

**Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP
Doutorado em Biotecnologia**

VERA LÚCIA ARAÚJO LEITE

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO JASMÔNICO PELA
LINHAGEM Kifn 3.1 DE *Botryosphaeria rhodina***

**RIBEIRÃO PRETO
2015**

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico
da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

L533o Leite, Vera Lucia Araújo, 1989-
Otimização da produção de ácido jasmônico pela linhagem kifn
3.1 de *Botryosphaeria rhodina* / Vera Lucia Araújo Leite. - -
Ribeirão Preto, 2016.
101 f.: il. color.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Míriam Verginia Lourenço.

Tese (doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,
Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2016.

1. Bioprocessos. 2. *Botryosphaeria rhodina*. I. Título.

VERA LÚCIA ARAÚJO LEITE

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO JASMÔNICO PELA LINHAGEM
KIFN 3.1 DE *BOTRYOSPHERIA RHODINA*.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia da Universidade de
Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Data da defesa: 15 de dezembro de 2015

Resultado: Aprovada

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dra. Miriam Verginia Lourenço
Universidade de Ribeirão Preto UNAERP


Prof. Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto
Universidade de Ribeirão Preto UNAERP


Prof. Dr. Wellington Marota Barboza
Instituto Federal Sul de Minas Gerais IFSULDEMINAS


Prof. Dra. Paula Brúzzadelli Vieira
Universidade de Ribeirão Preto UNAERP


Prof. Dr. Carlos Alberto França Ribeiro
Universidade de Ribeirão Preto UNAERP

RIBEIRÃO PRETO
2015

VERA LÚCIA ARAÚJO LEITE

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO JASMÔNICO PELA
LINHAGEM Kifn 3.1 DE *Botryosphaeria rhodina***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu da Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Míriam Verginia Lourenço.

RIBEIRÃO PRETO
2015

Aos meus amores, Marcelo Leite, Marcelo Leite Júnior e Luiz Henrique Leite,
pelo amor incondicional em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela consolidação de mais uma etapa em minha vida, pelas oportunidades que me foram oferecidas e, principalmente, por fortalecer-me em todos os momentos.

A professora Dr^a. Miriam Verginia Lourenço pela paciência e disponibilidade em todos os momentos, e por compartilhar seus conhecimentos, orientando e tornando possível a realização deste trabalho.

A Alexandre Zanelli dos Santos pelo esmero, sendo meu anjo da guarda, pelas conversas que tanto instigaram a busca por conhecimento e por toda assistência no laboratório.

Aos colegas de doutorado que foram fundamentais para o fortalecimento do desejo de concluir o trabalho.

A minha grande amiga Katia Alves pelo carinho e auxílio com a estatística; uma grande irmã.

Ao meu marido Marcelo Leite e meus filhos por compreenderem minhas ausências e a impaciência em diversos momentos.

Ao meu pai, minha família e agregados que sempre estiveram ao meu lado, apoiando, me divertindo, alegrando e incentivando nos momentos mais difíceis de minha vida.

A minha mãe (in memoriam). Exemplo de vida, perseverança, equilíbrio, solidariedade, compaixão, enfim, uma lição de amor incondicional.

Aos colegas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas – Câmpus Machado pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

A todos profissionais da UNAERP que, direta ou indiretamente, participaram no desenvolvimento deste trabalho, apoiando e incentivando a finalização de mais uma etapa em minha vida.

A CAPES pela bolsa que garantiu recursos para realização da pesquisa.

Ao IFSULDEMINAS pela liberação permitindo-me dedicação exclusiva ao doutorado.

CARPE DIEM
Hans Kelsen (2009)
Tradução: Bruno Garrote

Breve, Ah, em breve tu empalidecerás,
Este belo mundo abandonarás,
E esquecido serás.
Portanto, deves contigo não te preocupar;
Sempre se dá o hoje, nunca o amanhã;
Tempo é aparência.
Longinquamente não sonhes.
Tu podes da felicidade distanciar.
Somente aquilo que agarras é teu!

RESUMO

Jasmonatos são fitorreguladores que atualmente têm apresentado potencial biotecnológico em razão das diversas atividades biológicas exibidas pelo ácido Jasmônico (AJ) e seu éster Metiljasmonato (MJ), que têm sido alvos de estudo desta classe de compostos. Apesar de serem biosintetizados nas plantas a busca por microrganismos produtores de jasmonatos mostra-se promissora, considerando a possibilidade de aumento na produção destes compostos. Esta pesquisa objetivou a otimização de processo para a produção de ácido jasmônico (AJ) pela linhagem Kifn 3.1 do fungo *Botryosphaeria rhodina*, visando a produção de AJ em larga escala. Foram realizados experimentos com diferentes fontes nutricionais no meio de cultura (fontes de carbono, nitrogênio e fósforo) e variações na forma de cultivo (estático e sob agitação). Os resultados mostraram que a produção de AJ pelo fungo foi afetada tanto pela composição do meio de cultura quanto pela forma de cultivo. Dentro das condições analisadas, a adição de 75 g.L⁻¹ de sacarose e 0,5 g.L⁻¹ de KH₂PO₄ aumentou a produção de AJ. Foi verificado também que sob agitação de 150 rpm houve redução na produção de AJ pelo fungo, se comparada à produção em sistema estático, e foi observado aumento da viscosidade do meio causada pela produção de exopolissacarídeos pelo microrganismo. Entretanto, a redução da agitação de 150 para 75 rpm causou o aumento na produção de AJ em culturas sob agitação e o fermentado mostrou-se menos denso, possibilitando assim a continuidade dos estudos de produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* em biorreatores, com vistas a produção de JA em larga escala.

Palavras-chaves: Bioprocessos. Ácido jasmônico. *Botryosphaeria rhodina*. Jasmonatos.

ABSTRACT

Jasmonates are plant growth regulators that more recently have revealed significant biotechnological potential due to Jasmonic acid (JA) and its methyl jasmonate ester which have been the main target of studies on this class of compounds. Though they are biosynthesized in plants the search for microorganisms that are jasmonate producers seems to be promising, considering the probability of enhancing their production. The main objective of this study was to establish an optimized process for the production of JA using Kifn 3.1 strain of the fungus *Botryosphaeria rhodina*. Several experiments were carried out with different nutritional sources in the culture medium (sources of carbon, nitrogen and phosphorus) and varying cultivation forms (shaking and static). Results showed that the production of JA by the fungus was differently affected by both the composition of the culture medium and the cultivation system. Among the investigated experimental conditions, the concentration of 75 g/L sucrose combined with 0.5 g/L KH_2PO_4 enhanced JA production. It was also observed that shaking (150 rpm) reduced JA production by the fungus, if compared to JA yields in static system, and also increased the medium viscosity caused by exopolysaccharides produced by the microorganism. However, reduction of agitation speed to 75 rpm increased yields of JA cultured under agitation and the fermented broth was less viscous, allowing the continuity of studies on JA production by the fungus *B. rhodina* in bioreactors, aiming the large scale of production of JA.

Keywords: Bioprocesses. Jasmonic acid. *Botryosphaeria rhodina*. Jasmonate .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hifas do fungo <i>B. rhodina</i>	22
Figura 2 - Estrutura química do metil jasmonato (MJ) e do ácido jasmônico (JA).....	24
Figura 3 - Esquema de genes envolvidos na produção de AJ pela via dos octadenoides.	25
Figura 4 - A via biossintética do ácido jasmônico, presumida, em <i>L. theobromae</i>	26
Figura 5 - Cromatograma de padrão de ácido jasmônico.	52
Figura 6 – Produção de AJ pelo fungo <i>B. rhodina</i> fermentado em meio de cultura suplementado com diferentes fontes/concentrações de carbono sob agitação de 150 rpm.....	54
Figura 7 – Fermentado de <i>B. rhodina</i> em meio de cultura suplementado com 50 g.L ⁻¹ de lactose sob agitação de 150 rpm.	54
Figura 8 – Biomassa seca e fresca (g) produzida por <i>B. rhodina</i> cultivado em meios suplementados com diferentes fontes de carbono em agitação de 150 rpm.....	55
Figura 9 - Material resultante da secagem do micélio de fungo <i>B. rhodina</i> cultivado em meio Br1 (as setas indicam a película formada)	56
Figura 10 - Produção de AJ pelo fungo <i>B. rhodina</i> fermentado em meio de cultura suplementado com diferentes fontes/concentrações de carbono em agitação de 150 rpm - Em bloco.....	57
Figura 11 - Filtrado resultante dos fermentados (mL) do fungo <i>B. rhodina</i> cultivados em meio de cultura suplementado com diferentes fontes/concentrações de carbono sob agitação de 150 rpm - Em bloco.	59
Figura 12 - Massa fresca (g) resultante da fermentação do fungo <i>B. rhodina</i> cultivado em meio de cultura suplementado com diferentes fontes/concentrações de carbono sob agitação de 150 rpm - Em bloco.....	60
Figura 13 - Massa seca (g) resultante da fermentação do fungo <i>B. rhodina</i> cultivado em meio de cultura suplementado com diferentes fontes/concentrações de carbono sob agitação de 150 rpm - Em bloco.	62
Figura 14 - Produção de AJ (mg.L ⁻¹) por <i>B. rhodina</i> cultivado em diferentes concentrações de N, P e Sacarose em 6, 9 e 12 dias de fermentação.....	65
Figura 15 - Tendência da produção de AJ resultante do cultivo do fungo <i>B. rhodina</i> em meio Br1 suplementado com diferentes concentrações de sacarose.	71
Figura 16 - Produção de AJ pelo fungo <i>B. rhodina</i> fermentado em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de KH ₂ PO ₄	72

Figura 17 - Tendência da produção de AJ resultante do cultivo do fungo <i>B. rhodina</i> em meio Br1 suplementado com diferentes concentrações de KH_2PO_4	74
Figura 18 - Média do volume de filtrado resultante das fermentações de <i>B.rhodina</i> cultivado em meio Br1 suplementado com diferentes concentrações de KH_2PO_4	75
Figura 19 - Média da massa fresca resultante da fermentação de <i>B.rhodina</i> cultivado em meio Br1 suplementado com diferentes concentrações de KH_2PO_4	75
Figura 20 - Média da massa seca resultante da fermentação de <i>B.rhodina</i> cultivado em meio Br1 suplementado com diferentes concentrações de KH_2PO_4	76
Figura 21 - Média da produção de AJ (mg.L^{-1}) por fungo <i>B. rhodina</i> fermentado em meio Br1 e meio mínimo suplementado com diferentes fontes e concentrações de carbono.	78
Figura 22- Pérolas de alginato de cálcio contendo fungo <i>B. rhodina</i> . A: utilizando-se 5,0 mL de homogenato, B: 7,5 mL de homogenato e C: 10 mL de homogenato.....	83
Figura 23 - Meios de cultura (Br1) geleificado após fermentação de <i>B. rhodina</i> imobilizado em pérolas de alginato de cálcio.	84
Figura 24 – Cromatoplaca dos extratos dos fermentados de <i>B. rhodina</i> imobilizado em pérolas de alginato de cálcio cultivado em meio Br1.	85
Figura 25 – Fungo <i>B. rhodina</i> cultivado em meio Br1 utilizando bucha vegetal como suporte.	86
Figura 26 – Cromatoplaca dos extratos dos fermentados de <i>B. rhodina</i> cultivado em meio Br1. AJ: Padrão de ácido Jasmônico; 1: Imobilização em alginato de cálcio.; 2: Imobilização em bucha vegetal; 3: Imobilização em bucha vegetal com meio com redução de KNO_3 . A seta indica a linha de identificação de AJ.	87
Figura 27 - Produção de AJ pelo fungo <i>B. rhodina</i> em meio Mv e Br1 em fermentações em sistema estático e agitado (75 rpm).....	88

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio Br1.	41
Tabela 2 - Composição da solução de sais para meio mínimo (para 1000 mL).....	42
Tabela 3 - Composição do meio Mv.....	42
Tabela 4 - Tratamento com diferentes fontes de carbono (Lactose, Sacarose, Glicose e Amido) no meio Br1.	44
Tabela 5 - Tratamento com diferentes concentrações e fontes de carbono no meio de cultura Br1.....	45
Tabela 6 – Fatorial representando as concentrações das fontes de Nitrogênio (KNO ₃), fósforo (KH ₂ PO ₃) e carbono (sacarose) presentes no meio de cultura.	46
Tabela 7 - Fatorial representando os tratamentos das fontes de carbono (sacarose, glicose, lactose e glicerol) e as concentrações (0,0 g.L ⁻¹ , 50 g.L ⁻¹ e 75 g.L ⁻¹) presentes nos meios de cultura. Br1 e meio Mínimo (MM).....	48
Tabela 8 - Análise de variância – ANOVA- da produção de AJ, filtrado resultante, massa fresca e seca de fermentados de <i>B.rhodina</i> cultivados em meio Br1 suplementado com diferentes fontes de carbono (lactose, amido, glicose e sacarose).....	57
Tabela 9 - Teste Scott-knott – Produção de AJ do fungo <i>B.rhodina</i> cultivado em meio Br1 suplementado com diferentes fontes e concentração de carbono (em relação à fonte de carbono)	58
Tabela 10 - Teste Scott-knott - Produção de AJ pelo fungo <i>B. rhodina</i> cultivado em meios Br1 suplementado com diferentes concentrações das fontes de carbono.	58
Tabela 11 - Teste Scott-knott – Produção de AJ pelo fungo <i>B. rhodina</i> em meio suplementado com diferentes concentrações de fonte de carbono - considerando 30 g.L ⁻¹ das fontes de carbono	58
Tabela 12 - Teste Scott-knott – Produção de AJ pelo fungo <i>B. rhodina</i> em meio suplementado com diferentes concentrações de fonte de carbono - considerando 50 g.L ⁻¹ das fontes de carbono	59
Tabela 13 - Teste Tukey – Volume de filtrado resultante (mL) dos meios de cultura considerando a concentração de carbono.	60
Tabela 14 – Análise de variância - ANOVA - Concentração de carbono dentro de cada fonte para a produção de massa fresca.....	61
Tabela 15 – Efeito da concentração da fonte de carbono na produção de massa fresca (g) de <i>B. rhodina</i> cultivado em meio com diferentes fontes e concentrações de carbono.	61

Tabela 16 – Efeito da concentração da fonte de carbono na produção de Massa seca (g) de <i>B. rhodina</i> em meio com diferentes concentrações e fontes de carbono.	62
Tabela 17 - Média da concentração de AJ (mg.L ⁻¹) produzido por <i>B. rhodina</i> cultivado em meio Br1 suplementado com diferentes concentrações de N, P e Carbono em 6, 9 e 12 dias de fermentação	64
Tabela 18 - Influência da concentração de Nitrogênio (1), Fósforo (2) e Carbono (3), e suas interações, sobre a produção de AJ pelo fungo <i>B. rhodina</i> em 6, 9 e 12 dias de fermentação.	65
Tabela 19 - Média da produção de massa fresca (g.L ⁻¹) produzido por <i>B. rhodina</i> cultivado em meio Br1 suplementado com diferentes concentrações de N, P e Carbono em 6, 9 e 12 dias de fermentação.	67
Tabela 20 - Influência da concentração de Nitrogênio (1), Fósforo (2) e Carbono (3), e suas combinações, sobre a produção de massa fresca do fungo <i>B. rhodina</i> em 6 dias de fermentação.	67
Tabela 21 - Média da produção de massa seca (g.L ⁻¹) produzido por <i>B. rhodina</i> cultivado em meio Br1 suplementado com diferentes concentrações de N, P e Carbono em 6, 9 e 12 dias de fermentação	68
Tabela 22 - Influência da concentração de Nitrogênio, Fósforo e Carbono (sacarose), e suas combinações, sobre a produção de massa seca por fungo <i>B. rhodina</i> em 6, 9 e 12 dias de fermentação.	69
Tabela 23- Análise de variância - ANOVA – Produção de AJ (mg.L ⁻¹) do <i>B. rhodina</i> em meio com diferentes concentrações de sacarose	70
Tabela 24 - Teste de Tukey da produção de AJ pelo fungo <i>B. rhodina</i> cultivado em meio Br1 suplementado com diferentes concentrações de sacarose.	70
Tabela 25 - Análise de variância - ANOVA - Produção de AJ pelo fungo <i>B.rhodina</i> cultivado em meio Br1 suplementado com diferentes concentrações de KH ₂ PO ₄	73
Tabela 26 - Teste de Tukey da produção de AJ pelo fungo <i>B. rhodina</i> cultivado em meio Br1 dentro das concentrações de KH ₂ PO ₄	73
Tabela 27 - Comparação da produção de AJ de fermentados de <i>B. rhodina</i> cultivados em meio suplementado com diferentes fontes e concentrações de carbono em sistema estatico.	77
Tabela 28 - Análise de variância – ANOVA - da produção de AJ, de fermentados de <i>B.rhodina</i> cultivados em meio Br1 e meio mínimo suplementados com diferentes fontes de carbono (lactose, glicerol, glicose e sacarose).	78

Tabela 29 – Produção de AJ em relação a fonte e concentração de carbono em fermentados de fungo <i>B. rhodina</i> cultivados em meio Br1 e meio mínimo suplementado com diferentes fontes e concentrações de carbono.	79
Tabela 30 -- Produção de AJ em relação ao meio de cultura e a concentração da carbono em fermentados de fungo <i>B. rhodina</i> cultivados em meio Br1 e meio mínimo	79
Tabela 31 - Produção de AJ em relação ao meio de cultura e a fonte de carbono em fermentados de fungo <i>B. rhodina</i> cultivados em meio Br1 e meio mínimo	80
Tabela 32 – Média da produção de AJ em fermentados de <i>B. rhodina</i> cultivado em diferentes fontes e concentrações de carbono.....	81
Tabela 33 – Significância estatística entre os tratamentos (1 a 19) de fungos <i>B. rhodina</i> cultivados em meio Br1 e meio mínimo suplementados com diferentes fontes e concentrações de carbono.	82
Tabela 34 - Análise de variância – ANOVA - da produção de AJ de fermentados <i>de B.rhodina</i> cultivados em meio Mv e Br1 em sistema agitado (75 rpm) e estático.....	89
Tabela 35 - Teste Scott-knott – Produção de AJ pelo fungo <i>B. rhodina</i> considerando apenas o meio de cultura (Mv e Br1).	89
Tabela 36 - Teste Scott-knott – Produção de AJ pelo fungo <i>B. rhodina</i> considerando apenas o sistema (agitação 75 rpm ou estático).	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA – Ácido Abscísico

AJ – Ácido Jasmônico

ANOVA - Análise de Variância.

BD – Batata-Dextrose

BDA - Batata-Dextrose Ágar

BOD - Biochemical Oxygen Demand - Demanda Bioquímica de Oxigênio (em português)

CCDC - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DO - Densidade Óptica

OD - Dissolved Oxygen - Oxigênio dissolvido (em português)

DNA – Deoxyribonucleic Acid – Ácido Desoxirribonucléico (em português)

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

FM - Fase Móvel

HIV – Human Immunodeficiency Virus - Vírus da Imunodeficiência Humana (em português)

HPLC - High Performance/Pressure Liquid Chromatography – CLAE - Cromatografia
líquida de alta eficiência (em português)

HPV - Human Papillomavirus

INCA - Instituto Nacional do Câncer

LOX - Lipoxigenase

Br1 – Meio de cultura Miersch modificado

MJ – Metil Jasmonato

Mv – Meio de cultura Br1 com alterações na sacarose e fosfato.

MS – Secondary Metabolites – Metabólitos Secundários (em português)

OAC - Aleno Óxido Ciclase

OAS - Aleno Óxido Sintase

OPDA - 12-oxo-fitodienólico

ROS - Reactive Oxygen Species - Espécie reativa de oxigênio (em português)

rpm - Rotações por Minuto

STB – Stirred Tank Bioreactor

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. MICRORGANISMOS E SEUS METABÓLITOS	19
2.2. <i>Botryosphaeria rhodina</i>	21
2.2.1. Compostos produzidos por <i>Botryosphaeria rhodina</i>	23
2.2.1.1. Jasmonatos	24
2.3. BIOPROCESSOS	29
2.3.1. Variáveis do processo	33
3. OBJETIVOS	39
3.1. OBJETIVO GERAL	39
3.1.1. Objetivos Específicos	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1. MATERIAIS	40
4.2. MANUTENÇÃO DA LINHAGEM DE <i>B. rhodina</i>	41
4.3. PREPARO DE MEIO DE CULTURA	41
4.3.1. Meio Br1	41
4.3.2. Meio Mínimo	42
4.3.3. Meio Mv	42
4.3.4. Meio BDA	43
4.4. PREPARO DO HOMOGENATO (INÓCULO)	43
4.5. FERMENTAÇÕES PARA A PRODUÇÃO DE JASMONATOS	43
4.5.1. Avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono (Lactose, Sacarose, Glicose e amido solúvel) sobre a produção de AJ pelo fungo <i>B. rhodina</i> em fermentação agitada (150 rpm)	44
4.5.2. Avaliação do efeito da concentração de Nitrogênio (N) Fósforo (P) e Carbono (Sacarose) sobre a produção de AJ em fermentação estática.	45
4.5.3. Avaliação do efeito da concentração de sacarose sobre a produção de AJ pelo fungo <i>B. rhodina</i> cultivado em meio Br1 em fermentação estática.	46
4.5.4. Avaliação do efeito da concentração de Fósforo (KH ₂ PO ₄) sobre a produção de ácido jasmônico	47
4.5.5. Avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono (Lactose, Sacarose, Glicose e glicerol) sobre a produção de AJ pelo fungo <i>B. rhodina</i> em fermentação em meio Br1 e meio mínimo em condições estáticas.	47
4.5.6. Imobilização do fungo <i>B. rhodina</i> em alginato de cálcio, bucha vegetal e bucha sintética	48
4.5.7. Avaliação do efeito da Sacarose e do Fósforo (KH ₂ PO ₄) sobre a produção de AJ pelo fungo <i>B. rhodina</i> em fermentação em meio Br1 e meio Mv sob condições estáticas e agitadas.	50

4.6.	EXTRAÇÃO DO ÁCIDO JASMÔNICO (AJ)	50
4.7.	ANÁLISES CROMATOGRAFICAS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AJ. 51	
4.8.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	52
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1.	AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO (LACTOSE, SACAROSE, GLICOSE E AMIDO SOLÚVEL) SOBRE A PRODUÇÃO DE AJ PELO FUNGO <i>B. rhodina</i> EM FERMENTAÇÃO AGITADA.....	53
5.2.	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO (N) FÓSFORO (P) E CARBONO (SACAROSE) SOBRE A PRODUÇÃO DE AJ EM FERMENTAÇÃO ESTÁTICA.....	63
5.3.	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE SOBRE A PRODUÇÃO DE AJ PELO FUNGO <i>B. rhodina</i> CULTIVADO EM MEIO Br1 EM FERMENTAÇÃO ESTÁTICA.....	69
5.4.	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO (KH ₂ PO ₄) SOBRE A PRODUÇÃO DE ÁCIDO JASMÔNICO.....	72
5.5.	AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO (LACTOSE, SACAROSE, GLICOSE E GLICEROL) SOBRE A PRODUÇÃO DE AJ PELO FUNGO <i>B. rhodina</i> EM FERMENTAÇÃO EM MEIO Br1 E MEIO MÍNIMO EM CONDIÇÕES ESTÁTICAS.....	77
5.6.	IMOBILIZAÇÃO DO FUNGO <i>B. rhodina</i> EM ALGINATO DE CÁLCIO, BUCHA VEGETAL E BUCHA SINTÉTICA.....	83
5.7.	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SACAROSE E DO FÓSFORO (KH ₂ PO ₄) SOBRE A PRODUÇÃO DE AJ PELO FUNGO <i>B. rhodina</i> EM FERMENTAÇÃO EM MEIO Br1 E MEIO Mv SOB CONDIÇÕES ESTÁTICAS E AGITADAS (75 rpm).....	87
6.	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	92

1. INTRODUÇÃO

O Ácido Jasmônico (AJ) é um fitorregulador e está presente em centenas de espécies vegetais. Ele, seu ester Metiljasmonato (MJ), alguns precursores e derivados são denominados jasmonatos e estão relacionados ao mecanismo de defesa vegetal. Além disso, diversas atividades biológicas têm sido atribuídas aos jasmonatos, tais como atividades fitorreguladora, citotóxica, antibacteriana, antifúngica, calmante e anticancerígena. Dentre os estudos realizados sobre a ação anticancerígena destes compostos foi verificado alta seletividade citotóxica frente às células cancerosas quando comparada às células controle, o que torna os jasmonatos alvo de pesquisas como potenciais agentes anticâncer.

O AJ e MJ foram isolados e identificados pela primeira vez na década de 60 como os principais constituintes do óleo essencial de *Jasminun grandiflorun* e *Rosmarinus officinalis*. Atualmente a obtenção de AJ é feita através da extração vegetal, o que torna o processo demorado e oneroso, tornando os preços do produto comercial da ordem de 50 mil reais o quilo (produto enantiopuro) e valores ainda superiores quando se trata do produto com alto grau de pureza.

Entretanto estes compostos podem também ser produzidos por microrganismos, onde o fungo filamentosos *Botryosphaeria rhodina* tem se mostrado a espécie mais produtora. Algumas linhagens deste microrganismo destacam-se pelo potencial produtor de AJ, impulsionando assim os estudos na determinação de bioprocessos capazes de produzir jasmonatos com rendimentos economicamente viáveis.

Embora se conheça o potencial produtor de jasmonatos pelo fungo, o aumento na escala de produção exige estudos que permitam identificar tanto as necessidades nutricionais do microrganismo para a produção do composto alvo, quanto às condições do bioprocessos na qual a eficiência é maximizada, uma vez que o aumento na escala de produção exige maiores esforços nos controles operacionais e no monitoramento do processo. Nesse contexto este trabalho abordou estudos realizados no processo de produção de AJ pela linhagem Kifn 3.1 de *B. rhodina* baseados em alterações dos fatores nutricionais do meio de cultivo e das condições do processo, com vistas ao aumento na escala de produção.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MICRORGANISMOS E SEUS METABÓLITOS

Microrganismos têm sobrevivido em ambientes que são considerados inóspitos, com adaptações capazes de surpreender. Algumas células podem crescer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*psicrófilos*), enquanto outras podem crescer a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*termófilos*) com adaptações fisiológicas que suportam estas temperaturas. O mesmo pode ocorrer em relação ao pH e à capacidade de utilizar o oxigênio. Existem organismos que crescem preferencialmente em ambientes com oxigênio (aeróbios) enquanto outros não necessitam de oxigênio (anaeróbios), ou ainda, que podem sobreviver com ou sem o oxigênio (facultativos) (SHULER; KARGI, 2012).

Essa diversidade é também encontrada no reino *Fungi* e, neste caso, além da diversidade, existe ainda uma capacidade de adaptação muito grande, denominada de plasticidade gênica, que permite a ativação, ou não, de determinados genes em determinadas situações (POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013). Essas características dão aos fungos ampla capacidade de sobreviver em praticamente todos os ambientes.

Os fungos estão classificados no Reino *Fungi*, que inclui mais de 70.000 espécies descritas até hoje. Entretanto, estimativas sugerem que existam cerca de 1,5 milhões de espécies destes organismos, ou seja, apenas cerca de 6% das espécies são descritas (KIRK et al., 2008). A mais recente classificação deste Reino os identifica em quatro grupos principais: *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota* e *Chytridiomycota* (KANAGAWA; NEVES, 2011).

A classificação dos fungos nestes grupos considera, como base, os fatores morfológicos e fisiológicos, contudo os nomes estão relacionados à forma da estrutura de reprodução em que cada grupo está inserido. Os fungos são seres heterótrofos, com digestão extracelular, que se reproduzem por alternância de gerações e todos eles necessitam de ambientes relativamente úmidos para o seu desenvolvimento (KANAGAWA; NEVES, 2011).

São encontrados, em sua maioria, em processos de simbiose com outros seres, produzindo a partir dessas relações diversos compostos, tanto para o processo de fixação e interação com o hospedeiro, quanto para a defesa dos compostos produzidos pelos organismos a que se associam, ou ainda, contra possíveis invasores causadores de danos ao processo de interação ao hospedeiro. Nestas relações, as moléculas produzidas podem apresentar aplicações terapêuticas e/ou agroquímicas (CONTI; GUIMARÃES; PUPO, 2012).

Os compostos produzidos por microrganismos, podem possuir atividades biológicas distintas sobre grande diversidade de organismos (FELÍCIO; OLIVEIRA; DEBONSI, 2012). Hoje há, além de medicamentos, a produção de enzimas, biocombustíveis e energia renovável fazendo uso de fungos (DISHISHA et al., 2013) ou outros microrganismos. Dentre os fungos produtores de compostos de interesse, destacam-se os endofíticos, que têm sido estudados e considerados fonte importante para a obtenção de metabólitos secundários (FREIRE; VASCONCELOS; COUTINHO, 2014). Muitos compostos fúngicos, antes conhecidos apenas por apresentarem atividades tóxicas, tiveram propriedades biológicas de interesse descobertas. Alguns amplamente conhecidos, como os antibióticos, outros ainda se encontram em processos de pesquisa, como os de atividades citotóxicas (VALENCIA, 2011).

Os compostos, após serem sintetizados pelos fungos, podem ficar dentro das células ou, ainda, serem secretados no meio de cultura, como, por exemplo, as glucanas exopolissacarídeo, que possuem atividades biológicas e aplicações em processos industriais (BAUERMEISTER et al., 2010). Isto torna importante estudos do meio de cultura resultante dos processos de fermentação, assim como do material micelial resultante do crescimento do fungo.

O número de trabalhos com fungos é amplo, e a tendência é que as pesquisas com estes organismos sejam aprimoradas, uma vez que o uso da genética e genômica têm descoberto novas aplicações biotecnológicas para os compostos produzidos por estes organismos (BAKER, 2013). Além da produção direta de compostos a partir da fermentação com fungos, é possível ainda, com o uso de técnicas biomoleculares, identificar genes responsáveis pela biossíntese de compostos e manipulá-los, inserindo-os em outros organismos para aprimorar a produção de compostos de atividades comerciais de interesse (PUPO; GALLO, 2007).

Os compostos produzidos e/ou transformados pelos fungos têm como objetivo assegurar seu metabolismo no decorrer de sua existência, e sua produção ocorre tanto para a manutenção dos processos metabólicos primários quanto para atividade em situações adversas. Segundo Braz Filho (2010), estas substâncias são classificadas em metabólitos primários, quando fazem parte dos processos bioquímicos não especializados, e metabólitos secundários (MS), quando são produtos que vão atuar em situações específicas. Dentre os MS bioativos, podem ser citados os glicosídeos, esteroides, terpenos, flavonoides, dentre outros.

Normalmente estas substâncias são produzidas em pequenas concentrações, e em condições e situações específicas em cada organismo. Além de atuarem nas funções para que foram sintetizadas, esses compostos podem desenvolver atividades sobre organismos diversos

do qual foram produzidos, e atuarem em situações resolvendo ou minimizando problemas nestes organismos, constituindo assim produtos de interesse farmacológico (SANDES; BLASSI, 2000).

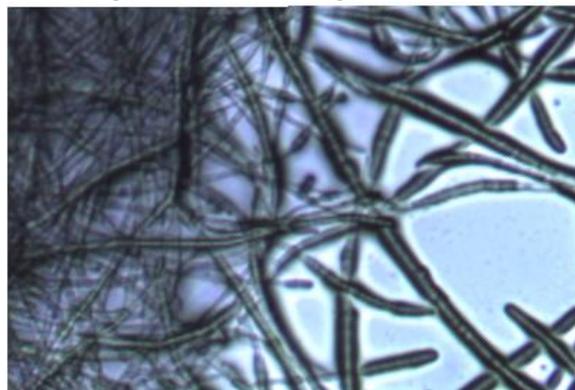
Além de compostos para a área farmacológica, microrganismos produzem também compostos utilizados na área agropecuária, alimentícia etc. (OLIVEIRA; GAZOLLA; SCHNEIDE, 2011). Dentre os compostos com funções biológicas já conhecidas estão os hormônios vegetais, sendo que alguns já sintetizados e comercializados com as mais diversas funções; outros apresentam promissora utilização na indústria farmacêutica, como é o caso da classe dos jasmonatos, pertencentes ao grupo dos *Oxilypins*.

Esta classe de compostos foi inicialmente identificada na espécie *Jasminum grandiflorum*, (DEMOLE; LEDERER; MERCIER, 1962), entretanto, hoje já se sabe que são produzidos também em outros grupos vegetais, sendo que a produção ocorre quando os vegetais se encontram em situações de estresse biótico ou abiótico.

Além dos vegetais, sabe-se que fungos e algas também são capazes de sintetizar os jasmonatos, podendo ser manipulados para um aumento da escala de produção dos compostos (DHANDHUKIA; THAKKAR, 2007). As pesquisas com fungos têm resultado na produção de diversos compostos com atividades interessantes, e novas moléculas devem ser descobertas, uma vez que o reservatório desses organismos na natureza é amplo, e a produção de jasmonatos é mais uma das áreas a ser explorada (SCHARF; BRAKHAGE, 2013). Dentre os fungos com possibilidade de produção de jasmonatos se encontram os fungos da espécie *B. rhodina*, e pesquisas têm demonstrado que esta espécie de fungo (*B. rhodina* - fase teleomorfa ou *L. theobromae* - fase anamorfa) apresenta resultados favoráveis para a produção destes compostos (TSUKADA; TAKAHASHI; NABETA, 2010).

2.2. *Botryosphaeria rhodina*

O fungo *B. rhodina* pertence ao Reino *Fungi*, ao filo *Ascomycota*, à Classe *Dodhideomycetes*, à ordem *Dothideales*, à Família *Botryosphaeriaceae*, ao Gênero *Botryosphaeria*. Possui hifas septadas (Figura 1) e podem se reproduzir sexuada ou assexuadamente.

Figura 1 - Hifas do fungo *B. rhodina*

Aumento 400x

Os fungos da família *Botryosphaeriaceae* são em muitos aspectos bastante parecidos com outros endófitos, apresentando altos níveis de transmissão, amplitude de afinidade de infecção, e podem causar diversas doenças em plantas (BARBIERE; CARVALHO, 2001), apresentando nestas os mais variados sintomas tais como tumores, necrose no caule, podridão do fruto entre outros (SILVA, 2007).

Os fungos podem ser identificados por características morfológicas, entretanto esta forma de identificação muitas vezes é dificultada, pois diversas espécies possuem características muito próximas, sendo, na maioria das vezes, necessárias a utilização de tecnologias como reação em cadeia da polimerase (PCR) para garantir a real identificação do organismo. Outro fator que dificulta a identificação são os sintomas causados pela infecção dos fungos, que estão associados a mais de um tipo de doença ou a mais de um tipo de fungo, tornando ainda mais difícil a identificação (NIEKERK et al., 2006). Esta dificuldade é encontrada na maioria das espécies de fungos, como os da família *Botryosphaeriaceae*.

Crous et al. (2006), utilizando de sequências de DNA, classificaram espécies ligadas à família *Botryosphaeriaceae*, sendo que, em algumas espécies, além da classificação da espécie pela sequência genética, existe uma classificação distinta pela forma de reprodução em forma teleomorfa (estádio meióspórico) e anamorfa (fase reprodutiva assexual). Este é o caso do fungo em estudo que na fase teleomorfo é denominado de *B. rhodina* e no estado anamorfo de *Lasiodiplodia theobromae* (ARX, 1981).

2.2.1. Compostos produzidos por *Botryosphaeria rhodina*

O fungo *B. rhodina* é, em muitas plantações, um patógeno, atacando quando estão em condições climáticas adversas (por exemplo, calor, frio, seca ou umidade extrema) podendo muitas vezes dizimar uma planta (SLIPPERS; WINGFIELD, 2007). Este fungo é também um produtor de metabólitos secundários de importância comercial já reconhecida.

Pesquisas com compostos resultantes do processo de fermentação de *B. rhodina* são desenvolvidas as mais variadas áreas, entretanto a farmacológica é uma das que apresentam promissor potencial de atividades destes compostos. Extratos de fermentados resultantes da fermentação de fungos *B. rhodina* apresentaram atividades antimicrobianas e antiproliferativa contra várias estirpes patológicas (ABDOU et al., 2009). A identificação das propriedades antimicrobianas e antiproliferativas sugerem que o sistema de interação planta-microrganismo pertence àqueles em que o endófito está ajudando a planta em um processo de simbiose, conseguindo assim manter sua própria sobrevivência. Esta proteção ocorre através da produção de compostos antifúngicos e antibacterianos do fungo endofítico, fornecendo ampla atividade de espectro antimicrobiano para se proteger de concorrentes invasores e/ou protegerem a planta de fitopatógenos. Uma das áreas de estudo é a produção destes compostos e sua utilização contra microrganismos causadores de doenças.

Além das atividades antifúngicas, correlacionadas ao sistema hospedeiro/invasor, os compostos produzidos pelo fungo *B. rhodina* apresentam também outras atividades de interesse médico como, por exemplo, atividade anticoagulante (MENDES et al., 2009) ou ainda compostos com capacidade de ativar o sistema imunológico de animais, como é o caso dos exopolissacarídeos (glucanas) (VASCONCELOS et al., 2008). A produção destes compostos, além de atender a indústria farmacêutica, tem também aplicações em outras áreas comerciais como é o caso da indústria alimentícia (SELBMANN; STINGELE; PETRUCCIOLI, 2003).

Alguns autores têm relatado ainda o potencial de linhagens de *B. rhodina* em produzir enzimas, que também são de interesse comercial, dentre elas, as lacases e as pectinases foram as mais encontradas (SALDANHA et al., 2007; DEKKER et al., 2007; GIESE et al., 2011; UENOJO; PASTORE, 2007).

Outra classe de compostos produzidos por fungos dessa espécie são os jasmonatos, fitormônios que tem despertado o interesse de pesquisadores por apresentarem propriedades biológicas de interesse comercial com atividade fitorreguladoras, anticâncer, antibacterianas,

entre outros. Entretanto, nem todas as linhagens dessa espécie de fungo são produtoras destes compostos. Em estudos realizados pelo grupo de pesquisa da Unidade de Biotecnologia na Universidade de Ribeirão Preto foi selecionada a linhagem Kifn 3.1 de *B.rhodina*, isoladas de diferentes hospedeiros, que têm apresentado promissor potencial de produzir estes hormônios.

2.2.1.1. Jasmonatos

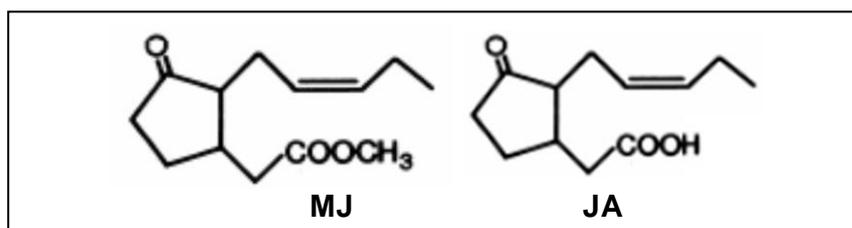
Assim como outros hormônios vegetais, os jasmonatos são mensageiros químicos que se movimentam entre as partes da planta e atuam diretamente na atividade dos genes, onde provocam respostas bioquímicas ou morfológicas. Estes compostos são produzidos em pequenas quantidades e são específicos, possuindo sítios de ligação nas membranas celulares (proteínas receptoras) onde ativam a ação de um ou mais mensageiros celulares que são capazes de realizar a ativação ou supressão de genes (RODRIGUES; LEITE, 2004).

Apesar de ser uma classe de hormônios, o termo jasmonatos inclui também os intermediários ativos na biossíntese do ácido jasmônico, bem como os derivados deste ácido que apresentem atividades biológicas ativas (TURNER; ELLIS; DEVOTO, 2002).

Dentre os jasmonatos, os mais conhecidos são o ácido jasmônico (AJ) e o metil jasmonato (MJ), identificados inicialmente no óleo de jasmim, e têm sua ação, nas plantas, ligada à inibição do crescimento e à indução de resistência a patógenos, participando ainda na proteção da planta contra as adversidades ambientais (ABDALA; CENZANO, 2006).

Os jasmonatos são derivados lipídicos da via dos octadecanoides (ou via Vick-Zimmermann), representados pelo ácido jasmônico (AJ), seu éster metil-jasmonato (MJ) (Figura 2), seus isômeros e alguns de seus precursores e metabólitos (HAMBERG; GARDNER, 1992). Os jasmonatos fazem parte das fito-oxilipinas, derivados de ácidos graxos livres (ácido linoléico e linolênico) pela ação das lipo-oxigenases (ACOSTA; FARMER, 2009).

Figura 2 - Estrutura química do metil jasmonato (MJ) e do ácido jasmônico (JA).



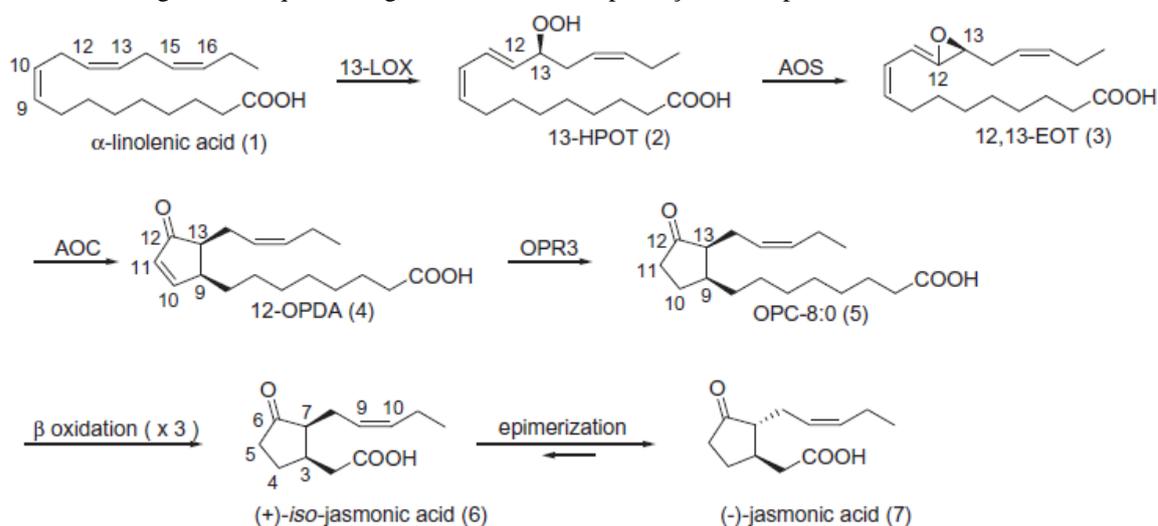
Fonte: MACIEL (2007)

Na década de setenta, Aldridge et al. (1971), isolaram o ácido jasmônico a partir de filtrado de culturas do fungo *Lasidiplodia theobromae*. Após estas pesquisas, diversos autores identificaram também os jasmonatos em outros vegetais.

A biossíntese dos jasmonatos acontece a partir da ativação de genes específicos, sendo que o gatilho que desencadeia a ativação dos genes pode ser o mais variado possível, mas todos ligados ao sistema de proteção da planta. Os jasmonatos estão ligados ao sistema de defesa dos vegetais, entretanto, as atividades biológicas destes nas plantas, são similares a de outros hormônios com atividades fitorreguladores (BLÉE, 2002). A rota metabólica dos mesmos já se encontra bem elucidada, mas o fato de um hormônio não atuar independente de outros dificulta o processo de produção dos mesmos (KERBAUY, 2012).

Nas plantas, a via de produção dos jasmonatos é denominada de via octadenocanoide, se inicia quando o ácido linolênico liberado por uma lipase é oxigenado por uma enzima, a lipoxigenase (LOX), sendo posteriormente convertido ao ácido 12-oxo-fitodienóico (OPDA) pela ação da aleno óxido sintase (OAS) e da aleno óxido ciclase (OAC) (Figura 3) (FARMER; RUSSELL; RYAN, 1992). Este processo ocorre a partir da ativação de grupos diferenciados de genes que desencadeiam uma série de reações de oxidação que culminam na formação dos jasmonatos (STRASSNER et al., 2002).

Figura 3 - Esquema de genes envolvidos na produção de AJ pela via dos octadenoides.



Fonte: TSUKADA; TAKAHASHI; NABETA, 2010.

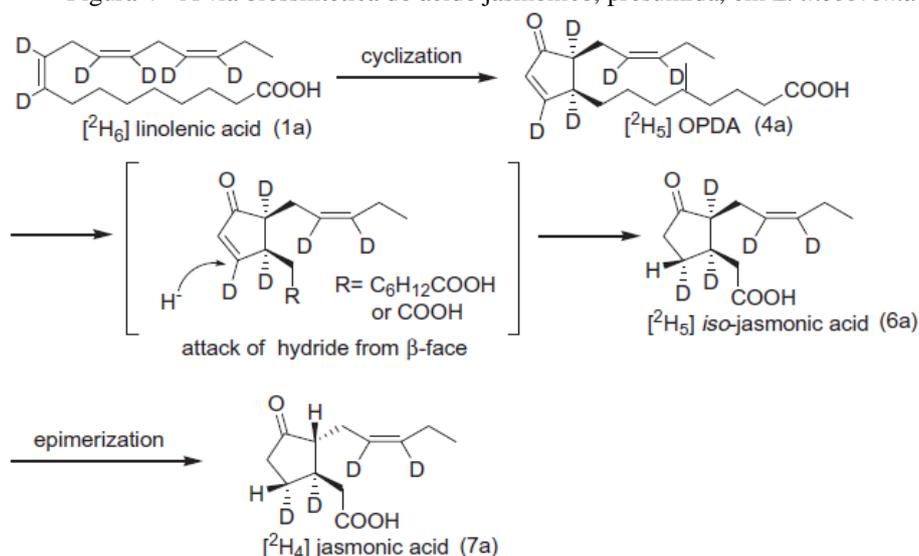
Após a produção deste hormônio pelas plantas, pode ser utilizado de imediato ou ficar acumulado (em pequenas quantidades) em partes da planta, dessa forma é possível fazer a extração do composto utilizando partes da planta onde se encontra em maior concentração.

A forma inicial de obtenção dos jasmonatos se deu pela extração a partir de flores de *Jasminium grandiflorum*, porém são necessários cerca de 800 kg de flores para a produção de apenas 1 g de ácido jasmônico. Esta forma de produção torna o produto oneroso uma vez que a concentração é baixa e, os mecanismos de extração laboriosos. Um quilograma de jasmonatos chega a ser comercializado a 50 mil reais (SECATTO, 2013), entretanto os jasmonatos são também encontrados em fungos e algas (DHANDHUKIA; TAKKAR, 2008).

Apesar de ainda não estar totalmente esclarecida, a rota metabólica da produção dos jasmonatos em fungos é semelhante às plantas. O processo se inicia com a identificação de um estímulo na parede celular, estímulo que promove a liberação de lipases, que fazem a oxidação do ácido linolênico. Em seguida, o ácido linolênico é exportado, a partir de plastídeos, para o peroxissomo, onde, então, é exportado para o citoplasma. Todo esse processo ocorre sob a ação de enzimas diversas (MOBLECH, FEUSSNER, HEILMANN, 2009).

A identificação de parte da rota metabólica da produção de jasmonatos em fungos da espécie *B. rhodina*, foi obtida com a utilização de marcadores radioativos que demonstraram a realização da síntese de ácido jasmônico (Figura 4) semelhante ao ocorrido nas plantas, por ciclização, apresentando inclusive atividades enzimáticas semelhantes (TSUKADA; TAKAHASHI; NABETA, 2010). Apesar da semelhança, algumas enzimas que atuam no processo são diferentes, o que sugere evoluções divergentes (BRODHUN, FEUSSNER, 2010).

Figura 4 - A via biossintética do ácido jasmônico, presumida, em *L. theobromae*.



Fonte: TSUKADA; TAKAHASHI; NABETA, 2010.

Inicialmente o estudo dos jasmonatos teve sua importância relacionada ao potencial fitorregulador. Segundo Meyer et al. (1984), estes reguladores de crescimento vegetal endógeno pertencem à classe das abscisinas e estão envolvidos no controle do metabolismo e desenvolvimento, possuindo ação inibitória do crescimento e da germinação de sementes e/ou ainda promovendo a senescência, assim como o ácido abscísico, sendo, portanto, um campo a ser explorado como bioestimulador ou elicitador (FARMER; RYAN, 1990).

Como os jasmonatos estão relacionados ao processo de defesa dos vegetais contra patógenos e adversidades ambientais, esta classe de compostos é mais uma com potencial comercial no objetivo de aumentar a produtividade agrícola (WEBER; VICK; FARMER, 1997). Entretanto, com o desenvolvimento de pesquisas, o leque de possibilidades de atividades dos jasmonatos foi ampliado e, conseqüentemente, o incremento da produtividade do hormônio também.

Uma das propriedades já reconhecidas, após a utilização exógena do metil jasmonatos, é a atividade fitorreguladora, com aumento da resistência à patógenos (WARABIEDA; OLSZAK, 2010). Além do aumento da resistência de plantas, a utilização do ácido jasmônico também exerce influência significativa na produção de frutos e botões florais em algumas espécies (LINARES et al., 2010).

Além destas atividades nas plantas, os jasmonatos também exercem ação biológica em células diferentes dos organismos em que são produzidos, configurando, assim, compostos que podem atuar em outras áreas, como na área da saúde. Na área farmacêutica, os jasmonatos têm apresentado atividades citotóxica, antibacteriana, antifúngica, antiagressiva, anticancerígena, entre outras (GOLDIN et al., 2008).

A busca por compostos com propriedades anticâncer é um campo, da área farmacológica, sempre em alta, pois, dentre as doenças que acometem a população do mundo, o câncer tem sido considerado relativamente comum, atingindo milhões de pessoas. Só no Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa para 2016 aponta para a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer (INCA, 2015). Segundo Sushma, Praveen e Poonam (2012), o câncer é o segundo maior problema de saúde pública em todo o mundo e o desenvolvimento de novos medicamentos, a partir de produtos naturais, tem se utilizado de metabólitos secundários de diversos organismos. Mais de 60% dos anticâncer utilizados atualmente são derivados de fontes naturais, como plantas, organismos marinhos e microrganismos (KIENLE et al., 2009), e isso tem intensificado a busca contínua por novos agentes naturais com essas propriedades.

Pesquisas têm demonstrado atividades anticâncer ligadas a diversos compostos da classe dos jasmonatos. Farooqi, Butt e Razzaq (2012) relacionam a prevenção do câncer de próstata com o uso de compostos derivados de microrganismos, dentre eles os jasmonatos, com capacidade de influenciar atividades receptoras de hormônios.

A utilização do metil jasmonatos, *in vitro*, induziu a morte em células de carcinoma de mama, próstata, melanoma, linfoma, células leucêmicas (FINGRUT; FLESCHER, 2002) e pulmão (FLESCHER, 2007) sem, no entanto, atingir linfócitos normais. Esta propriedade dos jasmonatos, de provocar morte celular nas células cancerígenas sem afetar os linfócitos normais, evidencia uma importante característica de seletividade citotóxica, impulsionando estudos contínuos no uso destas substâncias para o tratamento dos diversos tipos de câncer. Resultados semelhantes foram constatados por Lopes (2009) que, fazendo uso de metil jasmonato, conseguiu efeito citotóxico contra células tumorais de endotélio humano. Compostos derivados dos jasmonatos também têm apresentado atividade anticâncer em células do colo de útero e hepatomas humanos (RUSSO et al., 2012; MILROT et al., 2012; PARK et al., 2012).

Além das propriedades de combate a células cancerígenas, outras atividades biológicas desses compostos têm sido identificadas. Dang et al. (2011), em experimento com um análogo do metil jasmonato, conseguiram *in vitro* uma ação anti-inflamatória, demonstrando ser esse mais um potencial uso farmacêutico destes compostos. A utilização de MJ apresentou ainda ação citotóxica contra o protozoário *Trichomonas vaginalis*, (OFER; GOLD; FLESCHER, 2008).

Outra área da saúde em que a ação dos jasmonatos tem apresentado resultados satisfatórios, ainda *in vitro*, é a do controle de doenças consideradas endêmicas, como malária e esquistossomose (GOLD et al., 2003). O uso dos jasmonatos também está em teste com ação calmante e relaxante. Umukoro, Akinyinka e Aladeokin (2011) conseguiram, com o uso de metil jasmonato, a redução do uso de compostos para o controle da ansiedade em camundongos.

As pesquisas com jasmonatos são realizadas nas mais diversas áreas e a produção deste composto em quantidades que possam atender às necessidades tanto da pesquisa quanto, posteriormente, do mercado, é um desafio. Segundo Bhargav et al. (2008), os diversos produtos farmacológicos hoje comercializados, como, por exemplo, a produção dos ácidos cítrico, gálico, fumárico, linoleico e kojico, abriram novos campos de pesquisa. Do mesmo modo, a busca por processos que possam suprir a demanda da produção de jasmonatos, torna-se uma área a ser explorada.

2.3. BIOPROCESSOS

A manipulação de plantas e animais e o uso de microrganismos na geração de produtos de interesse têm suas origens na antiguidade, quando os princípios da biotecnologia eram empregados na produção de vinhos, pães e outros (BORÉM, 2005). A biotecnologia surgiu da integração de diversas áreas do saber, bioquímica, microbiologia, biologia molecular, genética, química, física e a engenharia (DORAN, 1995), entretanto, o termo biotecnologia só foi utilizado a partir do século XX e a ciência difere em muito do que praticavam no passado (CRIBB, 2004).

Os campos atendidos por essa “nova” ciência são bastante variados. Pandey, Soccol e Mitchell (2000) listam algumas dessas áreas: tratamento de águas residuais, fabricação de produtos alimentícios (iogurte, pão, vinho, molho de soja, cerveja, vinagre etc.), produção de enzimas, biorremediação, biodegradação, desintoxicação biológica, biotransformação e a produção de metabólitos primários e secundários (antibióticos, antioxidantes, enzimas, biopesticidas, biocombustíveis, elicitores, fitorreguladores etc.) entre outras. Fazer uma lista das áreas é um processo difícil, pois a cada dia são realizadas novas pesquisas e desenvolvidos novos produtos a partir da biotecnologia.

Nas últimas décadas, a biotecnologia provocou mudanças em áreas como a medicina, a agricultura, a gestão ambiental, entre outras, impulsionada principalmente pela manipulação de genes e pela biologia molecular. A partir da consolidação dessa ciência, foram desenvolvidos novos medicamentos, órgãos semissintéticos, alimentos mais nutricionais, tecnologia de computadores com bases moleculares biológicas, superorganismos e uma gama de produtos para o consumo e para processos industriais. Esses avanços têm como base o conhecimento e manipulação do material genético dos seres – ácido desoxirribonucléico (DNA), e a produção dos compostos orgânicos a partir desta manipulação (SHULER; KARGI, 2012).

Outro fator que torna importante a utilização da biotecnologia é o valor comercial ligado ao desenvolvimento dos mais variados compostos. Na balança final, a busca é por produtos cada vez menos dispendiosos e que tenham como fonte matéria-prima renovável (PEREIRA; BON, 2008). No processo de consolidação da biotecnologia, o desenvolvimento de bioprocessos foi e é um passo fundamental.

Segundo Pereira e Bon (*Ibid.*), são denominados de bioprocessos o emprego de procedimentos tecnológicos que utilizam sistemas biológicos, organismos vivos e os

compostos resultantes dos processos metabólicos destes para produzir, modificar produtos ou processos, ou ainda para favorecer atividades já existentes nos organismos. O produto pode ser ainda o próprio microrganismo, como na produção de levedura de panificação e de inoculantes agrícolas, ou ainda o resultado de uma transformação. A produção de compostos a partir de bioprocessos passa por três etapas:

- a) *Upstream process* – Nesta etapa é realizado o tratamento da matéria-prima, o preparo do meio de cultura e a esterilização.
- b) Etapa de transformação - Em que o meio de cultivo sofre a ação do agente biológico e das condições do processo.
- c) *Downstream process* - Em que ocorre a separação/purificação dos produtos resultantes da fase de transformação.

Para Mandenius e Brundin (2008), investigar as respostas ao longo do processo biotecnológico otimiza os resultados tanto *Upstream* quanto *Downstream*. Alguns fatores se tornam tão importantes que podem colocar todo um projeto em xeque, um exemplo, a produção de compostos que torna o meio de cultura viscoso (POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013).

Para aprimorar métodos, a integração das ciências é fundamental na elaboração e desenvolvimento do projeto, que deve prezar pela eficiência, sustentabilidade e economia. Da mesma forma, o conhecimento sobre a morfologia e fisiologia do organismo e a interação deste com os equipamentos e componentes do processo (FRESEWINKEL et al., 2014).

Analisar as variáveis e fatores existentes em um bioprocessos requer a utilização de mecanismos que possam dar maior agilidade e segurança, tanto na elaboração do projeto, quanto na análise dos dados. Um mecanismo que pode facilitar o estudo de variáveis interdependentes é a utilização de planejamento fatorial, que permite análises sem a necessidade da realização de um número muito grande de experimentos (MANDENIUS; BRUNDIN, 2008). A utilização do fatorial facilita o trabalho inicial, pois, apesar de um número pequeno de experimentos por fator, pode indicar as tendências da pesquisa (MARINHO; CASTRO, 2005).

A utilização de planejamento fatorial é uma ferramenta que favorece o desenvolvimento da pesquisa, tornando-o mais rápido, pois permite o estudo do efeito da influência de vários fatores e a combinação entre estes (CUNICO, et al., 2008). A utilização desse recurso permite a redução do número de ensaios e o estudo simultâneo de diversas variáveis, e da interação das mesmas.

Estruturado o fatorial, o passo inicial é a produção em bancada, buscando, nesta fase, as melhores condições de produção. No caso das fermentações, é fundamental conhecer e compreender a estrutura de biorreatores e a influência dos fatores que envolvem o desenvolvimento de um bioprocessos, enquanto ainda se desenvolve a pesquisa na bancada, pois, mesmo que o aumento da escala seja um desafio, muitos destes fatores têm seus parâmetros básicos definidos ou norteados na etapa da bancada.

Compreender o funcionamento e os parâmetros que envolvem o cultivo em biorreatores, enquanto ainda se faz a pesquisa em bancada, se torna importante, uma vez que estes equipamentos são utilizados em fermentações em larga escala. A utilização de biorreatores facilita o desenvolvimento das pesquisas, pois torna possível o controle da maior parte dos fatores físicos envolvidos no bioprocessos.

Segundo Pereira e Bon (2008), os biorreatores são classificados de acordo com os mecanismos de agitação e separação dos componentes do processo biológico: biorreatores agitados mecanicamente – *Stirred Tank Bioreactor* (STB), que possuem *peller* de agitação; biorreatores agitados pneumáticamente (*airlift ou bubble column*), que usam a energia cinética do líquido com uma coluna de bolhas; biorreatores a membrana (*hollow-fiber e flat-sheet*), que confinam as células no biorreator facilitando a separação de fases; e biorreator com células/enzimas, os quais imobilizam o agente biológico (ativos – reagentes químicos e passivos – com filmes biológicos). Deve-se identificar também quais são os fatores limitantes impostos pelo biorreator sobre a atividade do organismo. Segundo os autores, no biorreator deverão ser proporcionadas as condições antes estabelecidas em bancada para a melhor produção do agente biológico em estudo, dentre elas:

- Cinética do bioprocessos;
- Condições de esterilidade;
- Características hidrodinâmicas do meio;
- Processos de transferência de massa entre o agente biológico e o meio de cultura.

O modo de condução do bioprocessos em biorreator pode ser por: batelada simples, em que não há adição ou retirada de substâncias durante o processo; batelada alimentada, com a manutenção de um ou mais nutrientes, mas sem a retirada de produtos; ou condução contínua, em que ocorre tanto a alimentação quanto a retirada de produtos de forma contínua.

Ainda é possível que os biorreatores trabalhem com um ou mais microrganismos, com ou sem a recuperação do inóculo, em sequência ou não. Os processos podem ocorrer na

superfície do meio ou submersos (neste caso quase sempre com agitação) e em meio líquido, sólido ou semi-sólido.

Outro fator importante a ser considerado é o tempo de ciclo no biorreator, que também vai depender da espécie de organismo ou células que se utilizam e do tipo de produto que se deseja extrair (POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013).

Após a produção no biorreator, é realizada a extração dos compostos de interesse, a qual, segundo Abrahão Neto (2001), passa por quatro etapas:

- Remoção do material insolúvel;
- Separação dos compostos;
- Purificação;
- Isolamento final dos compostos.

A extração pode ocorrer por diversos processos, tais como filtração, centrifugação, extração por partição líquido-líquido, extração por enzimas, adsorção e cromatografia. A escolha do método está relacionada às características do composto que se deseja recuperar (POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013). Em todas as fases, os objetivos devem ser conciliados com a redução dos materiais contaminantes e na possibilidade de reutilização dos materiais empregados durante a produção (SHULER; KARGI, 2012).

Na fase de bancada, a simulação dos processos do biorreator pode ser feita com a combinação de diversos arranjos experimentais, desde que se possa reproduzir a hidrodinâmica da escala industrial, com o objetivo de manter o comportamento da cultura, especialmente no caso de fungos filamentosos (PAPAGIANNI, 2011). Todas essas etapas estão sujeitas a fatores diversos, tanto físicos quanto biológicos. A identificação e controle destes fatores na busca de melhores condições de produção caracterizam os processos biotecnológicos. De modo geral, existem variáveis que são comuns a quase todos os bioprocessos e que afetam o desenvolvimento e obtenção de compostos de interesse.

Entre as variáveis a serem otimizadas, Mandenius e Brundin (2008) citam o meio de cultura e os processos de operação; já Wang et al. (2009) coloca como pontos centrais, o melhoramento da linhagem microbiana, a otimização das condições do processo aliadas ao aumento da escala de produção. Apesar das variáveis serem interligadas, o controle de algumas é considerado essencial para o desenvolvimento de praticamente todos os organismos que se deseja trabalhar.

2.3.1. Variáveis do processo

Existem variáveis que afetam todos os organismos de maneira positiva ou negativa, tanto no crescimento, quanto na produção de compostos, e os processos fermentativos também estão sujeitos a estes fatores. São considerados processos fermentativos as reações de catálise de carboidratos ou de compostos orgânicos, podendo ocorrer na presença de oxigênio (fermentação oxidativa ou aeróbica) ou na ausência do mesmo (fermentação anaeróbica ou anoxidativa). Independente do tipo de fermentação, os organismos produzem no desenvolvimento destes processos os metabólitos primários e secundários que podem ser de interesse comercial, como, por exemplo, a produção de ácido acético, ácido lático, etanol, ácido butírico, antibióticos, entre outros (STANBURY; WHITAKER; HALL, 2003).

Dentre os fatores que podem afetar o bioprocesso destacam-se principalmente a temperatura, o pH, a concentração de oxigênio e o gás carbônico dissolvido no meio de cultura. A interação da temperatura-organismo pode ser a mais variada para os organismos. Segundo Shuler e Kargi (2012), existem três grupos de organismos para os quais a temperatura ótima (t_{opt}) é diferente: (1) organismos psicrófilos ($t_{opt} < 20\text{ }^{\circ}\text{C}$), organismos, (2) mesófilos (t_{op} entre $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$) e organismos (3) termófilos ($t_{op} > 50\text{ }^{\circ}\text{C}$).

À medida que a temperatura aumenta, a taxa de crescimento pode dobrar a cada $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, quando ultrapassada a temperatura ótima, a taxa de crescimento diminui e a morte térmica pode acontecer. A partir de determinada temperatura, a taxa de morte térmica é superior à taxa de crescimento, diminuindo a concentração de células viáveis.

Da mesma forma, a temperatura pode influenciar na formação de compostos, podendo ser diferente da temperatura ótima de crescimento da massa celular. O fato de a temperatura ideal de crescimento nem sempre ser a mesma da produção de compostos de importância comercial, pode dificultar o processo de produção. Além disso, variações na temperatura podem atuar como fator limitante nos processos biológicos, como, por exemplo, no processo de difusão, que pode ser dificultado ou acelerado dependendo da mesma.

A influência da temperatura na produção de compostos depende do tipo de organismo, uma vez que cada organismo possui uma determinada temperatura ideal. Entretanto, pode também estar relacionado ao sistema utilizado que pode ou não facilitar a saída do calor, por exemplo, um sistema com mais aeração perde calor mais facilmente que um menos aerado (BHARGAV et al., 2008). Desta forma, a agitação também é um fator a ser considerado, pois maior agitação pode facilitar a aeração e, conseqüentemente, a liberação do calor, além de

facilitar a difusão dos nutrientes necessários ao processo de fermentação (GEBIEN et al., 2012). A agitação pode também atuar incrementando ou limitando a produção de determinados compostos, como é o caso dos polissacarídeos (POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013).

Assim como a temperatura, o pH afeta o metabolismo dos organismos e a definição do pH ótimo está relacionado à espécie dos organismos e, do mesmo modo que a temperatura, pode ser diferente o pH ideal para o crescimento do pH para a produção de compostos de interesse (SHULER; KARGI, 2012).

Conhecer o pH ideal pode favorecer o aumento da produtividade ou ainda identificar condições que impedem o crescimento dos microrganismos não desejáveis como, por exemplo, na seleção de organismos participantes dos processos de produção de alimentos fermentados. Além da temperatura, o pH pode ainda agir em conjunto com outros fatores, como a salinidade (GONÇALVES, 2013).

O controle do pH e da temperatura pode, ainda, aumentar o rendimento de processos fermentativos ou controlar o crescimento de microrganismos (GONZÁLEZ et al., 2009; CHAGANTI et al., 2013). Da mesma forma, o pH é utilizado para incrementar processos de produção de compostos, como na produção de enzimas (NASCIMENTO et al., 2013) e de pigmentos fúngicos (TUDOR; ROBINSON; COOPER, 2013). Podem também influenciar o bioprocesso, os mecanismos de agitação do biorreator, e a forma de inserção e saída dos componentes necessários ao processo de fermentação (WONG et al., 2014).

Outra variável a ser considerada nos processos fermentativos é a taxa de oxigênio dissolvido (O.D.) que pode atuar, quando em baixas concentrações, como fator limitante dos processos de crescimento celular e de produção de compostos. Apesar de, em baixas concentrações, ser um fator limitante, acima de determinado valor (variável a cada organismo) a taxa de O.D não interfere no crescimento e nem na produção de compostos.

Mesmo sendo essencial, o oxigênio sozinho não participa do metabolismo celular, ele faz parte de uma série de reações bioquímicas em que uma fonte de carbono é fundamental para que ocorra a produção de energia que será utilizada tanto para o crescimento quanto para a produção de compostos (SHULER; KARGI, 2012). A taxa de energia liberada nestas reações depende da concentração de oxigênio disponível no processo e da fonte de carbono consumida pelo organismo (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009; LABBEIKI et al., 2014).

Na fermentação em biorreatores, o oxigênio normalmente é introduzido por aspersão de ar no meio de cultura e as bolhas de ar liberam o gás, que é absorvido pelas células. A dissolução do oxigênio e a disponibilidade deste às células dependem da temperatura do meio

de cultura e da viscosidade, sendo que temperaturas mais altas e meios de cultura menos viscosos facilitam a dissolução (SHULER; KARGI, 2012).

A influência do oxigênio ocorre tanto pela concentração do gás utilizada no processo, quanto da disponibilidade do mesmo às células (JI; HUANG; OUYANG, 2011; LEITE, 2014). A transferência do oxigênio presente em um sistema pode ser acelerada pela forma de atividade do biorreator, sendo que velocidades maiores promovem aumento da taxa de transferência de oxigênio o que favorece a produção de biomassa (KARIMI et al., 2013, COSTA, 2011, KUMAR, et al., 2013).

A taxa de oxigênio pode ainda afetar a morfologia, o crescimento celular, a absorção de nutrientes e a produção de metabólitos (TANG; ZHONG, 2003). No caso de modificações na morfologia de fungos filamentosos, isto pode influenciar na reologia do fermentado final, pois dependendo do tamanho ou da forma das estruturas das hifas pode ocasionar maior ou menor viscosidade do caldo (LIN; SCHOLZ; KRULL, 2010; TANG; ZHONG, 2003). Além do oxigênio, outro fator que pode alterar a viscosidade é a produção, pelo microrganismo, de compostos que alteram a reologia do fermentado, como os exopolissacarídeos. A produção destes compostos pode ser desencadeada por diversos fatores, tanto químicos quanto físicos como, por exemplo, o processo de agitação no cultivo de fungos filamentosos (POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013).

A aeração tem, portanto, efeito sobre o perfil metabólico e afeta a dinâmica microbiana de diversos organismos influenciando tanto no crescimento quanto na produção de compostos, como por exemplo, na produção de etanol (SAVOLAINEN et al., 2014). A influência do oxigênio no crescimento e produção de compostos está ligada a presença de uma fonte de carbono, portanto conhecer as principais fontes e a forma como a energia resultante da oxidação da fonte de carbono é disponibilizada ao microrganismo também é fator de influência em um bioprocessos.

O carbono é um dos elementos mais importantes para os microrganismos, uma vez que fornece energia para os processos metabólicos e participa ainda da formação da estrutura do organismo (CUNHA, 2010).

Para a maioria dos organismos, a principal fonte de carbono são os carboidratos (poliidroxialdeídos ou poliidrocetonas), classificados em três grupos de acordo com o número de ligações glicosídicas em monossacarídeos que contem de 3 a 7 carbonos (glicose, frutose, galactose etc.), oligossacarídeos ou dissacarídeos formados de dois monossacarídeos (sacarose, lactose, maltose etc.) e polissacarídeos formados por diversos monossacarídeos (amido, celulose, quitina, glicogênio). Os monossacarídeos não podem ser hidrolisados em

carboidratos mais simples, enquanto os dissacarídeos são hidrolisados em duas moléculas de monossacarídeos e os polissacarídeos resultam em mais de duas moléculas de monossacarídeos (SOLOMONS; FRYHLE, 2009). Durante o processo de hidrólise é produzida e liberada energia que pode ser utilizada pelo organismo. A glicose é um dos carboidratos mais utilizados pelos organismos, entretanto os processos bioquímicos podem diferenciar de um organismo para outro em aeróbios (o oxigênio é o aceptor final de hidrogênios) ou anaeróbios (ocorre sem aceptor final),.

Nos processos aeróbios a quantidade de energia liberada pela oxidação de cada molécula de carboidrato é maior quando comparada aos processos anaeróbios. Além disso, muitos organismos só são capazes de utilizar a fonte de carbono para a produção de energia na presença do oxigênio. A influência do oxigênio tem, portanto, um papel vital na síntese de metabólitos de interesse (YANG et al., 2014).

São também fundamentais ao processo de produção de compostos de interesse, macronutrientes como o nitrogênio, elemento essencial na constituição dos aminoácidos (proteínas), e o fósforo, que participa do metabolismo energético e na síntese de ácidos nucleicos. Juntamente com o oxigênio e a fonte de carbono, esses compostos são essenciais, ainda, em diversas reações metabólicas de desenvolvimento dos organismos.

Após as reações metabólicas da utilização da fonte de carbono com o oxigênio, os processos fermentativos resultam na produção de diversos compostos e também de dióxido de carbono (CO₂), que afeta o desenvolvimento dos organismos e, conseqüentemente, a produção dos compostos de interesse, sendo necessário que seja retirado do meio de cultura, uma vez que determinados níveis deste gás podem ser tóxicos para os organismos.

Nos trabalhos em bancada, o CO₂ produzido é liberado nos espaços em que havia inicialmente o oxigênio; em biorreatores existem mecanismos de retirada do gás sem comprometer o crescimento do organismo. Tanto o oxigênio como o gás carbônico têm o processo de troca gasosa suplementado em processos com agitação (DORAN, 1995).

Assim como no caso da temperatura, do pH, e do oxigênio, o controle do gás carbônico em um sistema pode ser utilizado tanto para incrementar a produtividade quanto para reduzir a atividade de determinados organismos, atuando muitas vezes como inibidor do crescimento de fungos e bactérias (HYMERY et al., 2014; CHENG et al., 2012; GUPTA; SINHA; ATWAL, 2014).

Segundo Cunha (2010), outro fator a ser considerado nos bioprocessos de metabólitos primários e secundários é o tipo de produção dos compostos em relação ao crescimento do microrganismo em estudo que pode ser:

- Associado – o produto formado é derivado diretamente do metabolismo primário do organismo, ou seja, a formação do produto ocorre em paralelo com o crescimento do organismo e conseqüentemente, com consumo do substrato (exemplo: a produção aeróbica de leveduras, a fermentação láctica por *Lactobacillus homofermentativos*).
- Semi-associado – o produto é derivado de um substrato usado no metabolismo primário, entretanto possui uma rota colateral ao do crescimento do organismo (exemplo: produção de ácido cítrico e a fermentação glucônica).
- Não associado – a formação do produto só se inicia após o término ou redução da reprodução celular do organismo em estudo, quando o substrato foi quase totalmente consumido (exemplo: processos de produção de antibióticos e também vitaminas).

A influência destas variáveis nos processos de produção não ocorre independente uma das outras, antes estão na maioria das vezes interligadas (PU et al., 2013). Identificar a combinação microrganismo, compostos, pH, temperatura e velocidade de agitação em que ocorre melhor produção de determinado composto é um trabalho árduo. A produção de ácido jasmônico, a partir de fungos, também está sujeita a estas variáveis, portanto fazer alterações no meio de cultura e na forma de cultivo pode favorecer a produção do composto.

Uma vez que o fungo *B. rhodina* tem apresentado produção de ácido jasmônico superior ao das plantas, este é um microrganismo a ser pesquisado, assim como alterações na fonte de carbono, nitrogênio e de fósforo, pois estes componentes, de modo geral, afetam as atividades biológicas de todos os organismos. Já entre as modificações físicas, uma das possibilidades é a de alterar a forma de cultivo de estático para agitado, uma vez que em larga escala as fermentações geralmente acontecem desta forma.

Segundo Canilha, Carvalho e Silva (2006), outra ferramenta que pode ser utilizada para aumentar a eficiência de bioprocessos é a utilização de mecanismos de imobilização do biocatalizador, que pode ocorrer por quatro processos:

- Autoagregação: as células se agrupam (naturalmente ou artificialmente) sem a necessidade de um suporte.
- Ligação à superfície: utiliza-se um suporte, ao qual as células se ligam por interação iônica ou covalente, entre as células e o suporte.
- Aprisionamento em matriz porosa: utiliza-se de uma matriz (alginato ou carragena) que envolve o biocatalizador a ser imobilizado. Este processo é o mais comumente utilizado para células viáveis.

- Contenção por barreira: o agente biocatalizador é encapsulado por membranas pré-formadas.

Portanto, segundo a literatura, existem diversas possibilidades de incremento da produção de compostos em fungos filamentosos, dentre as quais o aprisionamento em matriz porosa, modificações nos compostos do meio de cultura e na forma de cultivo do microrganismo. Estes fatores podem também influenciar tanto a produção de AJ, quanto o tempo de produção do mesmo.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Otimizar a produção de ácido jasmônico pela linhagem Kifn 3.1 do fungo *B. rhodina* em diferentes condições de cultivo.

3.1.1. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de diferentes fontes e concentrações de carbono (glicose, sacarose, lactose e amido) na produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* linhagem Kifn 3.1 quando cultivado em meio Br1 em condições de cultivo agitada;
- Avaliar experimentalmente a influência do nitrogênio (KNO_3), fósforo (KH_2PO_4) e sacarose sobre a produção de AJ em condições estáticas;
- Definir a influência do tempo de cultivo (6, 9 e 12 dias) sobre a taxa de produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* linhagem Kifn 3.1 quando cultivado em meio Br1;
- Definir a influência da concentração da fonte de fósforo sobre a taxa de crescimento celular e sobre a taxa de produção de jasmonatos em condições estáticas;
- Avaliar o efeito de diferentes fontes e concentrações de carbono (glicose, sacarose, lactose e glicerol) na produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* quando cultivado em meio mínimo e meio Br1 em condições estáticas;
- Avaliar experimentalmente a possibilidade de imobilização do fungo;
- Avaliar experimentalmente o efeito da sacarose e do fósforo (KH_2PO_4) sobre a produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* em fermentação em meio Br1 e meio Mv sob condições estáticas e agitadas;
- Quantificar o AJ produzido nas diferentes condições de processo e determinar as produtividades nas diferentes condições testadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os trabalhos foram desenvolvidos na Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), Campus Ribeirão, nos laboratórios da unidade de Biotecnologia e do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Agro-industrial (CTDA).

4.1. MATERIAIS

No desenvolvimento dos trabalhos foram utilizados solventes de grau P.A. e os equipamentos:

- AV 30 - PHOENIX
- Bomba a vácuo (Fabre-Primar 151) - TECNAL.
- Bomba de vácuo - NOVA TÉCNICA
- Câmara de Fluxo laminar – VECO.
- Capela de exaustão (0216 EX 2) - QUIMIS.
- Coluna Supelcosil C₁₈ (25 cm x 4,6 mm id, 5µm) – SIGMA ALDRICH
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (LC-10AD *vp*) – SHIMADZU.
- Cromatoplasmas de sílica gel (G60 F254) – MACHEREY-NAGEL
- Espectrofotômetro (600) – FEMTO.
- Incubadora refrigerada (B.O.D. MA 415) – MARCONI.
- Incubadora refrigerada (B.OD. MA 830) – MARCONI.
- Meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA) – ACUMÉDIA.
- Padrão ácido jasmônico (AJ) 2500 – SIGMA
- Padrão metil jasmonatos (MJ) - SIGMA
- pHmetro (W3B) - BELL ENGINEERING.
- Refrigerador (compacto 120) - CONSUL
- Turrax (MA 102) – MARCONI.

4.2. MANUTENÇÃO DA LINHAGEM DE *B.rhodina*

Para a manutenção da linhagem, estoques do fungo *B.rhodina* linhagem Kifn 3.1 são mantidos em frascos contendo água deionizada estéril e também em tubos de meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), cobertos com óleo mineral estéril, à temperatura ambiente. Para a reativação da cultura, 0,25 cm² do fungo foi inoculado em placas de Petri contendo meio de cultura BDA e mantido a 30°C na ausência de luz por 7 dias, servindo posteriormente de inóculo para a produção do homogenato para as fermentações.

4.3. PREPARO DE MEIO DE CULTURA

No desenvolvimento do trabalho, foram utilizados diversos meios de cultura, sendo que a reativação do fungo *B. rhodina* ocorre em meio BDA, o crescimento para o preparo do inóculo em meio Br1 (meio adaptado a partir do meio Miersh, MIERSCH et al., 1989) e as fermentações em meio Br1, meio mínimo e em meio Mv (meio Br1 com modificações na concentração de sacarose e fosfato).

4.3.1. Meio Br1

Para o preparo do Br1 foram utilizados os componentes relacionados na Tabela 1, sendo estes compostos adicionados a 1000 mL de água deionizada e, posteriormente a agitação e dissolução dos compostos, o pH corrigido para 5,5. Este meio de cultura foi então autoclavado a 121 °C (1 kgf.cm⁻²) por 15 minutos para a posterior inoculação em câmara de fluxo laminar.

Tabela 1 - Composição do meio Br1.

Componente	Concentração g.L ⁻¹
Sacarose	50,0
KNO ₃	7,5
KH ₂ PO ₄	2,0
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,6
KCl	0,3
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,6
EDTA	0,8
Extrato de levedura	2,0
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,03
MnSO ₄ H ₂ O	0,003
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,003
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,003

4.3.2. Meio Mínimo

Para o meio mínimo foram utilizados de 20 mL da solução de sais 10,9 g de glicose, 0,058 de nitrato de sódio, 2 g de caseína, 50 mL de elementos traços (Tabela 2), dissolvidos em 1 litro de água deionizada. Após a dissolução total dos componentes, o meio foi autoclavado a 121 °C (1 kgf.cm⁻²) por 15 minutos para a posterior inoculação em câmara de fluxo laminar.

Tabela 2 - Composição da solução de sais e elementos traços para meio mínimo (para 1000 mL).

Composto	Concentração
K ₂ SO ₄	76 g.L ⁻¹
KCl	26 g.L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	26 g.L ⁻¹
Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	40 mg.L ⁻¹
CuSO ₄ ·5H ₂ O	400 mg.L ⁻¹
FeSO ₄ ·7H ₂ O	532 mg.L ⁻¹
MnSO ₄ ·H ₂ O	292 mg.L ⁻¹
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	800 mg.L ⁻¹
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8 g.L ⁻¹

4.3.3. Meio Mv

Para o preparo do Mv foram utilizados os componentes químicos relacionados na Tabela 3, sendo estes compostos adicionados a 1000 mL de água deionizada e, posteriormente a agitação e dissolução dos compostos, o pH corrigido para 5,5. Este meio de cultura foi então autoclavado a 121 °C (1 kgf.cm⁻²) por 15 minutos para a posterior inoculação em câmara de fluxo laminar.

Tabela 3 - Composição do meio Mv.

Componente	Concentração g.L ⁻¹
Sacarose	75,0
KNO ₃	7,5
KH ₂ PO ₄	0,5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,6
KCl	0,3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,6
EDTA	0,8
Extrato de levedura	2,0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,03
MnSO ₄ ·H ₂ O	0,003
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,003
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,003

4.3.4. Meio BDA

Para o preparo do meio, 24 g de pó de BDA foram diluídos em um litro de água deionizada e então esterilizado por autoclavagem a 121°C (1 kgf.cm⁻²) por 15 minutos, sendo posteriormente resfriados a temperatura ambiente até aproximadamente 40°C, sendo então, em câmara de fluxo laminar, vertido em placas de petri estéreis. Após o resfriamento total do meio de cultura as placas foram então utilizadas.

4.4. PREPARO DO HOMOGENATO (INÓCULO)

Para o preparo do homogenato, fungo do estoque foi inicialmente inoculado e crescido em meio BDA; posteriormente utilizou-se de um fragmento de 0,25 cm² da placa micelial do fungo, sendo este inoculado em 50 mL de meio Br1. Após a inoculação o material foi mantido em incubadora, sob condições estáticas, à temperatura de 30 °C e na ausência de luz durante seis dias. O micélio foi então utilizado como inóculo para o preparo do homogenato. Posteriormente o micélio crescido em Br1 teve o meio de cultura escoado e à massa micelial resultante foi adicionada água deionizada. Este material foi então desintegrado com Turrax por aproximadamente cinco minutos, sendo adicionada água deionizada até a obtenção de um homogenato com densidade ótica de 0,5 (700 nm), medido em espectrofotômetro.

4.5. FERMENTAÇÕES PARA A PRODUÇÃO DE JASMONATOS

Para as fermentações foram utilizados 5 mL de inóculo do fungo *B. rhodina* isolados de plantas tropicais, uma vez que em esta linhagem se mostrou produtora de ácido jasmônico em concentrações superiores às plantas.

4.5.1. Avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono (Lactose, Sacarose, Glicose e amido solúvel) sobre a produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* em fermentação agitada (150 rpm).

Com o objetivo de identificar a fonte de carbono mais propícia à produção de AJ em sistema agitado, foram utilizadas as fontes de carbono: lactose, sacarose, glicose e amido solúvel no meio de cultura Br1. Foram preparados meios de cultura Br1 sem sacarose (normalmente utilizada em concentração de 50 g.L⁻¹) e suplementados com as fontes de carbono em 3 diferentes concentrações (15, 30 e 50 g.L⁻¹) para cada fonte (Tabela 4). Os carboidratos utilizados foram lactose (L), glicose (G), e amido solúvel (A) comparado à sacarose (S).

Tabela 4 - Tratamento com diferentes fontes de carbono (Lactose, Sacarose, Glicose e Amido) no meio Br1.

Tratamento	Fonte Carbono	Concentração g.L ⁻¹
L1	Lactose	15
L2	Lactose	30
L3	Lactose	50
S1	Sacarose	15
S2	Sacarose	30
S3	Sacarose	50
G1	Glicose	15
G2	Glicose	30
G3	Glicose	50
A1	Amido solúvel	15
A2	Amido solúvel	30
A3	Amido solúvel	50

Foram utilizados erlenmeyers de 250 mL de volume útil, contendo 50 mL dos meios de cultura, onde foram inoculados 5,0 mL de homogenato com D.O. de 0,5 em cada erlenmeyer. As fermentações foram realizadas em triplicata e mantidas sob agitação de 150 rpm a 30 °C no escuro¹, durante 15 dias. Decorrido o período de 15 dias de fermentação, os materiais foram filtrados e os líquidos submetidos à extração, detecção e quantificação de AJ. Os micélios foram pesados para avaliar a massa fresca e então secos em estufa a 40 °C até peso constante visando avaliar a massa seca.

Visando refinar o experimento, um novo experimento foi realizado em bloco, desta vez utilizando-se apenas as concentrações de 30 e 50 g.L⁻¹ de cada fonte de carbono testadas (Tabela 5). O experimento foi realizado em blocos casualizados utilizando-se as 4 fontes de carbono anteriormente citadas.

¹ Experimentos anteriores resultaram em maior produção de ácido jasmônico na ausência de luz.

Tabela 5 - Tratamento com diferentes concentrações e fontes de carbono no meio de cultura Br1.

Fonte de carbono	sigla	Concentração g.L ⁻¹
Amido	A30	30
Amido	A50	50
Glicose	G30	30
Glicose	G50	50
Sacarose	S30	30
Sacarose	S50	50
Lactose	L30	30
Lactose	L50	50

Os meios foram preparados, esterilizados em autoclave e posteriormente inoculados com 5 mL de homogenato. As fermentações foram mantidas sob agitação de 150 rpm a 30°C no escuro, por um período de 15 dias. Após o período de fermentação, realizou-se a filtração à vácuo e o filtrado submetido à extração, detecção e quantificação de AJ. A massa fresca de micélio foi pesada e em seguida seca em estufa a 40° até peso constante, para a determinação dos valores de massa fresca e seca respectivamente. O experimento foi realizado em triplicata totalizando os três blocos, 24 frascos com grau de liberdade de 23. Deste experimento foram analisadas as variáveis respostas: produção de ácido jasmônico, volume do filtrado resultante, massa seca e fresca e pH.

4.5.2. Avaliação do efeito da concentração de Nitrogênio (N) Fósforo (P) e Carbono (Sacarose) sobre a produção de AJ em fermentação estática.

Visando avaliar o efeito da concentração da fonte de carbono (sacarose), fósforo (KH₂PO₄), nitrogênio (KNO₃) e do tempo de fermentação (6, 9, e 12 dias) sobre a produção de ácido jasmônico pelo fungo *B.rhodina* foram variadas as concentrações de sacarose (20 ou 50 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (0,5 ou 2,0 g.L⁻¹) e KNO₃ (2,0 ou 7,5 g.L⁻¹) no meio de cultura Br1 (controle).

Para as fermentações foram utilizados 5 mL de inóculo do fungo para 50 mL dos meios de cultura em erlenmeyer com volume útil de 250 mL. Para a estruturação do experimento foi utilizado de planejamento experimental fatorial executado com dois níveis e três fatores (2³), sendo que o sinal “-” significa a menor concentração utilizada e o sinal “+” a maior concentração (Tabela 6). Após a inoculação as fermentações foram mantidas em câmara de crescimento tipo BOD sob condições estáticas no escuro a 30 °C por períodos de 6, 9 e 12 dias. O experimento foi realizado em duplicata.

Tabela 6 – Fatorial representando as concentrações das fontes de Nitrogênio (KNO₃), fósforo (KH₂PO₃) e carbono (sacarose) presentes no meio de cultura.

Tratamentos	N	P	Sacarose
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

N (-) 2,0 g.L⁻¹, N (+) 7,5 g.L⁻¹, P (-) 0,5 g.L⁻¹, P (+) 2,0 g.L⁻¹, Sacarose (-) 20 g.L⁻¹, Sacarose (+) 50 g.L⁻¹

Após decorrido os períodos de fermentação, o material foi submetido a filtração à vácuo e posteriormente à extração e quantificação de AJ produzido. A biomassa foi pesada e então seca em estufa a 40 °C até peso constante para a determinação dos pesos fresco e seco respectivamente. As análises estatísticas foram realizadas com a Planilha Eletrônica para Cálculos de Planejamentos Experimentais².

4.5.3. Avaliação do efeito da concentração de sacarose sobre a produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* cultivado em meio Br1 em fermentação estática.

Com o objetivo de verificar o efeito da concentração de sacarose sobre a produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* em fermentação estática, foi preparado um experimento de fermentação em meio Br1 suplementado com concentrações de sacarose de 0,0 g.L⁻¹ a 400 g.L⁻¹ com intervalos de 25 g.L⁻¹. Este experimento foi realizado com o cultivo em seis dias, uma vez que em experimentos anteriores com este período de fermentação a produção de AJ é estatisticamente a mesma que períodos de 9 e 12 dias, desta forma foi possível reduzir o tempo de produção do composto.

Os meios foram preparados, esterilizados em autoclave e posteriormente inoculados com 5 mL de homogenato. As fermentações foram mantidas estáticas em incubadora tipo BOD a 30 °C no escuro por 6 dias. Após este período, foi realizada a filtração, extração, detecção e quantificação do AJ. O experimento foi realizado em quintuplicatas e foram avaliadas as variáveis resposta: produção de AJ, biomassa seca e fresca.

² Repositório da UNICAMP - <http://lqta.iqm.unicamp.br/portugues/Downloads.html#teofilo> - Acesso em 20/12/2013

4.5.4. Avaliação do efeito da concentração de Fósforo (KH_2PO_4) sobre a produção de ácido jasmônico

Resultados anteriores demonstraram a importância do fósforo na produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* quando fermentado em meio Br1. Visando verificar o efeito da concentração deste composto sobre a produção, foi realizado experimento variando-se a concentração de fósforo no meio de cultura Br1 em concentrações de 0,00 a 3,0 g.L^{-1} da fonte de fósforo (KH_2PO_4) com intervalos de 0,5 g entre estes. O objetivo foi a obtenção de uma curva de produção de ácido jasmônico em função da concentração de fósforo no meio de cultura.

O meio de cultura foi preparado com as variações do fosfato e inoculado com 5 mL de homogenato com D.O. de 0,5. Após a inoculação o material ficou em incubadora à temperatura de 30 °C por 6 dias sob condições estáticas e no escuro. Decorrido o período de fermentação, o material foi filtrado a vácuo e o filtrado submetido à extração e análise da produção de ácido jasmônico. A biomassa foi pesada e seca em estufa a 40 °C até peso constante para a determinação dos pesos fresco e seco respectivamente. Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e a análise de regressão para estimar o ponto de máximo aproveitamento.

4.5.5. Avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono (Lactose, Sacarose, Glicose e glicerol) sobre a produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* em fermentação em meio Br1 e meio mínimo em condições estáticas.

Com o crescimento do fungo, ocorre o consumo de energia para a manutenção do metabolismo básico. Reduzir o consumo dos nutrientes com este metabolismo pode favorecer a produção de compostos secundários. Neste intento, foi realizado um experimento fatorial em que se objetivou estudar a produção do ácido jasmônico pelo fungo em relação a três fatores: o meio (Br1 e Mínimo), as fontes de carbono (Lactose, Sacarose, Glicerol, glicose) e concentração das fontes de carbono (75 g.L^{-1} e 50 g.L^{-1}). Estes foram comparados ao controle

negativo, sendo este sem fonte de carbono no meio Br1 e mínimo, e ao controle do meio mínimo em que a concentração de glicose a 3 g.L^{-1} (Tabela 7). Para as fermentações foram preparados meio de cultura Br1 e meio mínimo (MM) suplementados com as fontes de carbono nas concentrações de $0,0 \text{ g.L}^{-1}$, 50 g.L^{-1} e 75 g.L^{-1} e as fermentações foram mantidas no escuro por um período de seis dias.

Tabela 7 - Fatorial representando os tratamentos das fontes de carbono (sacarose, glicose, lactose e glicerol) e as concentrações ($0,0 \text{ g.L}^{-1}$, 50 g.L^{-1} e 75 g.L^{-1}) presentes nos meios de cultura. Br1 e meio Mínimo (MM).

Tratamento	Fonte de carbono	Meio de cultura	Concentração g.L^{-1}
1	Controle negativo	Br1	0,0
2	Lactose	Br1	75
3	Lactose	Br1	50
4	Sacarose	Br1	75
5	Sacarose	Br1	50
6	Glicerol	Br1	75
7	Glicerol	Br1	50
8	Glicose	Br1	75
9	Glicose	Br1	50
10	Controle negativo	MM	0,0
11	Lactose	MM	75
12	Lactose	MM	50
13	Sacarose	MM	75
14	Sacarose	MM	50
15	Glicerol	MM	75
16	Glicerol	MM	50
17	Glicose	MM	75
18	Glicose	MM	50
19	Glicose	MM	3

4.5.6. Imobilização do fungo *B.rhodina* em alginato de cálcio, bucha vegetal e bucha sintética.

Com o objetivo de imobilizar o fungo *B. rhodina*, evitando assim seu crescimento, foi testado inicialmente alginato de cálcio. Para isso, em béquer de 250 mL, foram dissolvidos 3,0 g de alginato de sódio em 100 mL de água deionizada aquecida a 70°C para a dissolução total. Em outro béquer, foram dissolvidos 15 g de cloreto de cálcio em 500 mL de água deionizada.

A solução de alginato de sódio foi distribuída em frascos (5,5 de diâmetro por 8,5 altura), sendo um total de 12 frascos contendo 5 mL cada, autoclavados a 121°C (1 kgf.cm^{-2}) por 15 minutos para posterior utilização.

Em câmara de fluxo laminar foram adicionadas as soluções de alginato de cálcio o homogenato de *B.rhodina*, testando-se três diferentes concentrações do homogenato: 5 mL

(A), 7,5 mL (B) ou 10 mL (C). A solução de alginato com o homogenato foi agitada até a total homogeneização, pipetada no cloreto de cálcio, possibilitando assim a formação de pérolas. Durante a produção das pérolas se procurou manter uma distância de 10 cm da ponta da pipeta para o líquido durante o gotejamento. Foi contado o número de pérolas formadas em cada concentração de homogenato.

Os frascos com as pérolas foram colocados sob refrigeração por 17 horas. Após este período, as pérolas foram lavadas duas vezes em água deionizada, esterelizada e posteriormente inoculadas em 50 mL de meio Br1. Os frascos foram vedados e colocados em câmara de crescimento a 30°C no escuro, sendo 2 amostras de cada concentração mantidas sob agitação e 2 em condições estáticas por um período de 12 dias. Neste experimento foram avaliadas as variáveis: número de pérolas formadas, crescimento do fungo em condições estáticas e agitadas, e a produção de ácido jasmônico e metil jasmonato.

Devido à dificuldade na imobilização do fungo em pérolas de alginato, novo experimento foi realizado. Desta vez, cada pérola formada com o fungo, após o refrigeração, foi passada novamente pelo alginato de sódio e pelo cloreto de cálcio, formando assim uma segunda camada sobre o micélio do fungo, seguindo a mesma metodologia anterior.

Como forma de oferecer um suporte para o fungo, foram utilizados então pedaços de bucha vegetal, com aproximadamente 3,5 cm de altura e 4 cm de diâmetro, acondicionados no fundo de frasco (5,5 de diâmetro por 8,5 altura), e autoclavados. A cada frasco foi adicionado 50 mL de meio Br1 e 5,0 mL de homogenato, mantidos em câmara de crescimento a 30 °C no escuro por um período de seis dias sob condições estáticas. O experimento foi realizado em triplicata.

Após o período descrito, o meio de cultura foi retirado e analisado, e um novo meio de cultura (Br1) adicionado para que o fungo pudesse produzir jasmonatos novamente. Nessa troca foram utilizados apenas 20 mL de meio Br1 uma vez que a esponja já se encontrava encharcada pelo meio utilizado inicialmente. Após seis dias (14 da primeira inoculação), o meio de cultura foi coletado para verificação da presença de jasmonatos.

Com o objetivo de controlar o crescimento do fungo e favorecer a produção de AJ, novo experimento, utilizando bucha vegetal como suporte, foi realizado, entretanto no experimento foi alterada a concentração de KNO_3 no meio de cultura, mantendo a bucha vegetal como suporte. Neste experimento variou-se o teor de Nitrogênio do meio, reduzindo-se para metade a concentração de KNO_3 do meio de cultura ($3,75\text{g.L}^{-1}$). Como controle utilizou-se o meio Br1 contendo $7,5\text{ g.L}^{-1}$ de KNO_3 . O experimento foi realizado em triplicata.

Visando a padronização do suporte, bem como garantir que não houvesse interação entre este e o microrganismo, optou-se por substituir a bucha vegetal por bucha sintética (poliuretano). O experimento foi realizado de forma semelhante ao com a bucha vegetal, entretanto, neste caso, foram utilizados pedaços de bucha sintética com medidas de 8x8 cm de largura e 3 cm de altura, acondicionadas em frascos de vidro (5,5 de diâmetro por 8,5 altura) contendo 50 mL de meio Br1, autoclavados por 15 minutos a 121 °C (1 Kfg.cm⁻²).

Em câmara de fluxo laminar, 5,0 mL de inóculo foram adicionados aos frascos com a bucha sintética e o Meio Br1. Os frascos foram colocados em câmara de crescimento à temperatura de 30 °C, no escuro durante seis dias. Após este período, o meio de cultura foi extraído e submetido a análise para detecção e quantificação de jasmonatos.

4.5.7. Avaliação do efeito da Sacarose e do Fósforo (KH₂PO₄) sobre a produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* em fermentação em meio Br1 e meio Mv sob condições estáticas e agitadas.

A fermentação do fungo em sistema agitado tem resultado na produção de compostos (exopolissacarídeos) que tornam o meio extremamente viscoso. Esses compostos têm utilização e aplicação em diversas áreas, entretanto quando o objetivo é o cultivo do fungo para a produção de outros metabólitos, como é o caso dos jasmonatos, a produção desses torna-se um problema, pois dificulta a aeração e a disponibilidade dos nutrientes e a extração dos compostos de interesse.

Objetivando ampliar a produção de AJ e reduzir a viscosidade quando em sistema agitado, utilizou-se do meio Mv – Br1 modificado (com sacarose 50 e 75 g.L⁻¹ e fósforo 0,5 g.L⁻¹) - comparado ao meio Br1 normalmente utilizado. O processo foi conduzido em sistema agitado (75 rpm) e estático.

4.6. EXTRAÇÃO DO ÁCIDO JASMÔNICO (AJ)

Todos os experimentos tiveram seu material submetido à filtração a vácuo em funil de Büchner. Os filtrados tiveram o pH ajustado para 3,0 com ácido clorídrico 4 M. Dos filtrados resultante foram coletados 10 mL e submetidos à extração. Para a extração do AJ presente em

cada amostra, foi utilizado o método de partição líquido-líquido em uma relação de 1:1 (v:v) com acetato de etila. A partição foi repetida três vezes para cada amostra com as fases orgânicas reunidas e submetidas à dessecação com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). Após a evaporação do solvente, as amostras foram submetidas a análises cromatográficas qualitativas e quantitativas.

4.7. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS PARA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE AJ.

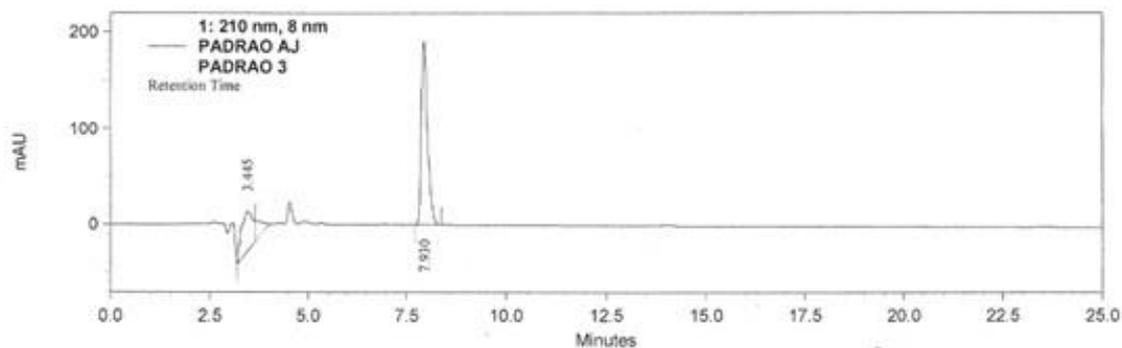
A detecção da presença de AJ e MJ nos fermentados foi feita através de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), utilizando-se cromatoplasmas de sílica gel (F254) e fase móvel composta de clorofórmio: acetato de etila: acetona: ácido acético (40:10:5:1). Após a eluição, para a visualização de jasmonatos, as placas foram borrifadas com solução de vanilina sulfúrica 2% e em seguida aquecidas à temperatura de 100°C. Amostras padrões de AJ e MJ foram utilizadas como referência.

A quantificação de AJ nos extratos foi realizada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizando-se um cromatógrafo acoplado a um detector de arranjo de diodo. Foi utilizado uma coluna C_{18} , eluição isocrática, com metanol:ácido acético 0,1% na proporção de 60:40. O fluxo foi de 0,85 mL/min sendo injetados 20 μL de amostra e a análise monitorada em comprimento de onda de 210 nm. Para a quantificação utilizou-se o método do padrão externo através do traçado de uma curva de calibração, utilizando-se soluções de padrão autêntico de AJ e MJ em concentrações variando entre 0,1 – 1,0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Para o cálculo das áreas referentes à produção de AJ presentes nas amostras utilizou-se a fórmula: $Y = A + B \cdot X$. Onde Y é a área resultante das análises cromatográficas de cada amostra (concentração de AJ) e A e B são dados pela curva de calibração obtidas da análise do padrão de AJ.

Os resultados dos cromatogramas das amostras foram comparados a cromatograma de padrões (Figura 5) para a identificação do tempo de retenção. A partir do valor identificado nas áreas dos cromatogramas, foi realizada a quantificação do jasmonatos presente nas amostras.

Figura 5 - Cromatograma de padrão de ácido jasmônico.



4.8. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Inicialmente foram utilizados planejamentos fatoriais para a identificação de um ponto principal dos experimentos seguintes. Neste caso, foi realizada a observação de médias dos fatores em estudo com valores diferenciados em dois níveis, sendo um valor maior (+) e um valor menor (-). Os resultados das médias observadas em cada fator em estudo e da interação dos mesmos foram analisados por matriz de coeficiente de contraste e analisados por teste t em que se determinou o efeito (positivo ou negativo) dos fatores em estudo e da interação dos mesmos sobre as variáveis respostas. Para a execução do planejamento fatorial utilizou-se planilha eletrônica para cálculos de planejamentos experimentais da UNICAMP. Após o direcionamento dos trabalhos, os experimentos realizados foram analisados por análise de variância (ANOVA), regressão linear, teste de Tukey e Scott Knott de acordo com cada especificidade (MONTGOMER; PECK; VINING, 2006). Para tais análises foi utilizado o software livre R³ e o pacote proc glm no software SAS.

³ Software mantido pela Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Disponível em: www.estadisticador.xpg.com.br. Acesso em: 13/08/2013.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Posch, Herwig e Spadiut (2013), a formação dos compostos secundários em fungos filamentosos é desencadeada pela atividade de genes que recebem estímulos de determinados fatores. Entretanto, a plasticidade dos fungos filamentosos permite muitas vezes uma adaptação ao ambiente sem a ativação destes genes. As células de um organismo podem se adaptar ao meio em que foram submetidas sendo, muitas vezes, necessária a intervenção e/ou modificações do meio de cultura para que as células ativem os genes responsáveis pela produção de compostos secundários.

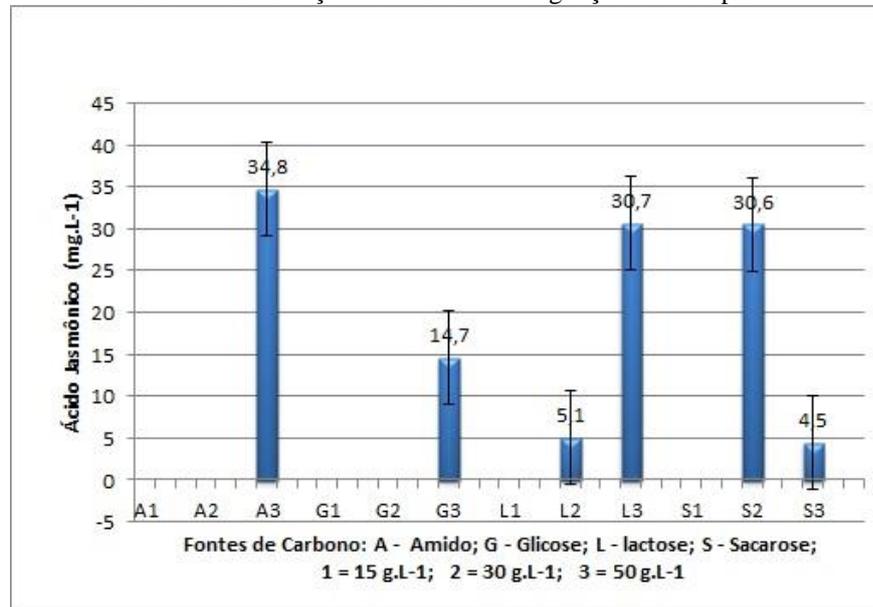
Uma adaptação observada em fungos filamentosos é, quando em cultivo sob agitação, a produção de substâncias que tornam o meio viscoso. Isto dificulta a difusão dos nutrientes e a posterior retirada dos compostos de interesse do meio de cultura. A busca por mecanismos, tanto químicos como físicos, que possam reduzir essa viscosidade torna-se também um fator importante no bioprocessamento de fungos filamentosos. As alterações no ambiente de crescimento do fungo podem tanto favorecer o mecanismo de produção de compostos secundários, quanto reduzir a viscosidade.

Dentre os nutrientes utilizados pelos microrganismos alguns são fundamentais a todos, como as fontes de carbono, nitrogênio e fósforo (SHULER; KARGI, 2012).

5.1. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO (LACTOSE, SACAROSE, GLICOSE E AMIDO SOLÚVEL) SOBRE A PRODUÇÃO DE AJ PELO FUNGO *B. rhodina* EM FERMENTAÇÃO AGITADA.

A figura 6 apresenta os dados de produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* quando fermentado sob agitação e na presença de diferentes fontes/concentrações de carboidratos. Considerando as concentrações dos carboidratos foi possível verificar que nos meios com 15 g.L⁻¹, independente do tipo de açúcar, o fungo não foi capaz de produzir AJ. Quando foram utilizadas 30 g.L⁻¹ de carboidrato, somente nos meios contendo lactose ou sacarose houve produção de AJ, entretanto nos meios onde a presença de carboidrato foi de 50 g.L⁻¹ o fungo foi capaz de produzir AJ independente do tipo de açúcar testado, porém com diferentes concentrações do composto. Desta forma o uso de amido ou lactose a 50 g.L⁻¹ apresentaram produções de AJ semelhantes à que foram utilizadas de sacarose a 30 g.L⁻¹, com produções médias na ordem de 30 mg.L⁻¹.

Figura 6 – Produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* fermentado em meio de cultura suplementado com diferentes fontes/concentrações de carbono sob agitação de 150 rpm.



Nos meios com diferentes fontes de carbono, o crescimento do fungo sob agitação resultou na produção de compostos, possivelmente polissacarídeo, que propiciaram um meio de cultura extremamente viscoso (Figura 7).

Figura 7 – Fermentado de *B. rhodina* em meio de cultura suplementado com 50 g.L⁻¹ de lactose sob agitação de 150 rpm.



(A seta indica o exopolissacarídeo formado na fermentação)

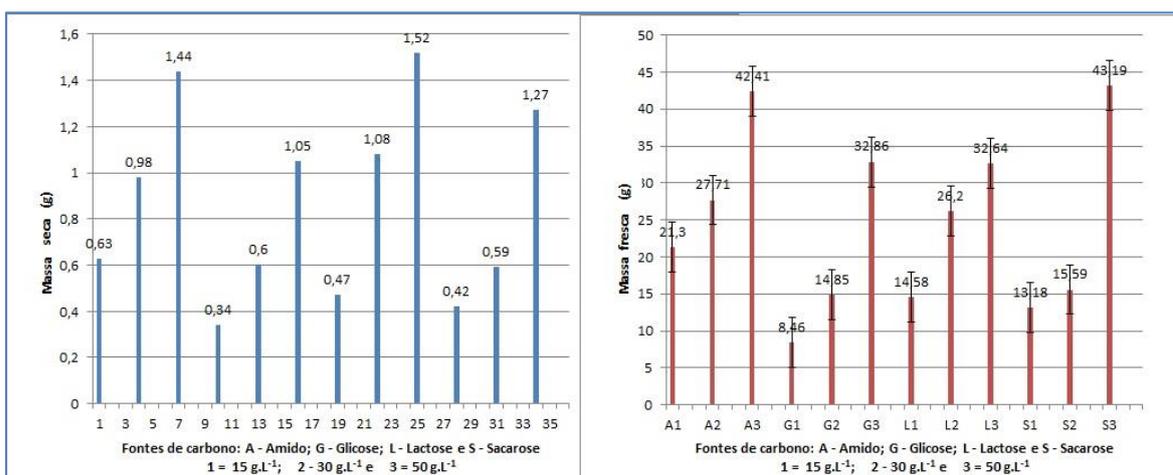
A viscosidade do meio pode estar relacionada ainda com o crescimento celular e com a morfologia do fungo, uma vez que a plasticidade genética permite que os mesmos possam ativar determinados genes de acordo com a situação ou ambiente em que estão se desenvolvendo (KANAGAWA; NEVES, 2011).

Em todas as fontes de carbono analisadas, a viscosidade foi proporcional à concentração do carboidrato; a utilização de 15 g.L⁻¹ promoveu fermentados com menor produção do exopolissacarídeo. Já a utilização do amido, com 50 g.L⁻¹, foi o que

proporcionou fermentados mais viscoso, enquanto que a utilização da lactose proporcionou fermentados com menor produção de compostos que tornam o meio viscoso. Entretanto, ter meios de cultura menos viscosos sem a produção de jasmonatos não é interessante, assim, para fermentações agitadas, a utilização da sacarose em 30 g.L^{-1} , nas condições analisadas apresentou-se a mais indicada, uma vez que conciliou produção de jasmonatos e com uma viscosidade menor.

Além da produção de jasmonatos, a biomassa fresca e seca também foi avaliada. Na medida das biomassas fresca e seca dos micélios foi possível observar uma relação direta com a concentração do carboidrato: quanto maior a concentração do carboidrato, maior a biomassa seca e fresca produzida (Figura 8), sendo que a utilização do amido e da sacarose na concentração de 50 g.L^{-1} foram as que proporcionaram maior biomassa final.

Figura 8 – Biomassa seca e fresca (g) produzida por *B. rhodina* cultivado em meios suplementados com diferentes fontes de carbono em agitação de 150 rpm.



A fonte de carbono, assim como sua concentração, tem efeito direto sobre o metabolismo primário e secundário dos organismos. Para Smiderle et al. (2012), determinadas fontes de carbono adicionadas ao meio de cultivo promovem menor crescimento de biomassa micelial. Além da fonte de carbono, a concentração também é fator determinante no crescimento micelial e da produção ou não de compostos de interesse.

Penariol et al. (2008), avaliaram a influência da fonte de carbono (glicose, amido, sacarose, lactose e maltose) e do nitrogênio (fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio bibásico, fosfato de cálcio, fosfato de sódio, ácido fosfórico, fosfato de amônio), juntamente com a suplementação do cultivo com fontes orgânicas de macro e micronutrientes sobre o crescimento e esporulação de fungos da espécie *Bipolaris euphorbiae*, demonstrando

que o desempenho do fungo é incrementado pela suplementação do meio de cultivo com peptona e extrato de levedura, e que a adição de vitaminas favorece a produção de conídios desta espécie de fungo.

Para a fermentação do fungo *B. rhodina*, dentro dos intervalos e das fontes de carbono analisadas, a concentração da fonte de carbono no meio de cultura influenciou diretamente a produção de AJ, massa seca e fresca.

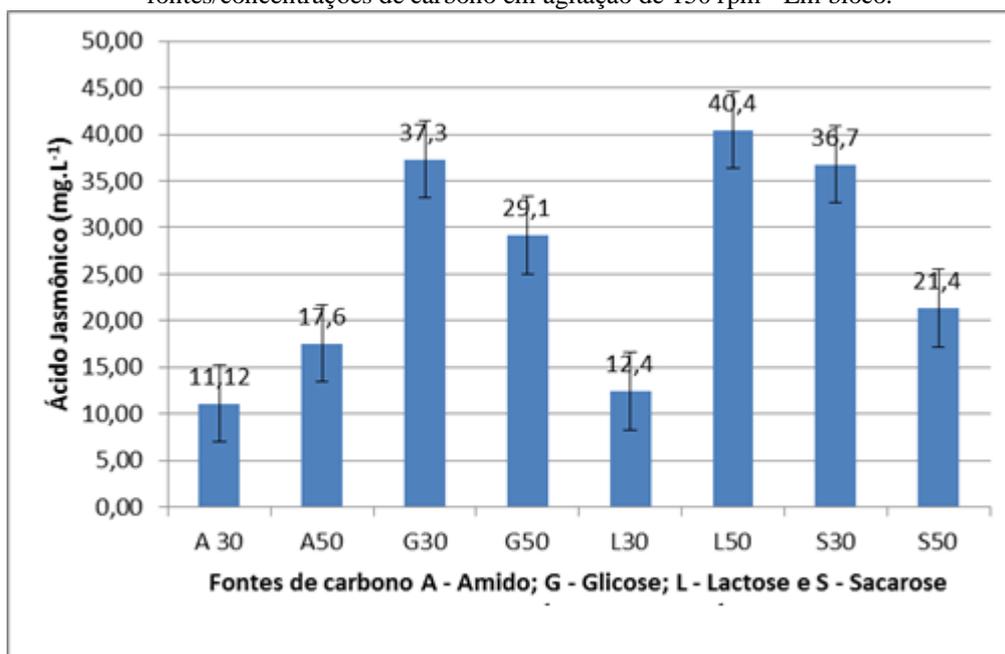
No processo de secagem do material resultante da filtragem, para análise da massa seca, foi observado que no micélio do fungo crescido no meio contendo sacarose como fonte de carbono, formou-se uma película transparente (Figura 9), solúvel em água, possivelmente um polímero biodegradável.

Figura 9 - Material resultante da secagem do micélio de fungo *B. rhodina* cultivado em meio Br1 (as setas indicam a película formada)



No desenvolvimento do fatorial para a identificação da melhor fonte de carbono ocorreram variações significativas na produção do AJ entre as replicatas. Um novo fatorial foi estruturado, desta vez em bloco, utilizando-se apenas os resultados mais favoráveis do fatorial inicial (30 e 50 g.L⁻¹ do carboidrato). Neste experimento ocorreu a produção de AJ nas concentrações entre 30 e 50 mg.L⁻¹ em todas as fontes de carbono utilizadas (figura 10).

Figura 10 - Produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* fermentado em meio de cultura suplementado com diferentes fontes/concentrações de carbono em agitação de 150 rpm - Em bloco.



O resumo da análise de variância para cada variável resposta, do estudo das fontes de carbono (fatorial em bloco), está representado na Tabela 8. Para a produção de AJ foram significativas a fonte, a concentração de carbono e a interação entre fonte e concentração; para o filtrado resultante apenas a concentração de carbono foi significativa; já para a massa fresca foram significativas a concentração e a interação com a fonte. Para a massa seca não foi encontrada diferença estatística significativa dentro das fontes e das concentrações analisadas.

Tabela 8 - Análise de variância – ANOVA- da produção de AJ, filtrado resultante, massa fresca e seca de fermentados de *B. rhodina* cultivados em meio Br1 suplementado com diferentes fontes de carbono (lactose, amido, glicose e sacarose).

Fonte de variação	GL	AJ	Filtrado resultante	Massa fresca	Massa seca
Fonte de Carbono	3	SG	-	-	-
Concentração de carbono	1	SG	SG	SG	-
Fonte * concentração	3	SG	-	SG	-

SG - significativo

Quando analisada a fonte de carbono, o teste Scott-knott (1974) demonstra que dentre as fontes analisadas, a sacarose é a fonte em que ocorreu maior produção de AJ, seguida de glicose e do amido (sem diferença estatística entre elas). Com a utilização da lactose como fonte de carbono, não ocorreu a produção de AJ (Tabela 9).

Tabela 9 - Teste Scott-knott – Produção de AJ do fungo *B.rhodina* cultivado em meio Br1 suplementado com diferentes fontes e concentração de carbono (em relação à fonte de carbono) .

Fonte carbono	Médias AJ mg.L ⁻¹	L	0.00 a
A	7.49 b	G	12.71 b
	S	28.53 c	

Erro padrão: 2.58 $\alpha \leq 0,05$ L – Lactose A – Amido G – Glicose S – Sacarose
Médias seguidas de mesma letra não apresentaram significância estatística ao nível de 5%.

Quando analisada a concentração de carbono, verificou-se que a produção de AJ foi superior quando a concentração da fonte de carbono foi maior (Tabela 10), que demonstra que a utilização de 50 g.L⁻¹ das fontes de carbono tiveram um rendimento superior ao das fermentações com o uso de 30 g.L⁻¹. Dentro das concentrações analisadas, maior concentração da fonte de carbono resultou em maior produção de AJ.

Tabela 10 - Teste Scott-knott - Produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* cultivado em meios Br1 suplementado com diferentes concentrações das fontes de carbono.

Concentrações	Médias AJ mg.L ⁻¹
30 g.L ⁻¹	6.71a
50 g.L ⁻¹	17.65b

Erro padrão: 1.82 $\alpha \leq 0,05$ L – Lactose A – Amido G – Glicose S – Sacarose
Médias seguidas de mesma letra não apresentaram significância estatística ao nível de 5%.

No desdobramento da produção de AJ, quando combinado fonte e concentração de carboidrato, novamente apresentou significância estatística nos diferentes níveis. Pela análise com o teste de Scott-knott, quando utilizado a concentração de 30 g.L⁻¹ de sacarose como fonte de carbono, a produção de AJ foi superior em relação às demais fontes de carbono (Tabela 11).

Tabela 11 - Teste Scott-knott – Produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* em meio suplementado com diferentes concentrações de fonte de carbono - considerando 30 g.L⁻¹ das fontes de carbono

Fonte carbono 30 g.L ⁻¹	Médias AJ mg.L ⁻¹
L	0.00a
G	4.42a
A	4.64 a
S	17.78b

Erro padrão: 3,65 $\alpha \leq 0,05$ L – Lactose A – Amido G – Glicose S – Sacarose
Médias seguidas de mesma letra não apresentaram significância estatística ao nível de 5%.

Quando utilizado a concentração de 50 g.L⁻¹ das fontes de carbono, a sacarose novamente resultou em produção de AJ superior as demais fontes de carbono, entretanto, neste nível, a produção de AJ com o uso da glicose superou a de amido (Tabela 12). Em relação a concentração da fonte de carbono, o uso de 50 g.L⁻¹ de sacarose superou a produção

de AJ quando comparada ao uso de 30 g.L⁻¹ da mesma fonte de carbono.

Tabela 12 - Teste Scott-knott – Produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* em meio suplementado com diferentes concentrações de fonte de carbono - considerando 50 g.L⁻¹ das fontes de carbono

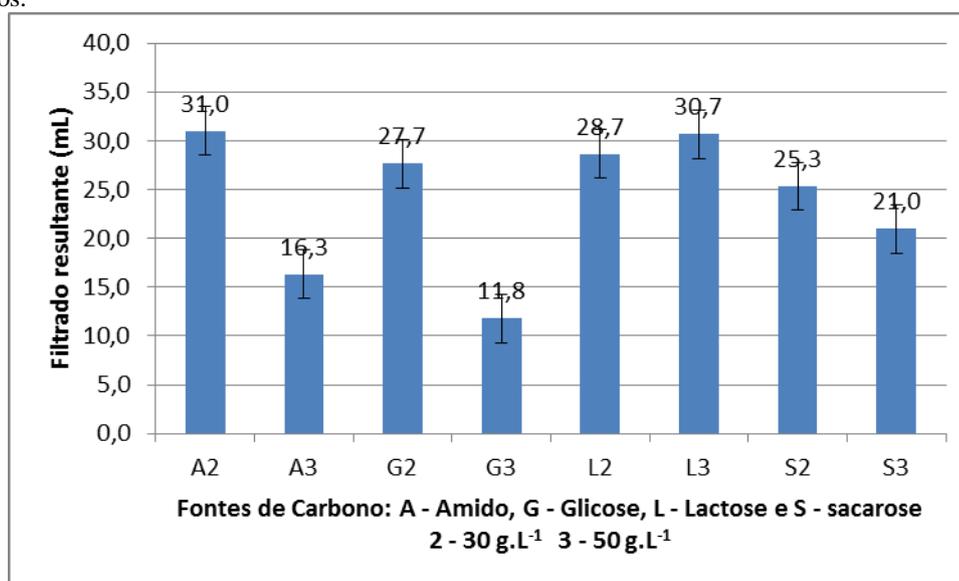
Fonte carbono 50 g.L ⁻¹	Médias AJ mg.L ⁻¹
L	0.00a
A	10.33 a
G	21.00b
S	39.28c

Erro padrão: 3,65 $\alpha \leq 0,05$ L – Lactose A – Amido G – Glicose S – Sacarose
Médias seguidas de mesma letra não apresentaram significância estatística ao nível de 5%.

O tipo da fonte de carbono exerceu efeito somente para a produção de AJ, entretanto, a concentração das fontes de carbono influenciaram significativamente a produção de AJ, a massa fresca e o filtrado resultante. Quando analisadas a interação fonte de carbono e concentração, verificou-se significância estatística para a produção de AJ e para a produção de biomassa fresca.

O volume de filtrado resultante está relacionado à concentração da fonte de carbono presente no meio de cultura, sendo que concentrações de carbono maior proporcionaram menor volume de filtrado resultante (Figura 11). Apenas com a utilização da lactose esta proporção não ocorreu. Nesse caso maior concentração da fonte de carbono promoveu meio de cultura menos viscoso.

Figura 11 - Filtrado resultante dos fermentados (mL) do fungo *B. rhodina* cultivados em meio de cultura suplementado com diferentes fontes/concentrações de carbono sob agitação de 150 rpm, realizado em blocos casualizados.



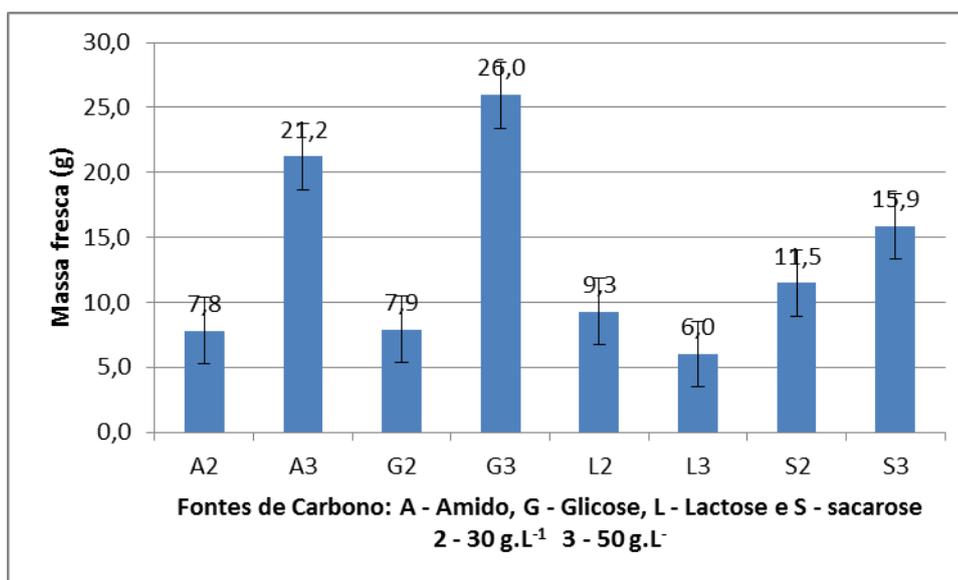
A análise estatística do filtrado resultante foi realizada por meio do teste de Tukey, demonstrando que a utilização de 30 g.L⁻¹ de carbono (Tabela 13), resultou em volume de filtrado superior quando comparado ao uso de 50 g.L⁻¹, independente da fonte de carbono utilizada. Neste caso, o meio de cultura é menos viscoso, o que favorece o uso em larga escala, pois quanto menor a viscosidade, mais fácil a difusão dos nutrientes no meio de cultura.

Tabela 13 - Teste Tukey – Volume de filtrado resultante (mL) dos meios de cultura considerando a concentração de carbono.

Concentração carbono	Médias
50 g.L ⁻¹	19.95a
30 g.L ⁻¹	28.16b

Outro fator importante é a análise da massa fresca, obtida após a filtragem do material fermentado, que também pode estar relacionada à viscosidade produzida pelo fungo, pois quanto mais viscoso o meio, mais difícil a filtragem e, conseqüentemente, maior massa fresca. A massa fresca apresentou uma proporção inversa à do filtrado resultante (Figura 12), em todas as fontes de carbono exceto na lactose.

Figura 12 - Massa fresca (g) resultante da fermentação do fungo *B. rhodina* cultivado em meio de cultura suplementado com diferentes fontes/concentrações de carbono sob agitação de 150 rpm realizado emblocos casualizados.



Na análise da variância (Tabela 14), verificou-se que na interação fonte/concentração de carbono houve significância estatística para o amido ($p \leq 0.0144$) e para a glicose ($p \leq 0.0021$), enquanto que para a lactose e para a sacarose não houve significância. Portanto, procedeu-se o desdobramento da concentração de carbono dentro de cada fonte de carbono.

Tabela 14 – Análise de variância - ANOVA - Concentração de carbono dentro de cada fonte para a produção de massa fresca.

Fonte de variação	Fonte de carbono	GL	p	
Concentração de carbono	Amido	1	0.0144	SG
Concentração de carbono	Glicose	1	0.0021	SG
Concentração de carbono	Lactose	1	0.4258	-
Concentração de carbono	Sacarose	1	0.3759	-

SG - significante

O teste de média permite observar que quando utilizado as fontes de carbono, amido ou glicose na concentração de 50 g.L⁻¹ se obteve uma produção de massa fresca superior à produzida com 30 g.L⁻¹; já com a lactose e sacarose como fonte de carbono não há diferença estatística com a utilização de 30 ou 50 g.L⁻¹ da fonte de carbono (Tabela 15). Tanto a produção de biomassa como a de AJ, teve influencia positiva da concentração da fonte de carbono, ou seja, maior concentração de carbono produziu tanto maior biomassa quanto AJ.

Tabela 15 – Efeito da concentração e da fonte de carbono na produção de massa fresca (g) de *B. rhodina*.

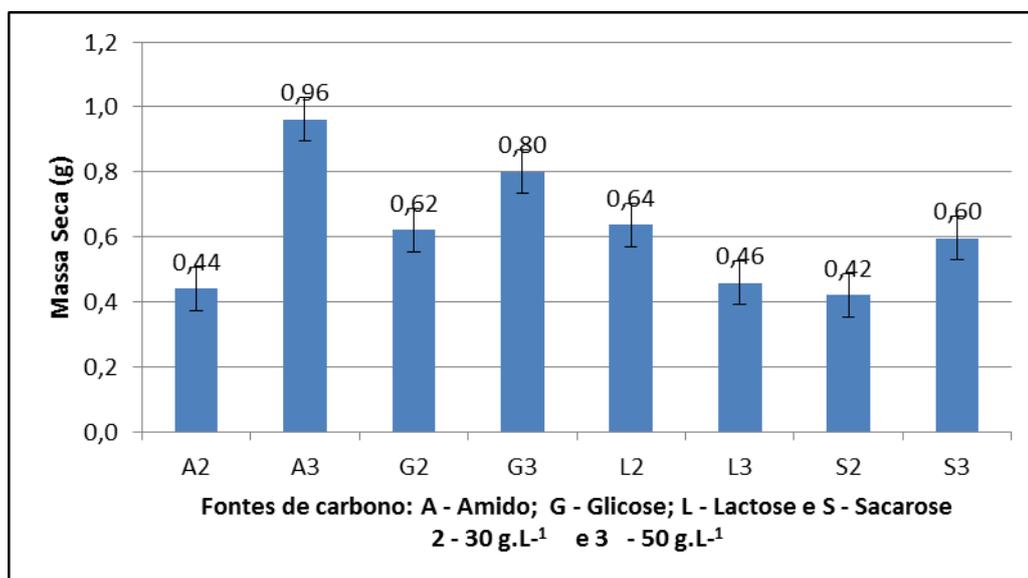
	Amido	Glicose	Lactose	Sacarose
30 g.L ⁻¹	7.82 a1	7.90 a1	9.97 a1	11.48 a1
50 g.L ⁻¹	21.22 a2	25.96 a2	6.03 a1	15.86 a1

Médias seguidas de mesma letra na linha e mesmo número na coluna não apresentam significância estatística ao nível de 5%.

A relação entre fonte de carbono e a densidade do meio de cultura foi estudada por Fonseca et al. (2011), que investigaram as propriedades físicas das botryosferanas (exopolissacarídeos) produzidos pelo fungo *B.rhodina* MAMB-05 quando cultivado em glicose, sacarose e frutose, identificando a produção de compostos que tornavam o meio de cultura denso, com a utilização de glicose e sacarose.

A massa fresca é um fator de relevância para a identificação da viscosidade do meio de cultura, entretanto não é possível saber com exatidão o crescimento micelial do fungo, já que dependendo dos compostos produzidos, ou seja, se o fungo produz exopolissacarídeo o micélio pode reter água durante a filtração por interferência do polímero. Desse modo, a análise da massa seca é importante para a confirmação do crescimento micelial do fungo. Para a massa seca, as proporções encontradas se mantiveram (Figura 13), ou seja, maior concentração da fonte de carbono resultou em maior biomassa; novamente a lactose foi excessão, neste caso, maior concentração da fonte de carbono atuou inibindo o crescimento do fungo.

Figura 13 - Massa seca (g) resultante da fermentação do fungo *B. rhodina* cultivado em meio de cultura suplementado com diferentes fontes/concentrações de carbono sob agitação de 150 rpm - Em bloco.



Na análise de variância para a produção de massa seca (Tabela 16), nenhum dos fatores em estudo foi relevante. Mesmo sendo importante para a identificação do crescimento micelial, no estudo não houve significância nem da fonte de carbono, nem da concentração de carbono.

Tabela 16 – Efeito da concentração da fonte de carbono na produção de Massa seca (g) de *B. rhodina* em meio com diferentes concentrações e fontes de carbono.

	Amido	Glicose	Lactose	Sacarose
30 g.L ⁻¹	0.44 a	0.61 a	0.45 a	0.41 a
50 g.L ⁻¹	0.96 a	0.79 a	0.63 a	0.59 a

Valores seguidos de mesma letra nas colunas não apresentam significância estatística ao nível de 5%.

Ao compararmos a produção de biomassa fresca com a produção de ácido jasmônico, observa-se que com a utilização de 50 g.L⁻¹ o fungo produz tanto mais biomassa quanto mais ácido jasmônico nas fontes de carbono amido, glicose e sacarose, já a biomassa seca, é superior em todas as fontes de carbono com a utilização de 50 g.L⁻¹ quando comparada a 30 g.L⁻¹. Sendo assim é possível inferir que nas condições ensaiadas a produção de AJ está relacionada com a produção de biomassa para os carboidratos amido, glicose, sacarose e lactose.

Quando se tem o objetivo de produzir compostos de interesse, o crescimento exagerado do fungo pode estar desviando energia que é necessária para os processos de produção (POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013). Li et al. (2012), buscando otimizar a

produção de acarbose a partir do *Actinoplanes sp*, observaram que maiores concentrações de fonte de carbono podem inibir a produção de metabólitos secundários.

Na análise final, conclui-se que, para a produção de ácido jasmônico, a melhor fonte de carbono, dentre as analisadas, é a sacarose na concentração de 50 g.L⁻¹, seguida da glicose e do amido também na concentração de 50 g.L⁻¹. Entretanto, a análise da formação de compostos que tornam o meio denso, representada pela massa fresca e pelo filtrado resultante, os melhores resultados foram com a utilização de 30 g.L⁻¹, enquanto que para a massa fresca os melhores resultados foram obtidos com a utilização do amido e da glicose com 30 g.L⁻¹.

Como o objetivo é o cultivo do fungo em larga escala, é preferível a utilização da sacarose na concentração de 30 g.L⁻¹, apesar de produzir menos ácido jasmônico, pois produz um volume de filtrado maior e massa fresca menor, o que caracteriza um meio de cultura menos viscoso.

Vale ressaltar que nesse experimento a concentração de AJ foi inferior às obtidas em experimentos anteriores, devido ao fato do mesmo ter sido realizado sob agitação. Embora seja de conhecimento que a melhor condição de produção de AJ em erlemeyers de 250 mL, seja sob condições estáticas, é sabido também que quanto a escala de produção é elevada para volumes maiores, quer em erlenmeyers ou em biorreator, a produção de AJ pelo fungo sofre redução. Dessa forma, torna-se imprescindível o estudo sobre condições de agitação que possibilitem a produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* em concentrações superiores à atualmente obtida.

5.2. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO (N) FÓSFORO (P) E CARBONO (SACAROSE) SOBRE A PRODUÇÃO DE AJ EM FERMENTAÇÃO ESTÁTICA.

A interação da fonte de carbono (sacarose), fósforo (KH₂PO₄), nitrogênio (KNO₃) e o tempo de fermentação podem influenciar a produção de ácido jasmônico pelo fungo *B.rhodina*. Apesar de sabermos que a produção em larga escala ocorre sob agitação, inicialmente verificou-se esta influencia em sistema estático, para tanto foi realizado um fatorial combinando estes fatores. Para este fatorial foram utilizadas as concentrações: sacarose (20 ou 50 g.L⁻¹), KH₂PO₄ (0,5 ou 2,0 g.L⁻¹) e KNO₃ (2,0 ou 7,5 g.L⁻¹) no meio de cultura Br1 (controle tratamento 8).

Consideradas as concentrações das fontes de N, P e C nos meios de cultura sobre a produção de AJ, verificou-se que os meios de cultura em que a concentração de C foi menor, tratamentos 1 a 4, a produção de ácido jasmônico foi inferior aos meios de cultura com maior concentração do carboidrato, tratamentos 5 a 8. Quando consideradas as concentrações dos compostos (N, P e C) e o período de fermentação; os meios de cultura em que N e P estão em maior concentração, mas o carbono foi reduzido (tratamento 4), a produção foi inferior em todos os períodos de tempo analisados (Tabela 17).

Tabela 17 - Média da concentração de AJ (mg.L^{-1}) produzido por *B. rhodina* cultivado em meio Br1 suplementado com diferentes concentrações de (KNO_3), KH_2PO_4 e Sacarose em 6, 9 e 12 dias de fermentação

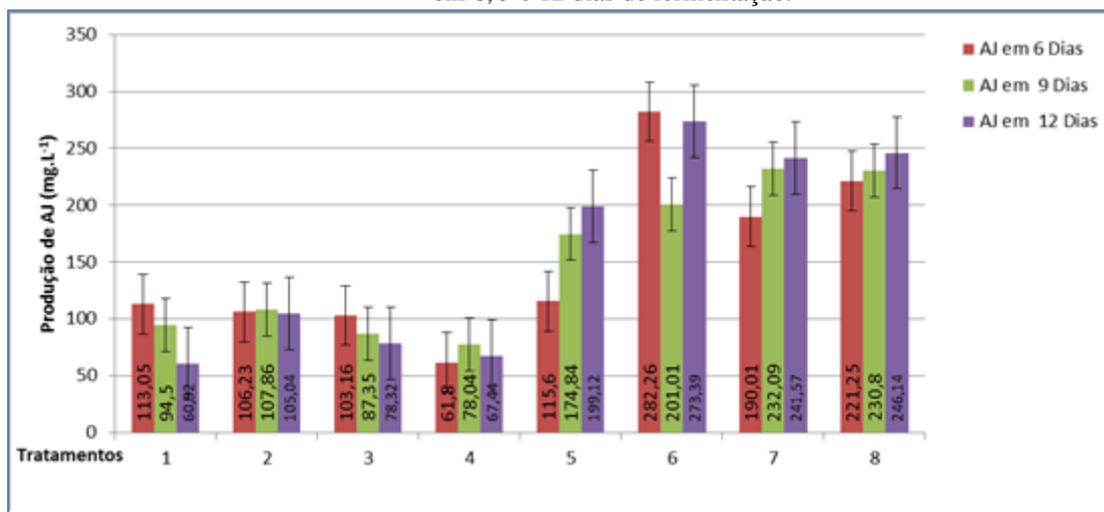
Tratamento	Concentração de KNO_3 (g.L^{-1})	Concentração de KH_2PO_4 (g.L^{-1})	Concentração de sacarose (g.L^{-1})	AJ em 6 Dias (mg.L^{-1})	AJ em 9 Dias (mg.L^{-1})	AJ em 12 Dias (mg.L^{-1})
1	2,0	0,5	20	113,05	94,50	60,92
2	7,5	0,5	20	106,23	107,86	105,04
3	2,0	2,0	20	103,16	87,35	78,32
4	7,5	2,0	20	61,80	78,04	67,44
5	2,0	0,5	50	115,60	174,84	199,12
6	7,5	0,5	50	282,26	201,01	273,39
7	2,0	2,0	50	190,01	232,09	241,57
8	7,5	2,0	50	221,25	230,80	246,14

Avaliando-se o efeito do N e do P em meio de cultura com a fonte de carbono (sacarose) reduzida, verifica-se que quando foi utilizada menor concentração de N a produção de ácido jasmônico diminuiu com o aumento do tempo (tratamentos 1 e 3), enquanto que, em menor concentração de P, a produção de ácido jasmônico foi constante (tratamento 2).

Quando se analisa a produção de ácido jasmônico nos meios com maior concentração de sacarose (tratamentos 5 a 8), nota-se uma maior produção nestas condições. Nestes meios verificou-se que, quando a fonte de N foi reduzida (tratamento 7), a produção de ácido jasmônico foi semelhante ao meio controle (tratamento 8); evidenciando que na presença de maior concentração de sacarose, mesmo em reduzida concentração de N a produção de ácido jasmônico pelo fungo não sofreu redução. Entretanto, quando a concentração de P foi menor que o controle (tratamento 6), o fungo foi capaz de aumentar a concentração de ácido jasmônico produzido em 6 e 12 dias, quando comparado a todos os demais tratamentos.

Considerando-se apenas o tempo de fermentação verificou-se que nos meios em que a concentração inicial de açúcar foi menor, (meios 1 a 4), o tempo influenciou negativamente na produção, enquanto que naqueles com maiores concentrações de açúcar, houve influência positiva (Figura 14).

Figura 14 - Produção de AJ (mg.L^{-1}) por *B. rhodina* cultivado em diferentes concentrações de N, P e Sacarose em 6, 9 e 12 dias de fermentação.



Na análise fatorial da influência das concentrações dos compostos N, P e C e da interação dos mesmos, houve influência positiva da fonte de carbono em todos os períodos analisados (3), ou seja, a concentração de 50 g.l^{-1} de sacarose produziu melhor efeito na produção de ácido jasmônico quando comparada à concentração de 20 g.L^{-1} , independente do tempo de fermentação (6, 9 ou doze dias). Quando utilizado maior concentração de nitrogênio (1) este exerceu influência positiva em seis dias de fermentação, deixando de exercer influência nos períodos de nove e doze dias. A interação entre as maiores concentrações de nitrogênio e fósforo combinada com a redução da sacarose (1x2) exerceu influência negativa em seis dias de fermentação, e assim como o nitrogênio deixou de influenciar a partir de nove dias de fermentação. Já a interação nitrogênio e sacarose em maiores concentrações com redução do fósforo (1x3) exerceu influência positiva em seis dias e também deixou de influenciar a partir do nono dia de fermentação (Tabela 18).

Tabela 18 - Influência da concentração de Nitrogênio (1), Fósforo (2) e Carbono (3), e suas interações, sobre a produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* em 6, 9 e 12 dias de fermentação.

Interação	Efeito em 6 dias	Efeito em 9 dias	Efeito em 12 dias
1	+ SG		
2			
3	+ SG	+ SG	+ SG
1x2	- SG		
1x3	+ SG		
2x3			
1x2x3			

1 – KNO_3 2 – KH_2PO_4 3 – Sacarose SG - Significativo (positivo +, negativo -)

A influência das fontes de nitrogênio na produção de metabólitos também foi investigada por Baumer (2009), que em trabalho com o fungo *P. sanguineusi* para a produção

de cinabarina (antibiótico) constatou que a adição de fontes de nitrogênio (peptona, extrato de levedura e uréia) pode reduzir a produção do metabólito. A otimização de processos fermentativos também foi comprovada por Ramos (2008), que trabalhando com fungo *Arhrinium state of apiospora montegneu Sacc.*, obteve melhora nas atividades biológicas (antibacteriana, antifúngica e antitumoral), promovida pelos extratos provenientes do fungo, quando o mesmo foi cultivado em meio de cultura suplementado com sacarose e nitrato de sódio.

Considerando-se apenas o tempo de fermentação, em seis dias todos os compostos exercem influência, entretanto em nove e doze dias, apenas a sacarose exerce efeito significativo, provavelmente pelo fato de o fungo já ter crescido suficientemente, reduzindo assim a utilização do nitrogênio e do fósforo, mas mantendo a necessidade da fonte de carbono para a produção dos compostos secundários.

Partindo dessas análises, verifica-se que, dentre os períodos analisados, seis dias de fermentação em meio com a redução do fósforo para $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ e a manutenção dos valores de nitrogênio e sacarose em maiores concentrações ($7,5$ e 50 g.L^{-1}), favorecem a produção de ácido jasmônico dentro das condições analisadas.

Outro fator importante a ser analisado na utilização de microrganismos para a produção em larga escala é a biomassa produzida no processo. A quantidade de biomassa fresca representa o material resultante do crescimento do fungo (micélio) acrescido da água que não foi extraída na filtração. Identificar os fatores que influenciam na sua produção pode favorecer tanto o controle do crescimento do fungo, quanto a produção de compostos que tornem o meio mais denso e que dificultam a dissolução dos compostos no meio de cultura, fator determinante nas fermentações em biorreatores.

A produção de massa fresca no processo de fermentação do fungo *B. rhodina* em meio suplementado com diferentes concentrações de nitrogênio, fósforo e sacarose, apresentou maiores valores em seis dias de fermentação. E semelhante à produção de AJ, a maior massa fresca foi produzida quando utilizado o tratamento seis (em que há redução do fósforo). Considerando-se os períodos de fermentação, ocorreu redução na biomassa com o aumento do tempo em todos os tratamentos, porque o fungo consome parte do material produzido nos primeiros dias de crescimento após a redução dos nutrientes do meio de cultura (Tabela 19).

Tabela 19 - Média da produção de massa fresca (g.L^{-1}) produzido por *B. rhodina* cultivado em meio Br1 suplementado com diferentes concentrações de N, P e Carbono em 6, 9 e 12 dias de fermentação.

Tratamento	Concentração de N (g.L^{-1})	Concentração de P (g.L^{-1})	Concentração de C (g.L^{-1})	Massa fresca em 6 Dias (g.L^{-1})	Massa fresca em 9 Dias (g.L^{-1})	Massa fresca em 12 Dias (g.L^{-1})
1	2,0	0,5	20	12,795	4,04	5,44
2	7,5	0,5	20	13,38	5,545	5,345
3	2,0	2,0	20	17,145	9,585	6,645
4	7,5	2,0	20	18,325	7,62	8,16
5	2,0	0,5	50	19,185	11,285	10,525
6	7,5	0,5	50	26,665	19,175	15,22
7	2,0	2,0	50	18,755	7,98	16,98
8	7,5	2,0	50	15,95	7,775	9,825

Na análise fatorial da influência do N, P e sacarose sobre a produção de massa fresca, observa-se que a utilização de concentrações maiores de sacarose influenciou positivamente a produção de massa fresca em todos os períodos de fermentação, semelhante à produção de AJ. Com a utilização somente do nitrogênio ou do fósforo em maiores concentrações houve influência positiva em nove dias de fermentação, entretanto quando combinado o fósforo em maior concentração ao nitrogênio ou à sacarose, também em maiores concentrações, o efeito foi negativo tanto em seis quanto em nove dias (Tabela 20).

Tabela 20 - Influência da concentração de Nitrogênio (1), Fósforo (2) e Carbono (3), e suas combinações, sobre a produção de massa fresca do fungo *B. rhodina* em 6 dias de fermentação.

Interação	Efeito em 6 dias	Efeito em 9 dias	Efeito em 12 dias
1		+ SG	
2		- SG	
3	+ SG	+ SG	+ SG
1x2	- SG	- SG	
1x3		+ SG	
2x3	- SG	- SG	
1x2x3	- SG		- SG
1 - KNO_3 ,	2- KH_2PO_4 e	3- Sacarose	SG - Significância (positivo +, negativo -)

O efeito da concentração da fonte de carbono (sacarose) sobre a produção de biomassa fresca apresentou resultados semelhantes ao obtido para a produção de AJ, nos tratamentos em que a concentração utilizada foi maior (50 g.L^{-1}), a biomassa também foi superior, independente do tempo de fermentação, quando se considerou apenas a influência do tempo: em seis dias a produção de biomassa fresca foi maior comparada a nove e doze dias em todos os tratamentos.

A biomassa produzida pelo fungo pode alterar a reologia do caldo do fermentado. Segundo Zinidarsic e Pavko (2001), essas alterações podem ocorrer como resultado do crescimento celular, da formação de sistemas de rede micelial ou ainda pela produção de substâncias como os polissacarídeos, que também afetam a viscosidade. Para Posch, Herwig e Spadiut (2013), a concentração de biomassa em fungos filamentosos é uma das variáveis capazes de afetar a viscosidade, sendo proporcional ao crescimento de biomassa.

A produção de biomassa fresca nem sempre é proporcional à biomassa seca, pois como a biomassa fresca representa o material micelial juntamente com a água retida durante o processo de filtração, pode estar relacionada aos compostos produzidos pelo fungo no processo de fermentação, ou ainda à forma como o material micelial cresceu (OLSVIK; KRISTIANSEN, 1994).

Para a produção de biomassa seca, a relação entre os tratamentos e os dias foi semelhante à massa fresca e à produção de AJ, ou seja, em seis dias a biomassa seca foi maior que em nove e doze dias, o fungo consumiu parte do material orgânico produzido, após a redução dos compostos no meio de cultura. O mesmo ocorreu em relação a concentração de nitrogênio, fósforo e carbono, nos meios em que a concentração foi maior (tratamentos 4 a 8), a biomassa seca também foi (Tabela 21).

Tabela 21 - Média da produção de massa seca (g.L^{-1}) produzido por *B. rhodina* cultivado em meio Br1 suplementado com diferentes concentrações de N, P e Carbono em 6, 9 e 12 dias de fermentação

Tratamento	Concentração de N (g.L^{-1})	Concentração de P (g.L^{-1})	Concentração de C (g.L^{-1})	Massa seca em 6 Dias (g.L^{-1})	Massa seca em 9 Dias (g.L^{-1})	Massa seca em 12 Dias (g.L^{-1})
1	2,0	0,5	20	0,345	0,24	0,23
2	7,5	0,5	20	0,38	0,265	0,245
3	2,0	2,0	20	0,42	0,31	0,265
4	7,5	2,0	20	0,49	0,335	0,345
5	2,0	0,5	50	0,595	0,705	0,675
6	7,5	0,5	50	0,93	0,9	0,7025
7	2,0	2,0	50	0,57	0,675	0,785
8	7,5	2,0	50	0,805	0,81	0,755

Na análise fatorial da produção da biomassa seca, novamente se observou a influência positiva da concentração de sacarose em todos os períodos de fermentação, com maior produção quando utilizado 50 g.L^{-1} . Já o nitrogênio exerceu influência positiva combinado à fonte de sacarose em maior concentração ou com a sacarose e o fósforo em menores concentrações. O fósforo exerceu influência negativa quando utilizado em maior concentração combinado à sacarose em maior concentração (Tabela 22).

Tabela 22 - Influência da concentração de Nitrogênio, Fósforo e Carbono (sacarose), e suas combinações, sobre a produção de massa seca por fungo *B. rhodina* em 6, 9 e 12 dias de fermentação.

Interação	Efeito em 6 dias	Efeito em 9 dias	Efeito em 12 dias
1	+ SG	+ SG	
2			+ SG
3	+ SG	+ SG	+ SG
1x2			
1x3	+ SG	+ SG	
2x3	- SG	- SG	
1x2x3			
1 - KNO ₃ ,	2- KH ₂ PO ₄ e	3- Sacarose	SG – significância (positivo +, negativo -)

As fontes de carbono, nitrogênio e fósforo podem atuar incrementando ou reduzindo o crescimento micelial. Tavares et al. (2012), relacionaram o nitrogênio e a fonte de carbono como efeito inibidor do crescimento de isolados de *Paecilomyces lilacinus*.

O efeito da suplementação da fonte de carbono sobre a produção de biomassa também foi estudada por Pretti (2009), que, no cultivo do fungo *Aspergillus nidulans*, observou que a produção de biomassa foi proporcional a suplementação da fonte de carbono por uma fonte de nitrogênio, entretanto sem acréscimo da produção de compostos de interesse.

A análise final do experimento permite concluir que dentro das concentrações analisadas, a sacarose em 50 g.L⁻¹ influenciou positivamente na produção de AJ, biomassa fresca e seca em todos os períodos de tempo analisados. Também que, das interações nitrogênio, fósforo e sacarose, o melhor efeito sobre a produção de ácido jasmônico foi obtido em seis dias, quando combinado a menor concentração de fósforo (0,5 g.L⁻¹), com a maior concentração de nitrogênio (7,5 g.L⁻¹) e sacarose (50 g.L⁻¹), e que a utilização de fósforo em 2,0 g.L⁻¹ tem efeito negativo na produção de biomassa fresca quando combinada com nitrogênio em 7,5 g.L⁻¹, e sacarose 50 g.L⁻¹, entretanto não interfere na produtividade de AJ.

5.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SACAROSE SOBRE A PRODUÇÃO DE AJ PELO FUNGO *B. rhodina* CULTIVADO EM MEIO Br1 EM FERMENTAÇÃO ESTÁTICA.

A análise estatística demonstra que a concentração da sacarose exerce influência significativa sobre a produção de AJ e sobre a produção de biomassa seca. Para a produção de AJ, o coeficiente de determinação do modelo estatístico foi de $R^2 = 0,7261$. Na análise de variância da produção de AJ foram encontradas diferenças estatísticas da influência das diferentes concentrações de sacarose sobre a produção de AJ (Tabela 23).

Tabela 23- Análise de variância - ANOVA – Produção de AJ (mg.L^{-1}) do *B. rhodina* em meio com diferentes concentrações de sacarose

Fonte de Variação	GL	p-valor
Concentração de Sacarose	16	5,2341E ⁻⁴⁸
Resíduo	51	
Total	67	

cv : 14,55

Para identificar estas diferenças foi realizado o teste de Tukey (Tabela 24). A análise demonstra que as concentrações de sacarose de 50, 75, 100 e 125 g.L^{-1} são diferentes entre si e de todas as outras concentrações.

A concentração de 150 g.L^{-1} só não se difere estatisticamente da concentração de 25 g.L^{-1} , e a concentração 0,0 g.L^{-1} é diferente das concentrações de 200, 175 e 25 g.L^{-1} .

Tabela 24 - Teste de Tukey da produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* cultivado em meio Br1 suplementado com diferentes concentrações de sacarose.

Concentração de Sacarose (g.L^{-1})	Média produção de AJ mg.L^{-1}
75	446,3575a
100	325,1325b
50	231,655c
125	183,3325d
150	85,24e
25	68,865ef
175	49,3425fg
200	36,0025fgh
225	24,66ghi
250	16,205ghi
275	11,285hi
325	8,725hi
300	8,1825hi
350	7,4425hi
375	6,5825hi
400	4,2925 hi
0	0,6075i

Médias seguidas de mesma letra não apresentaram significância estatística ao nível de 5%

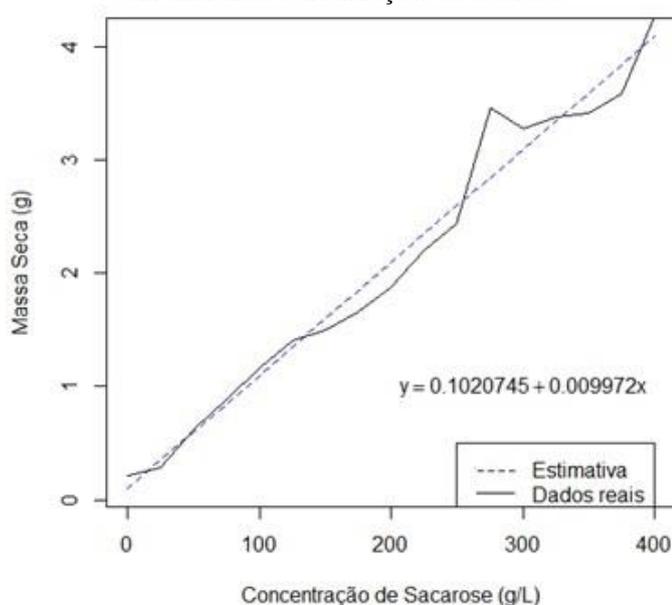
A análise dos dados demonstram que a utilização de 75 g.L^{-1} foi a mais favorável para a produção de AJ, com diferença estatística significativa em nível de 5%. Já a utilização de concentrações de sacarose superiores a 175 g.L^{-1} exerceram um efeito inibidor sobre a produção de AJ, com redução gradual entre eles.

Objetivando identificar a relação entre produção de AJ e biomassa seca do fungo, foram realizadas a análise da variância e o teste de Tukey da produção de biomassa seca. Para a produção de biomassa seca, o coeficiente de determinação do modelo foi de $R^2 = 0,9727$, que significa aproximadamente 97,27% da variabilidade dos dados é explicada pelo modelo abaixo.

$$\text{Massa Seca} = 0,1020745 + 0.0099720 * \text{Sacarose}$$

A análise do gráfico da produção de massa seca (Figura 15) permite concluir que caso não haja adição de sacarose, ou seja, a concentração de sacarose for igual a zero, a produção de massa fresca será de 0,10 g. Caso haja o aumento de 1 g/L na concentração de sacarose, haverá um aumento de 0,0099720 g na produção de massa fresca. O gráfico demonstra uma clara relação da biomassa seca com a concentração da fonte de carbono. Quanto maior a concentração da fonte de carbono, maior a biomassa seca produzida pelo fungo.

Figura 15 - Tendência da produção de AJ resultante do cultivo do fungo *B. rhodina* em meio Br1 suplementado com diferentes concentrações de sacarose.



Ao comparar a produção de biomassa com a produção de AJ, verifica-se que de $0,0 \text{ g.L}^{-1}$ à 75 g.L^{-1} existe relação entre crescimento de biomassa e a produção de AJ. A partir de 100 g.L^{-1} não há relação direta da produção de AJ com a produção de biomassa, a partir deste

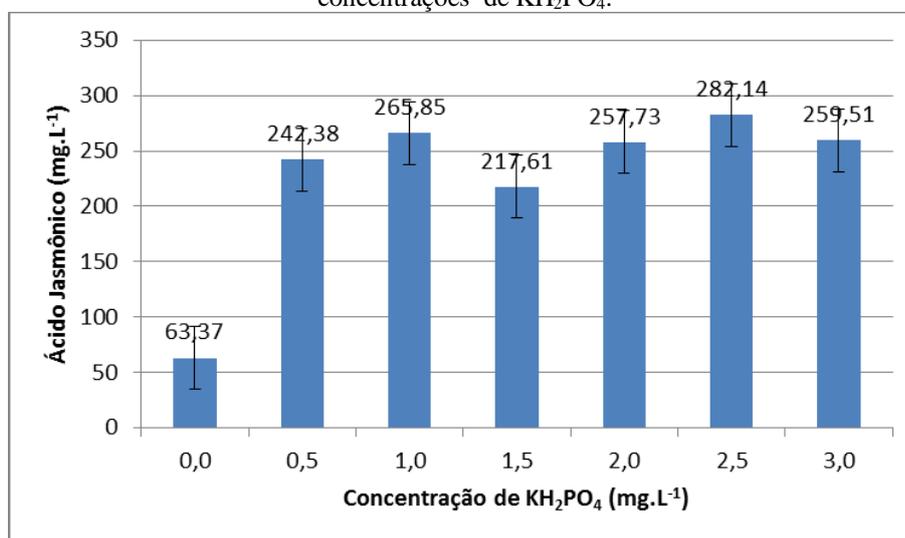
valor ocorre uma redução gradual da produção de AJ, enquanto que a produção de biomassa se mantém. Isto significa que concentrações de sacarose acima de 100 g.L^{-1} restringem a produção de AJ.

A análise final permite a conclusão que em sistema estático, utilizando a sacarose como fonte de carbono, a melhor produção de AJ ocorre quando utilizado de 75 g.L^{-1} .

5.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO (KH_2PO_4) SOBRE A PRODUÇÃO DE ÁCIDO JASMÔNICO.

A análise da média da produção de AJ pelo fungo *B. rhodina*, permite observar que, sem a adição de fósforo ao meio de cultura (tratamento 1), ocorreu uma redução de 77,53% na produção de ácido jasmônico (Figura 16) em comparação a maior produção. Já na presença deste sal a melhor produção de AJ ($282,14 \text{ mg.L}^{-1}$), ocorreu com a utilização de $2,5 \text{ g.L}^{-1}$ de KH_2PO_4 .

Figura 16 - Produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* fermentado em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de KH_2PO_4 .



Visando a identificação da influência na produção de AJ, pelo fungo *B. rhodina* em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de KH_2PO_4 , foi realizado a análise de variância (Tabela 25), apresentando diferenças estatísticas significativas.

Tabela 25 - Análise de variância - ANOVA - Produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* cultivado em meio Br1 suplementado com diferentes concentrações de KH_2PO_4 .

Fonte de Variação	GL	p
Concentração de Fósforo	6	1,186E ⁻⁰⁶
Resíduo	28	
Total	34	

Cv = 21,29

Para identificar entre quais concentrações ocorreram estas diferenças, foi realizado o teste de Tukey (Tabela 26). A análise do teste de Tukey, demonstra que a diferença estatística ocorre apenas entre o tratamento 1, em que não foi utilizado o sal e os demais tratamentos (tratamento 2 a 7), ou seja, dentro das concentrações de KH_2PO_4 analisadas, não há influência significativa da utilização desta fonte de sal para a produção de AJ.

Tabela 26 - Teste de Tukey da produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* cultivado em meio Br1 dentro das concentrações de KH_2PO_4 .

Tratamentos	Concentração de KH_2PO_4 (g.L ⁻¹)	Médias da produção de AJ (mg.L ⁻¹)
1	0	63,37 b
2	0,5	242,38 a
3	1,0	265,85 a
4	1,5	217,60 a
5	2,0	257,72 a
6	2,5	282,14 a
7	3,0	259,50 a

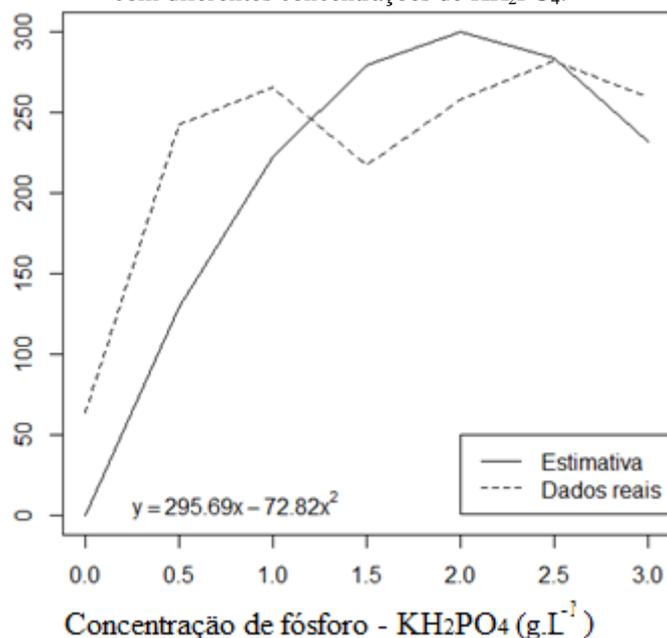
Médias seguidas de mesma letra não apresentaram significância estatística ao nível de 5%

Para identificar a relação do fósforo com a produção de AJ, foi realizado o ajuste dos modelos de regressão mais adequado. O coeficiente de determinação do modelo de regressão (R^2), para o AJ foi de 0,93 sendo que o modelo que melhor explica os valores para esta variável foi dado por:

$$\text{Ácido Jasmônico} = 295,69 * \text{Fósforo} - 72,82 * \text{Fósforo}^2$$

A partir deste modelo, obteve-se a curva de regressão da produção de AJ por *B. rhodina* (Figura 17), quando fermentado em meio de cultura Br1 em função da suplementação do meio de cultura com KH_2PO_4 dentro do intervalo de 0,0 e 3,0 g.L⁻¹.

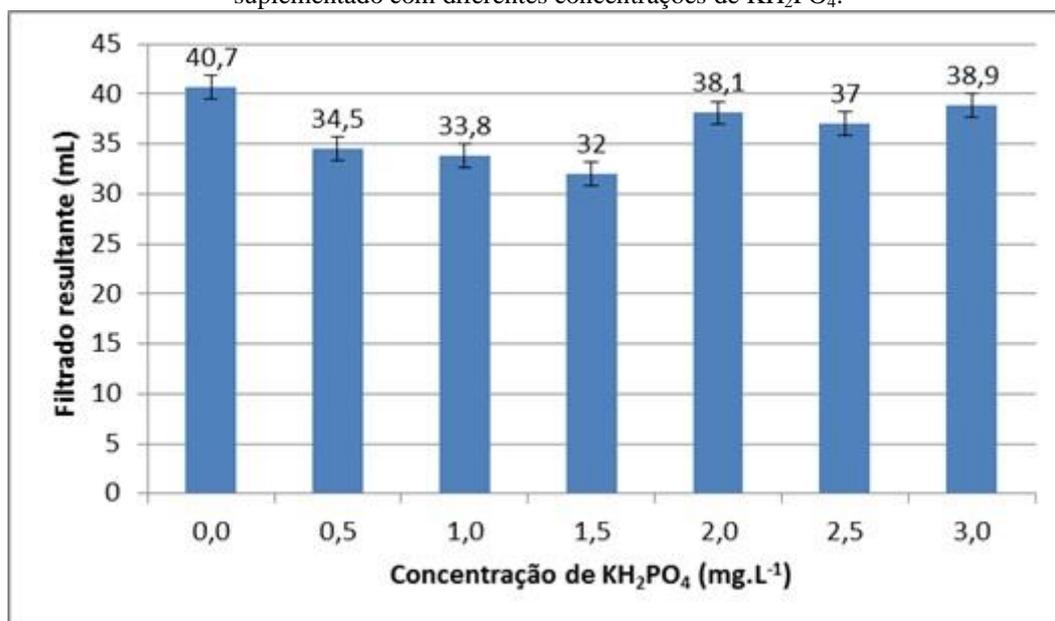
Figura 17 - Tendência da produção de AJ resultante do cultivo do fungo *B. rhodina* em meio Br1 suplementado com diferentes concentrações de KH_2PO_4 .



O modelo demonstra que caso não haja adição de KH_2PO_4 ao meio de cultura, não haverá produção de ácido jasmônico (estimativa), entretanto os dados reais da produção de AJ demonstram que, mesmo sem a adição da fonte de fósforo, houve produção, entretanto com uma redução de 77,56%, quando comparada à maior produção em que foi utilizado o sal. Para o cálculo do ponto máximo de produção a análise estatística demonstra que com $2,03 \text{ g.L}^{-1}$ de KH_2PO_4 se obtém a produção máxima de $300,16 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido jasmônico.

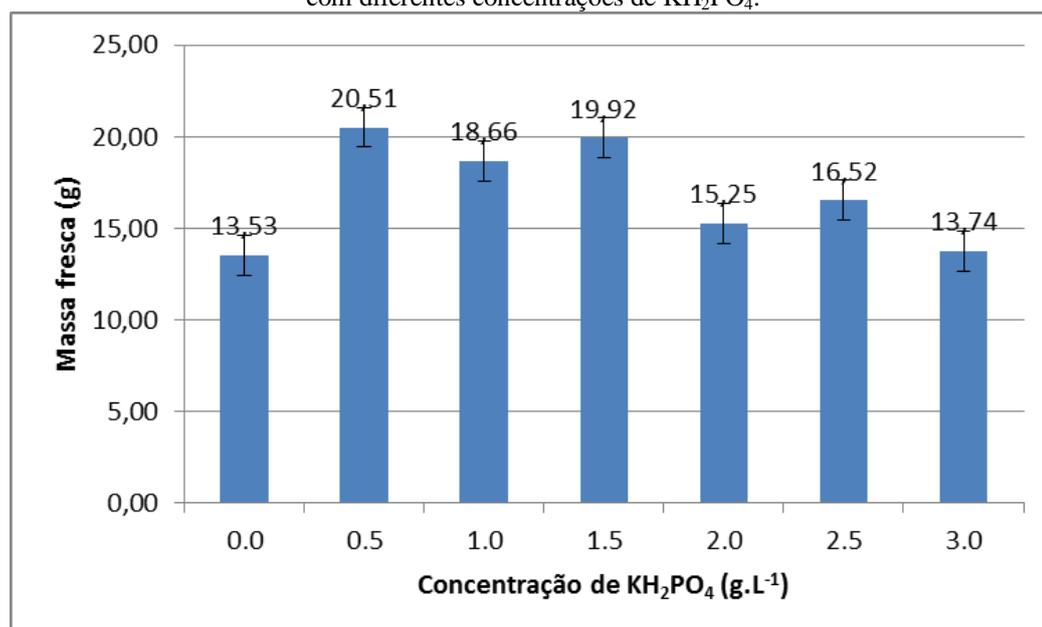
A análise do filtrado resultante do processo de fermentação (Figura 18), permite observar que sem a adição do fosfato o volume do filtrado é maior ($40,7 \text{ mL}$), enquanto que com a utilização de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de KH_2PO_4 ocorre redução do filtrado. Possivelmente o fungo utiliza o KH_2PO_4 para a produção de compostos que influenciam na viscosidade final do meio de cultura.

Figura 18 - Média do volume de filtrado resultante das fermentações de *B. rhodina* cultivado em meio Br1 suplementado com diferentes concentrações de KH_2PO_4 .



Para a produção de massa fresca pelo fungo *B. rhodina* cultivado em meio Br1 suplementado com diferentes concentrações de fonte de fósforo, a não utilização do KH_2PO_4 resulta em menor produção de biomassa (Figura 19). Já a maior biomassa fresca ocorreu com a utilização do sal nas concentrações entre 0,5 a 1,5 g.L^{-1} , a partir destes valores de fosfato a concentração de sal exerce influência negativa reduzindo a produção de biomassa fresca.

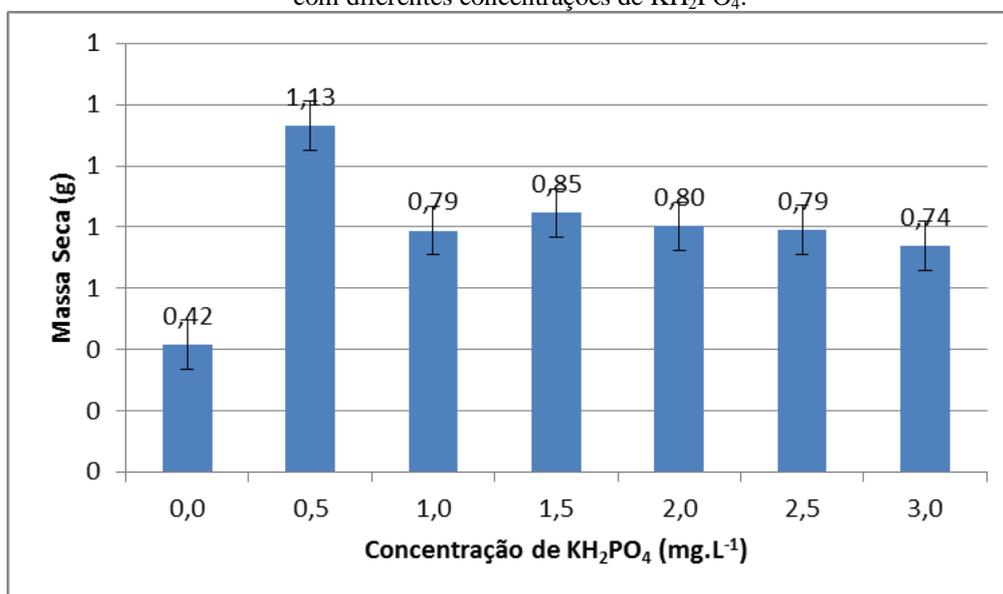
Figura 19 - Média da massa fresca resultante da fermentação de *B. rhodina* cultivado em meio Br1 suplementado com diferentes concentrações de KH_2PO_4 .



Assim como na produção da biomassa fresca, a supressão total do fosfato no meio de cultura promoveu redução também na biomassa seca do fungo (Figura 20), mas a maior

produção de biomassa seca ocorreu com a utilização de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de KH_2PO_4 . Concentrações de fósforo entre 1,0 e 3,0 não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

Figura 20 - Média da massa seca resultante da fermentação de *B.rhodina* cultivado em meio Br1 suplementado com diferentes concentrações de KH_2PO_4 .



A supressão total do fosfato exerceu influência sobre a produção de AJ, filtrado resultante e massa fresca e seca, demonstrando que este nutriente participa tanto do metabolismo de crescimento do fungo quanto da produção do AJ. A influência de nutrientes sobre a produção de compostos de interesse também foi estudada por Dishisha et al. (2013), que usando *Propionibacterium acidipropionici*, relacionaram a fonte de carbono e nitrogênio utilizadas com a produção da biomassa do fungo e a produção de ácido propiônico.

Apesar de o ponto máximo de produção de AJ ser na concentração de $2,0 \text{ g.L}^{-1}$ da fonte de fosfato, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre a utilização de $0,5$ e $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ da fonte de fosfato. Outro fator a ser considerado é que a produção em larga escala deve ocorrer em biorreatores, onde a viscosidade do meio é fator fundamental, e neste sentido, a utilização de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ é mais indicada, uma vez que nesta concentração do sal, o filtrado resultante do processo de fermentação é maior. Como a produção de AJ ocorreu semiassociada ao crescimento da massa micelial do fungo, concentrações que favoreçam a produção de biomassa também são interessantes, e novamente o maior valor de massa micelial ocorreu quando utilizado $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ de fosfato.

5.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO (LACTOSE, SACAROSE, GLICOSE E GLICEROL) SOBRE A PRODUÇÃO DE AJ PELO FUNGO *B. rhodina* EM FERMENTAÇÃO EM MEIO Br1 E MEIO MÍNIMO EM CONDIÇÕES ESTÁTICAS.

As médias da produção de AJ entre os dois meios de cultura (Tabela 27) demonstram que em meio Br1 o fungo produz mais AJ em todos os tratamentos, exceto no controle negativo (sem adição de fonte de carbono).

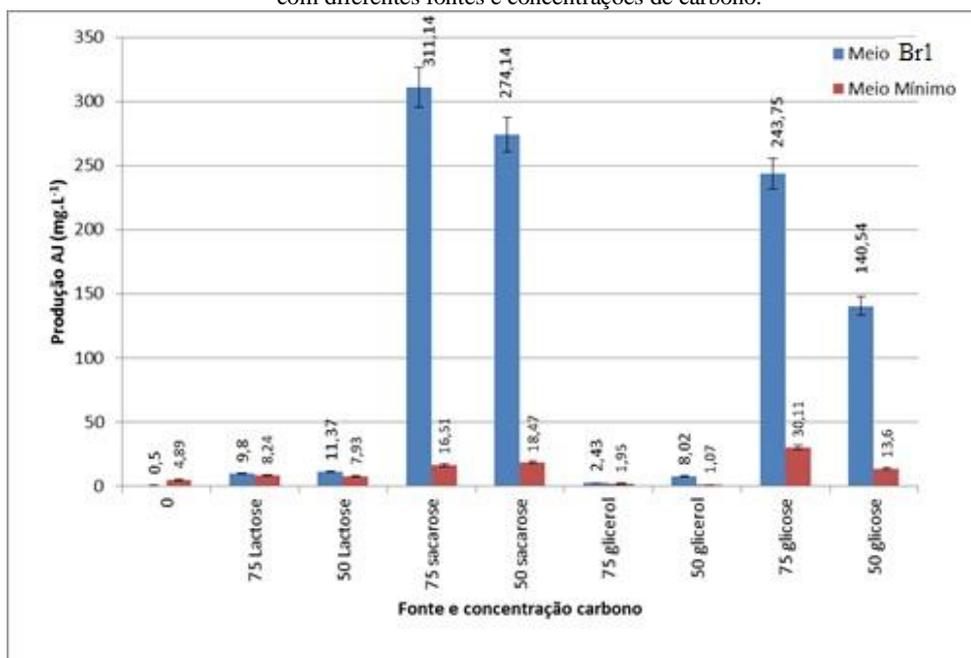
Tabela 27 - Comparação da produção de AJ de fermentados de *B. rhodina* cultivados em meio suplementado com diferentes fontes e concentrações de carbono em sistema estatico.

Concentração g.L ⁻¹	Fonte Carbono	AJ em Br1 (mg.L ⁻¹)	AJ em meio mínimo (mg.L ⁻¹)
0	-	0,5	4,89
75	Lactose	9,8	8,24
50	Lactose	11,37	7,93
75	Sacarose	311,14	16,51
50	Sacarose	281,05	18,47
75	Glicerol	2,77	1,95
50	Glicerol	8,02	1,07
75	Glicose	243,75	30,11
50	Glicose	140,54	13,6

Ao analisar a média de produção entre os meios de cultura (Figura 21), pode-se observar que com a utilização de sacarose e glicose nas concentrações de 75 e 50 g.L⁻¹ a produção é superior à produção quando utilizado das outras fontes de carbono (lactose, glicerol) nas mesmas concentrações.

Isso possivelmente ocorre pelo fato de o fungo produzir enzimas específicas para a hidrólise da sacarose, mas não para a lactose e o glicerol, dificultando assim a metabolização dos monissacarídeos formadores destes últimos.

Figura 21 - Média da produção de AJ (mg.L^{-1}) por fungo *B. rhodina* fermentado em meio Br1 e meio mínimo suplementado com diferentes fontes e concentrações de carbono.



Na análise estatística do fatorial (Tabela 28) foi encontrada significância estatística para os fatores: meio de cultura, fonte de carbono, concentração da fonte de carbono, e as interações fonte/concentração de carbono e meio/fonte/concentração de carbono.

Tabela 28 - Análise de variância – ANOVA - da produção de AJ, de fermentados de *B. rhodina* cultivados em meio Br1 e meio mínimo suplementados com diferentes fontes de carbono (lactose, glicerol, glicose e sacarose).

Fontes de Variação	G.L.	valor-p	
Meio	1	<.0001	SG
Fontes de Carbono	3	<.0001	SG
Meio * Fonte de Carbono	3	<.0001	SG
Concentração	2	<.0001	SG
Meio*Concentração	1	0.0005	-
Fontes de Carbono*Concentração	3	<.0001	SG
Meio*Fonte de Carbono * Concentração	3	<.0001	SG

SG - significativo

Como houve significância estatística em todos os fatores e a interação entre os mesmos também foi significativa, denota-se que os fatores são dependentes e não se pode estudá-los separadamente. Dessa forma, realizaram-se os desdobramentos necessários para a identificação de quais concentrações são significativas dentro das fontes de carbono analisadas (Tabela 29). Para a fonte de carbono foram significativos as concentrações de 50 g.L^{-1} e 75 g.L^{-1} de glicose e de sacarose.

Tabela 29 – Produção de AJ em relação a fonte e concentração de carbono em fermentados de fungo *B. rhodina* cultivados em meio Br1 e meio mínimo suplementado com diferentes fontes e concentrações de carbono.

Fontes de Carbono	Concentração (g.L ⁻¹)	G.L	valor-p	
Glicerol	50	1	0.0256	
Glicerol	75	1	0.8770	
Glicose	3	0	-	
Glicose	50	1	<.0001	SG
Glicose	75	1	<.0001	SG
Lactose	50	1	0.6953	
Lactose	75	1	0.6009	
Sacarose	50	1	<.0001	SG
Sacarose	75	1	<.0001	SG
-	0	1	0.1245	

SG - significativo

Ou seja, para a produção de AJ, a utilização de sacarose e glicose nas concentrações de 50 g.L⁻¹ e 75 g.L⁻¹, altera significativamente quando modifica-se o meio de cultura, sendo que em meio Br1 a produção pode ser 1000 vezes maior que produção em meio mínimo. Para as demais concentrações não foram encontradas diferenças estatísticas significativas. Como já era esperado, mesmo utilizando o meio Br1, que é rico em nutrientes, sem a suplementação com a fonte de carbono, o fungo produz relativamente a mesma quantidade de AJ que quando cultivado em meio mínimo sem a utilização de uma fonte de carbono.

O mesmo foi observado em relação ao meio de cultura (Tabela 30) em que as concentrações de 50 g.L⁻¹ e 75 g.L⁻¹ apresentaram diferenças estatísticas significativas.

Tabela 30 — Produção de AJ em relação ao meio de cultura e a concentração da carbono em fermentados de fungo *B. rhodina* cultivados em meio Br1 e meio mínimo .

Meio	Concentração C (g.L ⁻¹)	G.L	valor-p
Br1	0	0	-
Br1	50	3	<.0001 SG
Br1	75	3	<.0001 SG
Mínimo	0	0	-
Mínimo	3	0	-
Mínimo	50	3	<.0001 SG
Mínimo	75	3	<.0001 SG

SG - significativo

Nos meios de cultura Br1 e mínimo, quando utilizado das concentrações de 50 g.L⁻¹ e 75 g.L⁻¹, há diferença na produção de AJ quando variou-se a fonte de carbono, entretanto quando não se utiliza de uma fonte de carbono não há diferença estatística significativa. Quando analisado o meio de cultura e as fontes de carbono (Tabela 31), observa-se significância estatística para a utilização da glicose tanto no meio Br1 quanto no meio

mínimo, ou seja, nesta fonte de carbono ocorre diferença estatística significativa quando variou-s a concentração nos dois meios de cultura.

Tabela 31 - Produção de AJ em relação ao meio de cultura e a fonte de carbono em fermentados de fungo *B. rhodina* cultivados em meio Br1 e meio mínimo

Meio	Fonte Carbono	G.L	valor-p	
Br1	Glicerol	1	0.0876	
Br1	Glicose	1	<.0001	SG
Br1	Lactose	1	0.9295	
Br1	Sacarose	1	0.2956	
Br1	Sem Carbono	0	-	
Mínimo	Glicerol	1	0.4906	
Mínimo	Glicose	2	<.0001	SG
Mínimo	Lactose	1	0.9351	
Mínimo	Sacarose	1	0.6740	
Mínimo	Sem Carbono	0	-	

SG - significativo

Em uma análise final (Tabela 32) foi possível identificar que com a utilização do meio Br1 suplementado das fontes de carbono glicose e sacarose, a concentração de carbono influencia significativamente, sendo que com 75 g.L^{-1} ocorre uma produção superior em ambas fontes de carbono; para a lactose e o glicerol não há diferença estatística significativa independente da concentração utilizada.

Tabela 32 – Média da produção de AJ em fermentados de *B. rhodina* cultivado em meio de cultura contendo diferentes fontes e concentrações de carbono.

Tratamento	Meio	Fontes Carbono	Concentração C g.L ⁻¹	Média AJ (mg.L ⁻¹)
8	Br1	Sacarose	75	311,14a
7	Br1	Sacarose	50	281,05b
4	Br1	Glicose	75	243,75b
3	Br1	Glicose	50	140,54c
14	Mínimo	Glicose	75	30,11d
17	Mínimo	Sacarose	50	18,47de
18	Mínimo	Sacarose	75	16,51de
13	Mínimo	Glicose	50	13,6de
6	Br1	Lactose	75	11,37de
5	Br1	Lactose	50	9,8de
16	Mínimo	Lactose	75	8,24de
1	Br1	Glicerol	50	8,02de
12	Mínimo	Glicose	3	7,96de
15	Mínimo	Lactose	50	7,93de
2	Br1	Glicerol	75	2,77e
9	Br1	Sem Carbono	0	0,5e
10	Mínimo	Glicerol	50	1,07e
11	Mínimo	Glicerol	75	2,77e
19	Mínimo	Sem Carbono	0	4,89e

Médias seguidas de mesma letra não apresentaram significância estatística ao nível de 5%.

Ao se comparar a significância entre os tratamentos (Tabela 33) observa-se que com a utilização do meio Br1 (tratamento 1 a 9) todos os tratamentos apresentam diferenças significativas com pelo menos quatro outros tratamentos; com a utilização do meio mínimo apenas o tratamento 14, que utiliza a glicose na concentração de 75 g.L⁻¹, e o tratamento 18, em que foi utilizado a sacarose na concentração de 75 g.L⁻¹, apresentam diferenças significativas com outros tratamentos. Os demais praticamente não diferem entre si.

Tabela 33 – Significância estatística entre os tratamentos (1 a 19) de fungos *B. rhodina* cultivados em meio Br1 e meio mínimo suplementados com diferentes fontes e concentrações de carbono.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
1		.	SG	SG	.	.	SG	SG
2	.		SG	SG	.	.	SG	SG	SG
3	SG	SG		SG																
4	SG	SG	SG		SG	SG	.	SG												
5	.	.	SG	SG		.	SG	SG
6	.	.	SG	SG	.		SG	SG
7	SG	SG	SG	.	SG	SG		SG												
8	SG		SG																	
9	.	.	SG	SG	.	.	SG	SG		SG	SG	.
10	.	.	SG	SG	.	.	SG	SG	SG	SG	.
11	.	.	SG	SG	.	.	SG	SG	SG
12	.	.	SG	SG	.	.	SG	SG
13	.	.	SG	SG	.	.	SG	SG
14	.	SG	SG	SG	.	.	SG	SG	SG	SG	SG	SG
15	.	.	SG	SG	.	.	SG	SG
16	.	.	SG	SG	.	.	SG	SG
17	.	.	SG	SG	.	.	SG	SG
18	.	.	SG	SG	.	.	SG	SG	SG	SG
19	.	.	SG	SG	.	.	SG	SG	SG

SG – significância estatística em 5%

A utilização do meio mínimo, com reduzida concentração de nutrientes, não favoreceu a produção do composto, isso demonstra a importância dos elementos que compõe o meio Br1 na produção de AJ. O fungo além de utilizar esses compostos para a produção de micélio, também os utiliza na produção de metabólitos secundários.

Verificou-se que a utilização da sacarose na concentração de 75 g.L⁻¹ em meio Br1 é, dentro das fontes e concentrações analisadas, 9,68 % mais produtiva que a utilização de 50 g.L⁻¹ da mesma fonte de carbono, e 28,73 % mais produtiva que a utilização de 75 g.L⁻¹ de glicose em meio Br1. Dessa forma o mais indicado é a utilização de 75 g.L⁻¹ de sacarose em meio Br1.

As modificações no meio de cultura podem favorecer a produção de compostos de interesse, entretanto além da manipulação, autores sugerem também modificações na forma de cultivo (MIENDA; IDI; UMAR, 2011; KONDO et al., 2013).

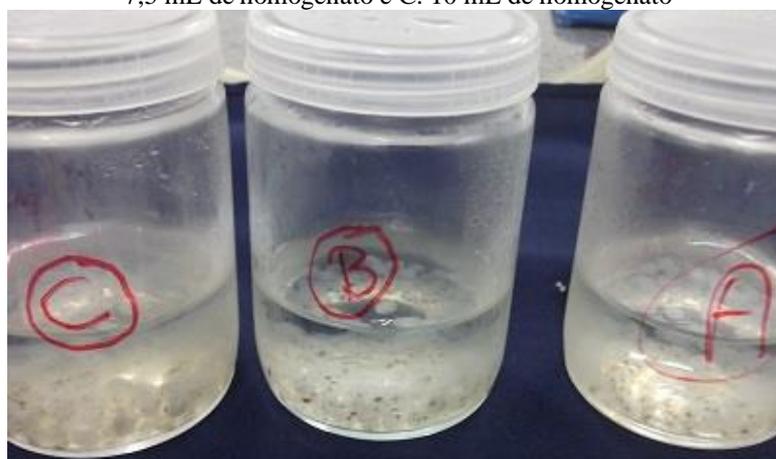
Dentre as modificações, uma das possibilidades é a imobilização do organismo. O processo de imobilização por matriz porosa poderia impedir que o fungo se desenvolvesse, fornecendo ao fungo condições para a sobrevivência e mantendo a produção de ácido

jasmônico (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006). Assim, utilizar o alginato de cálcio para formar uma camada envolvendo o fungo, possibilitando a imobilização do mesmo, reduziria o atrito das hifas do fungo e poderia reduzir a produtividade de exopolissacarídeo, conseqüentemente reduziria a viscosidade do meio de cultura de fermentações em sistema agitado.

5.6. IMOBILIZAÇÃO DO FUNGO *B.rhodina* EM ALGINATO DE CÁLCIO, BUCHA VEGETAL E BUCHA SINTÉTICA.

No experimento para imobilização do fungo *B.rhodina* em alginato de cálcio, foi possível observar que a utilização de 5,0 mL de homogenado (Figura 22 - A) promoveu a formação de pérolas que apresentaram formas mais circulares que as com 7,5 e 10 mL (Figura 22 - B e C), sendo que nestes frascos algumas pérolas ficaram agrupadas. Ao transferir as pérolas para o meio de cultura (Br1), houve a formação de aglomerados nas pérolas onde foram usadas 7,5 e 10 mL de homogenado.

Figura 22- Pérolas de alginato de cálcio contendo fungo *B. rhodina*. A: utilizando-se 5,0 mL de homogenato, B: 7,5 mL de homogenato e C: 10 mL de homogenato



No processo de imobilização com alginato de cálcio, a utilização de 5,0 mL de homogenato proporcionou a formação de um número menor de pérolas (110 pérolas) quando comparadas a 7,5 mL (127 pérolas) e 10 mL (145 pérolas) e conseqüentemente pérolas com maior concentração de micélio, visto que a quantidade de líquido final é menor (55 mL) quando comparada com as de maior concentração de homogenato (57,5 e 60 mL). Apesar das diferenças no número de pérolas, não houve diferença significativa na produção de AJ.

A utilização de alginato de cálcio como encapsulamento para o fungo não promoveu a imobilização total do fungo, visto que este continuou a crescer quando em contato com o meio de cultura. O objetivo era que o fungo produzisse AJ e que as pérolas contendo o micélio pudessem ser reutilizadas como inóculo, entretanto o crescimento do fungo, em contato com o alginato, produziu uma grande quantidade de exopolissacarídeo (Figura 23), que exauriu quase que a totalidade do meio de cultura.

Figura 23 - Meios de cultura (Br1) geleificados após fermentação de *B. rhodina* imobilizado em pérolas de alginato de cálcio.

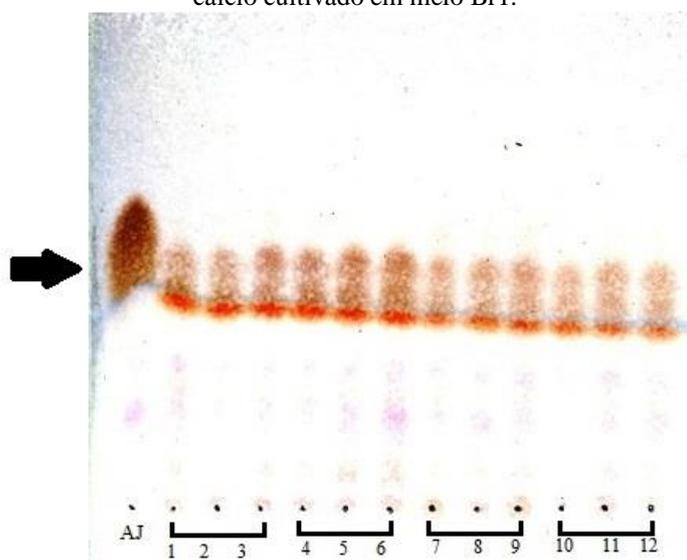


Possivelmente, estes compostos são pentosanas ou β -glucanas, compostos produzidos pelo fungo que em contato com a água forma géis. Segundo Bauermeister et al. (2010) esses compostos são produzidos como mecanismos de adaptação do fungo a determinados ambientes ou substâncias. Nesse caso, o contato com o alginato desencadeou a produção do composto.

Como não ocorreu o aprisionamento do fungo com uma camada de alginato, foi realizado um segundo experimento com uma dupla camada de alginato. Mesmo com a formação de uma dupla camada de alginato sobre o micélio, o microorganismo se desenvolveu no meio de cultura, e novamente produziu compostos que tornaram o meio de cultura gelatinoso. Isto pode ter acontecido pela entrada da água nas pérolas de alginato, tornando-as mais porosas e facilitando a saída do fungo, permitindo assim o contato das hifas com os nutrientes necessários ao seu crescimento.

O crescimento do fungo, mesmo encapsulado em duas camadas nas pérolas de alginato, também pode ter sido favorecido pelo tamanho das células do fungo, que possivelmente atravessaram os poros existentes nas pérolas. Além disso, o crescimento de fungos filamentosos é apical, ou seja, nas pontas das hifas, com a trituração do micélio, o número de “pontas” foi aumentado, favorecendo assim o crescimento do fungo (POSCH, HERWIG, SPADIUT, 2013). Na análise por CCDC (Figura 24) foi possível à identificação de jasmonatos nas amostras, entretanto o esperado era que o fungo não extravasasse os pellets, possibilitando assim a reutilização das pérolas como inóculo.

Figura 24 – Cromatoplaça dos extratos dos fermentados de *B. rhodina* imobilizado em pérolas de alginato de cálcio cultivado em meio Br1.



AJ – padrão, 1 a 3 (controle); 4 a 6 (7,5 mL de homogenato); 7 a 9 (10 mL de homogenato) e 10 a 12 (5 mL de homogenato com dupla camada de alginato). A seta indica a linha de identificação de ácido jasmônico

A imobilização foi incapaz de evitar o crescimento do fungo, entretanto a análise qualitativa dos fermentados evidenciou a produção de AJ pelo fungo em todas as amostras avaliadas. Embora aconteça a produção de AJ, o fungo produziu um exopolissacarídeo, que somado as pérolas de alginato proporcionou a formação de uma massa polimérica que exauriu quase que a totalidade do meio de cultivo. A formação de exopolissacarídeo quando em cultura agitada já ocorreu em experimentos anteriores a esta pesquisa e consta na literatura. Segundo Tang e Zhong (2003), estes compostos podem ser produzidos quando há agitação, pois torna o oxigênio mais disponível às células, o que favorece a produção de exopolissacarídeo.

Como os compostos utilizados tornam o meio geleificado, dificultando a disponibilidade de oxigênio e nutrientes para o fungo, compromete a produção de AJ. A

produção do polissacarídeo pode ainda estar atrelada a mecanismos de defesa do microrganismo, que, em ambiente menos propício, produz diferentes metabólitos secundários.

Segundo Shuler e Kargi (2012), essa produção desvia a rota metabólica natural do microrganismo, ativando genes de defesa que são capazes de produzir os mais variados compostos. Neste caso, a produção de um polímero quando em contato com o alginato de cálcio ou em agitação pode ser um mecanismo que impeça o atrito das hifas com o frasco ou até mesmo entre as células, tornando assim o meio menos inóspito.

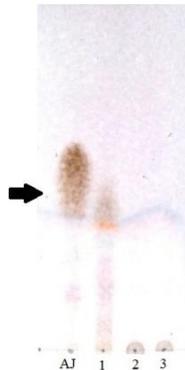
Como não foi possível imobilizar o fungo em alginato, buscou-se uma forma de fornecer um suporte para o crescimento do mesmo, com o objetivo de reutilizar a massa micelial formada sobre o suporte como inóculo, após a retirada do meio de cultura de cada produção de AJ. O agente utilizado foi a bucha vegetal, *Luffa cylindrica*, que é composta por fibrilas unidas entre si com resina natural (TANOB et al., 2005). Estas fibras podem servir como um suporte similar aos tecidos vegetais normalmente habitados por fungos *B. rhodina*. Com a utilização da bucha vegetal como suporte, houve uma boa aderência do fungo à bucha (Figura 25) e um crescimento reduzido no meio de cultura.

Figura 25 – Fungo *B. rhodina* cultivado em meio Br1 utilizando bucha vegetal como suporte.



No cultivo do fungo, utilizando a bucha vegetal como suporte, houve um crescimento rápido em direção à parte superior da bucha, fato que reforça a importância do oxigênio no crescimento do fungo, uma vez que neste espaço a disponibilidade de oxigênio é maior. Entretanto, apesar de ter havido crescimento do fungo, na análise por CCDC não foi detectada a presença de AJ em nenhuma das amostras (Figura 26).

Figura 26 – Cromatoplaca dos extratos dos fermentados de *B. rhodina* cultivado em meio Br1. AJ: Padrão de ácido Jasmônico; 1: Imobilização em alginato de cálcio.; 2: Imobilização em bucha vegetal; 3: Imobilização em bucha vegetal com meio com redução de KNO_3 . A seta indica a linha de identificação de AJ.



Para tornar o ambiente de cultura mais inóspito, reduzindo a matéria orgânica, substituiu-se o suporte de bucha vegetal por bucha sintética, entretanto os resultados foram semelhantes àqueles em que foi utilizada a bucha vegetal; novamente não favoreceu a produção de AJ.

5.7. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA SACAROSE E DO FÓSFORO (KH_2PO_4) SOBRE A PRODUÇÃO DE AJ PELO FUNGO *B. rhodina* EM FERMENTAÇÃO EM MEIO Br1 E MEIO Mv SOB CONDIÇÕES ESTÁTICAS E AGITADAS (75 rpm).

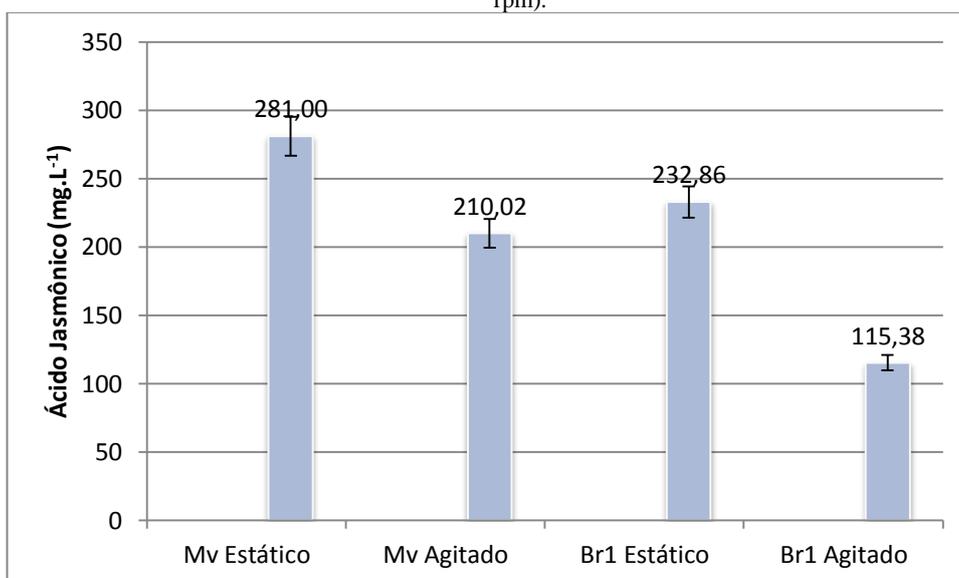
A produção de AJ, quando se cultivou o fungo *B. rhodina* em agitação de 150 rpm, apresentou melhor produção de AJ com a utilização da sacarose como fonte de carbono (média de 40 mg.L^{-1}). Esta produção é bastante inferior a média de produção em sistema estático (aproximadamente 230 mg.L^{-1}), e menor ainda quando comparada a produção quando utilizado o meio Mv em sistema estático, (produção média de 280 mg.L^{-1}). Estes valores reduzidos da produção de AJ nesta condição podem estar relacionados ao metabolismo do fungo, que passa a usar a energia para a produção de exopolissacarídeo, reduzindo assim a produção de AJ, ou ao fato de não se conseguir extrair totalmente o AJ produzido, que pode ficar preso no composto gelatinoso.

O aumento da viscosidade no processo agitado pode ser desencadeado pelo atrito das hifas que estimulam a produção de exopolissacarídeos como mecanismo de proteção. Além da função de proteção do fungo estes compostos são também utilizados como reserva de energia por estes organismos (POSCH; HERWIG; SPADIUT, 2013). Objetivando ampliar a produção

de AJ e reduzir a viscosidade, utilizou-se do meio Mv (Br1 modificado em sacarose e fósforo) comparado ao meio de cultura Br1 e reduziu-se a agitação de 150 para 75 rpm. Este processo foi comparado ao controle (sistema estático). Uma vez que a quantidade de técnicas de fermentação diferentes que podem ser utilizadas é grande, sendo necessários trabalhos de pesquisas para buscar identificar substratos que possam manter os processos sustentáveis e produtivos (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012).

A produção de ácido jasmônico nas fermentações em que utilizou-se meio Mv (maior concentração de sacarose (75 mg.L^{-1}), combinado à redução na concentração de fosfato ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$) foi superior ao meio Br1 tanto no sistema agitado quanto estático (Figura 27). Verificando-se que o meio Mv poderá gerar resultados promissores no processo em maior escala, quando se utilizar biorreatores onde o sistema deverá ser agitado.

Figura 27 - Produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* em meio Mv e Br1 em fermentações em sistema estático e agitado (75 rpm).



Na análise estatística estes resultados foram corroborados. O resumo da análise de variância para o fatorial (Tabela 34) que foram significativos o meio de cultura (Mv e Br1) e a condição de fermentação (agitado e estático).

Tabela 34 - Análise de variância – ANOVA - da produção de AJ de fermentados de *B.rhodina* cultivados em meio Mv e Br1 em sistema agitado (75 rpm) e estático.

Fonte de variação	GL	AJ
Meio de cultura	1	SG
Agitação	1	SG
Meio de cultura x agitação	1	-
Erro	16	16
CV	22,5	-
X	209,89	-

CV – coeficiente de variação X- Média geral SG - significativo

Como houve significância procedeu-se o desdobramento dos fatores em análise. Na análise apenas dos meios de cultura, obteve-se resultado 30,32% superior com o meio Mv em relação ao meio Br1, independente da forma de cultivo (Tabela 35).

Tabela 35 - Teste Scott-knott – Produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* considerando apenas o meio de cultura (Mv e Br1).

Meio de cultura	Médias AJ mg.L ⁻¹
Mv	237,52a
Br1	182,25b

Erro padrão: 14,96 $\alpha \leq 0,05$

Quando considerado apenas o sistema de cultivo do fungo (estático e agitado) novamente o meio Mv favoreceu um crescimento de 43,40% na produção de AJ quando comparado ao meio Br1 (Tabela 36).

Tabela 36 - Teste Scott-knott – Produção de AJ pelo fungo *B. rhodina* considerando apenas o sistema (agitação 75 rpm ou estático).

Meio de cultura	Médias AJ mg.L ⁻¹ cultivo agitado	Médias AJ mg.L ⁻¹ cultivo estático
Mv	210,02 a	281,00a
Br1	115,38 b	232,86 b

Erro padrão: 14,96 $\alpha \leq 0,05$

Médias seguidas de mesma letra na linha e mesmo número na coluna não apresentaram diferença estatística ao nível de 5%.

O processo fermentação do fungo quando realizado em agitação de 150 rpm, resultou em fermentados extremamente viscosos em função da produção de exopolissacarídeos, e baixa produção de AJ (média de 50 mgL⁻¹). Com modificações no meio de cultura (aumento da concentração de sacarose e redução no fosfato) combinada à redução da velocidade de agitação (150 para 75 rpm) obteve-se melhora significativa na produção de AJ (média de 50 mg.L⁻¹ para 210 mg.L⁻¹) e, também redução na viscosidade do meio de cultura.

Quando se compara a produção de AJ utilizando-se deste processo com a produção comercial (quando utiliza-se extração de vegetais), a concentração de AJ é significativamente

superior tanto em meio estático quanto agitado. Esses resultados mostram-se promissores, uma vez que a produção de AJ por bioprocessos não estará sujeita às intempéries, variações sazonais ou possíveis situações de estresse do vegetal. O tempo para produção de AJ pelo fungo poderá ser reduzido, quando comparado à plantas, e principalmente os parâmetros do processo poderão ser otimizados de forma a se obter produções ainda superiores destas aqui apresentadas. Além disso, a utilização de biorreatores com maior capacidade proporcionará redução no custo de produção de AJ e, conseqüentemente, nos preços praticados atualmente pelo mercado.

6. CONCLUSÕES

A linhagem Kifn 3.1 de *B. rhodina* produziu AJ em diferentes concentrações, em função do tempo, da composição do meio de cultura e das condições de cultivo. O uso de sistemas de imobilização ou suportes para o aprisionamento do fungo não se mostraram eficientes, impossibilitando assim a reutilização do micélio no processo de produção de AJ, estratégia esta que contribuiria para o aumento da produtividade e redução dos custos de produção do mesmo. Quanto à composição do meio, redução da fonte de fósforo (KH_2PO_4) para $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, associado à suplementação com $75,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sacarose como fonte de carbono proporcionaram maiores produções de AJ pelo fungo. Quanto às condições de cultivo, embora em sistema estático o teor de AJ no fermentado seja superior (300 mg.L^{-1}), a manutenção da fermentação sob agitação de 75 rpm mostrou-se promissora, uma vez que nestas condições o fungo produziu menor teor de exopolissacarídeo, gerando assim um meio com menor viscosidade. Desta forma, o fungo foi capaz de produzir e excretar AJ em concentrações superiores (200 mg.L^{-1}) às obtidas sob maior agitação (30 mg.L^{-1}), além disso, a redução do tempo de fermentação de 12 para 6 dias proporcionou ao bioprocessamento de AJ maior produtividade.

REFERÊNCIAS

- ABDALA, G.; CENZANO, A. Biosíntesis de jasmonatos y participación en procesos del desarrollo vegetal. **SAFV, Temas de Fisiología Vegetal**, Córdoba p. 56-87, 2006.
- ABDOU, R. et al. Botryorhodines A–D, antifungal and cytotoxic depsidones from *Botryosphaeria rhodina*, an endophyte of the medicinal plant *Bidens pilosa*. **Phytochemistry**, v. 71, p. 110–116, Jena, Nov 2009.
- ABRAHÃO NETO, J. . Purificação de Enzimas. In: Urgel de Almeida Lima; Eugênio Aquarone; Walter Borzani; Willibaldo Schimidel. (Org.). **Biociencia Industrial**, v.3, p. 377-389, 1ª ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001.
- ACOSTA, F.; FARMER, E. Jasmonates. **The Arabidopsis Book**, n. 8, p. 1-13, 2009.
- ALDRIDGE, D. C. et al. Metabolites of *Lasidiplodia theobromae*. **Journal of the Chemical Society**, p. 1623-1627, 1971.
- AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista Brasileira de Botânica**, v.22, n.2 (suplemento), p.225-229. São Paulo, out. 1999
- BAKER, E. Overview Fungi and Industrial Biotechnology – A Special Issue for an Amazing Kingdom. **Industrial Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 105-107. New Rochelle - NY, jun 2013. DOI:10.1089.
- BARBIERE, L. R.; CARVALHO, I. F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Revista Brasileira de Agrociências**, v. 7, n. 2, p. 79-83. Pelotas - RS, mai-ago 2001.
- BAUERMEISTER, A. et al. β -1,3- Glucanases Fúngicas: produção e aplicações biotecnológicas. **Seminário de Ciências Exatas e Tecnológicas**, n. 2, p. 75-86.jul./dez. Londrina, 2010.
- ARX V. J.A. **The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture**. 3ª edition. Vaduz, Germany, 1981.
- BAUMER, J. D. **Produção do Antibiótico Cinabarina pelo Fungo Pycnoporus sanguineus utilizando Resíduos Lignocelulósicos como Substrato**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis – SC, 2009.
- BARBIN, D. **Planejamento e análise estatística de experimentos agrônômicos**. Editora Midas: Araçatuba, PR, 2003.
- BHARGAV, et al. Solid-state Fermentation: An Overview. **Chemical & Biochemical Engineering Quarterly**, n. 22, p. 49–70. New Delhi, Sept 2008.
- BLÉE, E. Impact of Phito-oxylipins in plant defence. **Trends in Plant Scienc**, v. 7, p. 315-321, Jul 2002.

BORÉM, A. A história da Biotecnologia. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 34, p. 10-12. Viçosa, Jan-Jun, 2005.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da Fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239. São Paulo, Dez 2010.

BRODHUN F.; FEUSSNER I. Oxylipins in fungi. **The FEBS Journal**, v. 278, p. 1047-1063. Gottingen – Germany, 2011.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J.B.A. Biocatalizadores imobilizados: uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n.36, n.6, p.48-57. Brasília, 2006.

CHAGANTI, et al. Influence of linoleic acid, pH and HRT on anaerobic microbial populations and metabolic shifts in ASBRs during dark hydrogen fermentation of lignocellulosic sugars. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.38, p. 2212 -2220, 2013.

CHENG, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi increase organic carbon decomposition under elevated CO₂. **Science**, v. 337, p. 1084-1087, August 2012. DOI: 10.1126/science.1224304.

CONTI, R.; GUIMARÃES, D. ; PUPO, T. Aprendendo com as interações da natureza: micro-organismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Ciência e Cultura**, v.64, n. 3 , p. 43-47, Campinas, 2012.

COSTA, L.V. **Estudo da Influência do Oxigênio na Produção de Bioetanol**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de Aveiro, Portugal, 2011.

CRIBB, Y. Sistema agroalimentar brasileiro e biotecnologia moderna: oportunidades e perspectivas. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 21, n. 1 , p. 169-195, jan./abr. Brasília, 2004.

CROUS, P. W. et al. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. **Studies in mycology**, v. 55, p. 235–253, 2006.

CUNHA, M. A. A. **Manual básico de apoio e estudo da disciplina: Tecnologia das fermentações**. UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2010.

CUNICO, M. W. M. et al. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**, v.9, n.1. Curitiba, Jan/Jun, 2008. ISSN 1518-5192.

DANG, H.T. et al. Anti-inflammatory effect of methyl dehydrojasmonate (J2) is mediated by the NF- κ B pathway. **Journal of Molecular Medicine**, v. 89, n. 1, p. 83–90, 2011. DOI: 10.1007/s00109-010-0688-0.

DEKKER, R. F. H. et al. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **International Microbiology**. v. 10, p. 177-185. July 2007. ISSN:1139-6709

DEMOLE, E.; LEDERER, E.; MERCIER, D. Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. **Helvetica Chimica Acta**, v. 45, p. 675–685, 1962.

DHANDHUKIA, P. C.; THAKKAR, R. Significant medium components for enhanced Jasmonic acid production by *Lasiodiplodia theobromae* using Plackett-Burman Design. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 1, n. 1, p. 79-86, Gujarat – India, 2007. ISSN:0973-8916.

DHANDHUKIA, C. C.; THAKKAR, V. R. Response surface methodology to optimize the nutritional parameters for enhanced production of jasmonic acid by *Lasiodiplodia theobromae*. **Journal of Applied Microbiology**, p. 636-643. Gujarat, Jan 2008.

DISHISHA, T. et al. An economical biorefinery process for propionic acid production from glycerol and potato juice using high cell density fermentation. **Bioresource Technology**, n.135, p. 504–512, Sweden, Aug 2013.

DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. Sydney: Elsevier Science & Technology Books, 430 p. 1995. ISBN: 0122208552.

FARMER, E. E.; RUSSELL R. J.; RYAN, C. A. Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. **Plant Physiology**, v. 98, p. 995-1002. Washington, 1992.

FARMER, E.E.; RYAN, A. Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, p. 7713-7716, Pullman, October 1990.

FAROOQI, A. A.; BUTT, G.; RAZZAQ, Z. Algae extracts and methyl jasmonate anti-cancer activities in prostate cancer: choreographers of 'the dance macabre'. **Cancer Cell International**, p. 12-50, 2012. DOI:10.1186/1475-2867-12-50.

FELÍCIO, R.; OLIVEIRA, A. L.; DEBONSI H.M. Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 39-42. São Paulo, 2012. ISSN 0009-6725.

FINGRUT O.; FLESCHER E. Plant stress hormones suppress the proliferation and induce apoptosis in human cancer cells. **Leukemia**, v.16, n. 4, p. 608–616, April, 2002. DOI: 10.1038/sj/leu/2402419.

FLESCHER, E. Jasmonates in cancer therapy. **Cancer Letters**, v. 245, p. 1-10, March 2007. DOI:10.1016/j.canlet.2006.03.001.

FONSECA, et al. Thermal and Rheological Properties of a Family of Botryosphaerans Produced by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **Molecules**, v. 16, p. 7488-7501, September 2011. ISSN 1420-3049.

FREIRE, F. C. O., VASCONCELOS, F. R., COUTINHO, I. B. L. Fungos endofíticos: uma fonte de produtos bioativos de importância para a humanidade. **Essentia - Ciências Agrárias/Microbiologia**, v. 16, n° 1, p. 61-102. Sobral, jun./nov. 2014.

FRESEWINKEL, et al. Integration in microalgal bioprocess development: Design of efficient, sustainable, and economic processes. **Engineering in Life Sciences**, Karlsruhe, p. 1–14, Jun 2014.

GARCIA-OCHOA , F.; GOMEZ , E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. **Biotechnology Advances**, v. 27(2), p. 153-176, Mar-Apr 2009. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.10.006

GEBIEN, G. et al. Influência do pH e temperatura na produção de holocelulases por *Lentinula boryana* cultivado em *Eucalyptus benthamii*. **X Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – ENZITEC**. Blumenau -SC, Outubro 2012.

GIESE, E. C. et al. Produção, propriedades e aplicações de ligossacarídeos – **Seminário de Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 683-700. Londrina, abr/jun. 2011. DOI:10.5433/1679-0359

GOLD, D. et al. The Antiparasitic Actions of Plant Jasmonates. **Journal of Parasitology**, v.89, p. 1242-1244, 2003.

GOLDIN, N. et al. Methyl jasmonate binds to and detaches mitochondria-bound hexokinase. **Oncogene**, v.27, p. 4636–4643, Macmillan Publisher, 2008.

GONÇALVES, S. **Influência do sal, ph e temperatura no desenvolvimento de estafilococos coagulase negativa isolados de produtos cárneos fermentados**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de Lisboa. Lisboa, 2013.

GONZÁLEZ, et al. Modelación de la Influencia del pH y la temperatura en la velocidad de crecimiento de *Tsukamurella Paurometabola* C-924. **Tecnología Química**, v. XXIX, n. 1, p. 59-62. Camaguey,2009.

GUPTA, A.; SINHA, S. N.; ATWAL, S. S. **Modified atmosphere in seed health management: Laboratory and field assay of carbon dioxide against storage fungi in paddy**. **Plant Pathology Journal**, v. 13, n. 3, p. 193-199. Haryana 2014. ISSN 18125383.

HAMBERG, M.; GARDNER, H. W. Oxylin pathway to jasmonates: biochemistry and biological significance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1165, p. 1-18, 1992.

HYMERY, et al. Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese:A Review. Comprehensive Reviews. **Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 437-456, June 2014. DOI: 10.1111/1541-4337.12069.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Incidência de Câncer no Brasil**. 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em: 10 Junho 2015.

Jl, X.; HUANG, H.; OUYANG, P. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. **Biotechnology Advances**, v. 29. p. 351–364, Nanjing, 2011.

KANAGAWA, A. I.; NEVES, M. A. **Biologia e Sistemática de Fungos Algas e Briófitas**. **Cadernos Cb Virtual**, v. 2, p. 256-318. João Pessoa, 2011.

- KARIMI, et al. Oxygen mass transfer in a stirred tank bioreactor using different impeller configurations for environmental purposes. **Iranian Journal of Environmental Health Sciences & Engineering**, v. 10(1), p. 1-9. Tehran, 2013. 10.1186/1735-2746-10-6
- KELSEN, H. **Carpe Diem** – Tradução de Bruno Garrote. Revista dos Estudantes de Direito da Universidade de Brasília, Brasília, v. n. 8, p. 421-422, 2009.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- KIENLE G.S., et al. *Viscum album L.* extracts in breast and gynaecological cancers: a systematic review of clinical and preclinical research. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 28, p. 28-79, 2009. DOI: 10.1186/1756-9966-28-79.
- KIRK, P. M. et al. **Dictionary of the fungi**. 10. ed. Wallingford - UK: CAB International, 2008.
- KONDO, A. et al. Development of microbial cell factories for bio-refinery through synthetic bioengineering. **Journal of Biotechnology**, n. 163, p. 204– 216. Yokohama, May 2013.
- KUMAR. M. S. et al. Effect of stirring speed in lipase production using germinated maize oil. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 5, issue 2, p. 349-352. Feb, 2013.
- LABBEIKI, G. et al. Enhanced oxygen transfer rate and bioprocess yield by using magnetite nanoparticles in fermentation media of erythromycin. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.22, p. 1-7, Tehran, janeiro 2014. DOI:10.1186/s40199-014-0066-5
- LEITE, C. A. **Avaliação do processo de produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus***. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara - SP, 2014.
- LI, K.-T. et al. An optimized industrial fermentation processes for acarbose production. **Bioresource Technology**, v. 118, p. 580–583. Nanchang, May 2012.
- LIN, P.-J.; SCHOLZ, A.; KRULL, R. Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**, n. 49, p. 213–220. Braunschweig, December 2010.
- LINARES, A. M. et al. Atividade fitorreguladora de jasmonatos produzidos por *Botryosphaeria rhodina*. **Horticultura Brasileira**, v.28, p. 430-434, Brasília, Set 2010.
- LOPES, J. E. F. **Efeito antiogênico do metil jasmonatos, puro ou nanocarregado, um novo mecanismo para sua ação antineoplástica e antimetástica**. Tese (Doutorado em Ciências de materiais) - Univesidade Federal de São Carlos – UFSCAR. São Carlos, 2009.
- MACIEL, M. **Identificação de proteases cisteínicas envolvidas em processos de sinalização e defesa em *Ricinus communis L.*** Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes - RJ, 2007.
- MANDENIUS, C.; BRUNDIN, A. Review: Biocatalysts And Bioreactor Design. **Biotechnology Progress**, n. 24, p. 1191-1203. Linkoping, Novembro 2008. ISSN DOI 10.1021/bp.67.

- MENDES, S. F. et al. Sulfonation and anticoagulant activity of botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 grown on fructose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45 , p. 305–309. June, 2009.
- MARINHO, M. R. M., CASTRO, W. B. **Planejamento fatorial: uma ferramenta poderosa para os pesquisadores**. In: XXXIII Congresso Brasileiro de Ensino de Engenharia. Campina Grande – PB, Setembro 2005.
- MEYER A, et al. Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. **Journal Plant Growth Regulation**, v.3, p. 1-8, ed. Springer–Verlag, 1984.
- MIERSCH, O et al. Jasmonic-acid like substances from culture filtrate of *Botryodiplodia theobromae*. **Phytochemistry**, v.28, n.5, p.1303-1305. Great Britain, 1989.
- MIENDA, B. S.; IDI, ; UMAR, A. Microbiological Features of Solid State Fermentation and its Applications - An overview. **Research in biotechnology**, v. 2(6), p. 21-26, 2011. ISSN: 2229-791X.
- MILROT, E. et al. Methyl jasmonate reduces the survival of cervical cancer cells and downregulates HPV E6 and E7, and survivin. **Cancer Letters**. v. 319, Issue 1, p. 31–38, 2012.
- MOBLECH, A.; FEUSSNER, I.; HEILMANN, I. Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 511–517. Gottign – Germany, 2009.
- MONTGOMERY, D. C.; PECK, E. A.; VINING, G. G. **Introduction to linear regression analysis**. 3^a. ed., Wiley: New York, 2006.
- MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. 6^aed., John Wiley: New York, 1978.
- NASCIMENTO, et al. **Effect of pH and temperature on phytase and biomass production by submerged fermentation with *aspergillus niger* var. *phoenicis* urm 4924**. XIX Simpósio Nacional de Bioprocessos - X Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas. Braga, 2013.
- NIEKERK, J. M. V. et al. *Botryosphaeria spp.* as grapevine trunk disease pathogens. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 45, p. 43–54, Firenze, 2006. ISSN: 0031-9465.
- OFER, K.; GOLD, D.; FLESCHER E. Methyl jasmonate induces cell cycle block and cell death in the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. **International Journal for Parasitology**, n.38, p. 8-9. Jul, 2008. DOI: 10.1016/j.ijpara.2007.12.008.
- OLIVEIRA, D.; GAZOLLA, M.; SCHNEIDE, S. Produzindo novidades na agricultura familiar: agregação de valor e agroecologia para o desenvolvimento rural. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, 28, n. 1, p. 17-49. Brasília, jan./abr 2011.
- OLSVIK, E., KRISTIANSEN, B. Rheology of filamentous fermentations. **Biotech Adv.**, v. 12, p. 1-39, Great Britain, 1994.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, n. 35, p. 1153–1169, February 2000.

PAPAGIANNI,. Methodologies for Scale-down of Microbial Bioprocesses. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v.7, issue 5, p. 1-7. Thessaloniki, 2011. DOI:10.4172/1948.

PARK, C. et al. J7, a methyl jasmonate derivative, enhances TRAIL-mediated apoptosis through up-regulation of reactive oxygen species generation in human hepatoma HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 1, p. 86–93, Elsevier, 2012. DOI:10.1016/j.tiv.2011.10.016.

PENARIOL, M.C.. MONTEIRO, A.C, PITELLI, R.A. Crescimento e esporulação de *Bipolaris euphorbiae* cultivado sob diferentes condições Nutricionais. **Ciência Rural**, v.38, n.7. Santa Maria, out 2008. ISSN 0103-8478.

PEREIRA, J. N.; BON, E. P. D. S. **Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, v. 1, 62 p. 2008. ISBN 978-85-903967-2-7.

POSCH, A. E.; HERWIG, C.; SPADIUT, O. Science-based bioprocess design for filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 37-44. January, 2013.

PRETTI, T. S. **Otimização das condições de cultivo do fungo *aspergillus nidulans* para produção de melanina usando resíduos agroindustriais**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual Paulista, UNESP. Araraquara - S.P, 2009.

PU, X., et al. Camptothecin-producing endophytic fungus *Trichoderma atroviride* LY357: isolation, identification, and fermentation conditions optimization for camptothecin production. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 97. p. 9365–9375. China, 2013.

PUPO, M. T.; GALLO, B. C. Biologia Química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Quimica Nova**, v. 30, n. 6, p. 1446-1455. São Paulo, 2007.

RAMALHO, M. A. P.; FERREIRA, D. F.; OLIVEIRA, A. C. **Experimentação em genética e melhoramento de plantas**. Lavras: UFLA, p. 87-134, 2000.

RAMOS, H. P. **Otimização das condições de cultivo do fungo endofítico *Arthrinium state os Apioospora montagnei* Sacc. Para produção de metabólitos secundários com atividades biológicas**. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) Universidade de São Paulo – USP. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 2008.

RODRIGUES, T. D. K. D.; LEITE, I. C. **Fisiologia Vegetal Hormônios das Plantas..** Jaboticabal: Funep, 2004. p. 19-38.

RUSSO A, et al. A new jasmonic acid stereoisomeric derivative induces apoptosis via reactive oxygen species in human prostate cancer cells. **Cancer Letters**, v. 326(2), p. 199-205. Elsevier Ireland, 2012.

SALDANHA, R. L. et al. Genetic diversity among *Botryosphaeria* isolates and their correlation with cell wall-lytic enzyme production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 259-264. Março, 2007.

SAVOLAINEN, O. I. et al. The role of oxygen in the liquid fermentation of wheat bran. **Food Chemistry**, n.153, p. 424–431. Elsevier, 2014.

SCHARF, H.; BRAKHAGE, A. Engineering fungal secondary metabolism: A roadmap to novel compounds. **Journal of Biotechnology**, v. 163, p. 179– 183, Jena, June 2013.

SECATTO, M. **Desenvolvimento da síntese total do (±)-ácido jasmônico visando aplicação em escala industrial**. Dissertação (Mestrado Profissional em Química) Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR. São Carlos – SP, 2013.

SELBMANN, L.; STINGELE, F.; PETRUCCIOLI, M. Exopolysaccharide production by filamentous fungi: the example of *Botryosphaeria rhodina*. **Journal Article Antonie van Leeuwenhoek**, v. 84, n. 2, p. 135-145. Setembro, 2003.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. 2nd Edition. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 2012.

SILVA, S. D. C. **Estudo químico de microorganismos associados a *Khaya ivorensis* (Meliaceae)**. Tese (Doutorado em Química) Universidade Federal de São Carlos – UFSCA. São Carlos – SP, 2007.

SLIPPERS B.; WINGFIELD M. J. *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact fungal. **Biology Reviews**, n.21 p. 90-106. Pretoria, 2007.

SMIDERLE, F.R. et al. Exopolysaccharides, proteins and lipids in *Pleurotus pulmonarius* submerged culture using different carbon sources. **Carbohydrate Polymers**, n.87, p. 368-376. Elsevier, 2012.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 7a. ed., LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S.A: Rio de Janeiro, 2001.

STANBURY, P.F.; WHITAKER, A.; HALL, S.J. **Principles of fermentation technology**. Oxford: Butterworth Heinemann, 2000.

STRASSNER, J. et al. Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecenoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. **The Plant Journal**, v. 32, p. 585-601. Stuttgart - Germany, 2002.

SUBRAMANIYAM, R.; VIMALA, R. Solid State And Submerged Fermentation For The Production Of Bioactive Substances: A Comparative Study. **International Journal of Science and Nature**, v. 3(3), p. 480-486. Tamil Nadu, 2012. ISSN 2229 – 6441.

SUSHMA K.; PRAVEEN K.; POONAM R. Medicinal Plants of Asian Origin Having Anticancer Potential: Short Review. **Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v.2(10), p. 0 -07, 2012. e-ISSN: 2249-622X.

TANG, Y., ZHONG, J. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, issue 3-4, p. 478–484. March, 2003.

TANOBE, et al. A comprehensive characterization of chemically treated Brazilian sponge-gourds (*Luffa cylindrica*). **Science Direct**, n. 24, p. 474–482. Curitiba, Dezembro 2005. DOI:10.1016/j.polymertesting.2004.12.004.

TAVARES, et al. efeito de fontes de carbono e nitrogênio inorgânico sobre o crescimento micelial e esporulação de isolados de *Paecilomyces lilacinus*. **Journal of Agronomic Sciences**, v.1, n.1, p.171-180, Umuarama, 2012.

TSUKADA, K.; TAKAHASHI, K.; NABETA, K. Biosynthesis of jasmonic acid in a plant pathogenic fungus, *Lasiodiplodia theobromae*. **Phytochemistry**, v. 71 , p. 2019–2023, Sapporo – Japan, Out 2010.

TUDOR, D.; ROBINSON, C.; COOPER P. A. The influence of pH on pigment formation by lignicolous fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, n. 80, p. 22-28, September 2013.

TURNER, J.G.; ELLIS, C.; DEVOTO, A. The jasmonate signal pathway. **The Plant Cell**, vol. 14, p.153-164. United Kingdom: 2002.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 388-394. São Paulo, janeiro 2007.

UMUKORO S.; AKINYINKA A.O.; ALADEOKIN A.C. Antidepressant activity of methyl jasmonate, a plant stress hormone in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 98(1), p. 8-11. Mar, 2011. DOI: 10.1016/j.pbb.2010.12.001.

VALENCIA, J.W.A. **Metabólitos de origem fúngica: aplicações potenciais em processos biotecnológicos**. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, UNB. Brasília - DF, 2011.

VASCONCELOS, A. F. et al. Three exopolysaccharides of the β -(1 \rightarrow 6)-D-glucan type and a β -(1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 2481–2485. Junho, 2008.

WANG, Y. et al. Industrial bioprocess control and optimization in the context of systems biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 989-995. Epub, May 2009. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2009.05.022

WARABIEDA, W.; OLSZAK, R. W. Effect of exogenous methyl jasmonate on numerical growth of the population of the two-spotted spider mite (*tetranychus urticae* koch.) on strawberry plants and young apple trees. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, n. 4, p. 541-544, 2010.

WEBER, H.; VICK, B.; FARMER, E. Dinor-oxo-phytodienoic acid: a new hexadecanoid signal in the jasmonate family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.94, p.10473–10478. Pullman, 1997.

WONG, C. et al. Effects of pH and fermentation strategies on 2,3-butanediol production with an isolated *Klebsiella* sp. Zmd30 strain. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 169–176. Twain, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.10.101

YANG, J., et al., Effect of oxygen supply on *Monascus* pigments and citrinin production in submerged fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. XX, n. XX, p. 1-6, Elsevier, 2014. DOI:10.1016/j.jbiosc.2014.10.014

ZINIDARSIC, P.; PAVKO, A. Morphology of Filamentous Fungi. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39(3), p. 237–252, 2001. ISSN 1330–9862.