                               |                                      | Custo total<br>(R\$/batelada) |
|---------------------|------------|------------|-------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
|                     | Quantidade | Unidades   | depreciação<br>(R\$/batelada) | Consumo energético<br>(R\$/batelada) |                               |
| <b>Inóculo</b>      |            |            |                               |                                      |                               |
| Estufa              | 72         | h/batelada | 2,38                          | 8,34                                 | 10,72                         |
| Autoclave           | 2          | h/batelada | 0,19                          | 3,31                                 | 3,50                          |
| Fluxo laminar       | 1          | h/batelada | 0,11                          | 0,46                                 | 0,58                          |
| Shaker              | 72         | h/batelada | 13,64                         | 33,36                                | 47,01                         |
| Turrax              | 0,1        | h/batelada | 0,01                          | 0,02                                 | 0,02                          |
| Mão de obra         | 2          | h/batelada | 17,05                         |                                      | 17,05                         |
| Placa de Petri      | 1          | unidade    | 0,88                          |                                      | 0,88                          |
| Meio Arroz          | 1000       | mL         | 0,18                          |                                      | 0,18                          |
| <b>TOTAL</b>        |            |            |                               |                                      | <b>79,95</b>                  |
| <b>Fermentação</b>  |            |            |                               |                                      |                               |
| Shaker              | 96         | h/batelada | 18,19                         | 44,49                                | 62,68                         |
| Autoclave           | 2          | h/batelada | 0,19                          | 3,31                                 | 3,50                          |
| Fluxo laminar       | 1          | h/batelada | 0,11                          | 0,46                                 | 0,58                          |
| Turrax              | 0,1        | h/batelada | 0,01                          | 0,02                                 | 0,02                          |
| Mão de obra         | 2          | h/batelada | 17,05                         |                                      | 17,05                         |
| Meio Arroz          | 1000       | mL         | 0,18                          |                                      | 0,18                          |
| <b>TOTAL</b>        |            |            |                               |                                      | <b>84,01</b>                  |
| <b>Extração</b>     |            |            |                               |                                      |                               |
| Centrífuga          | 2          | h/batelada | 0,68                          | 0,40                                 | 1,08                          |
| Shaker              | 12,99      | h/batelada | 2,46                          | 6,02                                 | 8,48                          |
| Fluxo laminar       | 1,5        | h/batelada | 0,17                          | 0,70                                 | 0,86                          |
| Espectro            | 1          | h/batelada | 0,17                          | 0,08                                 | 0,25                          |
| Mão de obra         | 2          | h/batelada | 17,05                         | 0,00                                 | 17,05                         |
| Acetato de etila    | 80         | mL         | 1,71                          |                                      | 1,71                          |
| <b>TOTAL</b>        |            |            |                               |                                      | <b>29,43</b>                  |
| <b>Concentração</b> |            |            |                               |                                      |                               |
| Rota evporador      | 2          | h/batelada | 0,24                          | 1,06                                 | 1,30                          |
| Mão de obra         | 2          | h/batelada | 17,05                         |                                      | 17,05                         |
| <b>TOTAL</b>        |            |            |                               |                                      | <b>18,34</b>                  |

3800mL meio  
300g/biomassa

**78,94736842**

Considerando uma batelada = 5 erlens de 500mL contendo 200 mL de meio

## Anexo X – Custo de produção por ciclos de extração.

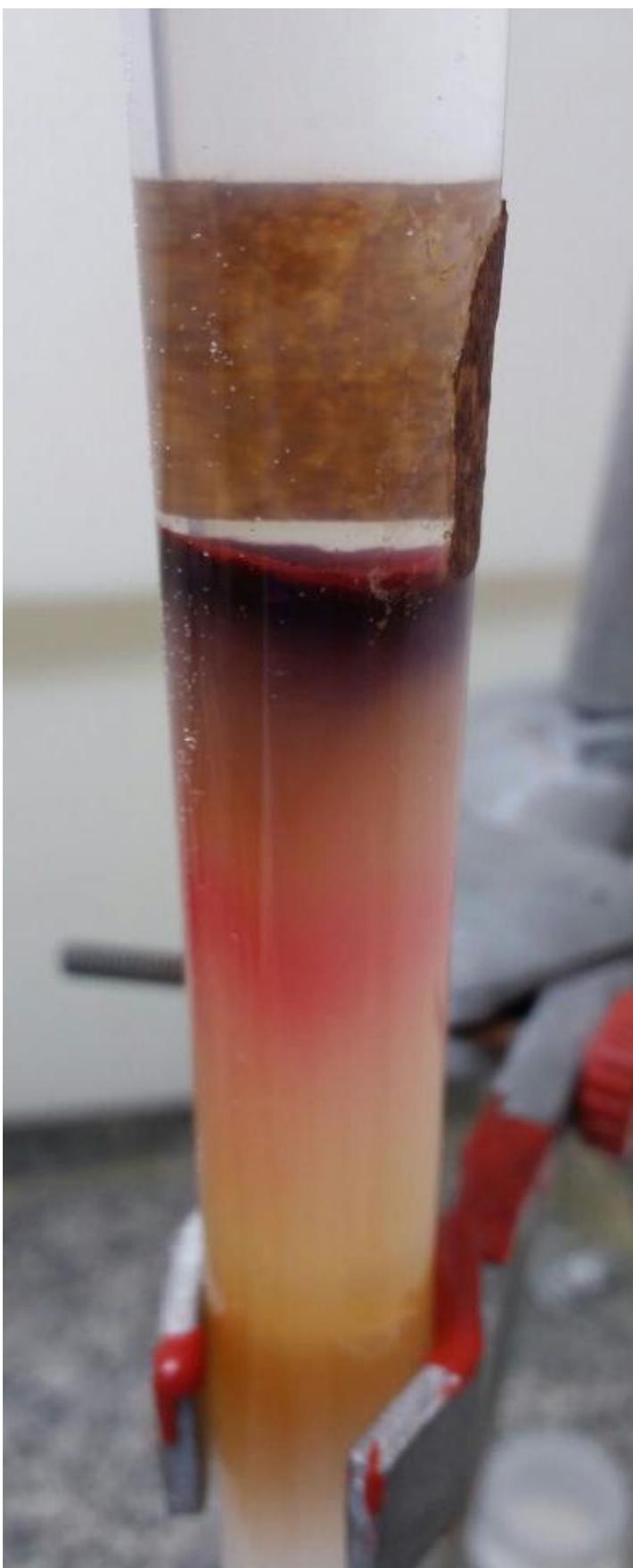
|  |        |                        |             |                   |                 |
|--|--------|------------------------|-------------|-------------------|-----------------|
| <b>Custo de produção com um ciclo de extração</b>      |        | 80 mL                  |             |                   |                 |
|  | R\$    |                        |             |                   |                 |
| Produção de 80g de biomassa                            | 163,95 | Produção de bicaverina | 30,49247 mg | Custo de produção | 6,943715 R\$/mg |
| Extração de 80g de biomassa                            | 29,43  |                        |             |                   |                 |
| Concentração de 80mL de extrato                        | 18,34  |                        |             |                   |                 |
| TOTAL  | 211,73 |                        |             |                   |                 |
| <b>Custo de produção com dois ciclos de extração</b>   |        | 160 mL                 |             |                   |                 |
|  | R\$    |                        |             |                   |                 |
| Produção de 80g de biomassa                            | 163,95 | Produção de bicaverina | 50,30834 mg | Custo de produção | 5,15837 R\$/mg  |
| Extração (2x) de 80g de biomassa                       | 58,87  |                        |             | Sem reextração    | 13,88743 R\$/mg |
| Concentração (2x) de 80mL de extrato                   | 36,69  |                        |             |                   |                 |
| TOTAL  | 259,51 |                        |             |                   |                 |
| <b>Custo de produção com três ciclos de extração</b>   |        | 240 mL                 |             |                   |                 |
|  | R\$    |                        |             |                   |                 |
| Produção de 80g de biomassa                            | 163,95 | Produção de bicaverina | 65,94643 mg | Custo de produção | 4,659646 R\$/mg |
| Extração (3x) de 80g de biomassa                       | 88,30  |                        |             | Sem reextração    | 20,83114 R\$/mg |
| Concentração (3x) de 80mL de extrato                   | 55,03  |                        |             |                   |                 |
| TOTAL  | 307,29 |                        |             |                   |                 |
| <b>Custo de produção com quatro ciclos de extração</b> |        | 320 mL                 |             |                   |                 |
|  | R\$    |                        |             |                   |                 |
| Produção de 80g de biomassa                            | 163,95 | Produção de bicaverina | 76,30088 mg | Custo de produção | 4,653485 R\$/mg |
| Extração (4x) de 80g de biomassa                       | 117,73 |                        |             | Sem reextração    | 27,77486 R\$/mg |
| Concentração (4x) de 80mL de extrato                   | 73,38  |                        |             |                   |                 |
| TOTAL  | 355,07 |                        |             |                   |                 |
| <b>Custo de produção com cinco ciclos de extração</b>  |        | 400 mL                 |             |                   |                 |
|  | R\$    |                        |             |                   |                 |
| Produção de 80g de biomassa                            | 163,95 | Produção de bicaverina | 83,78182 mg | Custo de produção | 4,808239 R\$/mg |
| Extração (5x) de 80g de biomassa                       | 147,17 |                        |             | Sem reextração    | 34,71857 R\$/mg |
| Concentração (5x) de 80mL de extrato                   | 91,72  |                        |             |                   |                 |
| TOTAL  | 402,84 |                        |             |                   |                 |
| <b>Custo de produção com seis ciclos de extração</b>   |        | 480 mL                 |             |                   |                 |
|  | R\$    |                        |             |                   |                 |
| Produção de 80g de biomassa                            | 163,95 | Produção de bicaverina | 90,85926 mg | Custo de produção | 4,95955 R\$/mg  |
| Extração (6x) de 80g de biomassa                       | 176,60 |                        |             | Sem reextração    | 41,66229 R\$/mg |
| Concentração (6x) de 80mL de extrato                   | 110,07 |                        |             |                   |                 |
| TOTAL  | 450,62 |                        |             |                   |                 |
| <b>Custo de produção com sete ciclos de extração</b>   |        | 560 mL                 |             |                   |                 |
|  | R\$    |                        |             |                   |                 |
| Produção de 80g de biomassa                            | 163,95 | Produção de bicaverina | 92,8449 mg  | Custo de produção | 5,368082 R\$/mg |
| Extração (7x) de 80g de biomassa                       | 206,04 |                        |             | Sem reextração    | 41,66229 R\$/mg |
| Concentração (7x) de 80mL de extrato                   | 128,41 |                        |             |                   |                 |
| TOTAL  | 498,40 |                        |             |                   |                 |

## ANEXO XI – Concentração de bicaverina em replicatas.

10g de biomassa + 10mL acetato de etila. Deixa 4h20min, remove solvente e adiciona mais 10mL acetato de etila

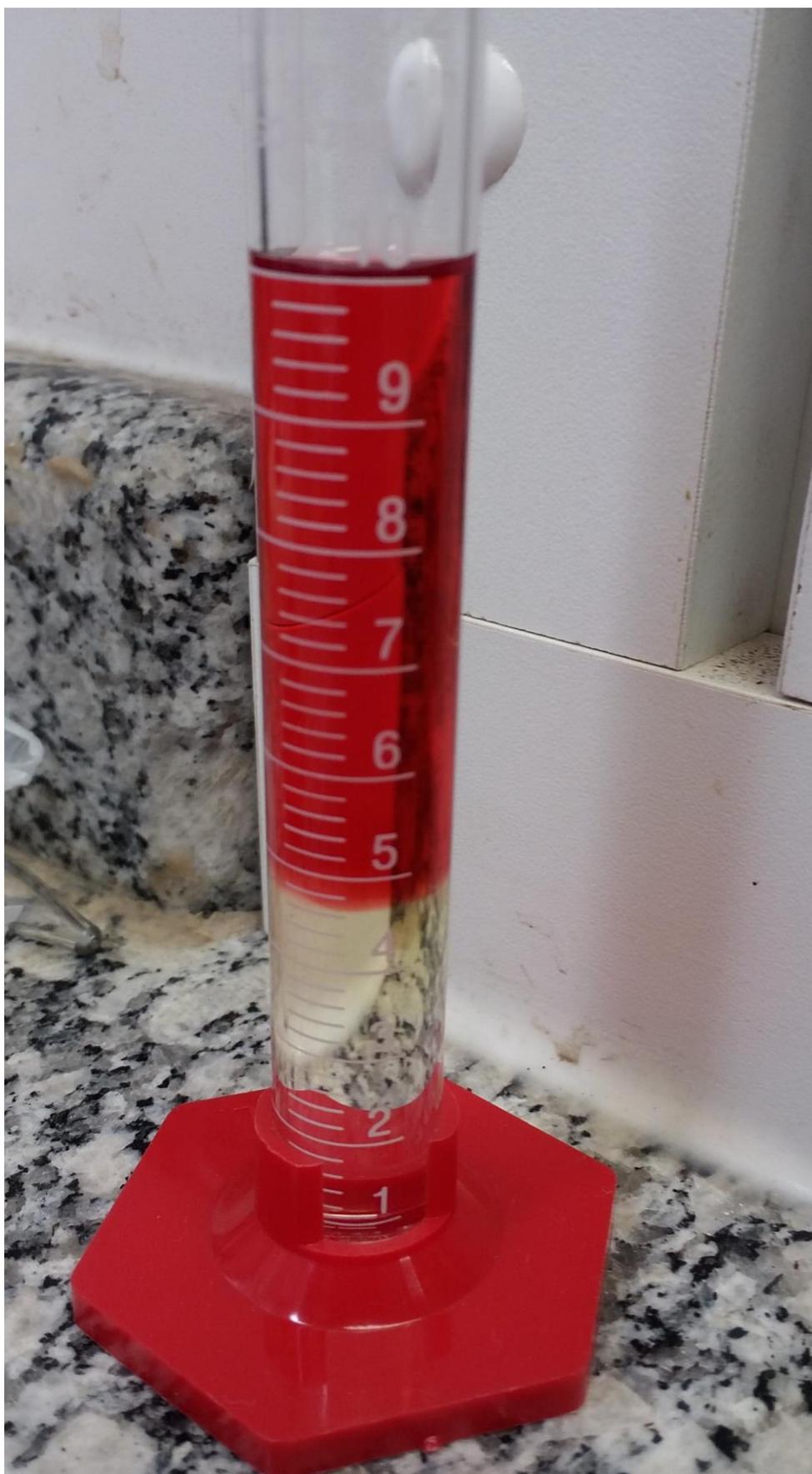
| Extrações | Absorbância das replicatas |        |        |        |        | Concentração de bicaverina nas replicatas (mg/L) |        |        |        |        | Conc. Média   | DP    | CV    | Volume Total (mL) | Quantidade de bicaverina (mg) | Concentração final de bicaverina (mg/L) | produtividade (mg/h) | Custo da extração |          |  |
|-----------|----------------------------|--------|--------|--------|--------|--|--------|--------|--------|--------|---------------|-------|-------|-------------------|-------------------------------|---|----------------------|-------------------|----------|--|
|           | 1                          | 2      | 3      | 4      | 5      | 1  | 2      | 3      | 4      | 5      |               |       |       |                   |                               |   |                      | R\$               | R\$/mg   |  |
| 1         | 1,5468                     | 1,5300 | 1,0785 | 1,3038 | 1,1649 | 443,64   | 438,91 | 311,83 | 375,25 | 336,15 | <b>381,16</b> | 59,38 | 15,6% | 10                | 3811,6                        | 381,2                                   | 879,6                | 29,43             | 0,007722 |  |
| 2         | 0,8102                     | 0,9134 |        | 0,8428 | 0,8361 | 236,32   | 265,37 |        | 245,5  | 243,61 | <b>247,70</b> | 12,43 | 5,0%  | 20                | 6288,5                        | 314,4                                   | 725,6                | 58,87             | 0,009361 |  |
| 3         | 0,6117                     | 0,6641 | 0,6836 | 0,7401 | 0,6259 | 180,45   | 195,2  | 200,69 | 216,59 | 184,45 | <b>195,48</b> | 14,32 | 7,3%  | 30                | 8243,3                        | 274,8                                   | 634,1                | 88,30             | 0,010712 |  |
| 4         | 0,4733                     | 0,5009 | 0,1198 | 0,5118 | 0,5463 | 141,5  | 149,27 | 42,006 | 152,34 | 162,05 | <b>129,43</b> | 49,42 | 38,2% | 40                | 9537,6                        | 238,4                                   | 550,2                | 117,73            | 0,012344 |  |
| 5         | 0,4041                     | 0,3176 | 0,0411 | 0,3304 | 0,4208 | 122,02   | 97,677 | 19,856 | 101,28 | 126,72 | <b>93,51</b>  | 43,07 | 46,1% | 50                | 10472,7                       | 209,5                                   | 483,4                | 147,17            | 0,014053 |  |
| 6         | 0,3183                     | 0,3237 | 0,0414 | 0,3705 | 0,3705 | 97,874   | 99,394 | 19,94  | 112,57 | 112,57 | <b>88,47</b>  | 38,94 | 44,0% | 60                | 11357,4                       | 189,3                                   | 436,8                | 176,60            | 0,015549 |  |
| 7         | 0,0259                     | 0,0308 | 0,0188 | 0,1729 | 0,0453 | 15,578   | 16,957 | 13,579 | 56,951 | 21,038 | <b>24,82</b>  | 18,17 | 73,2% | 70                | 11605,6                       | 165,8                                   | 382,6                | 206,04            | 0,017753 |  |

Anexo XII – Cromatografia em coluna aberta com sílica gel com extrato bruto.

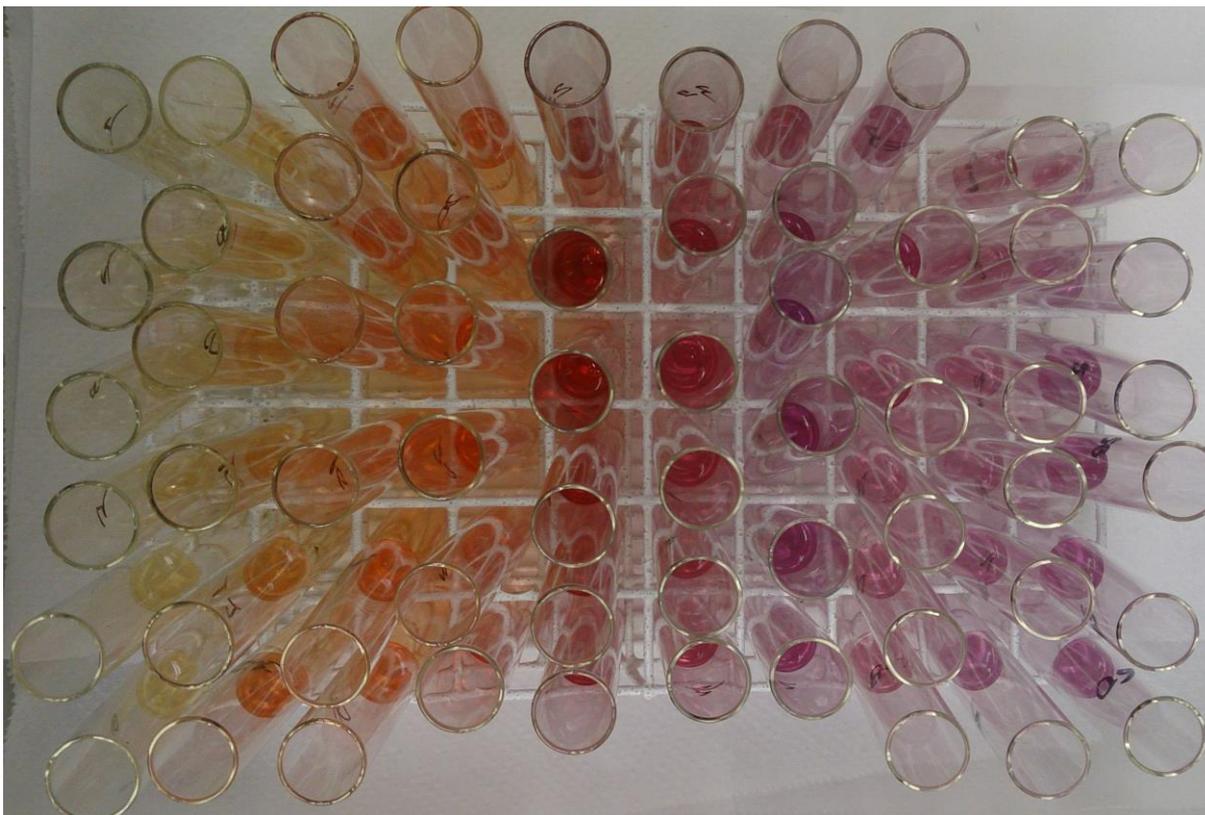




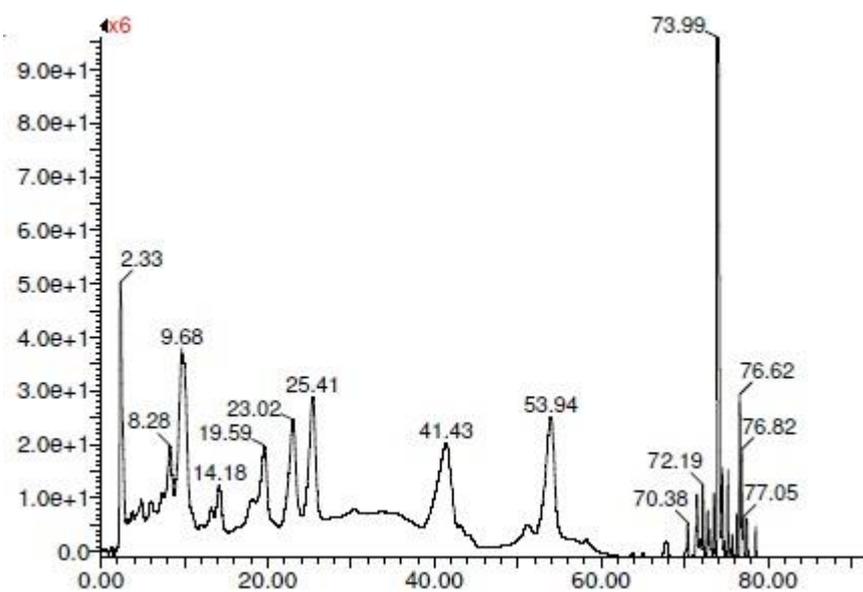
Anexo XIII – Fração vermelha coletada após coluna aberta com sílica gel.



## Anexo XIV – Frações coletadas após cromatografia em coluna Sephadex.



## Anexo XV – Cromatograma das amostras coletadas em HPLC semi-preparativo.



Anexo XVI – Cromatograma da bicaverina purificada, pós semi-preparativo.

