



**UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA ACADÊMICA**  
**COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS**

**Laura Truan Oliveira**

**PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE BIODERIVADOS E BIODERIVADOS POR**  
***Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) A PARTIR DE RESÍDUOS DA**  
**AGROINDÚSTRIA**

**Recife**  
**2017**

**Laura Truan Oliveira**

**PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE BIOSURFACTANTES E PIGMENTOS POR  
*Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) A PARTIR DE RESÍDUOS DA  
AGROINDÚSTRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais Universidade Católica de Pernambuco como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em **Desenvolvimento de Processos Ambientais**.

Área de Concentração: Desenvolvimento em Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientador: Profa. Dra. Kaoru Okada

Co-orientadoras: Dra. Rosileide Fontenele Silva e Dra. Thayse Alves de Lima Silva

**Recife  
2017**

Oliveira, L. T. Produção simultânea de biossurfactantes e pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) a partir de resíduos da agroindústria

OLIVEIRA, L. T.

Produção simultânea de biossurfactantes e pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) a partir de resíduos da agroindústria, 2017.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2017.

1. Pigmento. 2. Biossurfactante. 3. Cevada 4. Soro de leite. 5. *Penicillium sclerotiorum*. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais. Centro de Ciências e Tecnologia.

Oliveira, L. T. Produção simultânea de biossurfactantes e pigmentos por *Penicillium sclerotiorum*  
(UCP 1361) a partir de resíduos da agroindústria

**PRODUÇÃO SIMULTÂNEA DE BIOSURFACTANTES E PIGMENTOS POR  
*Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) A PARTIR DE RESÍDUOS DA  
AGROINDUSTRIA**

**Laura Truan Oliveira**

**Examinadores:**

---

Prof. Dra. Kaoru Okada  
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva  
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

---

Prof. Dra. Luciana de Oliveira Franco  
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dra. Kaoru Okada, pela oportunidade de aprendizado, por toda a orientação e todo o conhecimento passado ao longo desses anos;

Às minhas co-orientadoras, Dra. Rosileide Fontenele e Dra. Thayse Alves por estarem sempre presentes, por todos os dias, noites e madrugadas, pela eterna paciência e por nunca cansarem de me ensinar, muito obrigada;

A todos os meus professores da graduação e do mestrado, por me tornarem a profissional que eu sou hoje. Especialmente à professora Dra. Galba Maria Campos-Takaki e professor Dr. Carlos Alberto Alves da Silva por inúmeros conselhos e toda a ajuda prestada;

À coordenadora do curso professora Dra. Clarissa Daisy pelos conhecimentos transmitidos e pela atenção sempre dada;

Aos meus colegas de turma por tornarem esses dois anos inesquecíveis, e por sempre deixarem tudo mais fácil;

Aos meus companheiros de laboratório, obrigada a cada um de vocês que me ajudaram, seja ensinando novos conhecimentos, emprestando placas de sabouraud ou conversas de incentivo;

À amiga de longas datas e companheira de mestrado Nathália Sá Alencar, pelo incentivo de sempre, por toda a ajuda e pelas conversas diárias que tornaram esses dois anos melhor do que eu poderia esperar;

Ao meu marido Pedro, por me empurrar quando eu precisava, e mais ainda por me abraçar não só quando eu precisava, essa conquista não é só minha, é nossa. Obrigada pela paciência, pelo incentivo e pela torcida constante, sem você o caminho seria muito mais difícil e menos feliz;

Aos meus pais Vladimir e Katarina (em memória) por sempre me ensinarem que o estudo é essencial e que tudo sempre só depende de mim, vocês me ensinaram que a palavra desistir não existe e me tornaram grande parte do que eu sou hoje, obrigada por tudo;

Aos técnicos do NPCIAMB, Sr. Humberto e André Felipe por todo o auxílio e atenção.

À Universidade Católica de Pernambuco, que me permitiu a realização deste trabalho.

Ao CETENE pela colaboração na realização da análise feita;

À Capes, pelo apoio financeiro, por meio da concessão da bolsa de estudos.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	i
<b>SUMÁRIO</b> .....	ii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	iv
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	v
<b>RESUMO</b> .....	vi
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1.1 Introdução</b> .....	14
<b>1.2 Objetivos</b> .....	16
1.2.1 Objetivo Geral.....	16
1.2.2 Objetivos Específicos.....	16
<b>1.3 Revisão da Literatura</b> .....	17
1.3.1 Fungos filamentosos .....	17
1.3.2 <i>Penicillium</i> .....	17
1.3.3 Metabolitos secundários .....	19
1.3.3.1 Biossurfactantes .....	21
1.3.3.2 Pigmento .....	23
1.3.4 Substratos para produção .....	27
1.3.4.1 Soro de leite .....	28
1.3.4.2 Cevada .....	30
1.3.4.3 Utilização de substratos na produção de pigmentos .....	30
<b>1.4 Referências Bibliográficas</b> .....	32

<b>CAPÍTULO II</b> – Estratégia de baixo custo para a produção natural de pigmento rosa por <i>Penicillium sclerotiorum</i> (UCP 1361) a partir de recursos renováveis e sua promissora atividade antimicrobiana .....	40
<b>CAPÍTULO III</b> – transformação sustentável de cevada e soro de leite como recurso natural renovável para obtenção de biossurfactante por <i>Penicillium sclerotiorum</i> (UCP 1361) .....	60
<b>Conclusões Gerais</b> .....	76
<b>ANEXOS</b> .....	79
<b>Anexo 1:</b> Manuscrito submetido a <b>Canadian Journal of Chemical Engineering</b> : Cost effective strategy for natural production of new pink pigment by <i>Penicillium sclerotiorum</i> (UCP 1361) from renewable resources and its promising antimicrobial activity .....	80
<b>Anexo 2:</b> Carta de submissão do manuscrito submetido .....	96
<b>Anexo 3:</b> Normas da revista a qual o trabalho foi submetido .....	97

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1.</b> Características macroscópicas e microscópicas do <i>Penicillium sclerotiorum</i> : A. Identificação macroscópicas em meios CYA, MEA e Glicerol 25%; B: identificação microscópica de esporos; C: Identificação microscópica dos conidióforos .....	19
<b>Figura 2.</b> Representação da estrutura do biossurfactante e de sua reação em contato com óleo e água .....	21
<b>Figura 3:</b> Tipos de descarte agroindustrial gerado por diferentes industrias .....	28

### CAPÍTULO II

<b>Figura 1.</b> Características macroscópicas e microscópicas de <i>Penicillium sclerotiorum</i> em CYA, MEA e Glicerol 25% .....	49
<b>Figura 2.</b> (A) Identificação microscópica dos conidióforos; (B) Identificação microscópica dos esporos .....	49
<b>Figura 3:</b> Amplificação do DNA de <i>Penicillium sclerotirum</i> com os primers ITS1 e ITS4 .....	50
<b>Figura 4:</b> Diagrama de Pareto para investigar os efeitos das concentrações de soro de leite e cevada para produção de pigmento .....	52
<b>Figura 5:</b> Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de pigmento rosa produzido por <i>Penicillium sclerotiorum</i> no meio selecionado: (A) tempo de retenção e (B) varredura de absorvância .....	53

### CAPÍTULO III

<b>Figura 1.</b> Características macroscópicas e microscópicas de <i>Penicillium sclerotiorum</i> em CYA, MEA e Glicerol 25% .....	66
<b>Figura 2.</b> (A) Identificação microscópica dos conidióforos; (B) Idenicação microscópica dos esporos .....	67

<b>Figura 3:</b> Amplificação do DNA de <i>Penicillium sclerotirum</i> com primer ITS1 e ITS4 .....	67
<b>Figura 4:</b> Diagrama de Pareto para investigar os efeitos das concentrações de soro de leite e cevada para produção de biossurfactante .....	70
<b>Figura 5:</b> Capacidade emulsificante do biossurfactante produzido por <i>Penicillium sclerotiorum</i> utilizando soro de leite e cevada .....	71
<b>Figura 6:</b> Dispersão formada de acordo com os substratos: (A) Biossurfactante; (B) Detergente comercial; (C) Água .....	72

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1:</b> Componentes e porcentual de proteína do soro de leite .....	29
<b>Tabela 2:</b> Produção de pigmentos por diferentes micro-organismos em fermentação submersa .....	31

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1:</b> Variáveis e níveis do Delineamento composto central (DCC) .....	46
<b>Tabela 2:</b> Produção de pigmento e biomassa por <i>Penicillium sclerotiorum</i> de acordo com planejamento composto central (DCC) .....	51
<b>Tabela 3:</b> Porcentual de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre presente na composição do meio selecionado .....	51
<b>Tabela 4:</b> Ensaio de difusão em discos do pigmento .....	54

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 1:</b> Variáveis e níveis do planejamento Delineamento Composto Central (DCC) para produção de biossurfactante por <i>Penicillium</i> sp. ....	64
<b>Tabela 2:</b> Tensão superficial (TS) como parâmetro para avaliar a produção de biossurfactante por <i>Penicillium sclerotiorum</i> em meio contendo soro de leite e cevada .....	69
<b>Tabela 3:</b> Biossurfactante produzido por <i>Penicillium sclerotiorum</i> comparado com SDS e água .....	72

## RESUMO

Os micro-organismos apresentam elevado potencial na produção de diversos metabolitos essenciais para diferentes setores industriais. Dentre estes metabolitos estão os pigmentos e biossurfactantes que são importantes biomoléculas utilizadas na indústria alimentícia, têxtil, cosmética e farmacêutica. Neste contexto este estudo foi realizado com objetivo de identificar a espécie de *Penicillium* sp. isolado do solo da Caatinga de Pernambuco, além de produzir, isolar e caracterizar o pigmento e biossurfactante produzidos. O *Penicillium* sp. isolado foi identificado por análises morfológicas e molecular (PCR), enquanto a produção do pigmento e biossurfactante foi realizada utilizando meio contendo diferentes concentrações de soro de leite e cevada de acordo com o planejamento Delineamento Composto Central (DCC) de 2<sup>2</sup>. A extração do pigmento foi realizada a partir da biomassa, a purificação através de cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia em coluna, pigmento foi preliminarmente identificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Enquanto o biossurfactante foi extraído a partir do líquido metabólico e comprovado a produção extracelular pela tensão superficial. Os resultados obtidos a partir da identificação clássica para *Aspergilloides* indicam o fungo como pertencente ao gênero e espécie *Penicillium sclerotiorum*. Este fungo foi capaz de produzir elevado rendimento de biomassa (15,4g/L) e pigmento rosa (2,23 g/L) no meio constituído de 8% de soro de leite e 6% de cevada na condição quatro do planejamento. Neste meio, os resultados demonstraram elevado teor de carbono (42,56%) e nitrogênio (6,28%), resultando na razão de C/N de 15:1. O pigmento apresentou banda de coloração rosa intenso com valor de Rf=0,961, tempo de retenção de 2,828 a 247 nm e atividade inibitória para as bactérias (*Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*) e na levedura *Candida glabrata*. Por outro lado a máxima produção de biossurfactante ocorreu no meio constituído por 4% de soro de leite e 2% de cevada com redução da tensão superficial de 70 para 27 mN/m. Um índice de emulsificação de 68% utilizando óleo queimado de motor, índice de dispersão de 33,15 cm<sup>2</sup> e viscosidade reduzida de 279,6 para 48,5 cP. *Penicillium sclerotiorum* demonstrou habilidade de produzir pigmento e biossurfactantes a partir de meio econômico constituído de soro de leite e cevada, apresentando desta forma, uma alternativa viável para substituição dos corantes sintéticos e surfactantes químicos atendendo aos requisitos essenciais para sustentabilidade.

Palavras-Chave: Pigmento; Biossurfactante; Cevada; Soro de leite; *Penicillium sclerotiorum*

## ABSTRACT

Microorganisms have a high potential in the production of several essential metabolites for various industrial sectors. Among these metabolites are the pigments and biosurfactants that are important molecules used in the food, textile, cosmetic and pharmaceutical industries. In this context, this study was carried out to identify the species of *Penicillium* sp. Isolated from the soil of the caatinga of Pernambuco, besides producing, isolating and characterizing the pigment and biosurfactant produced. *Penicillium* sp. isolated were identified by morphological and molecular analyzes (PCR), while pigment and biosurfactant production was performed using medium containing different concentrations of whey and barley according to the Delineation central composite (CCD) 2<sup>2</sup>. Pigment extraction was performed from biomass, purification by thin layer chromatography (TLC) and column chromatography, pigment was preliminarily identified by high performance liquid chromatography (HPLC). While the biosurfactant was extracted from the metabolic liquid and proved the extracellular production by the surface tension. The results obtained from the classic identification for *Aspergilloides* indicate that the fungus belongs to the genus and species *Penicillium sclerotiorum*. This fungus was able to produce high yield of biomass (15.4g/L) and pink pigment (2.23 g/L) in the medium consisting of 8% whey and 6% barley in condition four of the planning. In this medium, the data showed high carbon content (42.56%) and nitrogen (6.28%), resulting in a C / N ratio of 15: 1. The pigment had a pink band with a value of Rf = 0.961, retention time of 2.828 at 247 nm and inhibitory activity for gram-negative bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*) and *Candida glabrata* yeast. Still, the maximum biosurfactant production occurred in the medium consisting of 4% whey and 2% barley with a reduction in surface tension from 70 to 27 mN/m. Emulsion index of 68% using engine burned oil, dispersion index of 33.15 cm<sup>2</sup> and reduced viscosity from 279.6 to 48.5 cP. *Penicillium sclerotiorum* demonstrated the ability to produce pigment and biosurfactants from an economic environment consisting of whey and barley, thus presenting a viable alternative for the substitution of synthetic dyes and chemical surfactants meeting the essential requirements for sustainability.

**Key Words:** Pigment; Biosurfactant; Barley; Whey; *Penicillium sclerotiorum*

# CAPÍTULO I

## 1.1 INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas, os fungos vem sendo amplamente explorados por sua capacidade de produzir diferentes substâncias de interesse econômico: biossurfactantes, pigmentos, enzimas, ácidos orgânicos, antibióticos, vitaminas, aminoácidos e esteroides (CHAKRABORTY et al., 2010). Uma das razões em ser tão usados é por estarem presentes em quase todos os ambientes da Terra, sendo as regiões tropicais uma das áreas com maior diversidade do mundo, pois o clima quente e úmido é bastante favorável para a sua multiplicação (BLACKWELL, 2011). Os fungos presentes no solo possuem a capacidade de ativar muitas rotas metabólicas para a degradação de diversos componentes, dependendo das condições do meio em que se encontram e da disponibilidade de nutrientes (PETIT et al., 2009).

Para vários metabolitos encontrados nos seres vivos, temos o seu referente químico, que em sua maioria é amplamente utilizado, a diferença é que os produzidos pelos seres vivos possuem vantagens superiores, porém ainda há um grande custo ligado a essa produção. Com isto, nas últimas décadas tem havido uma grande demanda por novas tecnologias com o objetivo de minimizar o custo de produção, aumentando a utilização comercial (NITSCHKE et al., 2011)

Dentre os metabolitos produzidos por fungos destacam-se os biossurfactantes, que são metabolitos secundários com atividade tensoativa e são sintetizados por uma grande variedade de micro-organismos (BANAT et al., 2000). A maior vantagem dos biossurfactantes, quando comparado aos surfactantes sintéticos, está na sua diversidade estrutural e aceitabilidade ambiental por serem biodegradáveis, biocompatíveis, menos tóxicos, com maior especificidade, possibilidade de produção in situ e também a partir de substratos renováveis e resíduos agroindustriais (MULLIGAN, 2009).

Outro tipo de metabolito secundário são os pigmentos, encontrados em uma variedade de vegetais, plantas, animais e micro-organismos. Sua forma de produção é variada e a tecnologia utilizada para sua produção, depende principalmente, do agente empregado neste processo (MORTIZ, 2005).

Apesar de ser usado em diversos produtos, a indústria de corantes vem sofrendo com o aumento dos custos de produção, e com a dificuldade em minimizar os danos ao ambiente causados pelo processo de produção, o qual gera efluentes. Devido a isso, as indústrias estão buscando vias mais econômicas e sustentáveis ao ambiente para os corantes existentes.

O mercado de pigmentos naturais está em expansão, e com isso o uso de pigmentos sintéticos vem reduzindo. Aumentando a necessidade de estudos para melhorar essa área.

Uma estratégia possível para reduzir os custos de produção de pigmentos fungicos é a utilização de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis e de baixo custo tais como subprodutos agrícolas ou de processamento industrial.

Quando se utiliza resíduos agroindustriais como substratos para a obtenção de biossurfactantes e pigmentos, o custo de produção e o volume de compostos a ser despejado no meio ambiente são menores. Tornando-os cada vez mais atraentes para as pesquisas em desenvolvimento.

Esse trabalho teve como objetivo a produção simultânea de biossurfactante e extração de pigmento por fungo filamentosos, o *Penicillium sclerotiorum*, utilizando substratos da agro indústria como meio de produção.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Produzir biossurfactantes e pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* isolado do solo da caatinga utilizando meio econômico contendo substratos alternativos.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Identificar a espécie *Penicillium sp.* UCP 1361;
- Avaliar o perfil de crescimento de *Penicillium sclerotiorum* isolado do solo da caatinga-PE em meio contendo substratos alternativos;
- Avaliar a influência de diferentes combinações de substratos, assim como das suas concentrações por planejamento fatorial, para a produção de biossurfactante e pigmento pelos fungos;
- Selecionar as melhores condições para proceder a produção de biossurfactante e pigmento pelo fungo;
- Realizar o isolamento do biossurfactante e do pigmento;
- Realizar a caracterização do pigmento;
- Identificar e quantificar o pigmento produzido;
- Investigar o potencial do pigmento isolado em atividade antimicrobiana;
- Avaliar o potencial do biossurfactante na dispersão de derivados de petróleo;
- Validar todos os resultados por métodos estatísticos.

## 1.3 REVISÃO DA LITERATURA

### 1.3.1 Fungos filamentosos

Fungos são um dos grupos de organismo mais diverso do mundo, existem cerca de 1,5 milhões de espécies fungicas, mas apesar disso algumas espécies possuem distribuição limitada e são encontradas apenas em um ambiente específico. Pode-se encontrar fungos em cada substrato e ecossistema possível, e cada um pode ter uma característica diferente (OLIVEIRA et al., 2013)

Dentre todos os fungos, destacam-se os fungos filamentosos, que são utilizados na produção de alimentos como os produtos fermentados e bebidas alcoólicas, contribuem na indústria farmacêutica, estão presentes no processo de biodegradação e tratamento biológico de efluentes, atuam na atividade enzimática e na biotransformação, devido a isso são de extrema importância biotecnológica, agrícola e ecológica, pois mantém o equilíbrio do ambiente, decompondo restos vegetais, degradando substâncias tóxicas, auxiliando as plantas a crescerem e se protegerem contra inimigos, como outros micro-organismos patogênicos. (ABREU; ROVIDA; PAMPHILE, 2015).

### 1.3.2 *Penicillium*

Há mais de 200 anos que Link (1809) introduziu o gênero *Penicillium*, e descreveu três espécies *P. candidum*, *P. glaucum* e *P. expansum*. Desde então, mais de 1000 nomeclaturas foram introduzidos no gênero. Muitos desses não são reconhecidos hoje devido a descrição incompleta pelos critérios modernos, por esses critérios, muitos desses não são mais considerados parte do gênero. Em 1930, Thom compilou todas as espécies descritas até 1930 e considerou 300 espécies. Posteriormente Raper e Thom em 1949 aceitou 137 espécies, Pitt em 1979 descreveu 150 espécies, já Ramírez em 1982 descreveu 252 espécies (incluindo as espécies descritas como *Eupenicillium*). (VISAGIE et al. 2014).

Esse gênero é frequentemente encontrado no solo e ambientes quentes. Algumas espécies tem uma grande importância na indústria alimentícia, devido ao seu uso na produção de queijos, ou sua patogenicidade que causam deterioração pós colheita. O gênero tem como característica a sua capacidade de produzir metabolitos secundários específicos, e podem conferir vantagens ecológicas importantes, tais como a eliminação de espécies microbianas concorrentes, é também fonte de importantes compostos bioativos. Outro importante fato é o

uso de penicilina, derivada de *P. chrysogenum*, como o primeiro antibiótico de largo espectro (BALLESTER et al., 2015).

A importância histórica da taxonomia do *Penicillium* em amostras isoladas de alimentos, solo e ambiente interno é compreensível dada a importância desses fungos como agentes de deterioração, produtores de micotoxinas e fontes de antibióticos. Grande parte da expansão do número de espécies do gênero *Penicillium* pode ser atribuída à revolução antibiótica e a facilidade com que o solo poderia ser coletado pelos viajantes e usado para isolar novas amostras ao retornar ao laboratório (VISAGIE et al., 2016).

A classificação de *Penicillium* tem evoluído bastante desde a sua primeira descrição. Muitos micologistas utilizam critérios morfológicos de classificação, mas recentemente vem se utilizando também novos critérios, entre eles a produção de metabolitos secundários específicos, o que permite uma nova classificação das espécies (BANANI et al., 2016).

JI, SAMSON e FRISVAD (2000) descrevem o gênero com quatro subgêneros: *Penicillium*, que apresenta conidióforo terverticilado, bom crescimento em meio CYA, intensa esporulação e possuem bom crescimento em baixas temperaturas e pH; *Aspergiloides*, com conidióforo monovertecilado, fiáides diretamente no fim do conidióforo, com apenas ponto de ramificação entre o conidióforo e a cadeia de conídios; *Furcatum*, com conidióforo biverticilado, métulas tanto nas laterais como no final da estipe, e *Biverticillium*, biverticilado, com numerosas métulas terminais com tamanho semelhante à fiáides.

O gênero *Penicillium* é conhecido por sua capacidade de produzir corantes de diversas cores. Essa sua capacidade é frequentemente comparada aos pigmentos obtidos por *Monascus*, com a vantagem de não haver a produção concomitante da micotoxina citrinina (MAPARI et al., 2008; MÉNDEZ et al., 2011).

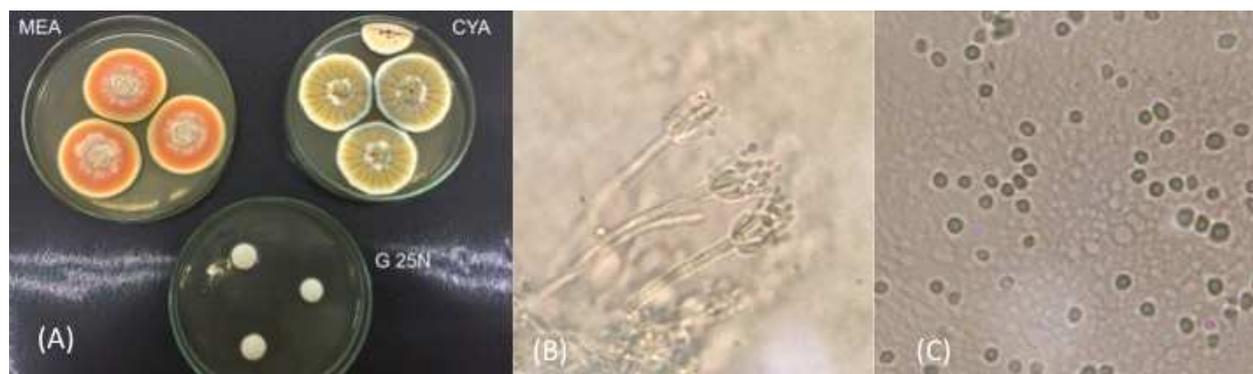
*Penicillium* são micro-organismos considerados GRAS (geralmente reconhecido como seguro) pelo FDA (administração americana de comidas e drogas), o que resulta em seu uso na produção de queijos e medicamentos (SCHUBER et al., 2012). As espécies de *Penicillium* têm sido extensamente estudadas, e desde a descoberta da penicilina até hoje, muitos metabolitos secundários com potencial farmacêutico já foram identificados (PETIT et al., 2009). Por exemplo a espécie *P. sclerotiorum* produz o pigmento esclerotiorina, uma azafilona que apresenta atividade antimicrobiana e inibidora de algumas enzimas importantes, como a aldose

redutase, lipase e integrases e proteases do vírus da imunodeficiência humana HIV-1 (ARUNPANICHLERT et al., 2010). Muitas espécies de *Penicillium* produzem substâncias que podem ser usadas como corantes, como o mitorubrinol, a mitorubrina, o mitorubrinal e o ácido mitorubrínico (SAMSON et al., 2011).

A espécie *P. sclerotiorum* é incluída na seção Aspergilloides, devido a semelhança com o conidióforo do *Aspergillus*, além dessa espécie, estão incluídas as espécies: *P. glabrum*, *P. spinulosum*, *P. lividum*, *P. thomii*, *P. spinulosum*, *P. implicatum*, *P. montanense* e *P. bilaiae*. (PITT, 1985; PITT, 2000)

*Penicillium sclerotiorum*, pertence ainda a um complexo, chamado de “*Penicillium sclerotiorum*”, revisado por Rivera e Seifert (2011), através de análises morfológicas e filogenéticas de cinco regiões do DNA: genes  $\beta$ -tubulina (Bena), citocromo c oxidase subunidade 1 (COX1), calmodulina (CMD), fator de alongamento da tradução 1- $\alpha$  (TEF1- $\alpha$ ) e da região ITS do Rdna. De acordo com os resultados obtidos os micologistas afirmam que se trata de um complexo formado por sete espécies: *P. sclerotiorum*, *P. guanacastense*, *P. mallochii*, *P. viticola*, *P. cainii*, *P. jacksoni*, e *P. johnkrugi*.

**Figura 1.** Características macroscópicas e microscópicas do *Penicillium sclerotiorum*: A. Identificação macroscópicas em meios CYA, MEA e Glicerol 25%; B: identificação microscópica de esporos; C: Identificação microscópica dos conidióforos



### 1.3.3 Metabolitos secundários

Metabolitos fúngicos são divididos em primários, que são os metabolitos essenciais para o crescimento e reprodução, e os secundários, que são os não essenciais para a vida celular, apesar de sua grande importância (AKILANDESWARI; PRADEEP, 2016)

Um metabolito secundário fungico é um composto químico produzido por um número limitado de espécies, e tem um poder de diferenciação elevado. É comum que diferentes espécies de fungos tenham um ou mais metabolitos secundários em comum. Muitos metabolitos secundários são produzidos por fungos filogeneticamente muito diferentes. (FRISVAD et al., 2004)

Fungos filamentosos são conhecidos por produzir uma grande variedade de metabolitos secundários, que tem um papel importante na diversidade e adaptação desses micro-organismos em vários nichos ecológicos. Há um grande interesse nesses metabolitos devido ao seu potencial na biotecnologia, bem como desenvolvimento de remédios, cosméticos e alimentos (DA COSTA SOUZA, et al., 2016)

Metabolitos secundários são estruturalmente moléculas heterogêneas de baixa massa molecular, e apesar de quimicamente diversificada, eles são produzidos por algumas vias biossintéticas (BRAKHAGE, 2013). Alguns desses metabolitos são micotoxinas prejudiciais, outras são utilizadas na medicina como remédios, e são eficientes no combate a doenças humanas. As vezes metabolitos benéficos e prejudiciais são produzidos pela mesma espécie. (BANANI et al., 2016)

As condições de cultivo são parâmetros críticos para a produção de metabolitos secundários por um micro-organismo. Qualquer pequenas modificação no meio de cultura podem impactar a produção de certos compostos, como também influenciar no perfil geral de seus metabolitos secundários (VANDERMOLEN et al., 2013).

Sabendo que os micro-organismos são capazes de modificarem suas propriedades fisiológicas e bioquímicas de acordo com a condição nutricional a que são expostos, o rendimento de compostos bioativos, muitas vezes, pode ser substancialmente aumentado pela otimização de alguns fatores físico-químicos como temperatura, salinidade, valor de pH, luz ou por modificações nos componentes do meio, presença de precursores ou inibidores (KIRANMAYI et al., 2011).

Os metabolitos secundários necessitam condições específicas para sua produção e sua biossíntese está sujeita a diversos reguladores como temperatura, luminosidade e fontes de carbono e nitrogênio. Em condições laboratoriais normais muitos genes responsáveis pela biossíntese de metabolitos podem mostrar pouca expressão, e conseqüentemente reduzir a produção de metabolitos secundários específicos ao ponto de não serem detectáveis

(BRAKHAGE, 2013).

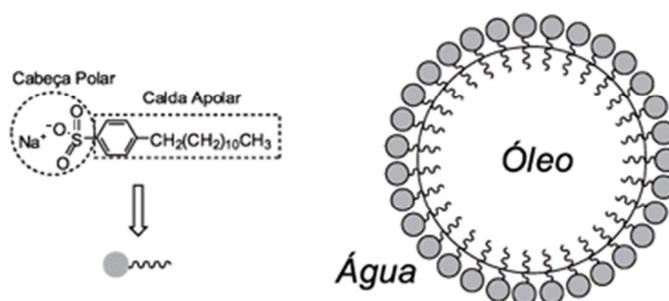
A produção de metabólitos secundários depende intrinsecamente das espécies de micro-organismos, de seus nutrientes e das condições de cultura. Quaisquer alterações afetam diretamente a quantidade e qualidade da produção desses metabólitos (KUMAR ET AL., 2015).

Entre os diversos importantes metabolitos secundários podemos citar os biossurfactantes e os pigmentos.

### 1.3.3.1. Biossurfactantes

Surfactantes ou tensoativos são moléculas anfipáticas constituídas estruturalmente de uma porção polar solúvel em água e outra apolar que é geralmente um hidrocarboneto, insolúvel em água, porém solúvel em lipídeos (figura 1) (DESAI; BANAT, 1997; SOARES, 2015).

**Figura 2.** Representação da estrutura do biossurfactante e de sua reação em contato com óleo e água.



Fonte: Rinaldi et al., 2007

Vários compostos com propriedades tensoativas são sintetizados por organismos vivos, desde plantas (saponinas) até micro-organismos (glicolípido) e também no organismo humano (sais biliares), sendo considerados surfactantes naturais. Neste contexto, os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e interfacial, e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biossurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (ARAUJO, et al 2013).

Biossurfactantes podem ser produzidos através do cultivo de micro-organismos, através da bioconversão de substâncias como açúcar, óleos, alcanos, etc. Além disso, podem ser obtidos por transesterificação de gorduras ou derivado de plantas ou gordura animal via saponificação (TIMMA et al 2014). Surfactantes são uma importante classe de compostos químicos amplamente utilizados em diversos produtos usados diariamente. Em sua maioria, são sintetizados quimicamente a partir de recursos petroquímicos, por isso são caros e possuem risco para o ambiente devido a sua natureza persistente (REBELLO et al., 2014).

Esses compostos tenso ativos sintetizados por vários micro-organismos (bactéria, leveduras e fungos filamentosos), têm atraído um grande interesse devido as suas potenciais vantagens sobre os surfactantes químicos. Ou seja, biossurfactantes possuem um desempenho semelhante ou melhor e tem um menor impacto no meio ambiente, devido a sua baixa toxicidade e alta biodegradabilidade (PEREIRA et al., 2013)

Comparado aos surfactantes sintéticos, os biossurfactantes possuem melhor atividade superficial, baixa toxicidade, podem se ligar a metais pesados, possuem uma maior biodegradabilidade e podem ser produzidos a partir de fontes renováveis (TIMMA et al. 2014). Outra vantagem sobre a utilização de biossurfactante reside no fato de serem compostos que não são derivados do petróleo, podendo ser produzidos a partir de fontes renováveis, e ainda possuem estabilidade em condições extremas de pH, temperatura e salinidade, alta seletividade e baixa concentração critica micelar (CMC) (GUDIÑA et al., 2015).

Os biossurfactantes são classificados de acordo com a composição química e a origem microbiana, diferentemente dos surfactantes sintetizados quimicamente que são classificados de acordo com seus grupos polares da região hidrofílica da molécula. As principais classes de biossurfactantes incluem os glicolipídios, lipopeptídeos e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (ARAUJO et al., 2013).

A atividade superficial desses biotensoativos pode resultar em ação antimicrobiana, propriedade que está também aplicável nos setores alimentício e farmacêutico. Além disso, na área ambiental estes compostos são utilizados como auxiliares em processos de biorremediação de resíduos oleosos e metais tóxicos em solos e efluentes (RODRIGUES et al., 2014).

Algumas peculiaridades dos biossurfactantes são influenciadas pela tensão superficial como a emulsão, ação detergente, formação de micelas e solubilidade. Essas características consolidam a capacidade da dispersão de óleos em biossurfactantes e os ratificam como produtos biotecnológicos essenciais no controle dos desastres petrolíferos (RUFINO et al, 2014; BRASILEIRO et al., 2015). Eles também possuem potencial em aplicação na agricultura, como matéria prima para cosméticos, produtos farmacêuticos, detergentes, higiene pessoal e processamento de alimentos, entre outros (DE SOURAV et al., 2015).

O principal fator que restringe o uso de biossurfactantes no mercado é seu custo de produção quando comparado com os seus similares sintéticos. O sucesso para o desenvolvimento industrial da produção dos biossurfactantes depende do uso alternativo de substratos de baixo custo que não ultrapassem 10-30% do custo total, como os subprodutos agroindustriais, sendo uma importante estratégia para reduzir os custos associados ao processo (COSTA, 2016).

Biossurfactantes são biologicamente produzidos por diversos substratos, bem como resíduos da agro indústria, indústria de processamento alimentício, processamento de frutas e processamento de petróleo. (DE SOURAV et al., 2015).

Apesar das grandes vantagens dos biossurfactantes sobre os surfactantes químicos sintéticos, ainda há obstáculos econômicos no processo em larga escala e no seu custo de produção. Nas últimas décadas concentraram-se em minimizar custos de produção, a fim de aumentar a sua utilização em pesquisas (NITSCHKE et al., 2011).

### **1.3.3.2. Pigmentos**

Os aditivos cuja finalidade é atribuir cor são chamados de corantes, podendo ser classificados como pigmentos ou corantes, mas frequentemente são usados como sinônimos. (MAPARI et al., 2010). Nos últimos anos, a indústria de corantes tem aumentado consideravelmente e é esperado que continue a crescer 10% a 15% ao ano (CORTEZ et al., 2017).

Na indústria alimentícia o uso de pigmentos naturais aumentou como substituição de seus homólogos sintéticos, devido principalmente à crescente conscientização sobre os riscos

ambientais e os possíveis efeitos colaterais dos produtos químicos utilizados na síntese de corantes alimentícios (CAROCHO et al., 2014).

Além da sua aplicação na indústria alimentícia, o consumo destes compostos naturais tem sido associado a uma redução de doenças não transmissíveis tais como câncer, diabetes e obesidade (LI et al., 2016, COOPERSTONE; SCHWARTZ 2016). Estas consequências aumentam a necessidade de utilização de pigmentos naturais. A principal utilidade destes biopigmentos é a melhoria da aparência de alimentos e bebidas, porém ainda há uma desvantagem tecnológica devido a geralmente haver uma baixa estabilidade em comparação aos corantes sintéticos (CORTEZ et al., 2017)

Estudos apontam que os corantes começaram a ser usados em alimentos aproximadamente em 1500 a.C. Eram obtidos a partir de fontes naturais, como páprica, açafrão, pétalas de flores, extrato de beterraba, etc. (BURROWS, 2009).

Para um corante ser considerado natural ele tem que ser originado de organismos vivos, ou seja, de plantas, animais ou micro-organismos e obtidos por extração física ou química de seus pigmentos. Apesar de vários organismos serem capazes de sintetizar pigmentos, os fungos se sobressaem por sua alta produtividade e liberação extracelular de metabólitos (HAILEI et al., 2011; VENDRUSCOLO et al., 2016).

Micro-organismos produtores de pigmentos devem satisfazer diversos critérios, como capacidade de uso de uma ampla variedade de fontes de carbono e nitrogênio, tolerância a mudanças de pH, temperatura, concentração mineral, rendimento de cor razoável, não toxicidade, não patogenicidade e facilidade de separação da massa celular (BABITHA et al. 2009). Além disso, esses organismos podem crescer em diferentes sistemas de cultura (submerso e sólido) e podem ser geneticamente modificados para aumentar a produtividade e qualidade de produção de pigmentos (ESPINOZA-HERNANDEZ et al. 2013).

Pigmento microbiano é o termo utilizado para as células microbianas que produzem cor. Há pigmentos em uma grande variedade de cores e solubilidade e com diferentes estruturas (CHATTOPADHYAY et al. 2008). Corantes naturais derivados de matéria-prima bruta tem desvantagens em relação aos fatores de rendimento de extração. Devido a crescente demanda de consumo dos corantes naturais, os pigmentos de origem microbiana estão substituindo o uso de corantes sintéticos em aplicações alimentícias (DUFOSSE, 2014).

Os fungos ascomicetos mostram um grande potencial na produção de pigmentos, que vão entre o espectro vermelho e são comparados aos corantes alimentícios naturais já existente, servindo como uma nova fonte de corante alimentar (AKILANDESWARI; PRADEEP, 2016). Entre os ascomicetos produtores, destacam-se os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Monascus* (MÉNDEZ et al., 2011).

A produção de pigmentos utilizando micro-organismos é controlada pela composição do meio, suplementos e a otimização das condições de cultivo utilizando modelos experimentais, contribuindo para a produção bem sucedida em larga escala (VENIL, et al., 2014).

Apesar do constante avanço, a extração de uma alta concentração de pigmento com um elevado nível de purificação continua sendo um desafio para a indústria (VENIL; ZAKARIA; AHMAD, 2013).

Devido a certas desvantagens inerentes, os corantes naturais à base de plantas ou animais podem ser considerados inadequados para utilização industrial. Principalmente devido a sua disponibilidade e instabilidade limitadas, à dependência da estação, às condições ambientais e à flora e fauna restritas (SHAHID et al., 2013). Outras desvantagens são os longos processos de extração, para produzir menos quantidade de corante, e o seu elevado custo. Atualmente, os corantes microbianos estão ganhando importância porque podem superar as desvantagens dos corantes sintéticos e naturais. Os pigmentos microbianos não dependem da estação, das condições geográficas e da terra. Além disso, podem ser produzidos sob condições controladas com rendimento previsível. São biodegradáveis, fáceis de eliminar, e possuem uma ampla paleta de cores (GUPTA et al, 2016).

Na utilização de pigmentos, há grande presença de  $\beta$ -caroteno, riboflavina e licopeno. O pigmento  $\beta$ -caroteno pode ser de amarelo a laranja avermelhado, é encontrado em micro-organismos como *Serratia*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Agrobacterium*, *Sulfolobus* e *Streptomyces*. Tem sido bastante utilizado em produtos da agro indústria, como queijo, melão, xarope de glicose, celobiose e melão de beterraba como nutriente para produção do pigmento. Ele é utilizado como aditivo em óleos vegetais, bebidas a base de laranja e margarinas (KIRTI, et al., 2014; NIGAM; LUKE, 2016).

A Riboflavina é um pigmento amarelo, solúvel em água produzido por diversos micro-organismos; *Eremothicum ashbyii*, *Ashbya gossypii*, *Candida flaleri*, *Sacchaomyces cerevisiae* e *Bacillus subtilis* são os maiores produtores de riboflavina (KUMAR, et al., 2015). Pode ser usado como aditivo em cereais, massas, molhos, queijo processado, produtos lácteos e bebidas energéticas (MALIK, TOKKAS, GOYAL, 2012).

Um outro pigmento bastante utilizado recentemente é o licopeno, que é um carotenóide vermelho, e é isômero do  $\beta$ -caroteno. Foi visto que o cis-isômero do licopeno é mais estável e tem um maior poder antioxidante quando comparado a forma do trans-licopeno. A engenharia genética vem tentando produzir um licopeno para ser usado como corante alimentício a partir do *Fusarium sporotrichioides* usando substrato da indústria do milho (KUMAR, et al., 2015).

*Monascus ruber* é um fungo bastante conhecido, é isolado de alimentos ou encontrado no solo. São frequentemente utilizados na Ásia para a produção de vinhos de arroz, queijo de soja ou arroz vermelho fermentado (MOHARRAM et al., 2012). *M. ruber* produz pelo menos seis tipos de pigmentos descritos na literatura: dois com coloração amarela (anquaflavina e monascina), dois com tonalidade alaranjada (rubropunctatina e monascorrubrina) e outros dois que apresentam cor vermelha (rubropunctamina e monascorrubramina), todos com diferentes estrutura química (KONGRUANG, 2011). Apesar dos diversos pigmentos produzidos, os vermelhos apresentam a maior demanda, devido ao uso como corante em carnes. (CHATTERJEE et al., 2009). Contudo, o seu uso na indústria alimentícia ainda é restrito, devido a produção de toxinas durante o processo fermentativo, entre eles a micotoxina citrinina, que induz hepatotoxicidade e nefrotoxicidade em humanos (HAILEI et al., 2011).

Ascolor s.r.o. (República Tcheca) possui várias patentes relacionadas a uma linhagem fúngica de *P. oxalicum* var. *Armeniaca* produtora de um pigmento rosa avermelhado que pode ser aplicado na indústria alimentícia e cosmética. Linhagem que foi obtida do solo e produz um cromóforo do família das antraquinonas. Arpink Red foi aprovado para uso pela Comissão do Codex Alimentarius (2002) para uso em carnes e produtos análogos de carnes, bebidas não alcoólicas, sorvetes e derivados de leite (DUFOSSE, et al., 2006).

#### **1.3.4 Substratos para produção**

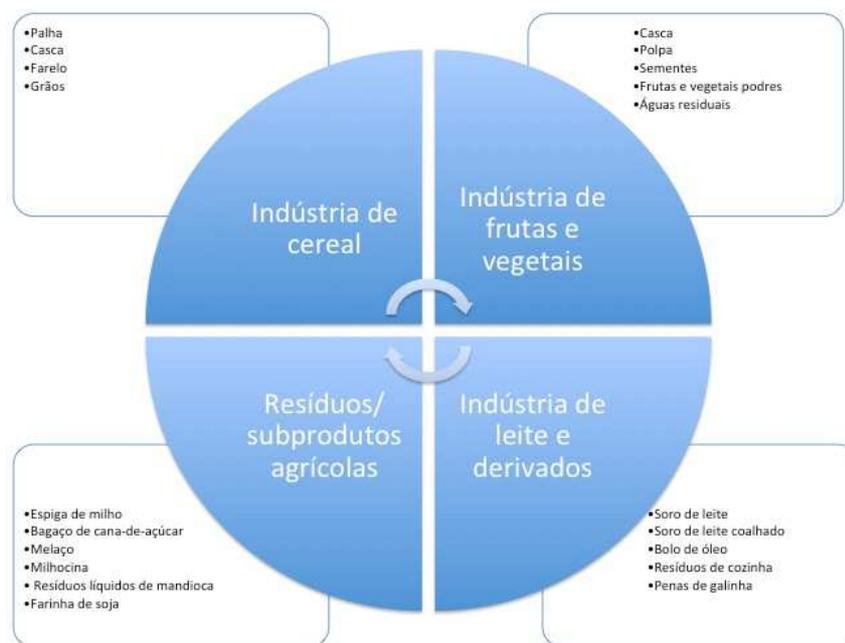
Em uma constante busca por melhorias na agroindústria e na tentativa de reduzir os impactos gerados pelas indústrias, pesquisas são realizadas em busca de mudanças de novas

políticas ambientais. Em consequência a utilização de subprodutos industriais vem se tornando importante para a economia e o meio ambiente, uma vez que se podem evitar possíveis impactos ambientais. Pesquisas foram realizadas utilizando resíduos industriais para crescimento de micro-organismos e recuperação de biomassa em diversas áreas da biotecnologia, como saúde, agricultura, energia e meio ambiente (ZANOTTO, 2011).

Quando se utiliza resíduos agroindustriais como substratos para a obtenção de biossurfactantes e pigmentos, o custo de produção e o volume de compostos a ser despejado no meio ambiente são menores. Assim, o impacto ambiental da indústria torna-se menor e, além disso, há a valorização econômica dos resíduos que seriam descartados (MULLIGAN, 2009; ACCORSINI et al., 2012).

A produção agro industrial sempre gera algum tipo de descarte, seja em forma sólida, líquida ou gasosa. A geração de resíduos tem altos valores na demanda biológica de oxigênio e pode chegar a causar diferentes problemas, como custo de coleta, eliminação, tratamento e perda de matérias-primas valiosas. A conscientização da poluição ambiental resulta na recuperação de diversos produtos valiosos e utilizáveis, que antes eram considerados resíduos. Os descartes agro industriais são gerados durante o processamento industrial de produtos de diferentes indústrias da agricultura como mostra a figura 3. Os produtos derivados das atividades agrícolas incluem palha, caule, folhas, casca, leguminosas, bagaço, grãos gastos, e assim por diante. Que são produzidos ao longo do ano. Devido a grande disponibilidade e a sua composição rica em compostos que podem ser utilizados em outros processos, há um grande interesse na reutilização do descarte, tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental (PANESAR; KAUR; PANESAR; 2015).

**Figura 3:** Tipos de descarte agroindustrial gerado por diferentes industrias.



Fonte: Panesar; Kaur; Panesar; 2015

A biotecnologia microbiana tem desenvolvido novas possibilidades para utilização de descartes produzidos para o desenvolvimento de produtos de valor agregado. A utilização de descarte agro industrial na fermentação para desenvolvimento de novos produtos pode ser efetivo em termos de redução de custos e da poluição ambiental. Nos últimos anos, as matérias primas e os subprodutos agro industriais têm sido propostos como fontes alternativas de carboidratos de baixo custo para a produção de metabólitos microbianos, com o objetivo de minimizar também os problemas ambientais e os problemas relacionados ao seu descarte. (PANESAR; KAUR; PANESAR; 2015)

#### 1.3.4.1 Soro de leite

O soro de leite é a porção aquosa liberada do coágulo durante a fabricação convencional de queijos, considerado um efluente residual que pode acarretar graves problemas ambientais associados ao seu alto teor de matéria orgânica (MIZUBUTI, 1994; BIEGER; RINALDI, 2009). Em torno de 90 a 95% do volume do leite usado para a fabricação de queijos resultam em soro, o qual contém aproximadamente metade dos sólidos totais do leite, incluindo proteínas solúveis, sais e principalmente a lactose (CHAVES et al., 2010).

As proteínas presentes no soro de leite apresentam propriedades tecnológicas interessantes como: solubilidade, emulsificação, gelatinização e capacidade de reter água. Além disso, têm função antimicrobiana e antioxidante. Devido a sua rica constituição nutricional, o soro de leite pode acarretar graves problemas quando descartado de forma incorreta no ambiente (RIBEIRO-SANTOS et al., 2015).

As indústrias produtoras de derivados de leite têm enfrentado grandes problemas com os resíduos gerados em sua produção. Estima-se que para cada quilo de queijo produzido, a indústria de laticínios gere nove quilos de subproduto com alta concentração de matéria orgânica (BIEGER e RINALDI, 2009; OLIVEIRA et al., 2012).

O soro do leite contém de 4 a 6g de proteínas por litro, e são de 15 a 20% (m/m) da proteína total contida no leite, este valor está relacionado com a produção de soro ácido ou doce e o tipo de queijo (PELEGRINE; CARRASQUEIRA, 2008).

As proteínas do soro de leite incluem  $\alpha$  – lactoglobulina, lactoferina, lactoperoxidases, lisozima e outros componentes menores como discute na tabela 1. Dependendo da quantidade consumida através do alimentos lácteos, diferem os benefícios adquiridos, como por exemplo antibacteriana, antioxidante, antiviral e antifúngica. (RIBEIRO-SANTOS et al., 2015)

**Tabela 1:** Componentes e porcentual de proteína do soro de leite

Componentes do soro de leite	% (m/m) de proteína do soro de leite
$\beta$ – lactoglobulina	50-55
$\alpha$ – lactalbumina	20-25
Soroalbumina (BSA)	05-10
Imunoglobulina	10-05
Lactoferrina	01-02
Lactoperoxidase	0,5

Fonte: Ribeiro-Santos et al. (2015) adaptado

#### **1.3.4.2 Cevada**

Um outro subproduto que pode ser utilizado como fonte de carbono para os micro-organismos é a cevada, que destaca-se como o quarto colocado do ranking de produção de cereais no mundo, devido a sua ampla adaptabilidade ecológica, por ser matéria-prima na fabricação de cerveja e pela sua utilização na alimentação animal, além de ser reconhecida pelo elevado potencial produtivo e pela baixa incidência de doenças (MCCARTHY et al., 2013).

Diferentemente do mercado da cevada no mundo, onde 66% da produção é utilizada como forrageira e ração para as criações, o cultivo comercial de cevada no Brasil destina-se a fabricação de malte, principal matéria-prima da indústria cervejeira, sendo estas empresas responsáveis por fomentar a cultura no país. (MUSSATTO et al., 2006) O resíduo de cervejaria apresenta uma produção anual em torno de 30 milhões de toneladas pelas cervejarias do mundo, das quais cerca de 3,4 milhões de toneladas são produzidas na Europa e no Brasil a estimativa de disponibilidade ultrapassa 2 milhões de toneladas/ano (STOJCESKA et al., 2008; NIEMI et al., 2012).

#### **1.3.4.3 Utilização de substratos na produção de pigmentos**

Os micro-organismos produzem pigmentos através da fermentação, que pode ser sólida ou submersa. As taxas de utilização de vários nutrientes diferem em cada substrato, assim como a produtividade. (JOSHI E ATTRI, 2005). Micro-organismos como bactérias, fungos e leveduras, dependendo da sua fonte produzem diferentes tipos de pigmentos. (MÉNDEZ et al., 2011). Os micro-organismos utilizados para produção de pigmento devem ter algumas características necessárias como não patogenicidade, não toxicidade, utilizar uma ampla variedade de fontes de carbono e nitrogênio, ter um rendimento razoável de cor, ser tolerante à alterações de temperatura e pH e facilidade de separação. (BABITHA; 2009)

A utilização de descarte agro industrial para produção de pigmento utilizando diferentes micro-organismos tem sido reportado em diferentes estudo, como apresentado na tabela abaixo.

**Tabela 2:** Produção de pigmentos por diferentes micro-organismos em fermentação submersa

<b>Produção de pigmentos por diferentes micro-organismos em fermentação submersa</b>			
<b>Micro-organismo</b>	<b>Meio</b>	<b>Tipo de pigmento</b>	<b>Referência</b>
<i>Rhodotorula rubra</i>	Soro de leite com água de coco	Pigmento amarelo	Kaur; Chakraborty; Kaur; 2009
<i>Sporidobolus salmonicolor</i>	Meio de malte de levedura	Carotenóides	Valduga et al., 2009
<i>R. glutinis</i>	Meio de descarte de tomate	Carotenóides	Silveira; Daroit; Brandelli; 2008
<i>Rhodosporium paludigenum</i>	Ureia KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Carotenóides	Yimyoo et al., 2011
<i>Monascus purpureus</i>	Caldo de malte de levedura modificado	Pigmento amarelo e vermelho	Wongjewboot et al., 2011
<i>Penicillium purpurogneum</i>	Meio Czapek DOX	Pigmento vermelho	Méndez et al., 2011
<i>Streptomyces sp.</i>	Meio basal	Prodigines	Li et al., 2012
<i>Serratia marcescens</i>	Caldo de Glicerol e peptona	Pigmento Vermelho	Gulani; Bhattacharya; Das; 2012
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Farinha de semente de algodão	Piocianim	El-Fouly et al., 2015

Fonte: Panesar, Kaur, Panesar; 2015

## 1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. A. S. DE, ROVIDA, A. F. S., PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista Uningá**. V. 21, n. 1, pp. 55-59. 2015.

ACCORSINI, Fábio Raphael et al. Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 116-125, 2012.

AKILANDESWARI, P.; PRADEEP, B. V. Exploration of industrially important pigments from soil fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 4, p. 1631-1643, 2016.

ARAUJO, et al. Biossurfactantes: Propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. **Quim. Nova**, V. 36, n. 6, p. 848-858. 2013.

ARUNPANICHLERT, Jiraporn et al. Azaphilone and isocoumarin derivatives from the endophytic fungus *Penicillium sclerotiorum* PSU-A13. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n. 8, p. 1033-1036, 2010.

BABITHA, Sumathy. Microbial pigments. In: **Biotechnology for agro-industrial residues utilisation**. Springer Netherlands, 2009. p. 147-162.

BALLESTER, Ana-Rosa et al. Genome, transcriptome, and functional analyses of *Penicillium expansum* provide new insights into secondary metabolism and pathogenicity. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, n. 3, p. 232-248, 2015.

BANANI, Houda et al. Genome sequencing and secondary metabolism of the postharvest pathogen *Penicillium griseofulvum*. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 1, 2016.

BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial application of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BIEGER, A.; RINALDI, R. Reflexos do reaproveitamento de soro de leite na cadeia produtiva de leite do oeste do Paraná. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e

Oliveira, L. T. Produção simultânea de biossurfactantes e pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) a partir de resíduos da agroindústria

Sociologia Rural, 47., 2009, Porto Alegre. **Anais do Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural**. Florianópolis, 2009.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, v. 98, n. 3, p. 426–438. 2011

BRAKHAGE, Axel A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 21-32, 2013.

BRASILEIRO, PPF et al. UTILIZAÇÃO DE CONSERVANTE PARA ESTABILIZAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Candida guilliermondii* EM BIORREATOR. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 2590-2597, 2015.

BURROWS, J. Palette of our palates: a brief history of food coloring and its regulation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 8, n. 4, p. 394-408, 2009.

CAROCHO, Márcio et al. Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 377-399, 2014.

CHAKRABORTY, S; GHOSH, U; CHAKRABORTY, S. Fungi: Its importance in biotechnology -A review on its past, present and future prospects. *Journal of Pharmacy Research*, v. 3, n. 12, p. 3059-3060, 2010.

CHATTERJEE, Sandipan et al. Characterization of red pigment from *Monascus* in submerged culture red pigment from *Monascus Purpureus*. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 5, n. 12, p. 2102-2108, 2009.

CHATTOPADHYAY, Pritam; CHATTERJEE, Sandipan; SEN, Sukanta K. Biotechnological potential of natural food grade biocolorants. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 17, 2008.

CHAVES, K.; CALLEGARO, E.; SILVA, V. Utilização do soro de leite nas indústrias de laticínios da região de Rio Pomba-MG. In: Congresso Nacional de Laticínios, 27., 2010, Juiz de Fora. **Anais do Congresso Nacional de Laticínios**. 2010.

Oliveira, L. T. Produção simultânea de biossurfactantes e pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) a partir de resíduos da agroindústria

COLLA, Luciane Maria; HEMKEMEIER, Marcelo; GIL, Anelise Sertori Lopes. Biossorção de cádmio e produção de biossurfactantes por fungos filamentosos em fermentação submersa. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2012.

COOPERSTONE, J. L.; SCHWARTZ, S. J. Recent insights into health benefits of carotenoids. **Handbook on natural pigments in food and beverages: industrial applications for improving food color**. Woodhead Publishing. p, p. 473-97, 2016.

CORTEZ, Regina et al. Natural Pigments: Stabilization Methods of Anthocyanins for Food Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 1, p. 180-198, 2017.

DA COSTA SOUZA, Patrícia Nirlane et al. Production and chemical characterization of pigments in filamentous fungi. **Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 12-22, 2016.

DE, Sourav et al. A review on natural surfactants. **RSC Advances**, v. 5, n. 81, p. 65757-65767, 2015.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DUFOSSE, Laurent et al. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current opinion in biotechnology**, v. 26, p. 56-61, 2014.

DUFOSSE, Laurent. Microbial production of food grade pigments. **Food technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 313-323, 2006.

ESPINOZA-HERNÁNDEZ, Tanya Cecilia et al. Characterization of three novel pigment-producing *Penicillium* strains isolated from the Mexican semi-desert. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 22, 2013.

GUDIÑA, Eduardo J. et al. Novel bioemulsifier produced by a *Paenibacillus* strain isolated from crude oil. **Microbial cell factories**, v. 14, n. 1, p. 1, 2015.

Oliveira, L. T. Produção simultânea de biossurfactantes e pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) a partir de resíduos da agroindústria

GUPTA, Charu et al. Dyeing wet blue goat nappa skin with a microbial colorant obtained from *Penicillium minioluteum*. **Journal of Cleaner Production**, v. 127, p. 585-590, 2016.

HAILEI, Wang et al. Improvement of the production of a red pigment in *Penicillium* sp. HSD07B synthesized during co-culture with *Candida tropicalis*. **Bioresource technology**, v. 102, n. 10, p. 6082-6087, 2011.

JI, Pitt'; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. List of accepted species and their synonyms in the family *Trichocomaceae*. **Integration of Modern Taxonomic Methods For Penicillium and Aspergillus Classification**, p. 9, 2000.

JOSHI, V. K.; ATTRI, Devender. Solid state fermentation of apple pomace for the production of value added products. **Pollution in Urban Industrial Environment**, p. 180, 2005.

KIRTI, Kushwaha et al. Colorful world of microbes: carotenoids and their applications. **Advances in Biology**, v. 2014, 2014.

KONGRUANG, Sasithorn. Growth kinetics of biopigment production by Thai isolated *Monascus purpureus* in a stirred tank bioreactor. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 93-99, 2011.

KUMAR, S. N. et al. Molecular characterization of forest soil based *Paenibacillus elgii* and optimization of various culture conditions for its improved antimicrobial activity. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

LI, Xin et al. Anthocyanins inhibit trastuzumab-resistant breast cancer in vitro and in vivo. **Molecular medicine reports**, v. 13, n. 5, p. 4007-4013, 2016.

MALIK, Kamla; TOKKAS, Jayanti; GOYAL, Sneha. Microbial pigments: a review. **Int J Microbial Res Technol**, v. 1, n. 4, p. 361-365, 2012.

MAPARI, S; THRANE, U; MEYER, A. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 300- 307, 2010.

Oliveira, L. T. Produção simultânea de biossurfactantes e pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) a partir de resíduos da agroindústria

MAPARI, Sameer AS et al. Computerized screening for novel producers of Monascus-like food pigments in *Penicillium* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 21, p. 9981-9989, 2008.

MCCARTHY, Aoife L. et al. Brewers' spent grain; bioactivity of phenolic component, its role in animal nutrition and potential for incorporation in functional foods: a review. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 72, n. 01, p. 117-125, 2013.

MÉNDEZ, Alejandro et al. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 12, n. 12, p. 961-968, 2011.

MIZUBUTI, I. Soro de Leite: Composição, processamento e utilização na alimentação. **Semina Ciências Agrárias**. v. 15, n.1, p.80-94. 1994.

MOHARRAM, Ahamed M. et al. Chemical profile of *Monascus ruber* strains. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, n. 4, p. 490-499, 2012.

MORTIZ, D.E.. Produção do pigmento monascus por *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo submerso. Tese de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Maio de 2005.

MULLIGAN, C.N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v 14, p 372-378, 2009.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I.C. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. **Journal of Cereal Science**, v. 43, n.1, p.1-14, 2006.

NIEMI, P. et al. Characterization of lipids and lignans in brewer's spent grain and its enzymatically extracted fraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 39, p. 9910-9917, 2012.

NIGAM, Poonam Singh; LUKE, Jasmine Sharon. Food additives: production of microbial

Oliveira, L. T. Produção simultânea de biossurfactantes e pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) a partir de resíduos da agroindústria

pigments and their antioxidant properties. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 93-100, 2016.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O.; CONTIERO, J. Rhamnolipids and PHAs: recent reports on *Pseudomonas*-derived molecules of increasing industrial interest. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 621–630, 2011.

OLIVEIRA, D.; BRAVO, C.; TONIAL, I. Soro de leite: um subproduto valioso. **Rev. Inst. Latic.** V. 67, n. 385, p. 64-71 2012.

OLIVEIRA, L. G. et al. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. **Journal of arid environments**, v. 95, p. 49-54, 2013.

PANESAR, Reeba; KAUR, Shubhneet; PANESAR, Parmjit S. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 70-76, 2015.

PELEGRINE, D. H. G.; CARRASQUEIRA, R. L. Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas. **Brazilian Journal of Food Technology, VII BMCFB**, p. 145-151, 2008.

PEREIRA, Jorge FB et al. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel**, v. 111, p. 259-268, 2013.

PETIT, Philippe et al. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 8-9, 2009.

PITT, John I.; HOCKING, Ailsa Diane. **A laboratory guide to common Penicillium species**. Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Research, 1985.

REBELLO, Sharrel et al. Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants. **Environmental chemistry letters**, v. 12, n. 2, p. 275-287, 2014.

RIBEIRO-SANTOS, R. et al. Proteína do soro de leite: Aproveitamento e aplicações na produção de embalagem biodegradável. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento**

Oliveira, L. T. Produção simultânea de biossurfactantes e pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) a partir de resíduos da agroindústria

**Sustentável**, v. 10, n. 5, p. 51, 30 dez. 2015.

RIVERA, K. G.; SEIFERT, K. A. A taxonomic and phylogenetic revision of the *Penicillium sclerotiorum* complex. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 139-158, 2011.

RODRIGUES, E. et al. Produção de Compostos com Propriedades Emulsificantes por *Aspergillus flavus* Utilizando Resíduos Agroindustriais. **Revista Ciências Exatas e Naturais**. V. 16, n. 1. 2014.

RUFINO, R. D. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**. 2014.

SAMSON, R. A. et al. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. **Studies in Mycology**, v. 70, p. 159-183, 2011.

SCHUBER, Lilian Cristina Lopes et al. Isolamento e seleção de fungos produtores de B-galactosidase. **Evidencia: biotecnologia e alimentos**, n. 1, p. 19-40, 2012.

SHAHID, Mohammad et al. Recent advancements in natural dye applications: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 53, p. 310-331, 2013.

SOARES DE ABREU, JÉSSICA ALINE; DA SILVA ROVIDA, AMANDA FLÁVIA; ALENCAR PAMPHILE, JOÃO. FUNGOS DE INTERESSE: APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS. **UNINGÁ Review**, v. 21, n. 1, 2015.

STOJCESKA, V.; AINSWORTH, P.; PLUNKETT, A. The recycling of brewer's processing by-product into ready-to-eat snacks using extrusion technology. **Journal of Cereal Science**, v. 47, p. 469-479, 2008.

TIMMA, L., Full Factorial Design of Screening Experiments for Biosurfactant Enhanced Remediation of Hydrophobic Substances in Soil. **Journal of Clean Energy Technologies**, V. 2, n. 1, 2014.

Oliveira, L. T. Produção simultânea de biossurfactantes e pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) a partir de resíduos da agroindústria

USHA KIRANMAYI, Mangamuri et al. Optimization of culturing conditions for improved production of bioactive metabolites by *Pseudonocardia* sp. VUK-10. **Mycobiology**, v. 39, n. 3, p. 174-181, 2011.

VANDERMOLEN, Karen M. et al. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 71, 2013.

VENDRUSCOLO, Francielo et al. Monascus: a reality on the production and application of microbial pigments. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 178, n. 2, p. 211-223, 2016.

VENIL, Chidambaram Kulandaisamy et al. Current perspective on bacterial pigments: emerging sustainable compounds with coloring and biological properties for the industry—an incisive evaluation. **RSC Advances**, v. 4, n. 74, p. 39523-39529, 2014.

VENIL, Chidambaram Kulandaisamy; ZAKARIA, Zainul Akmar; AHMAD, Wan Azlina. Bacterial pigments and their applications. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1065-1079, 2013.

VISAGIE, C. M. et al. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in mycology**, v. 78, p. 343-371, 2014.

ZANOTTO, Caroline. Caracterização de resíduo da indústria de beneficiamento de milho. 2011.

# CAPÍTULO II

## Artigo I

### **Produção natural de pigmento rosa por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) a partir de recursos renováveis e sua promissora atividade antimicrobiana**

Manuscrito submetido a *Canadian Journal of Chemical Engineering*

Oliveira, L. T. Produção simultânea de biossurfactantes e pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) a partir de resíduos da agroindústria

**Produção natural de pigmento rosa por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) a partir de recursos renováveis e sua promissora atividade antimicrobiana**

Laura Truan Oliveira<sup>1\*</sup>; Nathália Sá Alencar Amaral Marques<sup>1</sup>; Adriana Ferreira de Souza<sup>2</sup>; Tayane de Cássia Dias Mendes Silva<sup>3</sup>; Michele Freitas Santiago<sup>4</sup>; Norma Buarque de Gusmão<sup>5</sup>; Galba Maria Campos-Takaki<sup>1,6</sup>; Rosileide Fontenele Silva<sup>6,7</sup>; Thayse Alves Silva<sup>6,7</sup>; Kaoru Okada<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup> Mestrado de Desenvolvimento em Processos Ambientais - Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>2</sup> Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>3</sup> Centro de Estratégias e Tecnologias do Nordeste – CETENE, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>4</sup> Programa de pós-graduação em Fitopatologia- UFRPE, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>5</sup> Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>6</sup> Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>7</sup> Programa Nacional de Pós doutorado CAPES (PNPD) Pós graduação em Processos ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

## Resumo

O desenvolvimento de tecnologias para a transformação sustentável de recursos naturais em pigmentos utilizando fungos filamentosos atinge um mercado atual e promissor pela sua possível utilização em aplicações biomédicas. Neste contexto, este estudo relata a produção sustentável e a caracterização de um pigmento natural de *Penicillium* sp. obtidos a partir da bioconversão de resíduos de soro de leite e cevada. A identificação da espécie de *Penicillium* foi realizada a partir de análises morfológica e molecular (PCR), enquanto a produção do pigmento foi investigada a partir de planejamento fatorial DCC 2<sup>2</sup> contendo diferentes concentrações dos resíduos. A extração de pigmento foi realizada a partir da biomassa utilizando etanol a 95%, a purificação por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia em coluna e identificação preliminar por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Adicionalmente, também foi investigado o potencial para a inibição do crescimento de bactérias gram positivas e gram negativas a partir do pigmento. Os resultados indicam que o fungo pertence a *Penicillium sclerotiorum*. Este fungo produziu elevado rendimento de biomassa (15,4 g/L) e pigmento rosa (2,23 g/L) no meio constituído por 8% de soro de leite e 6% de cevada. Neste meio, os dados mostraram alto teor de carbono (42,56%) e nitrogênio (6,28%), resultando em uma relação C/N de 15:1. O pigmento apresentou uma banda rosa com  $R_f = 0,961$ , tempo de retenção de 2,828 a 247 nm e atividade inibitória para bactérias (*Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*) e levedura *Candida albicans*. A partir dos resultados obtidos, o *Penicillium sclerotiorum* demonstrou a capacidade de produzir pigmentos naturais com potencial antimicrobiano como alternativa sustentável e viável para a produção industrial.

**Palavras chave:** Pigmento; Cevada; Soro de leite; *Penicillium sclerotiorum*; atividade antimicrobiana

## 1. Introdução

Pigmentos são conhecidos como substâncias altamente coloridas utilizadas em uma variedade de produtos industriais com o objetivo de prover uma aparência atrativa em produtos comercializáveis especialmente nos setores alimentícios, têxteis e farmacêutico. No entanto os problemas causados por pigmentos sintéticos como problemas de toxicidade, reações alérgicas, intolerâncias e carcinogenicidade, limitando o seu uso, aumentando assim o interesse do Mercado internacional em pigmentos naturais. (SOARES; PIMENTA, 2015; NARENDRABABU; SHISHUPALA, 2017)

Os pigmentos naturais podem ser produzidos por plantas, animais e micro-organismos. Dentre eles, a produção microbiológica vem ganhando destaque no mercado devido à capacidade de produzir alto rendimento, devido à não sazonalidade dos micro-organismos, não competem por espaço limitado, podem ter um alto desempenho e possibilitam a produção a partir de fontes renováveis tais como resíduos agroindustriais. (MORALES-OYERVIDES, et al., 2015)

Atualmente os pigmentos fúngicos são amplamente utilizados na indústria de alimentos, no tom rosa há pigmentos produzido por *Monascus*, e Arpink red, produzido por *Penicillium oxalacum*. (NIGAM; LUKE, 2016)

É possível produzir pigmentos fúngicos em grande escala por fermentação utilizando uma variedade de substratos sustentáveis. Entre os pigmentos de origem fúngica, *Penicillium* se destaca por produzir pigmentos diferentes em cores diferentes, especialmente no espectro vermelho e amarelo. (AKILANDESWARI; PRADEEP, 2016)

Os resíduos naturais da indústria têm ampla utilização como meios de cultura em processos de fermentação devido ao seu baixo custo, uma vez que os componentes do meio podem representar de 38% a 73% do custo total de produção. (SÁNCHEZ, 2009)

Entre os diferentes resíduos existentes da indústria alimentar, o soro de leite se destaca por ser o principal subproduto da indústria de laticínios e é produzido durante a fabricação de queijo, durante o processo de coagulação. Soro de leite contém uma série de nutrientes importantes, tais como lactose, proteínas solúveis, lipídios e sais minerais. Pode ser utilizado como uma fonte barata de lactose e proteína. (DAS et al., 2016)

Outro subproduto que pode ser utilizado como fonte de carbono para micro-organismos é a cevada, que se destaca como o quarto maior produtor de cereais do mundo, devido à sua ampla adaptabilidade ecológica, sendo uma matéria-prima na fabricação de cerveja e sua utilização na alimentação animal, além de ser reconhecida pelo alto potencial produtivo e pela baixa incidência de doenças. (MCCARTHY et al., 2013)

Uma importante propriedade dos pigmentos é a sua atividade antimicrobiana. Atualmente, considerando a crescente demanda por ingredientes naturais vem aumentando, o uso de agentes antimicrobianos naturais e que são permitidos em alimentos é um tema que deve ser desenvolvido em harmonia com relação a indústria, o consumidor e práticas legais. (KONURAY; ERGINKAYA, 2015)

Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma estratégia econômica para a produção de um pigmento natural por *Penicillium sclerotiorum* utilizando resíduos de recursos renováveis (soro e cevada) com o objetivo de atender a demanda do mercado mundial de pigmentos e investigar a atividade antimicrobiana deste pigmento.

## **2. MATERIAIS E METODOS**

### **2.1 Micro-organismo**

*Penicillium* sp. (UCP 1361) isolado do solo semi arido de Pernambuco, nordeste do Brasil, foi obtido do Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), na Universidade Católica de Pernambuco, registrado na World Federation for Culture Collection (WFCC).

### **2.2 Identificação morfológica de *Penicillium* sp.**

A identificação do fungo isolado foi realizada de acordo com o manual de identificação de *Penicillium* sp. descrito por Pitt. (PITT, et al., 1979; SAMSON; PITT, 2000) A amostra foi inoculada em meio de cultura Czapek Yeast Autolisado ágar (CYA) a 25° C e 37° C e no meio Malte Extrato ágar (MEA) e Glicerol Nitrato ágar (G25N) a 25° C. Após sete dias a morfologia da colônia foi observada e o diâmetro medido, seguido de observação microscópica do formato e tamanho da célula.

## **2.3 Identificação molecular de *Penicillium* sp.**

Após sete dias de crescimento em meio Batata Dextrose Agar (BDA). O extrato de DNA, do micélio fungico crescido extraído a partir do Protocolo de extração com CTAB DNA adaptado de Doyle & Doyle (1987).

A identificação molecular foi realizada por PCR utilizando primers universais ITS1 e ITS4, ITS 1 (5' TTC CGT AGG TGA ACC EGC GG 3') e ITS 4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (WHITE et al., 1990). Os parâmetros de ciclagem para ITS1 e ITS4 consistem na desnaturação à 95°C por 5 minutos, seguido por 45 ciclos a 95°C por 20 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, e um ciclo final de 10 minutos à 72°C, foi realizado em termo ciclador Veriti 96-Well, Applied Biosystems.

Os produtos de amplificação por PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose à 1,0% e visualizado em SYBR<sup>®</sup> Green I Gel de ácido nucléico (Invitrogen) sobre luz UV fotodocumentador com gel eletroforese - L-PIX TOUCH. O produto do PCR foi purificado utilizando kit de purificação PureLink (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. As regiões ITS 1 e 4 para sequenciamento com ABI 3500 Genetic Analyzer (Aplicado Biosystems) na ACTGene (Alvorada-RS). Sequências foram montadas e a qualidade analisada utilizando Pacote Staden (STADEN et al., 1998). Ajustes manuais foram feitos quando necessário. As sequências foram comparadas com a base de dados de sequências NCBI utilizando o algoritmo BLAST como uma identificação aproximada.

## **2.4 Produção de pigmento**

### **2.4.1 Resíduos Agro industriais**

Os resíduos agro industriais foram gentilmente cedidos por duas diferentes indústrias de Pernambuco. A cevada foi proveniente de uma indústria de cerveja e soro de leite de um indústria de processamento de queijo da região.

### **2.4.2 Delineamento composto central (DCC)**

O Delineamento Composto Central (DCC) de 2<sup>2</sup> com 4 pontos centrais e 4 pontos axiais foi utilizado para avaliar a interação entre as variáveis independentes soro de leite e cevada (Tabela 1) e os dados foram analisados no Statistic versão 6.0.

**Tabela 1:** Variáveis e níveis do Delineamento composto central (DCC)

NÍVEIS					
VARIÁVEIS	- 1,41	- 1	0	1	1,41
Soro de leite (%)	3,18	4	6	8	8,82
Cevada (%)	1,18	2	4	6	6,82

### 2.4.3 Produção de pigmento

*Penicillium* sp. foi inoculado em placas de Petri contendo meio Batata Dextrose Agar (BDA) e incubado à 28°C durante 96 h. Após este período, os conídios foram contados ( $10^7$ /mL) e alíquotas de suspensão a 1% (v/v) com água destilada foram inoculadas em frascos Erlenmeyers contendo 100 mL do meio de produção de pigmento. A composição do meio foi estabelecida por Delineamento Composto Central (DCC) de  $2^2$  contendo diferentes concentrações de soro de leite e cevada. A peptona em concentração constante (0,3%) em todos os meios do DCC e o pH foi ajustado para 6,0. Os frascos foram incubados em agitador orbital a 150 rpm, à 28°C durante 96 h.

### 2.5 Análise elementar do meio de produção

A composição elementar de carbono (C), nitrogênio (N), hidrogênio (H) e enxofre (S) presente no meio para a produção de pigmentos foi realizada em analisador elementar (modelo EA 1110 CHNS-O).

### 2.6 Rendimento da Biomassa

Após o cultivo de *Penicillium* sp. de acordo com o DCC, o líquido metabólico foi filtrado e a biomassa obtida foi lavada, liofilizada e o rendimento expresso em g/L.

### 2.7 Extração de pigmento

A extração do pigmento foi realizada de acordo com Shin et al., (1998) adaptada pelo aumento do volume de etanol a 95%, de 5 mL para 20 mL quando o pigmento estava no agitador, depois centrifugou-se durante 10 min, a 12.000 rpm. O líquido sobrenadante após a evaporação, foi quantificado. O rendimento do pigmento bruto obtido foi expresso em g/L.

## **2.8 Varrimento do pigmento pelo comprimento de onda**

O extrato do pigmento foi analisado por varrimento na região de comprimento de onda de 400-800 nm utilizando o espectrofotômetro UV-Vis. (YOU et al., 2014) As amostras foram feitas com uma amostra diluída (1:10). Os resultados foram expressos em unidades de absorvância (UA/mL) a um dado comprimento de onda ( $\lambda$ ), multiplicado pelo fator de diluição.

## **2.9 Purificação do pigmento**

### **2.9.1 Cromatografia de camada delgada**

O pigmento bruto foi purificado por cromatografia em camada delgada, utilizando o método de Mukherjee e Singh (2011), modificado, por substituição de hexano e acetato de etila por acetato de etila. Os resultados foram expressos pelo fator de retenção onde  $R_f = \text{Distância percorrida pelo composto} / \text{Distância percorrida pelo solvente}$ .

### **2.9.2 Cromatografia em coluna**

Com o objetivo de separar e purificar a amostra de pigmento, realizou-se cromatografia em coluna. Em uma coluna de cromatografia em vidro, adicionou-se 1 cm de sulfato de sódio anidro, 30 cm de sílica gel (60-120 mesh, ativado previamente durante 1 hora numa mufla a 800°C) e concluiu-se com 1 cm de sulfato de sódio a nido. Foi adicionado 120 mL de acetato de etila, depois a amostra de pigmento diluída no mesmo solvente, mais 50 mL de acetato de etila. Quando todo o solvente passou pela da coluna de sílica, foi recolhido e as frações separadas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

### **2.9.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Para identificar o pigmento purificado, a amostra foi ressuspensa em acetato de etila e analisada de acordo com Mukherjee e Singh (2011). Os dados foram analisados utilizando a coluna cromatográfica Sunfire, Waters C18, 4,6 x 150 mm, a fase móvel utilizada foi acetato de etilo, fluxo 0,6 mL min<sup>-1</sup> e temperatura de 30°C. A detecção foi realizada utilizando cromatogramas lidos a um comprimento de onda de 450 nm.

## 2.10 Atividade antimicrobiana

### 2.10.1 Amostras patógenas

O pigmento produzido foi investigado contra oito patógenos: *Staphylococcus aureus* (UCP 1001), *Escherichia coli* (UCP 0989), *Salmonella enterica* (UCP 01595), *Klebsiella pneumonia* (UCP 0962), *Candida albicans* (UCP0993), *Candida pelliculosa* (UCP 0994), *Candida tropicalis* (UCP 0996) e *Candida guilliermondii* (UCP 0992).

### 2.10.2 Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A concentração mínima inibitória do pigmento produzido por *Penicillium* sp. capaz de inibir o crescimento de bactérias e fungos foi investigada utilizando o método de micro diluição em microplacas de 96 poços de acordo com o protocolo descrito pelo Clinical Laboratory Standards Institute (2006). As microplacas foram examinadas usando resazurina como indicador de crescimento, onde o aparecimento de rosa mostra crescimento do micro-organismo e azul indica inibição de crescimento. (PALOMINO et al., 2002; ELSHAFIE et al., 2015)

### 2.10.3 Difusão em discos

A capacidade do pigmento produzido por *Penicillium* sp. de inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos também foi investigado pelo método de difusão em disco. (FIEBELKORN et al., 2013) As suspensões bacterianas foram utilizadas após a obtenção de  $10^7$  UFC/mL em meio Brain Heart Infusion ágar (BHI), seguido de aplicação de discos de papel de filtro (6 mm de diâmetro) impregnados com 30 µL do pigmento em diferentes concentrações (100 µg, 200 µg, 300 µg e 400 µg). Os discos de vancomicina foram utilizados como controle positivo. As placas foram incubadas à 37°C durante 24 h e a atividade antibacteriana foi medida (mm) após a aparência de um halo de inibição. O experimento foi realizado em triplicada.

## 3. Resultados e discussão

### 3.1 Identificação e caracterização de *Penicillium* sp.

A identificação do *Penicillium* sp. foi baseada em uma análise morfológica (macroscópica e microscópica) e a confirmação foi dada após identificação molecular. De acordo com os aspectos macroscópicos (Figura 1), o *Penicillium* sp. (UCP 1361) cultivado em meio Czapek (CYA) a 25°C demonstraram colônias com diâmetro entre 30 a 35 mm, micélio

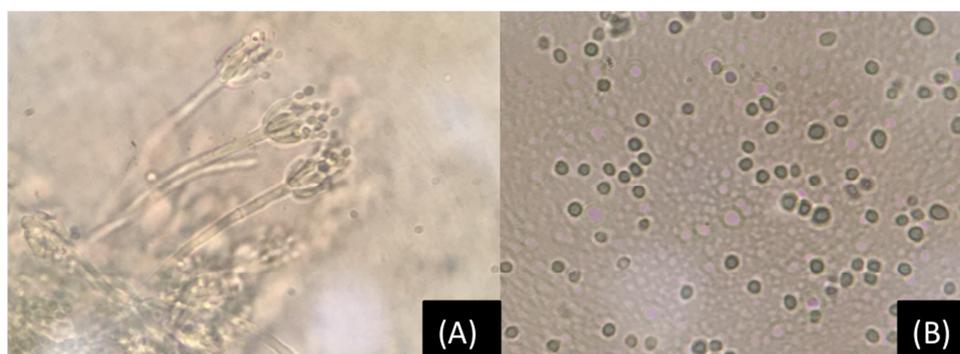
branco e sulcado, conídio turquesa acinzentado, com produção de exsudato alaranjado. Enquanto em meio de Extrato de Malte Agar (MEA) a 25°C as colônias apresentaram crescimento velutíneo e flocoso no centro da colônia, conídio com cores similares as do meio CYA, após 21 dias de cultivo em MEA apresentou presença de esclerócios. Em meio glicerol nitrato 25% (G25N), as colônias alcançaram 11 mm de diâmetro, plano e amarelado após crescimento a 25°C. Em 37°C não houve crescimento e em nenhum dos meios testados.

**Figura 1.** Características macroscópicas e microscópicas de *Penicillium sclerotiorum* em CYA, MEA e Glicerol 25%



Adicionalmente, através de identificação microscópica do *Penicillium* sp. em meio CYA (Figura 2) foi observado a presença de conidióforos suaves e finos, monoverticilados e poucas métulas. A presença de conidióforos definitivamente vesicular com diâmetro de 5-7  $\mu\text{m}$  foi observado após crescimento em meio CYA (Figura 2A). Em meio MEA os conidióforos alcançaram 10 $\mu\text{m}$ , fiáides ampiliformes de 9-12  $\mu\text{m}$ , conídio globoso a elipsoidal medindo 3,5 a 4,5  $\mu\text{m}$  finamente áspero (Figura 2B) apresentando algumas estrias. Por isso, de acordo com a taxonomia clássica, baseado na características morfológicas descritas, o isolado foi identificado como *Penicillium sclerotiorum* subgênero *Aspergilloides*, seção *Aspergilloides*.

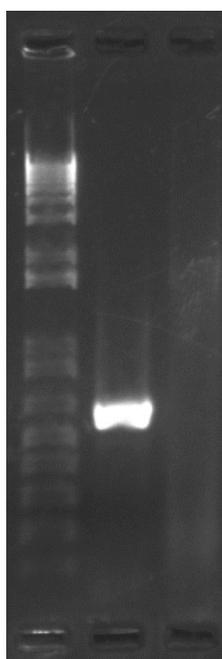
**Figura 2.** (A) Identificação microscópica dos conidióforos; (B) Identificação microscópica dos esporos



### 3.2 Identificação molecular do *Penicillium* sp. com PCR

Para confirmar a identidade do fungo, a sequência obtida foi comparada utilizando a análise BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), e verificou-se que a identidade Genbank (AY373931. 1) correspondeu à sequência obtida com uma identidade máxima de 99% como *Penicillium sclerotiorum*, na análise molecular utilizando primers específicos (ITS1 e ITS4) houve uma amplificação de 580 pb. (Figura 3). De acordo com Haugland et al. (2004), um produto de PCR com os primers ITS1/ITS4 amplificam 603 pb para *Penicillium sclerotirum*.

**Figura 3:** Amplificação do ADN de *Penicillium sclerotiorum* com o primers ITS1 e ITS4



### 3.3 Produção de pigmento de *Penicillium sclerotiorum* utilizando fontes naturais renováveis

Para possível comercialização de um pigmento natural é necessário o uso de processos econômicos e alto rendimento de pigmento. Neste contexto, *Penicillium sclerotiorum* foi capaz de produzir 2,23 g/L de pigmento extraído a partir de 15,4g/L de biomassa na condição 4 do planejamento DCC em meio contendo soro (8%) e cevada (6%) (Tabela 2). Este resultado foi superior ao obtido por Sardaryan et al. (2004) que relataram um rendimento de 1,5-2,0 g/L do pigmento vermelho Arpink extraído de *Penicillium oxalicum*.

**Tabela 2:** Produção de pigmento e biomassa por *Penicillium sclerotiorum* de acordo com planejamento composto central (DCC)

<b>Amostra</b>	<b>Soro de leite (%)</b>	<b>Cevada (%)</b>	<b>Biomassa (g/L)</b>	<b>Pigmento (g/L)</b>
<b>1</b>	4	2	5	0,19
<b>2</b>	8	2	4,8	0,19
<b>3</b>	4	6	13	2,21
<b>4</b>	8	6	15,4	2,23
<b>5</b>	6	6,82	14,2	1,17
<b>6</b>	6	1,18	3,1	0,27
<b>7</b>	8,82	4	9,3	0,38
<b>8</b>	3,18	4	9,8	0,40
<b>9</b>	6	4	9,5	0,47
<b>10</b>	6	4	10,4	0,30
<b>11</b>	6	4	9,2	0,40
<b>12</b>	6	4	9,2	0,42

### 3.4 Análise elementar do meio selecionado

O meio selecionado para produção de pigmento (soro de leite 8% e cevada 6%) demonstrou as quantidades de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre presente na Tabela 3. Os dados demonstram um alto teor de carbono (42,56%) seguido de nitrogênio (6,28%), favorecendo a proporção C/N de 15:1. Estes resultados estão de acordo com Pisareva e

Kujumdzieva, (2010) que afirmaram que a produção máxima de pigmento é influenciada pelo alto teor de carbono na composição do meio.

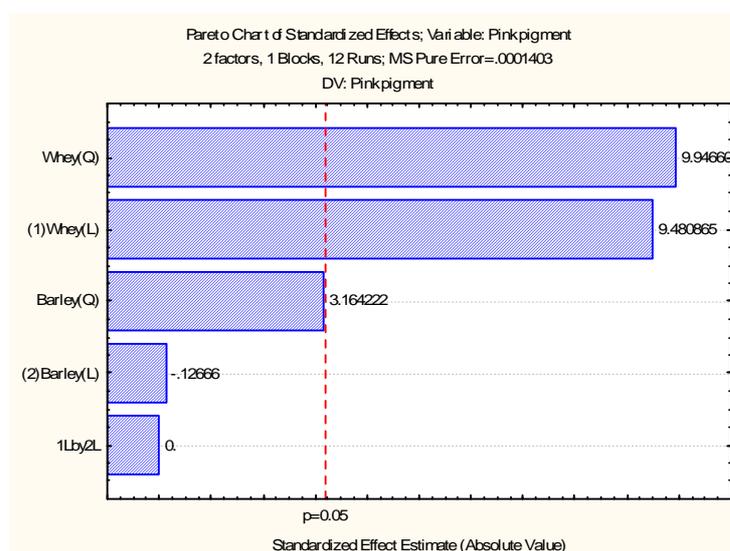
**Tabela 3:** Percentual de carbono, hidrogênio, nitrogênio e enxofre presente na composição do meio selecionado

Carbono (%)	Hidrogênio (%)	Nitrogênio (%)	Enxofre (%)
42,50	6,20	3,49	0,43

### 3.5 Influencia do soro de leite e cevada na produção de pigmento por *Penicillium sclerotiorum* de acordo com o diagrama de Pareto

De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 4), com nível de confiança de 95%, observou-se que o soro de leite, avaliado em função linear (L) e quadrática (Q), foi a variável independente mais significativa do ponto de vista estatístico favorecendo o aumento da produção de pigmento por *Penicillium sclerotiorum*. Enquanto a cevada avaliada em função quadrática (Q) apresentou um resultado significativo no nível  $p < 0,05$ . No entanto as concentrações utilizadas não favoreceram o aumento da produção de pigmentos será necessária a otimização futura para aumentar o rendimento de pigmento.

**Figura 4:** Diagrama de Pareto para investigar os efeitos das concentrações de soro de leite e cevada para produção de pigmento

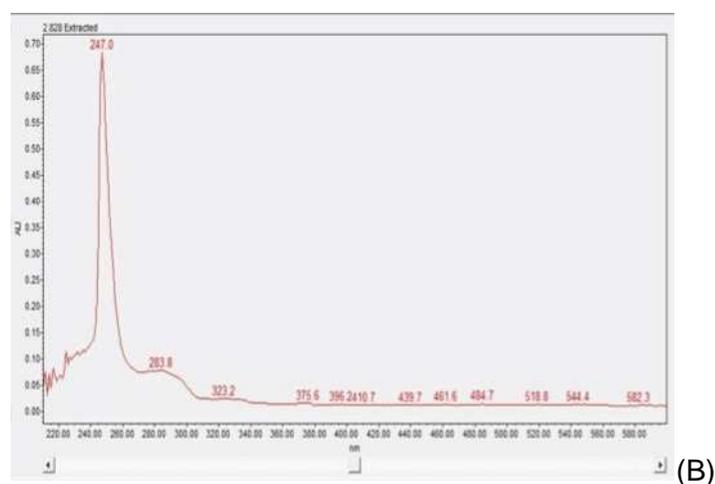
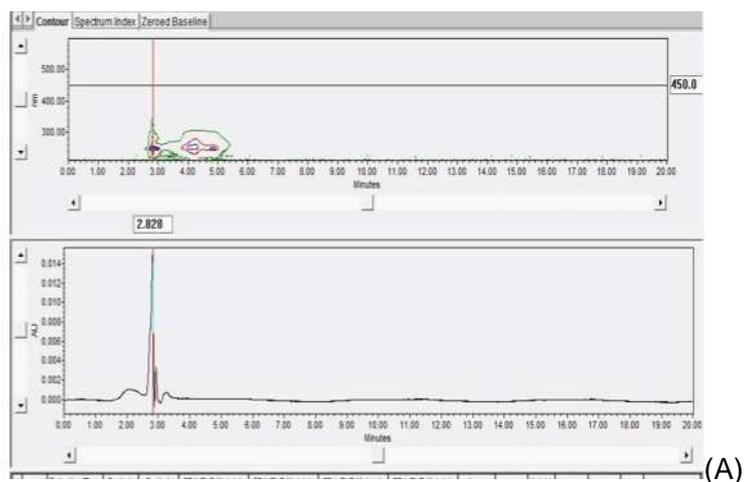


### 3.6 Identificação e purificação de pigmento rosa produzido por *Penicillium sclerotiorum*

Para identificar e purificar o pigmento produzido por *Penicillium sclerotiorum* na condição selecionada do planejamento fatorial DCC (8% soro e 6% cevada), foram realizadas as análises por espectro visível, Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Neste estudo, o pigmento rosa de *Penicillium sclerotiorum* foi lido em comprimento de onda de 550 nm (Absorbância 4,49). Estes dados foram de acordo com Velmurugan et al., (2010) que afirmam que a faixa visível para pigmento rosa é no comprimento de onda de 550 nm. As análises de CCD demonstraram o aparecimento de banda rosa com  $R_f = 0,961$ . Por outro lado, os resultados obtidos pela HPLC mostraram que o pigmento tem tempo de retenção (RT) de 2,828 (Figura 5A), lido em comprimento de onda de 247 nm, como mostrado na Figura 5B. Em relação a outros pigmentos naturais produzidos por fungos, os rosa são pouco descritos na literatura (WANG et al., 2004; PANESAR; KAUR; PANESAR, 2015; PERUMAL et al., 2009). Mansouri et al., (2013) descrevem a produção de um pigmento rosa avermelhado produzido por *Penicillium subrubescens* com RT = 9,34 no comprimento de onda de 255 nm.

De acordo com a literatura até o presente, não há registro de pigmento rosa produzido por *Penicillium sclerotiorum*, sendo registrado a produção de pigmentos no espectro amarelo (DOS REIS CELESTINO et al. 2014) e laranja (GOMES; TAKAHASHI, 2016).

**Figura 5:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de pigmento rosa produzido por *Penicillium sclerotiorum* no meio selecionado: (A) tempo de retenção e (B) varredura de absorbância



### 3.7 Potencial antimicrobiano de pigmento rosa produzido por *Penicillium sclerotiorum*

A atividade mínima inibitória do pigmento extraído de *Penicillium sclerotiorum* foi observado contra *Staphylococcus aureus* (120 $\mu$ g), *Escherichia coli* (120 $\mu$ g), *Klebsiella pneumonia* (120 $\mu$ g), e *Candida glabrata* (120 $\mu$ g).

O ensaio de difusão em discos do pigmento produzido demonstrou ação efetiva contra as bactérias gram-negativas *Salmonella enterica* e *Escherichia coli* como demonstra a tabela 4.

**Tabela 4:** Ensaio de difusão em discos do pigmento

	100 µg	200 µg	300 µg	400 µg	Vancomicina
<i>Salmonella enterica</i>	+	+	++	++	+++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+++
<i>Escherichia coli</i>	+++	+++	+++	+++	++

“+++”, “++” e “+” significa bom, moderado e muito pouco, respectivamente

#### 4. CONCLUSÃO

*Penicillium sclerotiorum* demonstrou a capacidade de produzir novo pigmento natural a partir de um ambiente económico a base de soro de leite e cevada. Desta forma, este pigmento surge como uma alternativa sustentável e viável para a produção industrial devido ao alto rendimento e baixo custo no processo produtivo. Além disso, os resultados preliminares sugerem o potencial antimicrobiano do pigmento indicando sua possível aplicação em diferentes indústrias.

## 5. REFERENCIAS

AKILANDESWARI, P.; PRADEEP, B. V. Exploration of industrially important pigments from soil fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 4, p. 1631-1643, 2016.

DAS, Bipasha et al. Recovery of whey proteins and lactose from dairy waste: A step towards green waste management. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 101, p. 27-33, 2016.

DOS REIS CELESTINO, Jessyca et al. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 569-575, 2014.

DOYLE, Jeff J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem bull**, v. 19, p. 11-15, 1987.

ELSHAFIE, Hazem S. et al. In vivo antifungal activity of two essential oils from Mediterranean plants against postharvest brown rot disease of peach fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 11-15, 2015.

FIEBELKORN, K. R. et al. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4740-4744, 2003.

GOMES, Dhionne Corrêia; TAKAHASHI, Jacqueline Aparecida. Sequential fungal fermentation-biotransformation process to produce a red pigment from sclerotiorin. **Food chemistry**, v. 210, p. 355-361, 2016.

HAUGLAND, Richard A. et al. Quantitative PCR analysis of selected *Aspergillus*, *Penicillium* and *Paecilomyces* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 198-210, 2004.

KONURAY, Gözde; ERGINKAYA, Zerrin. Antimicrobial and antioxidant properties of pigments synthesized from microorganisms. **The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs (A. Méndez-Vilas, Ed.) FORMATEX**, p. 27-33, 2015.

Oliveira, L. T. Produção simultânea de biossurfactantes e pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) a partir de resíduos da agroindústria

MANSOURI, S. et al. *Penicillium subrubescens*, a new species efficiently producing inulinase. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 103, n. 6, p. 1343-1357, 2013.

MCCARTHY, Aoife L. et al. Brewers' spent grain; bioactivity of phenolic component, its role in animal nutrition and potential for incorporation in functional foods: a review. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 72, n. 01, p. 117-125, 2013.

MORALES-OYERVIDES, L. et al. Effect of heat exposure on the colour intensity of red pigments produced by *Penicillium purpurogenum* GH2. **Journal of Food Engineering**, v. 164, p. 21-29, 2015.

MUKHERJEE, Gunjan; SINGH, Sanjay Kumar. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 188-192, 2011.

NARENDRABABU, B. N.; SHISHUPALA, S. Spectrophotometric detection of Pigments from *Aspergillus* and *Penicillium* isolates. **Journal of Applied Biology & Biotechnology Vol**, v. 5, n. 01, p. 053-058, 2017.

NIGAM, Poonam Singh; LUKE, Jasmine Sharon. Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 93-100, 2016.

PALOMINO, Juan-Carlos et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PANESAR, Reeba; KAUR, Shubhneet; PANESAR, Parmjit S. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 70-76, 2015.

PERUMAL, K. et al. Extraction and characterization of pigment from *Sclerotinia* sp. and its use in dyeing cotton. **Textile Research Journal**, v. 79, n. 13, p. 1178-1187, 2009.

Oliveira, L. T. Produção simultânea de biossurfactantes e pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) a partir de resíduos da agroindústria

PISAREVA, E. I.; KUJUMDZIEVA, A. V. Influence of carbon and nitrogen sources on growth and pigment production by *Monascus Pilosus* C1 strain. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 24, n. sup1, p. 501-506, 2010.

PITT, John I. et al. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. **The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*.**, 1979.

SAMSON, Robert A.; PITT, John I. (Ed.). **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification.** CRC Press, 2000.

SÁNCHEZ, Carmen. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 2, p. 185-194, 2009.

SARDARYAN, E. et al. Arpink Red—meet a new natural red food colorant of microbial origin. **Pigments in Food, More than Colours...**, L. Dufossé (Ed.), **Université de Bretagne Occidentale Publ., Quimper, France**, p. 207-208, 2004.

SHIN, Chul S. et al. Morphological change and enhanced pigment production of *Monascus* when cocultured with *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 59, n. 5, p. 576-581, 1998.

SOARES, Deyze Alencar; PIMENTA, Raphael Sanzio. Evaluation of antimicrobial activity from extracellular pigments produced by endophytic/Avaliação da atividade antimicrobiana de pigmentos extracelulares produzidos por fungos endofíticos. **Journal of bioenergy and food science**, v. 2, n. 4, 2015.

STADEN, Rodger; BEAL, Kathryn F.; BONFIELD, James K. The staden package, 1998. **Bioinformatics methods and protocols**, p. 115-130, 1999.

VELMURUGAN, Palanivel et al. Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 262-268, 2010.

Oliveira, L. T. Produção simultânea de biossurfactantes e pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) a partir de resíduos da agroindústria

WANG, Long et al. *Penicillium persicinum*, a new griseofulvin, chrysogine and roquefortine C producing species from Qinghai province, China. **Antonie van leeuwenhoek**, v. 86, n. 2, p. 173-179, 2004.

WHITE, Thomas J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

WIKLER, Matthew A. (Ed.). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard**. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.

YOU, Ting-Ting et al. Chemical composition, properties, and antimicrobial activity of the water-soluble pigments from *Castanea mollissima* shells. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 8, p. 1936-1944, 2014.

## CAPÍTULO III

## Artigo II

# TRANSFORMAÇÃO SUSTENTAVEL DE CEVADA E SORO DE LEITE COMO RECURSO NATURAL RENOVAVEL PARA OBTENÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361)

\* Manuscrito a ser submetido ao Journal of Chemistry and Chemical Engineering

Oliveira, L. T. Produção simultânea de biossurfactantes e pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) a partir de resíduos da agroindústria

**TRANSFORMAÇÃO SUSTENTAVEL DE CEVADA E SORO DE LEITE COMO RECURSO NATURAL RENOVAVEL PARA OBTENÇÃO DE BIOSURFACTANTE POR *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361)**

Laura Truan Oliveira<sup>1\*</sup>; Nathália Sá Alencar Amaral Marques<sup>1</sup>; Adriana Ferreira de Souza<sup>2</sup>; Michele Freitas Santiago<sup>3</sup>; Galba Maria Campos-Takaki<sup>1,4</sup>; Rosileide Fontenele da Silva Andrade<sup>4,5</sup>; Thayse Alves de Lima e Silva<sup>4,5</sup>; Kaoru Okada<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Mestrado em Desenvolvimento de Processos – Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>2</sup> Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>3</sup> Programa de graduação em fitopatologia - UFRPE, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>4</sup> Nucleo de Pesquisa em Ciências, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>5</sup> Programa Nacional de Pós doutorado CAPES (PNPD) Pós graduação em Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

## Resumo

Biossurfactantes são moléculas anfipáticas com capacidade de diminuir a tensão superficial entre dois líquidos, podem ser produzidos por micro-organismos e são utilizados em diferentes indústrias. No entanto seu custo de produção ainda é elevado. No presente trabalho foram utilizados resíduos agro industriais com o objetivo de diminuir o seu custo de produção e diminuir a poluição ambiental utilizando fontes renováveis. *Penicillium* sp. Identificado através de análise morfológica e molecular. Em seguida foi inoculado em meio contendo soro de leite (4%) e cevada (2%) como substratos, a tensão superficial foi avaliada de acordo com a metodologia do anel de Du Nouy, a propriedade emulsificante foi testada com substratos hidrofóbicos, a capacidade de dispersão de petroderivados e a viscosidade do biossurfactante foram analisadas com óleo queimado de motor. A extração do biossurfactante foi realizada utilizando clorofórmio e metanol. O fungo isolado foi identificado como *Penicillium sclerotiorum*. O biossurfactante reduziu a tensão superficial de 72 para 27 mN/m, obteve um índice de emulsificação de 68% utilizando óleo queimado de motor, índice de dispersão de 33,15 cm<sup>2</sup> e viscosidade reduzida de 279,6 para 48,5 cP. O biossurfactante extraído possui a habilidade de reduzir a tensão superficial e a viscosidade, também demonstrou capacidade de formar camada de dispersão e de emulsificação em petroderivados. Os estudos realizados indicam um potencial biossurfactante para processos biotecnológicos utilizando fontes renováveis de produção com custo reduzido .

**Palavras-chave:** *Penicillium sclerotiorum*; Biossurfactante; Soro de leite; Cevada; Resíduos agro industriais.

## 1. Introdução

Biossurfactantes são definidos como moléculas anfipáticas com regiões hidrofóbica e hidrofílica capazes de reduzir a tensão superficial. (RANDHAWA; RAHMAN; 2014).

Os Biossurfactantes tem atraído cada vez mais o interesse de diferentes indústrias devido as suas vantagens como diversidade estrutural, baixa toxicidade, maior biodegradabilidade, capacidade de funcionar em diferentes pH, temperatura e salinidade, bem como maior seletividade, menor CMC e produção com fontes renováveis, resíduos industriais e subprodutos industriais. (DA ROSA; FREIRE; FERRAZ, 2015; SANTOS et al., 2016)

Os biossurfactantes apresentam aplicações na biorremediação podendo auxiliar nos processos de remoção de metais pesados em meios líquidos por micro-organismos (COLLA et al, 2012). Eles também possuem potencial em aplicação na agricultura, como matéria prima para cosméticos, produtos farmacêuticos, detergentes e processamento de alimentos, entre outros. (DE SOURAV et al., 2015)

A formulação do meio de produção envolve a seleção de nutrientes que estimulem o crescimento do micro-organismo e a produção de metabólitos. A produção de biossurfactantes pode ser espontânea ou induzida pela presença de compostos lipofílicos, variações de pH, temperatura, aeração e velocidade de agitação ou quando o crescimento celular é mantido em condições de estresse, como uma baixa concentração de nitrogênio. (DESAI; BANAT, 1997; SANTOS et al., 2016)

No entanto, a produção de biossurfactantes ainda é restrita devido ao seu elevado custo de produção. Isto pode ser solucionado com o uso de substratos renováveis mais baratos. Com o objetivo de satisfazer esta demanda por baixo custo. (RIVERA et al., 2015)

Considerando o alto custo no processo de produção de biossurfactante, a bioconversão de resíduos industriais pode ser usado como uma alternativa mais econômica para produção de biossurfactante. A bioconversão de resíduos é de primordial importância para o futuro devido ao seu baixo custo financeiro e energético, redução da poluição ambiental e relativa facilidade de produção. Produzir produtos utilizáveis a partir de resíduos agro-industriais é, portanto, uma opção viável e favorável. (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011).

Entre os diferentes resíduos existentes da indústria alimentar, o soro de leite se destaca por ser o principal subproduto da indústria de laticínios e contém uma série de nutrientes importantes, tais como lactose, proteínas solúveis, lipídios e sais minerais. (DAS et al., 2016) Outro subproduto que pode ser utilizado como fonte de carbono para micro-organismos é a cevada, matéria-prima na fabricação de cerveja e utilizada na alimentação animal, além de ser reconhecida pelo alto potencial produtivo e pela baixa incidência de doenças. (MCCARTHY et al., 2013)

Portanto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma estratégia econômica para a produção de um biossurfactante por *Penicillium sclerotiorum* utilizando resíduos de recursos renováveis (soro de leite e cevada) com o objetivo de reduzir o custo de produção aliado com a diminuição da poluição ambiental.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1 Micro-organismo**

*Penicillium* sp. (UCP 1361) isolado de solos do semi-árido de Pernambuco, nordeste do Brasil, foi obtido do Banco de Culturas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia (NPCIAMB), da Universidade Católica de Pernambuco.

### **2.2 Identificação do *Penicillium* sp.**

A identificação do fungo isolado *Penicillium* sp. Foi realizada morfológicamente de acordo com o método descrito por Pitt (1979; 2000) e confirmada por identificação molecular. A cepa foi inoculada em meio de cultura Czapek Yeast autolisado Agar (CYA) a 25°C e 37°C e Malt Extract Agar (MEA) a 25°C. Após 7 dias as culturas foram observadas morfológicamente e o diâmetro foi medido, seguido pela observação microscópica do formato e tamanho da célula. Após sete dias de crescimento em meio Batata Dextrose Agar (BDA). O extrato de DNA, do micélio 64ungicos crescido e extraído a partir do Protocolo de extração com CTAB DNA adaptado de DOYLE; DOYLE (1987).

A identificação molecular foi realizada por PCR utilizando primers universais ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990). Os parâmetros de ciclagem para ITS1 e ITS4 consiste na desnaturação a 95°C por 5 minutos, seguido por 45 ciclos a 95°C por 20 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, e um ciclo final de 10 minutos a 72°C, foi realizado em termo ciclador Veriti 96-Well, Applied Biosystems.

Os produtos de amplificação por PCR foram separados por electroforese em gel de agarose a 1,0% e visualizado em SYBR<sup>®</sup> Green I Gel de ácido nucleico (Invitrogen) sobre luz UV fotodocumentador com gel electroforese - L-PIX TOUCH. O produto do PCR foi purificado utilizando kit de purificação PureLink (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. As regiões ITS 1 e 4 para sequenciamento com ABI 3500 Genetic Analyzer (Aplicado Biosystems) na ACTGene (Alvorada-RS). Sequências foram montadas e qualidade analisada utilizando Pacote Staden (STADEN et al., 1998). As sequências foram comparadas com a base de dados de sequências NCBI utilizando o algoritmo BLAST como uma identificação aproximada.

### 2.3 Substratos renováveis para produção

A cevada (proveniente da indústria de cerveja) e o soro de leite (obtido da indústria de queijo local) foram utilizados como substratos renováveis para produção do biossurfactante.

### 2.4 inóculo

A espécie foi inoculada em placa de Petri contendo meio Sabouraud (glicose 40 g/L, peptona 10 g/L e Agar 15/L) e incubado a 28 °C durante 7 dias. Após esse período, trinta discos de 6mm contendo os esporos jovens do fungo foram inoculados no meio de produção do biossurfactante.

### 2.5 Produção de biossurfactante

A produção do biossurfactante foi realizada em meio contendo concentrações de cevada e soro de leite estabelecidas pelo planejamento Delineamento Composto Central (DCC) de 2<sup>2</sup> conforme a Tabela 1. A concentração de peptona (0,3%) foi constante em todos os ensaios do planejamento e o pH foi ajustado para 6. O cultivo foi realizado em agitação orbital (150 rpm), 28°C durante 96 h. A análise estatística dos dados foi realizada no software Statistic 6.0.

**Tabela 1:** Variáveis e níveis do planejamento Delineamento Composto Central (DCC) para produção de biossurfactante por *Penicillium* sp.

NÍVEIS					
VARIAVEIS	-1,41	-1	0	1	1,41
Soro de leite (%)	3,18	4	6	8	8,82
Cevada (%)	1,18	2	4	6	6,82

## **2.6 Determinação da atividade surfactante**

Para determinar a ocorrência da produção de biossurfactante foi medido, no líquido metabólico livre de células, a tensão superficial utilizando o Tensiometro modelo Sigma 70 (KSV Instruments Ltd., Helsinki, Finland) de acordo com a metodologia do anel de Du Nouy (KUYUKINA et al., 2001)

## **2.7 Determinação da propriedade emulsificante**

A capacidade do biossurfactante em formar emulsões estáveis também foi investigada. Os substratos hidrofóbicos testados para indução da formação de emulsões foram: óleo de canola, óleo de milho, óleo de soja pós fritura, óleo de girassol e óleo de motor queimado (COOPER e GOLDENBERG, 1987).

## **2.8 Efeito na Viscosidade de óleo queimado de motor**

O efeito do biossurfactante de *Penicillium* sp. Na viscosidade de compostos hidrofóbicos foi investigado. O volume fixo de 6 mL de óleo queimado de motor foram transferidos para tubos de ensaio contendo o biossurfactante presente no líquido metabólico (2 mL). A água foi utilizada como controle negativo na redução da viscosidade e o surfactante químico SDS (Dodecil sulfato de sódio) foi utilizado como controle positivo. Os tubos foram agitados em vórtex durante 1 minuto e as emulsões formadas foram lidas em viscosímetro modelo Brookfield (Middleboro, MA, EUA, TC 500). Os resultados foram expressos em centipoise (cP).

## **2.9 Capacidade dispersante em óleo queimado de Motor**

A capacidade do biossurfactante em dispersar óleo queimado de motor foi realizada adicionado 20 mL de água destilada em placa de Petri, 1 mL de óleo queimado de motor, e 1 mL do líquido metabolito contendo biossurfactante. O controle positivo de dispersão utilizado foi detergente comercial e o negativo a água. A positividade dos resultados foi identificada pela formação de uma zona clara no centro da placa. Os resultados foram expressos em cm. (MORIKAWA et al., 2000)

## **3. Resultados e Discussão**

### 3.1 Identificação e caracterização de *Penicillium* sp.

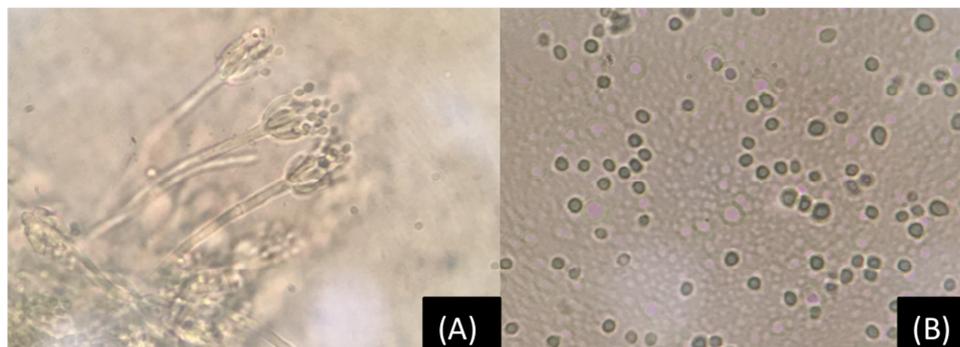
A identificação do *Penicillium* sp. foi baseada em uma análise morfológica (macroscópica e microscópica) e a confirmação foi dada após identificação molecular. De acordo com os aspectos macroscópicos (Figura 1), o *Penicillium* sp. (UCP 1361) cultivado em meio Czapek (CYA) a 25°C demonstraram colônias com diâmetro entre 30 a 35 mm, micélio branco e sulcado, conídio turquesa acinzentado, com produção de exsudato alaranjado. Enquanto em meio de Extrato de Malte Agar (MEA) a 25°C as colônias apresentaram crescimento velutíneo e flocoso no centro da colônia, conídio com cores similares as do meio CYA, após 21 dias de cultivo em MEA apresentou presença de esclerócios. Em meio glicerol nitrato 25% (G25N), as colônias alcançaram 11 mm de diâmetro, plano e amarelado após crescimento a 25°C. Em 37°C não houve crescimento e em nenhum dos meios testados.

**Figura 1.** Características macroscópicas e microscópicas de *Penicillium sclerotiorum* em CYA, MEA e Glicerol 25%



Adicionalmente, através de identificação microscópica do *Penicillium* sp. em meio CYA (Figura 2) foi observado a presença de conidióforos suaves e finos, monoverticilados e poucas métulas. A presença de conidióforos definitivamente vesicular com diâmetro de 5-7  $\mu\text{m}$  foi observado após crescimento em meio CYA (Figura 2A). Em meio MEA os conidióforos alcançaram 10 $\mu\text{m}$ , fiáldes ampiliformes de 9-12  $\mu\text{m}$ , conídio globoso a elipsoidal medindo 3,5 a 4,5  $\mu\text{m}$  finamente áspero (Figura 2B) apresentando algumas estrias. Por isso, de acordo com a taxonomia clássica, baseado na características morfológicas descritas, o isolado foi identificado como *Penicillium sclerotiorum* subgenero *Aspergilloides*, seção *Aspergilloides*.

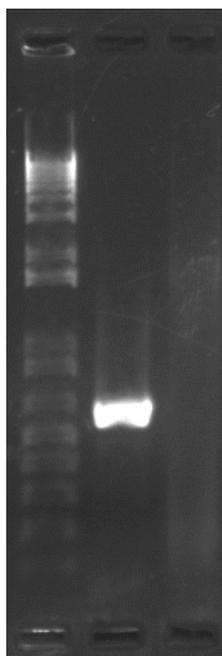
**Figura 2.** (A) Identificação microscópica dos conidióforos; (B) Identificação microscópica dos esporos



### 3.2 Identificação molecular do *Penicillium* sp. com PCR

Para confirmar a identidade do fungo, a sequência obtida foi comparada utilizando a análise BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), e verificou-se que a identidade Genbank (AY373931. 1) correspondeu à sequência obtida com uma identidade máxima de 99% como *Penicillium sclerotiorum*, na análise molecular utilizando primers específicos (ITS1 e ITS4) houve uma amplificação de 580 pb. (Figura 3). De acordo com Haugland et al. (2004), um produto de PCR com os primers ITS1/ITS4 amplificam 603 pb para *Penicillium sclerotiorum*.

**Figura 3:** Amplificação do DNA de *Penicillium sclerotirum* com primer ITS1 e ITS4



### **3.3 Cevada e soro de leite como fonte natural renovável para produção de biossurfactante por *Penicillium sclerotirum* (UCP 1361)**

A legislação ambiental exige constantemente que as indústrias realizem um plano de tratamento ou reaproveitamento dos seus resíduos. Neste contexto, este trabalho surge como uma alternativa de reaproveitamento da cevada e soro de leite, ambos resíduos de origem industrial, como fontes renováveis para obtenção microbiológica de biossurfactante. Os dados obtidos neste estudo demonstram que *Penicillium sclerotiorum* produziu um biossurfactante com excelente atividade superficial capaz de reduzir a tensão superficial de 72 para 27 mN/m no meio constituído por 4% de soro de leite e 2% de cevada, correspondente a condição 1 do planejamento DCC (Tabela 2). Esse dado comprova a habilidade do fungo em produzir biossurfactante, quando comparado com outros fungos, como o *Fusarium* sp. que reduziu a tensão superficial para 32 mN/m (QAZI et al., 2013), *Cunninghamella echinulata* para 36 mN/m (ANDRADE SILVA et al., 2014) e *Penicillium* sp. para valores entre 42 e 62 mN/m (MENDEZ CASTILLO; PRIETO CORREA; JIMENEZ JUNCA, 2017). Além disso, não há relatos na literatura que reporte a produção de biossurfactantes usando cevada como fonte nutricional microbiana.

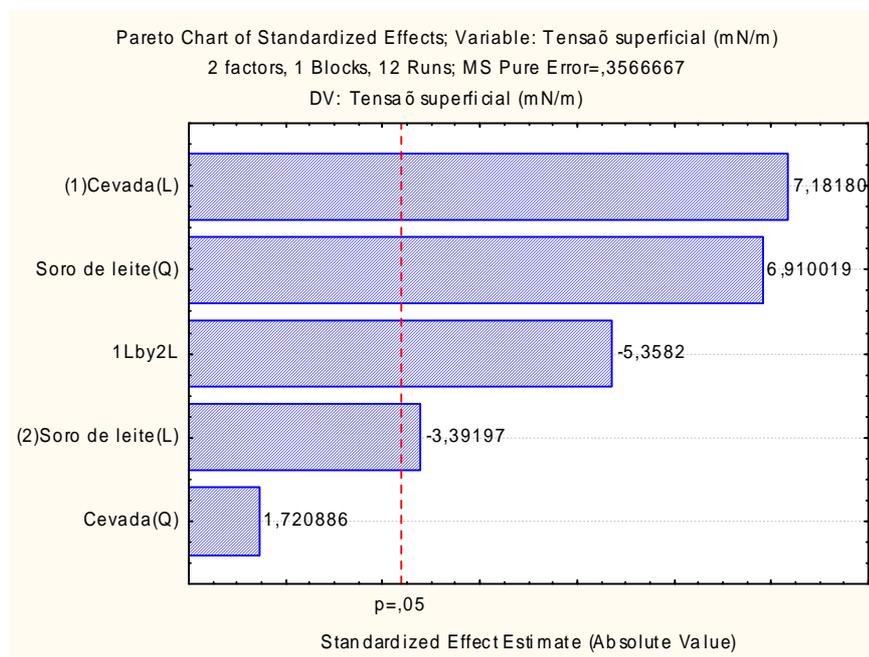
**Tabela 2:** Tensão superficial (TS) como parâmetro para avaliar a produção de biossurfactante por *Penicillium sclerotiorum* em meio contendo soro de leite e cevada

Amostras	Soro de leite (%)	Cevada (%)	Tensão superficial (mN/m)
1	4	2	27,0
2	8	2	30,8
3	4	6	35,7
4	8	6	33,1
5	6	6,82	32,5
6	6	1,18	33,3
7	8,82	4	37,8
8	3,18	4	32,9
9	6	4	34,1
10	6	4	33,7
11	6	4	37,7
12	6	4	31,5

### 3.4 Efeito da interação de cevada e soro de leite sobre a produção do biossurfactante avaliado pelo Diagrama de Pareto

O diagrama de Pareto, padronizado com nível de confiança de 95% (Figura 4), demonstra que a cevada (função linear), foi a variável mais significativa estatisticamente, seguido do soro de leite (função quadrática). Porém, a associação da cevada com o soro de leite, nas concentrações utilizadas neste estudo (função linear), foi a variável que mais provocou efeito significativo sobre a redução da tensão superficial. A cevada, em função quadrática, foi a única variável independente que não influenciou na redução da tensão superficial.

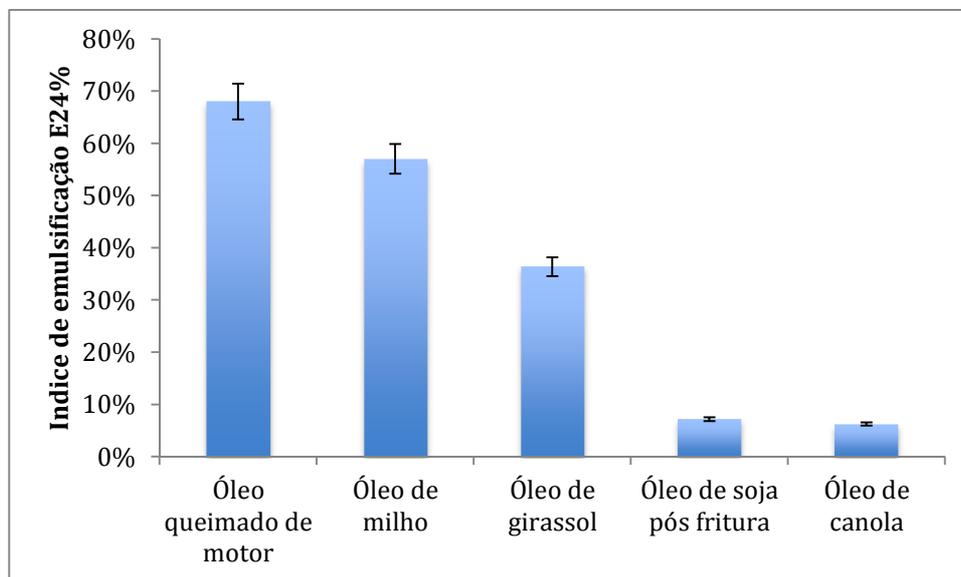
**Figura 4:** Diagrama de Pareto para investigar os efeitos das concentrações de soro de leite e cevada para produção de biossurfactante



### 3.5 Capacidade emulsificante do biossurfactante de *Penicillium sclerotiorum*

A capacidade de formação de emulsões por biossurfactantes é medida entre duas fases fluidas com diferentes graus de polaridade (AMIRIYAN et al., 2004). Neste sentido, o biossurfactante de *Penicillium sclerotiorum* produzido na condição 1 do planejamento DCC que induziu a máxima redução da tensão superficial (4% de soro de leite e 2% de cevada) proporcionou a formação de emulsões estáveis a partir do uso de óleo queimado de motor como substrato hidrofóbico, resultando em 68% de emulsificação, demonstrando desta forma, sua significativa ação emulsificante, uma vez que Willumsen e Karlson (1997) consideram valores significativos acima de 50% de emulsificação. Além deste, resultado significativo de emulsificação também foi obtido utilizando óleo de milho como substrato hidrofóbico (57%) (Figura 5).

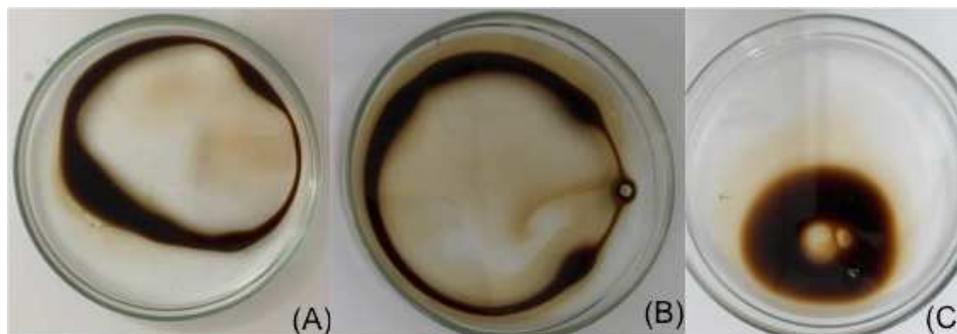
**Figura 5:** Capacidade emulsificante do biossurfactante produzido por *Penicillium sclerotiorum* utilizando soro de leite e cevada



### 3.6 Biossurfactante como agente dispersante

Os agentes dispersantes são surfactantes que auxiliam na dissolução da mancha de óleo em gotas menores. Neste contexto, o biossurfactante produzido por *Penicillium sclerotiorum* demonstrou habilidade em dispersar 33,15 cm<sup>2</sup> ODA do óleo queimado de motor em água (Figura 3A). Resultado inferior de dispersão foi obtido com o detergente comercial que dispersou 19,52 cm<sup>2</sup>(Figura 3B), utilizando água como controle negativo o resultado de dispersão foi 0 (Figura 3C). O resultado obtido foi semelhante ao encontrado por Andrade Silva et al. (2014) utilizando biossurfactante produzido por *Cunninghamella echinulata* crescido em meio contendo óleo de soja e milhocina, na qual dispersou 37,36 cm<sup>2</sup> no óleo queimado de motor.

**Figura 6:** Dispersão formada de acordo com os substratos: (A) Biossurfactante; (B) Detergente comercial; (C) Água.



### 3.7 Efeito do biossurfactante na viscosidade de óleo queimado motor

O biossurfactante bruto de *Penicillium sclerotiorum* foi capaz de reduzir a viscosidade do óleo queimado de motor de 279,6 Cp para 48,5 Cp (Tabela 3).

**Tabela 3:** Biossurfactante produzido por *Penicillium sclerotiorum* comparado com SDS e água

Biossurfactante	Viscosidade sem biossurfactante	Viscosidade com biossurfactante
	cP	cP
<i>Penicillium sclerotiorum</i>	279,6	48,5
água + SDS	24,1	
SDS	24,1	

## 4. Conclusão

*Penicillium sclerotiorum* demonstrou a capacidade de produzir biossurfactante a partir de meio de produção econômico a base de soro de leite e cevada. Este biossurfactante surge como uma alternativa sustentável e viável para a produção industrial devido ao baixo custo no processo produtivo. Além disto, o biossurfactante apresenta importantes características como redução da tensão superficial, índice dispersão e emulsificação em petro-derivados.

## 5. Referencias

AMIRIYAN, A. et al. Bioemulsan production by Iranian oil reservoirs microorganisms. **Iranian J Environ Health Sci Eng**, v. 1, p. 28-35, 2004.

ANDRADE SILVA, Nadielly R. et al. Biosurfactant-and-bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata* isolated from caatinga soil in the northeast of Brazil. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 9, p. 15377-15395, 2014.

COLLA, Luciane Maria; HEMKEMEIER, Marcelo; GIL, Anelise Sertori Lopes. Biossorção de cádmio e produção de biossurfactantes por fungos filamentosos em fermentação submersa. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, n. 1, p. 1-10, 2012.

COOPER, David G.; GOLDENBERG, Beena G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and environmental microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

DA ROSA, Celia FC; FREIRE, Denise MG; FERRAZ, Helen C. Biosurfactant microfoam: application in the removal of pollutants from soil. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 3, n. 1, p. 89-94, 2015.

DAS, Bipasha et al. Recovery of whey proteins and lactose from dairy waste: A step towards green waste management. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 101, p. 27-33, 2016.

DE, Sourav et al. A review on natural surfactants. **RSC Advances**, v. 5, n. 81, p. 65757-65767, 2015.

DESAI, Jitendra D.; BANAT, Ibrahim M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular biology reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DOYLE, Jeff J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem bull**, v. 19, p. 11-15, 1987.

Oliveira, L. T. Produção simultânea de biosurfactantes e pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) a partir de resíduos da agroindústria

GESHEVA, Victoria; STACKEBRANDT, Erko; VASILEVA-TONKOVA, Evgenia. Biosurfactant Production by Halotolerant Rhodococcus fascians from Casey Station, Wilkes Land, Antarctica. **Current microbiology**, v. 61, n. 2, p. 112-117, 2010.

HAUGLAND, Richard A. et al. Quantitative PCR analysis of selected Aspergillus, Penicillium and Paecilomyces species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 198-210, 2004.

KUYUKINA, Maria S. et al. Recovery of Rhodococcus biosurfactants using methyl tertiary-butyl ether extraction. **Journal of Microbiological Methods**, v. 46, n. 2, p. 149-156, 2001.

MAKKAR, Randhir S.; CAMEOTRA, Swaranjit S.; BANAT, Ibrahim M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB express**, v. 1, n. 1, p. 5, 2011.

MCCARTHY, Aoife L. et al. Brewers' spent grain; bioactivity of phenolic component, its role in animal nutrition and potential for incorporation in functional foods: a review. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 72, n. 01, p. 117-125, 2013.

MENDEZ CASTILLO, Lina; PRIETO CORREA, Erlide; JIMENEZ JUNCA, Carlos. Identification of fungi isolated from banana rachis and characterization of their surface activity. **Letters in Applied Microbiology**, 2017.

MORIKAWA, Masaaki; HIRATA, Yoshihiko; IMANAKA, Tadayuki. A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1488, n. 3, p. 211-218, 2000.

PITT, John I. et al. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. **The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*.**, 1979.

QAZI, Muneer Ahmed et al. Role of biosurfactant produced by Fusarium sp. BS-8 in enhanced oil recovery (EOR) through sand Pack column. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 3, n. 6, p. 598, 2013.

RANDHAWA, Kamaljeet K. Sekhon; RAHMAN, Pattanathu KSM. Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market. 2014.

Oliveira, L. T. Produção simultânea de biosurfactantes e pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) a partir de resíduos da agroindústria

RIVERA, Oscar Manuel Portilla et al. Lactic acid and biosurfactants production from residual cellulose films. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 177, n. 5, p. 1099-1114, 2015.

SAMSON, Robert A.; PITT, John I. (Ed.). **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. CRC Press, 2000.

SANTOS, Danyelle Khadydja F. et al. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 401, 2016.

STADEN, Rodger; BEAL, Kathryn F.; BONFIELD, James K. The staden package, 1998. **Bioinformatics methods and protocols**, p. 115-130, 1999.

WHITE, Thomas J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315-322, 1990.

WILLUMSEN, Pia A.; KARLSON, Ulrich. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, n. 5, p. 415-423, 1996.

# CAPÍTULO VI

## CONCLUSÕES GERAIS

A partir do estudo da produção e caracterização de pigmento e biossurfactante por *Penicillium sclerotiorum* conclui-se:

### Artigo I

*Penicillium sclerotiorum* UCP 1361 apresenta habilidade de crescer e produzir pigmento rosa em meio contendo soro de leite e cevada como substrato;

O pigmento rosa produzido por *Penicillium sclerotiorum* apresenta atividade antimicrobiana contra potentes patógenos;

O pigmento produzido por *Penicillium sclerotiorum* não apresenta semelhança com os descritos na literatura, indicando que se trata de um novo pigmento;

O processo produtivo para obtenção do pigmento de *Penicillium sclerotiorum* produzido a partir de meio contendo resíduos agro industriais está de acordo com os requisitos essenciais para sustentabilidade.

### Artigo II

*Penicillium sclerotiorum* UCP 1361 apresenta habilidade de crescer e produzir biossurfactante em meio contendo soro de leite e cevada como substrato;

O líquido metabólico livre de células produzido por *Penicillium sclerotiorum* UCP 1361 possui capacidade de reduzir a tensão superficial;

O líquido metabólico livre de células produzido por *Penicillium sclerotiorum* UCP 1361 possui propriedade emulsificante;

O líquido metabólico livre de células produzido por *Penicillium sclerotiorum* UCP 1361 possui capacidade de dispersar derivados de petróleo;

Oliveira, L. T. Produção simultânea de biossurfactantes e pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) a partir de resíduos da agroindústria

O líquido metabólico livre de células produzido por *Penicillium sclerotiorum* UCP 1361 possui capacidade de diminuir a viscosidade em óleo queimado de motor.

## **ANEXOS**

**Anexo 1:** Manuscrito submetido a Canadian Journal of Chemical Engineering

**Cost effective strategy for natural production of new pink pigment by *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) from renewable resources and its promising antimicrobial activity**

Laura Truan Oliveira<sup>1\*</sup>; Nathália Sá Alencar Amaral Marques<sup>1</sup>; Adriana Ferreira de Souza<sup>2</sup>; Tayane de Cássia Dias Mendes Silva<sup>3</sup>; Michele Freitas Santiago<sup>4</sup>; Norma Buarque de Gusmão<sup>5</sup>; Galba Maria Campos-Takaki<sup>1,6</sup>; Rosileide Fontenele da Silva Andrade<sup>6,7</sup>; Thayse Alves de Lima e Silva<sup>6,7</sup>; Kaoru Okada<sup>1,6</sup>

<sup>1</sup>Master in Development in Environmental Processes - Catholic University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>2</sup>Northeast Biotechnology Network - RENORBIO, Federal University Rural of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>3</sup>Center for Strategies and Technologies of the Northeast – CETENE, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>4</sup>Graduate Program in Phytopathology - UFRPE, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>5</sup>Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>6</sup>Nucleus of Research in Environmental Sciences, Catholic University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>7</sup>National Postdoctoral Program CAPES (PNPD) Post graduate in Environmental Processes, Catholic University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

**\* Corresponding author: lltruan@gmail.com**

### **Abstract**

The development of technologies for the sustainable transformation of natural resources into pigments from filamentous fungi reaches a current and promising market by its possible use in biomedical application. In this context, this study reports the sustainable production and characterization of a natural pigment of *Penicillium sclerotiorum* obtained from bioconversion of whey and barley wastes. The identification of the *Penicillium* species was carried out from morphological and molecular analyzes (PCR) while the production of the pigment was investigated from DCC 2<sup>2</sup> factorial design containing different concentrations of the wastes. Pigment extraction was performed from the biomass using 95% ethanol, purification by thin layer chromatography (TLC) and column chromatography and preliminary identification by high performance liquid chromatography (HPLC). Additionally, the potential of inhibition of the growth of gram positive and gram negative bacteria from pigment has also been investigated. The results of morphological and molecular analyzes identified the fungus as belonging to the genus and species *Penicillium sclerotiorum*. This fungus produced high yield of biomass (15.4g/L) and pink pigment (2.23 g/L) in the medium consisting of 8% whey and 6% barley. In this medium, the data showed high carbon content (42.56%) and nitrogen (6.28%), resulting in a C/N ratio of 15:1. The pigment presented pink band with Rf = 0.961, retention time of 2.828 to 247 nm and inhibitory activity for gram negative bacteria (*Staphylococcus aureus* and *Klebsiellapneumoniae*) and yeast *Candida glabrata*. From the results obtained *Penicilliums clerotiorum* demonstrated the ability to produce a new natural pigment with antimicrobial potential using sustainable and viable sources.

**Keywords:** Pigment; Barley; Whey; *Penicillium sclerotiorum*; Anti microbial activity

## INTRODUCTION

Pigments are known as highly colourful substances used in unlimited variety of industrial products to provide an attractive appearance in products marketable mainly in the food, textile and pharmaceutical sectors. However the problems cause by synthetic pigments such as toxicity issues, allergic reactions, intolerances and carcinogenicity, limiting their use, increasing the interest by the international market in natural pigments. <sup>[1,2]</sup>

Natural pigments can be produced by plants, animals and microorganisms. Among these, microbiological production has been gaining prominence in the market due to the ability to produce high yield, because of the non seasonality of microorganisms, they do not compete for the limited space, can have a high performance and enables the production from renewable sources such as agro-industrial waste. <sup>[3]</sup>

Currently the fungi pigments are widely used in the food industry, there are pigments in the pink tone produced by *Monascus*, and Arpink red, produced by *Penicillium oxalacum*. <sup>[4]</sup>

It is possible to produce fungal pigments in large scale by fermentation using a variety of substrates environmentally sustainable. Among the fungal origin pigments, *Penicillium* is known to produce different pigments in different colors, especially in the red and yellow spectrum. <sup>[5]</sup>

Natural raw materials of industry have wide use as culture media in fermentation processes because of their low cost since the medium components can represent from 38% to 73% of the total production cost. <sup>[6]</sup> Among the different existing wastes from the food industry, whey is the principal by-product of dairy industry and is produced during the manufacture of cheese during coagulation process. Whey contains a number of important nutrients such as lactose, soluble proteins, lipids, and mineral salts. It can be utilized as a cheap source of lactose and protein. <sup>[7]</sup>

Another by-product that can be used as a carbon source for microorganisms is barley, which stands out as the fourth-ranked cereal producer in the world, due to its wide ecological adaptability, being a raw material in brewing and its use in animal feed, besides being recognized by the high productive potential and the low incidence of diseases. <sup>[8]</sup>

A important property of pigments is their antimicrobial activity. Nowadays, considering the growing demand for natural ingredients has been increasing, the use of antimicrobial agents

that natural and allowed to attend in food is a subject that should be developed in harmony in terms of industry, consumer and legal practices. <sup>[9]</sup>

Therefore the objective of this work was achieve a cost effective strategy for production of a natural pigment by *Penicillium sclerotiorum* using renewable resources waste (whey and barley) aiming to attend the demand of the world market for pigments and investigate the antimicrobial activity of this pigment.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Microorganism*

*Penicillium* sp., (UCP 1361) was isolated of semi arid soil (PE), Northeast of Brazil and belongs to the Nucleus of Research in Environmental Sciences, Catholic University of Pernambuco, Brazil -NPCIAMB/UNICAP, registered in the World Federation for Culture Collection (WFCC).

### *Morphological identification of Penicillium sp.*

The identification of the sample isolated was carried out according to the *Penicillium* sp. identification key described by Pitt. <sup>[10,11]</sup> The strain was inoculated into the culture media Czapek Yeast Autolysate agar (CYA) at 25° C and 37° C and in the medium Malt Extract Agar (MEA) and Glycerol Nitrate Agar (G25N) at 25° C. After 7 days the colony morphology was observed and the diameter was measured, followed by microscope observation of cell shape and size.

### *Molecular identification of Penicillium sp.*

*Penicillium* sp. was grown during 7 days in medium Potato Dextrose Agar (PDA). To extract the DNA, from growing fungal mycelium by the CTAB DNA Extraction Protocol, adapted from Doyle & Doyle. <sup>[12]</sup> The molecular identification was performed by PCR (using universal primers ITS1 and ITS4, ITS 1 (5' TTC CGT AGG TGA ACC EGC GG 3') and ITS 4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC). <sup>[13]</sup> The cycling parameters for ITS1 and ITS4 consisted of a denaturation step at 95 °C for 5 min, followed by 45 cycles at 95 °C for 20 s, 53°C for 30 s, 72°C for 30 s, and a final cycle at 10 min at 72 °C, were conducted in Veriti 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems. The PCR amplifications products were separated by

electrophoresis in 1.0% agarose gels and visualized using SYBR<sup>®</sup> Green I Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen) under UV light Photo documentador for electrophoresis gel - L-PIX TOUCH. The PCR products were purified using the Purification Kit PureLink (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The regions ITS 1 and 4 for sequenced with an ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) at ACTGene (Alvorada-RS). Sequences were assembled and quality analyzed using the Staden Package,<sup>[14]</sup> Manual adjustments were made when necessary. The consensus sequences were compared with the NCBI sequence database using the BLAST algorithm as an approximate identification.

## Production of pigment

### *Agro industrial waste*

The agro industrial waste were kindly provided from two different Pernambuco industries. The barley was provided by the beer industry and the whey from the cheese processing industry in the region.

### *Delineation Central Composite (DCC)*

A Delineation Central Composite (DCC) of  $2^2$  with 4 central points and 4 axial points was used for evaluate the interaction between the independent variables whey and barley (Table 1) and the datas were analyzed in statistic version 6.0.

**Table 1:** Factors and levels of the Delineation Central Composite (DCC)

LEVELS					
VARIABLES	- 1.41	- 1	0	1	1.41
Whey (%)	3.18	4	6	8	8.82
Barley (%)	1.18	2	4	6	6.82

### *Production of pigment*

*Penicillium* sp. was inoculated in Petri dishes containing Potato Dextrose Agar (PDA) medium and incubated at 28 °C for 96h. After this period, the conidia were counted ( $10^7$ /mL), and aliquots of 1% (v/v) suspension with distilled water were inoculated into Erlenmeyers flasks containing 100 mL of the pigment production medium. The composition of the medium was

established by Delineation Central Composite (DCC) of  $2^2$  containing different concentrations of whey and barley. The peptone was constant concentration (0.3%) in all media of DCC and pH was adjust to 6.0. The flasks were incubated in an orbital shaker at 150 rpm, at 28 °C during 96 h.

### **Elementary analyzes of the production medium**

The elementary composition in carbon (C), nitrogen (N), hydrogen (H) and sulphur (S) present in medium for pigment production was performed in elemental analyzer instrument (model EA 1110 CHNS-O).

### **Yield Biomass**

After cultivation of *Penicillium* sp. according with the DCC, the metabolic liquid was filtered and the biomass obtained was washed, lyophilized and the yield is expressed in g/L.

### **Pigment extraction**

The extraction of the pigment was carried out according to Shin et al.,<sup>[15]</sup> adapted by increasing the volume of ethanol 95%, from 5 mL to 20 mL when the pigment was in the shaker, then was centrifuged for 10 min, at 12.000 rpm. The supernatant liquid after evaporation, was quantified. The yield of the crude pigment is expressed in g/L.

### **Pigment scanning by wavelength**

The pigment extract was analyzed by scanning in the wavelength region of 400-800 nm using UV-Vis spectrophotometer.<sup>[16]</sup> Samples were made with a diluted sample (1:10). The results were expressed in units of absorbance (UA/mL) at a given wavelength ( $\lambda$ ), multiplied by the dilution factor.

### **Purification of the pigment**

#### *Thin layer chromatography*

The crude pigment was purified by thin layer chromatography, using the method of Mukherjee and Singh,<sup>[17]</sup> modified, by substitution of hexane and ethyl acetate to ethyl acetate.

The result were express by retention factor where  $R_f = \text{Distance travelled by the compound} / \text{Distance travelled by the solvent front}$ .

#### *Column chromatography*

In order to separate and purify the pigment sample, it was carried out column chromatography. In a glass chromatography column, was added 1 cm of anhydrous sodium sulphate, 30 cm of silica gel (60-120 mesh, previously activated for 1 hour in a muffle at 800°C) and concludes with 1 cm over anhydrous sodium sulphate. 120 mL of ethyl acetate was added, then the diluted pigment sample in the same solvent, another 50 mL of ethyl acetate. When all the solvent has passed through the silica column was taken and separated fractions for analyzes by high performance liquid chromatography (HPLC).

#### *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*

To identify the purify pigment, the sample was resuspended in ethyl acetate and analyzed according to Mukherjee and Singh.<sup>[17]</sup> The data were analyzed using Chromatographic column Sunfire, Waters C18, 4.6 x 150 mm, mobile phase of ethyl acetate, flow-rate 0.6 mL min<sup>-1</sup>, and temperature of 30°C. The detection was performed using chromatograms read at a wavelength of 450 nm.

### **Antimicrobial activity**

#### *Pathogenic strains*

The pigment produced was investigate against eight human pathogens: *Staphylococcus aureus* (UCP 1001), *Escherichia coli*(UCP 0989), *Salmonella enterica* (UCP 01595), *Klebsiella pneumonia* (UCP 0962), *Candida albicans* (UCP0993), *Candida pelliculosa* (UCP 0994), *Candida tropicalis* (UCP 0996) and *Candida guilliermondii* (UCP 0992).

#### *Minimum Inhibitory Concentration (MIC)*

The minimum inhibitory concentration of the pigment *Penicillium sclerotiorum* capable of inhibiting the growth of bacteria and fungi was investigated utilizing micro dilution method in 96-well micro plates according with the protocol describe by Clinical Laboratory Standards

Institute. <sup>[18]</sup> The micro plates were examined using resazurin as indicator of growth, where the appearance of pink shows growth of the microorganism and blue indicates growth inhibition. <sup>[19,20]</sup>

### *Disk diffusion*

The ability of the pigment of *Penicillium* sp. inhibits the growth of microorganism pathogens was also investigated by the method disk diffusion test. <sup>[21]</sup> The bacterial suspensions were used after obtaining  $10^7$  CFU/mL on Brain Heart Infusion (BHI) agar medium, followed by application of filter paper disks (6 mm diameter) impregnated with 30  $\mu$ L of the pigment with different concentration (100 $\mu$ g, 200 $\mu$ g, 300 $\mu$ g and 400  $\mu$ g). Disks of vancomycin were used as positive control. The plates were incubated at 37°C during 24 h and the antibacterial activity was measured (mm) after appearance of a clear area. The experiments were performed in triplicate.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Identification and characterization of *Penicillium* sp.**

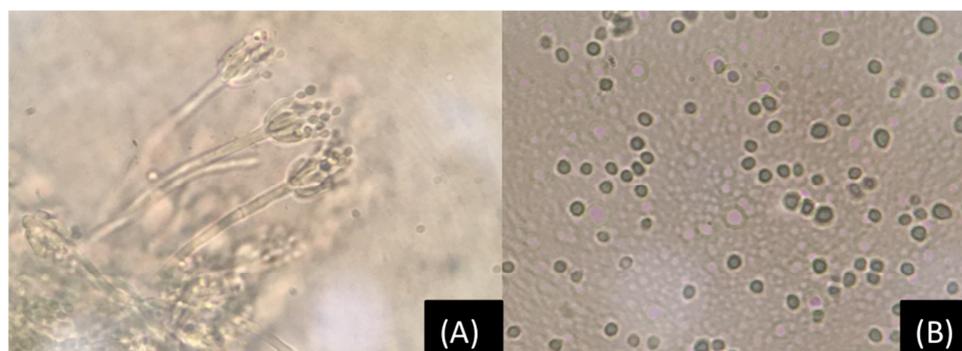
The identification of *Penicillium* sp. was based on the morphological profile (macroscopic and microscopic) and the confirmation was given after molecular identification. According to the macroscopic aspects (Figure 1), the *Penicillium* sp. (UCP 1361) cultivate in Czapek (CYA) at 25°C showed colonies with diameter 30 to 35 mm, white mycelium and grooved, turquoise greyish-conidia, with production of orange exudates. While in Malt extract agar medium (MEA) at 25°C the colonies presented velutine and flaky growth in the centre of the colony, conidia in similar colors to those in CYA. After 21 days of culture in MEA presented sclerotia. In medium glycerol nitrate 25% (G25N), the colonies reached 11 mm diameter, flat and yellow after growth at 25°C. At 37 °C there was no growth of the *Penicillium* sp. in any of the media tested.

**Figure 1:** Macroscopic and microscopic characteristics of *Penicillium sclerotiorum* on CYA, MEA and Glycerol 25%



In addition, by microscopic identification of *Penicillium* sp. in medium CYA (Figure 2) were observed the presence of smooth and thin conidiophores, monoverticillates conidiophores and few metulae. The presence of conidiophores definitely vesicular with diameter of 5-7  $\mu\text{m}$  was observed after growth in CYA medium (Figure 2A). In MEA medium the conidiophores reaching up to 10 $\mu\text{m}$ , phialides ampulliformes 9-12  $\mu\text{m}$ , conidia globose to ellipsoidal sub-measuring between 3.5 to 4.5  $\mu\text{m}$  finely roughened (Figure 2B) presenting some streaks. Therefore, according to the classical taxonomy, based on the morphological characteristics described, the isolated was identified as *Penicillium sclerotiorum* subgenus *Aspergilloides*, section *Aspergilloides*.

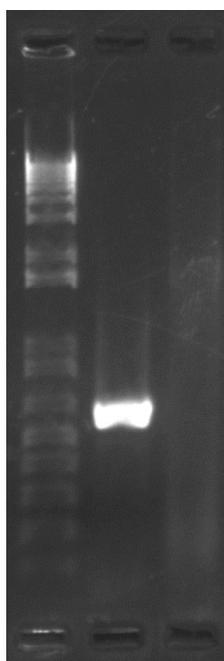
**Figure 2:** (A) Microscopic identification of conidiophores; (B) microscopic identification of spores



### Molecular Identification of *Penicillium* sp. with PCR

In order to confirm the fungal identity, the sequence obtained were compared using BLASTn analysis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), and it was found that the Genbank identities (AY373931.1) matched the sequence obtained with a maximum identity of 99% as a *Penicillium sclerotiorum*, in the molecular analysis using specific primers (ITS1 and ITS4) there was an amplification of 580 bp. (Figure 3). According to Haugland et al. <sup>[22]</sup>, a PCR product with the ITS1/ITS4 primers amplify 603 bp for *Penicillium sclerotirum*.

**Figure 3:** Amplification of *Penicillium sclerotirum* DNA with primer ITS1 and ITS4



### Production of pigment from *Penicillium sclerotiorum* using renewable natural resources

To possible commercialization of a natural pigment is necessary the use of economic process and high yield of pigment. In this context, *Penicillium sclerotiorum* was able to produce 2.23 g/L of pigment extracted from 15.4g/L of biomass in condition 4 of the planning design DCC in medium containing whey (8%) and barley (6%) (Table 2). This result was superior to the obtained by Sardaryan et al. <sup>[23]</sup> that reported a yield of 1.5-2.0 g/L of the Arpink red pigment extracted from *Penicillium oxalicum*.

**Table 2:** Production of Pigment and biomass by *Penicillium sclerotiorum* according to the Delineation Central Composite (DCC)

<b>Sample</b>	<b>Whey (%)</b>	<b>Barley (%)</b>	<b>Biomass (g/L)</b>	<b>Pigment (g/L)</b>
<b>1</b>	4	2	5	0.19
<b>2</b>	8	2	4.8	0.19
<b>3</b>	4	6	13	2.21
<b>4</b>	8	6	15.4	2.23
<b>5</b>	6	6.82	14.2	1.17
<b>6</b>	6	1.18	3.1	0.27
<b>7</b>	8.82	4	9.3	0.38
<b>8</b>	3.18	4	9.8	0.40
<b>9</b>	6	4	9.5	0.47
<b>10</b>	6	4	10.4	0.30
<b>11</b>	6	4	9.2	0.40
<b>12</b>	6	4	9.2	0.42

### **Elementary analyzes of the select medium**

The select medium for pigment production (whey 8% and barley 6%) showed the amount of carbon, hydrogen, nitrogen and sulphur present in Table 3. The data shown a high carbon content (42.56%) followed by nitrogen (6.28%), favouring the C/N ratio of 15:1. These results are in agreement with Pisareva and Kujumdzieva,<sup>[24]</sup> to the affirmed that the maximum production of pigment is influenced by the high carbon content.

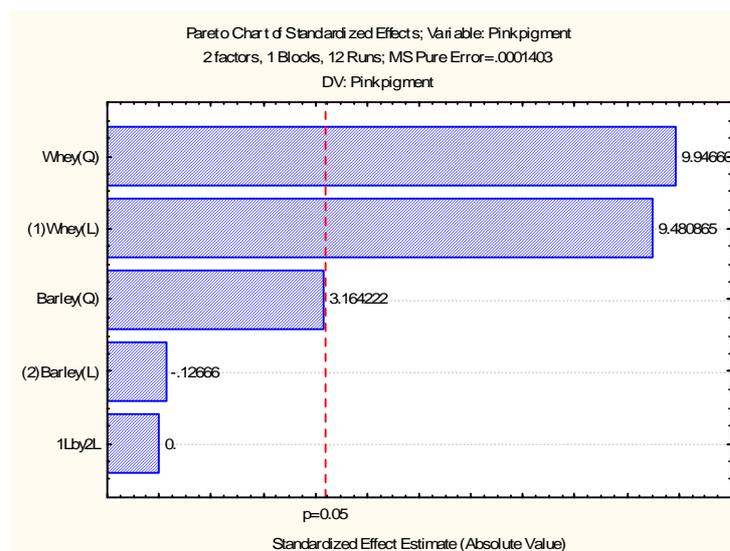
**Table 3:** Percentage of carbon, hydrogen, nitrogen and sulphur present in the composition of selected medium

Carbon (%)	Hydrogen (%)	Nitrogen (%)	Sulphur (%)
42.50	6.20	3.49	0.43

**Influence of whey and barley on pigment production for *Penicillium sclerotiorum* according with Pareto chart**

According to the Pareto chart (Figure 2), with a 95% confidence level, it was observed that the whey, evaluated in linear (L) and quadratic (Q) function, was the most significant independent variable at the statistical point of view favouring the increase of pigment production by *Penicillium sclerotiorum*. While the barley evaluated in quadratic function (Q) showed a significant result at the  $p < 0.05$  level. However the concentrations used did not favour the increase of the pigment production will be necessary future optimization to increase the yield of pigment.

**Figure 4:** Pareto chart to investigated the effects of whey and barley concentrations on pigment production

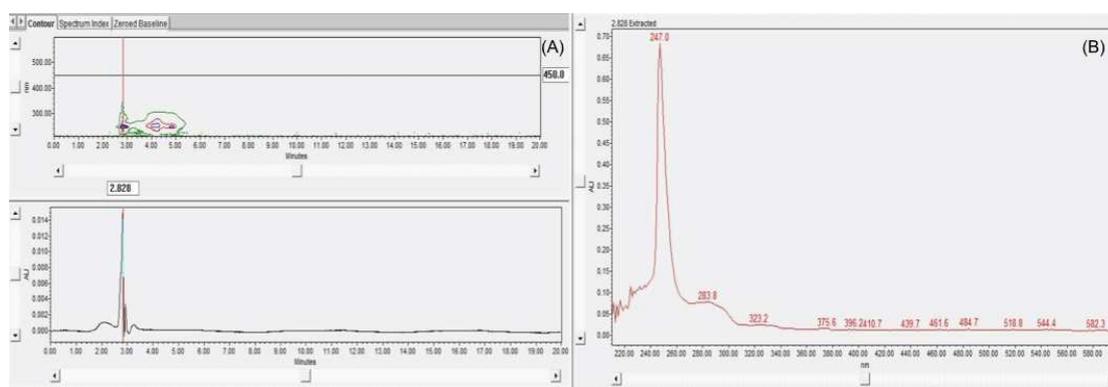


### Identification and purification of a pink pigment produce by *Penicillium sclerotiorum*

To identify and purify the pigment produced by *Penicillium sclerotiorum* in the selected condition of the factorial design DCC (8% whey and 6% barley), the analyzes by visible spectrum, Thin Layer Chromatography (TLC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) were performed. In this study, the pink pigment from *Penicillium sclerotiorum* was read in wavelength of 550 nm (Absorbance 4.49). These data were according with Velmurugan et al.,<sup>[25]</sup> to affirm that the visible range for pink pigment is at wavelength of 550 nm. The TLC analyzes demonstrated the appearance of pink band with  $R_f = 0.961$ . On the other hand, the results obtained by the HPLC showed that the pigment has retention time (RT) of 2.828 (Figure 5A), read at the wavelength of 247 nm as shown the Figure 5B. Regarding other natural pigments produced by fungi, pinks are poorly described in the literature.<sup>[26-28]</sup> However, Mansouri et al.,<sup>[29]</sup> describe the production of a reddish-pink pigment by *Penicillium subrubescens* with RT = 9.34 at wavelength of 255 nm.

According to the literature, there is no record of pink pigment produced by *Penicillium sclerotiorum*, being recorded only production of pigments in the yellow<sup>[30]</sup> and orange<sup>[31]</sup> spectrum.

**Figure 5:** High performance liquid chromatographic (HPLC) of the pink pigment produced by *Penicillium sclerotiorum* in the selected medium: (A) retention time and (B) absorbance scanning



### Antimicrobial potential of the pink pigment produced by *Penicillium sclerotiorum*

The minimal inhibitory activity of the pigment extracted of *Penicillium sclerotiorum* was observed against *Staphylococcus aureus* (120µg), *Escherichia coli* (120µg), *Klebsiella pneumonia* (120µg), and *Candida glabrata* (120µg).

The disk diffusion assay of the pigment produced showed effective action against the gram-negative bacteria *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* as shown the table 4.

**Table 4:** Disk diffusion assay of the pigment

	100 µg	200 µg	300 µg	400 µg	Vancomycin
<i>Salmonella enterica</i>	+	+	++	++	+++
<i>Klebsiella pneumonia</i>	+	+	+	+	+++
<i>Escherichia coli</i>	+++	+++	+++	+++	++

“+++”, “++” and “+” mean good, moderate and very less, respectively

## CONCLUSION

*Penicillium sclerotiorum* demonstrated the ability to produce a natural new pigment from an economic environment consisting of whey and barley. Therefore, this pigment emerges as a sustainable and viable alternative for industrial production due to the high yield and low cost in the production process. In addition, the preliminary results suggest the antimicrobial potential of the pigment indicating its possible application in different industries.

## REFERENCES

- [1] D. A. Soares, R. S. Pimenta, *J. Bioen. Food Sci.* **2015**, 2, 4.
- [2] B. N. Narendrababu, S. Shishupala, *J App Biol Biotech* **2017**, 5, 53.
- [3] L. Morales-Oyervides, J. C. Oliveira, M. J. Sousa-Gallagher, A. Méndez-Zavala, J. C. Montañez, *J. Food Eng.* **2015**, 164, 21.
- [4] P. S. Nigam, J. S. Luke, *Curr. Opin. Food Technol.* **2016**, 7, 93.
- [5] P. Akilandeswari, B. V. Pradeep, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, 100, 1631.
- [6] C. Sanchez, *Biotechnol. Adv* **2009**, 27, 185.
- [7] B. Das, S. Sarkar, A. Sarkar, S. Bhattacharjee, C. Bhattacharjee, *Process Saf. Environ. Prot.* **2016**, 101, 27.
- [8] A. L. McCarthy, Y. C. O'Callaghan, C. O. Piggott, R. J. FitzGerald, N. M. O'Brien, *Proc Nutr Soc.* **2013**, 72, 117.

- [9] G. Konuray, Z. Erginkaya, “Antimicrobial and antioxidant properties of pigments synthesized from microorganisms,” *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*, A. Méndez-Vilas, Ed., Formatex, Adana **2015**, p. 27.
- [10] J. I. Pitt, *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*, 1st edition, Academic Press Inc. Ltd., London **1979**, p. 107.
- [11] J. I. Pitt, R. A. Samson, J. C. Frisvad, *Integration of Modern Taxonomic Methods For Penicillium and Aspergillus Classification*, 1st edition, Harwood Academic Publishers, Amsterdam **2000**, p. 9.
- [12] J. J. Doyle, J. L. Doyle, *Phytochem Bull* **1987**, 19, 11.
- [13] T. J. White, T. Bruns, S. J. W. T. Lee, J. W. Taylor, “Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics,” *PCR protocols: a guide to methods and applications*, M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White, Eds., Academic Press, Inc., New York **1990**, p. 315.
- [14] R. Staden, K. F. Beal, J. K. Bonfield, “The staden package,” *Bioinformatics methods and protocols*, S. Misener, S. A. Krawetz, Eds., Humana Press, Totowa **1999**, p. 115.
- [15] C. S. Shin, H. J. Kim, M. J. Kim, J. Y. Ju, *Biotechnol. Bio eng*, **1998**, 59, 570.
- [16] T. T. You, S. K. Zhou, J. L. Wen, C. Ma, F. Xu, *J. Agric. Food Chem.* **2014**, 62, 1936.
- [17] G. Mukherjee, S. K. Singh, *Process Biochem.* **2011**, 46, 188.
- [18] CLSI. “Manual Clinical and Laboratory Standards Institute,” *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards*, 6th edition, M. A. Wikler, Eds., Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne **2006**.
- [19] J. C. Palomino, A. Martin, M. Camacho, H. Guerra, J. Swings, F. Portaels, *Antimic. Agent. Chemot.* **2002**, 46, 2720.
- [20] H. S. Elshafie, E. Mancini, I. Camele, L. De Martino, V. De Feo. *Ind. Crop. Prod.* **2015**, 66, 11.
- [21] K. R. Fiebelkorn, S. A. Crawford, M. L. McElmeel, J. H. Jorgensen, *J. Clin. Microbiol.* **2003**, 41, 4740.
- [22] R. A. Haugland, M. Varma, L. J. Wymer, S. J. Vesper, *Syst Appl Microbiol* **2004**, 27, 198.

- [23] E. Sardaryan, H. Zihlova, R. Strnad, Z. Cermakova, “ArpinkRed – Meet a New Natural Red Food Colorant of Microbial Origin” *Pigments in Food, More than Colours*, L. Dufossé, Ed., Quimper **2004**, p. 207.
- [24] E. I. Pisareva, A. V. Kujumdzieva, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2010**, 24, 5010.
- [25] P. Velmurugan, S. Kamala-Kannan, V. Balachandar, P. Lakshmana perumalsamy, J. C. Chae, B. T. Oh, *Carbohydr. Polym.* **2010**, 79, 262.
- [26] L. Wang, H. B. Zhou, J. C. Frisvad, R. A. Samson, R. A., *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **2004**, 86, 173.
- [27] R. Panesar, S. Kaur; P. S. Panesar, *Curr. Opin. Food Sci.* **2015**, 1, 70.
- [28] K. Perumal, V. Stalin, S. Chandrasekarenthiran, E. Sumathi, A. Saravanakumar, *Text. Res. J.* **2009**, 79, 1178.
- [29] S. Mansouri, J. Houbraken, R. A. Samson, J. C. Frisvad, M. Christensen, D. E. Tuthill, S. Koutaniemi, A. Hatakka, P. Lankine, *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **2013**, 103, 1343.
- [30] J. dos Reis Celestino, L. E. de Carvalho, M. da Paz Lima, A. M. Lima, M. M. Ogusku, J. V. B. de Souza, *Process Biochem.* **2014**, 49, 569.
- [31] D. C. Gomes, J. A. Takahashi. *Food chem.* **2016**, 210, 355.

**Anexo 2:** Carta de submissão do manuscrito submetido



" Author

! Home # Review [Authoring Dashboard](#) / [Submission Confirmation](#)

# Submission Confirmation

Thank you for your submission

**Submitted to Manuscript ID Title**

**Authors**

**Date Submitted**

The Canadian Journal of Chemical Engineering CJCE-17-0191

Cost effective strategy for natural production of new pink pigment by *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) from renewable resources and its promising antimicrobial activity

Oliveira, Laura Marques, Nathalia Souza, Adriana Silva, Tayane Santiago, Michele Gusmão, Norma Takaki, Galba Maria Silva, Thayse Andrade, Rosileide Okada, Kaoru

02-Mar-2017

SCHOLARONE™  THOMSON REL

### **Anexo 3: Normas da revista a qual o trabalho foi submetido**

#### **Instructions to Authors**

All authors should read the Canadian Society for Chemical Engineering Publication Ethics document. Authors are encouraged to read *Writing a Scientific Paper: From Clutter to Clarity* by Gregory S. Patience et al.

#### **Manuscript Requirements**

The manuscript must be in either English or French, and use Canadian spelling. **It should have been carefully checked for clarity, conciseness, correctness of grammar and spelling, and typographical errors.** The manuscript and all figures and tables must be supplied in electronic format. Please note that *Can. J. Chem. Eng.* follows the International System of Units (SI) and the *Chicago Manual of Style* (16<sup>th</sup> edition), excepting only reference style and Canadian spelling standards. For Canadian spellings, consult the *Canadian Oxford Dictionary*. Standard formal academic language is required; e.g. contractions (“can’t, don’t, wasn’t”), slang, and other casual language are not permitted.

All articles should be submitted in 12 pt Times New Roman font in a single column with 2.5 cm margins. The abstract should be single spaced and the main text should be in 1.5 spacing. Figures and tables should be embedded in the .doc(x) (Microsoft Word) file for the initial submission.

#### **Title Page**

##### **Author names**

Every author’s name must include at least one full (non-initialized) given name.

##### **Affiliation address format**

Name of institute, (parent institute if applicable,) city, province/state/region, (optional postal code,) country

**Example:** The Canadian Journal of Chemical Engineering, Chemical Engineering Society of Canada, Ottawa, ON, Canada

##### **Corresponding author**

Indicate the corresponding author with an asterisk (\*), and provide their email address or other preferred contact information in a footnote on the title page.

##### **Abstract and keywords**

The abstract is to indicate in no more than 250 words (maximum of 2 paragraphs) the scope and principal findings of the work (abstracts are not required for letters). Following the abstract, provide a maximum of 5 keywords or key-phrases (10 words total). Avoid general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, “and,” “of”). Be sparing with abbreviations. These keywords will be used for indexing purposes.

**Example:** “combustion, coal combustion, fluidized bed coal combustion, gas fluidization.”

##### **Graphical abstract**

Visual summary of the main findings of an article. This type of abstract is optional. This image must be created at larger than 300 dpi at larger than 9 cm wide. **A descriptive caption for the graphical abstract is mandatory.**

##### **Main Body of Manuscript**

Appropriate use of headings and subheadings should be made in the main body. All references, tables, and figures should be referred to in the text.

## Headings

Headings must be unnumbered and follow the guidelines below. Any in-text references to the sections must use their titles.

**Example:** "...see the Introduction section for details."

1st level	All capital letters (e.g. MATERIALS AND METHODS)
2nd level	Title case; bold; roman type (e.g. <b>Chemicals and Equipment</b> )
3rd level	Sentence case; italics (e.g. <i>Chemicals used</i> )
4th level	Sentence case; roman type (e.g. Methane and propane)

## Citations

All in-text citations to References sources must be numbered consecutively in the text. **They must be enclosed in square brackets and superscripted, and appear after any punctuation.**

**Examples:** "...as shown by Huglin.<sup>[6]</sup> ...According to Jones et al.,<sup>[7]</sup> ...As seen in the literature,<sup>[2-6,10,11]</sup> ..."

## Chemical names

Chemical compounds are to be named according to the rules established by IUPAC. Positional prefixes are to be printed in italics.

**Example:** "*n*-butane, *n*-C<sub>4</sub>-H<sub>10</sub>."

## Equations

All equations should be numbered using Arabic numerals and correctly punctuated. Refer to equations as "Equation (1)" (not Eq. (1) or Equation 1). Standard statistical formulae, such as t-test or ANOVA equations, should be omitted, as these are common knowledge.

Algebraic fractions in numbered equations (including those in Appendices) are to be printed in the following example styles:

$$\bar{C} = \frac{C_1 - C_0}{C_f - C_0}; \frac{dC}{dt} = k_L a(C^* - C) \quad (1)$$

Use the oblique slash to indicate division only for simple definitions included in a line of text.

**Example:** "...where  $\beta = \cos \theta/\tau$ ;  $dy/dx = (A/x) B$ ."

## Numbers and units

Spaces must be included between number and symbol/unit (e.g. "10 kPa"), with the exception of the lone degree symbol (e.g. "90°"). ± and ~ should not have a following space, but should have a space before. =, <, >, ×, and other operators should have a space on both sides.

- Use the decimal point (.) and not the comma (,) when writing numbers.
- Numbers with 5 or more digits left or right of the decimal require spaces every 3 digits, counting from the decimal point (e.g. "123 000.142 85").
- For all numbers in measurements, equations, or in any technical context, use digits. Do not write out the names of numbers (e.g. "4 g" is correct, not "four grams").
- Percentage signs and similar characters should be dropped where possible to ensure readability (e.g. "5 and 10 %" not "5 % and 10 %").
- "Larger than," "smaller than," or "about/around" in reference to numbers should be replaced with >, <, and ~ symbols where practical.
- Always abbreviate "minutes," "micrograms," etc. to SI symbols when they appear with a definite number. (i.e. only leave them long for e.g. "few minutes").
- The multiplication dot, or interpunct (•), is preferred over the cross (×), except in scientific notation (e.g. × 10<sup>-3</sup>).

- If possible, use numbers between 0.1 and 1000 with the appropriate multiple in reporting data. Thus  $3.1 \times 10^{-8} \text{ s} = 31 \text{ ns}$ . Exception is in a table or figure where the same unit should be used for comparison.

## SI units

The *Système International d'Unités* (SI) must be used for all dimensional quantities. If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI units. Consult the BIPM guide for further information. **Preferred practice is to use the base units** (m, kg, s, K, A, mol, cd) **and their derived units** (N, Pa, J, W, V, rad, sr, etc.) **in the nomenclature and in all equations.**

However, data may be reported in suitable multiples of these units provided the units are clearly stated.

Note that “weight” and “mass” have different technical meanings, and are not interchangeable. Verify that the correct term is being used in each case.

Where different usages of an SI unit exist, the precise meaning can be specified in the text or in parentheses after the unit.

Example: 100 mV (dc), 15 kPa (gauge), 1000 m<sup>3</sup> (STP)

Incorrect: 15 kPag, 1000 stdm<sup>3</sup>

## Complex units

The following requirements apply to units composed of multiple base units (e.g. m/s, W/m<sup>2</sup>•K).

- The product of two units should be indicated by a dot •. Thus m•N = metre newton, mN = millinewton, m•s<sup>-1</sup> = metre per second, ms<sup>-1</sup> = per millisecond.
- Division should be shown using one solidus (/): W/m<sup>2</sup> • K, but not W/m<sup>2</sup>/K.
- At most one prefix should be used, and preferably on a symbol in the numerator (except kg which is a base unit). Thus, V/mm should be kV/m; kJ/g should be MJ/kg.
- Do not use powers of 10 attached to the units, or variable symbols in tables and figures. Thus D, (cm<sup>2</sup>/s) × 10<sup>2</sup> probably means D, mm<sup>2</sup>/s, but confusion can arise.
- Do not mix units where avoidable. Thus power consumption per unit volume flow rate should be W•s/m<sup>3</sup> = J/m<sup>3</sup>, not W•min/m<sup>3</sup>.

## Units not permitted

The only non-SI units permitted are those in Table 6 and Table 7 of the BIPM brochure. Units which are not permitted, and the formulae to convert them to accepted units, appear in Table 8 and Table 9. Permitted non-SI units appear in Sections 5.1 through 5.1.4 of the NIST Guide. Please note that for non-SI units, the values of relevant quantities must be given in terms of SI units first, followed by the non-SI units in parentheses.

**Example:** “0.15 g/g (15 mass%)”

The following are examples of units that are **not** allowed in *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. For more information, please consult the BIPM guide.

Pressure	atm, bar, Torr, psi, mmHg
Amount of substance	g-mole, kg-mole
Length	Angstrom (Å), micron (μ)
Force	dyne, kilogram force (kgf)
Energy	calorie, erg, eV
Concentration	normality (N), molarity (M) (instead use kmol/m <sup>3</sup> or mol/L), ppm
Viscosity	poise, stokes
Mass, volume, or mole %	wt%, mass%, mol%, vol% (instead use g/g, mol/mol, L/L, or m <sup>3</sup> /m <sup>3</sup> as appropriate)
Permeability	darcy

## Spelling, grammar, and punctuation

### Overall style and grammar

A criterion for publication is that the text is clearly written and understandable. Referring to guide books such as the *Chicago Manual of Style*, or having a manuscript professionally edited are both recommended.

### Canadian spelling

*The Canadian Journal of Chemical Engineering* requires that submitting authors use Canadian spelling. Below is a list of common words with Canadian spelling (required) on the left and the American or British spelling on the right.

Canadian	American or British
<b>analyze</b>	analyse
<b>behaviour</b>	behavior
<b>centre</b>	center
<b>fibre</b>	fiber
<b>-ization</b>	-isation
<b>modelling, modelled</b>	modeling, modeled
<b>mould</b>	mold
<b>sulphur, sulphate</b>	sulfur, sulfate
<b>vapour</b>	vapor

### Punctuation

- 1 The Oxford comma is required. This is a comma before the final item in a list of 3 or more items (e.g. “carbon, nitrogen, and helium”). This comma should also be placed in lists where the final conjunction is “or.”
- 2 When using quotation marks, keep to the *Canadian Press* standard, which is to include all punctuation within closing quotation marks (e.g. “the gas showed similar properties.”)
- 3 Parentheses: Throughout the text, use only round brackets, “()”, and avoid using square brackets “[ ]” (reserved for citations). When using nested parentheses, only using round brackets is recommended (e.g. “(measurement of volume (v))”).
- 4 En dashes (–) indicate ranges between numbers and between subfigures, while hyphens (-) show a relationship between two words. Em dashes (—) create a parenthetical aside, and should only rarely be used.

### Formal style

- 1 Referential abbreviations: Always use the full words “Figure, Table, Equation” when referring to these items. Abbreviated forms “Fig., Tab., Eq.” are incorrect.
- 2 Conjunctions at the beginning of sentences such as *And, But, Or, So* are overly informal. Instead, transitions such as *Therefore, However, Thus*, etc. are recommended.
- 3 Contractions such as *it’s, can’t, wasn’t*, etc. should be replaced with the full terms.
- 4 Avoid subjective words like *good* or *bad* in the text. Instead, use descriptive adjectives to directly explain the situation in quantitative terms.
- 5 Informal language: Refrain from using informal or non-standard forms of words (e.g. “till” is an incorrect substitution for “until”).

### Equations

- 1 Introducing equations: Equations should be introduced with full sentences ending with a colon. Instead of incomplete, ungrammatical sentence fragments such as “this can be seen as:” or “we can find this by:” adding “as follows:” or “the following:” is recommended (e.g. “this can be seen as follows,” “we can find this by the following:”).
- 2 When listing the definitions of terms or symbols after an equation, begin with “where” and leave it uncapitalized and unindented (e.g. “where N is Avogadro’s number”).

### Latin terms

- 1 Commonly used Latin words or abbreviations (et al., in situ, i.e., e.g., etc.) are not italicized in text.
- 2 “Versus” is always written as a whole word and never reduced to “vs.”

### Figures and Tables

Image and table placement is determined during typesetting, therefore “insert table/figure here” notes are unnecessary. Figure and table captions should be listed at the end of the manuscript on a separate page titled “Figure Captions,” or uploaded as a separate document.

### Tables

Tables are to be numbered in Arabic numerals and have a brief descriptive title/caption at the top of each table. This title must not end in any punctuation, and should be in sentence case. Column headings should be brief and include the units of the item(s) listed. These units should be enclosed in parentheses (not after a slash or in square brackets).

When citing works in a table, bare citations are not permitted. Authors’ names must be included (e.g. “Smith et al.<sup>[6]</sup>” is correct; “[6]” alone is incorrect).

### Figures

Figures should not duplicate results given in tables. All figures should be numbered with Arabic numerals. Refer to figures as “Figure 1,” not “Fig. 1.” Figure captions must end in a period, and should be limited to basic descriptions of the figures, rather than lengthy interpretations and discussions.

Subfigures should be indicated throughout the text with lowercase letters directly after the figure number and with no spacing (e.g. “Figure 1b”). When citing multiple subfigures from the same figure, the following form is recommended: “Figures 1b–c.”

### Image files

Electronic files must be provided for all figures/images, and should be clearly named (e.g. “Figure 1.eps”). Vector based figures (i.e. figures created in Adobe Illustrator) are recommended, and these should be submitted in .eps format. Alternatively, figures can be created in .tif format at larger than 9 cm wide and 300 dpi. Please note that we cannot print your manuscript without clear image files.

Colour figures must be submitted in CMYK. Please do not submit colour figures as RGB.

Please do not submit figures in any of the following formats: JPG, GIF, PSD, CRD, PCT, PDF, BMP, 1-2-3 (or other) Lotus Formats.

### Colour illustrations

All colour figures will be reproduced in full colour in the online edition of the Journal at no cost to authors. Authors are requested to pay the cost of reproducing colour figures in print. Authors are encouraged to submit colour illustrations that convey essential scientific information. For best reproduction, bright, clear colours should be used. Place colour images against a white background wherever possible.

### Nomenclature

An alphabetical/numerical list of all symbols used in the paper (including symbols used in tables, figures, and appendices) may be provided on separate pages following the main body. Chemical names and units (e.g. “NaCl,” “ $\mu\text{m}$ ”) should not appear in the Nomenclature, as they are common knowledge.

List Greek letter symbols alphabetically immediately after the list of Roman symbols in a separate subsection entitled “Greek Letters.” Definitions are to be provided for all listed symbols, and SI units are to be listed enclosed in parentheses after the definition, where

applicable. List the **base** units of the symbols, even if other multiples are used in reporting data.

#### Example

$\rho$	density (kg/m <sup>3</sup> )
$T$	temperature (°C)
$P$	pressure (Pa)

#### References

References to literature must be numbered consecutively in the text. They must be enclosed in square brackets and superscripted, and appear **after** sentence punctuation. Use of DOI is highly encouraged. Unpublished results and personal communications are not recommended in the Reference list.

**Examples:** "...as shown by Huglin.<sup>[6]</sup> ... According to Jones et al.,<sup>[7]</sup> ... As seen in the literature,<sup>[2-6,10,11]</sup> ..."

For the "References" section after the main text, please use the following examples as a guide. All examples demonstrate the minimum acceptable information for each reference type.

All authors of a work must be listed, except in rare cases with over 20 authors. Sources which are "submitted" or "accepted" but not yet published, or which do not yet have a DOI, cannot be cited except as a website source.

#### Journals

Initials. Author Surname, *Abbreviated Journal Title* **year**, *volume number*, page number of first page.

Example: H. R. Kricheldorf, A. Stricker, *Macromol. Chem. Phys.* **1999**, *200*, 1726.

#### Books

Initials. Author Surname, *Book Title*, Edition number, Publisher, City of Publication **year**, page number.

Example: G. Wegner, K. Müllen, *Electronic Materials: The Oligomer Approach*, 1st edition, Wiley-VCH, Weinheim **1998**, p. 189.

#### Edited books

Author Surname, "Chapter/article title," *Book Title*, Edition number, Initial. Editor Surname, Eds., Publisher, City of Publication **year**, page number.

Example: F. R. Keen, B. P. Sullivan, "Mechanism of the Electrochemical Reduction of Carbon Dioxide Catalyzed by Transition Metal Complexes," *Electrochemical and Electrocatalytic Reactions of Carbon Dioxide*, B. P. Sullivan, K. Krist, H. E. Guard, Eds., Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam **1993**, p. 118.

#### Patents

Country code (for abbreviations: see "CASSI"), number (**registration year**), holder, inventor(s).

Example: Ger. 838217 (**1952**), Farbenfabriken Bayer AG, invs.: W. Lehmann, H. Rinke.

#### Theses

Initial. Author Surname, *Thesis title*, Type of degree, University name, City of publication **year**, page number.

Example: F. G. Kieviet, *Modeling Quality in Spray Dryer*, PhD thesis, Eindhoven University of Technology, Eindhoven, the Netherlands **1997**, p. 29.

#### Website

Initial. Author Surname, "Page title," *Website name*, **year published or updated**, accessed on day month year, url.

Oliveira, L. T. Produção simultânea de biossurfactantes e pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* (UCP 1361) a partir de resíduos da agroindústria

Example: R. Lowry, "Concepts and Applications of Inferential Statistics," *VassarStats*, **2013**, accessed on 6 September 2013, <http://vassarstats.net/>

### Conference

Initial. Author Surname, "Paper title," *Conference name*, host organization, conference city, day(s) month **year**.

Example: M. Liu, A. Andrianov, W. R. Rossen, "Sweep Efficiency in CO<sub>2</sub> Foam Simulations With Oil," *SPE EUROPEC/EAGE Annual Conference and Exhibition*, Society of Petroleum Engineers, Vienna, 23–26 May **2011**.

### Software

Name of software, version/release number, publisher, city **year** of release, URL.

Example: ANSYS Fluent, 17.2, ANSYS, Canonsburg **2016**, <http://www.ansys.com/products/fluids/ansys-fluent>.

### Newspaper article

Author, "Title of article," *Name of newspaper*, city, day month **year** of publication, URL.

Example: M. Marchione, "It's all good: Any exercise cuts risk of death, study finds," *Ottawa Citizen*, Ottawa, 9 January **2017**,

<http://www.ottawacitizen.com/health/good+exercise+cuts+risk+death+study+finds/12669534/story.html>.

### Government report

Authors, *Title of report*, Report number, Full name of sponsoring/organizing government department, City **year**, URL.

Example: Canadian Department of Finance, *Debt Management Report: 2015–2016*, F1-33E-PDF, Canadian Department of Finance, Ottawa **2017**, <http://www.fin.gc.ca/dtman/2015-2016/pdf/dmr-rgd16-eng.pdf>.

### Supplementary material

Tables of data, figures, and long derivations, etc. that are not considered to be essential for understanding the text will be filed with the Depository for Unpublished Data, CISTI, National Research Council Canada, Ottawa, Ontario, K1A 0S2, Canada.

### Submitting a Paper – Online Procedure

#### Instructions to Authors

All authors should read the Canadian Society for Chemical Engineering Publication Ethics document.

Authors are encouraged to read *Writing a Scientific Paper: From Clutter to Clarity* by Gregory S. Patience et al.

#### Submission of Manuscripts

Please note that manuscript submission is online only. To submit your manuscript please visit the ScholarOne website. To monitor the progress of your manuscript throughout the review process, login periodically and check your Author Dashboard.

Online help is available to you at all times during the process. You are also able to exit/re-enter at any stage before finally submitting your work. All submissions are kept strictly confidential. If you have any questions, do not hesitate to contact support.

All correspondence should be addressed to the Editor-in-Chief:

Joao B. P. Soares

University of Alberta

Edmonton, AB, Canada

E-mail: [jsoares@ualberta.ca](mailto:jsoares@ualberta.ca)

### **iThenticate Plagiarism Software**

Any article may be screened using this plagiarism prevention software at any stage of submission to ensure the overall similarity index is low. Submissions with a high similarity index may be returned to be rewritten, or rejected.

### **ScholarOne Submission Process**

#### **Step 1**

When choosing the “Special Issue Article” designation, clearly state the topic, conference, or event associated with the Special Issue. The guest editor for the Special Issue, who issued invitations, can provide clarification on the topic or event.

Several manuscript types are available:

- 1 **Article:** a full-length paper describing a new theory, or significant and substantial new results in any of the areas identified above.
- 2 **Letters:** two types:
  - 1 from authors, correcting or briefly elaborating on a paper previously published in the Journal;
  - 2 from others, commenting on material previously published in *The Canadian Journal of Chemical Engineering*.
- 3 Normally, these will be sent to the authors of the prior publication for their response before publication.
- 4 **Note:** describes the results of a short but complete study, or describes new or significantly improved experimental methods or devices.
- 5 **Review article:** normally by invitation. Authors wishing to submit a critical review should consult the Editor-in-Chief, in advance.
- 6 **Special Issue article:** by invitation only.
- 7 **Special Series article:** organized and invited by guest editors in different areas of expertise.
- 8 **Award Paper:** by invitation only.

#### **Step 2**

A maximum of 10 words is permitted in the keywords. These should match any keywords listed in the manuscript.

#### **Step 3**

The initial submission must list the full names of all authors and co-authors.

#### **Step 4**

Authors are required to suggest names (with complete mailing addresses) of three or four qualified reviewers for the manuscript, but the selection of the reviewers will be the responsibility of the Editor-in-Chief/Associate Editors. Suggested reviewers must not be at the same institution as any of the authors, to avoid conflict of interest. They must not have read the manuscript before.

#### **Step 5**

**A cover letter is mandatory.** The Corresponding Author should include a Cover Letter to the Editor-in-Chief that provides a short statement about the paper, whom it should primarily interest, and attest that the work is original and not published elsewhere.

#### **Step 6**

For initial submission of Word documents, we ask authors to embed figures and tables in the manuscript for ease of reading and review. Carefully following all formatting and submission instructions expedites the review of articles.

If the article is accepted, all figures and tables must be extracted into separate files, in order to undergo typesetting. At this time all highlighting must be removed from the text, and any

coloured text changed to black.

A compiled PDF for all LaTeX submissions is mandatory, and can be uploaded as a second “Main Document.”

When text, tables, and figures are uploaded individually, after the review stage, please use the following categories to indicate the type of the file. Text and tables should be saved as DOC (Microsoft Word) or RTF formats.

- 1 **Manuscript’s Most Relevant Contributions:** A file containing the manuscript’s most relevant contributions or research highlights is required upon submitting an article. This file contains a bullet point list of the most important highlights, contributions, or core findings of the article, and should be under 1 page long. Please include 3 to 5 bullet points (85 characters, including spaces, per bullet point is recommended). (MANDATORY)
- 2 **Main Document:** The main content of a manuscript. (MANDATORY)
- 3 **Figure:** An image file that depicts a graph, chart, drawing or photograph.
- 4 **Table:** A table, including its caption and number (e.g. “Table 1”).
- 5 **Supplementary Files for Review and online publication only:** Material which would not be printed in the hard copy but would appear in the online version only, such as extensive data sets or video files.
- 6 **Additional Files for Review but NOT for publication:** Files not intended for publication in any format but that provide valuable background or reference information, that are suitable for peer review.
- 7 **Additional Files NOT for Review and NOT for publication:** Files not intended for publication in any format, but provide valuable background or reference information. These are not suitable for peer review.
- 8 **TeX/LaTeX Supplementary File:** Any file that is part of a TeX/LaTeX document. *Note:* The main body of the TeX/LaTeX document (i.e. a file ending with “.tex”) should be designated as a Main Document. All files *referenced* by a main TeX/LaTeX document should be designated as a TeX/LaTeX Suppl File (including other “.tex” files).

### TeX/LaTeX Submissions

Directory structures should not be used when referencing external files. Upload a PDF version of your manuscript for initial review. Once a manuscript has been accepted for publication, upload the TeX document, all graphics as separate files, any class files, any bibliography files, and the PDF of the final version.

When uploading a LaTeX main document, the system will analyze the file to determine what additional resource files (such as image files and bibliographic files) are necessary to complete the document. **For all revisions during the review and publication process, the compiled PDF of the LaTeX file must be provided** (“Main Document” is the recommended file designation).

The LaTeX conversion process only allows images to be provided as .eps files.

A ‘Processing Log’ will be provided which constitutes a record of the conversion process. This is to help identify and correct any errors in the LaTeX document. Authors must view the HTML proof of the manuscript, where the link to the LaTeX document will open the PDF proof. This is necessary to ensure all formulas and other special formatting are rendered correctly.

Files uploaded as LaTeX Supplementary Files will not be viewable as individual files in the HTML proof and will not be rendered independently of the entire LaTeX document. Therefore, images and other content will show up in the PDF proof at the location specified in the LaTeX document. In addition, captions for images displayed within a LaTeX proof must be created in the LaTeX document, since image proofs cannot be created separately.