

Extração e identificação de pigmentos produzidos pelos isolados fúngicos JUSOLTH028, JUBES013 E JULAR007

RESUMO

Ana Luisa de Almeida Trzeciak
analu_trz@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Londrina, PR, Brasil

Robert Frans Huibert Dekker
xylanase@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Londrina, PR, Brasil

Juliana Feijó de Souza Daniel
julianasouza@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, Londrina, PR, Brasil

OBJETIVO: Conservar fungos com potencial de pigmentação e, assim, possibilitar a seleção de cepas que visualmente melhor pigmentaram para posterior extração em meio sólido e líquido. Além de, caracterizar os fungos por meio da técnica do microcultivo e da análise macroscópica. **MÉTODOS:** As técnicas escolhidas para conservação dos microrganismos foram: repicagem, óleo mineral e Castellani. Três fungos foram escolhidos por meio de seleção visual, repicados e inoculados em seis placas de Petri por isolado. Posteriormente ao tempo de pigmentação, os isolados fúngicos foram imersos em acetato de etila em triplicata, seguido pela imersão em metanol uma única vez, e evaporados por rotavapor. Por sua vez, a extração líquida consistiu no cultivo em dois tipos de meio: BDL e Czapeck. A possível caracterização se deu por micrografia eletrônica. **RESULTADOS:** As micrografias eletrônicas e análise macroscópica caracterizaram como possíveis gêneros: *Curvelaria*, *Phytomyces* e *Alternaria* respectivos aos fungos JUSOLTH028, JUBES013 e JULAR007. A massa dos extratos provenientes do meio sólido, contendo pigmento dos fungos selecionados, foram de 87,23 mg acetato de etila e 195,8 mg em metanol. Uma substância produzida pelo fungo JULAR007 foi evidenciada por TLC e apresentou fator de retenção de 0,5 quando eluída por 4,6 mL de clorofórmio e 0,4 mL de metanol. **CONCLUSÕES:** Esses resultados indicam uma produção de pigmentos satisfatória e incentivam a continuação do estudo em meio líquido para a identificação dos pigmentos.

PALAVRAS-CHAVE: Produtos naturais. Conservação. *Alternaria*. *Curvelaria*. *Pithomyces*.

1. INTRODUÇÃO

O setor industrial que, representa grande parte do PIB brasileiro e a economia do país, está em constante busca por novos produtos com uma rota menos custosa e com menor impacto ambiental [1]. Uma vez que esse dois fatores afetam respectivamente a produtividade e a qualidade do seu produto. Desse modo, os pigmentos fúngicos apresentam grande potencial para se tornar matéria prima em grandes áreas industriais, como a alimentícia, têxtil, farmacológica e de corantes, já que são matérias primas de baixo custo e ecologicamente amigáveis. [2]

Os pigmentos oriundos de fungos passam a ser economicamente viáveis, já que apresentam um cultivo em larga escala facilmente controlável; destinos já conhecidos em ramos específicos de indústrias, como o de produtos bioquímicos [3]. Além de propriedades biológicas importantes como: ação antibacteriana, antifúngica e herbicida. O Brasil apresenta uma variedade enorme de fungos devido a sua extensa área verde, principalmente na região Amazônica.

Assim, este trabalho se propõe a conservar os fungos da micoteca QuiMiBio – UTFPR Londrina, possibilitando a seleção visual de fungos com potencial de pigmentação e sua conservação. Posteriormente, os fungos tiveram seus pigmentos extraídos por dois métodos: sólido e líquido.

2. METODOLOGIA:

2.1 CONSERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS:

A conservação dos fungos pertencentes a micoteca QuiMiBio foi realizada por meio de três métodos: repicagem periódica, tubos com óleo mineral e Castellani. A repicagem consiste na transferência periódica dos fungos que crescem em meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) para novos meios em placas de Petri. A inoculação é realizada dentro do fluxo laminar, onde se é gerado um ambiente estéril, e a transferência se dá por meio de uma alça previamente flambada no bico de Bunsen. A repicagem garante a conservação dos fungos à curto prazo. [5]

O óleo mineral, segundo método utilizado, consiste na multiplicação dos fungos em meio de cultura dentro de frascos como os tubos de ensaio que, em seguida, é coberto com óleo mineral previamente esterilizado. Esta técnica garante a conservação à médio prazo dos microrganismos. Por sua vez, a técnica Castellani consiste em colocar colônias puras dentro de pequenos frascos contendo 4 mL de água destilada previamente esterilizada. Em seguida, é identificada, fechada com tampa de borracha e mantida a temperatura ambiente. O Castellani garante a conservação a longo prazo. [5][6]

Após a conservação, selecionou-se visualmente três isolados fúngicos que apresentaram ótima pigmentação denominados como JUSOLTH028 (isolado do solo), JULAR0070 (isolado da lagarta) e JUBES013 (isolado do besouro).

2.2 CULTIVO E EXTRAÇÃO EM MEIO SÓLIDO:

Os fungos selecionados com alto potencial de pigmentação foram conservados por meio da repicagem em BDA. Desse grupo, três cepas foram selecionadas visualmente e inoculadas em seis placas de Petri cada contendo meio BDA. Após o período de incubação de 20 dias em BOD a 28°C, as placas com os isolados foram cortadas em pequenos pedaços de 0,5 cm² e, colocadas em Erlenmeyer 500 mL contendo acetato de etila por 24 horas. Filtrou-se a mistura a vácuo e o sobrenadante foi evaporado por rotavapor. O experimento foi realizado em triplicata e uma vez utilizando-se como solvente o metanol.

2.2 CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO:

As três cepas selecionadas foram repicadas e incubadas por 7 dias em BOD a 28°C. Após a incubação, cada isolado foi cultivado em 1 Erlenmeyer contendo 125 mL de meio BDL (batata, dextrose e extrato de levedura) e 1 Erlenmeyer contendo 125 mL de meio Czapeck (sacarose, NaNO₃, KH₂PO₄, MgSO₄ e FeSO₄). Os frascos e mais 4 Erlenmeyer 250 mL, 2 contendo 62,5 mL do meio BDL e 2 contendo a mesma quantidade de meio Czapeck, foram incubados em mesa agitadora a 160 rpm por 14 dias a temperatura ambiente.

2.3 ANÁLISE POR TLC:

A cromatografia em camada delgada se baseia na diferença de afinidade dos componentes de uma mistura pela fase estacionária. O parâmetro mais importante a ser considerado em CCD é o fator de retenção (R_f), o qual é a razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel. Os valores ideais para R_f estão entre 0,4 e 0,6. [4]

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

3.1 FUNGOS CONSERVADOS:

Obteve-se um total de 32 fungos pigmentadores conservados.

3.2 ANÁLISE POR TLC:

A análise do perfil das substâncias por cromatografia em camada delgada (TLC) do isolado JULAR007 apresentou fator de retenção de 0,5 quando eluída por 4,6 mL de clorofórmio e 0,4 mL de metanol.

3.3 ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA:

Por sua vez, a análise microscópica dos fungos selecionados, JUSOLTH028, JUBES013, e JULAR007 indicou *Curvelaria*, *Pithomyces* e *Alternaria* como prováveis gêneros, respectivamente. A possível classificação se deu por características morfológicas dos esporos semelhantes as dos respectivos gêneros encontrados na literatura.

Figura 1 – Imagens obtidas por microscópio

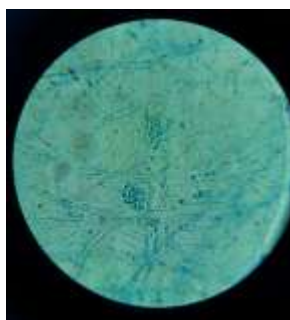


Figura 1 – Micrografia eletrônica JUSOLTH028



Figura 2 – Micrografia eletrônica JULAR007

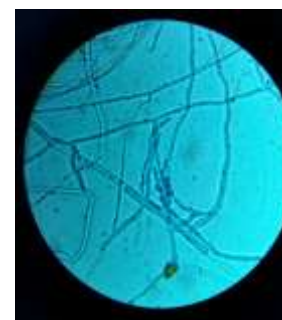


Figura 3 – Micrografia eletrônica JUBES01

Fonte: Autoria própria.

3.4 RESULTADO DAS AMOSTRAS EXTRAÍDAS EM MEIO SÓLIDO:

Cada isolado fúngico contido em pequenos frascos teve sua massa pesada com o auxílio de uma balança analítica resultando na seguinte tabela:

Tabela 1 – Tabela referente à massa dos extratos contendo pigmentos

Fungos	Acetato de etila (mg)	Metanol (mg)
JUSOLTH028	38,6	331,4
JULAR007	122,2	141,7
JUBES013	100,9	114,3

Fonte: Autoria própria (2017)

A massa encontrada com o metanol possivelmente é maior pelo fato deste reter umidade devido suas interações com a molécula de água.

Os resultados até o presente momento, que consta com a extração em meio líquido em andamento, vão ao encontro dos objetivos e garante que o projeto conte com perspectivas futuras. Essas, por sua vez, são a de dar continuidade a extração líquida dos três isolados e quantificar a massa de cada pigmento extraído. Também, será possível a comparação e análise de possíveis mudanças na pigmentação com a variação do pH em meio líquido. Além disso, as substâncias orgânicas podem ser evidenciadas por TLC e, por fim, o pigmento pode ter sua estrutura elucidada por espectrometria de massa e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C . Com isso, haverá um material suficiente para que o pigmento possa ser estudado a fim de dar um destino prático e economicamente interessante.

4. CONCLUSÃO

O trabalho obteve seu êxito com a extração dos pigmentos por alcançar seus objetivos prévios e, assim, estimula o projeto a avançar e crescer. Dentre os três pigmentos é possível que um seja escolhido para que se analise analiticamente sua molécula pelo CLAE, posteriormente, por espectrometria de massa e RMN evidenciando sua estrutura molecular. Sendo assim, é possível que o pigmento encontre aplicação prática em indústrias para que novos produtos surjam e estejam a disposição da sociedade.

Extraction and identification of pigments produced by fungal isolates JUSOLTH028, JUBES013 E JULAR007

ABSTRACT

OBJECTIVE: To preserve fungi with pigmentation potential and, thus, to allow the selection of strains that visually better pigmented for subsequent extraction in solid and liquid media. Besides, to characterize the fungi through the technique of microculture and macroscopic analysis. **METHODS:** The techniques chosen for the conservation of microorganisms were: reinoculated, mineral oil and Castellani. Three fungi were selected by visual selection, peeled and inoculated in six Petri dishes per isolate. Subsequent to the pigmentation time, the fungal isolates were immersed in ethyl acetate in triplicate, followed by immersion in methanol once, and rotary evaporation. In turn, the net extraction consisted of cultivation in two types of medium: PDY and Czapeck. The possible characterization was by electronic micrography. **RESULTS:** Electron micrographs and macroscopic analysis characterized as possible genera: Curvelaria, Phytomyces and Alternaria, respectively, to fungi JUSOLTH028, JUBES013 and JULAR007. The mass of extracts from the solid medium, containing pigment of selected fungi, was 87.23 mg ethyl acetate and 195.8 mg methanol. A substance produced by the fungus JULAR007 was evidenced by TLC and had a retention factor of 0.5 when eluted by 4.6 mL of chloroform and 0.4 mL of methanol. **CONCLUSIONS:** These results indicate a satisfactory pigment production and encourage the continuation of the study in a liquid medium for the identification of the pigments.

KEYWORDS: Natural products. Conservation. Alternaria. Curvelaria. Pithomyces.

REFERÊNCIAS

- [1] MAJID, A.; FAKHRI, S.; SEYED, A.; FARIDEH, T.; & ZARIN, E.; Investigating the influence of pH, temperature and agitation speed on yellow pigment production by *Penicillium aculeatum* ATCC 10409. **Natural Product Research**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25566679>. Acesso em: 21 ago. 2017.
- [2] DURÁN, N.; TEIXEIRA, F. S. M.; CONTI, R. A & ESPOSITO, E. **Ecological-Friendly Pigments From Fungi**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11837241> Acesso em: 21 ago. 2017.
- [3] RAVINDER, H. K.; THAKOR, R. P.; MARTIN, M. A. **An overview of pigment production in biological systems: Functions, biosynthesis, and applications in food industry**. *Food Reviews International*. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/87559129409540985> Acesso em: 21 ago. 2017.
- [4] CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G.; VIEIRA, P.C. **Cromatografia um breve ensaio**. Universidade Federal de Minas Gerais. Disponível em: http://zeus.qui.ufmg.br/~valmir/Artigo_Cromatografia.pdf. Acesso em: 21 ago. 2017.
- [5] BUENO, J.C. **Métodos de preservação para fungos fitopatogênicos habitantes do solo**. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Disponível em: <http://www.aptaregional.sp.gov.br/acesse-os-artigos-pesquisa-e-tecnologia/edicao-2006/2006-julho-dezembro/400-metodos-de-preservacao-para-fungos-fitopatogenicos-habitantes-do-solo/file.html>.
- [6] DIOGO, H.C.; SARPIERI, A.; PIRES, M.C. **Fungi preservation in distilled water**. São Paulo: Editorial Council, 2005. p. 591-594.

Recebido: 31 ago. 2017.

Aprovado: 02 out. 2017.

Como citar:

TRZECIAK, A. L. A. et.al. Extração e identificação de pigmentos produzidos pelos isolados fúngicos JUSOLTH028, JUBES013 E JULAR007. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 22., 2017, Londrina. **Anais eletrônicos...** Londrina: UTFPR, 2017. Disponível em: <<https://eventos.utfpr.edu.br/sicite/sicite2017/index>>. Acesso em: 2017.

Correspondência:

Ana Luisa de Almeida Trzeciak
Avenida dos Pioneiros, 3131, Londrina, Paraná, Brasil.

Direito autoral:

Este resumo expandido está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição-Não Comercial 4.0 Internacional.

