

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

INFLUÊNCIA DO ESTRESSE FÍSICO-QUÍMICO E BIOLÓGICO
NA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS POR *Penicillium sclerotiorum*
LM 5679

RODRIGO RIBEIRO CRUZ SANTOS

MANAUS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RODRIGO RIBEIRO CRUZ SANTOS

INFLUÊNCIA DO ESTRESSE FÍSICO-QUÍMICO E BIOLÓGICO
NA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS POR *Penicillium sclerotiorum*
LM 5679

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Vicente de Souza Braga

MANAUS

2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S237i Santos, Rodrigo Ribeiro Cruz
Influência do estresse físico-químico e biológico na produção de pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 / Rodrigo Ribeiro Cruz Santos. 2018
57 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: João Vicente Braga de Souza
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. fungos amazônicos. 2. colorantes naturais. 3. estresse abiótico.
4. estresse biótico. I. Souza, João Vicente Braga de II. Universidade
Federal do Amazonas III. Título

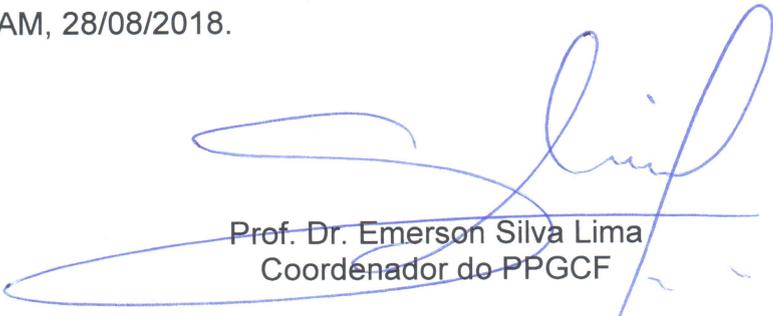
“Influência do estresse físico-químico e biológico na produção de pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* L.M 5679”.

DISCENTE: Rodrigo Ribeiro Cruz Santos

PARECER:

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 28/08/2018.

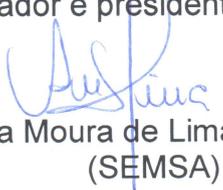


Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coordenador do PPGCF

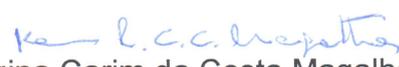
A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:



Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza
Orientador e presidente da banca



Profª. Drª. Alita Moura de Lima - Membro externo
(SEMSA)



Profª. Drª. Karen Regina Carim da Costa Magalhães - Membro interno (UFAM)

AGRADECIMENTOS

Muito obrigado a todos que me ajudaram! Desde um simples sorriso aos que estiveram e estão ao meu lado nesta jornada e não me deixaram desistir.

RESUMO

Colorantes de origem natural acompanharam o desenvolvimento humano, mas, com o avanço tecnológico, surgiram os colorantes sintéticos, mais fáceis de serem obtidos por não dependerem da sazonalidade comum às plantas, que ainda são as principais fontes de colorantes naturais. Atualmente, os colorantes sintéticos atualmente não são tão desejados, haja vista alguns estudos apontarem tais corantes como causadores de problemas de saúde como alergias, e de problemas ambientais, por se tratarem de substâncias de difícil degradação natural, gerando uma busca para o retorno ao natural. Fungos possuem uma relação milenar na produção de colorantes, é o caso do *angkak*, um tipo de arroz fermentado por fungos do gênero *Monascus*, um alimento adotado por alguns povos asiáticos. Na busca por novos colorantes de origem fúngica, em trabalhos deste grupo foram isolados e identificados alguns fungos para esta finalidade, sendo *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 um dos mais promissores, motivo pelo qual se tornou o foco deste trabalho. Este trabalho tem o objetivo de estudar a influência de estresses abióticos e bióticos na produção de colorante. Para estudar os estresses abióticos foi realizado cultivo em meio submerso com análise univariada dos fatores: pH, temperatura, tamanho do inóculo, atividade de água, osmolaridade, velocidade de agitação e exposição a luz. Para os estresses bióticos, foi realizado o mesmo bioprocessamento realizando inoculação simultânea, co-cultura, de *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli* com *P. sclerotiorum* LM 5679. Os níveis de colorantes foram estimados por espectroscopia no ultravioleta visível (UV/VIS), a biomassa de alguns experimentos também foi estimada. Dentre os fatores analisados nenhum superou a quantidade de pigmento produzido no bioprocessamento adotado como padrão, os valores mais altos foram obtidos nos testes conduzidos em pH 3 e tamanho de inóculo de 10^6 células/mL. Os resultados apontam que não há relação entre a quantidade de pigmento e a concentração de biomassa. A importância deste trabalho foi de expor como os fatores de estresse influenciam na produção de pigmento por *P. sclerotiorum* LM 5679 e, por isso, esses fatores devem ser investigados com foco na otimização do bioprocessamento.

Palavras-chave: Fungos amazônicos; colorantes naturais; estresse abióticos; estresse biótico

ABSTRACT

Colorants of natural origin accompanied human development, but with the technological advance synthetic dyes appeared, easier to obtain because they did not depend on the seasonality common to plants, which are still the main sources of natural dyes. Synthetic dyes are not so desired today, some studies point them as causing health problems such as allergies and environmental problems because they are substances of difficult natural degradation, generating a quest for the return to natural. Fungi have a far relation in the production of dyes, this is the case of *angkak*, a type of rice fermented by fungi of the genus *Monascus*, a food adopted by some Asian countries. In the search for new colorants of fungal origin, our research group have been working identifying some fungi for this purpose, being *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 one of the most promising, became the focus of this work. A small curiosity observed during the purification of this fungi was that it had a more intense coloration when it was not pure. This work aims to study the influence of abiotic and biotic stresses on dye production. To study the abiotic stresses, a submerged culture was performed with univariate analysis of the factors: pH, temperature, inoculum size, water activity, osmolarity and light exposure. For the biotic stresses, the same bioprocess was carried out by simultaneous inoculation, co-culture, of *C. albicans*, *S. aureus* and *E. coli* with *P. sclerotiorum* LM 5679. The concentration of pigments was estimated by UV-VIS Spectrophotometry, the biomass of some experiments was also estimated. Among the analyzed factors none exceeded the amount of pigment produced by the standard bioprocess, the highest values were obtained in the tests conducted at pH 3 and inoculum size of 10^6 cells/mL. The results indicate that there is no relationship between the amount of pigment and the concentration of biomass. This work presents how the stress factors have influence on the bioprocess, it is necessary more to conduct more investigation focusing on the optimization of the bioprocess. The importance of this work was to explain how the stress factors influence the production of pigment by *P. sclerotiorum* LM 5679 and should be investigated with a focus on the optimization of the bioprocess.

Keywords: Amazonian fungi; natural colorant; biotic stress; abiotic stress

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais colorantes naturais permitidos no Brasil para uso alimentar, farmacêutico, cosmético e animal.	13
Tabela 2 – Classificação de alguns compostos coloridos encontrados em fungos.....	16
Tabela 3 - Exemplo de substâncias coloridas produzidas por <i>P. sclerotiorum</i>	21

ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Aw – Atividade de água

CGEN – Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

CNNPA – Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos

FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação

g – Grama

GMC – Grupo Mercado Comum

INS – Sistema de Numeração Internacional de Aditivos Alimentares

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mg – Miligramas

mL – Mililitro

nm – Nanômetro

OMS – Organização Mundial da Saúde

pH – Potencial Hidrogeniônico

PKS – Policetídeo sintase

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

RPM – Rotações por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO	11
2.1 Colorantes	11
2.2 Fungos produtores de pigmentos	15
2.3 Fungos Amazônicos	17
2.4 Bioprocesso e pigmentos	18
2.5 Pigmentos produzidos por <i>P. sclerotiorum</i>	20
2.6 Estresses microbiológicos	21
3 OBJETIVOS	25
3.1 Geral	25
3.2 Específicos	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Micro-organismos	26
4.2 Procedimentos	27
4.2.1 Influência de estresse físico-químico na produção de pigmentos	27
4.2.2 Influência do estresse biológico na produção de pigmentos	28
4.3 Métodos analíticos	28
4.3.1 Extração de pigmento	28
4.3.3 Estimativa do pigmento	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÃO	52
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

Diante do crescimento econômico mundial que acompanhamos, verifica-se que alimentos, medicamentos e cosméticos são produtos amplamente consumidos. Para tornar estes produtos de interesse do consumidor, são utilizadas substâncias que possam prover características aos mesmos, tais como cor, sabor e validade elevada. Os colorantes são substâncias que apresentam cor no espectro do visível sendo utilizados em diversos produtos para aumentar a sua atratividade. Sua origem pode ser sintética ou natural, os primeiros, são os mais utilizados, mas estão relacionados a problemas de saúde e ambientais (VERMA, GUPTA, 2017).

A busca por novos colorantes naturais se justifica por apresentarem menor toxicidade em sua produção e em seu descarte quando comparado aos sintéticos (GAUTAM, 2016). Eles são mais desejados para serem utilizados nas indústrias de alimentos e farmacêutica por serem considerados mais seguros, além disso as restrições impostas pela legislação vigente sobre os colorantes sintéticos também reforçam a busca por novos colorantes naturais. Os colorantes de origem biológica têm sido obtidos de animais, plantas, bactérias e fungos (TULI *et al.* 2015).

Diversas revisões especializadas vêm ressaltando o potencial da utilização de colorantes de origem fúngica (DUFOSSÉ *et al.* 2014; MÉRILLON, RAMAWAT, 2017; PATAKOVA, 2013). Os colorantes de origem fúngica mais utilizados são os obtidos dos fungos do gênero *Monascus* e *Penicillium*. Esses corantes são principalmente policetídeos, especificamente azafilonas. Estudos recentes sugerem que o estresse fúngico de origem física, química e biológica pode ser utilizado como ferramenta para obtenção de produtos

biotecnológicos em maior quantidade (BERTRAND *et al.* 2013; BRAGA *et al.* 2015; WANG *et al.* 2017)

A Amazônia é a floresta tropical que abriga a maior diversidade vegetal e animal do mundo. Apesar dessa riqueza, poucos estudos foram realizados na prospecção de fungos produtores de colorantes (CELESTINO *et al.* 2014; SANTOS-EBINUMA *et al.* 2014; SANTOS-EBINUMA, TEIXEIRA, PESSOA, 2013) e nenhum foi realizado investigando a influência de fatores de estresse na produção desses colorantes por fungos. No grupo de pesquisa do Laboratório de Micologia do INPA, Oliveira *et al.* (2017), partindo do *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 isolou e identificou um alquilresorcinol (5-pentadacilresorcinol) de cor amarela. Essa espécie é conhecida produtora de colorantes policetídeos e não existem estudos avaliando a influência de estresse físico, químico e biológico em sua produção.

A realização de estudos deste tipo visa encontrar quais fatores estressantes podem ser mais relevantes na produção dos colorantes produzidos por *P. sclerotiorum* LM 5679, abrindo as portas para estudos vindouros objetivando a produção e otimização destes colorantes em maior escala. Diante dessa realidade, o presente trabalho tem como objetivo investigar a influência de fatores de estresse abióticos (físico-químicos) e bióticos (interações ecológicas) na produção de colorantes por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Colorantes

A cor é uma percepção visual provocada pela ação de um feixe de fótons sobre células especializadas, as células cone da retina. Transmitindo através de informação pré-processada ao nervo óptico, impressões para o sistema nervoso (HALL, 2015). Cada cor está relacionada com os diferentes comprimentos de onda do espectro eletromagnético. O espectro visível percebido pelas pessoas e por alguns animais varia entre 380 e 750 nanômetros. As cores que vemos resultam das propriedades químicas e físicas dos objetos em refletir apenas um tipo de cor (KOENDERINK, 2010).

As substâncias coloridas podem ser classificadas quanto a sua origem, em sintética ou natural, e quanto ao tipo de sua molécula, em orgânica e inorgânica, é comum, no entanto, que estas substâncias estejam classificadas nos dois grupos, por exemplo, vermelho de cochonilha é um colorante natural e orgânico pois é derivado de um inseto e apresenta estrutura molecular à base de carbono. Estas substâncias possuem em sua molécula um grupo cromóforo, grupo de átomos responsável pela cor que enxergamos no espectro visível (KOENDERINK, 2010).

As cores proporcionam uma aparência atrativa a produtos comercializáveis, tais como produtos alimentares, têxteis e produtos farmacêuticos. Neste foco a indústria investe em tecnologias para a obtenção e desenvolvimento de produtos coloridos chamativos para o consumidor. Arqueólogos acreditam que os colorantes passaram a ser empregados em alimentos por volta de 1500 A.C., sendo obtidos a partir de fontes naturais, como a páprica, açafrão, pétalas de flores, extrato de beterraba, entre outros (BURROWS, 2009).

Os colorantes são amplamente utilizados pela indústria têxtil, alimentícia, farmacêutica e para colorir os bens e objetos ao nosso redor. Eles podem ser classificados de formas diversas, como, por exemplo, corantes ou pigmentos quando solúveis ou insolúveis no meio em que estão, respectivamente. Os colorantes que mais impactam o meio ambiente são os utilizados pela indústria têxtil, que, em sua maioria, pertencem ao grupo azóico (GHALY *et al.* 2014).

No Brasil a regulação do uso de colorantes é conduzido por legislações próprias para cada área de aplicação. Para a indústria têxtil é utilizado a Resolução do CONAMA N. 430, de 2011, onde são estabelecidos parâmetros ideais para o descarte de resíduos líquidos, mas também podem ser reguladas por legislações estaduais. Colorantes permitidos em cosméticos, perfumes e produtos de higiene pessoal estão listados na RDC N. 44, de 2012 de acordo com Regulamento Técnico Mercosul, sendo que esta legislação não o abrange uso de corantes em medicamentos, a qual está sujeita a critérios dispostos na Farmacopeia Brasileira ou, ainda, em Boas Práticas de Fabricação e Farmacopeias Internacionais.

Na indústria de alimentos cabe a Resolução do CNNPA N. 44, de 1977, atualizada pelo Informe Técnico n. 68, de 2015 da ANVISA e harmonizada pela Resolução N. 11, de 2006 do GMC onde os colorantes permitidos se encontram listados e classificados em: corantes orgânicos naturais, corantes orgânicos sintéticos e corantes inorgânicos. A regulação das quantidades permitidas no Brasil para cada tipo de alimento se encontra no *Codex Alimentarius* da FAO/OMS. A indústria de alimentos para animais segue a Instrução Normativa Nº 42/2010 do MAPA onde estão listados os colorantes permitidos e não há restrição ou limites para os mesmos. Alguns dos principais colorantes comuns a todas estas áreas se encontram na Tabela 1.

INS	Corante
100 I	Cúrcuma, curcumina
101 I	Riboflavina
101 II	Riboflavina 5' fosfato de sódio
120	Carmim, cochonilha, ácido carmínico, sais.
141 I	Clorofila cúprica
141 II	Clorofilina cúprica, sais.
150a	Caramelo I – simples
150b	Caramelo II – processo sulfito cáustico
150c	Caramelo III – processo amônia
150d	Caramelo IV – processo sulfito-amônia
160a I	Beta-caroteno (sintético idêntico ao natural)
160a II	Carotenos: extratos naturais
160b	Urucum, bixina, norbixina, annatto extrato e sais.
160c	Páprica, capsorubina, capsantina
160d	Licopeno
160e	Beta-apo-8' - carotenal
160f	Ester metílico ou etílico do ácido beta-apo-8' carotenóico
161b	Luteína
161g	Cantaxantina
162	Vermelho de beterraba, betanina
163 I	Antocianinas (de frutas e hortaliças)
163 II	Extrato de casca de uva

Tabela 1 – Principais colorantes naturais permitidos no Brasil para uso alimentar, farmacêutico, cosmético e animal.

Fonte: (BRASIL, 1977, 2006, 2010, 2015; OMS, 2016)

Os colorantes sintéticos enfrentam hoje uma legislação muito mais severa, que tem reduzido o número de substâncias que podem ser usadas em alimentos pelos efeitos prejudiciais à saúde a curto ou longo prazo (MAPARI, THRANE, MEYER, 2010). No entanto, esses aditivos ainda são os mais utilizados pela indústria de alimentos, porque são mais baratos e mais estáveis frente a temperatura, pH e exposição à luz (KANAREK, 2011).

Na indústria têxtil, a substituição desses corantes por outros de fonte não-sintética também seria viável pela diminuição da toxicidade ambiental gerada, porquanto essas indústrias utilizam extensamente os corantes como matéria-prima, e por isso geram uma grande quantidade de resíduos tóxicos (GHALY *et al.* 2014; MIRJALILI, NAZARPOOR, KARIMI, 2011). Esses resíduos podem contaminar o solo e as fontes naturais de água, sendo responsáveis por causar sérios problemas de poluição ambiental (GHALY *et al.* 2014; MIRJALILI, NAZARPOOR, KARIMI, 2011).

Alguns colorantes sintéticos são derivados do petróleo, e, em sua maioria são xenobióticos, ou seja, os micro-organismos ambientais não contêm enzimas específicas para a degradação deste tipo de composto. Já os corantes naturais são mais fáceis de serem biodegradados, evitando o seu acúmulo na natureza (ALI, 2010; MIRJALILI, NAZARPOOR, KARIMI, 2011).

A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos - EFSA é o órgão governamental de maior destaque ao investigar os malefícios causados pelos colorantes sintéticos. Sendo responsável por proibições, restrição de uso e diminuição de quantidades limites. Os efeitos adversos relacionados a estes colorantes são reações alérgicas (FEKETE, TSABOURI, 2017) e hiperatividade em crianças (BURROWS, 2009), porém, ainda é necessário mais estudos para entender como o bioacúmulo de diversos colorantes afetam o nosso organismo.

Na busca para solucionar o perigo relacionado pelos colorantes sintéticos, há um interesse mundial no processo e desenvolvimento de pigmentos de fontes naturais. As plantas são as principais fontes de pigmentos naturais, no entanto, os pigmentos naturais das plantas também têm inconvenientes, tais como: fotoestabilidade, calor ou pH adverso, baixa solubilidade em água e, muitas vezes, não estão disponíveis ao longo do ano, dependendo da sazonalidade da planta.

2.2 Fungos produtores de pigmentos

Os pigmentos encontrados em fungos geralmente estão relacionados ao seu metabolismo secundário. Estas substâncias auxiliam na sobrevivência do fungo como a melanina, que confere proteção ambiental, já os carotenoides conferem proteção contra foto-oxidação enquanto que as flavinas atuam como cofatores enzimáticos (MÉRILLON, RAMAWAT, 2017). A produção de pigmentos por fungos também pode estar relacionada com a produção de outras substâncias como micotoxinas, isto justifica a cautela de algumas agências reguladoras em aprovar o seu uso comercial, pois, normalmente, é necessário maior quantidade de colorantes naturais para atingir a cor desejada quando comparado com os colorantes sintéticos (CAROCHO, MORALES, FERREIRA, 2015).

As famílias fúngicas que se destacam na produção de pigmentos de interesse comercial são Monascaceae (gênero *Monascus* spp.) e Trichomaceae (gêneros *Penicillium*, *Talaromyces*, *Aspergillus*, *Emericella*, *Eurotium* e *Paecilomyces*). Espécies de outras famílias também se destacam como *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Mucor* sp., *Blakeslea trispora*, *Ashbya gossypii*. Também é de interesse científico os fungos filamentosos de origem marinha, pois geralmente apresentam características únicas por se encontrarem em um ambiente adverso (MÉRILLON, RAMAWAT, 2017).

Os principais pigmentos fúngicos são produtos do metabolismo secundário de fungos, destacando os policetídeos e os terpenos. A melanina é um pigmento pouco conhecido quimicamente, devido a sua dificuldade em ser extraída e caracterizada logo não é utilizado em bioprocessos. A riboflavina ou vitamina E não faz parte do metabolismo secundário fúngico mas é produzida e comercializada como pigmento sendo obtida a partir do fungo

filamentoso *Ashbya gossypi* (MÉRILLON, RAMAWAT, 2017). Na Tabela 2 é mostrado grupos e classes químicas, nome da substância e dos fungos que as produzem.

Grupos	Classes	Substância	Fungo
Policetídeos	Azafilonas	Monascina e Ankaflavina	<i>Monascus purpureus</i>
	Naftoquinonas	Bikaverina	<i>Fusarium oxysporum</i>
	Antraquinonas	Arpink Red TM	<i>Penicillium oxalicum</i>
Terpenos	Carotenoides	Licopeno	<i>Fusarium sporotrichioides</i>
Compostos derivados dos aminoácidos	Melanina	-	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	Flavinas	Riboflavina	<i>Ashbya gossypii</i>

Tabela 2 – Classificação de alguns compostos coloridos encontrados em fungos.

Fonte: Adaptado de Dufossé (2006); Malik, Tokkas, Goyal (2012); Mérillon, Ramawat, (2017).

A produção e comercialização de pigmentos fúngicos pela indústria ocorre com alguns fungos filamentosos. Em alimentos, destaca-se *Blakeslea trispora* para produção de beta-caroteno, que se encontra acumulado em sua biomassa através de bioprocessos em meio submerso. Pigmentos tipo *Monascus* como a ankaflavina são usados para colorir carnes e seus processados. Em cosméticos também existe uso de pigmentos tipo *Monascus* para uso em batom com patente registrada. Já para uso têxtil, existem menores restrições para a aplicação de pigmentos fúngicos, um exemplo é o uso de *Isaria* spp., *Emericella* spp., *Penicillium* spp., *Monascus* spp. e *Fusarium* spp. para colorir couro (MÉRILLON, RAMAWAT, 2017).

A temática dos últimos trabalhos publicados sobre pigmentos abordam a descoberta de: novos pigmentos (ABREU *et al.* 2016); identificação de quais pigmentos são produzidos por fungos isolados de regiões específicas (ABREU *et al.* 2016); e influência de substratos e fatores físico-químico na produção de pigmentos (CELESTINO *et al.* 2014; SANTOS-EBINUMA *et al.* 2014).

2.3 Fungos Amazônicos

A Floresta Amazônica é a maior floresta tropical do mundo e possui a maior biodiversidade dentre elas (CHEN, ISHWARAN, PEZZUTI, 2016). Possui área de 5.500.000 Km² abrangendo 9 países, dos quais 60% pertencem ao Brasil (CHEN, ISHWARAN, PEZZUTI, 2016). Devido a sua dimensão e densidade, não foi estudada por completo, podendo ser fonte de novos recursos biotecnológicos ainda desconhecidos, tornando a Amazônia um importante local para bioprospecção de novas moléculas de interesses medicinais e tecnológicos (SKIRYCH *et al.* 2016).

Os fungos são seres eucariotos encontrados na maioria dos ecossistemas e logo possuem papel fundamental nos processos ecológicos para manutenção e harmonia de um ecossistema (MADGAN *et al.* 2016). A ampla biodiversidade amazônica, ainda pouco explorada, torna-a uma importante fonte para a busca de fungos produtores de pigmentos (CELESTINO *et al.* 2014; SANTOS-EBINUMA *et al.* 2014). As interações ecológicas pouco estudadas neste bioma geram expectativa sobre o que pode ser encontrado.

Durante os anos 90, uma série de estudos com fungos isolados da Amazônia foram conduzidos em uma parceria da Universidade Federal do Amazonas - UFAM com a Universidade Federal de Campinas - UNICAMP. Em um destes trabalhos foi investigado a cor da pigmentação produzida por cada um dos isolados fúngicos (DURÁN *et al.* 2002). Já Celestino *et al.* (2014), isolou e identificou fungos Amazônicos do solo produtores de pigmento. A conclusão deste trabalho foi a obtenção de um pigmento amarelado identificado como esclerotiorina por *Penicillium sclerotiorum* 2AV2, encontrado pela primeira vez em um fungo da região.

Dando continuidade ao trabalho com *P. sclerotiorum* 2AV2, Neves (2016), identificou mais um pigmento, o ácido oleico. Realizou também bioensaios com a esclerotiorina,

detectando atividade antitumoral frente as linhagens SKMEL-19, SKMEL-28 e MESA-DX e atividade antifúngica frente a *Cryptococcus neoformans*. Oliveira (2017) trabalhando com novo isolamento de fungos filamentosos do solo Amazônico capazes de produzir pigmentos, isolou de uma outra cepa de *P. sclerotiorum*, LM 5679, um pigmento amarelo alaranjado identificado como 5-pentadecilresorcinol.

Devido à grande importância dos pigmentos fúngicos como colorantes e até mesmo por demonstrarem potencial atividades biológicas relevantes (GUERIN, HUNTLEY, OLAIZOLA, 2003; HE, GIUSTI, 2010; PANGESTUTI, KIM, 2011), é necessário que sejam realizadas pesquisas com foco em colorantes fúngicos, assim como investigar a influência de diversos substratos e meios de cultura na produção dos mesmos, como vem sendo realizado no Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA (CELESTINO *et al.* 2014; NEVES, 2016).

2.4 Bioprocesso e pigmentos

É conhecido que a influência dos diversos meios de cultura, substratos, tipos de bioprocesso, tamanho do inóculo podem influenciar na produção destas substâncias (CELESTINO *et al.* 2014). Existem ainda fatores abióticos ou físico-químicos (temperatura, radiação, pH, osmolaridade, atividade de água), ecológicos (co-cultivo) que também influenciam na produção destas substâncias pelos fungos (AVERY, FAULL, SIMMONDS, 2004; BAKER, LOROS, DUNLAP, 2012; BERTRAND *et al.* 2013).

Bioprocesso é qualquer processo tecnológico em que se use células (animais, vegetais ou microbianas) mantidas em meio nutritivo visando a obtenção de um determinado produto que é produzido/biotransformado a partir de um substrato (BORZANI *et al.* 2001). Os bioprocessos com fungos podem ocorrer em estado sólido ou em meio submerso. A fermentação em estado sólido é um método em que o inóculo é realizado diretamente sobre

um substrato umedecido, um exemplo tradicional é o “angkak”, um arroz fermentado de cor vermelha-arroxeadado e brilhante, que adquire a sua cor ao ser cultivado com o bolor de *Monascus purpureus* (PATTANAGUL *et al.* 2008).

Alguns fatores interferem em bioprocessos, como o substrato utilizado e a temperatura. Alguns destes fatores são específicos do tipo do bioprocesso utilizado. Bioprocessos em estados sólidos são mais influenciados por temperatura e umidade, enquanto bioprocessos submerso são mais influenciados por agitação e pH (MADGAN *et al.* 2016).

O bioprocesso a ser utilizado para a obtenção de pigmentos depende dos seguintes fatores: organismo utilizado, tipo de pigmento e sua aplicação. Existem organismos que secretam pigmento para o meio extracelular, neste caso é interessante utilizar bioprocesso em meio submerso, o que pode vir a facilitar a separação do colorante e a sua produção. Ainda assim, fungos do gênero *Monascus* costumam produzir mais pigmento em meio sólido (MÉRILLON, RAMAWAT, 2017). Na produção de beta caroteno por *Blakeslea trispora* é usado meio submerso, mas o beta caroteno se encontra na sua biomassa e não no meio extracelular (MÉRILLON, RAMAWAT, 2017).

O modelo de bioprocesso a ser utilizado tem de ser determinado visando os parâmetros supracitados. Para a obtenção de uma hidroxiantraquinona de cor vermelha de nome Arpink red™ (atual Natural red™) obtida de *Penicillium oxalicum* var. *armeniaca* CCM8242 foi utilizado meio submerso líquido (SARDARYAN, 2002). Azafilonas vermelhas foram obtidas de *P. purpurogenum* por bioprocesso em meio submerso (ARAI *et al.*, 2013). O uso de meio submerso favoreceu a produção de pigmento roxo PP-V por *Talaromyces sp.* (MAPARI *et al.* 2012). Alguns trabalhos que usaram *P. sclerotiorum* para produzir esclerotiorina utilizaram meio submerso (CELESTINO *et al.* 2014; LUCAS *et al.* 2010).

2.5 Pigmentos produzidos por *P. sclerotiorum*

O gênero *Penicillium* se tornou conhecido pela produção do antibiótico penicilina, contudo possui outros usos como a produção de colorantes (DUFOSSÉ, 2006) e uso alimentar em alguns tipos de queijo (FOX *et al.* 2017). *Penicillium sclerotiorum* van Beyma foi identificado em 1937 e tem como sinônimo, em alguns trabalhos, *Penicillium multicolor* Grigorieva-Manoilova e Poradielova originalmente identificado em 1915. É passível de distinção entre outras espécies do gênero por apresentar colônias com forte coloração que variam do alaranjado ao vermelho e que podem ser visualizadas tanto na parte de cima da colônia quanto no reverso da placa de Petri (PITT, 1981).

Dentre as substâncias coloridas produzidas por *P. sclerotiorum* destaca-se uma molécula clorada de cor amarela denominado esclerotiorina (MACCURTIN, REILLY, 1940). Trata-se de uma azalifona natural pertencente a rota química dos policetídeos (CHIANG *et al.* 2009). Policetídeo Sintases (PKS) é o grupo de diversas enzimas envolvidas na produção destes policetídeos que pode ser encontrado também em plantas e bactérias (STAUNTON, WEISSMAN, 2001). Os diferentes tipos compostos policetídeos encontrados estão relacionados a estas enzimas, que por sua vez estão relacionadas aos genes PKS. Outros compostos coloridos produzidos por *P. sclerotiorum* se encontram na Tabela 3.

Substância	Coloração	Referências
5-pentadacilresorcinol	Amarelo alaranjado	(OLIVEIRA, 2017)
Ácido Oleico	Amarelo	(NEVES, 2016)
Esclerotiorina	Amarelo alaranjado	(CELESTINO <i>et al.</i> , 2014; MACCURTIN, REILLY, 1940)
Citrinina	Amarela	(PAIRET <i>et al.</i> 1995)
Isocromofilona VI	Avermelhado	(LUCAS <i>et al.</i> 2007)
Penicilazafilona B e C	Amarelo	(ZHOU <i>et al.</i> 2016)

Tabela 3 - Exemplo de substâncias coloridas produzidas por *P. sclerotiorum*

A espécie *P. sclerotiorum* pode ser encontrada em todo o mundo e costuma estar localizadas no solo (PITT, 1981). *P. sclerotiorum* LM 5679 foi isolada do solo Amazônico (CELESTINO *et al.* 2014), ainda em nosso grupo foi alvo de estudos sobre produção de colorantes (OLIVEIRA, 2017). Esta espécie apresenta coloração específica. Não há trabalhos especificando os melhores tipos de bioprocessos para produção destes colorantes, sendo seus compostos coloridos obtidos em bioprocessos estáticos (LUCAS *et al.* 2010; OLIVEIRA, 2017) ou sob agitação (RAINA, ODELL, KESHAVARZ, 2010); em ambiente completamente escuro (CELESTINO *et al.*, 2014; NEVES, 2016; OLIVEIRA, 2017) ou com luz natural (LUCAS *et al.*, 2010; RAINA, ODELL, KESHAVARZ, 2010) e em meios de culturas diversos.

2.6 Estresses microbiológicos

Estresse microbiológico pode ser definido como um fator ou fatores que criam um desafio fisiológico para um microrganismo, ameaçando as suas funções ou a sua sobrevivência (SCHIMEL, BALSER, WALLENSTEIN, 2007). Fatores como oscilação de temperatura, falta de nutrientes, pH, presença de outros organismos competindo por nutrientes

e espaço tendem a influenciar no metabolismo fúngico, afetando na produção de uma ou várias substâncias e enzimas (HALLSWORTH, MAGAN, 1996; MÉNDEZ *et al.* 2011). Logo é interessante otimizar fatores estressantes em um bioprocessamento na produção de pigmentos.

Com a intenção de sobreviver, diante de uma condição estressante, micro-organismos tendem a modificar-se, aumentando ou diminuindo o consumo de carbono e nitrogênio. Em uma situação de frio extremo, tendem a reforçar a membrana celular com a produção de lipídeos, podem produzir também proteínas e substâncias para resistir a tal situação (SCHIMMEL, BALSER, WALLENSTEIN, 2007). Logo, saber como fatores de estresse influenciam na produção de um bioproduto pode vir a ser vantajoso.

Desde 1995 já é produzido beta caroteno utilizando o fungo *Blakeslea trispora*, que possui duas formas sexuais, (+) e (-), para a produção do pigmento comercial, é utilizada uma co-cultura das duas formas (KUZINA, CERDÁ-OLMEDO, 2006). Em outro trabalho relacionando co-cultura com produção de pigmento, o fungo *Penicillium* sp. foi isolado de culturas de *Candida tropicalis* onde apresentou coloração vermelha, em bioprocessos realizados posteriormente restou identificado que o pigmento só era produzido na presença dos dois fungos (HAILEI *et al.* 2011).

Tal qual nos processos industriais comuns, nos bioprocessos deve-se monitorar alguns fatores físico-químicos. Alterações ou variações em temperatura, pH e pressão osmótica tendem a interferir no crescimento do micro-organismos e na quantidade do produto final desejado. O monitoramento deve ocorrer durante todo o bioprocessamento, pois o metabolismo do micro-organismo e suas conseqüentes reações que ocorrem podem vir a modifica-los (DUFOSSÉ, 2006). Fatores físico-químicos como radiação ultravioleta, agitação, atividade de água e aeração também podem ser determinantes em um bioprocessamento.

A temperatura elevada tende a favorecer as reações químicas já as reações enzimáticas tendem a respeitar uma temperatura ótima que pode ser baixa ou elevada, de acordo com as enzimas envolvidas (TORTORA, CASE, FUNKE, 2016). Na produção de alguns tipos de vinhos e cervejas por exemplo, é usado fermentação a baixas temperaturas (12 a 15 °C) para preservação de aromas frutados e diminuição da fermentação bacteriana (GARCÍA-RÍOS, RAMOS-ALONSO, GUILLAMÓN, 2016; LÓPEZ-MALO, QUEROL, GUILLAMON, 2013). A temperatura também influencia na velocidade do crescimento fúngico.

O pH mede o equilíbrio entre ácido e base em uma solução. A maioria dos fungos apresenta melhor crescimento em pH ácido. Assim como a temperatura, o pH influencia nos metabólitos produzidos pelo fungo assim como o seu crescimento (TORTORA, CASE, FUNKE, 2016). No meio intracelular o seu valor está próximo a neutralidade, grandes variações intracelulares podem causar danos irreversíveis ao micro-organismo (MADGAN *et al.* 2016).

A pressão osmótica está relacionada a concentração de água livre, o que é chamado de atividade de água (A_w). A presença de solutos em um meio de cultura tende a diminuir a atividade de água por se ligarem a ela e torná-la indisponível para o micro-organismo. As células, naturalmente, promovem processo de osmose para regular a atividade de água do meio em que se encontram. Pequenas alterações na pressão osmótica tendem a prejudicar um organismo, principalmente, impedindo o seu crescimento (MADGAN *et al.* 2016).

Estresse químico está relacionado às substâncias presentes no meio em que o organismo se encontra. Excesso ou escassez de macro e/ou micronutrientes são exemplos clássicos deste tipo de estresse (ERASMUS *et al.* 2003; TALBOT *et al.* 1997). Substâncias que não são comuns a um micro-organismo, denominadas xenobióticos, também causam situação de estresse químico. Alguns exemplos mais comuns destas substâncias são os antimicrobianos e agrotóxicos (MOUGIN, KOLLMANN, JOLIVALT, 2002).

Neste trabalho, adotaremos o conceito de substâncias caotrópicas (induzem as macromoléculas de um organismo a desordem) e substâncias kosmotrópicas (induzem as mesmas ao equilíbrio). Estes conceitos foram utilizados pela primeira vez por Hamaguchi, Geiduschek (1962) e Collins, Washabaugh (1985) respectivamente. Recentemente estes termos foram revisitados e melhor definidos (BALL, HALLSWORTH, 2015).

O estresse químico sempre esteve presente em processos biotecnológicos. Nos bioprocessos para obtenção de etanol a partir de açúcar, cepas de *S. cerevisiae* tolerantes ao produto final obtêm maior rendimento (ALPER *et al.* 2006). Na produção de queijos pode ser usado nitrato de sódio até 50 mg/Kg para inibir a formação de gases por coliformes e *Clostridium tyrobutyricum* (FOX *et al.* 2017). Em bioprocessos com imobilização de *S. cerevisiae* e *Oenococcus oeni* indicou o aumento da tolerância das cepas a etanol e dióxido de enxofre (SO₂), assim como uma melhor qualidade do vinho (SERVETAS *et al.* 2013).

É investigado que substâncias kosmotrópicas como glicerol e trealose podem ser usados em alguns bioprocessos como na produção de biocombustíveis a fim de proteger as células do efeito tóxico dos produtos (BHAGANNA *et al.* 2010).

Alguma das ideias deste trabalho foram baseadas em observações laboratoriais semelhantes às de HAILEI *et al.* (2011) com a produção de pigmento pelo *Penicillium* sp. HSD07B quando cultivados com *Candida tropicalis*. Havia uma maior intensidade de coloração nas placas de Petri com culturas *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 quando as mesmas se encontravam contaminadas por outros microrganismo. Por se tratar de um fungo promissor na produção de pigmento é interessante pensar em explorar estes elementos adversos como possibilidade para futuros estudos de otimização da produção de pigmentos por *P. sclerotiorum* LM 5679.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

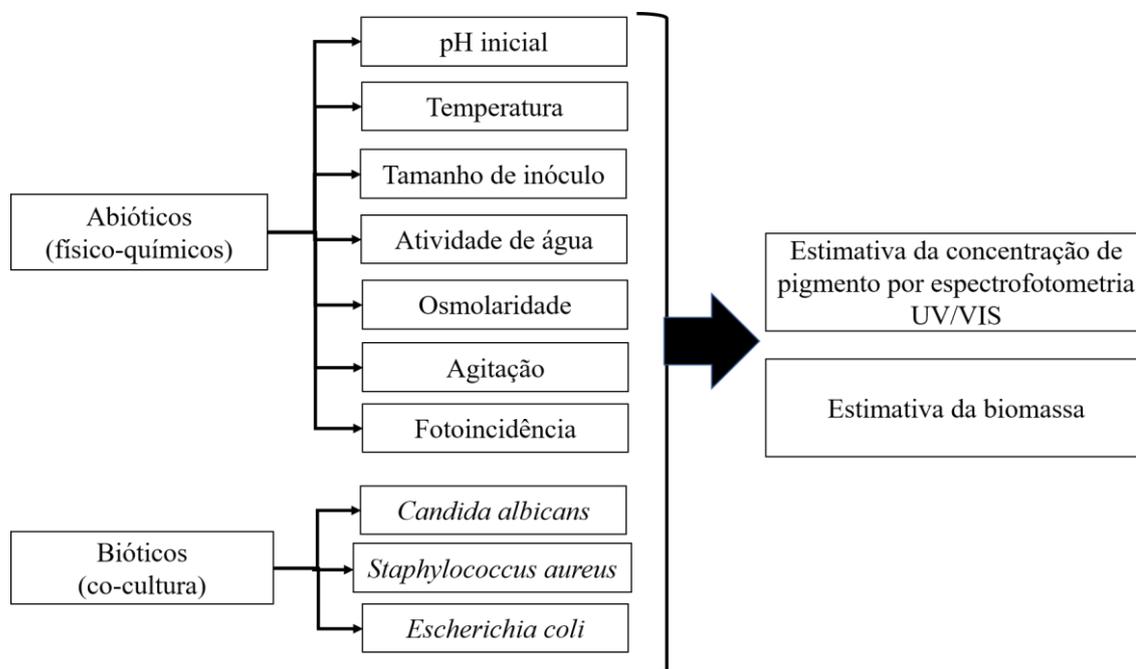
Investigar a influência de estresse abióticos e bióticos na produção de pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679.

3.2 Específicos

- Investigar a influência dos estresses abióticos (pH, temperatura, tamanho de inóculo, osmolaridade, atividade de água, agitação e foto incidência) na produção de pigmento.
- Estudar a influência do estresse biótico (co-cultura) com os micro-organismos *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* vivos e autoclavados na produção de pigmentos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A execução deste trabalho se encontra resumida na Figura 1.



Fluxograma 1: Fluxograma metodológico: fatores abióticos e bióticos testados e métodos analíticos empregados

4.1 Micro-organismos

Neste estudo, o fungo filamentososo isolado do solo, *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 foi obtido através da Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA, A autorização do CGEN foi dada pelo processor n°. 010344/2013-6. O microrganismo foi reativado em Ágar Sabouraud, após 5 dias foram transferidos para Batata Dextrose Ágar (BDA) e inoculado após 3 dias.

Nos experimentos envolvendo co-cultura foram utilizados os microrganismos *Candida albicans* (ATCC 36232), obtido através da Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA reativada em Ágar Sabouraud e incubada 35 ± 2 °C por 24 horas. As bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600) e *Escherichia coli* (ATCC 11775) foram cedidas pela Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária – CRMVS, FIOCRUZ –

INCQS, Rio de Janeiro, RJ, ambas foram reativadas em Ágar Müeller-Hinton e incubadas $35 \pm 2^\circ \text{C}$ por 24 horas.

4.2 Procedimentos

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e foram calculadas a média e o desvio padrão para cada uma das determinações realizadas.

4.2.1 Influência de estresse físico-químico na produção de pigmentos

O bioprocesso padrão foi realizado de acordo com Celestino *et al.* (2014): foram usados frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do Caldo Czapeck-Dox (3 g/L NaNO_3 , 1 g/L K_2HPO_4 , 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L KCl , 0.01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 30 g/L sacarose), o pH foi ajustado para 5.0 antes de ser esterilizado, o tamanho do inóculo de 10^4 células/mL. Os frascos foram incubados a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ \text{C}$) por 14 dias em local com ausência de iluminação e o bioprocesso ocorreu em condições estáticas. As condições investigadas neste estudo foram obtidas através de modificação univariada deste bioprocesso padrão.

Os experimentos foram realizados de modo univariado, mudando um fator a cada vez. O pH inicial dos meios de cultura avaliados foram 3, 5 (padrão), 7 e 9 usando solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M ou ácido clorídrico (HCl). As temperaturas avaliadas foram 5, 25 (padrão) 35 e 45°C . Os tamanhos de inóculos avaliados foram 10^1 , 10^3 , 10^4 (padrão) e 10^6 células/mL, que foram quantificados utilizando câmara de Neubauer. A concentração de glicerol avaliada foi 0 (padrão), 0,5, 1 e 3 M adicionadas durante a preparação do meio de cultura.

As concentrações de cloreto de sódio (NaCl) avaliadas foram de 0 (padrão), 3, 6 e 12% (p/v) adicionadas durante a preparação do meio de cultura. A influência da agitação foi realizada em agitador orbital nas velocidades de 50, 100 e 150 RPM, o padrão foi sem

agitação. A influência de luminosidade foi avaliada permitindo que o bioprocessamento ocorresse na bancada do laboratório onde havia iluminação artificial constante, neste caso o padrão foi realizado na ausência de luz.

4.2.2 Influência do estresse biológico na produção de pigmentos

Nesta etapa, os microrganismos *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli* foram inoculados ao mesmo tempo que o *P. sclerotiorum* na concentração de 10^4 células/mL. A levedura *C. albicans* foi quantificada utilizando câmara de Neubauer. Para as bactérias foi preparado o inóculo em solução salina na escala de 0,5 de McFarland com o auxílio de espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm, com absorvância entre 0,08 a 0,1, que correspondem aproximadamente a um inóculo de $1,5 \times 10^8$ células/mL (OPAS, ANVISA, SVS, 2006). Para os experimentos com os microrganismos autoclavados as suspensões previamente quantificadas foram autoclavadas por 15 minutos a 121 °C.

4.3 Métodos analíticos

4.3.1 Extração de pigmento

A extração do colorante do meio de cultura submerso foi adaptado de Celestino *et al.*, (2014), com algumas modificações. Ao fim do processo, 20 mL de acetato de etila foram adicionados em cada Erlenmeyer que foram vedados e colocados em agitador orbital a 100 RPM por 5 horas. Ao final da extração foram retirados cuidadosamente com uma micropipeta ao menos 5 mL da fase orgânica (superior) que foram acondicionados em tubos de ensaio previamente identificados.

4.3.2 Filtração e estimativa da biomassa

Após a extração dos colorantes foi realizada a filtração de cada bioprocessamento em filtro Whatman n. 1. previamente pesados. O peso seco foi realizado de acordo com (MINAMI, 2003), onde cada papel filtro foi colocado para secar em uma estufa a 105 °C e a cada hora

eram pesados, após serem resfriados em dessecador com sílica gel, até que seu peso fosse estabilizado.

4.3.3 Estimativa do pigmento

A fase orgânica (acetato de etila) foi submetida a análise espectral em um Espectrofotômetro UV/VIS (modelo: 700 plus - Femto) onde foi medida absorvância máxima (λ_{max}). Foi realizado um escaneamento de varredura para encontrar o comprimento de onda do colorante, que foi 350 nm. A estimativa de colorante é demonstrada multiplicando a absorvância pelo fator de diluição de cada amostra (KANG *et al.* 2014).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho encontram-se expostos na forma de artigo, que será submetido à revista International Journal of Microbiology.

Influência do estresse físico-químico e biológico na produção de pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679

Rodrigo R. C. Santos,¹ Ralyvan A. dos Santos², Tayana J. S. M. de Souza², Ana C. A. Cortez³, João V. B. Souza³

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200, 69067-005 Amazonas, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas – UEA. Av. Carvalho Leal, 1777, 69065-001 Amazonas, Brasil.

³ Departamento de Microbiologia Médica, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Av. André Araújo 2936, 69080-971 Amazonas, Brasil.

Resumo

Colorantes de origem natural acompanharam o desenvolvimento humano, mas, com o avanço tecnológico, surgiram os colorantes sintéticos, mais fáceis de serem obtidos por não dependerem da sazonalidade comum às plantas, que ainda são as principais fontes de colorantes naturais. Atualmente, os colorantes sintéticos atualmente não são tão desejados, haja vista alguns estudos apontarem tais corantes como causadores de problemas de saúde como alergias, e de problemas ambientais, por se tratarem de substâncias de difícil degradação natural, gerando uma busca para o retorno ao natural. Fungos possuem uma relação milenar na produção de colorantes, é o caso do *angkak*, um tipo de arroz fermentado por fungos do gênero *Monascus*, um alimento adotado por alguns povos asiáticos. Na busca por novos colorantes de origem fúngica, em trabalhos deste grupo foram isolados e identificados alguns fungos para esta finalidade, sendo *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 um dos mais promissores, motivo pelo qual se tornou o foco deste trabalho. Este trabalho tem o objetivo de estudar a influência de estresses abióticos e bióticos na produção de colorante. Para estudar os estresses abióticos foi realizado cultivo em meio submerso com análise univariada dos fatores: pH, temperatura, tamanho do inóculo, atividade de água, osmolaridade, velocidade de agitação e exposição a luz. Para os estresses bióticos, foi realizado o mesmo bioprocessamento realizando inoculação simultânea, co-cultura, de *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli* com *P. sclerotiorum* LM 5679. Os níveis de colorantes foram estimados por espectroscopia no ultravioleta visível (UV/VIS), a biomassa de alguns experimentos também foi estimada. Dentre os fatores analisados nenhum superou a quantidade de pigmento produzido no bioprocessamento adotado como padrão, os valores mais altos foram obtidos nos testes conduzidos em pH 3 e tamanho de inóculo de 10⁶ células/mL. Os resultados apontam que não há relação entre a quantidade de pigmento e a concentração de biomassa. A importância deste trabalho foi de expor como os fatores de estresse influenciam na produção de pigmento por *P. sclerotiorum* LM 5679 e, por isso, esses fatores devem ser investigados com foco na otimização do bioprocessamento.

Palavras-chave: Fungos amazônicos; colorantes naturais; estresse abióticos; estresse biótico

1 Introdução

Diante do crescimento econômico mundial que acompanhamos, verifica-se que alimentos, medicamentos e cosméticos são produtos amplamente consumidos. Para tornar estes produtos de interesse do consumidor, são utilizadas substâncias que possam prover características aos mesmos, tais como cor, sabor e validade elevada. Os colorantes são substâncias que apresentam cor no espectro do visível sendo utilizados em diversos produtos para aumentar a sua atratividade. Sua origem pode ser sintética ou natural, os primeiros, são os mais utilizados, mas estão relacionados a problemas de saúde e ambientais (VERMA, GUPTA, 2017).

A busca por novos colorantes naturais se justifica por apresentarem menor toxicidade em sua produção e em seu descarte quando comparado aos sintéticos (GAUTAM, 2016). Eles são mais desejados para serem utilizados nas indústrias de alimentos e farmacêutica por serem considerados mais seguros, além disso as restrições impostas pela legislação vigente sobre os colorantes sintéticos também reforçam a busca por novos colorantes naturais. Os colorantes de origem biológica têm sido obtidos de animais, plantas, bactérias e fungos (TULI *et al.* 2015).

Diversas revisões especializadas vêm ressaltando o potencial da utilização de colorantes de origem fúngica (DUFOSSÉ *et al.* 2014; MÉRILLON, RAMAWAT, 2017; PATAKOVA, 2013). Os colorantes de origem fúngica mais utilizados são os obtidos dos fungos do gênero *Monascus* e *Penicillium*. Esses corantes são principalmente policetídeos, especificamente azafilonas. Estudos recentes sugerem que o estresse fúngico de origem física, química e biológica pode ser utilizado como ferramenta para obtenção de produtos biotecnológicos em maior quantidade (BERTRAND *et al.* 2013; BRAGA *et al.* 2015; WANG *et al.* 2017)

A Amazônia é a floresta tropical que abriga a maior diversidade vegetal e animal do mundo. Apesar dessa riqueza, poucos estudos foram realizados na prospecção de fungos produtores de colorantes (CELESTINO *et al.* 2014; SANTOS-EBINUMA *et al.* 2014; SANTOS-EBINUMA, TEIXEIRA, PESSOA, 2013) e nenhum foi realizado investigando a influência de fatores de estresse na produção desses colorantes por fungos. No grupo de pesquisa do Laboratório de Micologia do INPA, Oliveira *et al.* (2017), partindo do *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 isolou e identificou um alquilresorcinol (5-pentadacilresorcinol) de cor amarela. Essa espécie é conhecida produtora de colorantes policetídeos e não existem estudos avaliando a influência de estresse físico, químico e biológico em sua produção.

A realização de estudos deste tipo visa encontrar quais fatores estressantes podem ser mais relevantes na produção dos colorantes produzidos por *P. sclerotiorum* LM 5679, abrindo as portas para estudos vindouros objetivando a produção e otimização destes colorantes em maior escala. Diante dessa realidade, o presente trabalho tem como objetivo investigar a influência de fatores de estresse abióticos (físico-químicos) e bióticos (interações ecológicas) na produção de colorantes por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679.

2 Material e Métodos

2.1 Microrganismos

Neste estudo, o fungo filamentosos isolado do solo, *Penicillium sclerotiorum* LM 5679 foi obtido através da Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA. O microrganismo foi reativado em Ágar Sabouraud, após 5 dias foram transferidos para Batata Dextrose Ágar (BDA) e inoculado após 3 dias.

Nos experimentos envolvendo co-cultura foram utilizados os microrganismos *Candida albicans* (ATCC 36232), obtido através da Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA reativada em ágar Sabouraud e incubada 35 ± 2 °C por 24 horas. As bactérias

Staphylococcus aureus (ATCC 12600) e *Escherichia coli* (ATCC 11775) foram cedidas pela Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária – CRMVS, FIOCRUZ – INCQS, Rio de Janeiro, RJ, ambas foram reativadas em ágar Müller-Hinton e incubadas 35 ± 2 °C por 24 horas.

2.2 Bioprocesso Padrão

O bioprocesso padrão foi realizado de acordo com Celestino *et al.* (2014): foram usados frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do Caldo Czapeck-Dox (3 g/L NaNO₃, 1 g/L K₂HPO₄, 0.5 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.5 g/L KCl, 0.01 g/L FeSO₄·7H₂O e 30 g/L sacarose), o pH foi ajustado para 5.0 antes de ser autoclavado, o tamanho do inóculo de 10⁴ células/mL. Os frascos foram incubados a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por 14 dias em local completamente escuro e o bioprocesso ocorreu em condições estáticas. As condições investigadas neste estudo foram obtidas através de modificação univariada deste bioprocesso padrão.

2.3 Influencia dos fatores abióticos – pH, temperatura, tamanho do inóculo, presença de glicerol, presença de cloreto de sódio (NaCl), influência de luz e agitação

Os experimentos foram realizados em triplicata de modo univariado, mudando um fator por de cada vez. O pH inicial dos meios de cultura avaliados foram 3, 5, 7 e 9 usando solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M ou ácido clorídrico (HCl). As temperaturas avaliadas foram 5, 25, 35 e 45 °C. Os tamanhos de inóculos avaliados foram 10¹, 10³, 10⁴ e 10⁶ células/mL, que foram quantificadas utilizando câmara de Neubauer. A concentração de glicerol avaliada foi 0, 0,5, 1 e 3 M adicionadas durante a preparação do meio de cultura.

As concentrações de cloreto de sódio (NaCl) avaliadas foram de 0, 3, 6 e 12% (p/v) adicionadas durante a preparação do meio de cultura. A influência da agitação foi realizada em agitador orbital nas velocidades de 50, 100 e 150 RPM, o padrão foi sem agitação. A

influência de luminosidade foi avaliada permitindo que o bioprocessamento ocorresse na bancada do laboratório onde havia iluminação artificial constante, neste caso o padrão foi realizado em escuridão total.

2.4 Influência de fatores bióticos – Co-cultura

Nesta etapa, os microrganismos *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli* foram inoculados ao mesmo tempo que o *P. sclerotiorum* na concentração de 10^4 células/mL. A levedura *C. albicans* foi quantificada utilizando câmara de Neubauer já para as bactérias foi preparado o inóculo em solução salina na escala de 0,5 de McFarland com o auxílio de espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm, com absorvância entre 0,08 a 0,1, que correspondem aproximadamente há um inóculo de $1,5 \times 10^8$ células/mL (OPAS, ANVISA, SVS 2006). Para os experimentos com os microrganismos autoclavadas as suspensões previamente quantificadas foram esterilizadas por 15 minutos a 121 °C.

2.5 Extração de colorantes

A extração do colorante do meio de cultura submerso foi adaptado de Celestino *et al.*, (2014), com algumas modificações. Ao fim do processo, 20mL de acetato de etila foi adicionado em cada Erlenmeyer que foram vedados e colocados em agitador orbital a 100 rpm por 5 horas. Ao final da extração foram retiradas cuidadosamente com uma micropipeta ao menos 5mL da fase orgânica (superior) que foram acondicionados em tubos de ensaio previamente identificados.

2.6 Filtração e estimativa da biomassa

Após a extração dos colorantes foi realizado a filtração de cada bioprocessamento em filtro Whatman n. 1. previamente pesados. O peso seco foi realizado de acordo com (MINAMI, 2003), onde cada papel filtro foi colocado para secar em uma estufa a 105 °C e a cada hora

eram pesados, após serem resfriados em dessecador com sílica gel, até que seu peso fosse estabilizado.

2.7 Estimativa de colorante

A fase orgânica (acetato de etila) foi submetida a análise espectral em um Espectrofotômetro UV/VIS (modelo: 700 plus - Femto) onde foi medido absorvância máxima (λ_{max}). Foi realizado um escaneamento de varredura para encontrar o comprimento de onda do colorante, que foi 350 nm. A estimativa de colorante é demonstrada multiplicando a absorvância pelo fator de diluição de cada amostra (KANG *et al.* 2014).

3 Resultados

Foi investigada a influência do tamanho do inóculo na produção de colorantes por *P. sclerotiorum* LM 5679. Podemos observar (Figura 1), a absorvância da fração acetato de etila (contendo o corante) e a produção de biomassa de *P. sclerotiorum* LM 5679. Os pH ácidos apresentaram maior quantidade de corante. O pH 5 (padrão) resultou em uma maior concentração de colorante. Já o pH 3 e pH 9 resultaram em uma maior concentração de biomassa.

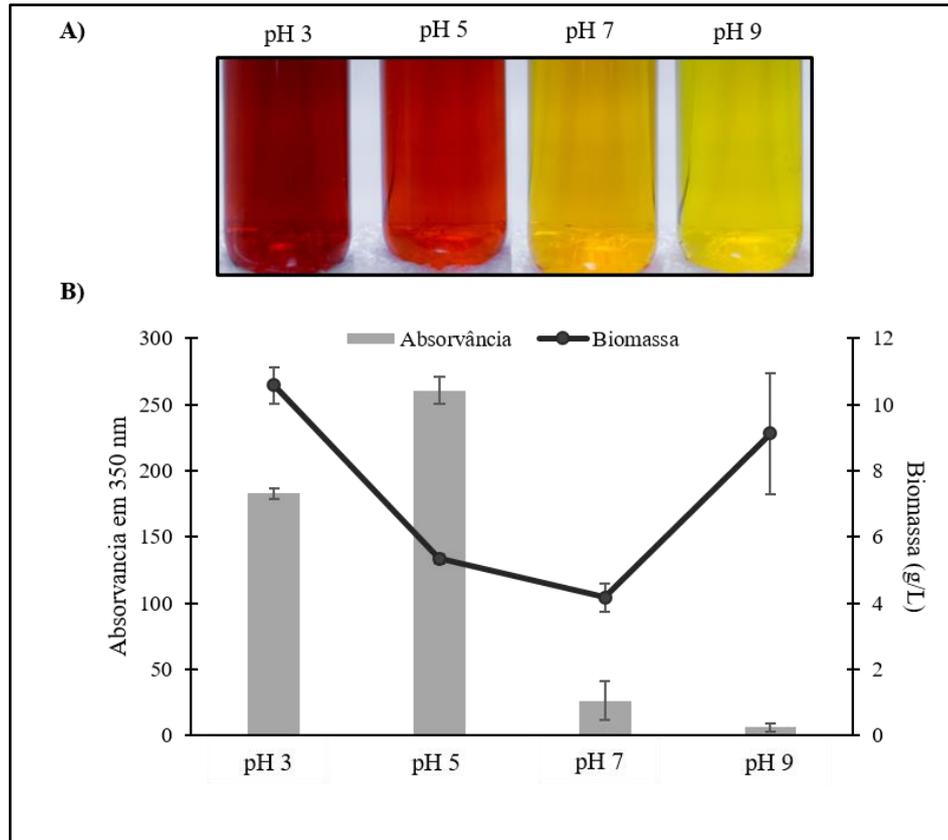


Figura 1 – Influência de diferentes pHs na produção de colorante (Absorbância em 350 nm) e biomassa por *P. sclerotiorum* LM 5679 em cultivo submerso

Foi investigada a influência do tamanho do inóculo na produção de colorantes por *P. sclerotiorum* LM 5679. Podemos observar (Figura 2), a absorvância da fração acetato de etila (contendo o corante) e a produção de biomassa de *P. sclerotiorum* LM 5679. Os inóculos 1×10^4 e 1×10^6 células/mL resultaram em maior produção de colorante. Do inóculo 1×10^3 resultou em maior concentração de biomassa.

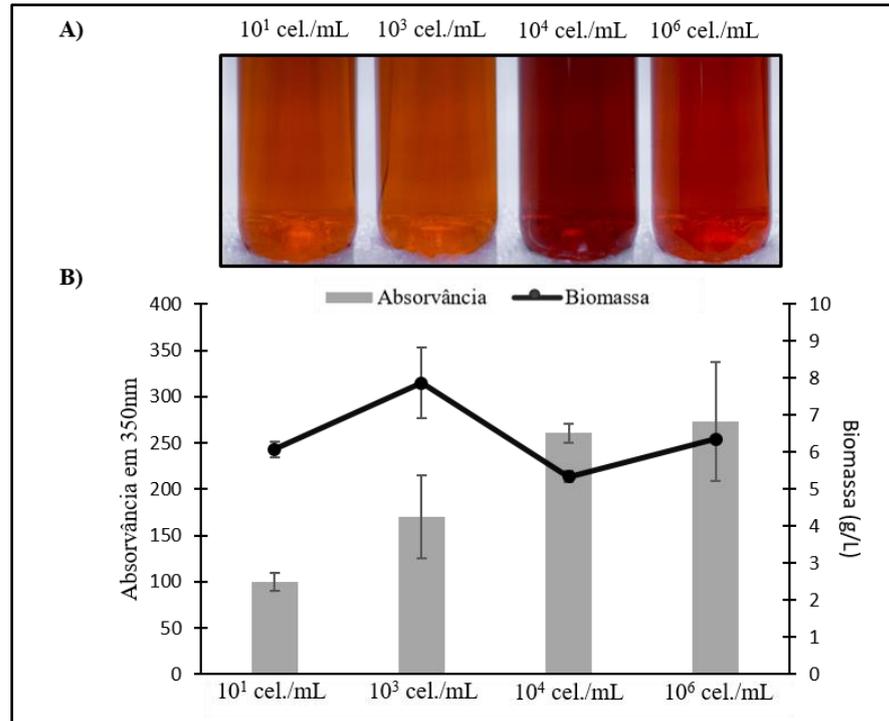


Figura 2 – Influência do tamanho de inóculos na produção de colorantes por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679

Foi investigada a influência da concentração de glicerol (atividade de água) na produção de colorantes por *P. sclerotiorum* LM 5679. Podemos observar (Figura 3), a absorvidade da fração acetato de etila (contendo o corante) e a produção de biomassa de *P. sclerotiorum* LM 5679. A maior concentração de colorantes ocorre com a ausência de glicerol.

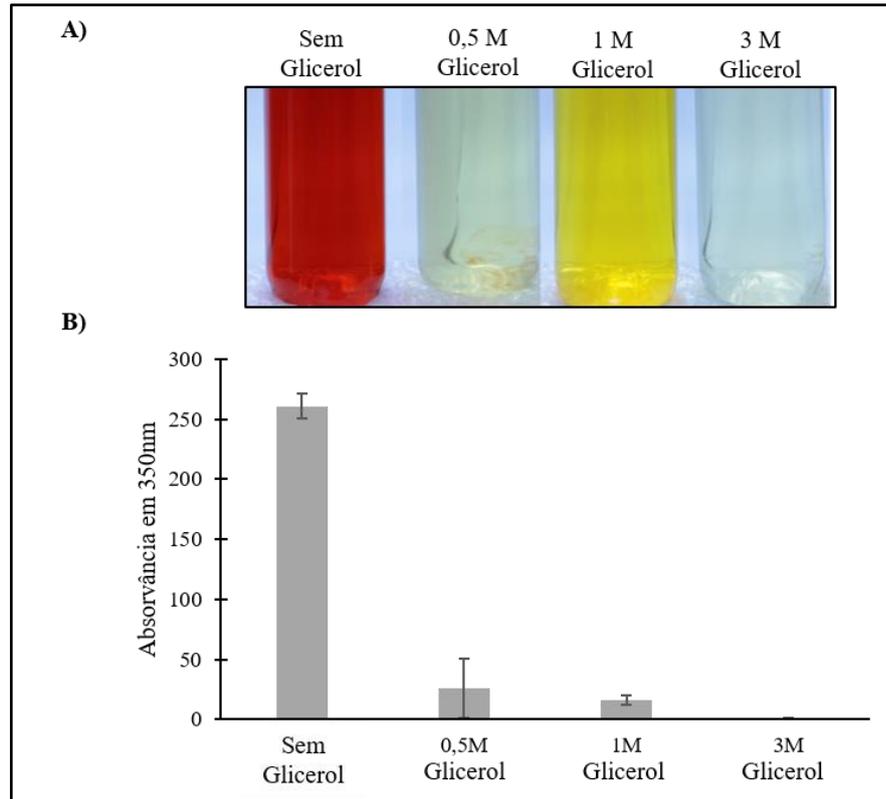


Figura 3 – Influência da concentração de glicerol na produção de colorante por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679

Foi investigada a influência da concentração de cloreto de sódio (estresse osmótico) na produção de colorantes por *P. sclerotiorum* LM 5679. Podemos observar (Figura 4), a absorvância da fração acetato de etila (contendo o corante) e a produção de biomassa de *P. sclerotiorum* LM 5679. Os colorantes foram produzidos de forma significativa apenas na ausência cloreto de sódio.

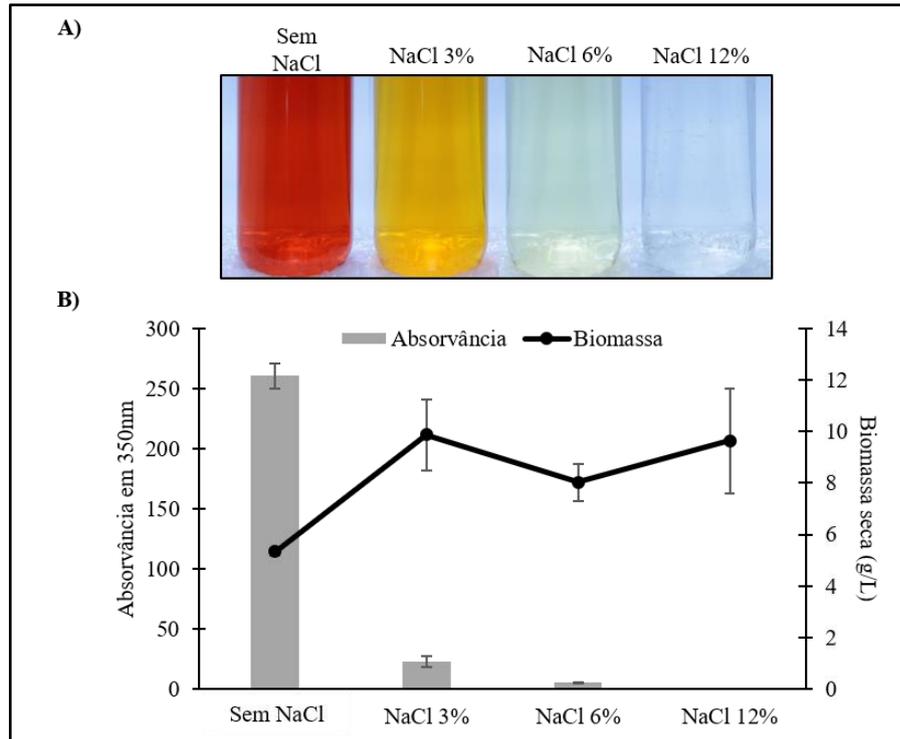


Figura 4 – Influência da concentração de cloreto de sódio na produção de colorante por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679

Foi investigada a influência da iluminação na produção de colorantes por *P. sclerotiorum* LM 5679. Podemos observar (Figura 5), a absorvância da fração acetato de etila (contendo o corante) e a produção de biomassa de *P. sclerotiorum* LM 5679. Os colorantes foram produzidos de forma mais significativa na ausência de luz.

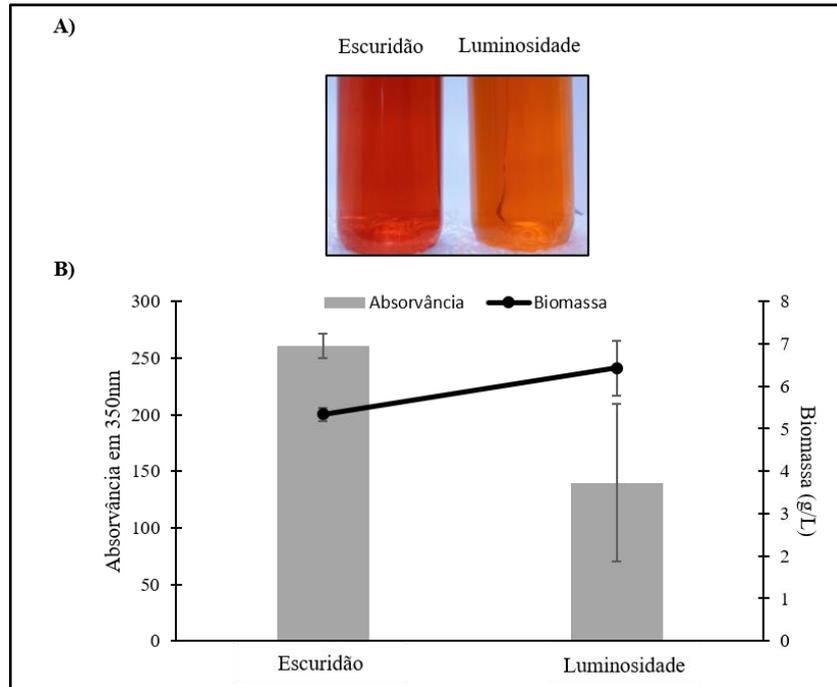


Figura 5 – Influência de iluminação na produção de pigmento por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679

Foi investigada a influência da agitação orbital na produção de colorantes por *P. sclerotiorum* LM5679 em bioprocesso submerso em frascos tipo Erlenmeyer. Podemos observar (Figura 6), a absorvidade da fração acetato de etila (contendo o corante) e a produção de biomassa de *P. sclerotiorum* LM 5679. Os colorantes foram produzidos de forma mais significativa na ausência de agitação orbital. A concentração final de biomassa foi maior nos experimentos com agitação.

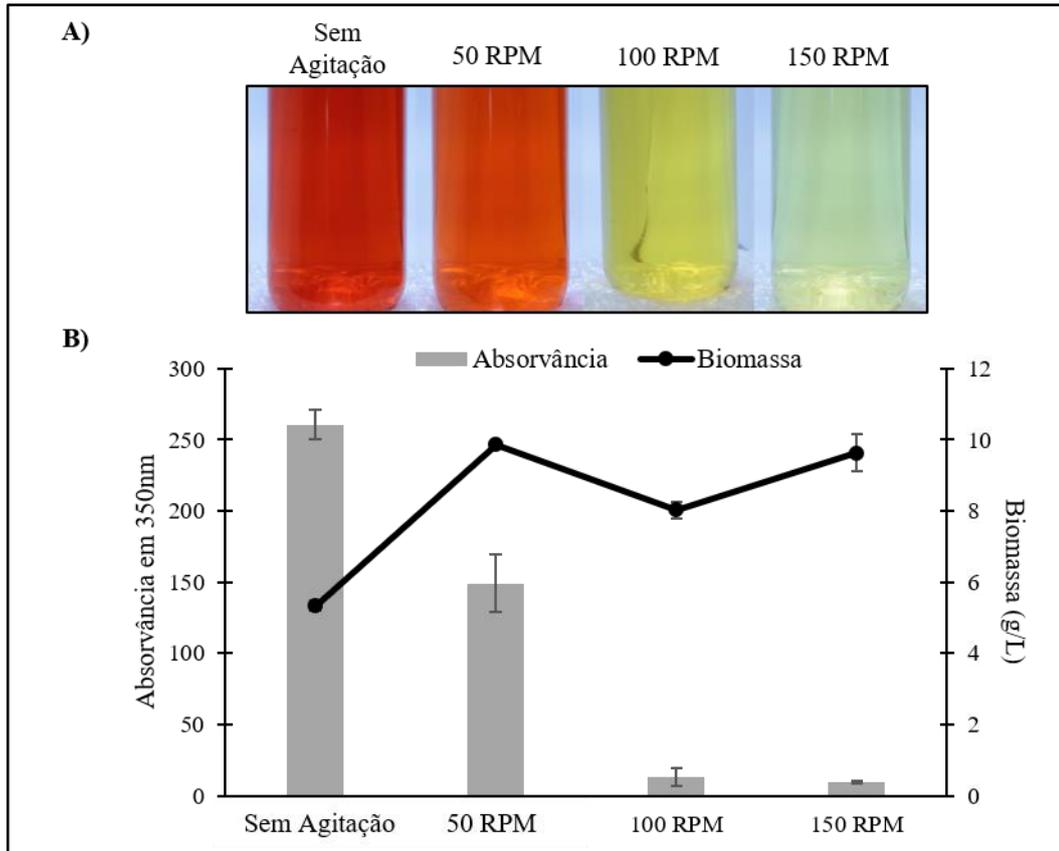


Figura 6 – Influência da agitação na produção de corante por *Penicillium sclerotiorum* LM 5679

Afim de investigar se fatores biológicos como co-culturas poderiam influenciar no bioprocesso, foram avaliadas a influência da inclusão de microrganismos (*C. albicans*, *E. coli* e *S. aureus*) vivos e após serem autoclavados na produção de colorantes por *P. sclerotiorum* LM 5679 (Figura 7). Podemos observar que as culturas mistas resultaram em menores concentração de corante e similares concentrações de biomassa. A cultura mista com *C. albicans* viva resultou na ausência de colorantes e redução da biomassa.

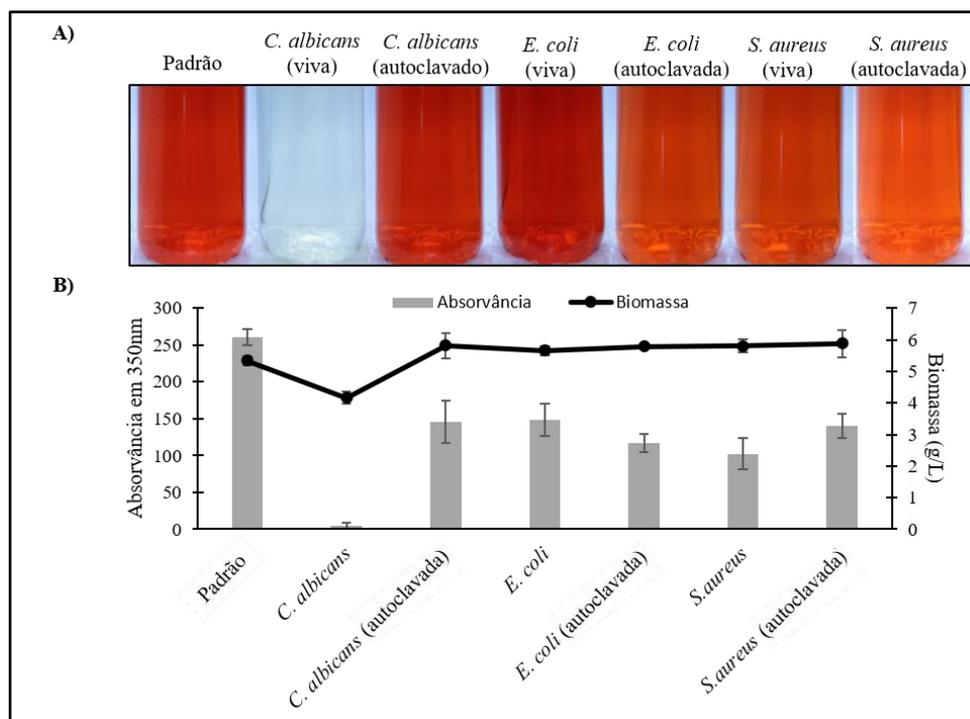


Figura 7 – Influência da co-cultura de alguns microrganismos com *P. sclerotiorum* na produção de colorantes

Investigou-se a influência da temperatura (5°C, 25°C, 35°C e 45°C) na produção de colorantes por *P. sclerotiorum* LM 5679. Não houve crescimento fúngico nas temperaturas que não o padrão 25°C, logo não foi possível obter resultados sobre a influência das temperaturas testadas.

4 Discussão

Os colorantes de origem fúngica têm sido investigados devido ao seu potencial biotecnológico. Recentemente, trabalhos têm sido realizados investigando a influência de fatores de estresse na produção de colorantes por fungos (CHEN *et al.* 2015; POMBEIRO-SPONCHIADO *et al.* 2017; WANG *et al.* 2017). Neste trabalho foi investigada a influência de diferentes fatores de estresse físico-químicos e da interação com outros micro-organismos na produção de colorantes por *P. sclerotiorum* LM 5679. Os resultados produzidos são importantes para a realização de futuros bioprocessos com este fungo. A produção do corante não demonstrou correlação direta com a produção de biomassa justificando que os fatores de

estresse devem ser investigados para cada organismo e bioprocessos (KANG *et al.* 2014; MÉNDEZ *et al.* 2011).

P. sclerotiorum foi quimicamente estudado pela primeira vez por MacCurtin e Reilly., (1940) que isolaram e identificaram o pigmento esclerotiorina. Em estudos subsequentes, algumas substâncias coloridas foram identificadas dentre estas podemos destacar: citrinina (PAIRET *et al.* 1995), isocromofilona VI (LUCAS, CASTRO, TAKAHASHI, 2007) (+)-ciclopenol, anacina, viridicatina. (LI *et al.* 2014), penicilazafilona B e C (ZHOU *et al.* 2016). Em trabalhos com *P. sclerotiorum* na Amazônia foram isolados esclerotiorina (CELESTINO *et al.* 2014), ácido oleico (NEVES, 2016) e 5-pentadecilresarcinol (OLIVEIRA, 2017).

Os colorantes de *P. sclerotiorum* possuem grande potencial para as ciências farmacêuticas. Quanto às atividades biológicas, o colorante esclerotiorina foi descrito como possuindo as seguintes atividades: inibição da proteína quinase G em *Mycobacterium tuberculosis* (CHEN *et al.* 2017), inibição de leucócito polimorfonuclear humano 5-lipoxigenase (CHIDANANDA, VASANTHA, SATTUR, 2015) e mostrou atividade antitumoral frente às linhagens tumorais SKMEL-19, SKMEL-28 e MESA-DX e atividade antifúngica frente à *Cryptococcus neoformans* (NEVES, 2016). O corante penicilazafilona C foi descrito como tendo atividade antineoplásica moderada frente a células de melanoma B16 e frente a células de câncer gástrico humano SGC 7901 e ainda atividade antimicrobiana frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E.coli* (ZHOU *et al.* 2016).

Nas condições experimentais, o pH 5 resultou em maior quantidade de colorante (Figura 1) e pH 3 em maior concentração de biomassa. O pH inicial é um parâmetro que deve ser investigado em bioprocessos submersos pois influi diretamente na produção de pigmentos (GMOSER *et al.* 2017). *Penicillium purpurogenum* GH2 em cultivo submerso produz maior quantidade de colorantes no pH 5 e maior concentração de biomassa no pH 7 (MÉNDEZ *et al.* 2011). *Penicillium aculeatum* em cultivo submerso produz maior quantidade de colorantes

no pH 6,5 sendo o pH destacado como parâmetro mais relevante pelo autor (AFSHARI *et al.* 2015). Outro trabalho que demonstra a importância desse parâmetro demonstrou que modificando o pH inicial foi possível produzir colorantes de *Monascus anka* sem citrinina, uma micotoxina colorida (KANG *et al.* 2014).

O tamanho de inóculo é um parâmetro que deve ser investigado pois influi no tempo necessário para produção de pigmento (MORALES-OYERVIDES *et al.* 2015). No presente trabalho, os tamanhos de inóculo 1×10^4 e 1×10^6 células/mL resultaram em maior produção de colorante e o inóculo 1×10^3 resultou em maior concentração de biomassa. Inóculo elevados geralmente estão associados a quantidades de colorantes maiores e que aparecem com menos tempo no bioprocessamento, também é conhecido que o uso de discos miceliais favorece a produção de colorante em relação do inóculo através da contagem de esporos (MORALES-OYERVIDES *et al.* 2015; SANTOS-EBINUMA *et al.* 2014).

A influência da concentração do glicerol no meio de cultivo é um parâmetro que deve ser investigado pois influi na atividade de água que por sua vez está relacionado a germinação do fungo (STEVENSON *et al.* 2017). Nas presentes condições experimentais, os colorantes foram produzidos somente na ausência do glicerol. *Monascus sp.* em cultivo submerso produz maior quantidade de colorantes com concentração de glicerol de 0,8 M (BABITHA, SOCCOL, PANDEY, 2007). *Monascus sanguineus* em cultivo submerso produz maior quantidade de colorantes com concentração de glicerol de 0,25 M (DIKSHIT, TALLAPRAGADA, 2014).

A influência da concentração de cloreto de sódio está relacionado ao estresse osmótico (ZAJC *et al.* 2014) mas, no caso do *P. sclerotiorum*, é descrito que alguns dos metabólitos coloridos, como esclerotiorina, precisam de doadores de íons de cloro para serem sintetizados (LUCAS *et al.* 2010). Dentre as diferentes concentrações avaliadas, a ausência de cloreto de sódio (padrão) apresentou maior produção colorante e a concentração de NaCl 3% apresentou

maior biomassa. Em estudo realizado com *Penicillium* sp., não houve aumento na produção de colorantes ao aumentar a concentração de NaCl, e em concentrações de NaCl até 2% p/v o colorante não era lançado no meio extracelular (CHINTAPENTA *et al.* 2014).

O excesso de luz ou sua ausência total podem ser considerados fatores de estresse em alguns fungos (MUKHERJEE, MISHRA, DESHMUKH, 2017). O padrão (escuridão total) apresentou maior produção de pigmento que o experimento exposto a luz. Em alguns fungos, principalmente os produtores de carotenoides à exposição a luz funciona como agente indutor na produção de pigmento visando à proteção contra radiação solar (FULLER, LOROS, DUNLAP, 2015). No caso de *P. sclerotiorum* LM 5679, a produção de pigmento aparenta não estar relacionada a esta proteção solar, a escuridão total tende a favorecer a produção de metabolismo secundário em alguns fungos (VELMURUGAN *et al.* 2010).

A agitação é um parâmetro que deve ser investigado pois influi na melhor oferta de nutrientes, oxigenação e favorece o crescimento fúngico (IBRAHIM, WELOOSAMY, LIM, 2015). No presente trabalho, a ausência de agitação favoreceu a produção de pigmento, enquanto que os níveis de agitação avaliados (50, 100 e 150 RPM) resultaram no aumento da biomassa. *Penicillium aculeatum* em cultivo submerso produz maior quantidade de colorantes na agitação 150 RPM (AFSHARI *et al.* 2015). Em um trabalho com *Monascus purpureus* a agitação de 180 RPM foi a que produziu maior quantidade de colorante (LV *et al.*, 2017).

Testes de co-cultura possuem resultados inesperados podendo favorecer a produção de metabólitos secundários pelo fungo (BERTRAND *et al.* 2014). Neste trabalho, foram realizados inóculos com microrganismos vivos e mortos. Somente a *C. albicans* (viva) conseguiu crescer quando observado no controle. Neste experimento, o padrão (ausente de microrganismos) produziu maior quantidade de pigmento enquanto os demais produziram quantidades inferiores, mas semelhantes entre si com exceção da co-cultura com *C. albicans* (viva) que produziu menor quantidade de pigmento e de biomassa.

A co-cultura de *Penicillium* sp. HSD07B com *Candida tropicalis* resultou em pigmento colorido descoberto ao acaso devido contaminação das placas de *C. tropicalis* por *Penicillium* sp. (HAILEI *et al.* 2011). Outros metabólitos secundários também vem sendo explorados por co-cultura como novos derivados furonona e alcaloides provenientes da co-cultura entre *Aspergillus sclerotiorum* e *Penicillium citrinum* (BAO *et al.* 2017) e a indução de compostos 2,5-dicetopiperazinas (2,5-DKPs) provenientes da co-cultura de *Penicillium* sp. DT-F29 com *Bacillus* sp. B31 (Yu *et al.*, 2017).

O presente trabalho apresentou algumas limitações: a) não foi realizada uma caracterização química dos tipos de colorantes que foram produzidos nas diferentes condições investigadas; b) o uso de experimentos do tipo univariados não permitiram avaliar a interação entre fatores para produção de pigmentos; c) biorreatores não foram investigados.

No entanto, o presente trabalho deve ser considerado robusto devido: a) ao número de fatores investigados, b) ao modo com que os pigmentos foram analisados (durante todos os experimentos) o aspecto visual esteve relacionado com as absorvidades observadas.

O presente trabalho nos permitiu definir a influência de diferentes fatores de estresse na produção de colorantes por *P. sclerotiorum* LM 5679. A produção de colorantes e biomassa não estiveram diretamente correlacionadas demonstrando que condições distintas do metabolismo secundário estiveram relacionadas com a produção dos colorantes. Esse trabalho é importante e apresenta-se como mais uma evidência que fatores de estresse devem ser investigados para otimização de bioprocessos.

5 Referências Bibliográficas

AFSHARI, M.; SHAHIDI, F.; MORTAZAVI, S. A.; TABATABAI, F.; ES'HAGHI, Z. Investigating the influence of pH, temperature and agitation speed on yellow pigment production by *Penicillium aculeatum* ATCC 10409. **Natural Product Research**, v. 29, n. 14, p. 1300–1306. 2015.

BABITHA, S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1554–1560, 2007.

BAO, J.; WANG, J.; ZHANG, X.-Y.; NONG, X.-H.; QI, S.-H. New furanone derivatives and alkaloids from the co-culture of marine-derived fungi *Aspergillus sclerotiorum* and *Penicillium citrinum*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 14, n. 3, p. e1600327. 2017.

BERTRAND, S.; BOHNI, N.; SCHNEE, S.; SCHUMPP, O.; GINDRO, K.; WOLFENDER, J.-L. Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1180–1204. 2014.

BERTRAND, S.; SCHUMPP, O.; BOHNI, N.; MONOD, M.; GINDRO, K.; WOLFENDER, J. L. *De novo* production of metabolites by fungal co-culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 6, p. 1157–1165, 2013.

BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N.; FERNANDES, É. K. K.; FLINT, S. D.; ROBERTS, D. W. Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. **Current Genetics**, p. 405–425, 2015.

CELESTINO, J. D. R.; CARVALHO, L. E. DE; LIMA, M. D. P.; LIMA, A. M.; OGUSKU, M. M.; SOUZA, J. V. B. DE. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 569–575, 2014.

CHEN, D.; MA, S.; HE, L.; YUAN, P.; SHE, Z.; LU, Y. Sclerotiorin inhibits protein kinase G from *Mycobacterium tuberculosis* and impairs mycobacterial growth in macrophages. **Tuberculosis**, v. 103, p. 37–43. 2017.

CHEN, G.; SHI, K.; SONG, D.; QUAN, L.; WU, Z. The pigment characteristics and productivity shifting in high cell density culture of *Monascus anka* mycelia. **BMC Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 72, 13. 2015.

CHIDANANDA, C.; VASANTHA, K. Y.; SATTUR, A. P. Sclerotiorin is non-mutagenic and inhibits human PMNL 5-lipoxygenase and platelet aggregation. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 53, n. 4, p. 228–231, 2015.

CHINTAPENTA, L. K.; RATH, C. C.; MARINGINTI, B.; OZBAY, G. Pigment production from a mangrove *Penicillium*. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 26, p. 2668–2674, 2. 2014.

DIKSHIT, R.; TALLAPRAGADA, P. Statistical optimization of pigment production by *Monascus sanguineus* under stress condition. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 68–79, 2014.

DUFOSSÉ, L.; FOUILLAUD, M.; CARO, Y.; MAPARI, S. A. S.; SUTTHIWONG, N. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 56–61, 2014.

FULLER, K. K.; LOROS, J. J.; DUNLAP, J. C. Fungal photobiology: visible light as a signal for stress, space and time. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 275–288, 2015.

GAUTAM, N. Food Colorants and their Toxicology: An Overview. **Sunsari Technical College Journal**, v. 2, n. 1, p. 69, 28 abr. 2016.

GMOSEK, R.; FERREIRA, J. A.; LENNARTSSON, P. R.; TAHERZADEH, M. J. Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 4, 10. 2017.

HAILEI, W.; ZHIFANG, R.; PING, L.; YANCHANG, G.; GUOSHENG, L.; JIANMING, Y. Improvement of the production of a red pigment in *Penicillium* sp. HSD07B synthesized during co-culture with *Candida tropicalis*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6082–6087, 2011.

IBRAHIM, D.; WELOOSAMY, H.; LIM, S.-H. Effect of agitation speed on the morphology of *Aspergillus niger* HFD5A-1 hyphae and its pectinase production in submerged fermentation. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 265, 2015.

KANG, B.; ZHANG, X.; WU, Z.; WANG, Z.; PARK, S. Production of citrinin-free *Monascus* pigments by submerged culture at low pH. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 55, p. 50–57, 2014.

LI, J.; WANG, J.; JIANG, C.-S.; LI, G.; GUO, Y.-W. (+)-Cyclophenol, a new naturally occurring 7-membered 2,5-dioxopiperazine alkaloid from the fungus *Penicillium sclerotiorum*

endogenous with the Chinese mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 16, n. 5, p. 542–548, 2014.

LUCAS, E. M. F.; CASTRO, M. C. M. DE; TAKAHASHI, J. A. Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromophilone VI and pencolide, metabolites from a Brazilian cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* Van Beyma. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 785–789, 2007.

LUCAS, E. M. F.; MACHADO, Y.; FERREIRA, A. A.; DOLABELLA, L. M. P.; TAKAHASHI, J. A. Improved production of pharmacologically-active sclerotiorin by *Penicillium sclerotiorum*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 4, p. 365–371, 2010.

LV, J.; ZHANG, B.-B.; LIU, X.-D.; ZHANG, C.; CHEN, L.; XU, G.-R.; CHEUNG, P. C. K. Enhanced production of natural yellow pigments from *Monascus purpureus* by liquid culture: The relationship between fermentation conditions and mycelial morphology. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 124, n. 4, p. 452–458, 2017.

MACCURTIN, T.; REILLY, J. Sclerotiorine, a chlorinated metabolic product of *Penicillium sclerotiorum*, Van Beyma. **Nature (London, United Kingdom)**, v. 146, p. 335, 1940.

MÉNDEZ, A.; PÉREZ, C.; MONTAÑÉZ, J. C.; MARTÍNEZ, G.; AGUILAR, C. N. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 12, n. 12, p. 961–968, 2011.

MÉRILLON, J.-M.; RAMAWAT, K. G. **Fungal Metabolites**. Cham: Springer International Publishing, 2017.

MINAMI, P. **Micologia: Métodos Laboratoriais de Diagnóstico das Micoses**. 1º Edição ed. São Paulo: Manole, 2003.

MORALES-OYERVIDES, L.; OLIVEIRA, J. C.; SOUSA-GALLAGHER, M. J.; MÉNDEZ-ZAVALA, A.; MONTAÑÉZ, J. C. Quantitative assessment of the impact of the type of inoculum on the kinetics of cell growth, substrate consumption and pigment productivity by *Penicillium purpurogenum* GH2 in liquid culture with an integrated stochastic approach. **Food and Bioproducts Processing**, v. 96, p. 221–231, 2015.

MUKHERJEE, G.; MISHRA, T.; DESHMUKH, S. K. Fungal pigments: An overview. *In: Developments in Fungal Biology and Applied Mycology*. Singapore: Springer Singapore, 2017. p. 525–541.

NEVES, M. R. P. DAS. **Produção de Colorantes e Atividade Biológica de Esclerotiorina**. Universidade Federal do Amazonas, 2016.

OLIVEIRA, L. A. DE. **Produção, isolamento e identidade de colorantes produzidos por fungos isolados de amostras do solo Amazônico**. Universidade Estadual do Amazonas, 2017.

OPAS; ANVISA, SAÚDE. **Controle interno da qualidade para testes de sensibilidade a antimicrobianos**. Brasília, 2006.

PAIRET, L.; WRIGLEY, S. K.; CHETLAND, I.; REYNOLDS, E. E.; HAYES, M. A.; HOLLOWAY, J.; AINSWORTH, A. M.; KATZER, W.; CHENG, X. M.; HUPE, D. J. Azaphilones with endothelin receptor binding activity produced by *Penicillium sclerotiorum*: taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity. **The Journal of antibiotics**, v. 48, n. 9, p. 913–923, 1995.

PATAKOVA, P. *Monascus* secondary metabolites: Production and biological activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 169–181, 2013.

POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R.; SOUSA, G. S.; ANDRADE, J. C. R.; LISBOA, H. F.; GONÇALVES, R. C. R. Production of melanin pigment by fungi and its biotechnological applications. **Melanin**. InTech, 2017.

SANTOS-EBINUMA, V. C.; ROBERTO, I. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; PESSOA, A. Improvement of submerged culture conditions to produce colorants by *Penicillium purpurogenum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 731–742, 2014.

SANTOS-EBINUMA, V. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; PESSOA, A. Submerged culture conditions for the production of alternative natural colorants by a new isolated *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 802–810, 2013.

STEVENSON, A.; HAMILL, P. G.; MEDINA, Á.; KMINEK, G.; RUMMEL, J. D.;

DIJKSTERHUIS, J.; TIMSON, D. J.; MAGAN, N.; LEONG, S.-L. L.; HALLSWORTH, J. E. Glycerol enhances fungal germination at the water-activity limit for life. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 947–967, 2017.

TULI, H. S.; CHAUDHARY, P.; BENIWAL, V.; SHARMA, A. K. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 4669–4678, 2015.

VELMURUGAN, P.; LEE, Y. H.; VENIL, C. K.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; CHAE, J.-C.; OH, B.-T. Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 346–350, 2010.

VERMA, S.; GUPTA, G. Natural dyes and its applications: a brief review. **International Journal of Research and Analytical Reviews**, v. 4, n. 4, p. 57–60, 2017.

WANG, M.; HUANG, T.; CHEN, G.; WU, Z. Production of water-soluble yellow pigments via high glucose stress fermentation of *Monascus ruber* CGMCC 10910. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 8, p. 3121–3130, 2017.

YU, L.; DING, W.; WANG, Q.; MA, Z.; XU, X.; ZHAO, X.; CHEN, Z. Induction of cryptic bioactive 2,5-diketopiperazines in fungus *Penicillium* sp. DT-F29 by microbial co-culture. **Tetrahedron**, v. 73, n. 7, p. 907–914, 2017.

ZAJC, J.; KOGEJ, T.; GALINSKI, E. A.; RAMOS, J.; GUNDE-CIMERMANA, N. Osmoadaptation strategy of the most halophilic fungus, *Wallemia ichthyophaga*, growing optimally at salinities above 15% NaCl. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 247–256, 2014.

ZHOU, S.; WANG, M.; ZHAO, H.; HUANG, Y.; LIN, Y.; TAN, G.; CHEN, S. Penicilazaphilone C, a new antineoplastic and antibacterial azaphilone from the Marine Fungus *Penicillium sclerotiorum*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 39, n. 12, p. 1621–1627, 2016.

6 CONCLUSÃO

Portanto, o presente trabalho nos permitiu definir a influência de diferentes fatores de estresse na produção de colorantes por *P. sclerotiorum* LM 5679. A produção de colorantes e biomassa não estiveram diretamente correlacionadas demonstrando que condições distintas do metabolismo primário estiveram relacionadas com a produção dos colorantes. Esse trabalho é importante e apresenta-se como mais uma evidência que fatores de estresse devem ser investigados para otimização de bioprocessos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L. M.; HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES, L.; SANTOS, C.; RIBEIRO GALVÃO, L.; GOMES CARDOSO, P.; LUIZA BIM GRIGOLETTO, T.; NIRLANE DA COSTA SOUZA, P.; ALBERTO BERALDO DE MORAES, L. Production and chemical characterization of pigments in filamentous fungi. **Microbiology**, v. 162, n. 1, p. 12–22, 2016.

ALI, H. Biodegradation of synthetic dyes - A review. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 213, n. 1–4, p. 251–273, 2010.

ALPER, H.; MOXLEY, J.; NEVOIGT, E.; FINK, G. R.; STEPHANOPOULOS, G. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. **Science**, v. 314, n. 5805, p. 1565–1568, 2006.

ARAI, T.; KOGANEI, K.; UMEMURA, S.; KOJIMA, R.; KATO, J.; KASUMI, T.; OGIHARA, J. Importance of the ammonia assimilation by *Penicillium purpurogenum* in amino derivative *Monascus* pigment, PP-V, production. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 19, 2013.

AVERY, P. B.; FAULL, J.; SIMMONDS, M. S. J. Effect of different photoperiods on the growth, infectivity and colonization of *Trinidadian* strains of *Paecilomyces fumosoroseus* on the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*, using a glass slide bioassay. **Journal of insect science (Online)**, v. 4, p. 38, 2004.

BAKER, C. L.; LOROS, J. J.; DUNLAP, J. C. The circadian clock of *Neurospora crassa*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 1, p. 95–110, 2012.

BALL, P.; HALLSWORTH, J. E. Water structure and chaotropicity: their uses, abuses and biological implications. **Phys. Chem. Chem. Phys.**, v. 17, n. 13, p. 8297–8305, 2015.

BERTRAND, S.; SCHUMPP, O.; BOHNI, N.; MONOD, M.; GINDRO, K.; WOLFENDER, J. L. De novo production of metabolites by fungal co-culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 6, p. 1157–1165, 2013.

BHAGANNA, P.; VOLKERS, R. J. M.; BELL, A. N. W.; KLUGE, K.; TIMSON, D. J.; MCGRATH, J. W.; RUIJSSENAARS, H. J.; HALLSWORTH, J. E. Hydrophobic substances induce water stress in microbial cells. **Microbial Biotechnology**, v. 3, n. 6, p. 701–716, 2010.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. DE A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial: fundamentos**. 1. ed. São Paulo. v. 1, 2001.

BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N.; FERNANDES, É. K. K.; FLINT, S. D.; ROBERTS, D. W. Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia. **Current Genetics**, p. 405–425, 2015.

BRASIL. **Resolução do CNNPA N. 44, de 1977**.

BRASIL. **Resolução N. 11, de 2006 do GMC**.

BRASIL. **Instrução Normativa N° 42/2010, MAPA**.

BRASIL. ANVISA, **Informe Técnico N. 68, de 2015.**

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

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Natural food additives: *Quo vadis?* **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, n. 2, p. 284–295, 2015.

CELESTINO, J. D. R.; CARVALHO, L. E. DE; LIMA, M. D. P.; LIMA, A. M.; OGUSKU, M. M.; SOUZA, J. V. B. DE. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 569–575, 2014.

CHEN, F.; ISHWARAN, N.; PEZZUTI, J. C. B. Deforestation monitoring in the Amazon River estuary by multi-temporal Envisat ScanSAR data. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 34, 2016.

CHIANG, Y. M.; SZEWCZYK, E.; DAVIDSON, A. D.; KELLER, N.; OAKLEY, B. R.; WANG, C. C. C. A gene cluster containing two fungal polyketide synthases encodes the biosynthetic pathway for a polyketide, asperfuranone, in *Aspergillus nidulans*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 8, p. 2965–2970, 2009.

COLLINS, K. D.; WASHABAUGH, M. W. The Hofmeister effect and the behaviour of water at interfaces. **Quarterly reviews of biophysics**, v. 18, n. 4, p. 323–422, nov. 1985.

DUFOSSÉ, L. Microbial production of food grade pigments. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 313–321, 2006.

DUFOSSÉ, L.; FOUILLAUD, M.; CARO, Y.; MAPARI, S. A. S.; SUTTHIWONG, N. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 56–61, 2014.

DURÁN, N.; TEIXEIRA, M. F. S.; CONTI, R. DE; ESPOSITO, E. Ecological-friendly pigments from fungi. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42, n. 1, p. 53–66, 2002.

ERASMUS, D. J.; MERWE, G. K. VAN DER; VUUREN, H. J. J. VAN. Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. **FEMS Yeast Research**, v. 3, n. 4, p. 375–399, 2003.

FEKETE, G.; TSABOURI, S. Common food colorants and allergic reactions in children: Myth or reality? **Food Chemistry**, v. 230, p. 578–588, 2017.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; MCSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. Segunda Edição. Boston, MA: Springer US, 2017.

GARCÍA-RÍOS, E.; RAMOS-ALONSO, L.; GUILLAMÓN, J. M. Correlation between low temperature adaptation and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. Agosto, p. 1–11, 2016.

GAUTAM, N. Food Colorants and their Toxicology: An Overview. **Sunsari Technical College Journal**, v. 2, n. 1, p. 69, 2016.

GHALY, A. E.; ANANTHASHANKAR, R.; ALHATTAB, M.; RAMAKRISHNAN, V. Production, characterization and treatment of textile effluents: a critical review. **Journal of Chemical Engineering & Process Technology**, v. 05, n. 01, p. 1–18, 2014.

GUERIN, M.; HUNTLEY, M. E.; OLAIZOLA, M. *Haematococcus* astaxanthin: Applications for human health and nutrition. **Trends in Biotechnology**, v. 21, n. 5, p. 210–216, 2003.

HAILEI, W.; ZHIFANG, R.; PING, L.; YANCHANG, G.; GUOSHENG, L.; JIANMING, Y. Improvement of the production of a red pigment in *Penicillium* sp. HSD07B synthesized during co-culture with *Candida tropicalis*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6082–6087, 2011.

HALL, J. E. **Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2015.

HALLSWORTH, J. E.; MAGAN, N. Culture Age, Temperature, and pH Affect the Polyol and Trehalose Contents of Fungal Propagules. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 7, p. 2435–2442, 1996.

HAMAGUCHI, K.; GEIDUSCHEK, E. P. The effect of electrolytes on the stability of the deoxyribonucleate helix. **Journal of the American Chemical Society**, v. 84, n. 8, p. 1329–1338, 1962.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 163–187, 2010.

KANAREK, R. B. Artificial food dyes and attention deficit hyperactivity disorder. **Nutrition Reviews**, v. 69, n. 7, p. 385–391, 2011.

KANG, B.; ZHANG, X.; WU, Z.; WANG, Z.; PARK, S. Production of citrinin-free *Monascus* pigments by submerged culture at low pH. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 55, p. 50–57, 2014.

KOENDERINK, J. J. **Color for the Sciences**. The MIT Press, 2010.

KUZINA, V.; CERDÁ-OLMEDO, E. Modification of sexual development and carotene production by acetate and other small carboxylic acids in *Blakeslea trispora* and *Phycomyces blakesleeanus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 4917–4922, 2006.

LÓPEZ-MALO, M.; QUEROL, A.; GUILLAMON, J. M. Metabolomic Comparison of *Saccharomyces cerevisiae* and the cryotolerant species *S. bayanus* var. *uvarum* and *S. kudriavzevii* during wine fermentation at low temperature. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

LUCAS, E. M. F.; CASTRO, M. C. M. DE; TAKAHASHI, J. A. Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromophilone VI and pencolide, metabolites from a Brazilian cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* Van Beyma. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 785–789, 2007.

LUCAS, E. M. F.; MACHADO, Y.; FERREIRA, A. A.; DOLABELLA, L. M. P.; TAKAHASHI, J. A. Improved production of pharmacologically-active sclerotiorin by *Penicillium sclerotiorum*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 4, p. 365–371, 2010.

MACCURTIN, T.; REILLY, J. Sclerotiorine, a chlorinated metabolic product of *Penicillium sclerotiorum*, Van Beyma. **Nature (London, United Kingdom)**, v. 146, p. 335, 1940.

MADGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BACKLEY, D. H.; STHAL, D. A. **Microbiologia de Broock**. Artmed Editora, 2016.

MALIK, K.; TOKKAS, J.; GOYAL, S. Microbial Pigments: a review. **International Journal of Microbial Resource Technology Accepted**, v. 1, n. 4, p. 361–365, 2012.

MAPARI, S. A. S.; MEYER, A. S.; THRANE, U.; FRISVAD, J. C. **Production of Monascus-like pigments**, 2012. Disponível em: <<https://www.google.com/patents/EP2262862B1?cl=en>>

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

MÉNDEZ, A.; PÉREZ, C.; MONTAÑÉZ, J. C.; MARTÍNEZ, G.; AGUILAR, C. N. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 12, n. 12, p. 961–968, 2011.

MÉRILLON, J.-M.; RAMAWAT, K. G. **Fungal Metabolites**. Cham: Springer International Publishing, 2017.

MINAMI, P. **Micologia: Métodos Laboratoriais de Diagnóstico das Micoses**. 1º Edição ed. São Paulo: Manole, 2003.

MIRJALILI, M.; NAZARPOOR, K.; KARIMI, L. Eco-friendly dyeing of wool using natural dye from weld as co-partner with synthetic dye. **Journal of Cleaner Production**, v. 19, n. 9–10, p. 1045–1051, 2011.

MOUGIN, C.; KOLLMANN, A.; JOLIVALT, C. Enhanced production of laccase in the fungus *Trametes versicolor* by the addition of xenobiotics. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 2, p. 139–142, 2002.

NEVES, M. R. P. DAS. **Produção de Colorantes e Atividade Biológica de Esclerotiorina**. Universidade Federal do Amazonas, 2016.

OLIVEIRA, L. A. DE. **Produção, isolamento e identidade de colorantes produzidos por fungos isolados de amostras do solo Amazônico**. Universidade Estadual do Amazonas, 2017.

OMS. **Codex Alimentarius da FAO/OMS**.

OPAS, O. P.-A. DA S.; ANVISA, A. N. DE V. S.; SAÚDE, S. DE V. EM S. S. **Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a antimicrobianos**. Brasília.

PAIRET, L.; WRIGLEY, S. K.; CHETLAND, I.; REYNOLDS, E. E.; HAYES, M. A.; HOLLOWAY, J.; AINSWORTH, A. M.; KATZER, W.; CHENG, X. M.; HUPE, D. J. Azaphilones with endothelin receptor binding activity produced by *Penicillium sclerotiorum*: taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity. **The Journal of antibiotics**, v. 48, n. 9, p. 913–923, 1995.

PANGESTUTI, R.; KIM, S. K. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 4, p. 255–266, 2011.

PATAKOVA, P. *Monascus* secondary metabolites: Production and biological activity. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 169–181, 2013.

PATTANAGUL, P.; PINTHONG, R.; PHIANMONGKHOL, A.; THARATHA, S. Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus* sp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 1–2, p. 20–23, 2008.

PITT, J. I. **The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces***. 1ª Edição ed. Londres: ACADEMIC PRESS INC, 1981. v. 21

RAINA, S.; ODELL, M.; KESHAVARZ, T. Quorum sensing as a method for improving sclerotiorin production in *Penicillium sclerotiorum*. **Journal of Biotechnology**, v. 148, n. 2–3, p. 91–98, 2010.

SANTOS-EBINUMA, V. C.; ROBERTO, I. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; PESSOA, A. Improvement of submerged culture conditions to produce colorants by *Penicillium purpurogenum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 731–742, 2014.

SANTOS-EBINUMA, V. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; PESSOA, A. Submerged culture conditions for the production of alternative natural colorants by a new isolated *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 802–810, 2013.

SARDARYAN, E. **Strain of the Microorganism *Penicillium Oxalicum* Var *Ameniaca* and its Application**. Estados Unidos da America, 2002. Disponível em: < <https://patents.google.com/patent/US6340586> >

SCHIMEL, J.; BALSER, T. C.; WALLENSTEIN, M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. **Ecology**, v. 88, n. 6, p. 1386–1394, 2007.

SERVETAS, I.; BERBEGAL, C.; CAMACHO, N.; BEKATOROU, A.; FERRER, S.; NIGAM, P.; DROUZA, C.; KOUTINAS, A. A. *Saccharomyces cerevisiae* and *Oenococcus oeni* immobilized in different layers of a cellulose/starch gel composite for simultaneous alcoholic and malolactic wine fermentations. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 1279–1284, 2013.

SKIRYCH, A.; KIERSZNIOWSKA, S.; MÉRET, M.; WILLMITZER, L.; TZOTZOS, G. Medicinal Bioprospecting of the Amazon Rainforest: A Modern Eldorado? **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 10, p. 781–790, 2016.

STAUNTON, J.; WEISSMAN, K. J. Polyketide biosynthesis: a millennium review. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 4, p. 380–416, 2001.

TALBOT, N. J.; MCCAFFERTY, H. R. K.; MA, M.; MOORE, K.; HAMER, J. E. Nitrogen starvation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* may act as an environmental cue for disease symptom expression. **Physiological and molecular Plant Pathology**, v. 50, p. 179–195, 1997.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. Artmed Editora, 2016.

TULI, H. S.; CHAUDHARY, P.; BENIWAL, V.; SHARMA, A. K. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 4669–4678, 2015.

VERMA, S.; GUPTA, G. Natural dyes and its applications: a brief review. **International Journal of Research and Analytical Reviews**, v. 4, n. 4, p. 57–60, 2017.

WANG, M.; HUANG, T.; CHEN, G.; WU, Z. Production of water-soluble yellow pigments via high glucose stress fermentation of *Monascus ruber* CGMCC 10910. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 8, p. 3121–3130, 2017.

ZHOU, S.; WANG, M.; ZHAO, H.; HUANG, Y.; LIN, Y.; TAN, G.; CHEN, S. Penicilazaphilone C, a new antineoplastic and antibacterial azaphilone from the Marine Fungus *Penicillium sclerotiorum*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 39, n. 12, p. 1621–1627, 2016.