



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

***ASPERGILLUS NIGER: SUA UTILIZAÇÃO NA INDÚSTRIA
FARMACÊUTICA***

Trabalho submetido por
Sara de Oliveira Mateus Afonso
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Outubro de 2015



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

***ASPERGILLUS NIGER*: SUA UTILIZAÇÃO NA INDÚSTRIA
FARMACÊUTICA**

Trabalho submetido por
Sara de Oliveira Mateus Afonso
para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Maria Helena Barroso

Outubro de 2015

Agradecimentos

Quero agradecer aos meus pais, Fátima e Carlos, e ao meu irmão João, pelo apoio incondicional, paciência e motivação que me deram, durante a execução da monografia.

Ao Tiago, obrigado pelas palavras de encorajamento e apoio que me deste nestes últimos meses.

À Andreia Reis, Raquel Pereira, Débora Rodrigues, Inês Martins e Filipa Matilde, pelo enorme apoio, amizade e carinho.

Gostaria de agradecer às minhas colegas e amigas com quem partilhei estes cinco anos de curso, à Filipa Cantiga, Inês Santos, Inês Mouquinho, Isabel Silva, Rita Pires, Rita Pinto e Sara Coelho. Em especial à Chantelle Teixeira, pela amizade, carinho, motivação e apoio durante este percurso.

Aos professores do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, pelos conhecimentos que me transmitiram e por me terem feito gostar, cada vez mais, da profissão.

Aos Serviços Farmacêuticos do Hospital São José e às colegas estagiárias, Joana Camilo e Íris Mendonça, pela amizade, gargalhadas e entreaajuda durante o estágio.

À equipa da Farmácia Louro pela transmissão de conhecimentos, disponibilidade e carinho durante o estágio curricular. Em especial à Dra. Bruna Alexandra e ao Dr. Eduardo Martins, pela amizade e motivação.

Quero agradecer, à professora Helena Barroso, pela orientação, paciência e disponibilidade durante a execução da monografia.

“Que nunca te falte a vontade de seguir em frente,
e que te lembres sempre da força que tens.”

Resumo

Aspergillus niger é um fungo bastante utilizado na indústria farmacêutica e com muita importância a nível biotecnológico. Tem a capacidade de produzir compostos a nível industrial, como, ácido cítrico, ácido glucónico, ácido málico, várias enzimas e vitamina C, através de processos fermentativos. Também é utilizado para a execução de biotransformação de produtos já existentes, formando compostos com aplicação farmacêutica ou melhorando a sua aplicação. *Aspergillus niger* é utilizado em ensaios laboratoriais, para análise da atividade antifúngica de produtos farmacêuticos e em testes de esterilidade, fazendo parte do procedimento de controlo de qualidade do produto. Este fungo é considerado como não patogénico e na produção de alguns compostos tem o estatuto de GRAS (geralmente reconhecido como seguro) dado pela FDA. Contudo, algumas estirpes industriais de *Aspergillus niger* têm a capacidade de produção de micotoxinas, a ocratoxina A, em menor quantidades, e as fumonisinas B₂, B₄ e B₆, em quantidades mais elevadas. Deve-se então realizar a produção utilizando condições que não favorecem a formação de micotoxinas e efetuar posteriormente o controlo de qualidade dos compostos produzidos, para assim garantir a segurança da sua utilização na indústria farmacêutica.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*; indústria farmacêutica; enzimas; biotransformação.

Abstract

Aspergillus niger is a fungus widely used in the pharmaceutical industry and with high importance in the biotechnological sector. It has the ability to produce industrial compounds such as citric acid, gluconic acid, malic acid, various enzymes and vitamin C, by fermentation processes. It is also used to perform biotransformations of products, producing compounds with pharmaceutical applications or improved application. *Aspergillus niger* is used in laboratory as test for the analysis of activity antifungal of pharmaceutical products or sterility tests, with is part of quality product control. This fungus is considered non-pathogenic and the production of some compounds have GRAS (generally recognized as safe) status by the FDA. However, some industrial strains of *Aspergillus niger* have the capability of mycotoxin production, ochratoxin A, although in lower amounts and fumonisin B₂, B₄ and B₆ in higher amounts. Consequently, should be carry out production using conditions that don't favor the formation of mycotoxins and perform the quality control of the produced compounds, to ensure the safety of its use in the pharmaceutical industry.

Key-words: *Aspergillus niger*; pharmaceutical industry; enzymes; biotransformation.

Índice Geral

Capítulo 1 - Introdução.....	17
Capítulo 2 - Género <i>Aspergillus</i>	21
2.1 - <i>Aspergillus niger</i>	23
2.1.1 - Vantagens da sua utilização.....	26
Capítulo 3 - Compostos Farmacêuticos produzidos por <i>Aspergillus niger</i>	29
3.1 - Ácidos Orgânicos	30
3.1.1 - Ácido Cítrico	30
3.1.2 - Ácido Glucónico.....	35
3.1.3 - Ácido Málico	39
3.2 - Enzimas	41
3.2.1 - Glucose Oxidase	41
3.2.2 - Insulinase	47
3.2.3 - Invertase	47
3.2.4 - Lipase	49
3.2.5 - Tanase.....	50
Capítulo 4 - Biotransformações por <i>Aspergillus niger</i>	53
Capítulo 5 - Utilização em ensaios laboratoriais	59
Capítulo 6 - Segurança	61
Capítulo 7 - Conclusão	65
Bibliografia.....	67

Índice de Figuras

Figura 1- Observação microscópica de <i>Aspergillus niger</i> (Ellis, Davis, Alexiou, Handke & Bartley, 2007).	25
Figura 2 - <i>Aspergillus niger</i> inoculado em meio Sabouraud com cloranfenicol.	25
Figura 3 - <i>Aspergillus niger</i> inoculado em meio Czapek Dox (Ellis et al., 2007).	25
Figura 4 - Representação da reação metabólica da produção de ácido cítrico por <i>Aspergillus niger</i> . Adaptado de (Kubicek et al., 2010; Max et al., 2010).	31
Figura 5 - Oxidação da glucose em <i>Aspergillus niger</i> . Adaptado de (Ramachandran et al., 2006).	36
Figura 6 - Esquema das reações de produção do ácido málico. Adaptado de (Brown et al., 2013).	40
Figura 7 - Esquema do funcionamento dos biossensores de glucose de primeira geração (A), segunda geração (B) e terceira geração (C). Adaptado de (Wong et al., 2008).....	46
Figura 8 - Gráfico dos artigos publicados sobre <i>Aspergillus niger</i> (“Web of Science,” s.d.).	65
Figura 9 - Gráfico de patentes publicadas sobre <i>Aspergillus niger</i> (“Web of Science,” s.d.).	65
Figura 10 - Gráfico de artigos publicados sobre <i>Aspergillus niger</i> e indústria farmacêutica (“Web of Science,” s.d.).	65
Figura 11 - Gráfico de artigos publicados sobre biotransformações realizadas por <i>Aspergillus niger</i> (“Web of Science,” s.d.).	65

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação dos subgéneros e secções do género <i>Aspergillus</i> . Adaptado de (Houbraken et al., 2014; Hubka et al., 2014).	22
Tabela 2 - Cor das colónias em espécies do género <i>Aspergillus</i> . Adaptado de (Prakash & Jha, 2014).	23
Tabela 3 - Principais compostos produzidos por <i>Aspergillus niger</i> e a sua utilização mais comum (Demain et al., 2005; Kubicek et al., 2010; Schuster et al., 2002; Smith, Birchall & Coulman, 2011).	29
Tabela 4 - Condições para a produção de ácido cítrico com <i>Aspergillus niger</i> . Adaptado de (Kubicek et al., 2010).	32
Tabela 5 - Resumo das condições de fermentação para produção do ácido glucónico utilizando <i>Aspergillus niger</i> (Ramachandran et al., 2006; Roehr et al., 1996; A. Sharma, Vivekanand & Singh, 2008; O. V. Singh & Kumar, 2007; O. V. Singh & Singh, 2006).	36
Tabela 6 - Resumo das condições de fermentação para produção da glucose oxidase utilizando <i>Aspergillus niger</i> (Bankar et al., 2009a; Bankar, Bule, Singhal & Ananthanarayan, 2009b; Hatzinikolaou & Macris, 1995; Li & Chen, 1994; Rogalski, Fiedurek, Szczordrak, Kapusta & Leonowicz, 1988; Zetelaki, 1968).	42
Tabela 7 - Resumo de algumas biotransformações por <i>Aspergillus niger</i> utilizadas na indústria farmacêutica (Parshikov & Sutherland, 2014, 2015; Parshikov, Woodling & Sutherland, 2015).	55
Tabela 8 - Estirpes de <i>Aspergillus niger</i> usadas em biotecnologia e que produzem micotoxinas. Adaptado de (Frisvad et al., 2011).....	63

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FES	Fermentação em Estado Sólido
FS	Fermentação em Superfície
FSm	Fermentação Submersa
GOX	Glucose oxidase
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
G-6-PDH	Glucose-6-fosfato desidrogenase
OTA	Ocratoxina A
PA	Ent-pimaradienoico
PUFA	Ácido gordo polinsaturado
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
6-PKF	6-fosfofrutoquinase

Capítulo 1 - Introdução

Os microrganismos são seres vivos com que lidamos diariamente. As doenças causadas por microrganismos, como as infecções fúngicas e bacterianas, têm aumentado significativamente ao longo dos anos. Mas a verdadeira importância dos microrganismos, verifica-se quando têm uma aplicação benéfica para o ser humano.

Os fungos começaram a ganhar relevância a partir da descoberta da Penicilina em 1929, por Alexander Fleming, utilizando o fungo *Penicillium notatum* (Kavanagh & Kelly, 2011).

Estima-se que existam 5 milhões de espécies de fungos no planeta, sendo que encontram-se apenas descritas 99000 espécies no *Dictionary of Fungi* (Blackwell, 2011). Estes organismos têm um papel fundamental e predominante nas nossas vidas, sendo seres decompositores da matéria orgânica e transformadores de matéria já consumida. O impacto dos fungos é elevado de diversas formas, pois é a partir destes que é possível a produção de enzimas, bebidas alcoólicas, pão, antibióticos e proteínas recombinantes, entre outros (J. W. Bennett, 2010; Idnurm & Meyer, 2014; Kavanagh & Kelly, 2011; Kniemeyer, 2011). Mas também possuem um impacto negativo, porque um número limitado de fungos é capaz de causar infecções oportunistas no humano (Baker, 2006). Dada a importância para os humanos, algumas espécies de fungos tem sido estudadas extensivamente.

Com a evolução da indústria farmacêutica no último século, ocorreram descobertas revolucionárias em diversas áreas, como na farmacologia, biologia, química e tecnologia, o que consequentemente permitiu um maior entendimento das patologias e levou à descoberta de novas tecnologias e técnicas que permitiram um grande avanço em diversas áreas de investigação. Atualmente, como Idnurm e Meyer (2014) referem, encontramos na idade do ouro para a descoberta de fungos e as suas aplicações. Verifica-se, que os fungos têm uma grande participação na indústria mundial, pois têm permitido a evolução de áreas como a indústria alimentar, farmacêutica e a biotecnologia.

Aspergillus são fungos com grande impacto tanto a nível económico como social e encontram-se distribuídos pelo mundo (R. A. Samson et al., 2014). *Aspergillus* é considerado um género muito importante na indústria alimentar e farmacêutica, nomeadamente na produção de enzimas e ácido cítrico (J. W. Bennett, 2010). A sua extrema relevância está relacionada com a patogenicidade, as micotoxinas produzidas, a

exploração biotecnológica e o facto de ser um organismo eucariota (Samson, Hong & Frisvad, 2006).

As espécies mais exploradas pela indústria farmacêutica são *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus terreus* (Berg et al., 2012; Meyer, Wu & Ram, 2011).

A espécie mais comum é *Aspergillus niger*, que apesar de ser um fungo que provoca infeções oportunistas no humano, tem o estatuto de ser geralmente reconhecido como seguro (GRAS) pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América (Abarca, Accensi, Cano & Cabañes, 2004; Baker, 2006; Samson et al., 2006).

Nesta monografia serão descritos os compostos obtidos utilizando *Aspergillus niger* e as respetivas aplicações desses compostos na indústria farmacêutica e também outras utilizações de *Aspergillus niger* durante o processo industrial. Assim, com esta monografia pretende-se demonstrar a evolução da utilização de *Aspergillus niger* ao nível da sua utilização na indústria farmacêutica.

O fungo *Aspergillus niger* tem sido estudado durante várias décadas, sendo o mais utilizado na biotecnologia. Em 1917, verificou-se que este fungo produzia ácido cítrico, passando a ser um dos ácidos mais utilizado na indústria (Baker, 2006; Schuster, Dunn-Coleman, Frisvad & Van Dijck, 2002). *Aspergillus niger* também produz outros ácidos orgânicos, sendo que estes continuam a ser produzidos por processos microbiológicos (Schuster et al., 2002).

Para além dos ácidos, *Aspergillus niger* também é fonte de produção de enzimas que são usadas na indústria, sendo que cada enzima produzida tem de ser considerada como segura antes de ser utilizada, possuindo o estatuto de GRAS (Abarca et al., 2004; Schuster et al., 2002).

Atualmente foram descobertos novos produtos derivados da utilização de *Aspergillus niger* com utilidade para a indústria farmacêutica, recorrendo a biotransformação. A biotransformação de compostos é um procedimento usado para a descoberta e investigação de novos fármacos, utilizando habitualmente fármacos que possuem determinados efeitos adversos prejudiciais para o humano e que requerem melhorias (Pollard & Woodley, 2007). *Aspergillus niger* é um dos organismos que auxilia na biotransformação, pois efetua modificações químicas nos compostos (Huttel & Hoffmeister, 2010).

O fungo *Aspergillus niger* também é utilizado em procedimentos laboratoriais de controlo de qualidade de produtos ou de esterilidade de processos, que são efetuados na indústria.

Todos os usos de *Aspergillus niger* vantajosos para a indústria farmacêutica serão abordados, mas sempre com a garantia de que os mesmos são seguros para o posterior uso nos humanos, sem que cause infecções aos mesmos. Assim é necessário garantir a segurança de todos os compostos produzidos, dos métodos efetuados e das estirpes do fungo utilizadas.

Capítulo 2 - Género *Aspergillus*

Aspergillus é um género muito vasto, com mais que 339 espécies, sendo um fungo filamentoso aeróbico, cosmopolita e ubiqüitário (Prakash & Jha, 2014; Samson et al., 2014; Schuster et al., 2002).

O género *Aspergillus* é o agente etiológico da infeção oportunista, denominada Aspergilose, que foi descrita pela primeira vez em Edimburgo, por J. H. Bennett, (1842). Aproximadamente vinte espécies foram identificadas como agentes de infeção nos humanos, sendo que as principais são *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus*, mas a infeção ocorre principalmente em indivíduos imunodeprimido (Prakash & Jha, 2014). Para além de infeções, este fungo pode causar reações alérgicas ou micotoxicoses (Prakash & Jha, 2014).

Em 1729, Pier Antonio Micheli introduziu pela primeira vez o nome do género *Aspergillus*, efetuou a identificação de conídios no fungo, com esporos que derivavam da estrutura central (Prakash & Jha, 2014; R. A. Samson et al., 2014). Esta identificação foi validada por Haller em 1768 (R. A. Samson et al., 2014). Uma grande variedade de monografias foram publicadas sobre este género desde a sua identificação, Thom & Raper em 1945 publicaram e aceitaram 89 espécies e Raper & Fennel em 1965, aceitaram mais 150 espécies (R. A. Samson et al., 2014). No ano de 1965, Raper & Fennel efetuaram a divisão do género *Aspergillus* em 18 grupos, baseando-se na cor observada nos esporos do conídio (Houbraken, Vries & Samson, 2014; Schuster et al., 2002). Foi definido que espécies que apresentassem o esporo com cor castanha/preta faziam parte do grupo *Aspergillus niger* (Schuster et al., 2002). Gams em 1985 procedeu a uma organização do género, introduzindo um subgénero e secções (R. A. Samson et al., 2014). Atualmente foi realizada uma remodelação, identificada na tabela 1, sendo que o género *Aspergillus* encontra-se dividido em quatro subgéneros, *Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* e *Nidulantes* e vinte secções (Houbraken et al., 2014; Hubka, Nováková, Kolařík, Jurjević & Peterson, 2014; Samson et al., 2014).

A nova taxonomia deste género, revela-se uma consequência da evolução tecnológica, foram utilizadas as sequências do ADN e as características fenotípicas das diversas espécies (Robert A. Samson et al., 2006).

Tabela 1 - Classificação dos subgêneros e secções do género *Aspergillus*. Adaptado de (Houbraken et al., 2014; Hubka et al., 2014).

SUBGÉNERO	SECÇÃO
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i> (Eurotium) <i>Restricti</i> (Eurotium)
<i>Circumdati</i>	<i>Candidi</i> <i>Circumdati</i> (Neopetromyces) <i>Flavi</i> (Petromyces) <i>Flavipedes</i> (Fennellia) <i>Nigri</i> <i>Terrei</i> <i>Jani</i>
<i>Fumigati</i>	<i>Cervini</i> <i>Clavati</i> (Neocarpenteles, Dichotomomyces) <i>Fumigati</i> (Neosartorya)
<i>Nidulantes</i>	<i>Aeni</i> (Emericella) <i>Bispori Cremeia</i> (Chaetosartorya) <i>Nidulantes</i> (Emericella) <i>Ochraceorosei</i> <i>Silvati</i> <i>Sparsi</i> <i>Usti</i> (Emericella)

Para a classificação de género, é necessário basear-se na morfologia da espécie observada ao microscópio. No caso mais específico de *Aspergillus*, tem de se analisar o tamanho e disposição dos conidióforos, a cor do esporo do conídio, a taxa de crescimento no meio de cultura e características fisiológicas (Houbraken et al., 2014; R. A. Samson et al., 2014). Em *Aspergillus* os conidióforos são produzidos por hifas vegetativas, das células do pé, são asseptados e não ramificados e terminam na vesícula. A vesícula é uma formação típica deste género, sendo esférica ou elíptica. Cobrindo a vesícula na totalidade ou apenas só na superfície superior, estão as fiálides sendo unisseriadas e estão em contacto direto com a vesícula ou então são bisseriadas e utilizam as células de suporte, métulas para efetuarem a ligação da vesícula às fiálides. As fiálides são células conidiogénicas, que produzem conídios, esporos com diâmetro de 2-5 µm. Estes são assexuais, sendo habitualmente células haploides, que formam uma cadeia radial (Prakash & Jha, 2014; Yu, 2010). Cleistocécios são uma estrutura globosa produzida durante a

reprodução sexuada da espécie, onde se apresentam os ascos. Os ascos são esféricos e contêm oito ascósporos. (Prakash & Jha, 2014; R. A. Samson et al., 2014)

Espécies que pertencem à secção *Nigri*, possuem conídios com coloração castanha escura a preto, a vesícula é esférica, contém fiáldes unisseriadas ou bisseriadas e hifas com pouca coloração (Simões, Santos & Lima, 2013).

Para além da observação microscópica, é importante uma identificação das espécies *Aspergillus*. Em meio de agar, é necessário analisar a cor da colónia, a taxa de crescimento e a tolerância à temperatura, sendo que usualmente é usado o meio Czapek-Dox, que contém nutrientes específicos, como a sacarose e o nitrato que permitem o crescimento deste género (Prakash & Jha, 2014). Na tabela 2 pode observar-se a coloração das colónias do género *Aspergillus* e a respetiva identificação das espécies.

Tabela 2 - Cor das colónias em espécies do género *Aspergillus*. Adaptado de (Prakash & Jha, 2014).

ESPÉCIE	SUPERFÍCIE	REVERSO
<i>A. clavatus</i>	Azul - Verde	Branco e passando a acastanhado
<i>A. flavus</i>	Amarelo – Verde	Dourado até vermelho-vinho
<i>A. fumigatus</i>	Azul – Verde até cinzento	Branco até cor-de-pele
<i>A. glaucus group</i>	Verde com áreas amarelas	Amarelo até castanho
<i>A. nidulans</i>	Verde até amarelo	Roxo até verde acastanhado
<i>A. niger</i>	Preto	Branco até amarelo
<i>A. terreus</i>	Castanho claro até escuro	Branco até castanho
<i>A. versicolor</i>	Branco no início, passa para amarelo, cor de pele, verde ou rosa pálido	Branco até amarelo ou roxo

A. = *Aspergillus*

2.1 - *Aspergillus niger*

Tieghem (1867) identificou e descreveu pela primeira vez a espécie *Aspergillus niger*, ficando com o nome científico, *Aspergillus niger* van Tieghem. Atualmente e devido a reformulação do género são considerados sinónimos desta espécie *Aspergillopsis intermedia*, *Aspergillopsis nigra*, *A. aeamori*, *A. cinnamomeus*, *A. fuscus*, *A. nanus*, *A. phoenicis*, *A. schiemaninae*, *Rhopalocystis nigra*, *Sterigmatocystis nigra*, *Sterigmatocystis phoenicis* (Species Fungorum, 2014). O nome *Aspergillus niger* conservou-se, devido à sua importância tanto a nível económico como informativo (Schuster et al., 2002).

Segundo a classificação taxonómica, este fungo pertence ao reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, classe *Eurotiomycetes*, ordem *Eurotiales*, família *Richocomaceae*, género *Aspergillus*, subgénero *Circumdati*, secção *Nigri* (Species Fungorum, 2014). Atualmente encontram-se presentes vinte e cinco espécies nesta secção, da qual faz parte *Aspergillus niger* (R. A. Samson et al., 2014).

O fungo *Aspergillus niger* é capaz de se propagar de forma eficaz em diferentes ambientes, pois a sua localização não se limita a uma zona do globo, sendo um dos fungos mais comuns do género (Meijer, Houbraken, Dalhuijsen, Samson & Vries, 2011). Esta espécie consegue crescer em locais secos e quentes, pois a temperatura ótima de crescimento é 35-37°C. Consegue ainda multiplicar-se dentro de uma gama de temperaturas entre os 6°C e os 47°C. O pH ótimo de crescimento é 6, mas pode encontrar-se entre valores de pH compreendidos entre 1.5 e 9.8 (Krijgsheld et al., 2013; Schuster et al., 2002). A atividade ótima da água é de 0.97 e a percentagem de humidade relativa ótima para que se observe o crescimento desta espécie está compreendida entre os 96 – 98 (Krijgsheld et al., 2013).

Mundialmente, *Aspergillus niger* pode ser um contaminante da comida e provoca infeções em colheita (Leeuwen et al., 2013). Este fungo é considerado geralmente não patogénico, pois os humanos entram em contacto com esporos de *Aspergillus niger* todos os dias, sem que se verifique sinais da doença (Schuster et al., 2002). Apenas em determinados casos, nomeadamente doentes com histórico de doenças graves ou a efetuar tratamentos com imunossuppressores, se observa a colonização de *Aspergillus niger* no humano (Schuster et al., 2002). *Aspergillus niger* é considerado o agente causador secundário, de otites bacterianas (Martins, Melo & Heins-Vaccari, 2004).

Existem características específicas que permitem identificar com clareza as espécies. A espécie *Aspergillus niger* é facilmente identificável, pois quando observado ao microscópio (Figura 1) visualizam-se as vesículas castanho-escuras a pretas, globulosas e radiadas e com fiálides bisseriadas, isto é, métulas e fiálides. Uma das características que o permite distinguir com clareza é que possui conídios castanho ou pretos, sendo globosos com um tamanho de 3.5-5 µm e rugosos. (Ellis, Davis, Alexiou, Handke & Bartley, 2007; Martins et al., 2004; Prakash & Jha, 2014)

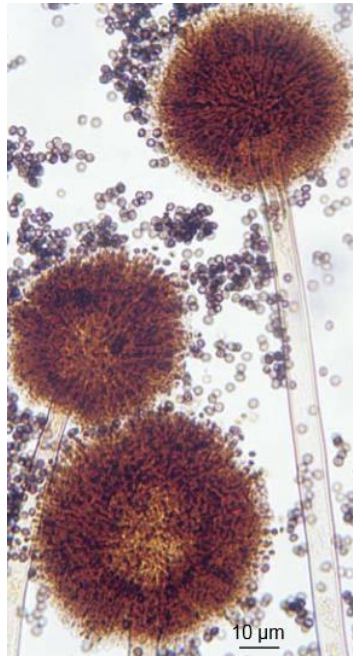


Figura 1- Observação microscópica de *Aspergillus niger* (Ellis, Davis, Alexiou, Handke & Bartley, 2007).

Como referido anteriormente, o meio Czapek Dox é utilizado para a identificação de espécies dentro deste género. Neste meio, a espécie cresce atingindo um diâmetro de 2,5 a 3 cm, num período de 10 a 15 dias. Apresenta-se com um aspeto camurça, com uma densa camada de conídios com coloração preta, no reverso do meio observa-se colónias no início com cor branca ou amarela compactadas e posteriormente negras (Figura 2 e 3) (Ellis et al., 2007; Martins et al., 2004; Prakash & Jha, 2014; Raper & Fennell, 1965).



Figura 2 - *Aspergillus niger* inoculado em meio Sabouraud com cloranfenicol.

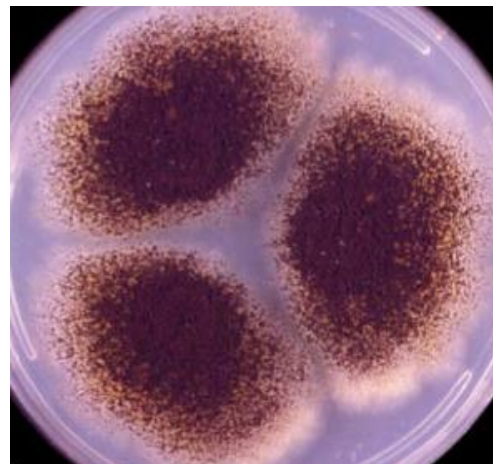


Figura 3 - *Aspergillus niger* inoculado em meio Czapek Dox (Ellis et al., 2007).

A reprodução feita por *Aspergillus niger* é assexuada, sendo similar à maioria das espécies deste género e na qual se formam os conidióforos (Pel et al., 2007).

Nesta espécie, é conhecida a sequenciação do genoma em três estirpes, *Aspergillus niger* ATCC 1015 (NRRL 328, CBS 113.46), que é uma estirpe selvagem, sendo que foi utilizado para a primeira patente de produção de ácido cítrico em 2005 (Baker, 2006; Ferracin et al., 2012). A outra estirpe selvagem é a NRRL 3 (ATCC 9029, CBS 120.49, N400), sendo utilizada para a produção de elevadas quantidades de ácido glucónico e a terceira estirpe sequenciada deriva da NRRL 3122 (ATCC 22343, CBS 115989), denominando-se de CBS 513.88, sendo uma estirpe mutada e utilizada para a produção de enzimas (Andersen et al., 2011; Baker, 2006; Berg et al., 2012; Ferracin et al., 2012). A estirpe NRRL 3122, é utilizada para a produção de glucoamilase A (Andersen et al., 2011).

No que diz respeito ao genoma desta espécie, na sequenciação e comparação do genoma observa-se que existe uma grande semelhança com genomas do género, existindo assim uma elevada conservação (Pel et al., 2007).

2.1.1 - Vantagens da sua utilização

Os fungos filamentosos, como o caso de *Aspergillus*, são muito utilizados na indústria como hospedeiros, pois são seres que possuem características úteis e vantajosas para a produção de uma diversidade de produtos e também conseguem promover a biotransformação de compostos (Meyer et al., 2011; Meyer, 2008).

As vantagens do uso desta espécie devem-se à sua fácil manipulação, capacidade de fermentação de várias matérias-primas de baixo custo e permite a produção de elevadas quantidades de produto (Costa, 2011; Murphy & Horgan, 2005).

Como já referido, *Aspergillus niger* mantém o estatuto de GRAS, condicionando de forma positiva o seu grande contributo e o seu uso na indústria, pois é considerado não patogénico e não tóxico (Abarca et al., 2004; J. W. Bennett, 2010; Robert A. Samson et al., 2006; Schuster et al., 2002). Este estatuto é uma grande vantagem para o uso desta espécie em processos industriais.

O fungo *Aspergillus niger* consegue crescer em diversos locais, que apresentam uma variedade de nutrientes, o que mostra que esta espécie apresenta uma grande versatilidade metabólica e flexibilidade nutricional (Driouch, 2011; Meyer et al., 2011; Meyer, 2008; Pel et al., 2007).

De acordo com Pel e colaboradores (2007) observa-se em *Aspergillus niger* a existência de um número elevado de proteínas únicas, que se encontram envolvidas em certos mecanismo, o que não ocorre noutros fungos filamentosos, demonstrando que esta espécie é bastante versátil ao nível de produção celular. As proteínas em questão encontram-se envolvidas na biossíntese de compostos orgânicos, como hidratos de carbono, lípidos, ácidos gordos, metabolismo de terpenos e metabolismo secundário. É importante referir, que esta espécie consegue ser muito eficiente na secreção de proteínas (Pel et al., 2007). A sua grande capacidade de sintetizar, glicosidar e secretar compostos é uma das razões para a utilização deste fungo como hospedeiro (J. W. Bennett, 2010; Gheshlaghi, Scharer, Moo-Young & Douglas, 2007). As enzimas extracelulares presentes neste fungo podem ainda ser usadas para a produção de outras enzimas (J. W. Bennett, 2010).

Aspergillus niger efetua a secreção de enzimas da hifa para atuar no meio nutritivo, sendo que este pode também ser utilizado como fonte de enzimas para além do próprio fungo (Ortergaard & Olsen, 2010).

Para a produção de compostos é benéfico o uso de fungos filamentosos, como o caso de *Aspergillus niger*, pois é um fungo capaz de utilizar como fonte de carbono uma grande variedade de produtos, efetua uma elevada conversão de substrato em ácido, é tolerante a altas concentrações de glucose, é pouco sensível a iões metálicos e ao ser um fungo unicelular permite um melhor controlo do processo de produção (Goldberg, Rokem & Pines, 2006). Para além das vantagens enunciadas, a capacidade de *Aspergillus niger* crescer em valores de pH baixo e tolerar um pH de 1.5, é considerada uma vantagem ecológica para o seu uso (Kubicek, Punt & Visser, 2010).

A morfogénese de *Aspergillus niger* em cultura cultivado vai condicionar o produto que se pretende obter. Assim é necessário analisar as propriedades do produto, deve-se efetuar ajustes no pH e na concentração dos nutrientes sendo que estes fatores estão dependentes do tipo de composto que se pretende produzir. (Demain, Velasco & Adrio, 2005; Krull et al., 2010)

Atualmente, utiliza-se a técnica de ADN recombinante, para efetuar modificações diretas nos microrganismos, o que vai permitir bloquear a via de um produto secundário, pela eliminação ou aumento dos níveis de enzima. Desta forma consegue-se a produção da enzima em elevadas quantidades, mas é necessário saber o local e o nível de modificações na enzima. (Gheshlaghi et al., 2007)

Capítulo 3 - Compostos Farmacêuticos produzidos por *Aspergillus niger*

Uma grande variedade de compostos são produzidos a partir de fungos, como enzimas, ácidos orgânicos, vitaminas, antibióticos, ácidos gordos, álcoois, aminoácidos, proteínas, hormonas e medicamentos (Murphy & Horgan, 2005). Para além disso, é previsível que no século 21, irão surgir mais utilizações dos fungos, aumentando assim o seu impacto na sociedade e na economia.

Os fungos filamentosos, como *Aspergillus niger*, são dependentes da matéria orgânica de outros organismos para sobreviverem, pois convertem esta matéria em nutrientes essenciais para o seu crescimento, sendo então caracterizados como fungos saprófitas (Murphy & Horgan, 2005). Assim, em determinadas condições é possível que o fungo produza uma elevada quantidade de determinados metabolitos, tanto primários como secundários, dependendo do composto que se pretende.

Os metabolitos primários são aqueles que são essenciais para o crescimento do fungo, sendo produzidos durante a sua fase de desenvolvimento, temos como exemplo, enzimas, gorduras, álcoois e ácidos orgânicos (Murphy & Horgan, 2005). Mas estes podem sofrer de seguida, uma segunda metabolização durante a fase estacionária, formando metabolitos secundários, em que alguns exemplos, são antibióticos (Murphy & Horgan, 2005).

O fungo *Aspergillus niger* utilizado como hospedeiro permite a produção de uma grande diversidade de produtos com utilização em diferentes indústrias, apresentando um impacto a nível industrial e biomédico muito positivo (Prakash & Jha, 2014). Os principais compostos gerados por este fungo encontram-se apresentados na tabela 3, com a respetiva utilização mais comum. Alguns destes produtos são utilizados na indústria farmacêutica; o seu método de produção e a respetiva utilidade nesta indústria, serão desenvolvidos nesta monografia.

Tabela 3 - Principais compostos produzidos por *Aspergillus niger* e a sua utilização mais comum (Demain et al., 2005; Kubicek et al., 2010; Schuster et al., 2002; Smith, Birchall & Coulman, 2011).

CLASSE	COMPOSTOS	APLICAÇÃO
Enzimas	Amilase	Conversão do amido
	Glucose oxidase	Análise da glucose no sangue
	Glucoamilase	Indústria alimentar
	Lipase	Detergentes

	Celulase	Indústria do papel
	Hemicelulase	
	Catalase	Indústria alimentar e têxtil
	Protease	Alimentos fermentados
Ácidos Orgânicos	Ácido Cítrico	Acidificante e agente de sabor na indústria alimentar e em bebidas
	Ácido Glucônico	Aditivo na alimentação
	Ácido Itacônico	Detergentes
	Ácido Fumárico	Aditivo na alimentação
	Ácido Málico	Aditivo na alimentação

3.1 - Ácidos Orgânicos

O fungo *Aspergillus niger* sendo um produtor celular, durante o crescimento aeróbico tem a capacidade de excreção de ácidos orgânicos (J. W. Bennett, 2010; Demain et al., 2005).

3.1.1 - Ácido Cítrico

Currie (1917) produziu ácido cítrico utilizando algumas estirpes de *Aspergillus niger*, e descreveu que a excreção do ácido foi conseguida com um meio com pH 2.5 – 3.5 e contendo açúcares e sais. No artigo o autor refere que a primeira referência de que, seria possível a produção de ácido cítrico utilizando um fungo foi feita por Zahorsky em 1913, utilizando o fungo *Sterigmatocystis nigra*. Sabe-se atualmente que este fungo corresponde a um sinónimo de *Aspergillus niger*. Em 1919, na Bélgica, efetuou-se o primeiro processo industrial de produção de ácido cítrico a partir de *Aspergillus niger* (Max et al., 2010).

Muitos microrganismos podem ser utilizados para a produção de ácido cítrico, mas para a produção a nível industrial a ser *Aspergillus niger* continua a ser o mais utilizado (Papagianni, 2007).

A produção em 2011 de ácido cítrico ultrapassou as 1,8 milhões de toneladas e verifica-se que por ano existe um aumento de cerca de 4% da produção de ácido cítrico a nível mundial (Nadeem, Ahmed, Abdul Mutalib, Tufail & Khan, 2014; Soccol, Vandenberghe & Rodrigues, 2006).

A capacidade de produção em excesso de determinados compostos tem sido conseguida utilizando estirpes específicas de *Aspergillus niger* que foram mutadas e selecionadas para a produção do composto necessário (Papagianni, 2007; Soccol et al., 2006). A estirpe

ATCC 11414 deriva da estirpe ATCC 1015 de *Aspergillus niger* e são ambas utilizadas para a produção a nível industrial de ácido cítrico, sendo que a ATCC 11414 possui as características de produção deste ácido melhoradas (Baker, 2006).

A produção de ácido cítrico é realizada através do catabolismo glicosídeo de glicose ou frutose, devido a uma anomalia presente no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), também denominado de ciclo de Krebs. De forma resumida, as reações metabólicas de produção do ácido cítrico (Figura 4) consistem, inicialmente na absorção do substrato de açúcar, originando o composto que sofre catabolismo glicosídeo, e forma piruvato. De seguida, dá-se a conversão em oxaloacetato e acetil-CoA e a sua condensação. Por fim ocorre a excreção do ácido cítrico formado. (Kubicek et al., 2010)

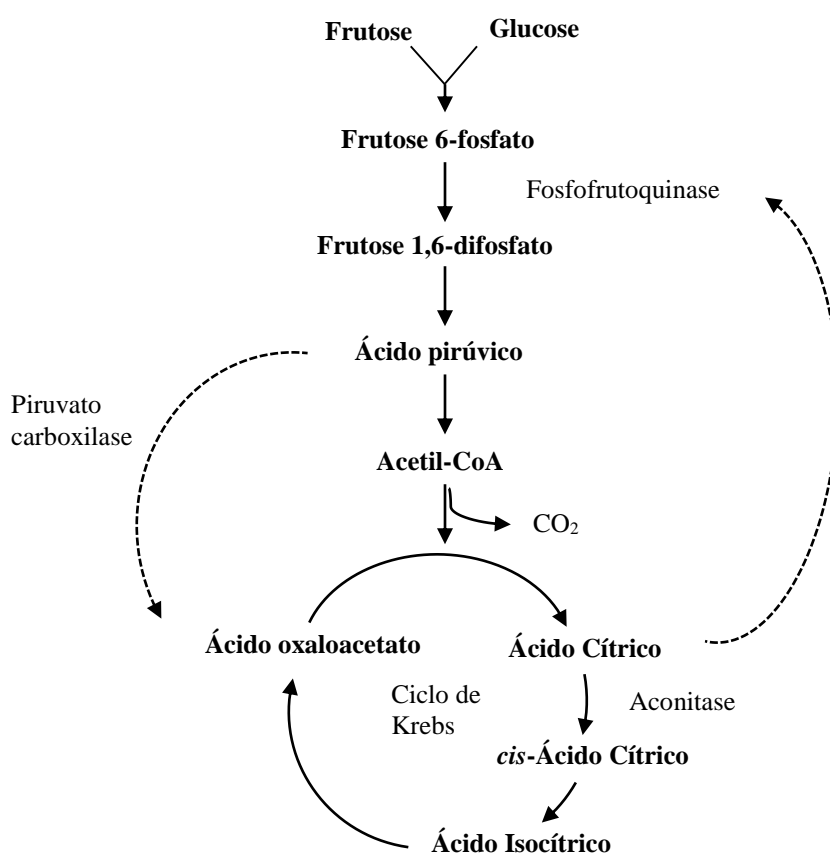


Figura 4 - Representação da reação metabólica da produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. Adaptado de (Kubicek et al., 2010; Max et al., 2010).

Nos dias de hoje sabe-se que a fermentação de ácido cítrico mais eficiente é conseguida quando uma série de condições são cumpridas, sendo estas apresentadas na tabela 4 (Kubicek et al., 2010). Para que exista uma produtividade elevada, deverão existir determinados nutrientes em determinadas quantidades, como o carbono, azoto, fósforo, oligoelementos e oxigénio (Kubicek et al., 2010; Murphy & Horgan, 2005). Para além

deste, os níveis de manganês devem ser baixos, para permitir que exista uma elevada produção de ácido cítrico (Baker & Bennett, 2007).

A temperatura e o pH da cultura são parâmetros que influenciam o processo da fermentação, deste modo é necessário que estejam dentro dos intervalos previamente otimizados (Demain et al., 2005; Murphy & Horgan, 2005).

Tabela 4 - Condições para a produção de ácido cítrico com *Aspergillus niger*. Adaptado de (Kubicek et al., 2010).

PARÂMETROS	COMPONENTES	INTERVALO
Hidratos de Carbono	Glucose e Sacarose Melaço	140 – 220 g/L -
Azoto	Sais de amónio	Equivalente a 0.4-0.6 g/L de Azoto
Fósforo	Fósforo de potássio	Equivalente a 0.4-1.0 g/L Fósforo
Oligoelementos	Mg ²⁺ Fe ²⁺ Zn ²⁺ Mn ²⁺	20-100 mg/L 1.3-1.5 mg/L 0.3-0.5 mg/L < 1 µg/L
Oxigénio	Ar ou oxigénio puro	> 100 mbar pressão de O ₂ parcial
pH	-	< 2
Temperatura	-	28-32 °C

Os processos para a produção do ácido cítrico utilizando *Aspergillus niger*, como hospedeiro são três, 1) fermentação em superfície (FS), 2) fermentação submersa (FSm) e 3) fermentação em estado sólido (FES). Estes processos permitem a produção industrial do ácido. (Kubicek et al., 2010; Murphy & Horgan, 2005)

1) Fermentação em Superfície

Relativamente à FS, este corresponde a uma técnica de produção de ácido cítrico realizada à superfície utilizando um substrato líquido, sendo que foi o primeiro procedimento no qual se efetuou a produção em grandes quantidades de ácido cítrico utilizando microrganismos (Murphy & Horgan, 2005). Este método necessita de bastante trabalho na sua execução, mas é menos sensível ao manganês, o que permite que esta técnica continue a ser utilizada nos dias de hoje (Kubicek et al., 2010).

O processo é realizado em câmaras de fermentação quase assépticas, que contêm vários tabuleiros planos e estáveis de aço inoxidável ou de alumínio (Swain, Ray & Patra, 2012).

O meio de cultura poderá conter melão como a fonte de hidratos de carbono que possui 15-20% de açúcares. O pH é ajustado a 6.0 – 6.5, devido ao ácido adicionado e também são adicionados outros compostos. (Berovic & Legisa, 2007)

Nesses tabuleiros é colocado o meio com os nutrientes necessários e por cima do líquido são adicionados os conídios do fungo. A câmara de fermentação contém um sistema de circulação de ar estéril, para o fornecimento de oxigénio e para que se mantenha a temperatura nos 28-30°C. (Kubicek et al., 2010)

Durante a fermentação é necessário manter o pH 2, se o pH 3 for atingido poderá ocorrer a formação de ácido glucónico e de ácido oxálico, a fermentação demora entre 8 a 12 dias, formando-se um tapete de micélio na superfície do tabuleiro (Murphy & Horgan, 2005).

Na parte final do processo, para a obtenção do ácido, é necessário retirar o micélio do tabuleiro e deve ser cuidadosamente lavado com água em ebulição e em determinados casos, pressionado para permitir que se obtenha uma maior quantidade de ácido cítrico (Berovic & Legisa, 2007; Max et al., 2010).

2) Fermentação Submersa

A FSm é o procedimento atualmente mais utilizado na indústria, pois permite uma produção de ácido cítrico em maior quantidade que qualquer outra técnica.

Para além disso, também necessita de uma reduzida área de trabalho e de menos procedimentos técnicos para a obtenção do composto. Possui um rendimento mais elevado e menor contaminação. (Kubicek et al., 2010; Murphy & Horgan, 2005)

As desvantagens desta fermentação refletem-se no facto de ser um processo que necessita de pessoal especificamente treinado para o executar e possui elevados custos de energia (Berovic & Legisa, 2007).

Esta fermentação ocorre em biorreatores de aço inoxidável, podendo ser utilizado um biorreator com ar comprimido, em que a ventilação de ar estéril se encontra na sua base ou em alternativa um biorreator com agitação. Ambos devem ser resistentes a ácidos, fator determinante devido ao facto do ácido cítrico ser corrosivo. (Kubicek et al., 2010; Max et al., 2010)

Na fermentação submersa, para uso industrial, a inoculação é realizada com suspensões de esporos ou usando um micélio pré-cultivado e a fonte de carbono tem de ser previamente diluída e esterilizada antes de ser adicionada ao biorreator (Murphy &

Horgan, 2005). A temperatura da fermentação deve rondar os 28-32 °C e dura entre 5 a 10 dias (Berovic & Legisa, 2007; Kubicek et al., 2010).

Para a recuperação do ácido cítrico, é necessária o aquecimento do micélio a 70°C e posteriormente é realizada a filtração (Berovic & Legisa, 2007).

3) Fermentação em estado sólido

O processo de FES, também denominado de fermentação em meio semi-sólido é vantajoso pois requer um uso baixo de energia e os substratos utilizados são relativamente baratos, como restos de frutas, farelo de cereais, entre outros (Kubicek et al., 2010).

A fonte de hidratos de carbono na FES tem de ser humedecida e esterilizada, posteriormente é colocada em tabuleiros e inoculada com conídios de *Aspergillus niger* (Murphy & Horgan, 2005). O substrato tem no início um pH de aproximadamente 5, sendo que quando termina a fermentação, após 5- 8 dias, tem um valor de pH 2.

A recuperação do ácido cítrico é realizada utilizando água quente, e se necessário poderá proceder-se à extração mecânica. (Berovic & Legisa, 2007)

Neste método de fermentação de ácido cítrico, *Aspergillus niger*, não é sensível aos oligoelementos presentes, como acontece nos outros processos de produção de ácido cítrico (Berovic & Legisa, 2007).

Após o procedimento correspondente a cada processo de fermentação do ácido cítrico, é necessário proceder à recuperação desse ácido, a qual pode ser realizada por três processos: precipitação, extração e adsorção (Soccol et al., 2006).

Existe uma grande variedade de utilizações do ácido cítrico, sendo utilizado principalmente na indústria alimentar, de bebidas, cosmética, farmacêutica e em detergentes (Demain et al., 2005; Schuster et al., 2002).

A elevada aplicação deste ácido orgânico, é devida às suas propriedades, como a sua capacidade de acidificação, sabor, a capacidade de quelação de iões metálicos, ao facto de não ser tóxico e por fim, à sua fácil assimilação (Kubicek et al., 2010).

As propriedades do ácido cítrico são uma grande vantagem para a sua utilização na indústria farmacêutica. É utilizado em soluções farmacêuticas orais, em xaropes e elixires, para melhorar o seu sabor, para manter a estabilidade dos princípios ativos e conseguir aumentar a atividade dos conservantes existentes no fármaco (Berovic & Legisa, 2007; Swain et al., 2012). Também é usado como antioxidante em preparações com vitaminas, com o intuito de as preservar e permite efetuar correção de pH em

cosméticos (Max et al., 2010). É utilizado como anticoagulante, na forma de citrato de sódio, permitindo a preservação do sangue após recolha e é usado para formar o citrato de potássio usado no tratamento de cistites (Smith et al., 2011). Em certos pós e comprimidos, contém também um efeito efervescente quando adicionado com bicarbonato de sódio (Swain et al., 2012). Em formulações adstringentes o ácido cítrico é adicionado, funcionando como acidificante (Soccol et al., 2006).

3.1.2 - Ácido Glucónico

Para além do ácido cítrico, este hospedeiro também é utilizado para a produção de ácido glucónico. O ácido glucónico é um ácido orgânico que forma, em soluções alcalinas, complexos com iões metálicos, solúveis em água com iões metálicos. Trata-se de um ácido não volátil, que apresenta baixa toxicidade e é pouco corrosivo (Shindia, El-Sherbeny, El-Esawy & Sheriff, 2006).

Para a formação de ácido glucónico, é necessário a existência de glucose ou de outra fonte de hidratos de carbono e de três enzimas, a glucose oxidase (GOX), lactonase e catalase (Kubicek et al., 2010; Ramachandran, Fontanille, Pandey & Larroche, 2006). De acordo com Witteveen, Veenhuis e Visser (1992) e em concordância com Mischak, Kubicek e Röhr (1985), em *Aspergillus niger*, estas enzimas estão localizadas na membrana da célula e a formação do ácido glucónico neste fungo corresponde a uma reação extracelular.

A reação de oxidação da glucose por *Aspergillus niger* ocorre em dois passos principais (Figura 5), inicialmente dá-se a oxidação da β -D-glucose pela enzima GOX para obtenção de D-glucono- δ -lactona desidratado, em que o cofactor FAD se converte em FADH₂ e pela ação da catalase transfere formalmente um átomo de hidrogénio para o oxigénio, formando o peróxido de hidrogénio. Posteriormente ocorre a hidrólise da lactona, do D-glucono- δ -lactona, em ácido glucónico, que pode ocorrer de duas formas ou por catálise pela lactonase ou pode ocorrer de forma espontânea. (Roehr, Kubicek & Komínek, 1996) Concluiu-se então, que a elevada expressão da glucose oxidase proporciona uma produção industrial do ácido glucónico (Kubicek et al., 2010).

Na utilização industrial, o ácido glucónico pode ser produzido através de vários métodos, sendo que o procedimento utilizando *Aspergillus niger* corresponde ao processo de fermentação (Shindia et al., 2006).

Mas, tão importante como o procedimento é também necessário identificar o composto que se pretende produzir. Para além do ácido glucónico, é possível a produção de

derivados do mesmo, como, o gluconato de ferro, de zinco, de cálcio, de sódio e D-glucono- δ -lactona, sendo que apresentam utilização na indústria farmacêutica o gluconato de ferro, de zinco e de cálcio (Ramachandran et al., 2006).

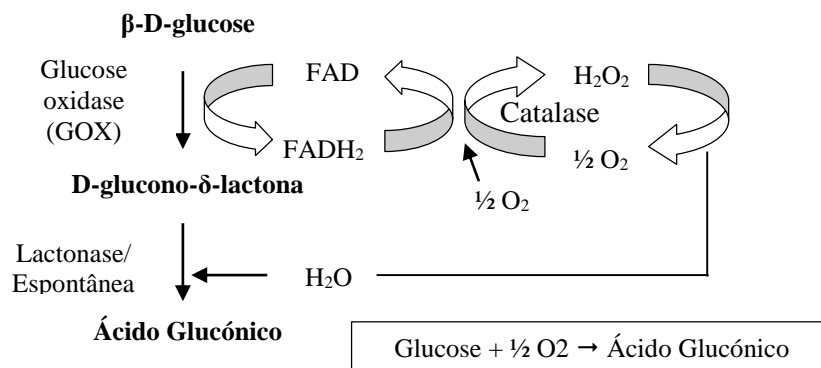


Figura 5 - Oxidação da glicose em *Aspergillus niger*. Adaptado de (Ramachandran et al., 2006).

Para que a fermentação seja realizada com sucesso e que se obtenha uma produção elevada de ácido glucônico ou dos derivados, é necessário que existam condições ótimas (Tabela 5) (Roehr et al., 1996).

Tabela 5 - Resumo das condições de fermentação para produção do ácido glucônico utilizando *Aspergillus niger* (Ramachandran et al., 2006; Roehr et al., 1996; A. Sharma, Vivekanand & Singh, 2008; O. V. Singh & Kumar, 2007; O. V. Singh & Singh, 2006).

PARÂMETROS	COMPONENTES	INTERVALO
Hidratos de Carbono	Glucose	110-250 g/L
Oligoelementos	Sulfato de magnésio Hidrogenofosfato de amônia Dihidrogenofosfato de potássio	Baixa concentração
Oxigênio	Ar ou oxigênio puro	4 bar 2 L/min
pH	-	4.5 – 6.5
Temperatura	-	30 °C

O pH do meio de fermentação deve apresentar-se num intervalo de 4.5 – 6.5, pois determinadas enzimas só se encontram ativas com pH neutro, como é o caso da GOX que é inativada a pH inferior a 3 (Roehr et al., 1996; O. V. Singh & Kumar, 2007). Para que o pH esteja entre os valores apresentados, é adicionado ao meio da fermentação um agente neutralizante, como o carbonato de cálcio ou o carbonato de sódio (O. V. Singh & Kumar,

2007). Num estudo realizado por Znad, Markoš e Baleš (2004), observou-se que o pH 5.5 corresponde ao pH ótimo para o crescimento de *Aspergillus niger*, sendo que foi obtido 150 g/L de ácido glucónico em 55h e 99% da glucose foi consumida.

Determinados elementos, como o sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), hidrogenofosfato de amónia ($(NH_4)_2 HPO_4$) e dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4), são nutrientes adicionados ao meio da fermentação, mas a sua concentração no meio deve ser baixa (Roehr et al., 1996; O. V. Singh & Singh, 2006).

Para que ocorra a oxidação da glucose, é essencial a presença de oxigénio, pois este substrato permite o funcionamento da enzima catalase (O. V. Singh & Kumar, 2007). A taxa de oxigenação na fermentação deve ser elevada, sendo conseguida com uma pressão até 4 bar e aplicada através da introdução de oxigénio puro ou na forma de ar atmosférico (Ramachandran et al., 2006). O estudo de Singh e Singh (2006), utilizando uva como fonte de hidratos de carbono, concluiu que a taxa de ar deve ter valores de 2.0 L/min.

Na produção de ácido glucónico, a glucose é uma das fontes de hidratos de carbono mais utilizadas e deve ser utilizada na concentração entre os 110-250 g/L (Ramachandran et al., 2006). O xarope de frutose/dextrose também pode ser utilizado ou outras fontes de hidratos de carbono mais económicas (O. V. Singh & Kumar, 2007). Alguns exemplos de fontes económicas são os figos, amido de milho hidrolisado, melação de cana, glucose e lactose desprotenizadas, concentrado de banana, concentrado da uva, solução de sacarose de resíduos de papel de escritório, melação de beterraba (Ikeda, Park & Okuda, 2006; Mukhopadhyay, Chatterjee, Chatterjee, Banerjee & Guha, 2005; Rao & Panda, 1994; Roukas & Harvey, 1988; Roukas, 2000; A. Sharma et al., 2008; O. V. Singh, Kapur & Singh, 2005; O. V. Singh & Singh, 2006; Vassilev, Vassileva & Spassova, 1993)

A enzima GOX que condiciona a produção do composto pode ser induzida utilizando microrganismos modificados (O. V. Singh & Kumar, 2007). Swart, Vondervoort, Witteveen, e Visser (1990) descreveram *Aspergillus niger*, com mutações que afetam a expressão da GOX. Efetuaram uma mutação do gene no *Aspergillus niger* que codifica a GOX (gox A), que resultou num aumento considerável da atividade da enzima, obtendo resultados semelhantes a Witteveen e colaboradores (1993). Para além disso, ambos os estudos concluem que uma produção elevada de gox A, é regulada pela fonte de carbono e de oxigénio presente no meio de fermentação.

As estirpes de *Aspergillus niger*, permitem a produção de sais e do ácido glucónico, como por exemplo no trabalho descrito por de Moksia, Larroche e Gros (1996), foram usadas

as estirpes NRRL 3, 567 e 599 e noutros estudos utilizou-se a estirpe mutada ORS-4-410 (O. V. Singh, Sharma & Singh, 2001a, 2001b; O. V. Singh & Singh, 2006).

A morfologia do fungo, também é um parâmetro a considerar. O estudo de Lu e colaboradores (2015) investigou a morfologia ótima do micélio de *Aspergillus niger*, em fermentação submersa e concluiu que o micélio disperso obtém um maior consumo de glucose e uma maior produção de ácido glucónico.

Como referido anteriormente, para a produção de ácido glucónico é necessário oxigénio para que as condições de fermentação sejam adequadas. Assim, os tipos de fermentação com fornecimento de oxigénio apropriado para a sua produção devem ser a fermentação submersa ou a fermentação em estado sólido (O. V. Singh & Kumar, 2007).

A FSm é um método vantajoso devido ao facto de ter a hipótese de ser alterada para uma operação contínua, mas requer um elevado gasto de energia, manutenção e necessita de adição agentes de neutralização (O. V. Singh & Kumar, 2007). Atualmente observa-se maior número de estudos utilizando a fermentação em estado sólido (Moksia et al., 1996; Ramachandran, Fontanille, Pandey & Larroche, 2007, 2008a, 2008b; Roukas, 2000; A. Sharma et al., 2008; O. V. Singh et al., 2001a).

Singh, Jain e Singh (2003) analisaram os diversos tipos de fermentação possível, com intuito de determinar qual o processo mais eficiente para a produção de ácido glucónico. Concluíram que a fermentação em estado sólido é a mais vantajosa para a produção de ácido glucónico utilizando *Aspergillus niger*, tendo obtido um rendimento de 94,7% utilizando glucose como fonte de hidratos de carbono.

Vários estudos analisaram a produção de ácido glucónico, utilizando a fermentação em estado sólido. Sharma e colaboradores (2008) utilizou cana de melaço na fermentação em estado sólido, e uma estirpe de *Aspergillus niger* mutada resistente a metal. Obtiveram uma produção de ácido glucónico de 76.3 g/L um rendimento de 85,2%, numa temperatura de 30°C e a taxa de ar foi de 2,5 L/min.

O processo de recuperação difere consoante o composto formado, e está dependente da fonte de carbono utilizada e do método de neutralização utilizado (Ramachandran et al., 2006).

O agente neutralizante é o hidróxido de cálcio ou carbonato de cálcio, e para a recuperação de gluconato de cálcio são adicionados ao meio nutritivo. Este deve ser aquecido e agitado vigorosamente, para se obter uma solução supersaturada de gluconato de cálcio. A seguir deve-se arrefecer a solução até aos 20°C e adicionar solventes solúveis e

consequentemente a solução sofre cristalização do composto. Normalmente é usado carvão ativo antes da cristalização para a remoção da cor. Por último, efetua-se a centrifugação do caldo, lava-se várias vezes e efetua-se a sua secagem a uma temperatura de 80°C. (Ramachandran et al., 2006)

Segundo Blom e colaboradores (1952), a recuperação do gluconato de sódio é efetuada através da filtração do caldo e é posteriormente concentrado até atingir uma concentração de 45% w/v e para que exista um pH final de 7.5 é adicionado hidróxido de sódio. Por fim, efetua-se o processo de secagem no tambor.

O ácido glucónico e os seus derivados, têm aplicações na indústria farmacêutica, em produtos higiénicos e na indústria alimentar, também é utilizado para a produção de cimento (Kubicek et al., 2010; Prakash & Jha, 2014).

Na indústria farmacêutica, são os sais formados a partir do ácido glucónico, que possuem interesse.

O derivado do ácido glucónico, o gluconato de cálcio é utilizado como suplemento na terapêutica do défice de cálcio, hipocalcémia e o gluconato de ferro, encontra-se indicado para anemias por défice de ferro (Infarmed, 2012; Ramachandran et al., 2006).

O gluconato de zinco é igualmente usado na indústria farmacêutica, sendo um dos constituintes dos fármacos para a cicatrização de feridas e para a terapêutica de constipações, também é utilizado em patologias cutâneas e letargia que são causados por carência de zinco (Ramachandran et al., 2006).

3.1.3 - Ácido Málico

O ácido málico é um ácido dicarboxílico, que contém dois isómeros, L e D, e apresenta boa solubilidade. O ácido L-málico é um isómero natural, encontrando-se em diversos frutos e é o composto intermédio obtido no TCA, produzido por microrganismos. (Goldberg et al., 2006; Roehr & Kubicek, 1996)

A formação de ácido málico é efetuada através da reação da glicólise e de uma parte do TCA, no citosol, como demonstrado na figura 6. As reações metabólicas no citosol para a produção do ácido málico, fazem parte da produção do ácido cítrico, sendo então o ácido málico um produto intermédio. (Brown et al., 2013; Goldberg et al., 2006).

O ácido málico é um ácido orgânico que apresenta segurança de comercialização, pois possui o estatuto de GRAS dado pela FDA (Goldberg et al., 2006).

A produção do ácido málico utilizando *Aspergillus niger* pode ser efetuada através de dois processos, pela biotransformação de substrato (descrito no capítulo 4) e pela fermentação (Roehr & Kubicek, 1996).

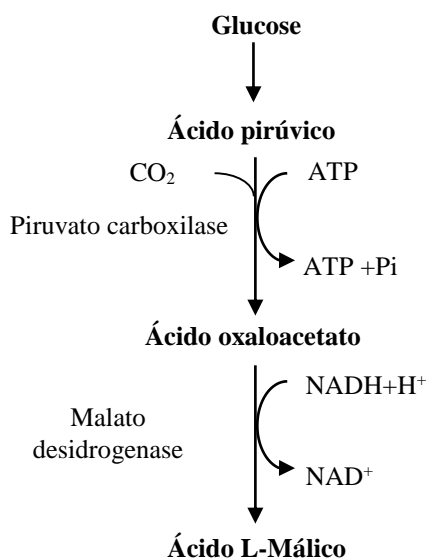


Figura 6 - Esquema das reações de produção do ácido málico. Adaptado de (Brown et al., 2013).

Atualmente existem poucos estudos sobre a produção de ácido málico através de fermentação. Mas como o ácido málico é um produto intermédio do ácido cítrico é necessário que as condições do meio de cultura sejam ótimas para a sua produção. Sabe-se que na fermentação para a produção de ácido L-málico, a fonte de azoto é um fator importante, devendo ser adicionada ao meio em baixas concentrações, pois após o seu consumo ocorre a secreção do ácido (Goldberg et al., 2006). Relativamente à fonte de hidratos de carbono utilizada, é verificado que é comum a utilização de glucose (Goldberg et al., 2006; West, 2011).

O carbonato de cálcio (CaCO_3) é um suplemento nutritivo importante para a adição ao meio de cultura, para se obter elevada produção de ácido málico (Goldberg et al., 2006). O meio de cultura para promover uma elevada produção de ácido málico para além dos compostos mencionados, deve também conter biotina e elevada concentração de iões de ferro (Goldberg et al., 2006).

Concluiu-se que a estirpe *Aspergillus niger* NRRL 599, adicionada a um meio com as condições indicadas, e utilizando glucose como fonte de hidratos de carbono, produziu 21,6 g/L de ácido málico após 160h (Goldberg et al., 2006).

O estudo realizado por West (2011) analisou a capacidade de espécies de *Aspergillus* para produzir ácido málico utilizando linhaça fina. As estirpes utilizadas de *Aspergillus niger* foram ATCC 9029, ATCC 9142 e ATCC 10577. A produção de ácido málico foi mais

elevada nas estirpes *Aspergillus niger* ATCC 9142 e ATCC 10577, com uma produção de cerca 0,8 g/g de ácido málico.

As aplicações deste ácido são vastas: é utilizado em infusões hospitalares, na formulação de tintas, na indústria alimentar, em bebidas, doces e comida, na indústria têxtil e na indústria farmacêutica (Goldberg et al., 2006). É bastante referida a sua utilização na indústria farmacêutica, e sabe-se que este ácido orgânico é um inibidor de fungos e bactérias, tendo capacidade antimicrobiana e é utilizado em determinadas soluções, como acidificante e aromatizante (Doores, 2005).

3.2 - Enzimas

A produção de enzimas em larga escala, essencialmente na indústria, é efetuada maioritariamente utilizando enzimas derivadas de microrganismos, pois corresponde a um procedimento mais rápido, com um controlo simples e com o mesmo processo consegue-se produzir diferentes enzimas, utilizando apenas diferentes microrganismos (Demain et al., 2005).

Determinadas enzimas apresentam grande importância terapêutica, sendo utilizadas em medicina e farmácia. Dado a sua relevância, são produzidas em inúmeros processos industriais. (Ortergaard & Olsen, 2010; Smith et al., 2011)

Segundo a *Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products* (AMFEP), atualmente encontram-se aproximadamente 243 enzimas em comercialização, das quais 18,5% são produzidas a partir do fungo *Aspergillus niger* (AMFEP, 2015). Este fungo, *Aspergillus niger* é utilizado para a produção de enzimas, porque contém o estatuto de GRAS, considerando-se segura a sua utilização industrial (Driouch, Roth, Dersch & Wittmann, 2010). Algumas dessas enzimas são a aminopeptidase, asparaginase, pectina, protease, glucoamilase, hemicelulose, catalase, glucose oxidase, amilase, lipase, alfa-galactosidase, beta-glucosidase, celulose, carboxipeptidase fosfolipase A2 e B, fitase, tanase, xilanase, peroxidase (AMFEP, 2015; Prakash & Jha, 2014).

3.2.1 - Glucose Oxidase

A glucose oxidase (GOX) (β -D-glucose:oxigénio-1-oxidoreductase, EC1.1.3.4) é uma flavoproteína que catalisa a oxidação de β -D-glucose em D-glucono- δ -lactona e peróxido de hidrogénio (Mirón, Vázquez, González & Murado, 2010). Esta enzima foi descoberta por Muller em 1928 em culturas de *Aspergillus niger* (Mirón, González, Pastrana & Murado, 2002).

Atualmente os organismos produtores da GOX são *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Penicillium chrysogenum*, contudo a sua produção é mais comum a partir de *Aspergillus niger* (AMFEP, 2015; Bankar, Bule, Singhal & Ananthanarayan, 2009a).

A GOX de *Aspergillus niger* foi atribuído o estatuto de GRAS, apresentando uma importância notável na indústria (Malherbe, Toit, Otero, Rensburg & Pretorius, 2003).

O mecanismo da reação da GOX (Figura 4) é dividido em dois passos, a reação de redução na qual GOX catalisa a oxidação de β -D-glucose em D-glucono- δ -lactona, que sofre hidrólise e origina o ácido glucónico, e a FAD presente na glucose oxidase, é reduzida a FADH₂ (Witt, Wohlfahrt, Schomburg, Hecht & Kalisz, 2000). O segundo passo, é a reação oxidativa, ocorrendo a re-oxidação da GOX através de uma molécula de oxigénio, produzindo peróxido de hidrogénio (H₂O₂) que pela ação da catalase origina água e oxigénio (Bankar et al., 2009a).

Esta enzima sendo essencial no mecanismo para a produção de ácido glucónico ou dos seus derivados, corresponde essencialmente a um subproduto dessa produção e é isolada do micélio de *Aspergillus niger* (Bankar et al., 2009a).

O fabrico a nível industrial da GOX é efetuado através do procedimento fermentativo e para que exista uma otimização da atividade da enzima foram estudados determinados parâmetros para atingir as condições ótimas (Tabela 6) e selecionadas estirpes mutantes de *Aspergillus niger* para uma superprodução da GOX.

Tabela 6 - Resumo das condições de fermentação para produção da glucose oxidase utilizando *Aspergillus niger* (Bankar et al., 2009a; Bankar, Bule, Singhal & Ananthanarayan, 2009b; Hatzinikolaou & Macris, 1995; Li & Chen, 1994; Rogalski, Fiedurek, Szczordrak, Kapusta & Leonowicz, 1988; Zetelaki, 1968).

PARÂMETROS	COMPONENTES	INTERVALO
Hidratos de Carbono	Glucose	± 8%
Azoto	Peptona	0.3 – 2%
CaCO₃	-	3.5 – 5%
Hidrocarbonetos	<i>n</i> -dodecano <i>n</i> -hexadecano Óleo de soja	-
Oxigénio	Ar ou oxigénio puro	-
pH	-	5.5 – 7
Temperatura	-	27.5 °C
Agitação	-	700 rpm

A manipulação genética de estirpes permitiu a mutação de *Aspergillus niger* para a produção de GOX, sendo que foi conseguido através do aumento das cópias do gene GOX. Algumas das estirpes *Aspergillus niger* mutadas para este efeito são a NRRL-3, a NRRL-3/2-2, a NRRL-3/3-1 e a NRRL-3/2-2A. (Kriechbaum et al., 1989; Sharif & Alaeddinoglu, 1992)

A fonte de hidratos de carbono utilizada na fermentação tem como intuito ser a origem de energia do processo, permitindo a criação do material celular (Stanbury, Whitaker & Hall, 1999). Uma grande variedade de fontes de carbono podem ser utilizadas, como frutose, galactose, glucose, lactose, sacarose, melação, maltose, xilose e amido. Hatzinikolaou e Macris (1995) analisaram as principais fontes de hidratos de carbono e concluíram que em *Aspergillus niger* a glucose, a sacarose e o melação são as fontes em que a GOX apresenta maior atividade. Num estudo semelhante ao anterior, realizado por Bankar, Bule, Singhal e Ananthanarayan (2009b) foram analisadas também diversas fontes de hidratos de carbono e os autores verificaram que a frutose, a glucose e a sacarose obtiveram melhores resultados na produção de GOX. Os resultados deste artigo estão em conformidade com o estudo de Hatzinikolaou e Macris (1995), que determinaram que a glucose, em estado puro ou no produto formado após a hidrólise da sacarose, é a fonte de hidratos de carbono principal para a indução do gene da GOX.

Para além da fonte ideal, a quantidade de hidratos de carbono também é um fator importante. Rogalski, Fiedurek, Szczordrak, Kapusta e Leonowicz (1988) investigaram o efeito da concentração de glucose na fermentação e concluíram que a glucose a 8% promove a maior atividade da GOX na estirpe mutada *Aspergillus niger* G-13.

O azoto presente na fermentação pode ser derivado de fontes orgânicas ou inorgânicas (Stanbury et al., 1999). O azoto inorgânico pode ser fornecido como nitratos, amónia em gás ou em forma de sal (Hutner, 1972). Com intuito de diminuição dos custos associados a fermentação industrial, têm sido utilizadas fontes nutritivas mais económicas, como por exemplo licor de milho, soro de queijo, peptona de corno do carneiro, entre outros (Bankar et al., 2009b; Canli & Kurbanoglu, 2011; Hatzinikolaou & Macris, 1995; Kona, Qureshi & Pai, 2001).

Kona, Qureshi e Pai (2001) utilizaram uma fonte de azoto económica, o licor de milho com a sacarose, que provocou um aumento da produção de GOX de 640 U/mL, enquanto o uso apenas da fonte de hidratos de carbono resultou na produção de 550 U/mL de GOX. Para investigar as fontes de azoto, Bankar e colaboradores (2009b) analisou peptona de protease, peptona de soja, peptona de carne, peptona de microrganismos, extrato de

levedura, extrato de carne bovina e licor de amido, como fontes orgânicas e como fontes de azoto inorgânico, o nitrato de amônio, nitrato de sódio e hidrogenofosfato de amônia. A produção de GOX foi mais elevada com a adição da peptona de protease e do nitrato de sódio, no meio de cultura da fermentação. Hatzinikolaou e Macris (1995) investigaram o efeito de diferentes fontes de azoto na produção da enzima e os resultados mostraram que a peptona é a melhor fonte a utilizar. A concentração recomendada é de 1 a 2% na utilização com a sacarose e no uso de melaço com a peptona, a quantidade deverá ser de 0.3 a 0.4%, para a produção máxima de GOX. Rogalski e colaboradores (1988) concluíram através do seu estudo, que com peptona a 3% no meio de fermentação com *Aspergillus niger* G-13 mutado, aumentou a produção de GOX.

A peptona do corno de carneiro foi estudada por Canli e Kurbanoglu (2011), que observaram que com *Aspergillus niger* OC-3 a peptona deverá ser utilizada no meio a 0.4% (4 g/L) para que se obtenha a melhor produção de GOX. É então possível concluir, de acordo com os estudos, que a peptona é a fonte de azoto que deve ser adicionada ao meio fermentativo.

O complemento do meio nutritivo com carbonato de cálcio (CaCO_3), que é um sal insolúvel, é também extremamente vantajoso, pois impede a ocorrência de alteração do pH e auxilia o crescimento do micélio, apresentando uma elevada atividade da GOX em concentração de 3,5% de CaCO_3 (Bankar et al., 2009b; Rogalski et al., 1988). Este suplemento tem sido estudado e comprovou-se o seu benefício. No entanto, as respectivas concentrações do CaCO_3 no meio é que divergem um pouco. Hatzinikolaou e Macris (1995) determinaram que a concentração ótima de CaCO_3 encontra-se entre o valor de 4 e 5%, para a sacarose e melaço, respetivamente. Para além do aumento da produção de GOX, a adição de carbonato de cálcio, provoca uma diminuição da síntese de 6-fosfofrutoquinase (6-PKF) e aumento de glucose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH), o que poderá indicar que adição de CaCO_3 conduz a um desvio da via glicósídea para a ocorrência direta da oxidação da glucose pela GOX (J.-Z. Liu, Huang, Liu, Weng & Ji, 2001).

Para além dos compostos referidos, a adição de hidrocarbonetos no meio, também aumenta as concentrações de GOX utilizando *Aspergillus niger* (Bankar et al., 2009a). A presença de 43% de *n-dodecano*, 110% de *n-hexadecano* e 31% de óleo de soja na fermentação, melhorou a atividade da GOX segundo Li e Chen (1994).

A agitação, a taxa de ar, o pH e a temperatura também são fatores a ter em consideração para a fermentação. O pH deve ser constante durante o período da fermentação e na

maioria dos estudos com *Aspergillus niger* o pH utilizado encontra-se entre 5.5 e 7 (Bankar et al., 2009a, 2009b; Canli & Kurbanoglu, 2011; Hatzinikolaou & Macris, 1995; Kona et al., 2001). A temperatura ótima para o crescimento do fungo *Aspergillus niger* e também para obter um elevado rendimento da GOX, observa-se aos 27,5°C (Bankar et al., 2009a). Para se alcançar uma produção de GOX alta e um crescimento rápido de *Aspergillus niger*, é importante que exista uma elevada agitação na fermentação, o que leva a um aumento da concentração de oxigénio (Zetelaki, 1968, 1970). O arejamento da fermentação pode ser realizado através de oxigénio puro ou pela introdução de ar (Bankar et al., 2009a). Zetelaki (1968) concluiu que a introdução de oxigénio puro na fermentação provoca um maior crescimento do micélio, cerca de 95 mg de micélio peso seco/100 mL/h. Também apuraram que em *Aspergillus niger* a agitação ideal durante a fermentação é de 700 rpm que conduz a 20-24% de atividade da GOX.

No final do processo fermentativo é necessário proceder à purificação da enzima. De acordo com Bankar e colaboradores (2009a) o procedimento consiste em efetuar inicialmente a rutura celular, e seguidamente a centrifugação ou filtração. A execução da precipitação é o processo seguinte, utilizando por exemplo sulfato de amónio e de seguida é efetuada uma cromatografia de troca iónica (Hatzinikolaou et al., 1996). Após a cromatografia, realiza-se uma liofilização que permite a obtenção do produto final. Para a realização da rutura celular, existem dois procedimentos ou por homogeneização ou através de ultrassom, sendo que Hatzinikolaou e Macris (1995) utilizaram uma combinação de ambos os processos.

As aplicações desta enzima são diversas como a redução da quantidade de álcool no vinho, na indústria têxtil, na indústria alimentar, nas bebidas e auxilia a produção de ácido glucónico (Wong, Wong & Chen, 2008). Para além das utilizações indicadas, a glucose oxidase é utilizada também nos produtos de higiene oral, como agente antimicrobiano sendo utilizado em pastas de dentífricas (Afseth & Rolla, 1983).

Outra aplicação farmacêutica corresponde ao uso da enzima nos aparelhos de controlo da glucose, utilizados em pessoas com diabetes de forma a controlar a doença. A GOX é uma das enzimas utilizadas nestes biossensores, e é necessário o uso de uma amostra de sangue do dedo. (Bankar et al., 2009a) Os biossensores de glucose são aparelhos muito importantes e bastante utilizados, devido à simplicidade do seu processo, à sensibilidade, ao seu uso direto podendo ser utilizado por qualquer pessoa sem formação técnica

(Devasenathipathy et al., 2015). Existem atualmente três gerações de biossensores, apresentados na figura 7.

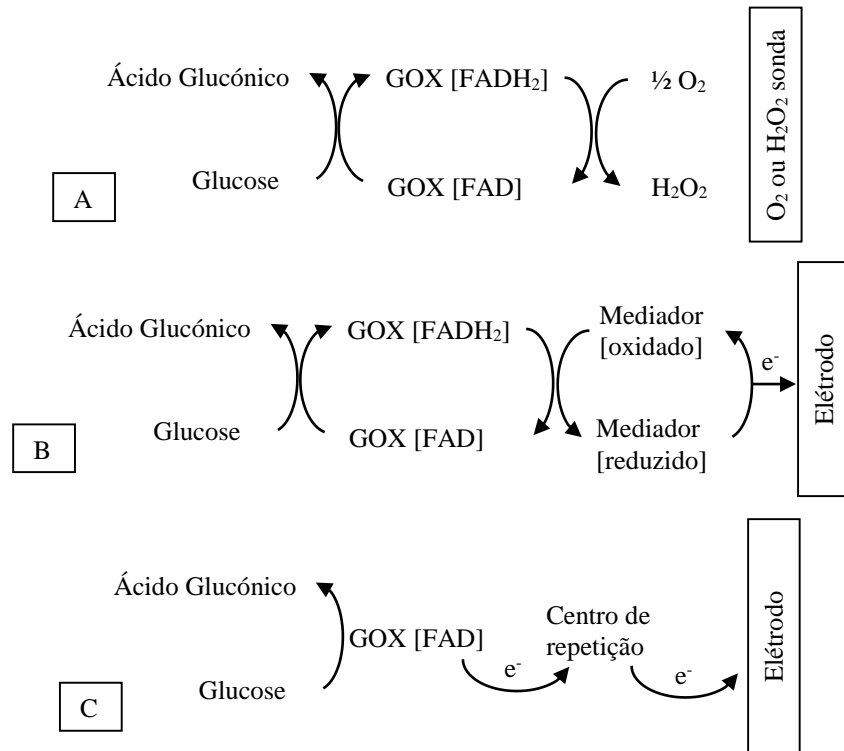


Figura 7 - Esquema do funcionamento dos biossensores de glicose de primeira geração (A), segunda geração (B) e terceira geração (C). Adaptado de (Wong et al., 2008).

Os biossensores da primeira geração (Figura 7A) medem a concentração de oxigênio usado ou deteta a concentração de peróxido de hidrogênio gerado, através de um eletrólito presente. Quando existe glicose no sangue dá-se uma reação de oxidação da GOX, formando um sinal na superfície do eletrólito que está relacionado com a quantidade de glicose presente no sangue. (J. Wang, 2008) Os biossensores de segunda geração (Figura 7B), são semelhantes ao de 1º geração mas conseguem reduzir a interferência de espécies redox, pois contém um mediador que efetua a ligação entre o eletrodo e a GOX, e detém a função de reduzir as espécies redox presentes, substituindo o oxigênio. Esta geração de biossensores apesar de reduzir alguma da interferência e de se ter de colocar na proximidade do eletrodo, não elimina na totalidade esta desvantagem (J. Wang, 2008). Assim, a finalidade dos biossensores de terceira geração (Figura 7C), é de eliminar a interferência. Os biossensores de 3ª geração apresentam uma ligação direta entre a GOX e o eletrodo, ocorrendo a transferência direta de elétrons (Z. Yang, Tang, Li, Zhang & Hu, 2014). Tem sido estudados alguns nano materiais para efetuar esta ligação, como nanotubos de dióxido de titânio, nanotubos de ouro, nanotubos de carbono, entre outros (Ammam & Fransaer, 2012; Devasenathipathy et al., 2015; Z. Yang et al., 2014).

3.2.2 - Insulinase

A insulinase (2,1-b-DD-fructanos fructanohidrolases, EC 3.2.1.7), é a enzima que efetua a hidrólise da insulina em frutose (Skowronek & Fiedurek, 2003).

Esta enzima executa a produção de frutose e frutoligossacarídeos, que são utilizados na indústria farmacêutica. Trata-se de uma enzima capaz de ser produzida por microrganismos, e possui um papel importante na produção de insulina, utilizada em farmácia (Skowronek & Fiedurek, 2006).

Certas espécies de *Aspergillus niger* conseguem efetuar a secreção de exo e endo-insulinase extracelular, quando presentes no meio de cultura adequado, mas são poucos os estudos que se encontram sobre a sua produção (Nakamura, Nagatomo, Hamada, Nishino & Ohta, 1994).

Têm sido utilizadas as estirpes *Aspergillus niger* 12, 817, TISTR 3570 e 20 OSM para a produção de diversas enzimas, como as endo-insulinases P-III, P-1A, P-1B e as insulinases I, II e III (Chi et al., 2011; Nakamura et al., 1994; Skowronek & Fiedurek, 2006).

Analisando os estudos, observa-se que a atividade máxima da insulinase utilizando o fungo *Aspergillus niger*, ocorre a uma temperatura de 40-60°C e um pH de 4-5 (Nakamura et al., 1994; P. Singh & Gill, 2006; Skowronek & Fiedurek, 2006).

No estudo de Nakamura e colaboradores (1994) foi realizada a fermentação submersa, com a estirpe mutagénica *Aspergillus niger* 817 e obteve-se a produção da endo-insulinase P-1A e P-1B. O pH e a temperatura ótima para a produção destas duas isoformas, foi de 5 e 40°C, respetivamente.

Skowronek e Fiedurek (2006) investigaram a produção da endo-insulinase a partir de *Aspergillus niger* 20 OSM. Estes autores concluíram que os catiões de cálcio favorecem a atividade da enzima e o EDTA, mercúrio e manganês e outros iões metálicos, inibem a atividade da endo-insulinase. Foi comprovado que para esta estirpe a produção máxima da insulinase, observa-se à temperatura de 50°C e num meio com pH de 5.

3.2.3 - Invertase

A invertase (EC 3.2.1.26) também denominada de beta-frutofuranosidase, é uma enzima glicoproteica que efetua a catálise da sacarose em glucose e frutose (Kulshrestha, Tyagi, Sindhi & Yadavilli, 2013; Rubio & Maldonado, 1995). Esta enzima tem sido utilizada em diversas indústrias, devido ao seu potencial biotecnológico (Ohara et al., 2015). É

encontrada em frutos, como na casca de uvas, em plantas e em microrganismos, como a *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* e *Aspergillus niger* (Kulshrestha et al., 2013). A nível industrial, pode recorrer-se a *Aspergillus niger* para a produção de invertase, através do procedimento fermentativo. Atualmente tem sido alvo de estudo o uso desta espécie na determinação das condições ótimas para a produção da enzima.

O processo fermentativo pode ser efetuado recorrendo a fermentação em estado sólido ou a fermentação submersa (Ohara et al., 2015). Existem diversos estudos em que se comparam os dois procedimentos, para concluir qual a fermentação em que melhor favorece a produção da invertase. Os estudos de Ashokkumar, Kayalvizhi e Gunasekaran (2001), Ohara e colaboradores (2015) e Romero-Gómez, Augur e Viniegra-González (2000), concluíram que a fermentação em estado sólido promove uma maior produção da enzima invertase.

Têm sido investigadas, as condições ótimas para que se promova uma produção elevada da enzima, utilizando *Aspergillus niger*. No estudo de Hirayama, Sumi e Hidaka (1989) foi utilizada a estirpe *Aspergillus niger* ATCC 20611, para a produção da β -frutofuranosidade. Para a fermentação foi utilizada a sacarose como fonte de hidratos de carbono e verificou-se o máximo de produção da enzima com um pH de 5.0 - 6.0, e temperatura de 50-60°C. Rubio e Maldonado (1995) estudaram também as condições ótimas utilizando *Aspergillus niger* como fungo produtor da invertase, verificando que com um pH de 5, a uma temperatura de 60°C e utilizando a sacarose como fonte de carbono, obtem-se elevada produção. Estes autores também determinaram que certos iões, como o cobre, magnésio, potássio, sódio, cálcio, mercúrio e fósforo, inibem a atividade da enzima em diferentes percentagens, sendo vantajoso não serem adicionados ao meio de cultura.

Um estudo mais recente de Driouch e colaboradores (2010) investigou a produção da invertase pela fermentação. Neste estudo foi utilizada uma estirpe de *Aspergillus niger* geneticamente modificada para a produção da enzima, a estirpe *Aspergillus niger* SKAn1015 e conclui-se que a presença de certos substratos no meio promove a produção da invertase, sendo então benéfico a adição ao meio de nitrato, glucose, Fe^{2+} e Mn^{2+} . Para além dos iões apresentados, verifica-se que a presença de iões de prata no meio de cultura da fermentação inibe da produção da invertase (Kulshrestha et al., 2013).

É possível concluir que a atividade máxima da enzima ocorre a um pH de 4.5 (intervalo de 3.5-4.5) e com uma temperatura de 55°C (Kulshrestha et al., 2013).

A invertase tem sido utilizada na indústria farmacêutica, na produção de novos fármacos e é utilizada em cosmética, pela sua ação de agente plastificantes, e na produção artificial de mel. Esta enzima é também utilizada para prevenir infecções bacterianas, devido a sua atividade antimicrobiana e capacidade antioxidante. Para além das infecções bacterianas, é vantajosa a sua utilização em concomitante com outras enzimas, sendo utilizada em doentes com gripes, problemas respiratórios e constipações. (Kulshrestha et al., 2013)

3.2.4 - Lipase

A lipase (triacilglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) é a enzima envolvida na formação de glicerol e ácidos gordos livres, pela hidrólise de gorduras e óleos (Gopinath, Anbu, Lakshmipriya & Hilda, 2013).

A síntese da lipase ocorre em microrganismos, plantas e animais, sendo *Aspergillus niger* um fungo bem conhecido pela produção da enzima logo é vantajosa a sua utilização (Pokorny, Friedrich & Cimerman, 1994). A lipase é uma enzima utilizada em diversas indústrias, devido à sua capacidade de hidrólise, síntese e biotransformação (Toscano, Gochev, Montero & Stoytcheva, 2011).

Existem poucos estudos que analisam as condições de produção de lipase extracelular, usando diferentes estirpes de *Aspergillus niger*. No estudo de Pokorny e colaboradores (1994) observa-se que o nitrato de amónio e o fosfato de amónio são as melhores fontes de azoto, para adicionar ao meio de cultura, na produção da lipase.

Conclui-se pelo estudo de Pokorny e colaboradores (1994) e Sugihara e Shimada (1988) que a presença de iões de ferro no meio de cultura inibe a lipase e que os iões de magnésio aumentam a produção de lipase por *Aspergillus niger*.

A 1,3-lipase específica uma nova lipase extracelular foi descoberta por Namboodiri e Chattopadhyaya (2000) utilizando o fungo *Aspergillus niger*, sendo que tem a atividade ótima num pH 5-6 e a uma temperatura entre os 35-55°C.

Aspergillus niger F044 foi considerada uma das estirpes para produção industrial de lipase no estudo de Shu, Yang e Yan (2007). Neste estudo a atividade ótima da lipase observou-se a 45°C num pH de 7. A presença de iões de magnésio e cálcio no meio de cultura promovem a produção da enzima, sendo consistente com o estudo apresentado.

Toscano e colaboradores (2011) efetuou a mutação de estirpes para uma produção elevada de lipase e obteve uma estirpe mutada de *Aspergillus niger* NMG_{12/4} que teve a atividade máxima de lipase num valor de 15.5 U/cm³.

A lipase encontra-se aplicada em diversas áreas, no caso da indústria farmacêutica, é utilizada em formulações que auxiliam o processo digestivo e na formulação de determinados lípidos, como os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) que são utilizados em fármacos anti inflamatórios, antitrombóticos e para o tratamento das dislipidémias (R. Sharma, Chisti & Banerjee, 2001).

3.2.5 - Tanase

A tanase (tanina acil hidrólase, EC 3.1.1.20) é uma enzima hidrolítica microbiana, presente em bactérias e fungos, que foi descoberta por van Tieghem em 1867 (Aboubakr, El-Sahn & El-Banna, 2013). Esta enzima efetua a transformação de ácido tânico em ácido gálico e glucose (Aguilar & Gutiérrez-Sánchez, 2001).

A produção de tanase com utilização da espécie *Aspergillus niger* é efetuada pela fermentação, sob condições ótimas para a secreção elevada da enzima. Recentemente Aboubakr e colaboradores (2013) estudou algumas variáveis que afetam a produção da enzima produzida por *Aspergillus niger* van Tieghem e concluíram que a produção da tanase deve ser efetuada em fermentação submersa com agitação intermitente, a uma temperatura de 35°C durante 96h e utilizando ácido tânico e como fonte de azoto, nitrato de sódio. Também verificaram que a presença de certos catiões na fermentação, como mercúrio e cobre, reduzem a produção da enzima.

O estudo de S. Sharma, Agarwal e Saxena (2007) analisa também as condições ótimas para a produção de tanase em *Aspergillus niger* utilizando a fermentação submersa, e verifica-se concordância com o artigo anterior. Na fermentação obteve-se as condições ótimas, com uma produção de enzima de 19.7 U/mL em que foi adicionado ácido tânico, nitrato de sódio, uma agitação de 150 rpm e um pH de 5, em que a fermentação teve uma duração de 48h.

Para além da fermentação submersa, a fermentação em estado sólido também é utilizada para a produção de tanase. Rodriguez-Dúran, Contreras-Esquivel, Rodríguez, Prado-Barragán e Agilar (2011), concluíram que na FES com a estirpe de *Aspergillus niger* GH1 e adicionando ao meio de cultura o ácido tânico, num pH de 4, a uma temperatura de 30°C e uma taxa de ar de 20 mL/min, consegue-se uma maior produção de tanase, com um valor de 50 g/L.

A principal aplicação da tanase verifica-se em chás e na produção natural de ácido gálico (Rodríguez-Dúran et al., 2011). A produção de ácido gálico é das utilizações mais

importantes da tanase na indústria farmacêutica, pois este ácido é utilizado na síntese de fármacos antibacterianos, como é o caso do antibiótico trimetoprim (Aguilar & Gutiérrez-Sánchez, 2001).

3.3 - Vitamina

3.3.1 - Vitamina C

A vitamina C também denominada de ácido ascórbico, é um composto orgânico que apresenta capacidades redutoras (Kuivanen, Penttilä & Richard, 2015). Atualmente são produzidas, mundialmente, 110000 toneladas anuais de ácido ascórbico (Pappenberger & Hohmann, 2014).

Esta vitamina é utilizada na indústria farmacêutica, como suplemento vitamínico, aditivo nos produtos cosméticos, conservante, devido a sua capacidade antioxidante e ainda, é um cofactor enzimático. Também é usada no sector alimentar e de bebidas. (Kuivanen et al., 2015; Pappenberger & Hohmann, 2014)

Recentemente verificou-se o potencial uso do fungo filamentosso *Aspergillus niger*, para a produção do ácido ascórbico. Kuivanen e colaboradores (2015) efetuaram manipulação genética em *Aspergillus niger* para através do ácido galacturônico conseguirem produzir o ácido ascórbico. Neste estudo obteve-se uma produção de ácido ascórbico de 170 mg/L, utilizando uma estirpe modificada.

Capítulo 4 - Biotransformações por *Aspergillus niger*

Certos organismos têm a capacidade de efetuar modificações químicas em compostos, denominando-se este processo de biotransformação. No caso dos fungos filamentosos, pode ocorrer utilizando a totalidade do organismo (várias transformações sintéticas sequenciais) ou através de biocatálise (reduzido número de passos sintéticos) (Huttel & Hoffmeister, 2010). A biotransformação auxilia a síntese de moléculas complexas, e quando é utilizada a totalidade do microrganismo, permite a execução de transformações muito exigentes (Huttel & Hoffmeister, 2010; Pollard & Woodley, 2007). O seu uso no sector farmacêutico permite que seja possível analisar o uso metabólico de determinados fármacos, estudar como são metabolizados em células eucarióticas e ter maior conhecimento sobre a biossíntese do microrganismo (Huttel & Hoffmeister, 2010).

Este procedimento é também denominado de “química verde”, pois é realizado a temperatura ambiente utilizando apenas reagentes naturais e reduz ou evita o uso de solventes (Chartrain & Sturr, 2005; Huttel & Hoffmeister, 2010).

Atualmente a maior utilização das biotransformações verifica-se no sector farmacêutico, pois promove a descoberta e a investigação de novos fármacos (Pollard & Woodley, 2007; Severiano et al., 2013). A indústria farmacêutica sempre aproveitou microrganismos para produzir derivados de produtos farmacêuticos. Os fungos filamentosos, têm sido alvo de estudo para a biotransformação de antibióticos, esteroides, alcaloides, compostos orgânicos, flavonoides e terpenóides. (Chartrain & Sturr, 2005)

Aspergillus niger é um dos fungos filamentosos que tem sido utilizado como organismo para a ocorrência de biotransformações, uma das razões é sobretudo o facto de efetuar a introdução de grupos hidroxilo em compostos bioativos (Severiano et al., 2013).

A artemisina é um fármaco anti malárico utilizado em casos específicos de resistência a outra terapêutica, mas apresenta baixa solubilidade à água e é neurotóxico (Pervaiz, Ahmad, Madni, Ahmad & Khaliq, 2013). Devido a estes efeitos, tornou-se essencial a biotransformação da artemisina, para criar derivados que poderão auxiliar a investigar novos fármacos anti maláricos. Parshikov, Miriyala, Muraleedharan, Avery e Williamson (2006) procederam a biotransformação da artemisina utilizando o fungo *Aspergillus niger* VKM F-1119 e produziram um novo composto o 5 β -hidroxiartemisina com um rendimento de 80% que apresenta atividade anti malária e solubilidade em água. Com o intuito da descoberta de novos fármacos, Zhan e colaboradores (2015) realizaram modificações na estrutura de artemisinina, um dos fármacos anti maláricos, utilizando a

estirpe de *Aspergillus niger* VKM F-1119. A biotransformação do fármaco originou quatro produtos, em que dois compostos, 3 β -hidroxi-4,12-epoxi-1-desoxiartemisina e 3,13-epoxiartemisina, foram produzidos pela primeira vez. Os estudos realizados sugerem que é necessário a presença de uma ponte de peróxido para que se mantenha a atividade anti malárica dos derivados de artemisina. Estes novos derivados da artemisina poderão fornecer nova informação para a criação de um novo fármaco bioativo anti malárico. A estirpe *Aspergillus niger* VKM F-1119 foi utilizada por Parshikov, Miriyala, Avery e Williamson (2004) para proceder à biotransformação de 10-desoartemisina, um derivado de artesimisina, em dois compostos 15-hidroxi-10-desoxiartemisina e 7 β -hidroxi-10-desoxiartemisina, que também podem auxiliar a descoberta de novos fármacos anti maláricos. Para além da estirpe *Aspergillus niger* VKM F-1119, a estirpe *Aspergillus niger* NRRL 599 também foi utilizada para a biotransformação da artemisitena em fármacos com atividade anti malária, o 9 α -artemisinina, 7 β -de-hidroxi-9 α -artemisinina e 7 β -hidroxi-9 α -artemisinina (Orabi et al., 1999; Parshikov, Netrusov & Sutherland, 2012; Parshikov & Sutherland, 2014). Mais duas estirpes foram utilizadas para a biotransformação do fármaco artemisinina, a estirpe *Aspergillus niger* AS 3.795 e *Aspergillus niger* AS 3.1858 (Parshikov et al., 2012; Parshikov & Sutherland, 2014). O estudo de Gowri e Haribabu (2011) demonstrou a necessidade de presença de um anel de epóxido, para a existência de atividade anti malárica no composto.

Para além da produção de ácido málico através de fermentação, este ácido orgânico com aplicação farmacêutica pode também ser produzido através de biotransformação utilizando determinadas estirpes de *Aspergillus niger* (West, 2011). A produção de ácido málico ocorre pela biotransformação de glucose em bruto, utilizando as estirpes de *Aspergillus niger* ATCC 9142, *Aspergillus niger* ATCC 10577 e *Aspergillus niger* ATCC 12846 (West, 2015).

Outra aplicação de *Aspergillus niger* verifica-se na resolução enzimática de mistura racêmica, nomeadamente o ibuprofeno. O ibuprofeno é um fármaco anti-inflamatório não esteroide, que atualmente continua a ser utilizado como mistura racêmica e pensa-se que o isômero S do ibuprofeno apresenta igualmente a atividade anti-inflamatória, mas 160 vezes mais ativa (Carvalho, Calafatti, et al., 2005). Foi utilizada para a execução da biotransformação a lipase purificada da estirpe *Aspergillus niger* AC-54 e obteve-se o (-)-(R)-ibuprofeno e (+)-(S)-ibuprofeno (Carvalho, Contesini, Bizaco, Calafatti & Macedo, 2006; Carvalho, Contesini, Bizaco & Macedo, 2005).

O Captopril® é um fármaco anti hipertensor, que pode ser formado através de biotransformação utilizando a lipase de *Aspergillus niger* (Chartrain & Sturr, 2005).

Para além dos casos enunciados, existem inúmeras biotransformação de compostos orgânicos, terpenóides, flavonoides e esteroides, utilizando culturas de *Aspergillus niger*. Na tabela 7 apresenta-se sumariamente algumas destas biotransformações, em que se formam compostos vantajosos para o sector farmacêutico.

Tabela 7 - Resumo de algumas biotransformações por *Aspergillus niger* utilizadas na indústria farmacêutica (Parshikov & Sutherland, 2014, 2015; Parshikov, Woodling & Sutherland, 2015).

	SUBSTRATO	FUNGO	PRODUTO	UTILIZAÇÃO	REREFÊNCIA
ESTEROIDES	20(S)-Protopanaxadiol	<i>A. niger</i> AS 3.1858	23,24-ene-25-etoxi-20-(S)-protopanaxadiol	Citotóxico	(G. Chen et al., 2013)
	Oximetalono	<i>A. niger</i> ATCC 10549	17 β -hidroxi-2 α -(hidroximetil)-17 α -metil-5 α -androstan-3-ona 2 α -(hidroximetil)-17 α -metil-5 α -androstan-3 β ,17 β -diol	Inibem a proliferação das células T	(Parshikov et al., 2004)
	Metil protodioscine	<i>A. niger</i> AS 3.1858	Esteroides diosgenine	Permite a síntese de outros compostos com maior atividade anticancerígena	(He, Liu, et al., 2006)
	-	<i>A. niger</i> ATCC 11394	3 β ,5 α ,6 β -triol-coleitano	Suprime a proliferação de células cancerígenas	(Lin et al., 2013)
	Cinobufagine	<i>A. niger</i> AS 3.1858	12 β -hidroxicinobufagin, desacetilcinobufagine 12 β -hidroxidesacetilcinobufagine 3-oxodesacetilcinobufagine Bufaline 7 β -hidroxibufaline 12 β -hidroxibufaline	Alguns destes derivados têm atividade citotóxica em células cancerígenas	(He, Tang, et al., 2006)
	Cinobufotaline	<i>A. niger</i> AS 3.739	9 α -hidroxicinobufotaline 3-oxocinobufotaline 5 β -hidroxi-16-epi-desacetilcinobufagine	Efeito anti proliferativo em células cancerígenas	(J. Lu et al., 2013)
FLAVONOIDES	Rutine	<i>A. niger</i> KCTC 6906	Quercetina 3-glucoside	Inibidor de células tumorais	(Witt et al., 2000)
	Nobiletine	<i>A. niger</i> IFO 4414	4'-hidroxi-5,6,7,8,3-pentametoxiflavona	Atividade anti mutagénica	(Okuno & Miyazawa, 2004)

COMPOSTOS ORGÂNICOS	Solvente Tolueno	<i>A. niger</i> MTCC-404	Álcool benzilo Benzaldeído	-	(Yadav, Yadav, Yadava & Yadav, 2011)
	Aminoácido T-Tirosina	<i>A. niger</i> GCBT-8	3,4-di-hidroxi-fenilolanina	Tratamento da doença de Parkinson	(Ali & Haq, 2010)
	Ácido Ferrúlico	<i>A. niger</i> GC-4 r	Álcool vanílico	Antioxidante	(Shahwar, Raza, Ali & Ahmad, 2011)
	(R)-enantiómero da glicidilazida	<i>A. niger</i>	-	Agente antimicrobiano	(L. Chen, Shen, Wei & Zhu, 2013)
	Epotolona A	<i>A. niger</i> AS 3.739	<i>trans</i> - e <i>cis</i> -12,13-di-hidroxi- epotilona A <i>trans</i> -12,15-epoxi-epotilona A <i>cis</i> -12,15- epoxi-epotilona A	Atividade citotóxica	(Y.-L. Wang et al., 2009)
	(±)- α -Acetil- γ - butirolactona	<i>A. niger</i> LIV 10	Hidroxi-etil- γ -butirolactona	Auxilia a síntese de novos fármacos	(Ribeiro et al., 2006)
	(+)-Sch-642305	<i>A. niger</i> ATCC 16404	-	Atividade antibacteriana contra <i>Bacillus subtilis</i>	(Adelin et al., 2012)
	Ácido α -linolenico	<i>A. niger</i>	Ácido 9-ceto-10E,12Z,15Z- octadecatrienoico Ácido 13-ceto-9Z,11E,15Z- octadecatrienoico	Possível anti-inflamatório	(Petta, Secatto, Faccioli & Moraes, 2014)
	Fraxinelone	<i>A. niger</i>	Dasicaspolo	Inibe células cancerígenas	(R.-L. Yang, Jia, & Zhang, 2005)
Fraxinigerllone			Atividade citotóxica		
TERPENÓIDES	Germacrona	<i>A. niger</i>	Zedoarondiol	Fármaco anti inflamatório	(Asakawa, Takahashi & Toyota, 1991; Cho et al., 2009)
	Atractilona	<i>A. niger</i>	Atractilenolide II	Inibe a permeabilidade vascular	(Hashimoto, Noma & Asakawa, 2001)
	(-)-Isolongifolol	<i>A. niger</i> ATCC 10549	10- e 9-hidroxisolongifolol	Investigada para a terapêutica de doenças do SNC	(Choudhary et al., 2005)
	Ácido Isostevico	<i>A. niger</i> BCRC 32720	-	Anti-inflamatório	(L. Yang et al., 2012)
	Isosteviol	<i>A. niger</i> IFO 4414	7-hidroxisosteviol 11- hidroxisosteviol 12-hidroxisosteviol	Anti tumoral	(Akihisa et al., 2004)

Baccatine VI	<i>A. niger</i> BCRC 31130	Taxumairol S1 Taxumairol T1	Investigados para atividade anti tumoral	(Shen, Lo, Lin & Chakraborty, 2003)
5-Hidroxi-10- metoxi-2,14- diacetoxitaxa- 4(20),11(12)- dieno	<i>A. niger</i> CGMCC 3.1858	2-hidroxi-5,10,14- triacetoxitaxa-4(20),11(12)- dieno	Previne a resistência a terapêutica química em células tumorais	(X. Liu et al., 2012)
Solidagenona	<i>A. niger</i> ATCC 16404	-	Protetor gástrico	(Schmeda- Hirschmann, Astudillo & Palenzuela, 2004)
Triptonida	<i>A. niger</i> AS 3.739	5-hidroxitriptonido triptolide 17-hidroxitriptonido 16-hidroxitriptonido	Anti-inflamatório e anti tumoral com menos toxicidade	(Ning et al., 2003)
Platicodina D	<i>A. niger</i> KCTC 6906	-	Aumenta a atividade da captura do nitrito	(Wie et al., 2007)

A. niger = *Aspergillus niger*

Os diterpenóides são compostos que contêm um grande espectro de atividade, são antiparasitários, antimicrobianos, anti-inflamatórios. Sabe-se que um diterpenóide, o ent-pimaradienoico (PA, ácido ent-pimara-8(14),15-dien-19-oico), pode ser aplicável no tratamento da hipertensão. Neste contexto, Severiano e colaboradores (2013) investigou o efeito anti hipertensor de derivados do PA utilizando estirpes de *Aspergillus niger*. O diterpeno metil 17a-hidroxi-ent-pimara-8(14),15-dieno-19-oato foi o único derivado de PA, formado anteriormente por biotransformação, que apresentou um maior efeito anti hipertensor que o PA. A biotransformação de PA utilizando *Aspergillus niger* permitiu a formação de três novos derivados, o ácido 1b-hidroxi ent-pimara-6,8(14),15-trien-19-oico, ácido 1a,6b,14b-trihidroxi ent-pimara-7,15-dien-19-oico e ácido 1a,6b,7a,11a-tetrahidroxi entpimara-8(14),15-dien-19-oico.

Capítulo 5 - Utilização em ensaios laboratoriais

A indústria farmacêutica durante a produção de produtos farmacêuticos segue as boas práticas de fabrico, para que seja garantida a qualidade de produção e controlo do medicamento. Posteriormente à produção, são efetuados testes para certificar a qualidade e a quantidade dos produtos. Habitualmente são realizados uma grande diversidade de ensaios, para verificar se os produtos se encontram em concordância com as normas e se poderão ser comercializados (Baird, 2011).

Os ensaios laboratoriais para o controlo de qualidade dos produtos são necessários para garantir a segurança e eficácia do produto para os doentes, devendo assim cumprir as especificações microbiológicas exigidas (Baird, 2011).

Alguns microrganismos são utilizados nos ensaios laboratoriais, apresentando interesse na microbiologia farmacêutica porque são considerados como organismos muito presentes no ambientes ou estão presentes nos locais de fabrico e conseqüentemente podem contaminar os produtos produzidos. Assim, os ensaios laboratoriais deverão ter em consideração estes microrganismos, utilizando-os para testar a presença dos mesmos nos produtos ou a capacidade dos produtos em eliminar os organismos (Baird & Denyer, 2007).

Aspergillus niger é um dos fungos com elevado interesse na microbiologia farmacêutica, pois os esporos do fungo encontram-se presentes em abundância no meio ambiente e principalmente no ar, possui um rápido crescimento e tem tolerância a variações de pH, podendo assim contaminar produtos farmacêuticos ou cosméticos. (Baird & Denyer, 2007; Nielsen, Mogensen, Johansen, Larsen & Frisvad, 2009) A estirpe de *Aspergillus niger* mais utilizada como estirpe de referência para os ensaios laboratoriais é a ATCC 16404 (Akers & Walcott, 2007; Akhavan, Jahangiri & Shafaghat, 2015; Verdenelli, Cecchini, Orpianesi, Dadea & Cresci, 2003).

Para analisar a atividade antifúngica de compostos, são testados tanto fármacos, como desinfetantes, antissépticos e conservantes que devem ter a capacidade de destruir ou inibir o crescimento de microrganismos (Gilmore, Ceri & Gorman, 2011; Gorman & Gilmore, 2011).

De acordo com a norma AFNOR T 72-202 de Abril de 2006 e NF EN 1275, para a determinação da atividade fungicida de antissépticos e desinfetantes, *Aspergillus niger* é um dos fungos que deve ser utilizado (Gorman & Gilmore, 2011).

Nos produtos cosméticos, normalmente existem conservantes e é necessário a realização de ensaios para verificar se o conservante mantém o cosmético em boas condições. Para testar a atividade do conservante, é utilizado o fungo *Aspergillus niger*. (Akers & Walcott, 2007)

A atividade dos antifúngicos também é testada utilizando *Aspergillus niger*, para novos fármacos. Akhavan e colaboradores (2015) testaram a atividade antimicrobiana de fruto de *Trigonostadium brachytaenium*, e concluíram que o fruto apresenta resistência contra *Aspergillus niger*.

A esterilização é um processo essencial em determinados produtos durante o seu fabrico, como é o caso de produtos cosméticos e produtos de administração parentérica, entre outros (Denyer, Hodges & Talbot, 2011). Este procedimento durante o fabrico permite a eliminação de microrganismo existentes nos produtos farmacêuticos que podem ser patogênicos, colocando em perigo o doente. Após a produção é necessário, como controlo de qualidade, a execução do teste de esterilidade para demonstrar a presença ou ausência de organismos viáveis que contaminam o produto farmacêutico ou o produto estéril de uso médico (Denyer et al., 2011). Neste teste é necessário a existência de um controlo positivo e negativo, que será o termo de comparação para o resultado do produto a esterilizar. A *European Pharmacopeia* sugere o uso do *Aspergillus niger*, como um dos fungos para o controlo positivo do teste (Denyer et al., 2011).

Capítulo 6 - Segurança

Todos os compostos produzidos são regularmente verificados pelas autoridades, para serem examinados e averiguar se estão dentro dos critérios impostos para serem considerados como GRAS e poderem posteriormente ser utilizados nas indústrias (Dijck, Selten & Hempenius, 2003).

Aspergillus niger é um fungo utilizado em grande número e em diversas indústrias, como a alimentar e a farmacêutica. E dada a elevada utilidade do fungo, é necessário garantir a sua segurança e conseqüentemente assegurar que o consumo dos produtos não é patogénico para o humano.

Aspergillus niger é considerado como um fungo não patogénico e em muitas das suas aplicações é considerado como GRAS (Blumenthal, 2004; Dijck et al., 2003; Frisvad et al., 2011). Em 1994 a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*, foi considerado como segura pela FDA (Blumenthal, 2004).

Apesar de ser considerada como segura, algumas estirpes de *Aspergillus niger* foram estudadas e verificou-se que existem certas estirpes utilizadas em procedimentos industriais que produzem micotoxinas (Frisvad et al., 2011).

As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos pelo fungo, sendo tóxicas para os humanos e animais (Kamei & Watanabe, 2005). Para prevenção e segurança de intoxicação, as micotoxinas têm sido extensivamente investigadas (Kamei & Watanabe, 2005). Sabe-se que determinadas estirpes de *Aspergillus niger* produzem fumonisinas e a ocratoxina A (OTA) (Nielsen et al., 2009).

As fumonisinas são micotoxinas cancerígenas produzidas pelas espécies *Fusarium* e existem aproximadamente 53 fumonisinas (Frisvad, Smedsgaard, Samson, Larsen & Thrane, 2007). Esta micotoxina é relevante devido ao facto de provocar toxicose a quando do consumo de alimentos contaminados, sendo necessário garantir a segurança dos alimentos (Mogensen, Nielsen, Samson, Frisvad & Thrane, 2009). Estudos de Baker (2006) e Pel e colaboradores (2007) mostraram a presença de homólogos dos genes de fumonisinas de *Fusarium verticillioides*, no genoma de *Aspergillus niger* ATCC 1015 e CBS 513.88. Mas estes genes não são sempre expressos, podendo apresentar-se apenas como genes silenciosos ou com defeito (Frisvad et al., 2007).

Foi analisado que quando se inocula *Aspergillus niger* em substrato de agar, com a presença de elevadas quantidades de cloreto de sódio, açúcar e glicerol, observa-se uma produção de fumonisina B₂ em quantidades significativas (Frisvad et al., 2007; Mogensen

et al., 2009). Noonim, Mahakarnchanakul, Nielsen, Frisvad e Samson (2009) num estudo, detetaram a capacidade de produção de fumonisina B₄ por *Aspergillus niger*, tanto em grãos de café Tailandês como em cultura de agar, com cloreto de sódio. Para além de fumonisina B₂ e B₄, foi isolado também a fumonisina B₆ numa cultura de *Aspergillus niger* NRRL 326 (Månsson et al., 2010).

Dado esta clara produção, pelas estirpes de *Aspergillus niger*, de fumonisina B₂, B₄ e B₆, é necessário analisar as implicações que pode possuir, pois *Aspergillus niger* tem diversas aplicações (Frisvad et al., 2007).

A OTA é produzida pelo género *Aspergillus* ou *Penicillium* e é considerada a ocratoxina mais tóxica, apresentando nefrotoxicidade e teratogenicidade, e também corresponde a um contaminante alimentar comum (Blumenthal, 2004; Zhihong, Kunlun & Yunbo, 2015). A OTA foi classificada pela *International Agency for Research on Cancer*, como uma micotoxina carcinogénica para o humano (Muñoz, Vega, Rios, Geisen & Degen, 2011). E em estudos realizados em ratos, verificou-se que a OTA produz tumores nos rins e fígado (Berger et al., 2003).

Existem fatores que são determinantes para a produção de OTA em fungos, e que estão relacionados com as condições da cultura existentes, como a temperatura, o pH, o tempo de incubação, os nutrientes, a humidade e a luz (Muñoz et al., 2011).

Apesar de se ter confirmado a capacidade de produção de micotoxinas por certas estirpes, é necessário realçar que os compostos produzidos por *Aspergillus niger* que obtiverem o estatuto de GRAS foram submetidos a testes carcinogénicos, citotóxicos e outros testes (Frisvad et al., 2011).

Assim, é possível afirmar que estas micotoxinas são produzidas em condições de crescimento limitadas, em que as condições da fermentação e as estirpes utilizadas controlam a produção de micotoxinas (Blumenthal, 2004; Environmental Protection Agency, 1997). Quando forem realizadas as produções, nas quais as condições de produção são controladas e definidas, é possível obter um produto sem a presença de micotoxinas (Blumenthal, 2004). Mas como tanto os meios de cultura como as estirpes dos microrganismos, estão em constante desenvolvimento e modificação, é necessário uma avaliação contínua de todos os produtos formados, pois existe o risco de formação de fumonisinas e/ou ocratoxina A (Frisvad et al., 2011).

As estirpes em que se verifica a formação das micotoxinas têm vindo a ser alvo de estudo, para se verificar os cuidados necessários a ter quando são usadas. Frisvad e colaboradores (2011) estudou as estirpes de *Aspergillus niger*, de uso industrial que produzem as

micotoxinas enunciadas, em que 83% das estirpes produzem fumonisinas e 33% das estirpes industriais produzem ocratoxina A. Os resultados também sugerem que um meio com elevada quantidade de hidratos de carbono e azoto, tem mais facilidade em promover a formação de micotoxinas.

A tabela 8 apresenta as estirpes de *Aspergillus niger* industriais investigadas para analisar a capacidade de produção de fumonisina B₂ e/ou ocratoxina A e consolida esta informação com as aplicações das estirpes utilizadas. Pela análise da tabela 8 observa-se que todas estirpes usadas na industria, conseguem produzir micotoxinas, a fumonisina B₂ e/ou OTA e possuem utilização biotecnológica alta. Assim, é recomendado que o uso de *Aspergillus niger* seja realizado usando estirpes com genes das micotoxinas inativos e quando as estirpes forem usadas, que sejam realizados testes de controlo de qualidade do produto formado, para garantir que é segura a sua utilização.

Tabela 8 - Estirpes de *Aspergillus niger* usadas em biotecnologia e que produzem micotoxinas. Adaptado de (Frisvad et al., 2011)

ESTIRPES INDUSTRIAIS DE <i>ASPERGILLUS NIGER</i>	PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS		APLICAÇÕES INDUSTRIAIS		
	Fumonisina B ₂	Ocratoxina A	Ácido cítrico e outros	Produção de enzimas	Biotransformação
CBS 108.47	+	-	✓		
CBS 127.48	-	+		✓	
CBS 262.65	+	-	✓		
CBS 630.78	+	-		✓	
CBS 513.88^d	+	+		✓	
IFO 4122	+	+	✓		
IFO 6082	+	+	✓		
IFO 8876	-	+	✓		
IFO 8877	-	+	✓		
IMI 016141	+	+	✓		
NRRL 3	+	-	✓	✓	✓
NRRL 326	+	-	✓	✓	✓
NRRL 328 = ATCC 1015	+	-	✓	✓	✓
NRRL 330	+	-	✓	✓	
NRRL 334	+	-	✓	✓	

NRRL 337	+	+	✓	✓	✓
NRRL 350	+	-	✓	✓	✓
NRRL 341	+	-		✓	
NRRL 363	-	+	✓		
NRRL 364	+	-	✓	✓	
NRRL 372	+	-	✓		
NRRL 566	+	-	✓	✓	✓
NRRL 599	+	-	✓		✓
NRRL 611	+	-	✓		
NRRL 615	+	-	✓		
NRRL 2270	+	-	✓	✓	✓
NRRL 3112	+	+		✓	
NRRL 3122	+	+		✓	✓

Para além de micotoxinas, o *Aspergillus niger* produz outros metabolitos secundários que apresentam toxicidade, como o ácido oxálico e o naftopirano (Dijck et al., 2003).

O ácido oxálico é um metabolito secundário produzido por *Aspergillus niger* em meios de cultura sólidos e líquidos e que tem efeitos tóxicos devido ao complexo formado do oxalato com o cálcio, que conduz a falência renal e a hipocalcemia (Blumenthal, 2004).

Outro metabolismo secundário, que apresenta toxicidade é o naftopirano. Apesar de se tratar de um composto tóxico, não tem interferência com a segurança dos produtos formados através de biotecnologia (Schuster et al., 2002).

Capítulo 7 - Conclusão

O *Aspergillus niger* é um fungo que se adapta a vários ambientes, ubiqüitário, os seus esporos encontram-se em grande abundância no meio ambiente estando em constante contacto com os seres humanos. Apesar de não se tratar de um microrganismo patogénico, tem sido alvo de grande investigação ao longo das últimas décadas.

De acordo com a pesquisa efetuada no *Web of Science* observa-se um elevado número de artigos publicados sobre *Aspergillus niger* na última década (Figura 8) e um aumento considerável das patentes relacionadas com o fungo, entre 2008 e 2012 (Figura 9), o que demonstra o crescente interesse da indústria por este microrganismo. É importante também realçar, que nos últimos 7 anos, têm sido publicados mais artigos relativamente a utilização de *Aspergillus niger* com relevância para a indústria farmacêutica (Figura 10). A biotransformação realizada com *Aspergillus niger* é um tema que tem aumentado exponencialmente, de acordo com a figura 11. (“Web of Science,” n.d.)



Figura 8 - Gráfico dos artigos publicados sobre *Aspergillus niger* (“Web of Science,” s.d.).



Figura 9 - Gráfico de patentes publicadas sobre *Aspergillus niger* (“Web of Science,” s.d.).



Figura 10 - Gráfico de artigos publicados sobre *Aspergillus niger* e indústria farmacêutica (“Web of Science,” s.d.).



Figura 11 - Gráfico de artigos publicados sobre biotransformações realizadas por *Aspergillus niger* (“Web of Science,” s.d.).

A produção de compostos farmacêuticos utilizando *Aspergillus niger*, tem sofrido uma evolução positiva nos últimos anos. As enzimas são os compostos que melhor demonstram esse progresso, pois tem-se verificado uma maior incidência na investigação e produção das mesmas, utilizando *Aspergillus niger*. Na indústria farmacêutica são utilizadas a glucose oxidase, invertase, insulinase, lipase e a tanase. Apesar das enzimas ocuparem um grande plano no campo da investigação, o ácido cítrico é o composto gerado por *Aspergillus niger* que apresenta maior produção industrial a nível mundial, devido a sua grande aplicação na indústria, em particular na farmacêutica e alimentar. A sua utilização e os processos de produção não são recentes, no entanto continuam a apresentar um aumento anual de fabrico de aproximadamente 4%. O ácido glucónico, o ácido málico e vitamina C, são igualmente produzidos por *Aspergillus niger* com utilização na indústria farmacêutica, mas em valores consideravelmente inferiores.

Atualmente a produção industrial dos composto enunciados é efetuada recorrendo à fermentação. Verifica-se que a fermentação em estado sólido, é um dos processos mais utilizados para a produção dos ácidos orgânicos, enzimas e vitamina.

Para a produção dos compostos por fermentação é importante estudar o controlo de variáveis com o objetivo de otimizar o processo industrial. Dos parâmetros que influenciam o processo salienta-se, o pH, a temperatura, a agitação, oxigenação, fonte de hidratos de carbono, fonte de azoto e oligoelementos.

Aspergillus niger é uma espécie que continua a ser fulcral no desenvolvimento e evolução da indústria farmacêutica, porque a sua aplicação na biotransformação de compostos permitirá otimizar e/ou criar novos fármacos que apresentem melhores resultados nas grandes áreas de investigação farmacêutica, em particular na malária e citotóxicos.

Como apresentado na monografia, alguns ensaios realizados em laboratório também utilizam *Aspergillus niger*, tanto para ser testada a capacidade antifúngica, conservante e desinfetante como também para controlar a esterilidade dos procedimentos executados.

Uma das questões de maior relevância quando se usa *Aspergillus niger* em produtos farmacêuticos, é garantir que são seguros, isto é, não contém micotoxinas prejudiciais para o doente. Devem ser controlados todos os métodos de procedimentos utilizados, as estirpes e também o composto final obtido. É necessário que este controlo seja realizado tanto pelas entidades reguladoras como pela indústria produtora.

Bibliografia

- Abarca, M. L., Accensi, F., Cano, J. e Cabañes, F. J. (2004). Taxonomy and significance of black aspergilli. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 86(1), 33–49. doi: 10.1023/B:ANTO.0000024907.85688.05
- Aboubakr, H. A., El-Sahn, M. A. e El-Banna, A. A. (2013). Some factors affecting tannase production by *Aspergillus niger* Van Tieghem. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 559–567. doi: 10.1590/S1517-83822013000200036
- Adelin, E., Martin, M.-T., Bricot, M.-F., Cortial, S., Retailleau, P. e Ouazzani, J. (2012). Biotransformation of natural compounds: Unexpected thio conjugation of Sch-642305 with 3-mercaptolactate catalyzed by *Aspergillus niger* ATCC 16404 cells. *Phytochemistry*, 84, 135–140. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.08.002
- Afseth, J. e Rolla, G. (1983). Clinical Experiments with a Toothpaste Containing Amyloglucosidase and Glucose Oxidase. *Caries Res*, 17(5), 472–475. doi: 10.1159/000260704
- Aguilar, C. N. e Gutiérrez-Sánchez, G. (2001). Review: Sources, Properties, Applications and Potential uses of Tannin Acyl Hydrolase. *Food Science and Technology International*, 7(5), 373–382. doi: 10.1177/108201301772660411
- Akers, M. J. e Walcott, V. K. (2007). Official Methods of Preservative Evaluation and Testing. In S. P. Denyer e R. M. Baird (Eds.), *Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices* (2ª ed., pp. 383–394). London: CRC Press.
- Akhavan, M., Jahangiri, S. e Shafaghat, A. (2015). Studies on the antioxidant and antimicrobial activity and flavonoid derivatives from the fruit of *Trigonostadium brachytaenium* (Boiss.) Alava. *Industrial Crops and Products*, 63, 114–118. doi: 10.1016/j.indcrop.2014.10.023
- Akihisa, T., Hamasaki, Y., Tokuda, H., Ukiya, M., Kimura, Y. e Nishino, H. (2004). Microbial Transformation of Isosteviol and Inhibitory Effects on Epstein-Barr Virus Activation of the Transformation Products. *Journal of Natural Products*, 67(3), 407–410. doi: 10.1021/np030393q
- Ali, S. e Haq, I. (2010). Production of 3,4-dihydroxy L-phenylalanine by a newly isolated *Aspergillus niger* and parameter significance analysis by Plackett-Burman design. *BMC Biotechnology*, 10(1), 86. doi: 10.1186/1472-6750-10-86

- AMFEP. (2015). List of enzymes. Disponível a 22 de Setembro, 2015, em [http://www.amfep.org/sites/g/files/g412356/f/201505/Amfep List of Enzymes update May 2015.pdf](http://www.amfep.org/sites/g/files/g412356/f/201505/Amfep_List_of_Enzymes_update_May_2015.pdf)
- Ammam, M. e Fransaer, J. (2012). Glucose/O₂ biofuel cell based on enzymes, redox mediators, and multiple-walled carbon nanotubes deposited by AC-electrophoresis then stabilized by electropolymerized polypyrrole. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(7), 1601–1609. doi: 10.1002/bit.24438
- Andersen, M. R., Salazar, M. P., Schaap, P. J., Vondervoort, P. J. I. Van De, Culley, D., Thykaer, J., ... Baker, S. E. (2011). Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. *Genome Research*, 21(6), 885–897. doi: 10.1101/gr.112169.110
- Asakawa, Y., Takahashi, H. e Toyota, M. (1991). Biotransformation of germacrane-type sesquiterpenoids by *Aspergillus niger*. *Phytochemistry*, 30(12), 3993–3997. doi: 10.1016/0031-9422(91)83451-P
- Ashokkumar, B., Kayalvizhi, N. e Gunasekaran, P. (2001). Optimization of media for β -fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 37, 331–338. doi: 10.1016/S0032-9592(01)00166-2
- Baird, R. M. (2011). Microbial spoilage, infection risk and contamination control. In S. P. Denyer, N. Hodges, S. P. Gorman e B. Gilmore (Eds.), *Hugo & Russel's Pharmaceutical Microbiology* (8^a ed., pp. 273–292). Oxford: Wiley-Blackwell Publishing.
- Baird, R. M. e Denyer, S. P. (2007). Introduction to Microbiology. In S. P. Denyer e R. M. Baird (Eds.), *Guide to Microbiological Control in Pharmaceuticals and Medical Devices* (2^a ed., pp. 1–21). London: CRC Press.
- Baker, S. E. (2006). *Aspergillus niger* genomics: past, present and into the future. *Medical Mycology : Official Publication of the International Society for Human and Animal Mycology*, 44 Suppl 1, S17–S21. doi: 10.1080/13693780600921037
- Baker, S. E. e Bennett, J. W. (2007). An Overview of the Genus *Aspergillus*. In G. H. Goldman e S. A. Osmani (Eds.), *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology and Research Methods* (1^a ed., pp. 3–11). Florida: CRC Press.
- Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S. e Ananthanarayan, L. (2009a). Glucose oxidase - An overview. *Biotechnology Advances*, 27(4), 489–501. doi: 10.1016/j.biotechadv.2009.04.003

- Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S. e Ananthanarayan, L. (2009b). Optimization of *Aspergillus niger* fermentation for the production of glucose oxidase. *Food and Bioprocess Technology*, 2(4), 344–352. doi: 10.1007/s11947-007-0050-x
- Bennett, J. H. (1842). On the Parasitic Vegetable Structures found growing in Living Animals. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, 15(2), 277–9. doi: 10.1017/S0080456800029963
- Bennett, J. W. (2010). An Overview of the Genus *Aspergillus*. In M. Machida e K. Gomi (Eds.), *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics* (1^a ed., pp. 1–17). Norfolk: Caister Academic Press.
- Berg, B. A. van den, Reinders, M. J. T., Hulsman, M., Wu, L., Pel, H. J., Roubos, J. A. e Ridder, D. (2012). Exploring Sequence Characteristics Related to High-Level Production of Secreted Proteins in *Aspergillus niger*. *Plos One*, 7(10), 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0045869
- Berger, V., Gabriel, A.-F., Sergent, T., Trouet, A., Larondelle, Y. e Schneider, Y.-J. (2003). Interaction of ochratoxin A with human intestinal Caco-2 cells: possible implication of a multidrug resistance-associated protein (MRP2). *Toxicology Letters*, 140-141, 465–476. doi: 10.1016/S0378-4274(03)00043-2
- Berovic, M. e Legisa, M. (2007). Citric acid production. *Biotechnology Annual Review*, 13, 303–343. doi: 10.1016/S1387-2656(07)13011-8
- Blackwell, M. (2011). The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98(3), 426–438. doi: 10.3732/ajb.1000298
- Blom, R. H., Pfeifer, V. F., Moyer, A. J., TraufRer, D. H., Conway, H. F., Crocker, C. K., ... Hannibal, D. V. (1952). Sodium gluconate production - Fermentation with *Aspergillus niger*. *Ind. Eng. Chem.*, 44(2), 435–440. doi: 10.1021/ie50506a061
- Blumenthal, C. Z. (2004). Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 39(2), 214–228. doi: 10.1016/j.yrtph.2003.09.002
- Brown, S. H., Bashkirova, L., Berka, R., Chandler, T., Doty, T., McCall, K., ... Berry, A. (2013). Metabolic engineering of *Aspergillus oryzae* NRRL 3488 for increased production of L-malic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(20), 8903–12. doi: 10.1007/s00253-013-5132-2

- Canli, O. e Kurbanoglu, E. B. (2011). Utilization of ram horn peptone in the production of glucose oxidase by a local isolate *Aspergillus niger* OC-3. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 41(1), 73–83. doi: 10.1080/10826068.2010.534223
- Carvalho, P. O., Calafatti, S. A., Marassi, M., Silva, D. M., Contesini, F. J., Bizaco, R. e Macedo, G. A. (2005). Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. *Química Nova*, 28(4), 614–621. doi: 10.1590/S0100-40422005000400012
- Carvalho, P. O., Contesini, F. J., Bizaco, R., Calafatti, S. A. e Macedo, G. A. (2006). Optimization of enantioselective resolution of racemic ibuprofen by native lipase from *Aspergillus niger*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 33(8), 713–718. doi: 10.1007/S10295-006-0138-8
- Carvalho, P. O., Contesini, F. J., Bizaco, R. e Macedo, G. A. (2005). Kinetic properties and enantioselectivity of the lipases produced by four *Aspergillus* species. *Food Biotechnology*, 19(3), 183–192. doi: 10.1080/08905430500316342
- Chartrain, M. e Sturr, M. (2005). Fungal Bioconversions: Applications to the Manufacture of Pharmaceuticals. In Z. An (Ed.), *Handbook of Industrial Mycology* (1^a ed., pp. 563–595). New York: Marcel Dekker.
- Chen, G., Yang, X., Li, J., Ge, H., Song, Y. e Ren, J. (2013). Biotransformation of 20(S)-protopanaxadiol by *Aspergillus niger* AS 3.1858. *Fitoterapia*, 91, 256–260. doi: 10.1016/j.fitote.2013.09.019
- Chen, L., Shen, H., Wei, C. e Zhu, Q. (2013). Bioresolution of (R)-glycidyl azide by *Aspergillus niger* ZJUTZQ208: a new and concise synthon for chiral vicinal amino alcohols. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(6), 2609–2616. doi: 10.1007/s00253-012-4382-8.
- Chi, Z.-M., Zhang, T., Cao, T.-S., Liu, X.-Y., Cui, W. e Zhao, C.-H. (2011). Biotechnological potential of inulin for bioprocesses. *Bioresource Technology*, 102(6), 4295–4303. doi: 10.1016/j.biortech.2010.12.086
- Cho, W., Nam, J.-W., Kang, H.-J., Windono, T., Seo, E.-K. e Lee, K.-T. (2009). Zedoarondiol isolated from the rhizoma of *Curcuma heyneana* is involved in the inhibition of iNOS, COX-2 and pro-inflammatory cytokines via the downregulation of NF-κB pathway in LPS-stimulated murine macrophages. *International Immunopharmacology*, 9(9), 1049–1057. doi: 10.1016/j.intimp.2009.04.012
- Choudhary, M. I., Musharraf, S. G., Nawaz, S. A., Anjum, S., Parvez, M., Fun, H.-K. e Atta-ur-Rahman. (2005). Microbial transformation of (–)-isolongifolol and

- butyrylcholinesterase inhibitory activity of transformed products. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13(6), 1939–1944. doi: 10.1016/j.bmc.2005.01.015
- Costa, L. M. A. S. (2011). *Caracterização de isolados de Aspergillus niger quanto à produção de ácido cítrico e à expressão de genes da citrato sintase*. Universidade Federal de Lavras, Brasil.
- Currie, J. N. (1917). The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.*, 31, 15–37.
- Demain, A. L., Velasco, J. e Adrio, J. L. (2005). Industrial Mycology: Past, Present and Future. In Z. An (Ed.), *Handbook of Industrial Mycology* (1^a ed., pp. 1–16). New York: Marcel Dekker.
- Denyer, S. P., Hodges, N. e Talbot, C. (2011). Sterilization procedures and sterility assurance. In S. P. Denyer, N. Hodges, S. P. Gorman e B. Gilmore (Eds.), *Hugo & Russel's Pharmaceutical Microbiology* (8^a ed., pp. 352–378). Oxford: Wiley-Blackwell Publishing.
- Devasenathipathy, R., Mani, V., Chen, S.-M., Huang, S.-T., Huang, T.-T., Lin, C.-M., ... Chen, B.-J. (2015). Glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized at gold nanoparticles decorated graphene-carbon nanotubes. *Enzyme and Microbial Technology*, 78, 40–45. doi: 10.1016/j.enzmictec.2015.06.006
- Dijck, P. W. M. van, Selten, G. C. M. e Hempenius, R. A. (2003). On the safety of a new generation of DSM *Aspergillus niger* enzyme production strains. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 38(1), 27–35. doi: 10.1016/S0273-2300(03)00049-7
- Doores, S. (2005). Organic Acids. In P. M. Davidson, J. N. Sofos e A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in Food* (3^a ed., pp. 91–141). New York: CRC Press.
- Driouch, H. (2011). *Systems Biotechnology of Recombinant Protein Production in Aspergillus niger (Volume 58)*. TU Braunschweig. Disponível em https://cuvillier.de/uploads/preview/public_file/721/9783869558080.pdf
- Driouch, H., Roth, A., Dersch, P. e Wittmann, C. (2010). Optimized bioprocess for production of fructofuranosidase by recombinant *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(6), 2011–2024. doi: 10.1007/s00253-010-2661-9
- Ellis, D., Davis, S., Alexiou, H., Handke, R. e Bartley, R. (2007). *Descriptions of Medical Fungi* (2^a ed.). Australia: Adelaide Medical Centre for Women and Children.

- Environmental Protection Agency. (1997). Final decision document: TSCA section 5(H)(4) exemption for *Aspergillus niger*. Attachment I. Item #: 3171. Disponível a 6 de Outubro, 2015, em <http://www2.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/fra006.pdf>
- Ferracin, L. M., Fier, C. B., Vieira, M. L. C., Monteiro-Vitorello, C. B., Varani, A. D. M., Rossi, M. M., ... Fungaro, M. H. P. (2012). Strain-specific polyketide synthase genes of *Aspergillus niger*. *International Journal of Food Microbiology*, *155*(3), 137–145. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.020
- Frisvad, J. C., Larsen, T. O., Thrane, U., Meijer, M., Varga, J., Samson, R. A. e Nielsen, K. F. (2011). Fumonisin and Ochratoxin Production in Industrial *Aspergillus niger* Strains. *Plos One*, *6*(8), e23496. doi: 10.1371/journal.pone.0023496
- Frisvad, J. C., Smedsgaard, J., Samson, R. A., Larsen, T. O. e Thrane, U. (2007). Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(23), 9727–9732. doi: 10.1021/jf0718906
- Gheshlaghi, R., Scharer, J. M., Moo-Young, M. e Douglas, P. L. (2007). Metabolic flux analysis for optimizing the specific growth rate of recombinant *Aspergillus niger*. *Bioprocess Biosyst Eng*, *30*(6), 397–418. doi: 10.1007/s00449-007-0136-x
- Gilmore, B. F., Ceri, H. e Gorman, S. P. (2011). Laboratory evaluation of antimicrobial agents. In S. P. Denyer, N. Hodges, S. P. Gorman e B. Gilmore (Eds.), *Hugo & Russel's Pharmaceutical Microbiology* (8^a ed., pp. 293–311). Oxford: Wiley-Blackwell Publishing.
- Goldberg, I., Rokem, J. S. e Pines, O. (2006). Organic acids: old metabolites, new themes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *81*(10), 1601–1611. doi: 10.1002/jctb.1590
- Gopinath, S. C. B., Anbu, P., Lakshmipriya, T. e Hilda, A. (2013). Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. *BioMed Research International*, *2013*, 31–34. doi: 10.1155/2013/154549
- Gorman, S. P. e Gilmore, B. F. (2011). Chemical disinfectants, antiseptics and preservatives. In S. P. Denyer, N. Hodges, S. P. Gorman e B. Gilmore (Eds.), *Hugo & Russel's Pharmaceutical Microbiology* (8^a ed., pp. 312–333). Oxford: Wiley-Blackwell Publishing.
- Gowri, P. M. e Haribabu, K. (2011). Microbial transformation of (+)-heraclenin by *Aspergillus niger* and evaluation of its antiplasmodial and antimicrobial activities. *Current Science*, *100*(11), 1706–1711.

- Hashimoto, T., Noma, Y. e Asakawa, Y. (2001). Biotransformation of terpenoids from the crude drugs and animal origin by microorganisms. *Heterocycles*, 54(1), 529–59. doi: 10.3987/REV-00-SR(I)7
- Hatzinikolaou, D. G., Hansen, O. C., Macris, B. J., Tingey, A., Kekos, D., Goodenough, P. e Stougaard, A. (1996). A new glucose oxidase from *Aspergillus niger*: characterization and regulation studies of enzyme and gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 46(4), 371–381. doi: 10.1007/BF00166232
- Hatzinikolaou, D. G. e Macris, B. J. (1995). Factors regulating production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(6), 530–534. doi: 10.1016/0141-0229(95)91708-7
- He, X., Liu, B., Wang, G., Wang, X., Su, L., Qu, G. e Yao, X. (2006). Microbial metabolism of methyl protodioscin by *Aspergillus niger* culture—A new androstenedione producing way from steroid. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 100(1-3), 87–94. doi: 10.1016/j.jsbmb.2006.03.007
- He, X., Tang, J., Qiao, A., Wang, G., Jiang, M., Liu, R. H. e Yao, X. (2006). Cytotoxic biotransformed products from cinobufagin by *Mucor spinosus* and *Aspergillus niger*. *Steroids*, 71(5), 392–402. doi: 10.1016/j.steroids.2005.12.003
- Hirayama, M., Sumi, N. e Hidaka, H. (1989). Purification and properties of a fructooligosaccharide-producing β -fructofuranosidase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(3), 667–673. doi: 10.1271/bbb1961.53.667
- Houbraken, J., Vries, R. P. e Samson, R. A. (2014). Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Advances in Applied Microbiology*, 86, 199–249. doi: 10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4
- Hubka, V., Nováková, A., Kolařík, M., Jurjević, Ž. e Peterson, S. W. (2014). Revision of *Aspergillus* section Flavipedes: seven new species and proposal of section Jani sect. nov. *Mycologia*, 107(1), 169–208. doi: 10.3852/14-059
- Hutner, S. H. (1972). Inorganic nutrition. *Annual Review of Microbiology*, 26(90), 313–346. doi: 10.1146/annurev.mi.26.100172.001525
- Huttel, W. e Hoffmeister, D. (2010). Fungal Biotransformations in Pharmaceutical Sciences. In M. Hofrichter (Ed.), *The Mycota: Industrial Applications X* (2^a ed., pp. 293–317). Berlin: Springer.
- Idnurm, A. e Meyer, V. (2014). Welcome to Fungal Biology and Biotechnology. *Fungal Biology and Biotechnology*, 1(1), 8. doi: 10.1186/s40694-014-0008-5

- Ikeda, Y., Park, E. Y. e Okuda, N. (2006). Bioconversion of waste office paper to gluconic acid in a turbine blade reactor by the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 97(8), 1030–1035. doi: 10.1016/j.biortech.2005.04.040
- Infarmed. (2012). *Prontuário Terapêutico – 11*. (INFARMED, Ed.) (11^a ed.).
- Kamei, K. e Watanabe, A. (2005). *Aspergillus* mycotoxins and their effect on the host. *Medical Mycology*, 43(s1), 95–99. doi: 10.1080/13693780500051547
- Kavanagh, K. e Kelly, J. (2011). Fungi. In S. P. Denyer, N. Hodges, S. P. Gorman e B. Gilmore (Eds.), *Hugo & Russel's Pharmaceutical Microbiology* (8^a ed., pp. 44–48). Oxford: Wiley-Blackwell Publishing.
- Kniemeyer, O. (2011). Proteomics of eukaryotic microorganisms: The medically and biotechnologically important fungal genus *Aspergillus*. *Proteomics*, 11(15), 3232–3243. doi: 10.1002/pmic.201100087
- Kona, R. P., Qureshi, N. e Pai, J. S. (2001). Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. *Bioresource Technology*, 78(2), 123–126. doi: 10.1016/S0960-8524(01)00014-1
- Kriechbaum, M., Heilmann, H. J., Wientjes, F. J., Hahn, M., Jany, K. D., Gassen, H. G., ... Alaeddinoglu, G. (1989). Cloning and DNA sequence analysis of the glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* NRRL-3. *FEBS Letters*, 255(1), 63–66. doi: 10.1016/0014-5793(89)81061-0
- Krijghsheld, P., Bleichrodt, R., Veluw, G. J. van, Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J. e Wösten, H. A. B. (2013). Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 74(1), 1–29. doi: 10.3114/sim0006
- Krull, R., Cordes, C., Horn, H., Kampen, I., Kwade, A., Neu, T. R. e Nörtemann, B. (2010). Morphology of filamentous fungi: linking cellular biology to process engineering using *Aspergillus niger*. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*, 121(2), 1–21. doi: 10.1007/10_2009_60
- Kubicek, C. P., Punt, P. e Visser, J. (2010). Production of Organic Acids by Filamentous Fungi. In M. Hofrichter (Ed.), *The Mycota: Industrial Applications X* (2^a ed., pp. 215–230). Berlin: Springer.
- Kuivanen, J., Penttilä, M. e Richard, P. (2015). Metabolic engineering of the fungal D-galacturonate pathway for L-ascorbic acid production. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1–9. doi: 10.1186/s12934-014-0184-2

- Kulshrestha, S., Tyagi, P., Sindhi, V. e Yadavilli, K. S. (2013). Invertase and its applications – A brief review. *Journal of Pharmacy Research*, 7(9), 792–797. doi: 10.1016/j.jopr.2013.07.014
- Leeuwen, M. R. van, Krijgsheld, P., Bleichrodt, R., Menke, H., Stam, H., Stark, J., ... Dijksterhuis, J. (2013). Germination of conidia of *Aspergillus niger* is accompanied by major changes in RNA profiles. *Studies in Mycology*, 74(1), 59–70. doi: 10.3114/sim0009
- Li, T. H. e Chen, T.-L. (1994). Enhancement of glucose oxidase fermentation by addition of hydrocarbons. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 78(4), 298–303. doi: 10.1016/0922-338X(94)90361-1
- Lin, C.-Y., Huo, C., Kuo, L.-K., Hiipakka, R. a., Jones, R. B., Lin, H.-P., ... Chuu, C.-P. (2013). Cholestane-3 β , 5 α , 6 β -triol Suppresses Proliferation, Migration, and Invasion of Human Prostate Cancer Cells. *Plos One*, 8(6), e65734. doi: 10.1371/journal.pone.0065734
- Liu, J.-Z., Huang, Y. Y., Liu, J., Weng, L. P. e Ji, L. N. (2001). Effects of metal ions on simultaneous production of glucose oxidase and catalase by *Aspergillus niger*. *Lett.Appl.Microbiol.*, 32(1), 16–19. doi: 10.1111/j.1472-765X.2001.00851.x
- Liu, X., Chen, R., Xie, D., Mei, M., Zou, J., Chen, X. e Dai, J. (2012). Microbial transformations of taxadienes and the multi-drug resistant tumor reversal activities of the metabolites. *Tetrahedron*, 68(47), 9539–9549. doi: 10.1016/j.tet.2012.09.091
- Lu, F., Ping, K., Wen, L., Zhao, W., Wang, Z., Chu, J. e Zhuang, Y. (2015). Enhancing gluconic acid production by controlling the morphology of *Aspergillus niger* in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 50(9), 1342–1348. doi: 10.1016/j.procbio.2015.04.010
- Lu, J., Deng, S., Chen, H., Hou, J., Zhang, B., Tian, Y., ... Ma, X. (2013). Microbial transformation of cinobufotalin by *Alternaria alternata* AS 3.4578 and *Aspergillus niger* AS 3.739. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 89, 102–107. doi: 10.1016/j.molcatb.2012.12.015
- Malherbe, D. F., Toit, M. du, Otero, R. R. C., Rensburg, P. van e Pretorius, I. S. (2003). Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(5-6), 502–511. doi: 10.1007/s00253-002-1208-0
- Månsson, M., Klejnstrup, M. L., Phipps, R. K., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C., Gottfredsen, C. H. e Larsen, T. O. (2010). Isolation and NMR Characterization of Fumonisin B₂

- and a New Fumonisin B₆ from *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 949–953. doi: 10.1021/jf902834g
- Martins, J. E. C., Melo, N. T. e Heins-Vaccari, E. (2004). *Atlas de Micologia Médica* (1^a ed.). Barueri: Manole.
- Max, B., Salgado, J. M., Rodríguez, N., Cortés, S., Converti, A. e Domínguez, J. M. (2010). Biotechnological production of citric acid. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 862–875. doi: 10.1590/S1517-83822010000400005
- Meijer, M., Houbraeken, J. A. M. P., Dalhuijsen, S., Samson, R. A. e Vries, R. P. (2011). Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish *Aspergillus niger* and other black aspergilli. *Studies in Mycology*, 69(1), 19–30. doi: 10.3114/sim.2011.69.02
- Meyer, V. (2008). Genetic engineering of filamentous fungi - Progress, obstacles and future trends. *Biotechnology Advances*, 26(2), 177–185. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.001
- Meyer, V., Wu, B. e Ram, A. F. J. (2011). *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: Current status and perspectives. *Biotechnology Letters*, 33(3), 469–476. doi: 10.1007/s10529-010-0473-8
- Mirón, J., González, M. P., Pastrana, L. e Murado, M. A. (2002). Diauxic production of glucose oxidase by *Aspergillus niger* in submerged culture: A dynamic model. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(5), 615–620. doi: 10.1016/S0141-0229(02)00143-6
- Mirón, J., Vázquez, J. A., González, P. e Murado, M. A. (2010). Enhancement glucose oxidase production by solid-state fermentation of *Aspergillus niger* on polyurethane foams using mussel processing wastewaters. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(1), 21–27. doi: 10.1016/j.enzmictec.2009.07.008
- Mischak, H., Kubicek, C. P. e Röhr, M. (1985). Formation and location of glucose oxidase in citric acid producing mycelia of *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 21(1), 27–31. doi: 10.1007/BF00252357
- Mogensen, J. M., Nielsen, K. F., Samson, R. A., Frisvad, J. C. e Thrane, U. (2009). Effect of temperature and water activity on the production of fumonisins by *Aspergillus niger* and different *Fusarium* species. *BMC Microbiology*, 9(1), 281. doi: 10.1186/1471-2180-9-281

- Moksia, J., Larroche, C. e Gros, J.-B. (1996). Gluconate production by spores of *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 18(9), 1025–1030. doi: 10.1007/BF00129725
- Mukhopadhyay, R., Chatterjee, S., Chatterjee, B. P., Banerjee, P. C. e Guha, A. K. (2005). Production of gluconic acid from whey by free and immobilized *Aspergillus niger*. *International Dairy Journal*, 15(3), 299–303. doi: 10.1016/j.idairyj.2004.07.010
- Muñoz, K., Vega, M., Rios, G., Geisen, R. e Degen, G. H. (2011). Mycotoxin production by different ochratoxigenic *Aspergillus* and *Penicillium* species on coffee- and wheat-based media. *Mycotoxin Research*, 27(4), 239–247. doi: 10.1007/s12550-011-0100-0
- Murphy, R. A. e Horgan, K. A. (2005). Antibiotics, Enzymes and Chemical Commodities from Fungi. In K. Kavanagh (Ed.), *Fungi: Biology and Applications* (1^a ed., pp. 113–135). Chichester: Wiley.
- Nadeem, S., Ahmed, I., Mutalib, I. A., Tufail, M. e Khan, M. S. (2014). Citric Acid Future Prospects for Pakistan, a Short Review. *Applied Mechanics and Materials*, 625, 61–64. doi: 10.4028/www.scientific.net/AMM.625.61
- Nakamura, T., Nagatomo, Y., Hamada, S., Nishino, Y. e Ohta, K. (1994). Occurrence of two forms of extracellular endoinulinase from *Aspergillus niger* mutant 817. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 78(2), 134–139. doi: 10.1016/0922-338X(94)90251-8
- Namoodiri, V. M. e Chattopadhyaya, R. (2000). Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. *Lipids*, 35(5), 495–502.
- Nielsen, K. F., Mogensen, J. M., Johansen, M., Larsen, T. O. e Frisvad, J. C. (2009). Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(5), 1225–1242. doi: 10.1007/s00216-009-3081-5
- Ning, L., Qu, G., Ye, M., Guo, H., Bi, K. e Guo, D. (2003). Cytotoxic biotransformed products from triptonide by *Aspergillus niger*. *Planta Medica*, 69(9), 804–8. doi: 10.1055/s-2003-43220
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K. F., Frisvad, J. C. e Samson, R. A. (2009). Fumonisin B₂ production by *Aspergillus niger* in Thai coffee beans. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 26(1), 94–100. doi: 10.1080/02652030802366090

- Ohara, A., Castro, R. J. S. de, Nishide, T. G., Dias, F. F. G., Bagagli, M. P. e Sato, H. H. (2015). Invertase production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation: Focus on physical–chemical parameters, synergistic and antagonistic effects using agro-industrial wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1–8. doi: 10.1016/j.bcab.2015.06.008
- Okuno, Y. e Miyazawa, M. (2004). Biotransformation of nobiletin by *Aspergillus niger* and the antimutagenic activity of a metabolite, 4'-hydroxy-5,6,7,8,3'-pentamethoxyflavone. *Journal of Natural Products*, 67(11), 1876–1878. doi: 10.1021/np034007g
- Orabi, K. Y., Galal, A. M., Ibrahim, A. R., El-Feraly, F. S., Khalifa, S. I. e El-Sohly, H. N. (1999). Microbial metabolism of artemisitene. *Phytochemistry*, 51(2), 257–61. doi: 10.1016/S0031-9422(98)00770-5
- Ortergaard, L. H. e Olsen, H. S. (2010). Industrial Applications of Fungal Enzymes. In M. Hofrichter (Ed.), *The Mycota: Industrial Applications X* (2^a ed., pp. 269–290). Berlin: Springer.
- Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, 25(3), 244–263. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.01.002
- Pappenberger, G. e Hohmann, H.-P. (2014). Industrial Production of L-Ascorbic Acid (Vitamin C) and D-Isoascorbic Acid. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*, 143, 143–188. doi: 10.1007/10_2013_243
- Parshikov, I. A., Miriyala, B., Avery, M. A. e Williamson, J. S. (2004). Hydroxylation of 10-deoxoartemisinin to 15-hydroxy-10-deoxoartemisinin by *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 26(7), 607–10. doi: 10.1023/B:BILE.0000021965.55420.e9
- Parshikov, I. A., Miriyala, B., Muraleedharan, K. M., Avery, M. A. e Williamson, J. S. (2006). Microbial transformation of artemisinin to 5-hydroxyartemisinin by *Eurotium amstelodami* and *Aspergillus niger*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 33(5), 349–352. doi: 10.1007/s10295-005-0071-2
- Parshikov, I. A., Netrusov, A. I. e Sutherland, J. B. (2012). Microbial transformation of antimalarial terpenoids. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1516–1523. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.03.010
- Parshikov, I. A. e Sutherland, J. B. (2014). The use of *Aspergillus niger* cultures for biotransformation of terpenoids. *Process Biochemistry*, 49(12), 2086–2100. doi: 10.1016/j.procbio.2014.09.005

- Parshikov, I. A. e Sutherland, J. B. (2015). Biotransformation of Steroids and Flavonoids by Cultures of *Aspergillus niger*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(3), 903–923. doi: 10.1007/s12010-015-1619-x
- Parshikov, I. A., Woodling, K. A. e Sutherland, J. B. (2015). Biotransformations of organic compounds mediated by cultures of *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(17), 6971–6986. doi: 10.1007/s00253-015-6765-0
- Pel, H. J., Winde, J. H., Archer, D. B., Dyer, P. S., Hofmann, G., Schaap, P. J., ... Stam, H. (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology*, 25(2), 221–231. doi: 10.1038/nbt1282
- Pervaiz, I., Ahmad, S., Madni, M. A., Ahmad, H. e Khaliq, F. H. (2013). Microbial biotransformation: a tool for drug designing. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49(5), 437–450. doi: 10.1134/S0003683813050098
- Petta, T., Secatto, A., Faccioli, L. H. e Moraes, L. A. B. (2014). Inhibition of inflammatory response in LPS induced macrophages by 9-KOTE and 13-KOTE produced by biotransformation. *Enzyme and Microbial Technology*, 58-59, 36–43. doi: 10.1016/j.enzmictec.2014.02.011
- Pokorny, D., Friedrich, J. e Cimerman, A. (1994). Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 16(4), 363–366. doi: 10.1007/BF00245052
- Pollard, D. J. e Woodley, J. M. (2007). Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *Trends in Biotechnology*, 25(2), 66–73. doi: 10.1016/j.tibtech.2006.12.005
- Prakash, R. e Jha, S. N. (2014). Basics of the Genus *Aspergillus*. *International Journal of Research in Botany*, 4(2), 26–30. Disponível em http://urpjournals.com/tocjnls/30_14v4i2_2.pdf
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A. e Larroche, C. (2006). Gluconic Acid: Properties, Applications and Microbial Production. *Food Technol. Biotechnol.*, 44(2), 185–195.
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A. e Larroche, C. (2007). Spores of *Aspergillus niger* as reservoir of glucose oxidase synthesized during solid-state fermentation and their use as catalyst in gluconic acid production. *Letters in Applied Microbiology*, 44(2), 155–160. doi: 10.1111/j.1472-765X.2006.02051.x

- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A. e Larroche, C. (2008a). Fed-batch Production of Gluconic Acid by Terpene-treated *Aspergillus niger* Spores. *Appl Biochem Biotechnol*, 151(2-3), 413–423. doi: 10.1007/s12010-008-8209-0
- Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A. e Larroche, C. (2008b). Permeabilization and inhibition of the germination of spores of *Aspergillus niger* for gluconic acid production from glucose. *Bioresource Technology*, 99(11), 4559–4565. doi: 10.1016/j.biortech.2007.06.055
- Rao, D. S. e Panda, T. (1994). Critical analysis of the effect of metal ions on gluconic acid production by *Aspergillus niger* using a treated Indian cane molasses. *Bioprocess Engineering*, 10(2), 99–107. doi: 10.1007/BF00393392
- Raper, K. B. e Fennell, D. I. (1965). *The Genus Aspergillus* (1^a ed.). Baltimore: Williams and Wilkins. Disponível em <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Link=T&TableKey=1468261600000061&Rec=1089&Fields=All>
- Ribeiro, J. B., Sousa, L. M. A., Soares, M. D. V., Ramos, M. D. C. K. V., Neto, F. R. de A., Fraga, C. A. M., ... Antunes, O. A. C. (2006). Microbial reduction of α -acetyl- γ -butyrolactone. *Tetrahedron: Asymmetry*, 17(6), 984–988. doi: 10.1016/j.tetasy.2006.03.015
- Rodríguez-Dúran, L. V., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez, R., Prado-Barragán, L. A. e Aguilar, C. N. (2011). Optimization of Tannase Production by *Aspergillus niger* in Solid-State Packed-Bed Bioreactor. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(9), 960–967. doi: 10.4014/jmb.1103.03025
- Roehr, M. e Kubicek, C. P. (1996). Further Organic Acids. In H. Rehm e G. Reed (Eds.), *Biotechnology: Products of Primary Metabolism, Volume 6* (2^a ed., pp. 363–374). Weinheim: VCH.
- Roehr, M., Kubicek, C. P. e Komínek, J. (1996). Gluconic Acid. In H.-J. Rehm e G. Reed (Eds.), *Biotechnology: Products of Primary Metabolism, Volume 6* (2^a ed., pp. 347–362). Weinheim: VCH.
- Rogalski, J., Fiedurek, J., Szczordrak, J., Kapusta, K. e Leonowicz, A. (1988). Optimization of glucose oxidase synthesis in submerged cultures of *Aspergillus niger* G-13 mutant. *Enzyme and Microbial Technology*, 10(8), 508–511. doi: 10.1016/0141-0229(88)90030-0

- Romero-Gómez, S. J., Augur, C. e Viniegra-González, G. (2000). Invertase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*, 22(15), 1255–1258. doi: 10.1023/A:1005659217932
- Roukas, T. (2000). Citric and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 25(6), 298–304. doi: 10.1038/sj/jim/7000101
- Roukas, T. e Harvey, L. (1988). The effect of pH on production of citric and gluconic acid from beet molasses using continuous culture. *Biotechnology Letters*, 10(4), 289–294. doi: 10.1007/BF01024422
- Rubio, M. C. e Maldonado, M. C. (1995). Purification and Characterization of Invertase from *Aspergillus niger*. *Current Microbiology*, 31(2), 80–83. doi: 10.1007/BF00294280
- Samson, R. A., Hong, S.-B. e Frisvad, J. C. (2006). Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology*, 44(1), 133–148. doi: 10.1080/13693780600913224
- Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S.-B., Hubka, V., Klaassen, C. H. W., ... Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 78, 141–173. doi: 10.1016/j.simyco.2014.07.004
- Schmeda-Hirschmann, G., Astudillo, L. e Palenzuela, J. A. (2004). Biotransformation of solidagenone by *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger* and *Curvularia lunata* cultures. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20(1), 93–97. doi: 10.1023/B:WIBI.0000013317.60257.33
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C. e Dijck, P. W. M. van. (2002). On the safety of *Aspergillus niger* - a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(4-5), 426–35. doi: 10.1007/s00253-002-1032-6
- Severiano, M. E., Simão, M. R., Ramos, H. P., Parreira, R. L. T., Arakawa, N. S., Said, S., ... Ambrósio, S. R. (2013). Biotransformation of ent-pimaradienoic acid by cell cultures of *Aspergillus niger*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21(18), 5870–5875. doi: 10.1016/j.bmc.2013.07.009
- Shahwar, D., Raza, M. A., Ali, T. e Ahmad, V. U. (2011). Microbial transformation of vanillin isolated from *Melia azedarach* to vanillyl alcohol followed by protease inhibition and antioxidant activity. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, 33(5), 715–719.

- Sharif, F. A. e Alaeddinoglu, N. (1992). Expression and overproduction of glucose oxidase in *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(1), 115–116. doi: 10.1007/BF00169429
- Sharma, A., Vivekanand, V. e Singh, R. P. (2008). Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support. *Bioresource Technology*, 99(9), 3444–3450. doi: 10.1016/j.biortech.2007.08.006
- Sharma, R., Chisti, Y. e Banerjee, U. C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19(8), 627–662. doi: 10.1016/S0734-9750(01)00086-6
- Sharma, S., Agarwal, L. e Saxena, R. K. (2007). Statistical optimization for tannase production from *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *Indian Journal of Microbiology*, 47(2), 132–138. doi: 10.1007/s12088-007-0026-6
- Shen, Y.-C., Lo, K.-L., Lin, C.-L. e Chakraborty, R. (2003). Microbial transformation of baccatin VI and 1 β -Hydroxy baccatin I by *Aspergillus niger*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13(24), 4493–4496. doi: 10.1016/j.bmcl.2003.08.069
- Shindia, A. A., El-Sherbeny, G. A., El-Esawy, A. E. e Sheriff, Y. (2006). Production of Gluconic Acid by Some Local Fungi. *The Korean Society of Mycobiology*, 34(1), 22–29. doi: 10.4489/MYCO.2006.34.1.022
- Shu, Z.-Y., Yang, J.-K. e Yan, Y.-J. (2007). Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus niger* F044. *Chinese Journal of Biotechnology*, 23(1), 96–100. doi: 10.1016/S1872-2075(07)60007-7
- Simões, M. F., Santos, C. e Lima, N. (2013). Structural Diversity of *Aspergillus* (Section Nigri) Spores. *Microscopy and Microanalysis*, 19(5), 1151–8. doi: 10.1017/S1431927613001712
- Singh, P. e Gill, P. K. (2006). Production of inulinases: Recent advances. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 151–162.
- Singh, O. V., Jain, R. K. e Singh, R. P. (2003). Gluconic acid production under varying fermentation conditions by *Aspergillus niger*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 78(2-3), 208–212. doi: 10.1002/jctb.748
- Singh, O. V., Kapur, N. e Singh, R. P. (2005). Evaluation of agro-food byproducts for gluconic acid production by *Aspergillus niger* ORS-4.410. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(4), 519–524. doi: 10.1007/s11274-004-2395-

- Singh, O. V. e Kumar, R. (2007). Biotechnological production of gluconic acid: Future implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(4), 713–722. doi: 10.1007/s00253-007-0851-x
- Singh, O. V., Sharma, A. e Singh, R. P. (2001a). Gluconic acid production by *Aspergillus niger* mutant ORS-4.410 in submerged and solid state surface fermentation. *Indian Journal of Experimental Biology*, 39(7), 691–696.
- Singh, O. V., Sharma, A. e Singh, R. P. (2001b). Optimisation of fermentation conditions for gluconic acid production by a mutant of *Aspergillus niger*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 39(11), 1136–1143.
- Singh, O. V. e Singh, R. P. (2006). Bioconversion of grape must into modulated gluconic acid production by *Aspergillus niger* ORS-4.410. *Journal of Applied Microbiology*, 100(5), 1114–1122. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02870.x
- Skowronek, M. e Fiedurek, J. (2003). Selection of biochemical mutants of *Aspergillus niger* resistant to some abiotic stresses with increased inulinase production. *Journal of Applied Microbiology*, 95(4), 686–692. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02027.x
- Skowronek, M. e Fiedurek, J. (2006). Purification and properties of extracellular endoinulinase from *Aspergillus niger* 20 OSM. *Food Technology and Biotechnology*, 44(1), 53–58.
- Smith, M. W., Birchall, J. C. e Coulman, S. A. (2011). The wider contribution of microbiology to the pharmaceutical sciences. In S. P. Denyer, N. Hodges, S. P. Gorman e B. Gilmore (Eds.), *Hugo & Russel's Pharmaceutical Microbiology* (8^a ed., pp. 446–476). Oxford: Wiley-Blackwell Publishing.
- Soccol, C. R., Vandenberghe, L. P. S. e Rodrigues, C. (2006). New Perspectives for Citric Acid Production and Application. *Food Technol. Biotechnol*, 44(2), 141–149. doi: 1330-9862
- Species Fungorum. (2014). Detalhes das espécies: *Aspergillus niger* Tiegh. 1867. Disponível a 21 de Agosto, 2015, em <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/ea00b3b8c44dbcf76443e20f78411dc2>
- Stanbury, P. F., Whitaker, A. e Hall, S. J. (1999). *Principles of Fermentation Technology* (2^a ed.). Burlington: Butterworth-Heinemann.
- Sugihara, A. e Shimada, Y. (1988). Purification and Characterization of *Aspergillus niger* Lipase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(6), 1591–1592.

- Swain, M. R., Ray, R. C. e Patra, J. K. (2012). Citric Acid: Microbial Production and Applications in Food and Pharmaceutical Industries. In D. A. Vargas e J. V. Medina (Eds.), *Citric Acid: Synthesis, Properties and Applications* (1^a ed., pp. 97–118). Nova Science Publisher.
- Swart, K., Vondervoort, P. J. I. van de, Witteveen, C. F. B. e Visser, J. (1990). Genetic localization of a series of genes affecting glucose oxidase levels in *Aspergillus niger*. *Current Genetics*, 18(5), 435–439. doi: 10.1007/BF00309913
- Tieghem, V. (1867). *Annales des Sciences Naturelles cinquième série. Botanique. VIII*. Paris: Victor Masson et fils, place de l'École-de-Médecine.
- Toscano, L., Gochev, V., Montero, G. e Stoytcheva, M. (2011). Enhanced Production of Extracellular Lipase by Novel Mutant Strain of *Aspergillus Niger*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25(1), 2243–2247. doi: 10.5504/BBEQ.2011.0019
- Vassilev, N. B., Vassileva, M. C. e Spassova, D. I. (1993). Production of gluconic acid by *Aspergillus niger* immobilized on polyurethane foam. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39(3), 285–288. doi: 10.1007/BF00192079
- Verdenelli, M. C., Cecchini, C., Orpianesi, C., Dadea, G. M. e Cresci, A. (2003). Efficacy of antimicrobial filter treatments on microbial colonization of air panel filters. *Journal of Applied Microbiology*, 94(1), 9–15. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01820.x
- Wang, J. (2008). Electrochemical glucose biosensors. *Electrochemical Sensors, Biosensors and Their Biomedical Applications*, 108(2), 57–69. doi: 10.1016/B978-012373738-0.50005-2
- Wang, Y.-L., Wang, H., Lu, Y.-X., Cheng, X.-C., Han, L.-L., Yaun, S.-J., ... Wu, C.-T. (2009). Microbial transformation of epothilone A by *Aspergillus niger* AS3.739. *Journal of Asian Natural Products Research*, 11, 357–364.
- Web of Science. (s.d.).
- West, T. P. (2011). Malic acid production from thin stillage by *Aspergillus* species. *Biotechnology Letters*, 33(12), 2463–2467. doi: 10.1007/s10529-011-0720-7
- West, T. P. (2015). Fungal biotransformation of crude glycerol into malic acid. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 70(5-6), 1–3. doi: 10.1515/znc-2015-0115
- Wie, H. J., Zhao, H. L., Chang, J. H., Kim, Y. S., Hwang, I. K. e Ji, G. E. (2007). Enzymatic modification of Saponins from *Platycodon grandiflorum* with *Aspergillus niger*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 8908–8913. doi: 10.1021/Jf0716937

- Witt, S., Wohlfahrt, G., Schomburg, D., Hecht, H. J. e Kalisz, H. M. (2000). Conserved arginine-516 of *Penicillium amagasakiense* glucose oxidase is essential for the efficient binding of beta-D-glucose. *The Biochemical Journal*, 347(2), 553–559. doi: 10.1042/0264-6021:3470553
- Witteveen, C. F. B., Veenhuis, M. e Visser, J. (1992). Localization of glucose oxidase and catalase activities in *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(4), 1190–1194.
- Witteveen, C. F. B., Vondervoort, P. J. I. van de, Broeck, H. C. van den, Engelenburg, F. A. C. van, Graaff, L. H., Hillebrand, M. H. B. C., ... Visser, J. (1993). Induction of glucose oxidase, catalase, and lactonase in *Aspergillus niger*. *Current Genetics*, 24(5), 408–416. doi: 10.1007/BF00351849
- Wong, C. M., Wong, K. H. e Chen, X. D. (2008). Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(6), 927–938. doi: 10.1007/s00253-008-1407-4
- Yadav, S., Yadav, R. S. S., Yadava, S. e Yadav, K. D. S. (2011). Stereoselective hydroxylation of ethylbenzene to (R)-1-phenylethanol using mycelia of *Aspergillus niger* as catalyst. *Catalysis Communications*, 12(9), 781–784. doi: 10.1016/j.catcom.2011.01.020
- Yang, L., Chang, S.-F., Lin, W.-K., Chou, B.-H., Wang, L.-H., Liu, P.-C. e Lin, S.-J. (2012). Oxygenated compounds from the bioconversion of isostevic acid and their inhibition of TNF- α and COX-2 expressions in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. *Phytochemistry*, 75, 90–98. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.12.006
- Yang, R.-L., Jia, T.-L. e Zhang, R.-Q. (2005). Microbial transformation of fraxinellone by *Aspergillus niger*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 7(6), 843–845. doi: 10.1080/10286020310001653318
- Yang, Z., Tang, Y., Li, J., Zhang, Y. e Hu, X. (2014). Facile synthesis of tetragonal columnar-shaped TiO₂ nanorods for the construction of sensitive electrochemical glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 528–533. doi: 10.1016/j.bios.2013.11.043
- Yu, J.-H. (2010). Regulation of Development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Mycobiology*, 38(4), 229. doi: 10.4489/MYCO.2010.38.4.229
- Zetelaki, K. (1968). The role of aeration and agitation in the production of glucose oxidase in submerged culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 12(1), 379–397. doi: 10.1002/bit.260100104

- Zetelaki, K. (1970). The role of aeration and agitation in the production of glucose oxidase in submerged culture. II. *Biotechnology and Bioengineering*, 10(3), 379–397.
- Zhan, Y., Liu, H., Wu, Y., Wei, P., Chen, Z. e Williamson, J. S. (2015). Biotransformation of artemisinin by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(8), 3443–3446. doi: 10.1007/s00253-015-6464-x
- Zhihong, L., Kunlun, H. e Yunbo, L. (2015). Ochratoxin A and ochratoxin-producing fungi on cereal grain in China: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(4), 461–470. doi: 10.1080/19440049.2014.996787
- Znad, H., Markoš, J. e Baleš, V. (2004). Production of gluconic acid from glucose by *Aspergillus niger*: Growth and non-growth conditions. *Process Biochemistry*, 39(11), 1341–1345. doi: 10.1016/S0032-9592(03)00270-X