

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA

MARÍLIA APARECIDA FIDELIS E MOURA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS E ESTUDO DA BIOMASSA DE
Penicillium sclerotiorum EM MEIOS DE CULTURA COM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES**

Belo Horizonte
2016

MARÍLIA APARECIDA FIDELIS E MOURA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS E ESTUDO DA BIOMASSA DE
Penicillium sclerotiorum EM MEIOS DE CULTURA COM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi

Belo Horizonte
2016

P929a Moura, Marília Aparecida Fidelis e.
Avaliação da produção de micotoxinas e estudo da
biomassa de *Penicillium sclerotiorum* em meios de cultura
com diferentes concentrações de nutrientes / Marília
Aparecida Fidelis e Moura. – 2016.
90 f. : il.

Orientadora: Jacqueline Aparecida Takahashi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciência de Alimentos.

1. *Penicillium sclerotiorum* – Teses. 2. Micotoxinas –
Teses. 3. Esclerotiorina – Teses. 4. Biomassa – Teses. 5.
Alimentos – Indústria – Teses. 6. Fungos – Teses. I.
Takahashi, Jacqueline Aparecida. II. Universidade Federal
de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 664.06



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

PPGCA

FOLHA DE APROVAÇÃO


AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS E ESTUDO DA BIOMASSA DE *Penicillium sclerotiorum* EM MEIOS DE CULTURA COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES

MARÍLIA APARECIDA FIDELIS E MOURA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIA DE ALIMENTOS, área de concentração CIÊNCIA DE ALIMENTOS.

Aprovada em 30 de setembro de 2016, pela banca constituída pelos membros:


Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi - Orientadora
Instituto de Ciências Exatas - UFMG


Profa. Dra. Raquel Linhares Bello de Araújo
Faculdade de Farmácia - UFMG


Profa. Dra. Flávia Augusta Guilherme Gonçalves
Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais - CEFETMG

Belo Horizonte, 30 de setembro de 2016.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Jacqueline Takahashi, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios do Departamento de Química e pela excelente orientação.

Às Profas. Dras. Scheilla Vitorino, Raquel Linhares e Renata Labanca, por permitirem a utilização do Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia e à Ronália Alvarenga pela ajuda preciosa com as análises.

À Profa. Dra. Luiza de Marilac Dolabella, por permitir a utilização do Laboratório de Química Analítica do Departamento de Química.

À química Mirra Neres e à Dra. Vanny Ferraz, do Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química, pelas sugestões e apoio técnico nas análises.

Ao pesquisador Fabiano Paschoal, do Laboratório de Micotoxinas da Fundação Ezequiel Dias, pela gentileza em colaborar com o experimento.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios do Departamento de Química, por generosamente somarem seus conhecimentos aos meus.

Aos membros da banca examinadora Profa. Dra. Raquel Linhares Bello de Araújo e Profa. Dra. Flávia Augusta Guilherme Gonçalves, pelas relevantes considerações sobre o trabalho.

Aos órgãos de fomento à pesquisa CNPq e FAPEMIG, pelo apoio financeiro ao projeto.

Aos meus pais, por me encorajarem nos estudos desde que me entendo por gente.

“A teoria sem a prática vira ‘verbalismo’, assim como a prática sem teoria vira ativismo. No entanto, quando se une a prática com a teoria tem-se a práxis, a ação criadora e modificadora da realidade”.

(Paulo Freire)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Aspectos gerais dos fungos	17
2.2 O papel dos fungos na biotecnologia	18
2.3 Fungos filamentosos na indústria de alimentos.....	21
2.4 Segurança alimentar e nutricional	23
2.5 Micotoxinas	24
2.6 <i>P. sclerotiorum</i>	30
2.7 Abordagem OSMAC.....	31
3. OBJETIVOS.....	32
3.1 Objetivo geral	32
3.2 Objetivos específicos	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Obtenção do fungo.....	33
4.2 Cultivo do fungo	33
4.2.1 Preparo dos meios de cultura.....	33
4.2.2 Preparo da suspensão de esporos.....	35
4.2.3 Contagem e inoculação de esporos	35
4.3 Filtração da biomassa e extração do caldo fermentado	35
4.4 Obtenção dos perfis cromatográficos	37
4.5 Quantificação de esclerotiorina	37
4.6 Pesquisa de micotoxinas.....	38
4.6.1 Avaliação da presença de ocratoxina A por UPLC-MS/MS.....	38
4.6.2 Avaliação da presença de ácido ciclopiazônico, ácido penicílico, citrinina, patulina e ocratoxinas A e B por espectrometria de massas.....	38
4.7 Estudo das biomassas	39
4.7.1 Determinação do rendimento	39
4.7.2 Determinação dos teores de umidade.....	39
4.7.3 Determinação dos teores de cinzas	40

4.7.4	Quantificação de macro e micronutrientes	41
4.7.5	Determinação dos teores de proteína	42
4.7.6	Determinação dos perfis de ácidos graxos.....	44
4.8	Análise estatística	45
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1	Aspecto macroscópico dos cultivos.....	45
5.2	Perfis cromatográficos dos extratos fúngicos	47
5.3	Quantificação de esclerotiorina	51
5.4	Pesquisa de micotoxinas.....	52
5.4.1	Pesquisa de ocratoxina A.....	52
5.4.2	Pesquisa de ácido ciclopiazônico, ácido penicílico, citrinina, patulina e ocratoxinas A e B	56
5.5	Estudo das biomassas	59
6.	CONCLUSÕES.....	72
7.	REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Limites máximos tolerados (LMT) para ocratoxina A e patulina, de acordo com a legislação brasileira atual	28
Tabela 4.1 - Meios de cultura do primeiro cultivo e suas respectivas concentrações de nutrientes (g/L)	34
Tabela 4.2 - Meios de cultura do segundo cultivo e suas respectivas concentrações de nutrientes (g/L)	34
Tabela 5.1 – Quantidades (médias e desvios-padrão) de esclerotiorina produzida pelo fungo nos onze meios de cultura do primeiro cultivo	51
Tabela 5.2 – Quantidades (médias e desvios-padrão) de esclerotiorina produzida pelo fungo nos cinco meios de cultura do segundo cultivo.	52
Tabela 5.3 – Rendimentos e teores de umidade, cinzas e proteína (médias e desvios-padrão) das biomassas obtidas a partir dos onze meios de cultura do primeiro cultivo.	60
Tabela 5.4 - Teores (médias e desvios-padrão) de Ca, Mg, Zn e Fe presentes nas biomassas fúngicas obtidas a partir dos onze meios de cultura do primeiro cultivo..	64
Tabela 5.5 - Teores (%) de ácidos graxos nos extratos lipídicos das biomassas de oito dos onze meios de cultura	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Algumas das principais micotoxinas de interesse na área de alimentos.....	26
Figura 4.1 – <i>P. sclerotiorum</i> após 7 dias de crescimento à temperatura ambiente, em tubo de ensaio contendo ágar batata dextrose	33
Figura 4.2 – Extração líquido/líquido do caldo fermentado filtrado para separação das fases orgânica e aquosa.....	36
Figura 5.1 – Biomassas e caldos fermentados após 23 dias de crescimento do fungo nos diferentes meios de cultura (primeiro cultivo)	46
Figura 5.2 – Biomassas e caldos fermentados após 20 dias de crescimento do fungo nos diferentes meios de cultura (segundo cultivo)	46
Figura 5.3 – Cromatograma (370 nm) por HPLC da substância esclerotiorina purificada.....	47
Figura 5.4 – Perfis cromatográficos (370 nm) por HPLC dos extratos do fungo nos diferentes meios de cultura do primeiro cultivo	49
Figura 5.5 – Perfis cromatográficos (370 nm) dos extratos do fungo nos diferentes meios de cultura do segundo cultivo.	50
Figura 5.6 – Cromatogramas (transições de quantificação e confirmação) referentes ao extrato obtido a partir do meio de cultura 2	53
Figura 5.7 – Cromatogramas (transições de quantificação e confirmação) referentes ao extrato obtido a partir do meio de cultura 4	53
Figura 5.8 – Cromatogramas (transições de quantificação e confirmação) referentes ao extrato obtido a partir do meio de cultura 6	54
Figura 5.9 – Cromatogramas (transições de quantificação e confirmação) referentes ao extrato obtido a partir do meio de cultura 2'	54
Figura 5.10 – Cromatogramas (transições de quantificação e confirmação) referentes ao extrato obtido a partir do meio de cultura 6'	55
Figura 5.11 – Espectro de massas referente ao extrato obtido a partir do meio de cultura 2	56
Figura 5.12 – Espectro de massas referente ao extrato obtido a partir do meio de cultura 4	56
Figura 5.13 – Espectro de massas referente ao extrato obtido a partir do meio de cultura 6	57
Figura 5.14 – Espectro de massas referente ao extrato obtido a partir do meio de cultura 8	57
Figura 5.15 – Espectro de massas referente ao extrato obtido a partir do meio de cultura 2'	57

Figura 5.16 – Espectro de massas referente ao extrato obtido a partir do meio de cultura 4'	58
Figura 5.17 – Espectro de massas referente ao extrato obtido a partir do meio de cultura 6'	58
Figura 5.18 – Espectro de massas referente ao extrato obtido a partir do meio de cultura 8'	58

ANEXO

Anexo 1 – Cromatograma (UPLC) do extrato fortificado com OTA, obtido a partir do meio de cultura 2.....	84
Anexo 2 – Cromatograma (UPLC) do extrato fortificado com OTA, obtido a partir do meio de cultura 4.....	84
Anexo 3 – Cromatograma (UPLC) do extrato fortificado com OTA, obtido a partir do meio de cultura 6.....	85
Anexo 4 – Cromatograma (UPLC) do extrato fortificado com OTA, obtido a partir do meio de cultura 2'.....	85
Anexo 5 – Cromatograma (UPLC) do extrato fortificado com OTA, obtido a partir do meio de cultura 6'.....	86
Anexo 6 – Cromatograma (CG) do perfil de ácidos graxos, obtido a partir da biomassa do meio de cultura 3.....	86
Anexo 7 – Cromatograma (CG) do perfil de ácidos graxos, obtido a partir da biomassa do meio de cultura 4.....	87
Anexo 8 – Cromatograma (CG) do perfil de ácidos graxos, obtido a partir da biomassa do meio de cultura 5.....	87
Anexo 9 – Cromatograma (CG) do perfil de ácidos graxos, obtido a partir da biomassa do meio de cultura 6.....	88
Anexo 10 – Cromatograma (CG) do perfil de ácidos graxos, obtido a partir da biomassa do meio de cultura 7.....	88
Anexo 11 – Cromatograma (CG) do perfil de ácidos graxos, obtido a partir da biomassa do meio de cultura 8.....	89
Anexo 12 – Cromatograma (CG) do perfil de ácidos graxos, obtido a partir da biomassa do meio de cultura 9.....	89
Anexo 13 – Cromatograma (CG) do perfil de ácidos graxos, obtido a partir da biomassa do meio de cultura 11.....	90

LISTA DE SIGLAS

ANOVA – *Analysis of Variance*

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – *Association of Analytical Communities*

BF₃ – Trifluoreto de Boro

CG – Cromatografia gasosa

CLA – *Conjugated Linoleic Acid*

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CLUE-MS/MS – Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas

DRI – *Dietary Reference Intakes*

ESI – *Electrospray Ionization*

FAME – *Fatty Acid Methyl Ester*

FAO - *Food and Agriculture Organization*

FDA – *Food and Drug Administration*

FUNED – Fundação Ezequiel Dias

GRAS – *Generally Recognized as Safe*

HPLC – *High-Performance Liquid Chromatography*

IAL – Instituto Adolfo Lutz

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

LCMS IT-TOF – *Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry with Ion Trap and Time of Flight*

MRM – *Multiple Reaction Monitoring*

NHMRC – *National Health and Medical Research Council*

OMS – Organização Mundial de Saúde

OSMAC – *One strain, many compounds*

OTA – Ocratoxina A

P.A. – Para análise

PDB – *Potato Dextrose Broth*

SPE – *Solid Phase Extraction*

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UNICEF – *The United Nations Children's Fund*

UPLC-MS/MS – *Ultra-Performance Liquid Chromatography tandem mass-spectrometry*

UV – Ultravioleta

WHO – *World Health Organization*

RESUMO

Penicillium sclerotiorum é uma espécie de fungo filamentososo que produz biomassa com elevados teores de umidade, proteínas e minerais e baixo teor de lipídios e, portanto, tem sido alvo de estudos visando sua aplicação na área de alimentos. O presente trabalho avaliou a possível produção de micotoxinas por *P. sclerotiorum* (o que limitaria sua utilização na indústria de alimentos), bem como a influência de mudanças no ambiente de cultivo sobre o perfil metabólico do fungo e composição nutricional da biomassa. Foram feitos dois cultivos, com meios de cultura empregando diferentes quantidades combinadas de glicose, peptona e cloreto de sódio e quantidades fixas de fosfato monopotássico e sulfato de magnésio. Foram observadas diferenças na coloração das biomassas e meios de cultura fermentados e nos perfis cromatográficos, entre os diferentes meios de cultura utilizados, indicando que houve modulação do metabolismo fúngico de acordo com a mudança nas condições de cultivo. Não foram detectadas ocratoxinas A e B, ácido ciclopiazônico, ácido penicílico, citrinina e patulina nos extratos fúngicos analisados. A produção de esclerotiorina variou entre 0,010 mg/mL e 0,152 mg/mL, no primeiro cultivo e 0,202 mg/mL e 0,699 mg/mL no segundo cultivo (sem diferença significativa no último caso). Os rendimentos de biomassa variaram entre 1,89 g e 7,80 g, sendo maior nos meios com maior quantidade de glicose. Os teores de umidade variaram entre 37,48% e 80,88%. Os teores de cinzas variaram entre 3,55% e 18,11%, com base em peso seco (p.s.). Os teores de macro e micronutrientes variaram entre 11,9 mg/100g e 137,5 mg/100g para Ca, 87,2 mg/100g e 154,2 mg/100g para Mg, 0,9 mg/100g e 3,0 mg/100g para Zn (sem diferença significativa) e 0,6 mg/100g e 1,7 mg/100g para Fe (sem diferença significativa), com base em p.s. Os teores de proteína variaram entre 21,56% e 41,88% com base em p.s. Os perfis de ácidos graxos revelaram a presença dos ácidos graxos essenciais linoleico e linolênico, com destaque para o linoleico, detectado em maior quantidade em todas as amostras analisadas. Os resultados indicam que *P. sclerotiorum* pode ser utilizado na produção de biomassa nutritiva e segura para a indústria de alimentos.

Palavras-chave: *Penicillium sclerotiorum*, micotoxinas, esclerotiorina, biomassa, alimentos, OSMAC.

ABSTRACT

Penicillium sclerotiorum is a species of filamentous fungus which produces biomass with high moisture, protein and mineral contents and low content of lipids. Therefore, it has been the subject of studies aimed at its use in food industry. The present work investigated if there is mycotoxin production by *P. sclerotiorum* (which would limit its use in food industry), as well as the influence of changes in cultivation environment over metabolic profile of this fungus and nutritional composition of its biomass. There were carried out two sets of experiments, with culture media using variable amounts of glucose, peptone and sodium chloride and fixed amounts of potassium phosphate and magnesium sulfate. Differences were observed in the color of the biomass and fermented culturing media as well as in the chromatographic profiles, between the different culture media used, indicating that there was modulation of fungal metabolism according to changes in growing conditions. There were not detected ochratoxins A and B, cyclopiazonic and penicillic acids, citrinin and patulin in the fungal extracts analyzed. Sclerotiorin production ranged between 0.010 mg/mL and 0.152 mg/mL in the first cultivation and 0.202 mg/mL and 0.699 mg/mL in the second cultivation (no significant difference in the last case). Biomass yields ranged between 1.89 g and 7.80 g, being greater in culture media with the highest amount of glucose. Moisture levels ranged from 37.48% and 80.88%. Ash levels ranged from 3.55% to 18.11%, based on dry weight (d.w.). Macro and micronutrient levels ranged from 11.9 mg/100 g to 137.5 mg/100 g for Ca, 87.2 mg/100 g to 154.2 mg/100 g for Mg, 0.9 mg/100 g to 3.0 mg/100 g for Zn (no significant difference), 0.6 mg/100 g to 1.7 mg/100 g for Fe (no significant difference), based on d.w. Protein levels ranged from 21.56% to 41.88% based on d.w. Fatty acid profiles revealed the presence of the essential fatty acids linoleic and linolenic, the first one being detected in greater quantities in all samples analyzed. The results indicate that *P. sclerotiorum* is able to be used in the production of a nutritious and safe biomass for food industry.

Keywords: *Penicillium sclerotiorum*, mycotoxins, sclerotiorin, biomass, food, OSMAC.

1 INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos tem investido cada vez mais em inovações, por serem estas reconhecidas como importantes instrumentos de competitividade econômica e satisfação das expectativas dos consumidores. (BIGLIARDI e GALATI, 2013). Diante deste cenário, a produção de proteína alimentar a partir de algas, leveduras, biomassa fúngica e bacteriana representa uma alternativa inovadora à agricultura convencional, uma vez que gera menos poluição ambiental, como emissão de gases do efeito estufa, e requer menor uso de terras e recursos hídricos quando comparada à agricultura e pecuária tradicionalmente praticadas (MATASSA *et al.*, 2016).

A biomassa fúngica (micélio), na maioria das vezes, é descartada como resíduo após a realização de processos fermentativos em escala industrial, enquanto o meio de cultura fermentado é aproveitado para a recuperação do produto de interesse (SCHMIDELL *et al.*, 2001). No entanto, a biomassa também é interessante do ponto de vista alimentar, devido ao seu perfil nutricional: elevado teor de proteínas, contendo aminoácidos essenciais; parede de quitina, que permite agir como fonte de fibra dietética; baixo teor de gordura; ausência de colesterol (GHORAI *et al.*, 2009).

P. sclerotiorum é uma espécie de fungo filamentosos cuja biomassa apresenta elevados teores de proteína e minerais e baixos teores de lipídeos, indicando ser uma possível fonte alimentícia nutritiva e de baixo valor calórico (CARVALHO, 2009), não havendo relatos, na literatura, da produção de micotoxinas por essa espécie. *P. sclerotiorum* também é produtor de uma diversidade de metabólitos secundários, dentre os quais se destaca a esclerotiorina, uma substância de forte coloração alaranjada, com potencial para utilização como corante natural (GOMES, 2011).

Diante da relevância da indústria alimentícia para a economia mundial, do interesse do mercado no aprimoramento e inovação tecnológica deste setor e do potencial apresentado pelos fungos como produtores de biomassa e metabólitos aplicáveis à indústria de alimentos, faz-se importante o estudo destes micro-organismos, bem como de suas condições de cultivo e os aspectos relacionados à sua segurança, a fim de se proporem novos produtos alimentícios interessantes do ponto de vista nutricional, sensorial e funcional.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais dos fungos

Os fungos são organismos eucariotos (possuem membrana nuclear), classificados pela biologia moderna em um reino próprio, o reino Fungi, baseado, dentre outras coisas, no seu modo de nutrição absorptiva: secretam uma vasta gama de enzimas no ambiente, permitindo que suas células absorvam o alimento “pré-digerido” (BENNETT, 1998). Entre as demais características que apresentam, incluem-se a formação de estruturas vegetativas filamentosas, as hifas, que constituem o micélio, e estruturas especializadas para reprodução sexuada e assexuada, próprias de cada grupo taxonômico, a partir das quais formam-se os esporos. Embora a maioria dos fungos forme micélio bem desenvolvido, alguns, como as leveduras, são unicelulares (ALEXOPOULOS *et al.*, 1996 citado por BRASIL, 2005).

Os fungos representam um grupo grande, diverso e amplamente disseminado de organismos, compreendendo os bolores (fungos filamentosos), cogumelos, trufas e leveduras. Cogumelos e trufas são macroscópicos, enquanto fungos filamentosos e leveduras são microscópicos. Aproximadamente 100.000 espécies de fungos já foram descritas, estimando-se a possibilidade de existirem até 1,5 milhão de espécies (BENNETT, 1998; MADIGAN *et al.*, 2010).

Os fungos são ubíquos, o que significa que ocupam diversos ambientes, sendo encontrados em vegetais, na água, em animais, em detritos e em abundância no solo, participando ativamente do ciclo dos elementos na natureza (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008). Um grande número de micro-organismos habita o solo em constante interação, determinando parcialmente propriedades físicas, químicas e biológicas desse habitat. Eles são importantes para o ciclo biogeoquímico, uma vez que conduzem inúmeras mudanças biológicas nesse ambiente (TAKAHASHI *et al.*, 2008). Alguns fungos são aquáticos, vivendo principalmente em água doce, mas podem viver em ambientes marinhos. A maioria dos fungos conhecidos, no entanto, é terrestre. Eles habitam o solo ou a matéria vegetal morta e desempenham papéis cruciais na mineralização do carbono orgânico. Inúmeros fungos são parasitas de plantas, acarretando doenças de importância econômica em grandes plantações. Alguns fungos causam doenças (micoses e micotoxicoses) em animais, inclusive

humanos, embora geralmente os fungos sejam patógenos animais de menor importância do que outros micro-organismos. Os fungos também estabelecem associações simbióticas com várias plantas, auxiliando-as na aquisição de minerais a partir do solo (como líquens e micorrizas), e vários fungos contribuem beneficentemente para a vida humana por meio de fermentação e da síntese de antibióticos (BRASIL, 2005; MADIGAN *et al.*, 2010).

2.2 O papel dos fungos na biotecnologia

A convenção sobre diversidade biológica define biotecnologia como: “qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados para fabricar ou modificar produtos ou processos para uso específico” (FAO, 2016).

Os fungos eram vistos, nos séculos passados, principalmente como organismos patogênicos ou deteriorantes que matavam plantas e decompunham a folhagem caída. A percepção sobre os benefícios dos fungos ampliou-se à medida que aumentou o consumo destes como alimentos, difundiu-se o uso de enzimas fúngicas e descobriram-se importantes antibióticos produzidos por eles (LEATHAM, 1992). O uso de fungos como fontes dietéticas e em bebidas fermentadas, no entanto, ocorre desde tempos pré-bíblicos. Evidências arqueológicas indicam que havia consumo de cogumelos selvagens por habitantes do Chile há quase 13.000 anos (ROJAS e MANSUR, 1995 citados por GHORAI *et al.*, 2009). Apesar da antiga prática de consumo de fungos e sua utilização na produção de outros materiais alimentícios, seu potencial não era tão bem explorado até a última metade do século XX, quando essa exploração foi impulsionada pela ‘era do ouro da microbiologia industrial’ (GHORAI *et al.*, 2009).

Muitas espécies de fungos macroscópicos, como os cogumelos e as trufas, são consideradas iguarias finas e são cultivadas para alimentação humana. Por outro lado, espécies microscópicas como as dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Saccharomyces* têm mostrado um grande potencial biotecnológico, devido às suas atividades metabólicas, como produtoras de enzimas degradativas ou sintetizadoras

de metabólitos úteis. Esses fungos formam uma importante base para a biotecnologia moderna (BENNETT, 1998).

Há um interesse mundial na atualidade em aumentar o uso de substâncias naturais em detrimento às sintéticas. Portanto, tecnologias ambientalmente sustentáveis são necessárias (AKILANDESWARI e PRADEEP, 2016). Dentre as fontes naturais de metabólitos ativos, os micro-organismos são o grupo mais importante na produção de substâncias com aplicação industrial, além de apresentarem elevada taxa de crescimento em um curto ciclo de vida, produzindo grandes quantidades de biomassa em curto período de tempo (DUFOSSÉ, 2006). Os fungos podem ser cultivados tecnicamente por processo fermentativo, através dos estágios de preparação do meio de cultura, inoculação e incubação. O meio pode conter substratos padronizados, mas também materiais obtidos a partir de fontes baratas de resíduos agroindustriais que serão transformados em alimentos e produtos farmacêuticos de alto valor agregado. O uso de fungos, portanto, é importante sob os pontos de vista econômico e ambiental (GHORAI *et al.*, 2009).

Os fungos filamentosos têm hoje destacada atuação na produção de fármacos, alimentos e bebidas, devido à sua capacidade de sintetizar produtos industriais como amilase, inulinase, invertase, pectinase, ácidos orgânicos, antibióticos e outros metabólitos (NAM *et al.*, 1993; KIM *et al.*, 1994 citados por BRASIL, 2005), além de sua utilização como agentes de controle biológico de pragas e na conversão de biomassa (ONIONS *et al.*, 1981; BERRY, 1988; LEONG e BERKA, 1990 citados por FINKELSTEIN e BALL, 1992).

Estudos farmacológicos e médicos têm mostrado que as divisões Basidiomycota e Ascomycota são uma imensa fonte de compostos biologicamente ativos, ainda que menos de 10% de todas as espécies tenham sido descritas e ainda menos tenham sido testadas quanto à significância terapêutica (SMITH *et al.*, 2015). Os fungos filamentosos são conhecidos por biossintetizar uma grande quantidade de metabólitos secundários, chegando a uma produção até 73% superior à de outras classes de micro-organismos (SPECIAN *et al.*, 2014). O metabolismo secundário é o conjunto de vias metabólicas responsáveis pela biossíntese de compostos não essenciais ao crescimento do organismo, mas relacionados à sua adaptação e

sobrevivência (LUCKNER, 1984). O primeiro metabólito secundário fúngico eficaz na terapêutica foi a penicilina, produzida pelo fungo *Penicillium chrysogenum*, descoberta por Fleming em 1928, sendo também o primeiro medicamento produzido em escala industrial, o que ocorreu já na década de 40 (SPECIAN *et al.*, 2014).

A produção de enzimas tem sido considerada um negócio altamente rentável, na ordem de bilhões de dólares por ano. As enzimas produzidas a partir de micro-organismos têm sido bastante exploradas comercialmente, uma vez que, em muitos casos, sua produção é menos dispendiosa e seu uso é menos prejudicial ao meio ambiente quando comparado ao uso de produtos químicos na indústria (LIMA *et al.*, 2015). Pigmentos com poder colorante possuem aplicações em diversos setores industriais (alimentício, têxtil e cosmético), além de poderem possuir propriedades organolépticas fundamentais quanto à atração do consumidor a um determinado produto. Os pigmentos naturais, como os derivados de fungos, são alternativas viáveis aos sintéticos, em virtude dos prejuízos à saúde associados a diversos corantes sintéticos (FERREIRA *et al.*, 2015).

Os fungos também possuem potencial genético para aplicação em processos de biorremediação, produzindo enzimas capazes de remover ou reduzir poluentes ambientais (MARTINS, 2009). Biorremediação é a aplicação de sistemas biológicos para limpeza de poluição orgânica e inorgânica, sendo bactérias e fungos os organismos mais importantes para recuperação, imobilização ou detoxificação de poluentes metálicos ou radionuclídeos (GADD, 2010). As biomassas de fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Saccaromyces* e *Trichoderma*, por exemplo, têm se mostrado eficientes na remoção de metais pesados em soluções aquosas e resíduos de agroquímicos no solo e em efluentes (PEREIRA e FREITAS, 2012).

2.3 Fungos filamentosos na indústria de alimentos

Os fungos filamentosos são usados em muitos processos industriais para obtenção de amilases, amiloglucosidases, celulasas, pectinases, lacases/ligninases, fitases, proteases, lipases e glico-oxidases. As enzimas produzidas por fungos apresentam vantagens, devido à sua liberação para o meio extracelular, o que torna mais fácil sua recuperação (GERMANO *et al.*, 2003; WARD, 2012; SOUZA, 2015). Células fúngicas são amplamente empregadas nas indústrias de fermento, vinho e pães devido à sua inerente capacidade de secretar uma grande quantidade de enzimas no meio de cultura (GHORAI *et al.*, 2009).

Devido a uma vasta gama de atividades biológicas, os fungos são considerados importantes fontes de pigmentos. Dentre as principais espécies presentes no solo, os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Trichoderma* são dominantes (AKILANDESWARI e PRADEEP, 2016). Os corantes naturais produzidos por micro-organismos podem ser empregados na indústria de alimentos, como é o caso da esclerotiorina, composto químico produzido pelo fungo filamentoso *P. sclerotiorum*, que tem sido alvo de estudos na área de alimentos devido à sua coloração alaranjada, capacidade antioxidante, potencial atividade biológica de redução do colesterol plasmático e no tratamento de diabetes (GOMES, 2011).

A estrutura de um fungo filamentoso consiste em filamentos longos de células conectadas, denominados hifas, que podem crescer até imensas proporções. Quando as condições ambientais são favoráveis, as hifas crescem formando uma massa filamentosa chamada micélio, que é visível a olho nu (PAPAGIANNI, 2004; GRIMM *et al.*, 2005) e é este micélio que compõe a biomassa fúngica. A biomassa fúngica, na maioria das vezes, é descartada como resíduo após a realização de processos fermentativos em escala industrial, enquanto o caldo é aproveitado para recuperação do produto de interesse (SCHMIDELL *et al.*, 2001). Entretanto, a biomassa fúngica é interessante sob o ponto de vista alimentar, devido ao seu perfil nutricional: bom teor de proteínas (20-30% da matéria seca) apresentando aminoácidos essenciais (leveduras são especialmente ricas em lisina); parede

fúngica composta de quitina, representando fonte de fibra dietética; alto teor de vitamina B; baixo teor de gordura; ausência de colesterol (GHORAI *et al.*, 2009).

A indústria de alimentos tem investido cada vez mais em inovações, por serem estas reconhecidas como um importante instrumento de competição econômica e satisfação das expectativas dos consumidores. Com o aumento da longevidade da população e da preocupação com sua qualidade de vida, além dos altos custos dos serviços de saúde, a demanda por alimentos nutritivos, funcionais (que ofereçam benefícios à saúde) e que utilizem novos ingredientes e processos tecnológicos seguros é crescente (BIGLIARDI e GALATI, 2013). A produção de proteína alimentar a partir de algas, leveduras, biomassa fúngica e bacteriana representa uma alternativa à agropecuária convencional, uma vez que gera menos poluição ambiental, como emissão de gases do efeito estufa, e requer menor uso de terras e recursos hídricos quando comparada à agricultura e pecuária (MATASSA *et al.*, 2016).

Muitos produtos fúngicos processados estão disponíveis no mercado, sendo o mais notável deles a micoproteína, desenvolvida como um substituto da carne sob o nome comercial 'Quorn'. A micoproteína é um produto resultante da fermentação de uma cepa selecionada de *Fusarium venenatum* (originalmente chamado *Fusarium graminearum*) (GHORAI *et al.*, 2009) e o seu desenvolvimento na década de 60 deveu-se a preocupações com uma possível diminuição na proteína alimentar disponível no mundo (FDA, 2001). *F. graminearum* tem sido usado desde 1985, no Reino Unido, para a produção da micoproteína Quorn® para consumo humano. A biomassa de *F. graminearum* é produzida em sistema de fluxo contínuo, o qual gera maior produtividade de biomassa do que em culturas sequenciais em batelada. A biomassa fúngica é comprimida e as hifas alinhadas pela mistura para originar um produto final com uma textura fibrosa semelhante à carne (WIEBE *et al.*, 1998).

A micoproteína é um ingrediente que pode ser incluído em alimentos ou pode funcionar como um alimento por si só. Possui um bom perfil nutricional (elevados teores de proteína e fibra; baixo teor de gordura; ausência de colesterol), podendo ser utilizada como substituto da fibra muscular em produtos alternativos à carne, substituto de gordura em certos produtos lácteos e substituto de cereais (FDA, 2001).

CARVALHO *et al.* (2010) caracterizaram as biomassas de quatro espécies de fungos filamentosos: *P. sclerotiorum*, *Penicillium janthinellum*, *Rhizopus stolonifer* e *Syncephalastrum racemosum*. Os resultados de seu trabalho mostraram que as biomassas dessas quatro espécies apresentaram altos teores de umidade, proteínas e minerais e baixo teor de lipídeos, indicando potencial para utilização como suplementos alimentares.

2.4 Segurança alimentar e nutricional

O conceito de segurança alimentar veio à luz a partir da Segunda Grande Guerra, com mais da metade da Europa devastada e sem condições de produzir o seu próprio alimento. Esse conceito leva em conta três aspectos principais: quantidade, qualidade e regularidade no acesso aos alimentos (BELIK, 2003). De acordo com a FAO (*Food and Agriculture Organization*), a segurança alimentar existe quando todas as pessoas, em todos os momentos, têm acesso físico, social e econômico a alimentos nutritivos, seguros e em quantidade suficiente para atender às suas necessidades dietéticas e preferências alimentares para uma vida saudável e ativa (FAO, 2006).

A utilização de determinados micro-organismos na alimentação humana (como *Saccharomyces cerevisiae* na fabricação de pães, bactérias ácido-láticas na fermentação do leite e o consumo de cogumelos selvagens e algas) ocorre a milhares de anos, contribuindo para o aporte de carboidratos, proteínas, lipídeos, minerais e vitaminas na dieta humana. No entanto, a primeira tentativa de se cultivar micro-organismos em larga escala para a alimentação humana ocorreu durante a Primeira e Segunda Guerras Mundiais, na Europa, quando a levedura *Torula* (*Candida utilis*) começou a ser cultivada devido à escassez de outras fontes proteicas naquela época (KUHAD *et al.*, 1997).

Em 1955, um grupo consultivo sobre proteínas foi criado para dar apoio à Organização Mundial de Saúde (OMS) e ao Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) no estabelecimento de diretrizes para segurança, nutrição e palatabilidade de novas fontes proteicas para consumo humano, devido à preocupação com uma possível escassez de fontes proteicas alimentares. Um

relatório das Nações Unidas, em 1968, avaliou a possibilidade do uso de proteína microbiana para o atendimento a requerimentos futuros. Em 1984, a empresa britânica *Marlow Foods* iniciou o processo de desenvolvimento da micoproteína, utilizando tecnologia de fermentação em grande escala (TRINCI, 1992).

O crescimento da demanda mundial por alimentos para humanos e animais tem incentivado a pesquisa de fontes proteicas não convencionais, dentre elas a proteína microbiana, passível de ser cultivada sob condições controladas, as quais são menos dependentes de espaço, variações climáticas e recursos hídricos, quando comparadas à agricultura tradicional. Os fungos são de particular interesse, uma vez que são capazes de crescer em substratos de baixo custo, como materiais lignocelulósicos e amiláceos (KUHAD *et al.*, 1997).

Uma substância GRAS (*generally recognised as safe*), ou seja, “geralmente reconhecida como segura”, de acordo com o FDA (*Food and Drug Administration*) - órgão de saúde estadunidense que regulamenta alimentos e medicamentos - é aquela cujo reconhecimento da segurança é baseado na visão de especialistas qualificados para tal. O *status* GRAS deve ser baseado no histórico de segurança do uso da substância em alimentos ou em procedimentos científicos, os quais requerem a mesma quantidade e qualidade de evidências que seriam requeridas para obter a regulação de aditivos de alimentos (FDA, 2015). Portanto, as linhagens fúngicas para uso na indústria de alimentos devem buscar alcançar o *status* GRAS.

2.5 Micotoxinas

Micotoxinas são metabólitos secundários fúngicos que exercem efeitos tóxicos em animais e humanos. Os efeitos tóxicos das micotoxinas na saúde humana e animal são referidos como micotoxicoses, cuja severidade depende do grau de toxicidade da micotoxina envolvida, extensão da exposição, idade e estado nutricional do indivíduo e possíveis efeitos sinérgicos de outras substâncias químicas às quais o indivíduo seja exposto (PERAICA *et al.*, 1999).

A palavra micotoxina é uma combinação do grego “*mykes*”, que significa fungo e do latim “*toxicum*”, que significa veneno. O termo micotoxina é geralmente atribuído a

metabólitos secundários tóxicos produzidos por alguns fungos que contaminam plantações no campo ou após a colheita (TURNER *et al.*, 2009). O termo “micotoxina” foi criado em 1962 após um surto na região de Londres, Inglaterra, durante o qual aproximadamente cem mil perus morreram. Quando essa misteriosa doença, que ficou conhecida como Doença X dos perus, foi relacionada ao fornecimento de uma ração à base de amendoim contaminada com metabólitos secundários fúngicos de *Aspergillus flavus* (aflatoxinas), tal fato sensibilizou os cientistas à possibilidade de existirem outros metabólitos fúngicos com propriedades tóxicas (BENNET e KLICH, 2003).

As micotoxinas são produzidas principalmente por cinco gêneros de fungos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* e *Alternaria*. No entanto, nem todas as linhagens de uma mesma espécie fúngica são capazes de produzir micotoxinas (MAZIERO e BERSOT, 2010). Entre as principais micotoxinas de interesse na área de alimentos, podem ser citadas: aflatoxinas (B₁, B₂, G₁, G₂ e M₁), ácido fusárico, patulina, citrinina, ocratoxinas (A, B e C), zearalenona, tricotecenos (desoxinivalenol, diacetoxiscirpenol e toxina T2), fumonisinas (B₁ e B₂), entre outras (Figura 2.1). As aflatoxinas são as que apresentam maior importância sob o ponto de vista toxicológico (IAL, 2008).

Ocasionalmente, micotoxinas produzidas por fungos saprófitos ou oportunistas, como espécies de *Penicillium*, encontram-se presentes em *commodities* agrícolas. Várias micotoxinas produzidas por *Penicillium* spp., incluindo ácido ciclopiazônico, patulina, ácido micofenólico e roquefortina C ocorrem em alimentos à base de milho, incluindo em silagem e há relatos de problemas de saúde em rebanhos expostos a essas toxinas (MANSFIELD *et al.*, 2008).

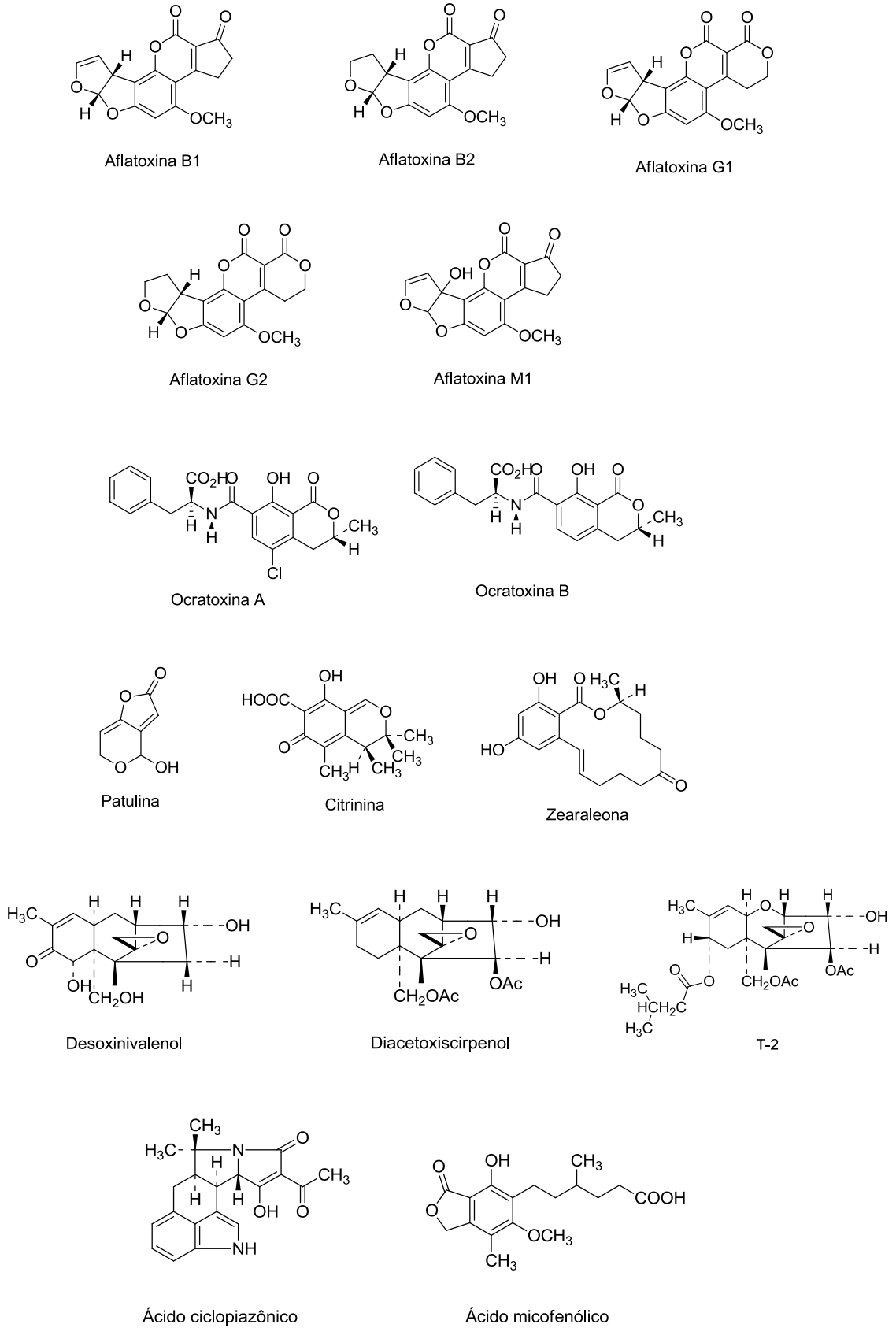


Figura 2.1 – Algumas das principais micotoxinas de interesse na área de alimentos (adaptado de DESJARDINS *et al.*, 2003).

O gênero *Penicillium* contém muitas espécies micotoxigênicas (aproximadamente 100) e a extensão das classes de micotoxinas produzidas é muito mais ampla do que a de qualquer outro gênero (SWEENEY e DOBSON, 1998). Ocratoxina é produzida por *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus ochraceus* e espécies relacionadas. Patulina é produzida principalmente por *Penicillium expansum*, um patógeno de frutas que causa putrefação em maçãs. Citrinina é produzida por *Penicillium citrinum*, mas *P. expansum* e *P. verrucosum* também foram relatados como produtores (EL-BANNA *et al.*, 1987 citados por SWEENEY e DOBSON, 1998).

A ingestão de micotoxinas por humanos, a qual ocorre principalmente através de alimentos vegetais e resíduos de metabólitos presentes em produtos de origem animal, pode levar à deterioração das funções hepática ou renal. Algumas micotoxinas são neurotóxicas ou interferem na síntese proteica e produzem efeitos desde sensibilidade ou necrose da pele até imunodeficiência extrema (SWEENEY e DOBSON, 1998).

Muitos fungos são capazes de produzir mais de uma toxina simultaneamente. A contaminação multimicotoxinas é de particular interesse, devido ao potencial efeito aditivo ou sinérgico em animais e humanos expostos (MANSFIELD e KULDAU, 2007).

DOMBRINK-KURTZMAN e BLACKBURN (2005) avaliaram o potencial de produção da micotoxina patulina por diferentes espécies de *Penicillium* (*P. expansum*, *P. griseofulvum*, *P. clavigerum* e *P. coprobium*) em diferentes meios de cultura. A maior quantidade de patulina foi produzida por *P. griseofulvum* em caldo batata dextrose suplementado com manganês.

De 97 amostras de resíduos alimentares coletadas e analisadas por RUNDBERGET *et al.* (2004), foram isoladas 25 espécies de *Penicillium* (as mais frequentes: *P. crustosum*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. expansum*, *P. roqueforti*, *P. spinulosum*, *P. viridicatum*, *P. commune*, *P. citrinum*, *P. solitum*). As micotoxinas produzidas por essas espécies incluíram ácido micofenólico, roquefortina C, penitremas A-F e tomitremas A e E.

Micotoxinas produzidas por espécies do gênero *Penicillium* podem representar um sério problema de contaminação em alimentos e rações. A alta toxicidade dessas micotoxinas exige análises em equipamento com baixos limites de detecção. Devido à alta polaridade de muitas micotoxinas, a cromatografia líquida de alta eficiência tem sido a técnica de separação preferida para sua análise. A combinação de cromatografia líquida com espectrometria de massas simplifica o desenvolvimento de métodos para a análise de micotoxinas polares (RUNDBERGET e WILKINS, 2002).

No Brasil, a Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece os limites máximos tolerados para as principais micotoxinas em algumas classes de alimentos. Dentre as principais micotoxinas de *Penicillium* spp., são estabelecidos limites para a ocratoxina A e a patulina (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Limites máximos tolerados (LMT) para ocratoxina A e patulina, de acordo com a legislação brasileira atual.

Micotoxina	Alimento	LTM (µg/kg)
Ocratoxina A	Cereais e produtos de cereais, incluindo cevada malteada	10
	Feijão	10
	Café torrado (moído ou em grão) e café solúvel	10
	Vinho e seus derivados	2
	Suco de uva e polpa de uva	2
	Especiarias: <i>Capsicum</i> spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta decaiena e pimentão-doce); <i>Piper</i> spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta); <i>Myristica fragrans</i> (noz-moscada); <i>Zingiber officinale</i> (gengibre); <i>Curcuma longa</i> (curcuma); misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas.	30
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	2
	Produtos de cacau e chocolate	5
	Amêndoa de cacau	10
	Frutas secas e desidratadas	10
Patulina	Suco de maçã e polpa de maçã	50

Fonte: adaptado de BRASIL (2011)

A ocratoxina A é classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) como substância do grupo 2 B – possivelmente carcinogênica para humanos. Outras micotoxinas produzidas por espécies do gênero *Penicillium*, como citrinina, patulina, ácido penicílico e ocratoxina B são incluídas pelo mesmo órgão entre as substâncias do grupo 3 – não classificáveis quanto à sua carcinogenicidade para humanos (WHO, 2016).

Ocratoxina A é encontrada principalmente em grãos (trigo, cevada, aveia, milho), feijão seco, amendoins mofados, queijos, tecidos suínos, café, passas, uvas, frutas secas e vinho. Patulina é bastante encontrada em alimentos mofados, maçãs podres, suco de maçã e resíduos de palha de trigo. Citrinina é mais comum em grãos (trigo, cevada, milho, arroz). Ácido ciclopiazônico ocorre principalmente em milho, amendoim e queijos. Ácido penicílico tem sua principal ocorrência em milho estocado, grãos de cereais, feijões secos e tabaco mofado (DESJARDINS *et al.*, 2003).

No caso do cultivo de biomassa fúngica em nível industrial, a produção de micotoxinas é mais provável de ocorrer quando o crescimento do micélio é limitado por condições físicas e nutricionais como taxas de C/N desbalanceadas, baixa disponibilidade de oxigênio e requerimentos nutricionais incompletos. Essas condições seriam, portanto, inadequadas para a produção de micoproteína (FDA, 2001). No processo de fabricação da micoproteína Quorn[®], é feito um controle regular (a intervalos de 6 horas) para micotoxinas e contaminantes potencialmente danosos (WIEBE, 2004). O'DONNELL *et al.* (1998) relataram a produção de micotoxinas do grupo dos tricotecenos por cepas de *F. venenatum* inoculadas em culturas de arroz, mas não foi observada a presença de tricotecenos em três produtos comercializados pela Quorn[®] analisados no mesmo estudo.

Não foram encontrados relatos na literatura sobre a produção de micotoxinas pelo fungo *P. sclerotiorum*.

2.6 *P. sclerotiorum*

P. sclerotiorum é uma espécie de fungo filamentoso, isolada pela primeira vez a partir de amostras de ar em Java, na Indonésia. As colônias de *P. sclerotiorum* possuem coloração alaranjada a vermelha e algumas cepas produzem escleródios alaranjados que dão o nome à espécie (RIVERA e SEIFERT, 2011). Os escleródios são descritos como estruturas morfológicamente variáveis, ricas em nutrientes, formadas por múltiplas hifas, que podem permanecer adormecidas ou quiescentes em condições ambientais adversas, até que estas condições melhorem e eles possam germinar, permitindo a reprodução do fungo (WILLETTS e BULLOCK, 1992).

Essa espécie fúngica tem sido alvo de estudos, visando sua aplicação na área de alimentos, uma vez que produz um composto chamado esclerotiorina, o qual pode ser empregado como corante natural com propriedades funcionais, devido à sua coloração alaranjada (GOMES, 2011). A esclerotiorina obtida a partir do meio de cultura fermentado por outra espécie de fungo, *Penicillium frequentans*, apresentou inibição da aldose redutase, uma enzima-chave envolvida em complicações da diabetes *mellitus* que podem levar a retinopatia, catarata, neuropatia e nefropatia em pacientes diabéticos, indicando sua potencial utilização no tratamento dessa doença (CHIDANANDA *et al.*, 2006). Além disso, esclerotiorina obtida do mesmo fungo apresentou atividade antioxidante, por inibição da enzima lipoxigenase (CHIDANANDA e SATTUR, 2007). TOMODA *et al.* (1999) relataram atividade inibitória da esclerotiorina de *Penicillium* spp. sobre a proteína de transferência de colesterol esterificado e triacilglicerol, indicando que essa substância apresenta propriedade de redução do colesterol. Também há relatos da produção de xilanase por *P. sclerotiorum*, enzima que hidroliza a xilana (polissacarídeo presente na parede celular vegetal), sendo empregada na indústria de polpa e papel, têxtil, bebidas e alimentícia (KNOB e CARMONA, 2008), além da produção de malato de cálcio, que pode ser transformado em ácido málico, o qual é utilizado como acidulante e realçador de flavor na indústria de alimentos e bebidas (WANG *et al.*, 2013).

2.7 Abordagem OSMAC

Fungos e bactérias produtores de metabólitos secundários têm o potencial de produzir vários compostos a partir de uma única cepa, característica importante na busca por compostos bioativos, que é um dos objetivos centrais da química de produtos naturais na indústria e na academia (BODE *et al.*, 2002). Pequenas alterações na forma de cultivo de um micro-organismo são capazes de modular a biossíntese de seus metabólitos secundários e, por isso, algumas estratégias vêm sendo desenvolvidas a fim de maximizar a produtividade de metabólitos fúngicos, variando-se a composição do meio de cultura, pH, temperatura, aeração e luminosidade, além da adição de precursores ou inibidores da biossíntese de metabólitos. O termo utilizado para essa abordagem é OSMAC “uma cepa, vários compostos”, do inglês: *one strain, many compounds* (TAKAHASHI *et al.*, 2013).

VANDERMOLEN *et al.* (2013) utilizaram a abordagem OSMAC para avaliar o impacto de seis meios de cultura líquidos e cinco meios de cultura sólidos sobre a produção de metabólitos secundários por três cepas fúngicas (*Glomerella acutata*, *Hypocreales* sp. e *Fusicolla* sp.). O estudo objetivou determinar condições ideais a serem utilizadas na triagem de novas substâncias de interesse farmacológico. Foram observadas diferenças visuais no crescimento fúngico, como colorações, e produção de exsudato entre os diferentes meios de cultura utilizados, além de diferenças nas quantidades de extrato produzido e na composição desses extratos (identificada através da utilização de aurofusarina e PC3, compostos escolhidos como marcadores indicativos do potencial produtivo dos fungos em cada meio).

No presente estudo, o fungo da espécie *P. sclerotiorum* foi cultivado em diferentes condições, partindo da premissa de que, assim como o metabolismo secundário é influenciado pelas condições de cultivo do micro-organismo, a composição nutricional e o rendimento da biomassa também podem ser afetados pela composição do meio de cultura no qual a mesma foi cultivada. Dessa forma, a abordagem OSMAC pode auxiliar na determinação da melhor condição de cultivo para obtenção de biomassa e metabólitos a serem explorados na área de alimentos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a biomassa e o meio de cultura fermentado pelo fungo *P. sclerotiorum* cultivado em diferentes concentrações de nutrientes.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar as diferenças macroscópicas nas biomassas fúngicas e meios de cultura fermentados obtidos nas diferentes condições de cultivo;

Avaliar as diferenças nos perfis cromatográficos dos extratos fúngicos obtidos a partir das diferentes condições de cultivo;

Quantificar a produção de esclerotiorina pelo fungo nas diferentes condições de cultivo;

Avaliar a presença de micotoxinas nos extratos fúngicos obtidos em diferentes condições de cultivo;

Estudar as biomassas do fungo obtidas em diferentes condições de cultivo quanto a rendimento, teores de umidade, cinzas, cálcio, magnésio, zinco, ferro, proteínas e perfil de ácidos graxos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do fungo

O fungo da espécie *P. sclerotiorum* foi obtido da coleção pertencente ao Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios, do Departamento de Química da UFMG.

Foi feita a repicagem do fungo em tubos de ensaio contendo ágar batata dextrose. Após sete dias à temperatura ambiente, observado o crescimento do fungo (Figura 4.1), os tubos foram transferidos para geladeira, onde permaneceram armazenados à temperatura de 4 °C até o momento de sua utilização.

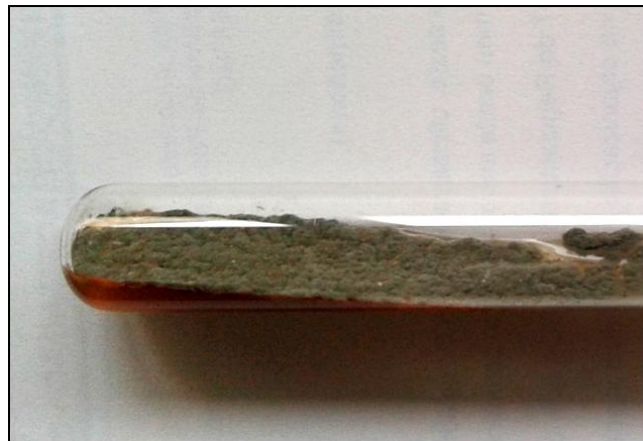


Figura 4.1 - *P. sclerotiorum* após 7 dias de crescimento à temperatura ambiente, em tubo de ensaio contendo ágar batata dextrose.

4.2 Cultivo do fungo

4.2.1 Preparo dos meios de cultura

No primeiro cultivo foram preparados onze meios de cultura líquidos, cada um contendo cinco ingredientes. Três ingredientes (glicose, peptona bacteriológica e cloreto de sódio) foram colocados em quantidades variáveis, seguindo um planejamento fatorial completo 2^3 com mais 3 pontos centrais, conforme mostra a Tabela 4.1. Os outros dois ingredientes (fosfato monopotássico e sulfato de magnésio) foram colocados nas quantidades fixas de 5 g/L e 2,5 g/L, respectivamente.

Tabela 4.1 – Meios de cultura do primeiro cultivo e suas respectivas concentrações de nutrientes (g/L).

Meio de cultura	Glicose	Peptona	Cloreto de sódio
1	25	25	0
2	100	25	0
3	25	100	0
4	100	100	0
5	25	25	25
6	100	25	25
7	25	100	25
8	100	100	25
9	62,5	62,5	12,5
10	62,5	62,5	12,5
11	62,5	62,5	12,5

No segundo cultivo foram preparados cinco meios de cultura líquidos com concentrações reduzidas (cinco vezes menores) dos mesmos nutrientes (Tabela 4.2). Os ingredientes fosfato monopotássico e sulfato de magnésio foram colocados nas quantidades de 1 g/L e 0,5 g/L, respectivamente. A escolha da formulação dos cinco meios de cultura do segundo cultivo foi feita com base naqueles meios que proporcionaram maiores rendimentos de biomassa no primeiro cultivo.

Tabela 4.2 – Meios de cultura do segundo cultivo e suas respectivas concentrações de nutrientes (g/L).

Meio de cultura	Glicose	Peptona	Cloreto de sódio
2'	20	5	0
4'	20	20	0
6'	20	5	5
8'	20	20	5
9'	12,5	12,5	2,5

Cada meio de cultura (do primeiro e do segundo cultivo) foi preparado na quantidade de 200 mL, em frascos de Erlenmeyer, tampados com rolhas de algodão hidrófobo e, posteriormente, esterilizados em autoclave via vapor saturado a 121 °C, sob pressão de 1,1 kgf/cm², por 15 minutos (adaptado de CARVALHO, 2009).

4.2.2 Preparo da suspensão de esporos

Uma alíquota de solução estéril de Tween 80 a 0,5% foi transferida para cada tubo de ensaio contendo o fungo crescido em ágar batata dextrose. Com uma alça de platina devidamente flambada em bico de Bunsen, foi feita a raspagem da superfície do ágar, a fim de liberar os esporos fúngicos. A suspensão de esporos obtida foi transferida em condições assépticas para um frasco de Erlenmeyer vazio e esterilizado.

4.2.3 Contagem e inoculação de esporos

Para determinação da concentração de esporos na suspensão preparada, foi feita a contagem dos mesmos, utilizando câmara de Neubauer. Um volume de 10 µL foi pipetado no espaço entre a superfície da câmara e a lamínula. A câmara foi posicionada em microscópio óptico e a contagem feita com objetiva de 40x. Foram contados cinco quadrantes (quatro extremidades e o centro) do quadrado central. A média das contagens de esporos dos cinco quadrantes foi calculada e seu valor foi multiplicado por 10.000 para obtenção do resultado em esporos/mL. Uma alíquota de 1 mL da suspensão de esporos padronizada ($1,5 \times 10^6$ esporos/mL) foi inoculada, em condições assépticas, em cada frasco contendo meio de cultura. Os frascos foram mantidos à temperatura ambiente, sobre bancada, por 23 dias para crescimento do fungo.

4.3 Filtração da biomassa e extração do caldo fermentado

Decorridos 23 dias da inoculação dos esporos, foram adicionados 30 mL de acetato de etila em cada frasco de Erlenmeyer contendo o fungo crescido, para inativação do mesmo. O caldo fermentado e a biomassa de cada frasco foram filtrados com papel filtro (poros 14 µm), em funil de Büchner acoplado a frasco Kitasato, com

auxílio de bomba de vácuo. Foram anotados os pesos das biomassas retidas na filtração e as mesmas foram embrulhadas em papel alumínio e armazenadas em *freezer* a -18 °C para análises posteriores.

O caldo fermentado filtrado foi transferido para funil de separação e vigorosamente agitado para a realização da extração líquido/líquido, a fim de obterem-se as fases orgânica e aquosa (Figura 4.2). A fase orgânica (fase de cima) foi transferida para um balão de fundo redondo e a fase aquosa (fase de baixo) foi novamente acrescida de uma quantidade aproximada de 20 mL de acetato de etila, procedendo-se novamente à agitação e separação em funil. Esse procedimento foi repetido até a obtenção de uma fase orgânica clara, indicando completa extração dos metabólitos orgânicos. A fase orgânica foi, então, submetida a rotaevaporação para concentração dos metabólitos e, posteriormente, transferida, com auxílio de clorofórmio e pipeta de Pasteur, para frasco de vidro previamente identificado com o nome da respectiva amostra. Os frascos contendo as amostras foram colocados em capela de exaustão até completa evaporação do solvente (PESSOA JR. e KILIKIAN, 2005).

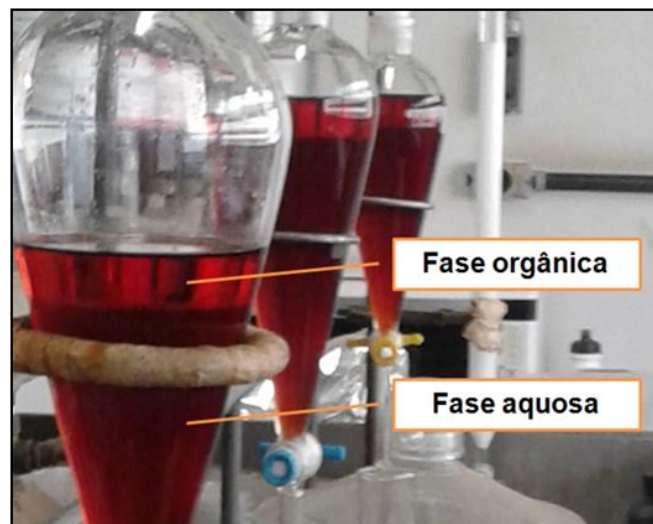


Figura 4.2 - Extração líquido/líquido do caldo fermentado filtrado para separação das fases orgânica e aquosa.

4.4 Obtenção dos perfis cromatográficos

Para obtenção dos perfis cromatográficos dos extratos fúngicos, procedeu-se à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Cada extrato foi pesado na quantidade de 1 mg, em tubo de Eppendorf, diluído com 1 mL (concentração de 1 mg/mL) de metanol grau CLAE, submetido a banho ultrassônico e filtrado em filtro de seringa com poros de tamanho 0,45 μm . As amostras preparadas foram armazenadas em geladeira a 4 °C até o momento da análise cromatográfica. Essa análise foi realizada em equipamento da marca Shimadzu, coluna C18 – 3 x 250 mm, com tamanho de partícula 5 μm , detector UV de lâmpada de deutério. A fase móvel constituiu-se de acetonitrila grau CLAE e água acidificada com ácido fórmico a 0,05%. A quantidade de amostra injetada foi de 2 μL e o comprimento de onda utilizado para obtenção dos perfis cromatográficos foi de 370 nm. As análises foram feitas no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química da UFMG.

4.5 Quantificação de esclerotiorina

A quantificação da esclerotiorina foi feita utilizando-se os perfis cromatográficos obtidos por CLAE. Primeiramente, foi preparada uma solução-padrão de esclerotiorina em metanol grau CLAE na concentração de 1 mg/mL. A partir desta solução-padrão foram preparadas seis diluições nas seguintes concentrações: 0,010 mg/mL, 0,013 mg/mL, 0,020 mg/mL, 0,033 mg/mL, 0,050 mg/mL e 0,100 mg/mL. A solução-padrão e suas diluições foram injetadas no mesmo equipamento para obtenção de uma curva-padrão. Após a obtenção da curva-padrão da esclerotiorina, as áreas dos picos cromatográficos correspondentes à substância esclerotiorina (identificados através do tempo de retenção), presentes nos cromatogramas das amostras analisadas por CLAE, foram calculadas através do programa *LC Solutions* e comparados com as áreas obtidas para os picos de cada diluição da curva-padrão, calculadas pelo mesmo programa.

4.6 Pesquisa de micotoxinas

4.6.1 Avaliação da presença de ocratoxina A por CLUE-MS/MS

Com a finalidade de se detectar a possível presença de ocratoxina A (OTA) nos extratos, foi realizada a análise por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-MS/MS) dos mesmos e comparação com o padrão de OTA. Foram escolhidos cinco extratos dentre aqueles do primeiro e segundo cultivos que estavam associados a um bom rendimento de biomassa. Estes extratos foram pesados em tubos de Eppendorf, diluídos com metanol grau CLAE (concentração de 1 mg/mL), agitados em vórtex e filtrados em filtros de seringa com poros de tamanho 0,22 µm.

A análise foi realizada em sistema da *Waters Corporation*: cromatógrafo líquido *UPLC ACQUITY I-CLASS*, com sistema binário de bombas para eluição em modo gradiente; coluna cromatográfica C18 – 2,1 x 100 mm, com tamanho de partícula 1,7 µm. O forno de coluna operou a 40 °C e o amostrador automático foi mantido a 10 °C. Espectrômetro de massas do tipo *Xevo TQ-S* com fonte de ionização *electrospray* (ESI) e analisador tipo triplo quadrupolo operando em MRM no modo positivo. Para a transição 404.1>239 foi utilizada a voltagem do cone de 30 Volts com energia de colisão de 23 Volts. Para a transição 404.1>221 foi utilizada a voltagem do cone de 30 V com energia de colisão de 35 V.

A análise foi executada no Laboratório de Micotoxinas da Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

4.6.2 Avaliação da presença de ácido ciclopiazônico, ácido penicílico, citrinina, patulina e ocratoxinas A e B por espectrometria de massas.

Com a finalidade de se detectar a possível presença das micotoxinas ácido ciclopiazônico, ácido penicílico, citrinina, patulina e ocratoxinas A e B, foram escolhidos oito extratos, dentre aqueles que estavam associados a um bom rendimento de biomassa, para análise por espectrometria de massas. Os extratos foram pesados em tubos de Eppendorf, solubilizados em metanol e submetidos a

centrifugação. Injetou-se a amostra em cromatógrafo líquido da marca Shimadzu LCMS-IT-TOF (225-07100-34) equipado com degaseificador *in line* modelo DGU-20A3, duas bombas modelo LC-20AD, *autosampler* modelo SIL-20A e módulo comunicador CBM-20A. A ionização foi realizada a partir do emprego de fonte de *electrospray* (ESI), com acumulador *íon trap* (IT). O analisador de massas empregado foi *time of flight* (TOF). A temperatura do bloco de aquecimento foi de 250 °C, a voltagem no capilar foi 4,5 kV, a temperatura da CDL foi fixada em 200 °C e a tensão no detector foi de 1,76 kV.

A análise foi executada no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química da UFMG.

A partir dos espectros de massas obtidos nesta análise, foi feita a comparação entre os valores de m/z (relação massa/carga) dos picos e os valores de m/z dos principais monoisótopos de cada uma das micotoxinas pesquisadas, com auxílio do programa *ChemDraw*.

4.7 Estudo das biomassas

O estudo das biomassas foi feito utilizando-se amostras de biomassas do primeiro cultivo, em triplicata.

4.7.1 Determinação do rendimento

Biomassas foram secas em estufa a 105 °C por 8 h e, posteriormente, pesadas para determinação do rendimento de biomassa seca (sem umidade).

4.7.2 Determinação dos teores de umidade

Recipientes de vidro vazios e previamente identificados foram levados a estufa a 105 °C por 4 h e, posteriormente, transferidos para dessecador, onde permaneceram por aproximadamente 30 min. Em seguida foram pesados e os valores das massas anotados. Aproximadamente 2 g de cada amostra (biomassa úmida) foram pesados nos respectivos recipientes e os valores exatos das massas

anotados. Os recipientes contendo as amostras foram colocados em estufa a 105 °C por 4 h. Em seguida, foram transferidos para dessecador e, após 30 min, pesados e os valores anotados. Os recipientes com as amostras foram recolocados em estufa a 105 °C por 1 h e, após 30 min em dessecador, novamente pesados, sendo este procedimento repetido até obtenção de massa constante, isto é, variação de, no máximo 0,2 mg entre duas pesagens consecutivas (AOAC, 2012).

O teor de umidade foi calculado através seguinte fórmula:

$$U = \frac{100 \times N}{P}$$

Sendo:

U = teor de umidade da amostra.

N = diferença de peso da amostra antes e após a estufa, subtraído o peso do recipiente vazio.

P = peso da amostra antes da estufa.

A análise de determinação do teor de umidade foi realizada no Laboratório de Química Analítica do Departamento de Química da UFMG.

4.7.3 Determinação dos teores de cinzas

Cadinhos de porcelana foram lavados com solução de ácido nítrico 5% em água destilada, enxaguados, identificados e submetidos a calcinação em mufla a 560 °C por 6 h. Após esse procedimento, os cadinhos foram transferidos para dessecador, onde permaneceram por aproximadamente 1 h, antes de serem pesados e suas respectivas massas anotadas. Uma quantidade aproximada de 2 g de cada amostra (biomassa seca) foi pesada e os valores exatos das massas anotados. As amostras nos cadinhos foram incineradas em bico de Bunsen até desaparecimento da fumaça produzida. Posteriormente, o material incinerado contido nos cadinhos foi levado à mufla a 560 °C por 8 h e depois transferidos para dessecadores, onde permaneceram por aproximadamente 1 h até resfriamento. As cinzas que

apresentaram coloração branca, indicando completa carbonização do material, foram pesadas e os valores anotados. As cinzas que apresentaram pontos pretos foram adicionadas de 3 a 4 gotas de água oxigenada 10 volumes e retornaram à mufla a 560 °C por 6 h. Decorrido esse tempo, foram transferidas a dessecador por aproximadamente 1 h e submetidas à pesagem (AOAC, 2012).

O teor de cinzas foi calculado através da seguinte fórmula:

$$C = \frac{100 \times N}{P}$$

Sendo:

C = teor de cinzas da amostra.

N = peso da amostra após a mufla, subtraído o peso do cadinho vazio.

P = peso da amostra antes da mufla.

A análise de determinação do teor de cinzas foi realizada no Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da UFMG.

4.7.4 Quantificação de macro e micronutrientes

As cinzas obtidas na análise de determinação do teor de cinzas foram utilizadas para quantificação de macro e micronutrientes. Foram quantificados os minerais Ca, Mg, Zn e Fe. A quantificação foi feita por análise de espectrometria de absorção atômica (adaptado de CARVALHO, 2009).

Frascos de vidro foram lavados com solução de ácido nítrico 5% em água destilada, e depois foram secos e identificados. Uma quantidade de 0,05 g de cinzas foi pesada em cada frasco com a respectiva identificação da amostra e os frascos foram colocados sobre chapa de aquecimento inicialmente fria. Foram pipetados 2 mL de ácido nítrico P.A. em cada um dos frascos e a temperatura da chapa de aquecimento foi gradualmente aumentada durante aproximadamente 1 h até atingir mais de 100 °C. Durante esse tempo, foi observada a solubilização total ou parcial

das cinzas, dependendo da amostra. Nos frascos em que houve diminuição da quantidade de ácido por evaporação antes que as cinzas estivessem completamente solubilizadas, um volume adicional de 1 mL de ácido nítrico P.A. foi pipetado e aguardou-se tempo suficiente para que a solubilização das cinzas fosse observada.

Após a solubilização das cinzas, as amostras foram transferidas para balão volumétrico de 5 mL com ajuda de um funil. Os frascos que continham inicialmente as amostras foram lavados, pipetando-se ácido nítrico P.A. e água deionizada com ajuda de uma pipeta de Pasteur, para remoção de quaisquer resíduos de cinzas e até que o volume do balão fosse completado para exatos 5 mL. O balão foi agitado vigorosamente para homogeneização da amostra e, em seguida, a amostra foi devolvida ao seu respectivo frasco. Além das amostras, foi preparado um controle, em triplicata, contendo apenas ácido nítrico e água deionizada, seguindo o mesmo procedimento de preparo das amostras, porém sem a presença de cinzas nos frascos. Entre cada preparo de amostra, o balão volumétrico e o funil foram lavados com ácido nítrico P.A. e água deionizada com o intuito de evitar interferência nos resultados da análise.

Os frascos de vidro contendo as amostras preparadas na etapa anterior foram cobertos com uma película de Parafilm, a fim de evitar contaminação química ou perdas por evaporação. As amostras foram, então, submetidas à análise por espectrometria de absorção atômica, no Departamento de Química da UFMG.

4.7.5 Determinação dos teores de proteína

A determinação dos teores de proteína foi feita pelo método de Kjeldahl clássico. Uma quantidade aproximada de 0,25 g de cada amostra (biomassa úmida) foi pesada em papel de seda e os valores exatos das massas foram anotados. Foram pesados também em papel de seda, aproximadamente 0,3 g de mistura catalítica composta por dióxido de titânio anidro, sulfato de cobre anidro e sulfato de potássio anidro (proporção 0,3:0,3:6). As amostras, assim como as misturas catalíticas, foram embrulhadas no papel de seda e colocadas dentro de tubos de vidro, onde foram acrescentados 5mL de ácido sulfúrico P.A. Os tubos foram identificados e posicionados em bloco digestor de proteínas, sendo a temperatura aumentada

gradualmente até atingir aproximadamente 375 °C. A digestão foi considerada concluída após aproximadamente 8 h, quando a solução contida nos tubos apresentou coloração azul-esverdeada e livre de material não-digerido (pontos pretos). Após o resfriamento da solução, esta foi transferida, com auxílio de 50 mL de água ultra-pura, para balão de destilação. Foram adicionadas 3 gotas de solução de fenolftaleína ao balão de destilação contendo a solução e este foi ligado ao conjunto de destilação (destilador de nitrogênio). Um frasco de Erlenmeyer contendo 10 mL de ácido sulfúrico 0,05 M e 3 gotas do indicador vermelho de metila foi mergulhado na extremidade afilada do sistema refrigerador do equipamento. Foi adicionado hidróxido de sódio 30% ao balão de destilação, por meio de um funil com torneira (acoplado ao equipamento), até garantir um ligeiro excesso de base. O equipamento foi ligado e aguardou-se até obtenção de volume aproximado de 75 mL do destilado no frasco de Erlenmeyer. O destilado foi titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, cujo volume gasto para titulação foi anotado (adaptado de IAL, 2008).

O teor de proteína foi calculado através da seguinte fórmula:

$$T = \frac{V \times 0,14 \times f}{P}$$

Sendo:

T = teor de proteína

V = diferença entre o volume (mL) de ácido sulfúrico 0,05M acrescentado e o volume (mL) de hidróxido de sódio 0,1M gasto na titulação.

P = nº de gramas da amostra.

f = 4,38 (fator de conversão utilizado para biomassa fúngica, considerando-se que 70% dos componentes nitrogenados presentes sejam digeríveis pelo organismo humano: 70% de 6,25 = 4,38) (MANZI *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2004; CARVALHO, 2009; ANÍBAL *et al.*, 2015).

A análise de determinação do teor de proteínas foi realizada no Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da UFMG.

4.7.6 Determinação dos perfis de ácidos graxos

Para extração dos lipídeos, foram pesados 0,5 g de cada amostra (biomassa seca) em frascos identificados e estas amostras foram trituradas com pistilo de porcelana. Foram acrescentados 10 mL de mistura clorofórmio/metanol (2:1) a cada frasco e estes foram levados a banho ultrassônico por 5 min. As soluções contidas nos frascos foram filtradas em papel filtro (poros 14 μm), e o líquido filtrado transferido para tubos criogênicos, que permaneceram em capela de exaustão para secagem dos solventes (adaptado de FOLCH *et al.*, 1957). Após a secagem, foi pipetado 1 mL de hexano em cada tubo criogênico contendo os extratos lipídicos e estes foram agitados em vórtex por 20 seg. Em seguida, foram pipetados 800 μL da fase hexânica em tubos criogênicos vazios e estes foram levados ao secador para secagem do solvente.

Para hidrólise, os extratos presentes nos tubos criogênicos foram dissolvidos em 100 μL de uma solução de etanol (95%)/hidróxido de potássio 1 mol/L (5%). Após agitação em vórtex por 10 seg, o óleo foi hidrolisado em forno de micro-ondas doméstico durante 5 min. Após resfriamento, adicionaram-se 400 μL de água mili-Q e 800 μL de acetato de etila para remoção do material não-saponificável. As camadas orgânicas foram desprezadas. Adicionaram-se, então, 100 μL de ácido clorídrico concentrado e 600 μL de acetato de etila. Após agitação em vórtex por 10 seg e repouso por 2 min, uma alíquota de 500 μL da camada orgânica foi retirada, colocada em tubos de Eppendorf e deixada em repouso para secagem por evaporação, obtendo-se, assim, os ácidos graxos livres (adaptado de CHRISTIE, 1989). Os ácidos graxos livres foram metilados com 100 μL BF_3 /metanol (14%) e aquecidos durante 10 min em banho de água a 60 $^\circ\text{C}$. Em seguida, as amostras foram secas por evaporação, diluídas com 200 μL de hexano e filtradas em SPE-Sil para retirada de corantes. Uma alíquota de 3 μL de cada amostra foi injetada no cromatógrafo gasoso (CG), nas condições descritas a seguir:

Cromatógrafo a gás HP7820A equipado com detector por ionização de chama. Utilizou-se uma coluna BP20 (SGE) 15 m x 0,22 mm x 0,25 μm com gradiente de temperatura: 100 $^\circ\text{C}$, 0 min, 7 $^\circ\text{C}/\text{min}$ até 220 $^\circ\text{C}$; injetor (split de 1/30) a 250 $^\circ\text{C}$ e detector a 260 $^\circ\text{C}$. Hidrogênio como gás de arraste (3 mL/min) e volume de injeção

de 2 µL. A identificação dos picos foi feita por comparação com padrões de ácidos graxos metilados FAME MIX C14-C22 (Supelco cat. No. 18917).

A análise cromatográfica foi executada no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química da UFMG.

4.8 Análise estatística

Os resultados estatísticos de rendimento de biomassa, teores de umidade, cinzas, macro e micronutrientes, proteínas e quantificação de esclerotiorina foram calculados por Análise de Variância (ANOVA), para avaliação da significância do modelo, e Teste de Tukey, para comparação entre as médias, utilizando-se o programa *Action Stat*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Aspecto macroscópico dos cultivos

No primeiro cultivo, as biomassas e seus respectivos caldos fermentados (meios de cultura contendo os metabólitos produzidos pelo fungo) apresentaram diferentes colorações entre os diferentes meios de cultura utilizados (Figura 5.1). A biomassa produzida no meio de cultura 6 destacou-se por apresentar forte coloração amarela (também observada no caldo fermentado), o que torna a composição desse meio de cultura de interessante exploração na área de alimentos, pela possibilidade de identificação da substância corante ou até mesmo utilização dessa biomassa na fabricação de um produto alimentício. Alguns fungos, como os do gênero *Monascus*, são utilizados em processos fermentativos, para a produção de corantes naturais, principalmente do grupo das azafilonas, que são utilizados em alguns países como aditivos em alimentos (GOMES e TAKAHASHI, 2016).



Figura 5.1 – Biomassas e caldos fermentados após 23 dias de crescimento do fungo nos diferentes meios de cultura (da esquerda para a direita: meios 1 a 11, em quadruplicata).

As biomassas e caldos fermentados do segundo cultivo também apresentaram variações nas colorações entre os diferentes meios de cultura utilizados. Conforme esperado, a coloração dos caldos apresentou-se mais clara e as biomassas produzidas foram menos exuberantes (Figura 5.2), devido à menor concentração dos nutrientes acrescentados aos meios de cultura no segundo cultivo quando em comparação com o primeiro cultivo. A biomassa do meio de cultura 6' novamente se destacou pela coloração amarela, enquanto a biomassa do meio 2' apresentou forte coloração alaranjada, indicando que a composição deste último meio (na ausência de cloreto de sódio), favoreceu a produção de uma substância diferente da produzida no meio 6' (com presença de cloreto de sódio).



Figura 5.2 – Biomassas e caldos fermentados após 20 dias de crescimento do fungo nos diferentes meios de cultura (da esquerda para a direita: meios 2' a 9', em duplicata).

A aceitabilidade de um alimento é diretamente influenciada pela cor. A associação de certas cores aceitáveis para cada alimento começa cedo no desenvolvimento cognitivo do ser humano (CLYDESDALE, 1993). Um estudo conduzido por LEE *et al.* (2013) avaliou subjetivamente a preferência de pessoas pela cor dos alimentos, através da apresentação de imagens e solicitação para que elas indicassem a cor que mais despertava seu apetite. Houve uma tendência de selecionar os alimentos que apresentavam cores mais vívidas, o que pode estar relacionado com uma propensão humana em selecionar alimentos frescos e não contaminados, baseado na percepção visual dos mesmos. PARISENTI *et al.* (2011) avaliaram a preferência de consumidores com relação à cor de camarões crus e cozidos e obtiveram maior aceitação, respectivamente, para as colorações cinza e alaranjada mais claras.

Pigmentos naturais produzidos por micro-organismos são comuns, como ankaflavinas, riboflavinas, zeaxantinas e β -carotenos de coloração amarela ou amarelo-alaranjada e antraquinonas, astaxantinas e licopenos de coloração vermelha ou róseo-avermelhada (DUFOSSÉ, 2006). GOMES (2011) comprovou a presença da substância corante esclerotiorina em extratos obtidos do cultivo de *P. sclerotiorum* em meio contendo glicose, peptona, fosfato de potássio, cloreto de sódio e sulfato de magnésio e obteve a substância purificada através de cromatografia em coluna de sílica. A esclerotiorina foi obtida como o principal metabólito produzido por fermentação em meio líquido, correspondendo a 30% do extrato fúngico seco (GOMES e TAKAHASHI, 2016).

5.2 Perfis cromatográficos dos extratos fúngicos

O cromatograma da substância esclerotiorina purificada, injetada nas mesmas condições em que os extratos foram injetados, apresentou um pico no tempo de retenção de 40 min (Figura 5.3), indicando que os picos presentes nos cromatogramas das amostras, próximos a esse mesmo tempo de retenção, correspondem a essa substância.

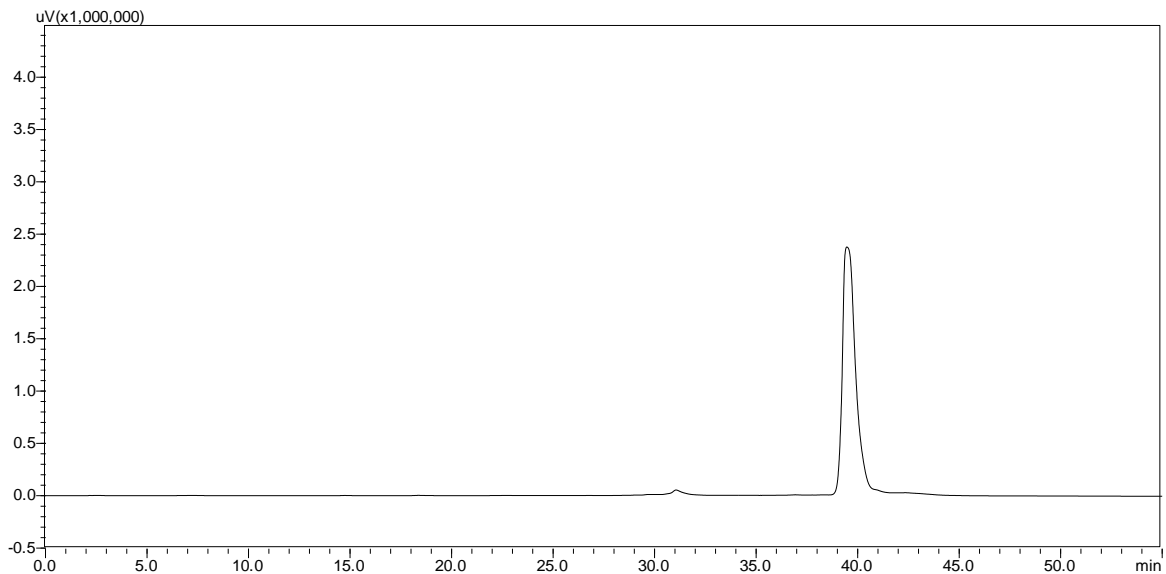


Figura 5.3 – Cromatograma (370 nm) por HPLC da substância esclerotiorina purificada.

Os perfis cromatográficos dos extratos fúngicos obtidos a partir dos diferentes meios de cultura do primeiro cultivo (Figura 5.4) variaram com relação ao tamanho dos picos, indicando que houve modulação da produção de determinados metabólitos em decorrência das alterações na composição dos meios de cultura. O cromatograma referente ao meio de cultura 6, que apresentou coloração amarela na biomassa e caldo fermentado, apresentou também maiores picos nos tempos de retenção de 15 e 20 min quando comparado aos demais, podendo estes picos representarem a (s) substância (s) responsável (eis) pela forte coloração amarela observada na biomassa e caldo desse meio de cultura. O cromatograma referente ao meio de cultura 2 apresentou maior pico no tempo de retenção próximo de 40 min (esclerotiorina) quando comparado aos demais, e o cromatograma referente ao meio de cultura 1 apresentou maior pico no tempo de retenção próximo de 34 min, quando comparado aos demais.

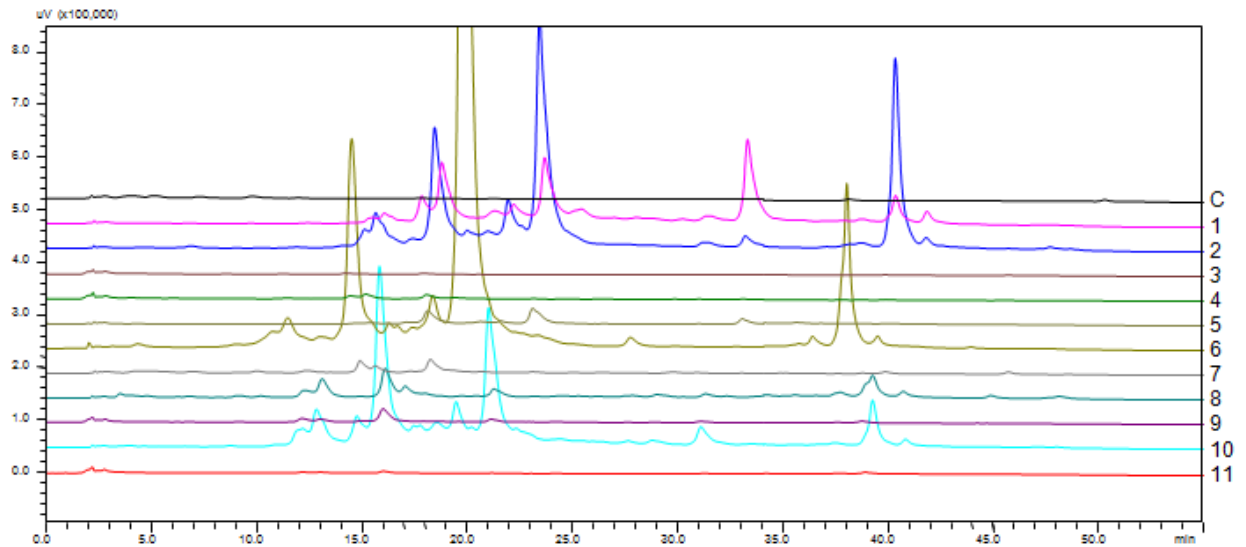


Figura 5.4 - Perfis cromatográficos (370 nm) por HPLC dos extratos do fungo nos diferentes meios de cultura do primeiro cultivo (de cima pra baixo: controle e meios de cultura 1 a 11).

Os perfis cromatográficos dos extratos fúngicos obtidos a partir dos diferentes meios de cultura do segundo cultivo (Figura 5.5) também variaram entre si com relação ao tamanho dos picos, além de apresentarem variação nos tamanhos dos picos quando em comparação com o primeiro cultivo. Os picos que aparecem nos primeiros 30 min foram menores no segundo cultivo quando comparados ao primeiro cultivo. No entanto, os picos que aparecem aos 40 min tenderam a ser maiores no segundo cultivo, indicando que a redução na concentração de nutrientes nos meios de cultura favoreceu o aumento da produção de esclerotiorina em detrimento de outros metabólitos. Novamente o cromatograma referente ao meio de cultura 6' (de composição semelhante ao meio de cultura 6, porém menos concentrado) apresentou maior pico no tempo de retenção próximo de 20 min, o qual representa, provavelmente, a substância responsável pela coloração amarela da biomassa e caldo obtidos nesse meio. Além disso, o cromatograma referente ao meio de cultura 6' apresentou maior pico aos 40 min (correspondente à esclerotiorina) quando comparado aos cromatogramas referentes aos demais meios.

As diferenças observadas entre os perfis cromatográficos do fungo nos diferentes meios de cultura podem ser explicadas através da abordagem OSMAC, segundo a qual mudanças na composição nutricional dos meios de fermentação podem alterar rotas biossintéticas do metabolismo fúngico, levando à produção de novos

metabólitos ou alterando as quantidades produzidas dos mesmos (TAKAHASHI *et al.*, 2013). HEWAGE *et al.* (2014) observaram diversificação na produção de metabólitos pelo fungo *Dothideomycete* sp.CR17 à medida em que variaram-se as fontes de batata (em pó ou fresca) utilizada no preparo do meio PDB (caldo batata dextrose) e as fontes de extrato de malte (obtido do comércio na Espanha ou nos Estados Unidos) utilizado no preparo do meio Czapek.

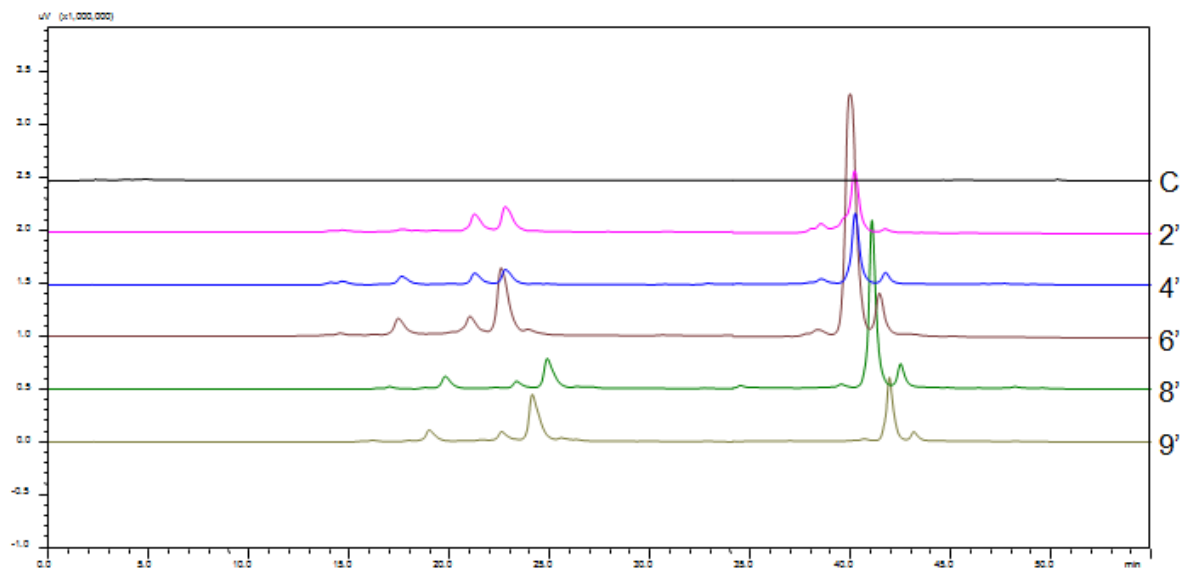


Figura 5.5 – Perfis cromatográficos (370 nm) por HPLC dos extratos do fungo nos diferentes meios de cultura do segundo cultivo (de cima pra baixo: controle e meios 2' a 9').

A escassez de nutrientes no segundo cultivo, em comparação com o primeiro, também representa um fator responsável por modular o metabolismo fúngico. Condições ambientais estressantes ao micro-organismo, as quais não foram avaliadas no presente estudo, por exemplo aquelas relacionadas à atividade de água (a_w) e temperatura, possuem diferentes impactos no crescimento fúngico e na produção de metabólitos secundários (MEDINA *et al.*, 2015). Em estudo correlacionando a atividade de água com a taxa de crescimento de três cepas de *Penicillium nordicum* em meio contendo presunto curado liofilizado, com adição de NaCl, RODRÍGUEZ *et al.* (2014) observaram maiores taxas de crescimento para as três cepas no meio com $a_w = 0,87$ (22% NaCl) em comparação ao meio com $a_w = 0,94$ (10% NaCl). Além disso, a produção de ocratoxina A pelo fungo foi maior no meio com maior concentração de sal.

Meios de cultura com abundância de nutrientes tendem a favorecer o crescimento do fungo em detrimento do metabolismo secundário. Em culturas contendo meio nutricionalmente rico, altos níveis de metabólitos secundários apenas são produzidos após a maior parte do crescimento celular haver ocorrido, uma vez que os metabólitos secundários não são necessários para o crescimento vegetativo da cultura. A regulação do metabolismo secundário pelas fontes de carbono e nitrogênio pode ser exemplificada pela repressão que glicose e altas concentrações de amônio (85 mM) exercem na produção de penicilina G por *Penicillium crysogenum*. A presença de glicose também reduz a produção de micotoxinas alcaloides por *Claviceps* sp, enquanto concentrações de amônio acima de 100 mM interferem na produção de β -lactâmicos (DEMAIN, 1986).

5.3 Quantificação de esclerotiorina

A maior produção de esclerotiorina no primeiro cultivo (0,152 mg/mL) ocorreu no meio de cultura 2, significativamente diferente dos demais meios (Tabela 5.1), o que corrobora com a observação dos perfis cromatográficos, onde o meio de cultura 2 apresentou maior pico no tempo de 40 min (que corresponde ao tempo de retenção da substância esclerotiorina). Nos demais meios de cultura, a produção de esclerotiorina variou entre 0,010 mg/mL nos meios 3, 4 e 5 e 0,046 mg/mL no meio 6, não havendo diferença significativa entre eles.

Tabela 5.1 – Quantidades (médias e desvios-padrão) de esclerotiorina produzida pelo fungo nos onze meios de cultura do primeiro cultivo.

Meio de cultura	Esclerotiorina (mg/mL)
1	0,017 \pm 0,01 b
2	0,152 \pm 0,11 a
3	0,010 \pm 0,00 b
4	0,010 \pm 0,00 b
5	0,010 \pm 0,00 b
6	0,046 \pm 0,05 b
7	0,012 \pm 0,00 b
8	0,017 \pm 0,01 b
9	0,035 \pm 0,03 b
10	0,030 \pm 0,01 b
11	0,027 \pm 0,03 b

Letras diferentes indicam que houve diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

No segundo cultivo, a produção de esclerotiorina variou entre 0,202 mg/mL no meio 2' e 0,699 mg/mL no meio 6', não havendo diferença significativa entre os valores observados (Tabela 5.2). No entanto, os valores obtidos foram superiores aos do primeiro cultivo, o que pode ser justificado pelo fato de que a biossíntese de metabólitos secundários parece ser parte de uma evolução fisiológica adaptativa a certas condições ambientais estressantes (MEDINA *et al.*, 2015). A esclerotiorina é um metabólito secundário com propriedades antimicrobianas, produzida pelo fungo *P. sclerotiorum* (LUCAS *et al.*, 2007) e a menor disponibilidade de nutrientes nos meios de cultura do segundo cultivo em comparação com o primeiro, pode ter favorecido a produção desta substância como uma resposta adaptativa a condições de possível competição por nutrientes com outros micro-organismos.

Tabela 5.2 – Quantidades (médias e desvios-padrão) de esclerotiorina produzida pelo fungo nos cinco meios de cultura do segundo cultivo.

Meio de cultura	Esclerotiorina (mg/mL)
2'	0,202 ± 0,07 a
4'	0,204 ± 0,07 a
6'	0,699 ± 0,52 a
8'	0,400 ± 0,17 a
9'	0,268 ± 0,10 a

Letras diferentes indicam que houve diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.4 Pesquisa de micotoxinas

5.4.1 Pesquisa de ocratoxina A

Nenhuma das cinco amostras analisadas apresentou valores quantificáveis para a ocratoxina A (OTA). Os cromatogramas dos extratos fortificados com OTA (padrão) (Anexo) confirmam o aparecimento de sinal com bom perfil cromatográfico no tempo de retenção de 8,6 minutos, correspondente à mesma, o que elimina a possibilidade de a ausência de detecção da micotoxina nas amostras ser devida a falhas metodológicas ou instrumentais. Os picos que aparecem nesse mesmo tempo de

retenção nos cromatogramas das amostras (Figuras 5.6 a 5.10) representam apenas ruídos, não havendo sido detectada a presença de OTA.

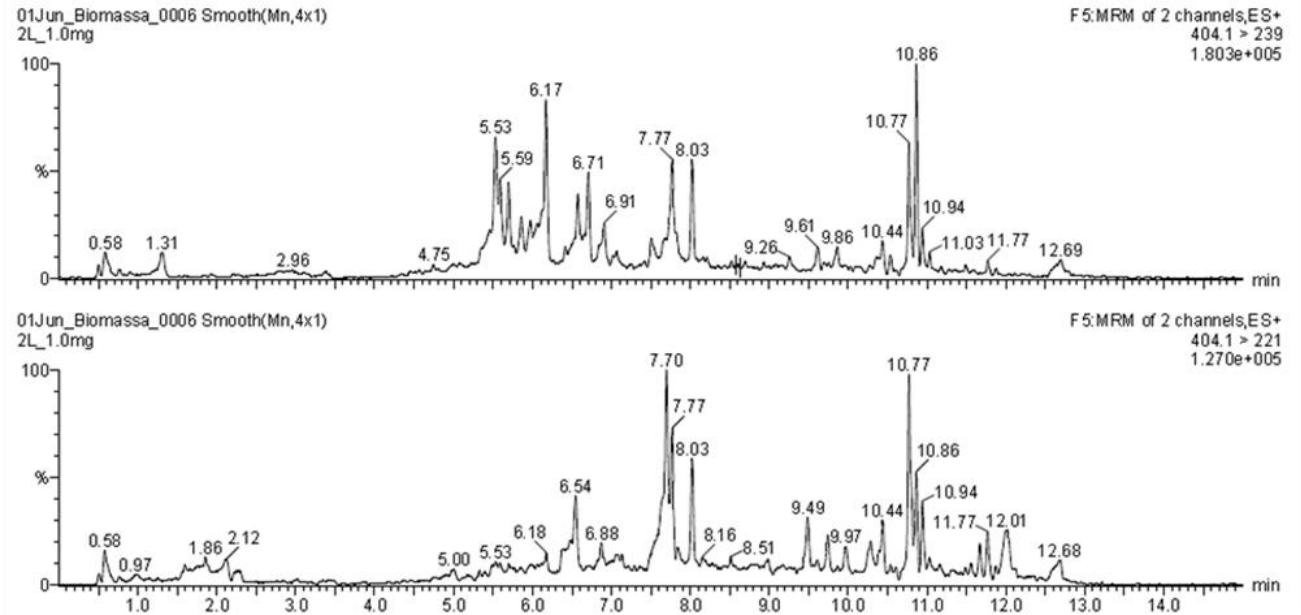


Figura 5.6 – Cromatogramas (transições de quantificação e confirmação) referentes ao extrato obtido a partir do meio de cultura 2.

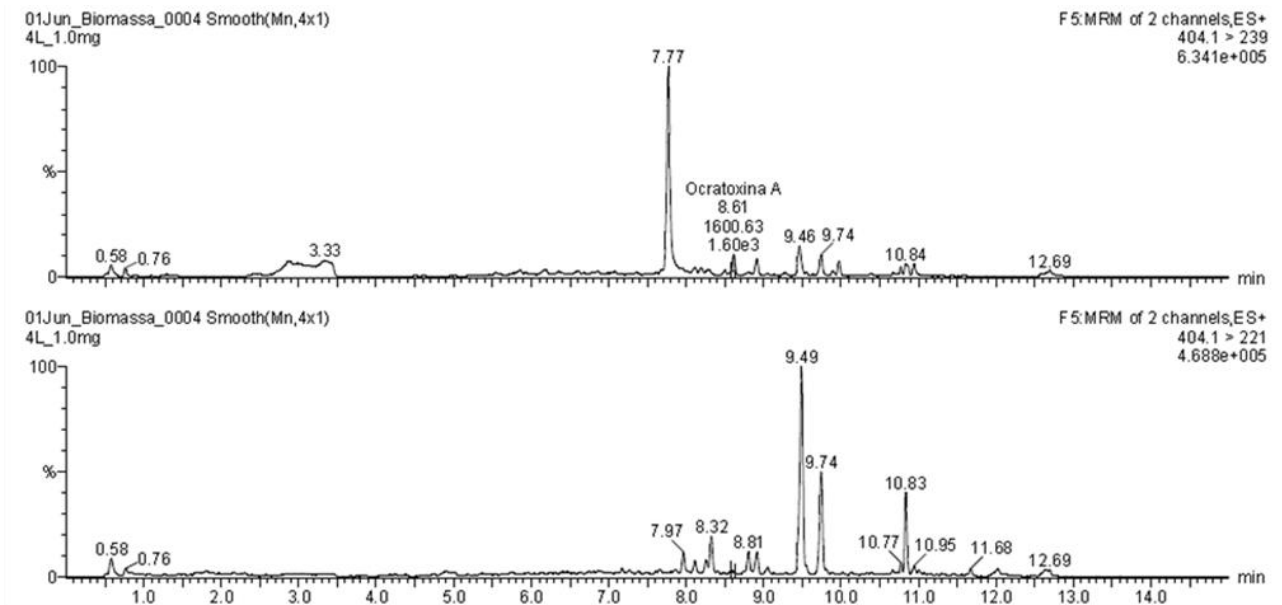


Figura 5.7 – Cromatogramas (transições de quantificação e confirmação) referentes ao extrato obtido a partir do meio de cultura 4.

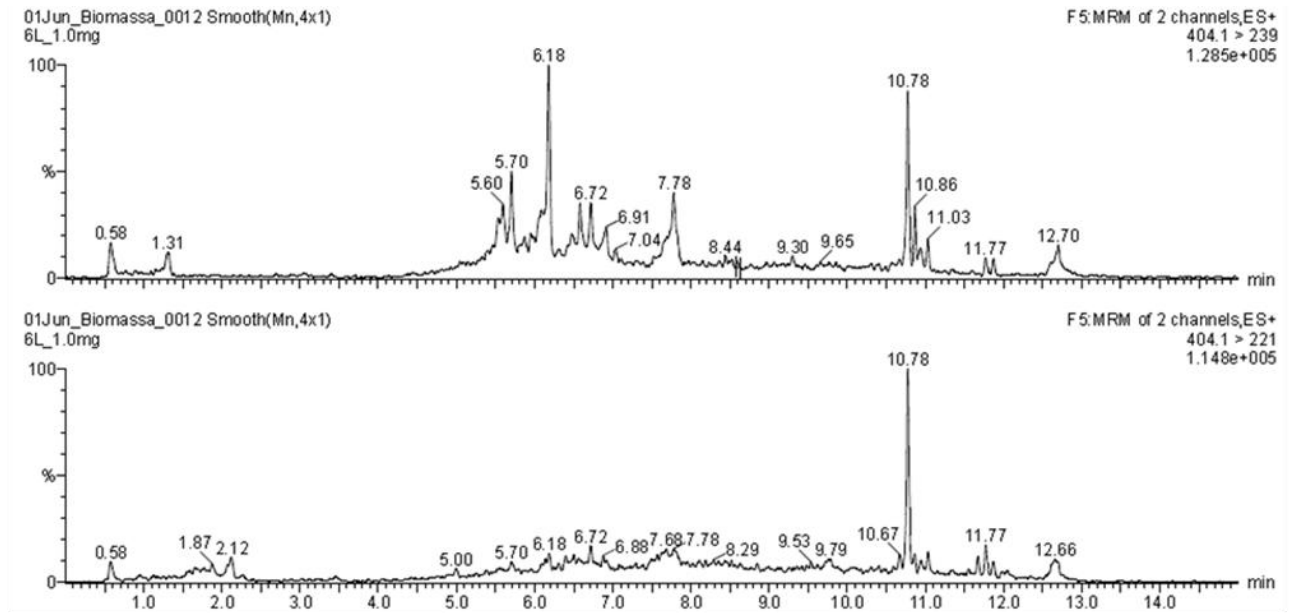


Figura 5.8 – Cromatogramas (transições de quantificação e confirmação) referentes ao extrato obtido a partir do meio de cultura 6.

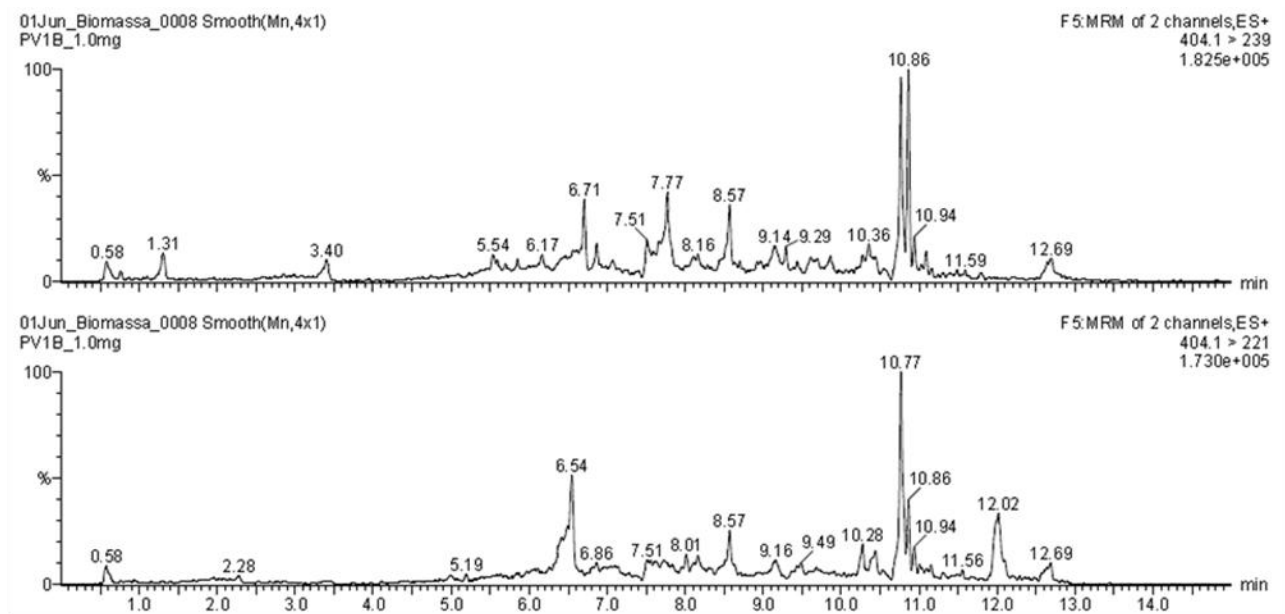


Figura 5.9 – Cromatogramas (transições de quantificação e confirmação) referentes ao extrato obtido a partir do meio de cultura 2'.

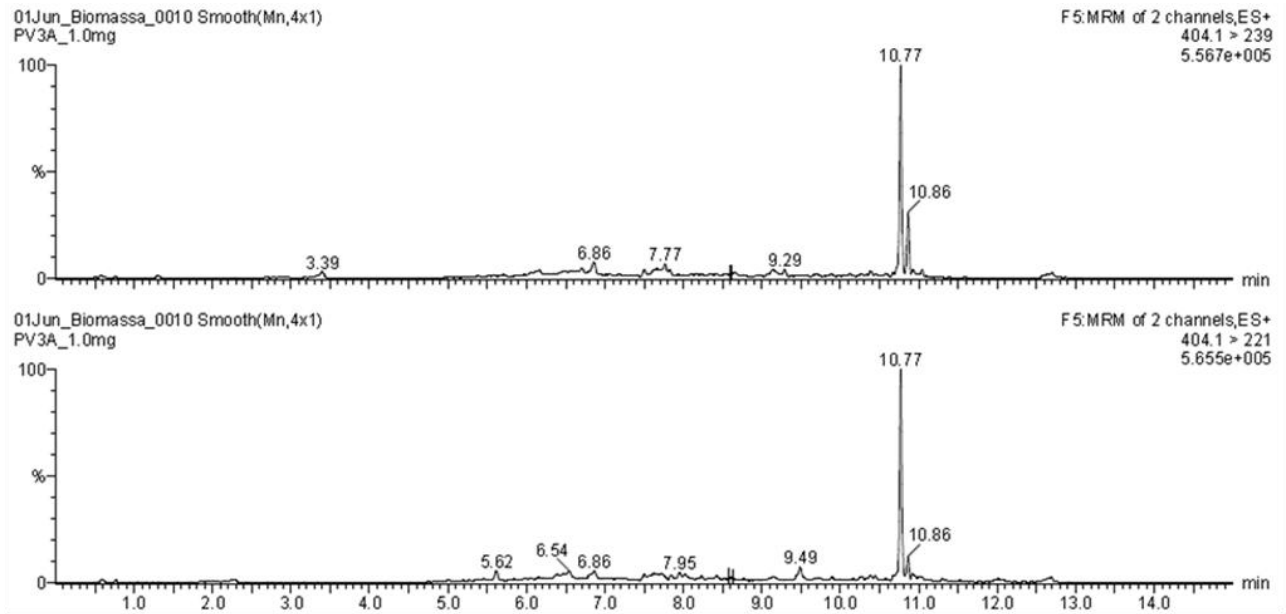


Figura 5.10 – Cromatogramas (transições de quantificação e confirmação) referentes ao extrato obtido a partir do meio de cultura 6’.

A análise de OTA foi priorizada no presente estudo, por se tratar de uma das principais micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Penicillium* e por se enquadrar, juntamente com aflatoxinas, tricotecenos, fumonisinas, zearalenona e alcalóides do ergot, no grupo das micotoxinas mais comuns e potencialmente danosas à saúde humana e animal (DESJARDINS *et al.*, 2003). A análise de alimentos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, baseada em instrumentos triplo-quadrupolo é uma excelente alternativa para detecção de OTA em matrizes complexas (RODRÍGUEZ-CABO *et al.*, 2016).

5.4.2 Pesquisa de ácido ciclopiazônico, ácido penicílico, citrinina, patulina e ocratoxinas A e B.

Nenhuma das oito amostras analisadas apresentou picos nos respectivos espectros de massas (Figuras 5.11 a 5.18), com valores de relação m/z equivalentes aos valores de relação m/z dos principais monoisótopos das moléculas das micotoxinas pesquisadas.

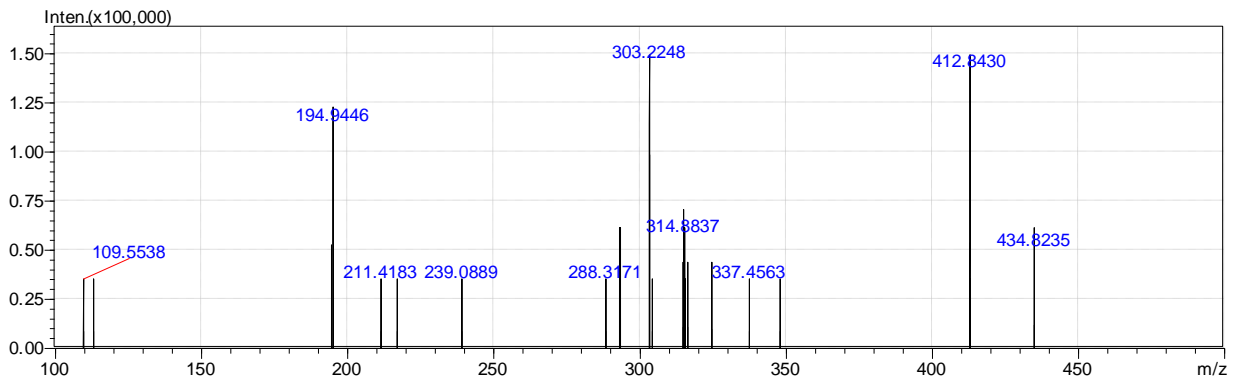


Figura 5.11 – Espectro de massas referente ao extrato obtido a partir do meio de cultura 2.

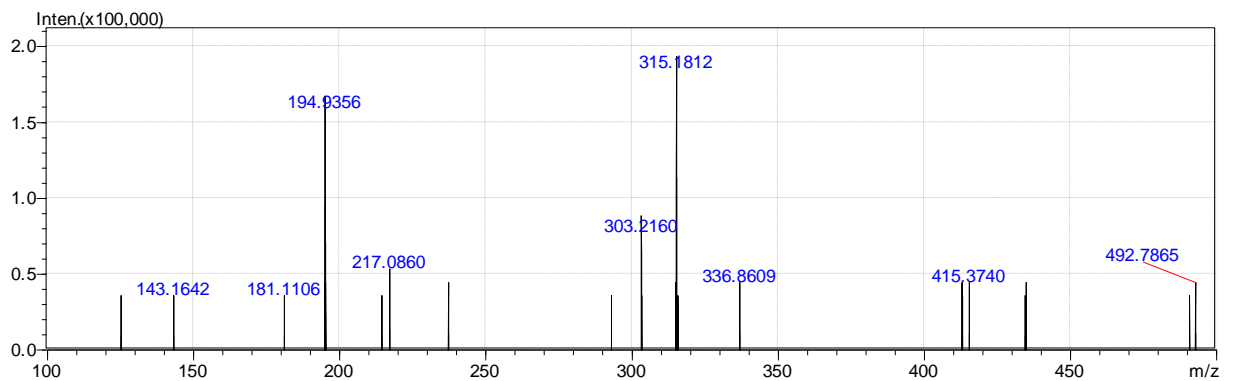


Figura 5.12 – Espectro de massas referente ao extrato obtido a partir do meio de cultura 4.

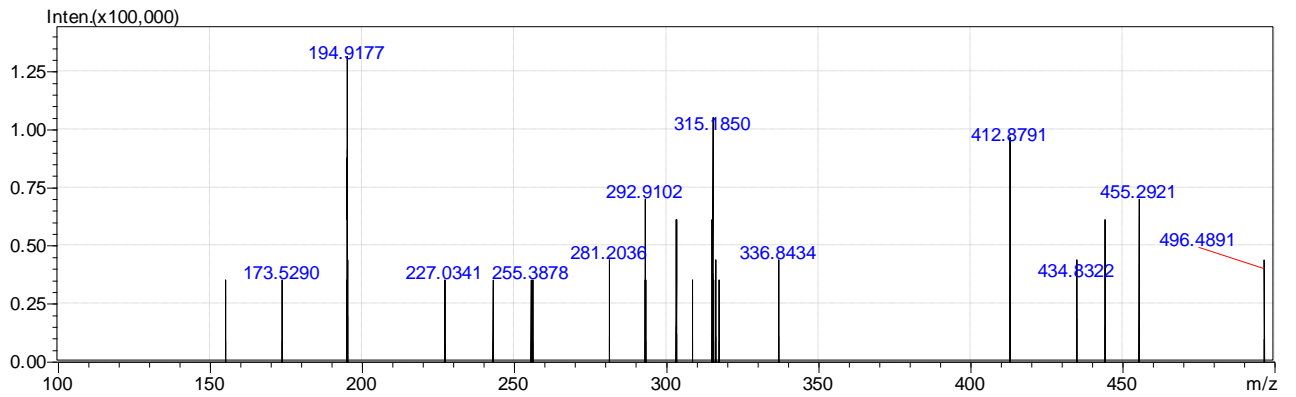


Figura 5.13 – Espectro de massas referente ao extrato obtido a partir do meio de cultura 6.

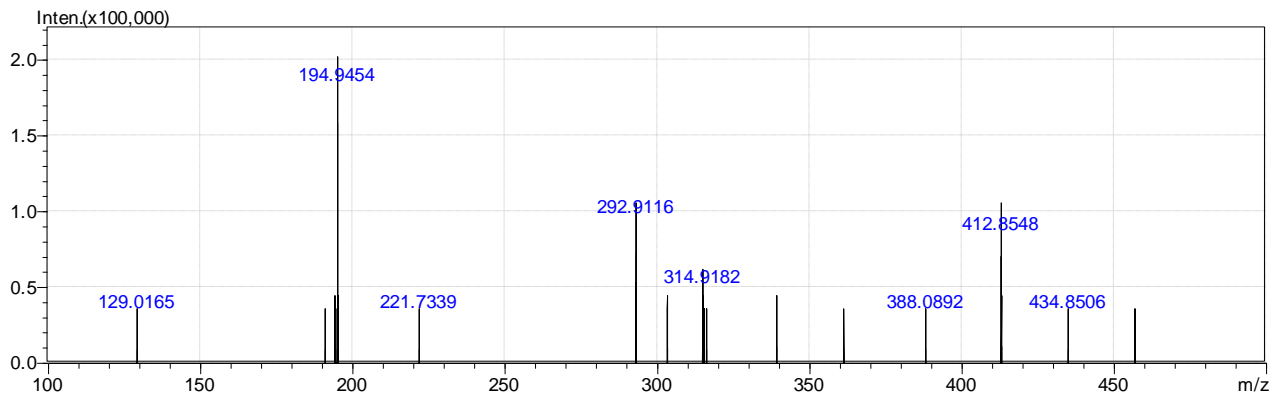


Figura 5.14 – Espectro de massas referente ao extrato obtido a partir do meio de cultura 8.

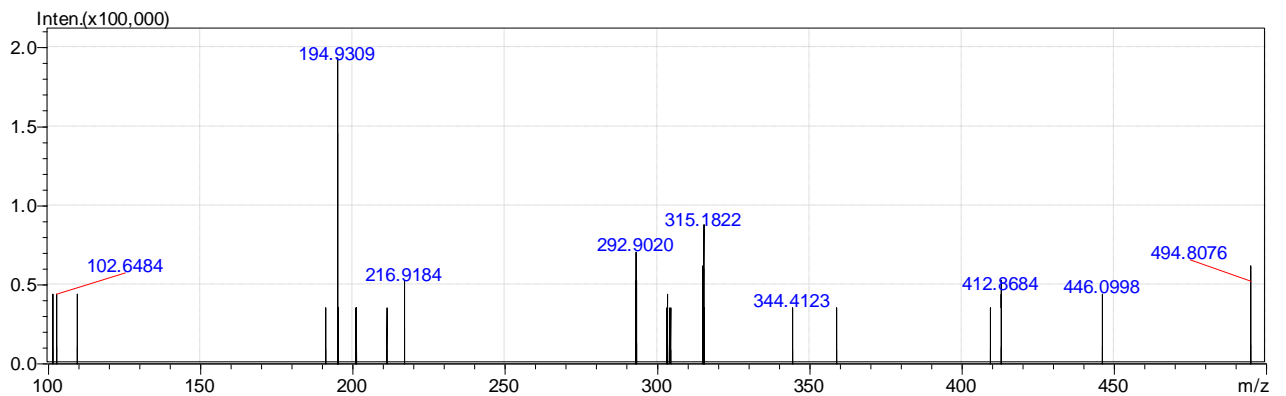


Figura 5.15 – Espectro de massas referente ao extrato obtido a partir do meio de cultura 2'.

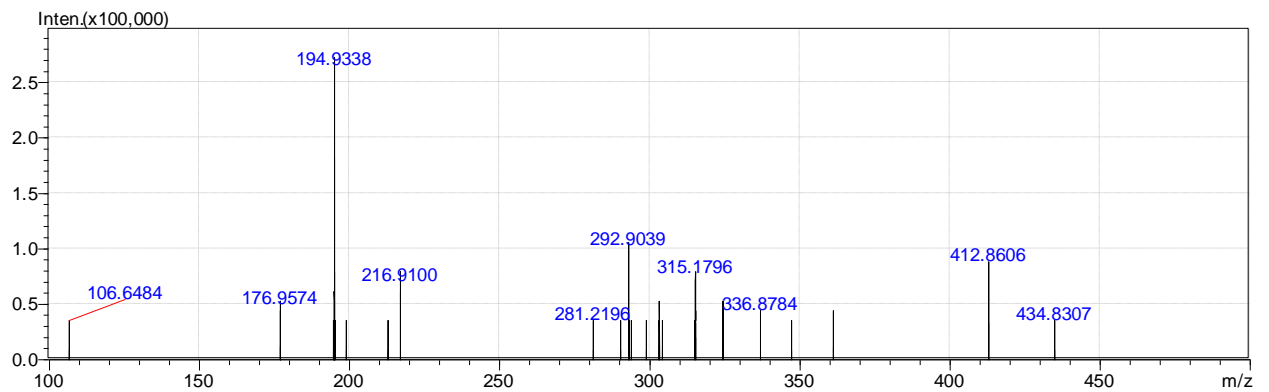


Figura 5.16 – Espectro de massas referente ao extrato obtido a partir do meio de cultura 4’.

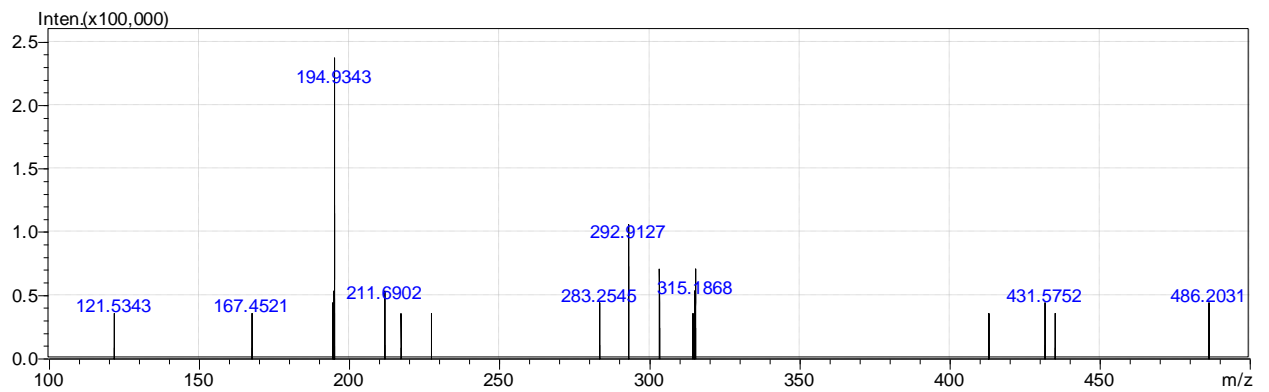


Figura 5.17 – Espectro de massas referente ao extrato obtido a partir do meio de cultura 6’.

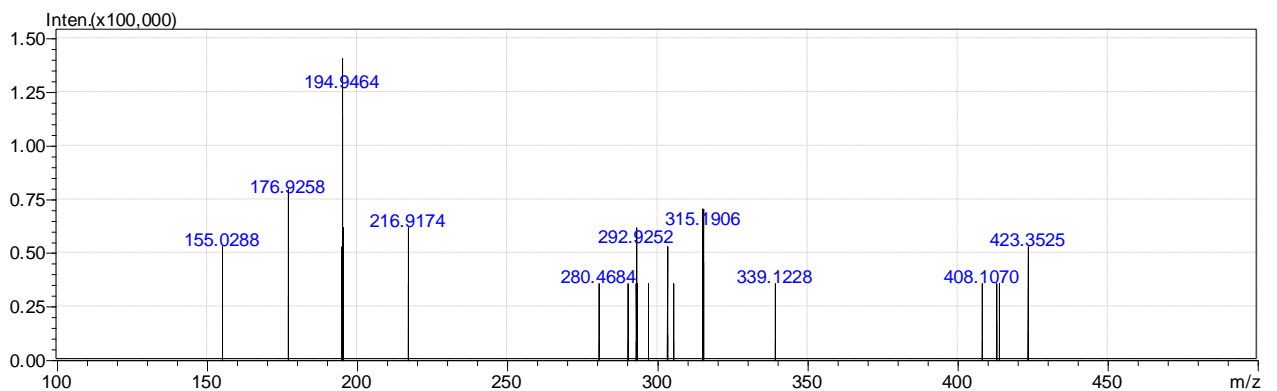


Figura 5.18 – Espectro de massas referente ao extrato obtido a partir do meio de cultura 8’.

Embora outras micotoxinas produzidas por fungos do gênero *Penicillium*, além da OTA, sejam menos comuns e não possuam muitas evidências de associação com riscos à saúde, sua pesquisa em alimentos é importante do ponto de vista da segurança alimentar. Os resultados da pesquisa de micotoxinas no presente

trabalho são coerentes com a ausência de relatos na literatura sobre a produção de micotoxinas por fungo da espécie *P. sclerotiorum*.

5.5 Estudo das biomassas

Os rendimentos médios de biomassa e teores médios de umidade, cinzas e proteína nas biomassas cultivadas nos onze meios de cultura do primeiro cultivo são apresentados na Tabela 5.3.

Os rendimentos médios de biomassa seca (Tabela 5.3) variaram de 1,89 g a 7,80 g nos meios de cultura 1 e 4, respectivamente. O meio de cultura 8 apresentou o segundo maior rendimento de biomassa (6,54 g), significativamente diferente do meio 4. Ambos os meios com maiores rendimentos de biomassa (4 e 8) continham as maiores quantidades de glicose e peptona combinadas (100 g/L de cada), o que pode ter influenciado o maior rendimento de biomassa nesses dois meios de cultura. Os meios 1 e 5 apresentaram os menores rendimentos de biomassa, respectivamente 1,89 g e 2,12 g, o que pode ser justificado pelo fato de que esses meios continham as menores quantidades de glicose e peptona combinadas (25 g/L de cada). A ausência de NaCl no meio 1 e presença no meio 5 não influenciou significativamente o rendimento de biomassa nos dois meios. Os outros pares de meios de cultura que apresentavam as mesmas quantidades combinadas de glicose e peptona (2 e 6, 3 e 7) e os três meios com quantidades intermediárias de nutrientes (9, 10 e 11) não diferiram significativamente entre si quanto ao rendimento de biomassa, apesar da ausência de NaCl nos meios 2 e 3 e presença nos meios 6 e 7.

Tabela 5.3 – Rendimentos e teores de umidade, cinzas e proteína (médias e desvios-padrão) das biomassas obtidas a partir dos onze meios de cultura do primeiro cultivo.

Meio de cultura	Composição	Rendimento de biomassa (g)	Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteína (%)
1	25 G; 25 P; 0 NaCl	1,89 ± 0,05 e	76,56 ± 4,09 ab	5,02 ± 0,07 d	41,88 ± 5,96 a
2	100 G; 25 P; 0 NaCl	5,46 ± 0,19 bc	68,48 ± 3,37 bcde	3,55 ± 0,51 d	29,44 ± 3,28 bc
3	25 G; 100 P; 0 NaCl	4,25 ± 0,32 d	80,88 ± 0,06 a	6,16 ± 0,27 d	42,30 ± 2,94 a
4	100 G; 100 P; 0 NaCl	7,80 ± 0,25 a	56,86 ± 0,26 ef	5,35 ± 0,56 d	36,18 ± 7,08 ab
5	25 G; 25 P; 25 NaCl	2,12 ± 0,01 e	70,03 ± 7,03 abc	18,11 ± 1,30 a	33,97 ± 1,14 ab
6	100 G; 25 P; 25 NaCl	6,19 ± 0,06 b	63,69 ± 0,47 cde	10,52 ± 0,50 c	21,56 ± 3,05 c
7	25 G; 100 P; 25 NaCl	4,27 ± 0,18 cd	50,22 ± 4,41 f	14,32 ± 0,39 b	34,41 ± 1,00 ab
8	100 G; 100 P; 25 NaCl	6,54 ± 1,18 b	57,63 ± 1,02 def	11,57 ± 1,43 c	32,05 ± 1,04 b
9	62,5 G; 62,5 P; 12,5 NaCl	4,97 ± 0,29 cd	72,05 ± 1,33 abc	11,00 ± 1,76 c	36,78 ± 1,90 ab
10	62,5 G; 62,5 P; 12,5 NaCl	4,52 ± 0,12 cd	37,48 ± 0,71 g	9,80 ± 0,83 c	31,83 ± 0,82 b
11	62,5 G; 62,5 P; 12,5 NaCl	4,46 ± 0,37 cd	69,60 ± 0,13 abcd	9,17 ± 0,46 c	30,89 ± 0,85 bc

Letras diferentes na mesma coluna indicam que houve diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os quatro meios de cultura que proporcionaram os maiores rendimentos de biomassa (2, 4, 6 e 8) foram aqueles com maior quantidade de glicose (100 g/L), o que evidencia a importância desse nutriente para o metabolismo fúngico. A glicose usualmente é uma excelente fonte de carbono para os micro-organismos (DEMAIN, 1986). A presença de carbono é fator modulador do crescimento microbiano. Estudo comparando o efeito da adição de fontes de carbono, nitrogênio e fósforo em 28 amostras de solo na taxa de crescimento de bactérias, mostrou que a falta de carbono limitou o crescimento bacteriano na maioria das 28 amostras e nenhum efeito positivo da adição de nitrogênio e fósforo (DEMOLING *et al.*, 2007).

Os teores médios de umidade (Tabela 5.3) variaram entre 37,48%, no meio 10, e 80,88% no meio 3. Os meios 1, 5, 9 e 11 não diferiram significativamente do meio 3, com teores de umidade de 76,56%, 70,03%, 72,05% e 69,60%, respectivamente. A ampla variação nos teores de umidade das biomassas pode ser explicada pela forma de armazenamento das mesmas antes da realização da análise (embrulhadas em papel alumínio e armazenadas em *freezer* a -18 °C), que pode ter permitido perda de água por formação de cristais de gelo no interior das biomassas, rompendo

a estrutura celular das mesmas, acarretando maior ou menor peso da biomassa úmida (antes da secagem em estufa), interferindo, conseqüentemente, no cálculo do teor de umidade (COLLA e HERNÁNDEZ, 2003). Devido a essa variação nos teores de umidades das biomassas, os resultados dos teores de cinzas, proteínas, Ca, Mg, Zn e Fe foram dados com base em peso seco (p.s.).

Os teores de umidade encontrados assemelham-se aos teores médios de umidade da carne: suína, cortes magros (53-60%), bovina (50-70%), frango (74%), peixe (65-81%) (FENNEMA, 1996), vitela (74,8%), cordeiro (72,9%) e carneiro (73,2%) (WILLIAMS, 2007). Teor de umidade de 72,5% foi relatado por ROBBERECHT *et al.* (1999) para a proteína fúngica Quorn[®]. CARVALHO (2009) encontrou valores de umidade ligeiramente superiores para as biomassas de *P. sclerotiorum* (82,6%), *Penicillium janthinellum* (75,3%), *Rhizopus stolonifer* (75,1%) e *Syncephalastrum racemosum* (83,4%) cultivados em meio contendo glicose (20 g/L), peptona (5 g/L), cloreto de sódio (5 g/L), fosfato de potássio (1 g/L) e sulfato de magnésio (0,5 g/L). Valores mais elevados de umidade em amostras de cogumelos também foram relatados por MANZI *et al.* (1999), que encontraram valores entre 85,24% e 94,70% de umidade em cogumelos do gênero *Pleurotus* e por LIU *et al.* (2016) que encontraram valores entre 81,43% e 90,93% em cogumelos dos gêneros *Suillus* e *Boletus*.

Os teores médios de cinzas (Tabela 5.3) variaram entre 3,55% no meio 2 e 18,11% no meio 5. Os teores mais baixos foram observados nas biomassas dos meios 1, 2, 3 e 4, provavelmente pelo fato de esses meios não apresentarem NaCl em sua composição, ao contrário dos demais, uma vez que Na e Cl fazem parte do conteúdo mineral.

Os teores de cinzas encontrados nas biomassas do presente estudo são semelhantes ou até mesmo superiores aos de alguns alimentos, tradicionalmente considerados importantes fontes de minerais, como leite em pó (5,96%), leite fluido de cabra (6,98%), queijo minas frescal (6,83%), brócolis cozido (5,41%), ervilha (7,04%), aveia (1,98%), semente de gergelim (3,02%), semente de linhaça (3,97%), noz (2,24%), castanha-do-brasil (3,52%), feijão carioca (3,57%), feijão preto (4,04%), ovo de galinha (3,28%), fígado bovino (5,23%), calculados com base em peso seco

(NEPA, 2011). MANZI *et al.* (1999), comparando a composição química de diferentes espécies de cogumelos cultivados em palha de trigo com 15% de beterraba, encontraram valores de cinzas entre 6,89% em *Pleurotus ostreatus* e 10,55% em *Pleurotus eryngii*, valores semelhantes aos encontrados no presente estudo. Os teores de cinzas encontrados no presente estudo foram, em geral, superiores aos relatados por CARVALHO (2009) para as biomassas de *P. sclerotiorum* (4,6% p.s.), *P. janthinellum* (4,8% p.s.), *R. stolonifer* (5,9% p.s.) e *S. racemosum* (9,1% p.s.), em meio de cultura com composição similar à utilizada no presente estudo, porém com concentrações cinco vezes menores dos nutrientes, incluindo sais, o que justifica a obtenção de um menor teor de cinzas no trabalho citado. BELUHAN e RANOGAJEC (2011) avaliaram a composição centesimal de cogumelos selvagens comestíveis coletados em regiões de floresta na Croácia e observaram teores de cinzas ligeiramente inferiores, variando entre 3,5% em *Agaricus campestris* e 10,08% em *Craterellus cornucopioides*. CHEN *et al.* (2015) também observaram valores ligeiramente inferiores em cogumelos coletados na China, variando entre 5,60% em *Lactarius tenuicystidiatus* e 9,86% em *L. volemus sensu lato*.

Os teores médios de proteína encontrados nas biomassas dos onze meios de cultura são apresentados na Tabela 5.3. Os teores de proteína das biomassas variaram entre 21,56% no meio 6 e 42,30% no meio 3. As biomassas dos meios de culturas 1, 4, 5, 7 e 9 não diferiram significativamente da biomassa do meio 3.

O método de análise utilizado no presente estudo (Kjeldahl) determina o nitrogênio orgânico total, isto é, o nitrogênio protéico e não-protéico (CECCHI, 2003). Portanto, os teores de proteína foram calculados utilizando-se fator de conversão nitrogênio/proteína igual a 4,38, uma vez que os fungos apresentam parede celular não-digerível, composta por quitina, na qual podem estar presentes compostos nitrogenados não-protéicos. O mesmo fator foi utilizado em outros estudos com cogumelos e fungos filamentosos e a escolha do fator de conversão foi feita assumindo-se que 70% dos componentes nitrogenados nos fungos filamentosos sejam digeríveis pelo organismo humano (70% de 6,25 = 4,38) (MANZI *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2004; CARVALHO, 2009; ANÍBAL *et al.*, 2015).

A quantidade recomendada de proteína a ser ingerida diariamente por uma pessoa adulta varia entre 34 e 56 g, dependendo do sexo e da idade, estimativa feita com base em 0,8 g de proteína por kg de peso corporal (DRI, 2005). Portanto, o maior teor de proteína encontrado no presente estudo representa de 76% a 124% da recomendação.

MANZI *et al.* (1999) observaram teores de proteína ligeiramente inferiores aos do presente estudo em amostras de cogumelos comestíveis, variando entre 15,19% em *L. edodes* e 34,73% em *P. ostreatus*. TORRES *et al.* (2000) relataram valores de proteína superiores aos do presente estudo para alimentos de origem animal, como peito de frango (79,42% p.s.), peito de peru (86,78% p.s.), lombo suíno (57,87% p.s.) e ovo de galinha (55,53% p.s.). Os mesmos autores, no entanto, relataram valores semelhantes aos do presente estudo para leite fluido tipo A (25,76% p.s.) e iogurte (30,36% p.s.). Tais resultados indicam que a biomassa de *P. sclerotiorum* pode representar uma alternativa ao consumo de proteína através de alimentos de origem animal, especialmente produtos lácteos, atendendo às expectativas de um mercado consumidor vegetariano ou com restrições ao consumo de cárneos/lácteos. MIRANDA *et al.* (2015) citam teor proteico ligeiramente superior ao do presente estudo para ovo de galinha (47,45% p.s.). Segundo WIEBE (2002), o valor proteico da micoproteína produzida a partir da biomassa de *F. venenatum* é de aproximadamente 44% (p.s.), valor este ligeiramente superior aos valores apresentados pelas biomassas de *P. sclerotiorum* no presente estudo, o que pode ser explicado pela presença de albumina de ovo como agente ligante na micoproteína Quorn[®], por se tratar de um produto processado (WIEBE, 2004). CARVALHO (2009) observou teores de proteína semelhantes nas biomassas de fungos filamentosos das espécies *P. sclerotiorum* (34,3% p.s.), *P. janthinellum* (37,5% p.s.), *R. stolonifer* (26,8% p.s.) e *S. racemosum* (31,1% p.s.) cultivados em meio contendo glicose (20 g/L), peptona (5 g/L), cloreto de sódio (5 g/L), fosfato de potássio (1 g/L) e sulfato de magnésio (0,5 g/L). Teores de proteína semelhantes aos encontrados no presente estudo são relatados para alguns alimentos tradicionalmente considerados fontes de proteína vegetal, como farinha de soja (38,22%), ervilha em vagem (32,33%), lentilha cozida (26,58%), feijão carioca cozido (24,49%) e feijão preto cozido (22,73%), valores calculados com base em peso seco (NEPA, 2011).

As quantidades médias de Ca, Mg, Zn e Fe presentes nas biomassas obtidas a partir dos onze meios de cultura do primeiro cultivo são apresentadas na (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Teores (médias e desvios-padrão) de Ca, Mg, Zn e Fe presentes nas biomassas fúngicas obtidas a partir dos onze meios de cultura do primeiro cultivo.

Meio de cultura	Ca (mg/100g)	Mg (mg/100g)	Zn (mg/100g)	Fe (mg/100g)
1	69,3 ± 7,9 bc	154,2 ± 9,6 a	1,4 ± 0,2 a	1,2 ± 0,3 a
2	22,3 ± 2,8 cd	116,2 ± 13,2 abc	0,9 ± 0,1 a	0,9 ± 0,0 a
3	81,4 ± 4,6 b	125,6 ± 9,5 abc	1,7 ± 0,3 a	1,6 ± 0,1 a
4	52,3 ± 1,0 bcd	103,4 ± 11,1 bc	1,4 ± 0,0 a	1,1 ± 0,3 a
5	71,7 ± 7,2 b	145,4 ± 8,9 ab	2,0 ± 0,9 a	1,3 ± 0,9 a
6	11,9 ± 4,3 b	87,9 ± 13,1 c	1,4 ± 0,4 a	0,6 ± 0,0 a
7	88,8 ± 4,7 b	100,3 ± 8,4 c	3,0 ± 0,2 a	1,6 ± 0,6 a
8	92,6 ± 18,1 ab	87,2 ± 7,7 c	2,1 ± 0,1 a	1,7 ± 0,4 a
9	58,4 ± 27,6 bcd	96,8 ± 13,4 c	2,2 ± 1,3 a	0,8 ± 0,2 a
10	62,0 ± 17,9 bc	104,0 ± 17,6 bc	1,6 ± 0,3 a	1,4 ± 0,1 a
11	137,5 ± 5,9 a	118,2 ± 0,8 abc	2,8 ± 0,7 a	1,1 ± 0,0 a

Letras diferentes na mesma coluna indicam que houve diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Comparando-se o desempenho das biomassas dos onze meios de cultura na produção de macro e micronutrientes, a biomassa do meio 11 destacou-se por apresentar o maior teor de Ca (não diferindo significativamente da biomassa do meio 8), enquanto a biomassa do meio 1 destacou-se por apresentar o maior teor de Mg (não diferindo significativamente das biomassas dos meios 2, 3, 5 e 11). Não houve diferença significativa nas quantidades de Zn e Fe entre as biomassas dos onze meios de cultura.

A recomendação de ingestão diária de Ca varia entre 1000 e 1300 mg/dia para um ser humano adulto, dependendo do sexo e da idade (DRI, 2005). O maior teor de Ca observado neste estudo (137,5 mg/100g) representa 11% a 14% desta recomendação. MANZI *et al.* (1999), avaliando o conteúdo mineral em cogumelos comestíveis, observaram teores de Ca mais baixos em comparação com os do presente estudo, variando entre 19,1 mg/100g em *Pleurotus pulmonarius* e 48,6

mg/100g em *P. ostreatus*. ROBBERECHT *et al.* (1999), estudando os conteúdos de minerais em alimentos vegetarianos na Bélgica, encontrou os seguintes teores de Ca: 33,7 mg/100g em quinoa, 53,4 mg/100g em lentilha, 58,7 mg/100g em cevada torrada, 81,2 mg/100g em feijão vermelho, 115,4 mg/100g em grão-de-bico, 216 mg/100g em linhaça e 1098,0 mg/100g em semente de gergelim. Para a proteína fúngica Quorn[®], o mesmo autor relata um teor de Ca igual a 42,3 mg/100g, com base em peso úmido (p.u.). CARVALHO (2009) obteve teor de Ca ligeiramente superior a partir da biomassa de *P. sclerotiorum* (73,8 mg/100g p.s.) quando comparado à quantidade média produzida pelo mesmo fungo nos onze meios de cultura no presente estudo (68,0 mg/100g p.s.). Para outras espécies estudadas pelo mesmo autor, os valores de Ca foram: *P. janthinellum* (4,9 mg/100g p.s.), *R. stolonifer* (105,3 mg/100g p.s.) e *S. racemosum* (258,4 mg/100g p.s.). Menores teores de Ca foram relatados por SOOMRO *et al.* (2016) para milho (27,6 mg/100g), berinjela (17,3 mg/100g), tomate (10,7 mg/100g), carne caprina (6,9 mg/100g) e carne vermelha (13,7 mg/100g).

As quantidades médias de Mg variaram entre 87,2 mg/100g no meio 8 e 154,2 mg/100g no meio 1. Os valores de Mg encontrados foram, em geral, superiores aos valores de Ca, provavelmente devido à inclusão deste elemento como ingrediente nos meios de cultura em forma de sulfato de magnésio (MgSO₄). A recomendação de ingestão diária de Mg varia entre 240 e 420 mg/dia para um ser humano adulto, dependendo do sexo e da idade (DRI, 2005), o que significa que o maior valor de Mg obtido no presente estudo (154,2 mg/100g) corresponde a 37 a 64% da recomendação.

MANZI *et al.* (1999) observaram valores mais elevados de Mg em amostras de cogumelos comestíveis, variando entre 116,5 mg/100g em *L. edodes* e 203,2 mg/100g em *P. ostreatus*. No entanto, CARVALHO (2009) obteve menores teores de Mg a partir das biomassas de *P. sclerotiorum* (67,4 mg/100g p.s.), *P. janthinellum* (58,1 mg/100g p.s.) e *R. stolonifer* (85,9 p.s.) e maior teor a partir da biomassa de *S. racemosum* (3438 mg/100g p.s.) quando comparados aos teores encontrados no presente estudo. ROBBERECHT *et al.* (1999), relatou a presença de Mg em amostra da proteína fúngica Quorn[®] na quantidade de 36,3 mg/100g (p.u.).

Os elementos Ca e Mg, por apresentarem altas necessidades de ingestão diária, são considerados macronutrientes. Já os elementos Zn e Fe apresentam baixas necessidades de ingestão diária e são considerados micronutrientes (CECCHI, 2003).

Não houve diferença significativa entre os teores de Zn nas diferentes biomassas do presente estudo. A recomendação de ingestão diária de Zn varia entre 8 e 11 mg/dia para um ser humano adulto, dependendo do sexo e da idade (DRI, 2005). Portanto o teor médio de Zn encontrado (1,9 mg/100g) corresponde a 17% a 24% desta recomendação.

CARVALHO (2009) obteve teores semelhantes de Zn a partir das biomassas de *P. sclerotiorum* (1,3 mg/100g p.s.), *P. janthinellum* (1,2 mg/100g p.s.), *R. stolonifer* (0,9 mg/100g p.s.) e *S. racemosum* (1,7 mg/100g p.s.). ROBBERECHT *et al.* (1999) relatou teores de Zn em alimentos vegetarianos na Bélgica: 2,8 mg/100g em quinoa, 5,0 mg/100g em lentilha, 2,6 mg/100g em grão-de-bico, 4,4 mg/100g em linhaça e 5,0 mg/100g em semente de gergelim. Para a proteína fúngica Quorn[®], o mesmo autor relata uma quantidade de Zn igual a 7,2 mg/100g (p.u.).

Não houve diferença significativa entre os teores de Fe nas diferentes biomassas do presente estudo. A recomendação de ingestão diária de Fe varia entre 8 e 18 mg/dia para um ser humano adulto, dependendo do sexo e da idade (DRI, 2005). Portanto, o teor médio de Fe encontrado (1,2 mg/100g) corresponde a 7 a 15% da recomendação.

Os teores de Fe nas biomassas do presente estudo assemelham-se a teores relatados por SOOMRO *et al.* (2016) para frutas como banana (1,2 mg/100g), manga (0,40 mg/100g), ameixa (1,0 mg/100g), melão (1,40 mg/100g) e melancia (0,30 mg/100g).

O perfil de ácidos graxos é apresentado na Tabela 5.5. Ao todo, dez ácidos graxos foram identificados nas biomassas dos meios de cultura 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 11. Foram identificados: ácido dodecanoico ou láurico (C12:0), ácido tetradecanoico ou mirístico (C14:0), ácido pentadecanoico (C15:0), ácido hexadecanoico ou palmítico

(C16:0), ácido hexadecenoico ou palmitoleico (C16:1), ácido heptadecanoico ou margárico (C17:0), ácido octadecanoico ou esteárico (C18:0), ácido octadecenoico ou oleico (C18:1), ácido octadecadienoico ou linoleico (C18:2) e ácido octadecatrienoico ou linolênico (C18:3) (COULTATE, 2002).

Não foram detectados ácidos graxos nas biomassas dos meios de cultura 1, 2 e 10, devido à interferência de substâncias presentes nos extratos lipídicos obtidos destes meios de cultura, as quais dificultaram a análise por cromatografia. O ácido graxo encontrado em maior quantidade em todos os extratos analisados foi o ácido linoleico (C18:2), seguido pelos ácidos palmítico (C16:0) e oleico (C18:1). Outros ácidos graxos não identificados foram encontrados em pequenas quantidades. Os cromatogramas dos perfis de ácidos graxos encontram-se no Anexo.

Tabela 5.5 – Teores (%) de ácidos graxos nos extratos lipídicos das biomassas de oito dos onze meios de cultura.

Ácido graxo	Meio de cultura							
	3	4	5	6	7	8	9	11
C12:0 láurico	0,7	0,1	1,7	0,4	0,1	0,5	0,0	0,1
C14:0 mirístico	0,6	0,3	1,3	0,4	0,2	0,6	0,2	0,2
C15:0 pentadecanoico	1,1	0,3	2,3	0,6	0,4	0,8	0,5	0,4
C16:0 palmítico	17,7	20,1	23,2	16,3	12,7	20	15,3	14,5
C16:1 palmitoleico	0,7	0,6	1,5	1,6	0,4	1,5	0,5	0,5
C17:0 margárico	2,2	1,0	3,6	0,7	1,6	1,2	1,6	1,0
C18:0 esteárico	5,8	6,5	11	4,8	4,1	6,1	5,1	3,3
C18:1 oleico	13,8	19,3	12,3	11,8	10,6	16,3	12,1	11,3
C18:2 linoleico	54,1	50,1	40,7	61,3	66,7	50,4	62,9	66,4
C18:3 linolênico	1,1	0,6	0,5	0,6	0,9	0,6	0,8	1,1
outros	2,2	1,2	2,1	1,5	2,4	2,1	1,0	1,0

Dos dez ácidos graxos identificados, seis são saturados (láurico, mirístico, pentadecanoico, palmítico, margárico e esteárico). No entanto, dentre aqueles encontrados em maiores quantidades, destacam-se dois ácidos graxos insaturados: oleico, que é monoinsaturado, e linoleico, que é poli-insaturado. Os ácidos linolênico

e palmitoleico também são insaturados, mas foram encontrados em menores quantidades.

A maior porcentagem do ácido linoleico foi observada na amostra referente ao meio de cultura 7 (66,7%), seguida pela amostra do meio de cultura 11 (66,4%). O menor teor foi observado na amostra do meio de cultura 5 (40,7%). O maior teor do ácido linolênico foi observado nas amostras dos meios de cultura 1 e 11 (1,1% para ambas), seguida pela amostra do meio de cultura 7 (0,9%). O menor teor foi observado novamente na amostra do meio de cultura 5 (0,5%). O maior teor de ácido oleico, por sua vez, foi observado na amostra do meio de cultura 4 (19,3%) e o menor teor, na amostra do meio de cultura 7 (10,6%).

As proporções de ácidos graxos insaturados/saturados nas amostras foram de 2,5:1 na amostra 3; 2,5:1 na amostra 4; 1,2:1 na amostra 5; 3,2:1 na amostra 6; 4,1:1 na amostra 7; 2,4:1 na amostra 8; 3,4:1 na amostra 9 e 4,1:1 na amostra 11. Devido à associação entre a ingestão de ácidos graxos e a ocorrência de aterosclerose, desconsiderando-se outros fatores de risco, os guias nutricionais focam na redução da contribuição da gordura no conteúdo de energia total de uma dieta e a redução da proporção de ácidos graxos saturados (COULTATE, 2002). Portanto, a melhor proporção entre ácidos graxos insaturados/saturados obtida neste estudo foi observada nas amostras correspondentes aos meios de cultura 7 e 11 (4,1:1). YLMAZ *et al.* (2006) relataram proporções semelhantes de ácidos graxos insaturados/saturados em amostras de corpo de frutificação de cogumelos das espécies *A. bisporus* (2,9:1), *Agaricus campestris* (3,7:1), *Boletus edulis* (5,6:1), *Coprinus comatus* (2,9:1), *P. ostreatus* (5,2:1), *Oudemansiella radicata* (4,6:1) e *Armillaria mellea* (5,2:1). ÖZTÜRK *et al.* (2011) também observaram proporções semelhantes nas espécies *A. bisporus* (3,9:1), *Agaricus bitorquis* (3,4:1) e *Agaricus essettei* (3,4:1). METZ *et al.* (2009) analisaram o perfil de ácidos graxos no músculo *longissimus dorsi* de novilhos e observaram proporção de ácidos graxos insaturados/saturados de 1:1,1 em novilhos jovens (abatidos aos 22 meses de idade) e superjovens (abatidos aos 13 meses de idade), sendo, portanto, a quantidade de ácidos graxos saturados maior do que a de insaturados no músculo analisado. ROSSATO *et al.* (2010) analisaram o músculo *longissimus thoracis* de bovinos terminados a pasto e observaram menor proporção entre ácidos graxos

saturados/insaturados para as raças Angus (1:1) e Nelore (1,1:1), em comparação com o presente estudo. A comparação dos perfis de ácidos graxos em amostras de origem fúngica e amostras de origem animal evidencia a qualidade nutricional da biomassa fúngica como fonte de ácidos graxos insaturados. CARVALHO *et al.* (2010), comparando os perfis de ácidos graxos de *P.sclerotiorum*, *S. racemosum* e *P. janthinelum*, observaram maiores níveis de ácidos graxos poli-insaturados em comparação com ácidos graxos saturados e monoinsaturados para os três fungos. *P. sclerotiorum* foi, dentre os três, o que apresentou os níveis mais altos de poli-insaturados, sendo os ácidos *trans*-linolelaídico e *cis*-linoléico C18:2 (n-6) os principais componentes. Neste mesmo trabalho, os ácidos graxos encontrados em maiores quantidades para as biomassas dos três fungos avaliados, também foram linoleico, palmítico e oleico. AHANGI *et al.* (2008) relataram teores ligeiramente inferiores de ácidos linoleico (31,6%) e linolênico (0,08%), mas teores superiores de ácidos palmítico (13,2%) e oleico (37,9%) em amostra de micoproteína produzida a partir do fungo *Fusarium oxysporum* (PTCC5115). Os conteúdos de ácidos graxos relatados por REIS *et al.* (2012) para cogumelos foram, em geral, superiores aos encontrados no presente estudo. Para ácidos linoleico e linolênico os teores foram, respectivamente: 77,7% e 0,1% em *A. bisporus* champignon, 79,4% e 0,1% em *A. bisporus* portobello, 68,9% e 0,1% em *P. ostreatus*, 68,8% e 0,3% em *P. eryngii*, 81,1% e 0,1% em *L. edodes* e 45,4% e 28,8% em *F. velutipes*. No caso do ácido oleico, os valores encontrados pelo mesmo autor foram ligeiramente menores do que os do presente estudo: 1,1% em *A. bisporus* champignon, 1,2% em *A. bisporus* portobello, 12,3% em *P. ostreatus*, 12,3% em *P. eryngii*, 2,3% em *L. edodes* e 5,7% em *F. velutipes*.

Os ácidos linoleico (C18:2^{cis9,12}ω6), também conhecido como ômega-6, e linolênico (C18:3^{cis9,12,15}ω3), também conhecido como ômega-3, são considerados ácidos graxos essenciais na dieta de mamíferos. O requerimento dos ácidos graxos poli-insaturados deve-se à ausência, nos mamíferos, das acil-coA graxo dessaturases, que introduzem um dupla ligação entre a posição 9 de um ácido graxo monoinsaturado e a terminação metileno da cadeia carbônica. Esses ácidos graxos poli-insaturados são precursores de ácidos graxos altamente insaturados, incluindo o ácido araquidônico (C20:4^{cis5,8,11,14}ω6), ácido eicosapentóico (C20:5^{cis5,8,11,14,17}ω3) e ácido decosahexaenoico (C22:6^{cis4,7,10,13,16,19}ω3) (SEALLS *et al.*, 2008).

O balanço entre ômega-6 e ômega-3 na dieta é de grande importância, uma vez que mediadores inflamatórios relacionados a doenças crônicas derivados de ômega-6 são mais potentes do que aqueles derivados de ômega-3. Uma taxa desbalanceada ômega-6/ômega-3 em favor de ômega-6 é altamente pro-trombótica e pro-inflamatória, contribuindo para a prevalência de aterosclerose, obesidade e diabetes. Portanto, taxas de ômega-6/ômega-3 de 2/1 ou 1/1 são recomendadas (SIMOPOULOS, 2016).

Ômega-6 é abundante na natureza e é encontrado nas sementes da maioria das plantas, exceto côco, cacau e palma. Ômega-3, por sua vez, é encontrado em vegetais verdes folhosos e em linhaça, canola, chia, perilla e nozes (SIMOPOULOS, 2016). ANTA *et al.* (2013), estudaram os principais alimentos consumidos como fontes de ácidos graxos por um grupo de 1068 adultos de dez províncias da Espanha e observaram que pescado, carnes, lácteos e gorduras/azeite foram as principais fontes de ômega-3 consumidas, enquanto carnes, cereais, frutas e lácteos foram as principais fontes de ômega-6. Pode ser observado, portanto, que os alimentos que são considerados as principais fontes de ácidos graxos essenciais nem sempre são os mais consumidos como fontes de tais nutrientes.

Em humanos, ômega 6 e ômega 3 são necessários para manter, sob condições normais, as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Também participam da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular, sendo denominados essenciais por não serem sintetizados pelo organismo (MARTIN, 2006). O ácido linoleico é componente essencial da estrutura da membrana lipídica, além de estar envolvido com a sinalização celular e ser precursor de eicosanoides (mediadores inflamatórios). Também é requerido para o funcionamento normal da pele (DRI, 2005). Ratos alimentados com uma dieta totalmente livre de gorduras mostram uma vasta gama de sintomas agudos que afetam a pele, o sistema vascular, os órgãos reprodutivos e o metabolismo lipídico. Os sintomas em ratos podem ser eliminados através da ingestão de ácido linoleico ou araquidônico (COULTATE, 2002).

Os mais importantes de todos os ácidos graxos naturalmente ocorrentes contendo duplas ligações *trans* são os ácidos linoleicos conjugados (CLAs) (COULTATE, 2002). CLA é um grupo de isômeros geométricos e posicionais do ácido linoleico, cujas principais fontes são as carnes de ruminantes e produtos lácteos (também há produtos enriquecidos pela adição de CLA extraído de óleo de cártamo) e tem provocado intensa pesquisa científica devido a potenciais efeitos benéficos à saúde, demonstrados em experimentos com animais e culturas celulares, incluindo a redução de gordura corporal e efeitos anticarcinogênico, antidiabetogênico e modulador do sistema imunológico (HARO *et al.*, 2006).

O ácido oleico, também conhecido como ômega-9, é o principal componente do óleo de oliva, o qual é a fonte primária de gordura na dieta do Mediterrâneo, conhecida pela baixa incidência de doenças cardiovasculares, Parkinson, Alzheimer e câncer (ALBUQUERQUE *et al.*, 2016). O ácido oleico possui efeitos moduladores de funções fisiológicas relatados na literatura, como funções anticarcinogênica e contra doenças auto-imunes e inflamatórias (SALES-CAMPOS *et al.*, 2013).

6 CONCLUSÕES

O emprego de diferentes combinações e/ou concentrações de nutrientes nos meios de cultura provocou modulação do metabolismo de *P. sclerotiorum*, levando à produção de biomassas com diferentes rendimentos, colorações e composições nutricionais, bem como caldos fermentados com diferentes colorações e perfis cromatográficos com variações quali e quantitativas.

Os meios de cultura utilizados no segundo cultivo (com menores concentrações de nutrientes) favoreceram a produção de esclerotiorina pelo fungo quando comparados aos meios de cultura utilizados no primeiro cultivo.

A ausência de detecção de micotoxinas produzidas pelo gênero *Penicillium* nas amostras analisadas neste estudo indica que, provavelmente, *P. sclerotiorum* não é produtor de tais substâncias nas condições de cultivo empregadas. No entanto, maior número de amostras deve ser analisado em estudos posteriores a fim de se comprovar essa informação.

As biomassas dos onze meios de cultura do primeiro cultivo apresentaram bom perfil nutricional comparando-se com dados da literatura, não havendo superioridade de um meio de cultura em particular com relação a todos os nutrientes. Novos estudos devem ser conduzidos, avaliando a interferência de outros fatores sobre o perfil nutricional e rendimento de biomassa de *P. sclerotiorum*.

A possibilidade de obtenção de elevados rendimentos de biomassa, elevados teores de proteína e ácidos graxos essenciais, adequando-se a composição do meio de cultura utilizado no cultivo de *P. sclerotiorum*, indica o potencial dessa espécie fúngica para cultivo em escala industrial com a finalidade de produção de um alimento.

Em geral, os resultados obtidos apontam para a segurança e a qualidade nutricional do uso da biomassa de *P. sclerotiorum* como um alimento.

7 REFERÊNCIAS

- AHANGI, Z.; SHOJAOSADATI, S. A.; NIKOOPOUR, H. **Study of Mycoprotein Production Using *Fusarium oxysporum* PTCC 5115 and Reduction of its RNA Content.** Pakistan Journal of Nutrition 7 (2): 240-243, **2008**.
- AKILANDESWARI,P.; PRADEEP, B. V. **Exploration of industrially important pigments from soil fungi.** Appl. Microbiol. Biotechnol. **(2016)** 100:1631-1643.
- ALBUQUERQUE, C. F. G.; MORAES, I. M. M.; OLIVEIRA, F. M. J.; BURTH, P.; BOZZA, P. T.; FARIA, M. V. C.; SILVA, A. R.; NETO, H. C. C. F. **Omega-9 Oleic Acid Induces Fatty Acid Oxidation and Decreases Organ Dysfunction and Mortality in Experimental Sepsis.** PLOS ONE **2016**.
- ANÍBAL, C.; FARENZENA, S.; RODRÍGUEZ, M. S.; ALBERTENGO, L. **Chemical composition and nutritional value of Argentine commercial edible mushrooms.** J. Journal of Consumer Protection and Food Safety. **(2015)** 10:155-164.
- ANTA, R. M. O.; RODRÍGUEZ, L. G. G.; CRUZ, T. K. V.; SÁNCHEZ, J. M. P.; VIZUETE, A. A.; SOBALER, A. M. L. **Fuentes alimentarias y adecuación de la ingesta de ácidos grasos Omega-3 y Omega-6 en una muestra representativa de adultos españoles.** Nutrición Hospitalaria **2013**; 28 (6): 2236-2245.
- AOAC. **Official methods of analysis.** Gaithersburg: Published by AOAC International, **2012**.
- ARUNPANICHLERT,J.;RUKACHAISIRIKUL,V.;SUKPONDMA,Y.;PHONGPAICHT,S .;TEWTRAKU,S.;RUNGJINDAMAI, N.;SKAYAROJ, J. **Azaphilone and Isocoumarin Derivatives from the Endophytic Fungus *Penicillium sclerotiorum* PSU-A13.** Chem. Pharm. Bull. 58 (8) 1033-1036 **(2010)**.
- BELIK, W. **Perspectivas para segurança alimentar e nutricional no Brasil. Saúde e Sociedade.** v.12, n.1, p.12-20, jan-jun **2003**. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/sausoc/v12n1/04.pdf>> Acesso em: 24 de mar. 2016.
- BELUHAN, S.; RANOGAJEC, A. **Chemical composition and non-volatile components of Croatian wild edible mushrooms.** Food Chemistry 124 **(2011)** 1076-1082.
- BENNET, J. W. **Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology.** Journal of Biotechnology 66 **(1998)** 101-107.
- BENNET, J. W.; KLICH, M. **Mycotoxins.** Clinical Microbiology Reviews, July **2003**, p. 497-516.
- BIGLIARDI, B.; GALATI, F. **Innovation trends in the food industry: the case of functional foods.** Trends in Food Science & Technology 31 **(2013)** 118-129.

- BODE, H. B.; BETHE, B.; HÖFS, R.; ZEECK, A. **Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity**. ChemBioChem, **2002**, 3, 619-627.
- BRASIL. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. **Diversidade biológica e conservação da floresta atlântica ao norte do rio São Francisco**. Seção II, capítulo 4. Brasília, **2005**.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA. **Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. Diário Oficial da União, DOU nº 37, de 22-2-2011.
- CARVALHO, S. A. **Avaliação do potencial de fungos filamentosos como fonte de nutrientes e ácidos graxos de interesse para a indústria alimentícia**. Tese. Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química UFMG. Belo Horizonte, **2009**.
- CARVALHO, S. A.; COELHO, J. V.; TAKAHASHI, J. A. **Screening Filamentous Tropical Fungi for their Nutritional Potential as Sources of Crude Proteins, Lipids and Minerals**. Food Science and Technology International. 16 (**2010**) 315-320.
- CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Editora Unicamp. 2ª edição revista. **2003**.
- CHEN, X. H.; LI, J. J.; ZHAO, B. Q. **Proximate composition, acute toxicity and antioxidative property of *Lactarius tenuicystidiatus*, a new species**. Journal of Food Safety 35 (**2015**) 161-171.
- CHIDANANDA, C.; RAO, L. J. M.; SATTUR, A. P. **Sclerotiorin, from *Penicillium frequentans*, a potent inhibitor of aldose reductase**. Biotechnology Letters (**2006**) 28: 1633-1636.
- CHIDANANDA, C.; SATTUR, A. P. **Sclerotiorin, a Novel Inhibitor of Lyxogenase from *Penicillium frequentans***. Journal of Agricultural and Food Chemistry **2007**, 55, 2879-2883.
- CHRISTIE, W. W. **Gas chromatography and lipids – a practical guide**. The Oily Press. **1989**. Disponível em: <<https://sceaqa.files.wordpress.com/2012/05/gaschromatographyandlipids.pdf>> Acesso em: 20 ago. 2016.
- CLYDESDALE, F. M. **Color as a Factor in Food Choice**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 33 (1): 83-101 (**1993**).
- COLLA, L. M.; HERNÁNDEZ, C. P. **Congelamento e descongelamento – sua influência sobre os alimentos**. Vetor, Rio Grande, 13: 53-66, **2003**.

COULTATE, T. P. **Food – the chemistry of its components**. Royal Society of Chemistry. 4th edition. **2002**.

DEMAIN, A. L. **Regulation of secondary metabolism in fungi**. Pure & Appl. Chem., vol. 58, nº 2, pp. 219-226, **1986**.

DEMOLING, F.; FIGUEROA, D.; BAATH, E. **Comparison of factors limiting bacterial growth in different soil**. Soil Biology & Biochemistry 39 (**2007**) 2485-2495.

DESJARDINS, A. E.; RICHARD, J. L.; PAYNE, G. A.; MARAGOS, C.; NORRED, W. P.; PESTKA, J. J.; PHILLIPS, T. D.; VAN EGMOND, H. P.; VARDON, P. J.; WHITAKER, T. B.; WOOD, G. **Micotoxins – Risks in Plant, Animal and Human Systems**. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, USA. **2003**. Disponível em: < http://www.trilogylab.com/uploads/Mycotoxin_CAST_Report.pdf> Acesso em: 01 de ago. 2016.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products – a biosynthetic approach**. Second Edition. John Wiley & Sons, LTD. **2002**.

DOMBRINK-KURTZMAN, M. A.; BLACKBURN, J. A. **Evaluation of several culture media for production of patulin by *Penicillium* species**. International Journal of Microbiology 98 (**2005**) 241-248.

DRI, DIETARY REFERENCE INTAKES. **Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino acids (2002/2005)**. Disponível em: < https://fnic.nal.usda.gov/sites/fnic.nal.usda.gov/files/uploads/recommended_intakes_individual.pdf> Acesso em: 31 ago. 2016.

DUFOSSÉ, L. **Microbial Production of Food Grade Pigments**. Food Technol. Biotechnol. 44 (3) 313-321 (**2006**).

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. Policy Brief. **Food Security**. June **2006**. Issue 2. Disponível em: < <http://www.fao.org/forestry/13128-0e6f36f27e0091055bec28ebe830f46b3.pdf>> Acesso em: 24 de mar. 2016.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. **FAO Statement on Biotechnology**. Disponível em: < <http://www.fao.org/biotech/fao-statement-on-biotechnology/en/>> Acesso em: 07 de jan. **2016**.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Microorganisms & Microbial-Derived Ingredients Used in Food (Partial List)**. **2015**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/MicroorganismsMicrobialDerivedIngredients/default.htm>> Acesso em: 05 de jan. 2016.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Mycoprotein GRAS notification**. **2001**. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/downloads/food/ingredientspackaginglabeling/gras/noticainventori/ucm266876.pdf>> Acesso em: 1 de jun. 2016.

FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. University of Wisconsin-Madison. Marcel Dekker, Inc. **1996**.

FERREIRA, A. G.; ROMANO, L. H.; JUNIOR, A. C. B.; SOUSA, C. P.; BAPTISTANETO, A. **Estudo cinético de produção de pigmento em fungo filamentosos**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v.36 supl.1, **2015**.

FINKELSTEIN, D. B.; BALL, C. **Biotechnology of Filamentous Fungi – Technology and Products**. **1992**. Pagina 7. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=zFfgBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=filamentous+fungi+biotechnology&ots=047JXYDvAt&sig=AlHQpl6swlVoDQjsbZvPWY_K0KA#v=onepage&q=filamentou s%20fungi%20biotechnology&f=false> Acesso em: 05 de jan. 2016.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. **A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues**. J. Biol. Chem. **1957**, 226: 497-509.

GADD, G. M. **Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation**. Microbiology (**2010**), 156, 609-643.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. **Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation**. Enzyme and Microbial Technology 32 (**2003**) 246-251.

GHORAI, S.; BANIK, S.P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. **Fungal biotechnology in food and feed processing**. Food Research International 42 (**2009**) 577-587.

GOMES, D. C. **Produção de esclerotiorina por *Penicillium sclerotiorum* e obtenção de derivados com aplicação potencial em alimentos**. Dissertação. Faculdade de Farmácia UFMG. Belo Horizonte, **2011**.

GOMES, D. C.; TAKAHASHI, J. A. **Sequential fungal fermentation-biotransformation process to produce a red pigment from sclerotiorin**. Food Chemistry. V. 210, **2016**, 355-361.

GRIMM, L. H.; KELLY, S.; KRULL, R.; HEMPEL, D. C. **Morphology and productivity of filamentous fungi**. Applied Microbiology and Biotechnology (**2005**) 69: 375-384.

HEWAGE, R. T.; AREE, T.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTAKOOP, P. **One strain-many compounds (OSMAC) method for production of polyketides**,

azaphilones and isochromanone using the endophytic fungus *Dothideomycete* sp. *Phytochemistry* 108 (2014) 87-94.

IAL, INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Secretaria de Estado de Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** 4ª edição. 1ª edição digital. São Paulo, 2008.

KNIGHT, N.; ROBERTS, G.; SHELTON, D. **The thermal stability of Quorn™ pieces.** *International Journal of Food Science and Technology* 2001, 36,47-52.

KNOB, A.; CARMONA, E. C. **Xylanase Production by *Penicillium sclerotiorum* and its Characterization.** *World Applied Sciences Journal* 4 (2): 277-283, 2008.

KNOB, A.; CARMONA, E. C. **Cell-associated acid β -xylosidase production by *Penicillium sclerotiorum*.** *New Biotechnology.* vol. 26, n.1/2, 2009.

KUHAD, R. C.; SINGH, A.; TRIPATHI, K. K.; SAXENA, R. K.; ERIKSSON, K. E. L. **Microorganisms as an Alternative Source of Protein.** *Nutrition Reviews*, vol. 55, n. 3. 1997: 65-75.

LEATHAM, G. F. **Frontiers in Industrial Mycology.** 1992. Pagina XI. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=XYLrBwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR11&dq=fungi+biotechnology&ots=1G7LdYfGvl&sig=_cCQfZoZ7saXe8p4hCMUxcUeZyY#v=onepage&q=fungi%20biotechnology&f=false> Acesso em: 05 de jan. 2016.

LEE, S. M.; LEE, K. T.; LEE, S. H.; SONG, J. K. **Origin of human colour preference for food.** *Journal of Food Engineering* 119 (2013) 508-515.

LIMA, M. S.; SANTOS, B. A. C.; SOARES, J. M. M. Q.; LIMA, T. R. A.; SILVA, T. H. L. **Potencial de fungos filamentosos na produção de enzimas utilizando diferentes fontes de amido.** *Revista Brasileira de Agrotecnologia.* V. 5, n. 1 (2015) páginas 49-53.

LIU, Y.; CHEN, D.; YOU, Y.; ZENG, S.; LI, Y.; TANG, Q.; HAN, G.; LIU, A.; FENG, C.; LI, C.; SU, Y.; SU, Z.; CHEN, D. **Nutritional composition of boletus mushrooms from Southwest China and their antihyperglycemic and antioxidant activities.** *Food Chemistry* 211 (2016) 83-91.

LOTTENBERG, A. M. P. **Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular.** *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 2009; 53/5.

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

LUCKNER, M. **Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg GmbH. 1984. p.16-22. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=FwXtCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA12&dq=secondary+metabolism+what+is&ots=P0qmC7CE5&sig=9jDEI8GQjdvFePZEEYFPyGFaJXo#v=onepage&q=secondary%20metabolism%20what%20is&f=false>> Acesso em: 05 de jun. 2016.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12ª edição. Porto Alegre. Artmed, 2010.

MANSFIELD, M. A.; KULDAU, G. A. **Microbiological and molecular determination of mycobiota in fresh and ensiled maize silage**. Mycologia, 99 (2), 2007, pp. 269-278.

MANSFIELD, M. A.; JONES, A. D.; KULDAU, G. A. **Contamination of Fresh and Ensiled Maize by Multiple *Penicillium* Mycotoxins**. Phytopathology Vol. 98, No. 3, 2008.

MANZI, P.; GAMBELLI, L.; MARCONI, S.; VIVANTI, V.; PIZZOFRERATO, L. **Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study**. Food Chemistry 65 (1999) 477-482.

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. **Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos**. Rev. Nutr., Campinas, 19 (6):761-770, 2006.

MARTINS, L. R. **Avaliação do potencial biotecnológico de fungos brasileiros em reações de biotransformação e biorremediação**. Tese. Instituto de Ciências Exatas. Departamento de Química UFMG. Belo Horizonte, 2009.

MATASSA, S.; BOON, N.; PIKAAR, I.; VERSTRAETE, W. **Microbial protein: future sustainable food supply route with low environmental footprint**. Microbial Biotechnology (2016).

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L.S. **Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil**. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais. Campina Grande. V. 12, n. 1, páginas 89-99, 2010.

MEDINA, A.; SCHMIDT-HEYDT, M.; RODRÍGUEZ, A.; PARRA, R.; GEISEN, R.; MAGAN, N. **Impacts of environmental stress on growth, secondary metabolite biosynthetic gene clusters and metabolite production of xerotolerant/xerophilic fungi**. Curr. Genet.(2015) 61: 325-334.

METZ, P. A. M.; MENEZES, L. F. G.; SANTOS, A. P.; BRONDANI, I. L.; RESTLE, J.; LANNA, D. P. D. **Perfil de ácidos graxos na carne de novilhos de diferentes idades e grupos genéticos terminados em confinamento**. Revista Brasileira de Zootecnia, v.38, n.3, p.523-531, 2009.

MIRANDA, J. M.; ANTON, X.; REDONDO-VALBUENA, C.; ROCA-SAAVEDRA, P.; RODRIGUEZ, J. A.; LAMAS, A.; FRANCO, C. M.; CEPEDA, A. **Egg and Egg-Derived Foods: Effects on Human Health and Use as Functional Foods.** *Nutrients* **2015**, 7, 706-729.

NEPA. NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. Universidade de Campinas – UNICAMP. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO.** 4ª edição revisada e ampliada. Campinas – SP, **2011**. Disponível em: < http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada> Acesso em: 21 jan. de 2017.

NHMRC, AUSTRALIAN NATIONAL HEALTH AND MEDICAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Reference Values for Australia and New Zealand – Magnesium.** **2006**. Disponível em: < <https://www.nrv.gov.au/nutrients/magnesium>> Acesso em: 03 set. 2016.

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; CASPER, H. H. **Molecular Phylogenetic, Morphological, and Mycotoxin Data Support Reidentification of the Quorn Mycoprotein Fungus as *Fusarium venenatum*.** *Fungal Genetics and Biology* **23**, 57-67 (1998).

ÖZTÜRK, M.; DURU, M. E.; KIVRAK, S.; DOĞAN, N. M.; TÜRKÖĞLU, A.; ÖZLER, M. A. ***In vitro* antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: A comparative study on the three most edible mushrooms.** *Food and Chemical Toxicology* **49** (2011) 1353-1360.

PAPAGIANNI, M. **Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes.** *Biotechnology Advances* **22** (2004) 189-259.

PARISENTI, J.; BEIRÃO, L. H.; TRAMONTE, V. L. C. G.; OURIQUE, F.; BRITO, C. C. S.; MOREIRA, C. C. **Preference ranking of colour in raw and cooked shrimps.** *International Journal of Food Science and Technology* **2011**, 46, 2558-2561.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. **Toxic effects of mycotoxins in humans.** *World Health Organization. Bulletin of the World Health Organization*, **1999**, 77 (9). Páginas 754-766.

PEREIRA, A. R. B.; FREITAS, D. A. F. **Uso de microorganismos para a biorremediação de ambientes impactados.** *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental.* V (6), nº 6, p.975-1006, **2012**.

PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos.** Ed. Manole, edição 1, **2005**, cap. 6: Extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas.

REBOLÉ, A.; VELASCO, S.; RODRÍGUEZ, M. L.; TREVIÑO, J.; ALZUETA, C.; TEJEDOR, J. L.; ORTIZ, L. T. **Nutrient content in the muscle and skin of fillets from farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Food Chemistry* **174** (2015) 614-620.

REIS, F. S.; BARROS, L.; MARTINS, A.; FERREIRA, I. C. F. R. **Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study.** Food and Chemical Toxicology 50 (2012) 191-197.

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

ROBBERECHT, H.; HENDRIX, P.; VAN CAUWENBERGH, R.; VAN DYCK, K.; DEELSTRA, H. **Mineral and trace element content of various vegetarian foodstuffs available in Belgium.** Z Lebensm Unters Forsch A (1999) 208:156-161.

RODRÍGUEZ, A.; MEDINA, A.; CÓRDOBA, J. J.; MAGAN, N. **The influence of salt (NaCl) on ochratoxin A biosynthetic genes, growth and ochratoxin A production by three strains of *Penicillium nordicum* on a dry-cured ham-based medium.** International Journal of Food Microbiology 178 (2014) 113-119.

RODRÍGUEZ-CABO, T.; RODRÍGUEZ, I.; RAMIL, M.; CELA, R. **Liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry selective determination of ochratoxin A in wine.** Food Chemistry 199 (2016) 401-408.

ROSSATO, L. V.; BRESSAN, M. C.; RODRIGUES, E. C.; GAMA, L. T.; BESSA, R. J. B.; ALVES, S. P. A. **Parâmetros físico-químicos e perfil de ácidos graxos da carne de bovinos Angus e Nelore terminados em pastagem.** Revista Brasileira de Zootecnia, v. 39, n.5, p.1127-1134, 2010.

RUNDBERGET, T.; WILKINS, A. L. **Determination of *Penicillium* mycotoxins in foods and feeds using liquid chromatography-mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, 964 (2002) 189-197.

RUNDBERGET, T.; SKAAR, I.; FLAOYEN, A. **The presence of *Penicillium* and *Penicillium* mycotoxins in food wastes.** International Journal of Food Microbiology 90 (2004) 181-188.

SALES-CAMPOS, H.; SOUZA, P. R.; PEGHINI, B. C.; SILVA, J. S.; CARDOSO, C. R. **An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease.** Mini Rev. Med. Chem. 2013; 13 (2): 201-10.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia industrial.** v. 2, Engenharia bioquímica. 2001. Editora Edgard Blücher. p.5-10.

SEALLS, W.; GONZALEZ, M.; BROSNAN, M. J.; BLACK, P. N.; DIRUSSO, C. C. **Dietary polyunsaturated fatty acids (C18:2 ω 6 and C18:3 ω 3) do not suppress hepatic lipogenesis.** Biochimica et Biophysica Acta 1781 (2008) 406-414.

SIMOPOULOS, A. P. **An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk of Obesity.** Nutrients 2016, 8, 128.

SINGH, M. P.; LEIGHTON, M. M.; BARBIERI, L. R.; ROLL, D. M.; URBANCE, S. E.; HOSHAN, L.; MCDONALD, L. A. **Fermentative production of self-toxic fungal**

secondary metabolites. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (2010) 37:335-340.

SMITH, H.; DOYLE, S.; MURPHY, R. **Filamentous fungi as a source of natural antioxidants.** Food Chemistry 185 (2015) 389-397.

SOOMRO, S. I.; MEMON, N.; BHANGER, M. I.; MEMON, S.; MEMON, A. A. **Mineral content of Pakistani foods: An update of food composition database of Pakistan through indirect method.** Journal of Food Composition and Analysis 51 (2016) 45-54.

SOUZA, P. M. **Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro.** Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP. São Paulo, 2015.

SOUZA, P. M. **Produção de protease por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro.** Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. São Paulo, 2015.

SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R.C.; FELBER, A.C.; AZEVEDO, J.L.; PAMPHILE, J.A. **Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos.** UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde 2014; 16 (4): 345-51.

STAJICH, J. E.; BERBEE, M. L.; BLACKWELL, M.; HIBBETT, D. S.; JAMES, T. Y.; SPATAFORA, J. W.; TAYLOR, J. M. **The fungi.** Current Biology V. 19, Issue 18, pR840-pR845, 2009.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A.D.W. **Review: Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species.** International Journal of Food Microbiology 43 (1998) 141-158.

TAKAHASHI, J. A.; MONTEIRO DE CASTRO, M.C.; SOUZA, G.G.; LUCAS, E. M. F.; BRACARENSE, A. A. P.; ABREU, L. M.; MARRIEL, I. E.; OLIVEIRA, M. S.; FLOREANO, M. B.; OLIVEIRA, T. S. **Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes*, and *Listeria monocytogenes*.** Journal de Mycologie Médicale (2008) 18, 198-204.

TAKAHASHI, J. A.; TELES, A. P. C.; BRACARENSE, A. A. P.; GOMES, D. C. **Classical and epigenetic approaches to metabolite diversification in filamentous fungi.** Phytochem. Ver. (2013) 12: 773-789.

TOMODA, H.; MATSUSHIMA, C.; TABATA, N.; NAMATAME, I.; TANAKA, H.; BAMBERGER, M. J.; ARAI, H.; FUKAZAWA, M.; INOUE, K.; OMURA, S. **Structure-specific Inhibition of Cholesteryl Ester Transfer Protein by Azaphilones.** The Journal of Antibiotics, vol. 52, no. 2, 1999, p. 160-170.

TORRES, E. A. F. S.; CAMPOS, N. C.; DUARTE, M.; GARBELOTTI, M. L.; PHILIPPI, S. T.; RODRIGUES, R. S. M. **Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.20, n.2, 2000.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ª edição. Editora artmed. 2012.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ª edição. Editora Atheneu. 2008

TRINCI, A. P. J. **A Kinetic Study of the Growth of *Aspergillus nidulans* and Other Fungi**. J. gen. Microbiol. (1969), 57, 11-24.

TRINCI, A. P. J. Myco-protein: **A twenty-year overnight succes story**. Mycological Research 96 (1): 1-13 (1992).

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAM, S; PILETSKY, S.A. **Analytical methods for determination of mycotoxins: a review**. Analytica Chimica Acta 632 (2009) 168-180.

VANDERMOLEN, K. M.; RAJA, H. A.; EL-ELIMAT, T.; OBERLIES, N. H. **Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program**. Applied and Industrial Microbiology and Biotechnology 2013, 3:71.

WANG, Z. P.; WANG, G.Y.; KHAN, I.; CHI, Z.M. **High-level production of calcium malate from glucose by *Penicillium sclerotiorum* K302**. Bioresource Technology 143 (2013) 674-677

WANG, X. M.; ZHANG, J.; WU, L. H.; ZHAO, Y. L.; LI, T.; LI, J. Q.; WANG, Y. Z.; LIU, H. G. **A mini-review of chemical composition and nutritional value of edible wild-grown mushroom from China**. Food Chemistry 151 (2014) 279-285.

WARD, O. P. **Production of recombinant proteins by filamentous fungi**. Biotechnology Advances 30 (2012) 1119-1139.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer, IARC. **Agents classified by the IARC monographs**, volumes 1-116. Disponível em: < <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>> Acesso em: 29 ago. 2016.

WIEBE, M. G.; ROBSON, G. D.; TRINCI, A. P. J. **Peptone changes the timing and accumulation of morphological mutants of the Quorn® myco-protein fungus *Fusarium graminearum* A3/5 in glucose-limited chemostat cultures**. FEMS Microbiology Letters 169 (1998) 23-28.

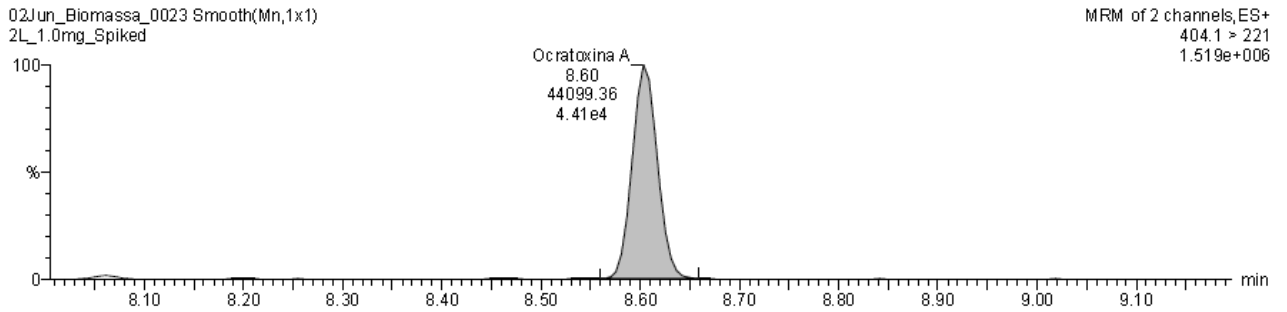
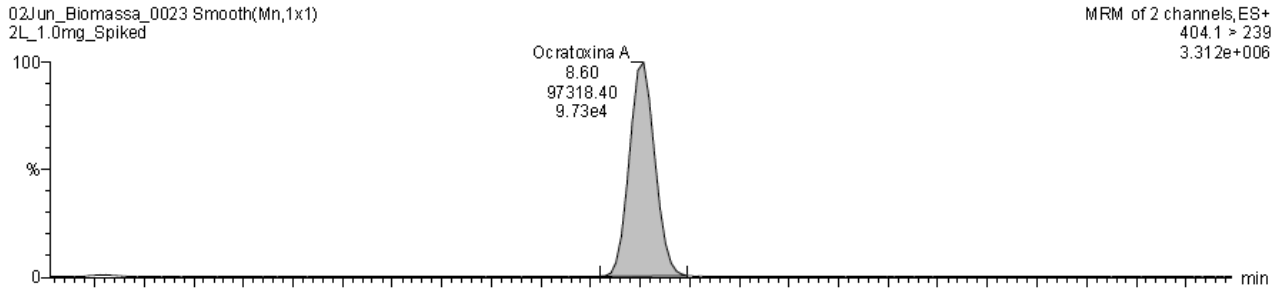
WIEBE, M. G. **Myco-protein from *Fusarium venenatum*: a well-established product for human consumption**. Appl. Microbiol. Biotechnol. (2002) 58:421-427.

WIEBE, M. G. **Quorn™ Myco-protein – Overview of a successful fungal product.** Mycologist, Volume 18, **2004** p. 17-20.

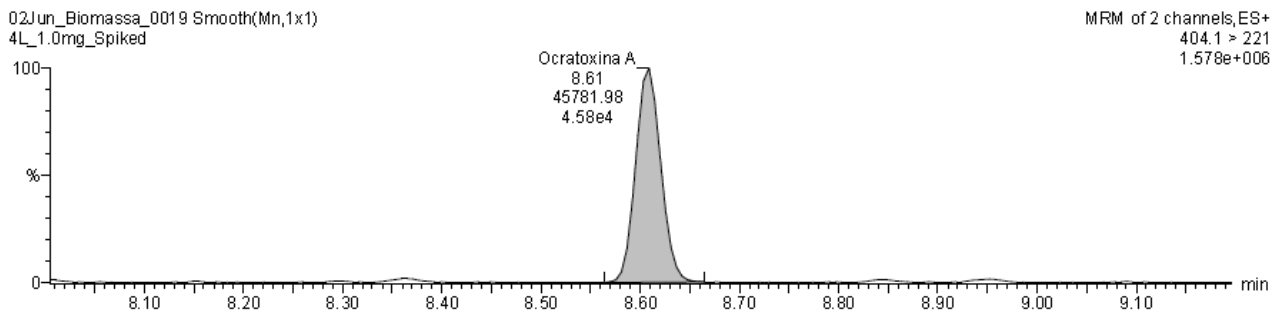
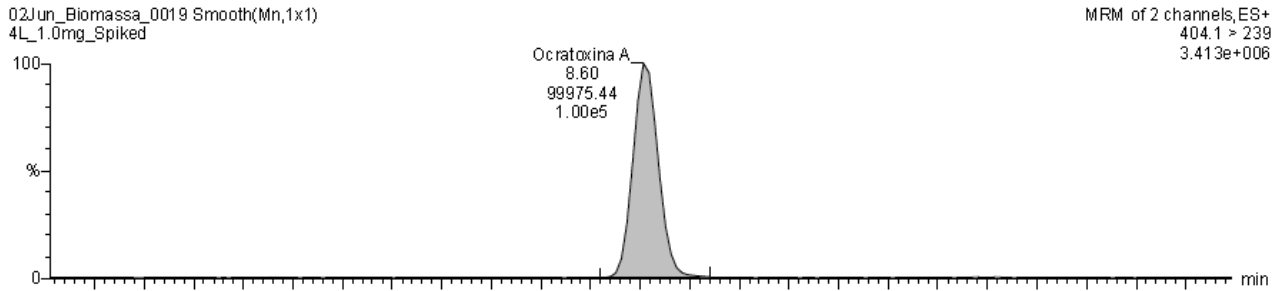
WILLETTS, H. J.; BULLOCK, S. **Developmental biology of sclerotia.** Mycological Research 96 (10), 801-816 (**1992**).

YLMAZ, N.; SOLMAZ, M.; TÜRKEKUL, I.; ELMASTAS, M. **Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey.** Food Chemistry 99 (**2006**) 168-174.

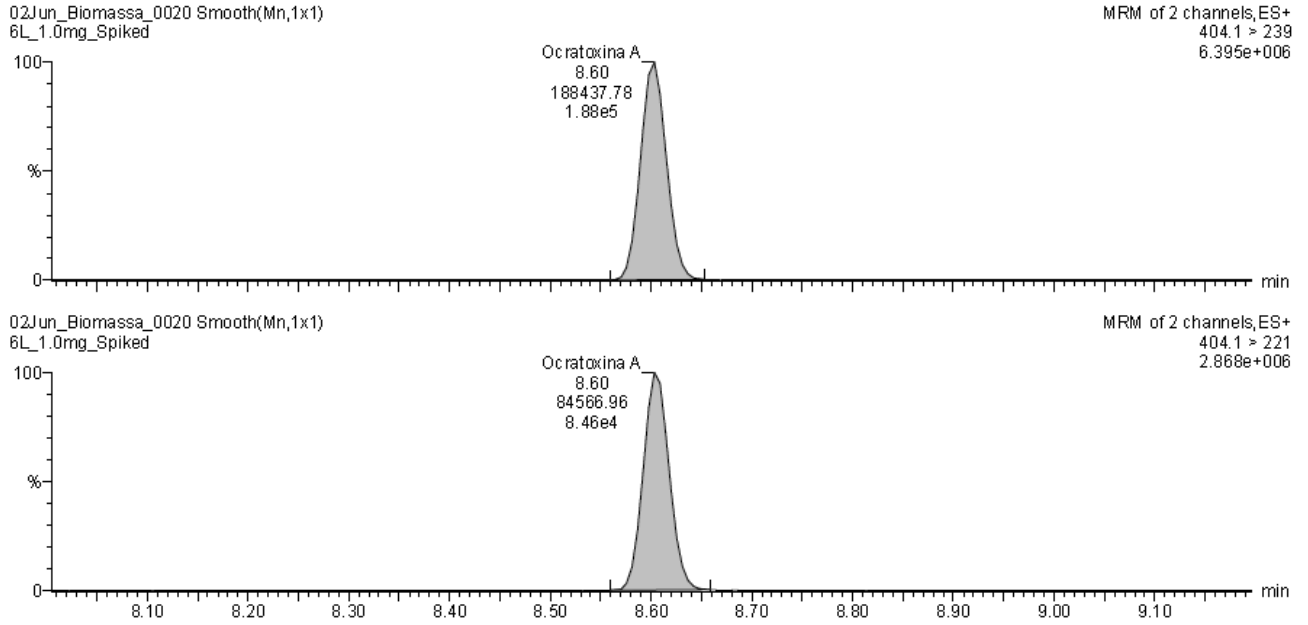
ANEXO



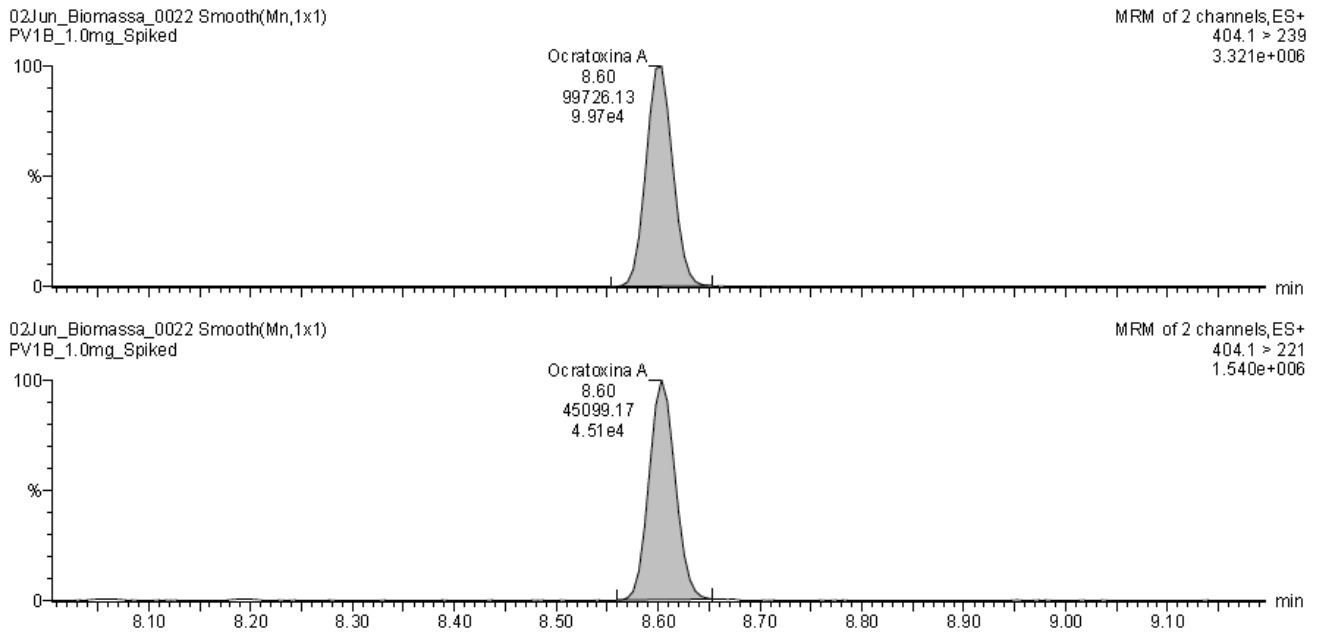
Anexo 1 – Cromatograma (UPLC) do extrato fortificado com OTA obtido a partir do meio de cultura 2.



Anexo 2 – Cromatograma (UPLC) do extrato fortificado com OTA obtido a partir do meio de cultura 4.

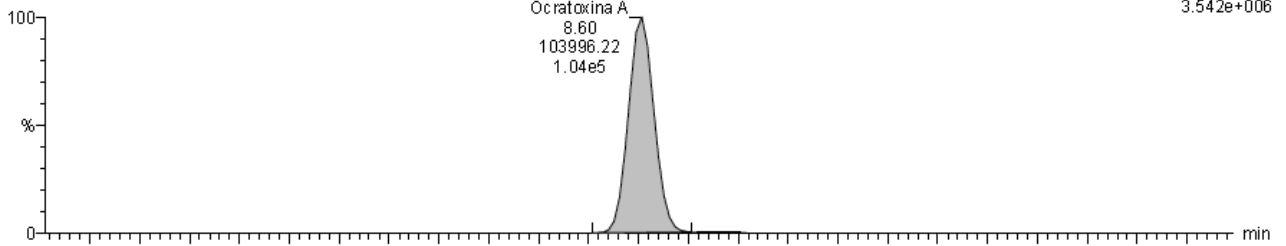


Anexo 3 – Cromatograma (UPLC) do extrato fortificado com OTA obtido a partir do meio de cultura 6.

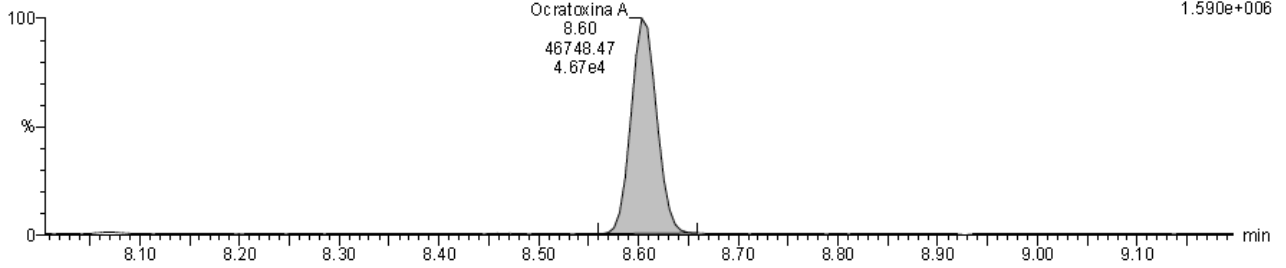


Anexo 4 – Cromatograma (UPLC) do extrato fortificado com OTA obtido a partir do meio de cultura 2'.

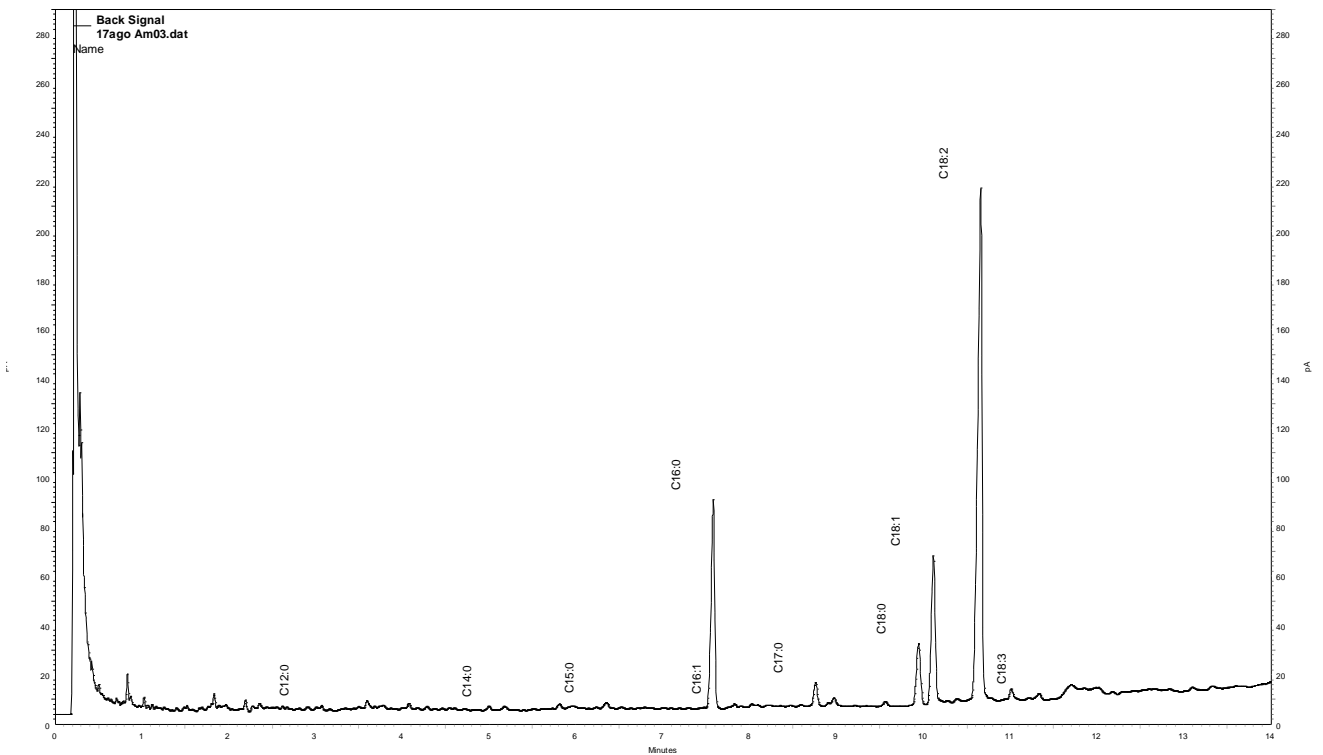
02Jun_Biomassa_0021 Smooth(Mn,1x1)
PV3A_1.0mg_Spiked



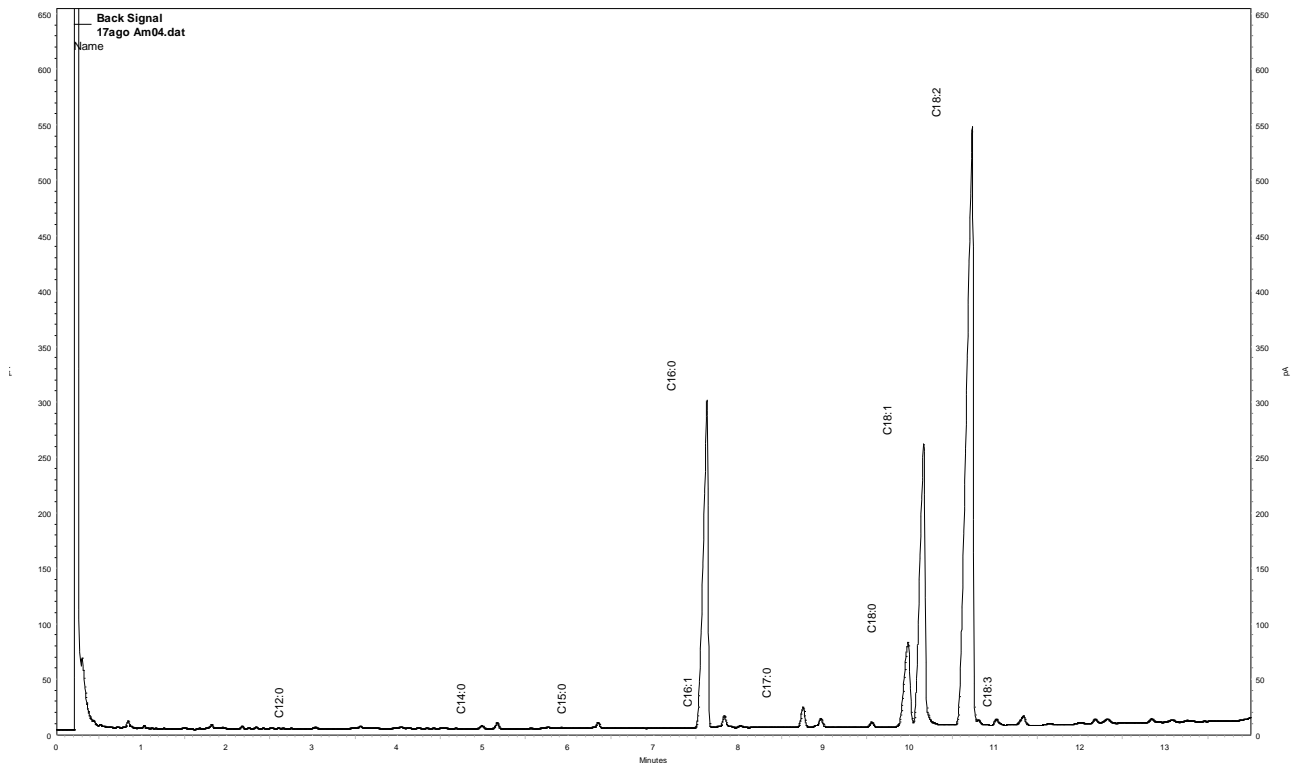
02Jun_Biomassa_0021 Smooth(Mn,1x1)
PV3A_1.0mg_Spiked



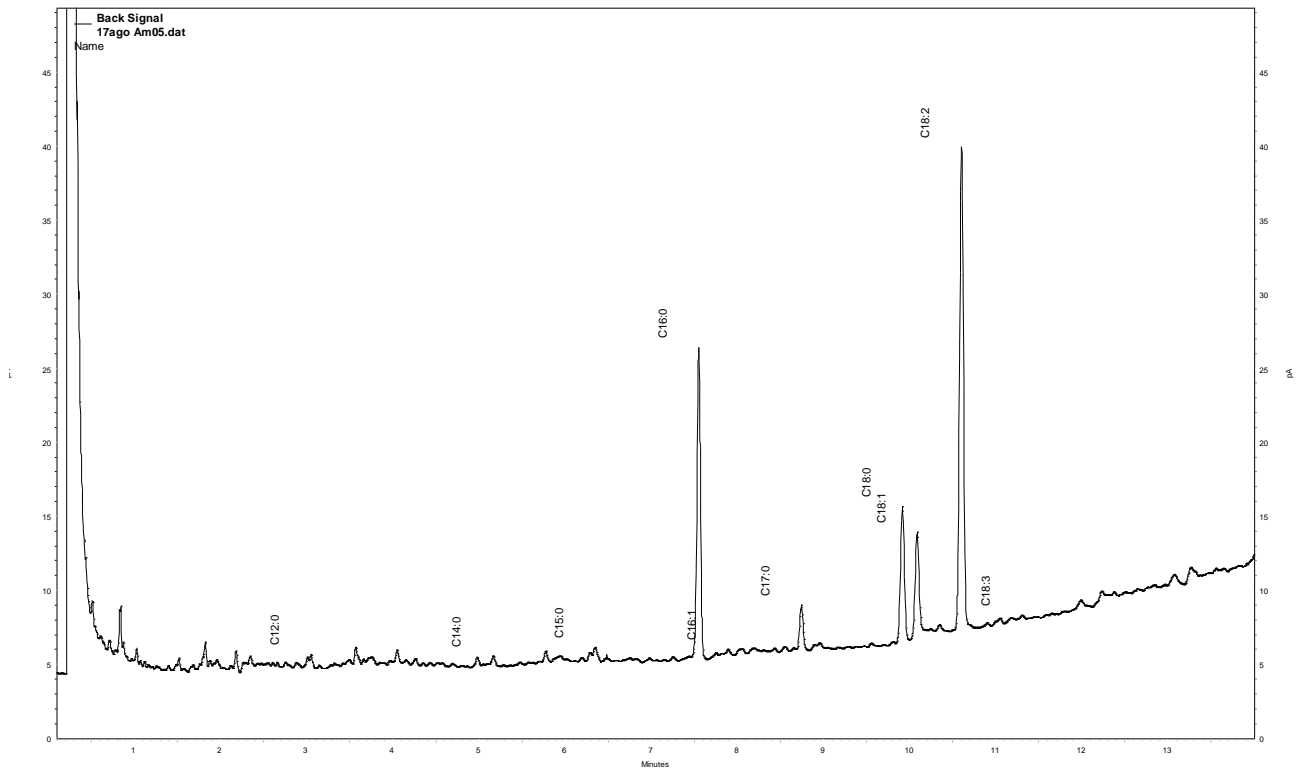
Anexo 5 – Cromatograma (UPLC) do extrato fortificado com OTA obtido a partir do meio de cultura 6'.



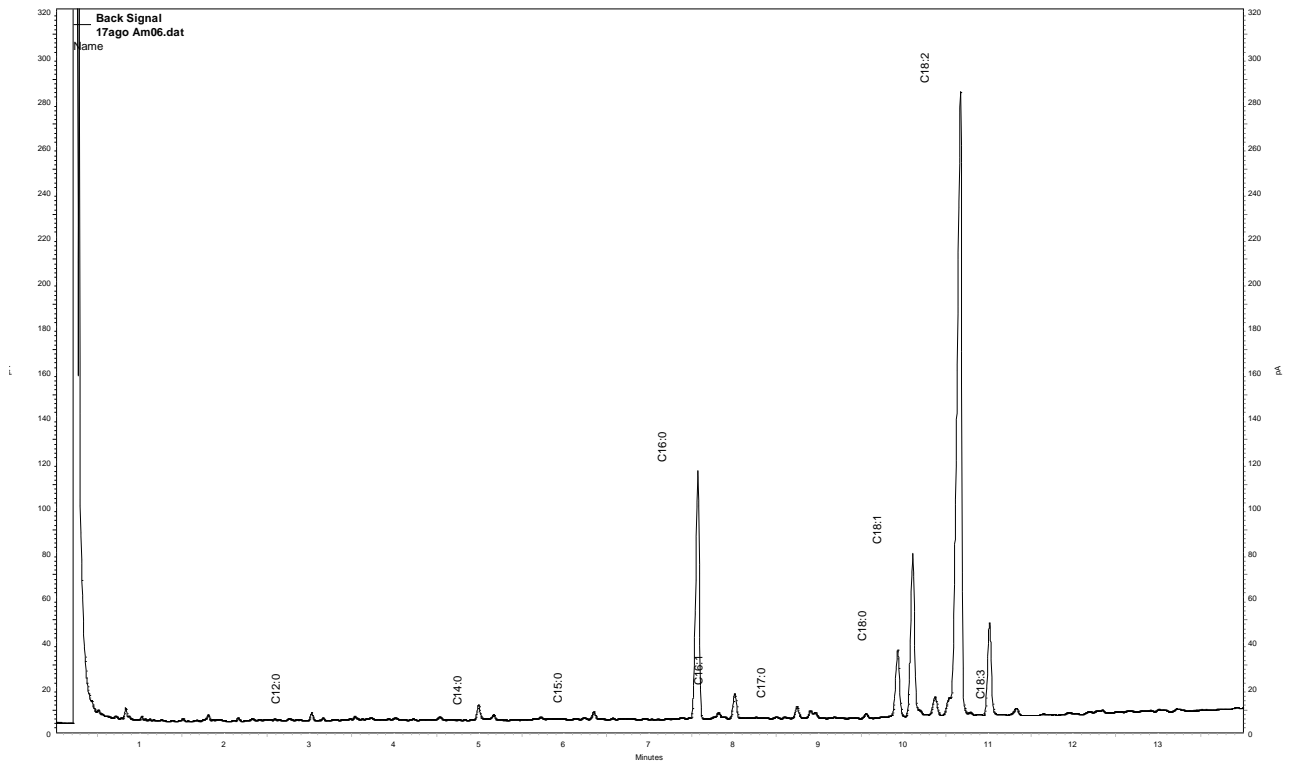
Anexo 6 - Cromatograma (CG) do perfil de ácidos graxos, obtido a partir da biomassa do meio de cultura 3.



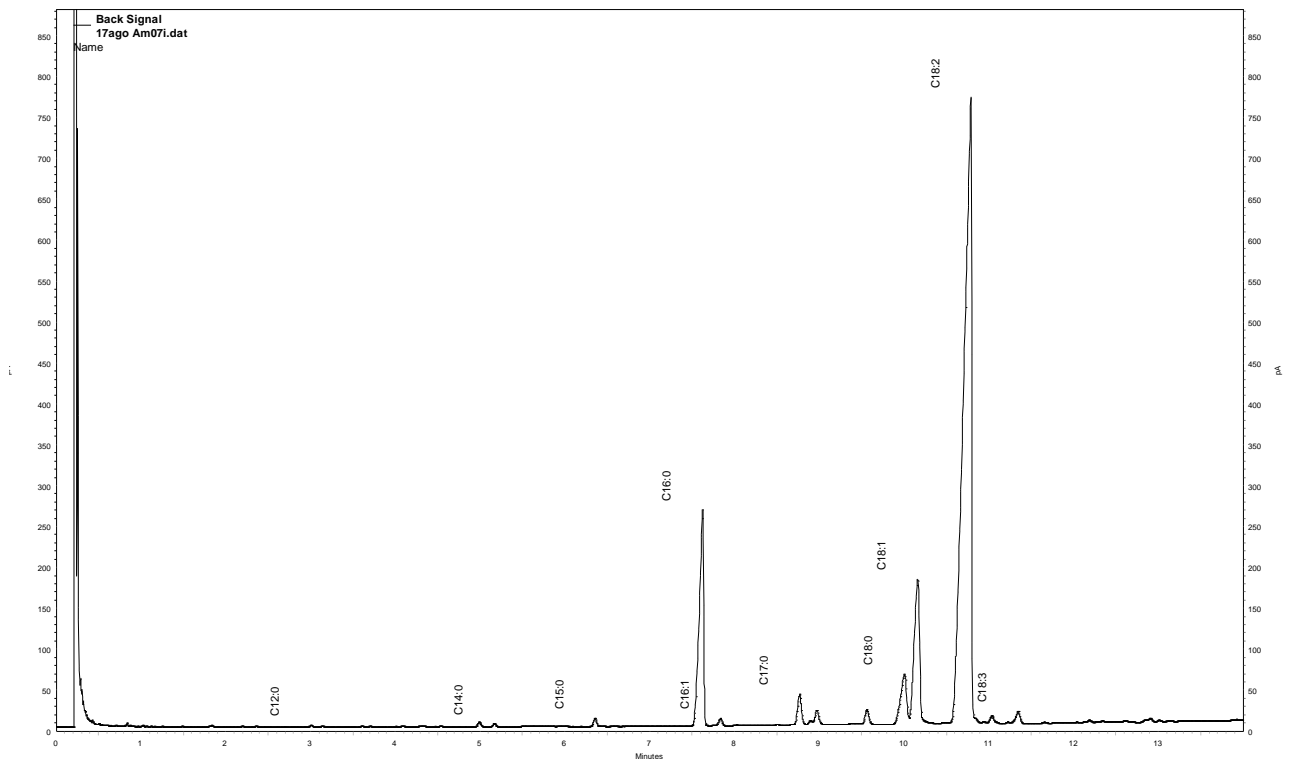
Anexo 7 – Cromatograma (CG) do perfil de ácidos graxos, obtido a partir da biomassa do meio de cultura 4.



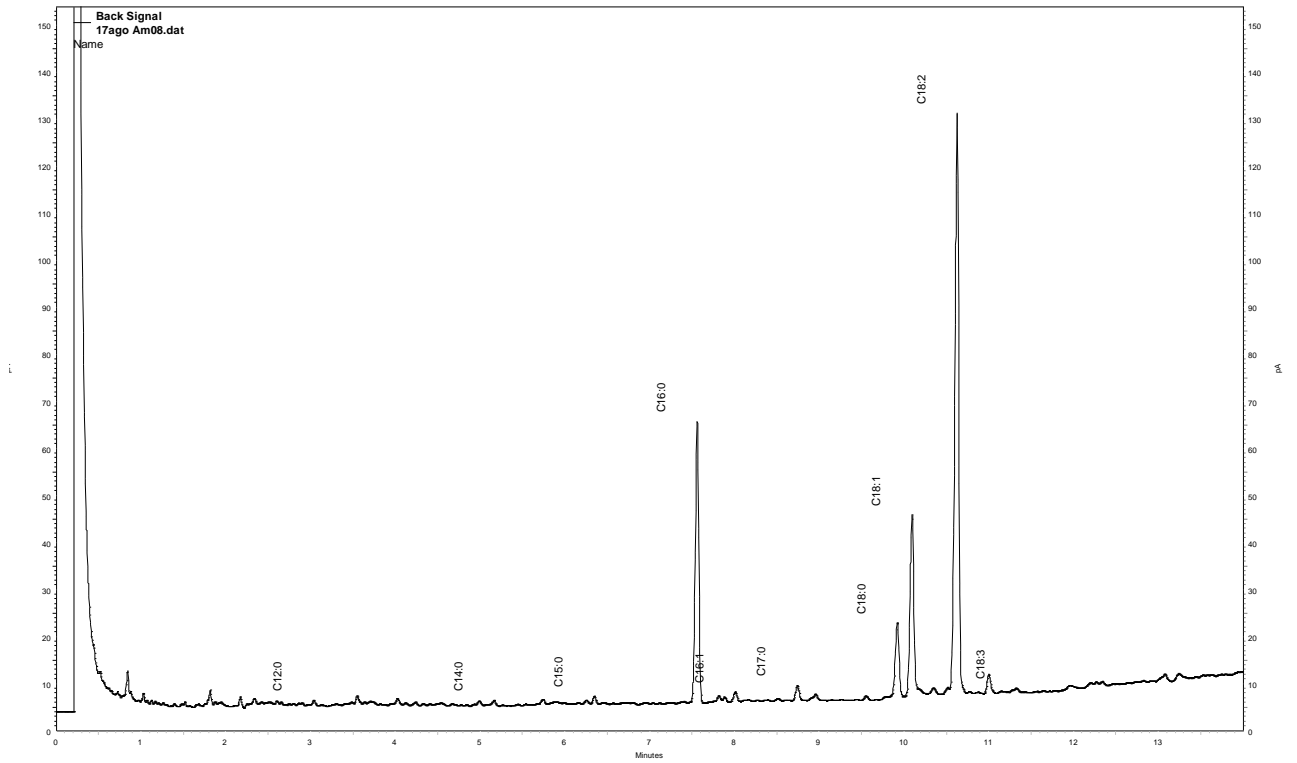
Anexo 8 – Cromatograma (CG) do perfil de ácidos graxos, obtido a partir da biomassa do meio de cultura 5.



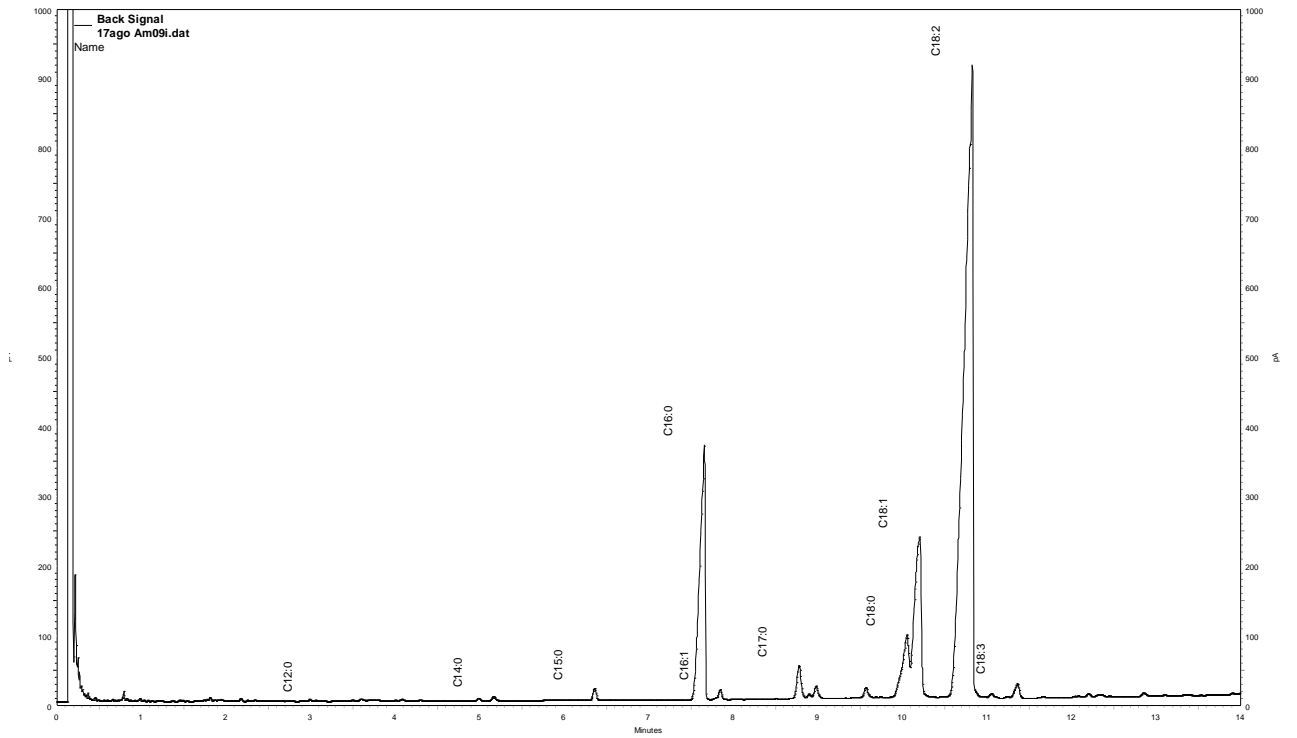
Anexo 9 – Cromatograma (CG) do perfil de ácidos graxos, obtido a partir da biomassa do meio de cultura 6.



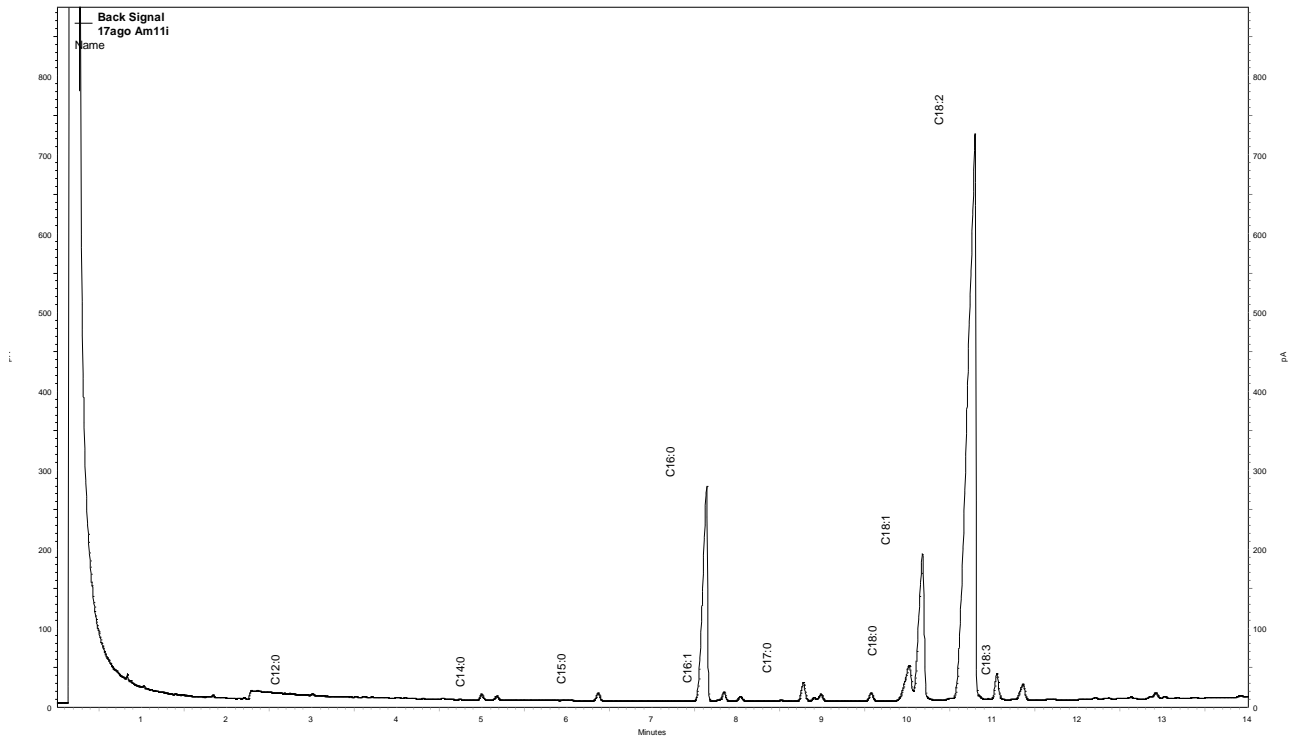
Anexo 10 – Cromatograma (CG) do perfil de ácidos graxos, obtido a partir da biomassa do meio de cultura 7.



Anexo 11 – Cromatograma (CG) do perfil de ácidos graxos, obtido a partir da biomassa do meio de cultura 8.



Anexo 12 – Cromatograma (CG) do perfil de ácidos graxos, obtido a partir da biomassa do meio de cultura 9.



Anexo 13 – Cromatograma (CG) do perfil de ácidos graxos, obtido a partir da biomassa do meio de cultura 11.