
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**PRODUÇÃO DE PIGMENTOS PELO FUNGO ANTÁRTICO
PSEUDOGYMNOASCUS SP. 6DC415-1: OTIMIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E
IDENTIFICAÇÃO.**

ISABELA FERNANDA DA SILVA

Rio Claro - SP

2022



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**PRODUÇÃO DE PIGMENTOS PELO FUNGO ANTÁRTICO
PSEUDOGYMNOASCUS SP. 6DC415-I: OTIMIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E
IDENTIFICAÇÃO.**

ISABELA FERNANDA DA SILVA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Daiane Cristina Sass

Rio Claro - SP

Junho - 2022

S586p

Silva, Isabela Fernanda da

Produção de pigmentos pelo fungo antártico *Pseudogymnoascus* sp. 6DC415-I: otimização, purificação e identificação / Isabela Fernanda da Silva. -- Rio Claro, 2022

76 f. : il., tabs., fotos, mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Daiane Cristina Sass

1. Fungos Antárticos. 2. Pigmentos naturais. 3. Purificação. 4. Biotecnologia. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PRODUÇÃO DE PIGMENTOS PELO FUNGO ANTÁRTICO
PSEUDOGYMNOASCUS SP. 6DC415-I: OTIMIZAÇÃO, PURIFICAÇÃO E
IDENTIFICAÇÃO

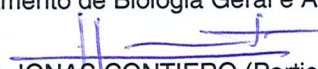
AUTORA: ISABELA FERNANDA DA SILVA

ORIENTADORA: DAIANE CRISTINA SASS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA), área: Microbiologia Aplicada pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. DAIANE CRISTINA SASS (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro



Prof. Dr. JONAS CONTIERO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro

Prof. Dr. ALYSSON WAGNER FERNANDES DUARTE (Participação Virtual)
Campus Arapiraca / Universidade Federal de Alagoas

gov.br

Documento assinado digitalmente
ALYSSON WAGNER FERNANDES DUARTE
Data: 31/07/2022 16:37:24-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Rio Claro, 29 de julho de 2022

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família, principalmente, aos meus pais, Sonia e Ari, por terem me apoiado e confortado nos momentos de dificuldade, sempre me dando suporte, acreditando no meu potencial e me incentivando.

Agradeço, é claro, à minha orientadora Prof^a Dr^a Daiane Cristina Sass, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, por toda ajuda e apoio, por ter sido compreensiva e contribuir para minha experiência profissional e agradecer pela sua dedicação com seus alunos. Agradecer a todo o pessoal do LaQBim, por serem sempre prestativos e me ajudarem quando eu precisava. Desejo a todos um brilhante futuro, pois são pessoas incríveis e merecedoras.

Também sou muito grata às meninas da Rep. Cilada, que me acolheram nesses dois anos, e à todas minhas amigas, sejam as Borgias de longa data ou as mais recentes do nosso querido grupo Melories, que estiveram comigo nessa trajetória e foram vitais para torná-la mais gratificante, pelo apoio, desabafos e risadas, sendo companhias essenciais.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A demanda por pigmentos naturais vem crescendo devido a efeitos nocivos de alguns corantes sintéticos e a busca por formas mais sustentáveis de consumo. Nesse contexto, pigmentos fúngicos fornecem uma boa alternativa aos sintéticos. As comunidades microbianas antárticas são de grande importância para a produção de metabólitos secundários, tais como os pigmentos, pois são compostos importantes para a adaptação desses organismos ao ambiente extremo em que vivem. Além disso, devido ao seu isolamento, essas comunidades podem ser uma fonte rica de novos produtos naturais com estruturas químicas únicas. Este trabalho visou analisar a produção dos pigmentos vermelhos pelo fungo *Pseudogymnoascus* sp. 6DC415-I, isolado de sedimentos marinhos da Antártica, bem como otimizá-la, seguida da purificação e identificação dos pigmentos produzidos. Para tal, avaliou-se a produção dos pigmentos vermelhos nas temperaturas de 15 e 25 °C e nos pHs 3, 5, 7 e 9 em meio líquido Malte 2% por 20 dias de incubação a 150 rpm. Nas condições de 15 °C e pH 5 se obteve a maior produção dos pigmentos, avaliada na leitura de absorvância em 500 nm, sendo que a 25 °C não se detectou produção de pigmentos vermelhos. O fungo foi cultivado em meio Malte Ágar 1% e os pigmentos produzidos no meio de cultura foram extraídos com acetona. O extrato bruto foi submetido a cromatografia de camada reversa C18 para sua purificação, na qual obteve-se três frações vermelhas eluídas em Metanol 90 %. As frações foram submetidas às análises de RMN de ¹H e FT-IR e obteve-se a confirmação da purificação de duas delas como compostos muito similares. Os espectros dessas frações indicaram tratarem-se de compostos da classe das melaninas, da categoria das feomelaninas. A atividade antibacteriana do extrato bruto e das frações obtidas foi testada contra as bactérias *Xanthomonas citri*, *X. passiflorae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, através do método de microdiluição em poços e leitura da D.O₆₀₀, não sendo observada nenhuma inibição de crescimento superior a 50%. Também avaliou-se a atividade antioxidante das mesmas amostras, por meio do método de captura de DPPH, com resultado de IC₅₀ a 1000 µg/mL para a fração 1 e 1143 µg/mL para a fração 2. Apesar do gênero *Pseudogymnoascus* sp. ser bastante comum ao ambiente antártico, até o momento, não há muitos estudos referentes à sua produção de pigmentos, principalmente de feomelanina. O pigmento vermelho extracelular e solúvel em água produzido pelo *Pseudogymnoascus* sp. 6DC415-I pode então representar um potencial para aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Fungo antártico, pigmentos naturais, feomelanina.

ABSTRACT

The demand for natural pigments has been growing due to the harmful effects of some synthetic dyes and the search for more sustainable forms of consumption. In this context, fungal pigments provide a good alternative to synthetic ones. Antarctic microbial communities are of great importance for the production of secondary metabolites, such as pigments, due to their role in helping these organisms adapt to the extreme environment in which they live. Furthermore, because of their isolation, these communities can be a rich source of new products with unique structures. This study aimed to analyze the production of red pigments by the fungus *Pseudogymnoascus* sp. 6DC415-I, isolated from antarctic marine sediments, as well as optimizing it, followed by purification and identification of the pigments produced. In order to do that, the production of red pigments was evaluated at temperatures of 15 and 25 °C and at pHs 3, 5, 7 and 9 in 2% Malt broth for 20 days of incubation at 150 rpm. The biggest production of pigments obtained, quantified in the absorbance reading at 500 nm, was at 15 °C and pH 5. No red pigments production was detected at 25 °C. The fungus was cultivated in 1% Malte Agar medium and pigments produced were extracted from the culture medium with acetone. The crude extract was subjected to C18 reversed-phase chromatography for its purification, in which three red fractions were eluted in 90 % methanol. The fractions were submitted to ¹H NMR and FT-IR analysis. Two of them were purified and were similar compounds. According to their spectra, the fractions are melanins, belonging to the pheomelanin category. The antibacterial activity of the crude extract and fractions was tested against the bacteria *Xanthomonas citri*, *X. passiflorae*, *Escherichia coli*, *Streptococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, using the microdilution in wells method and reading of their O.D₆₀₀. No growth inhibition greater than 50% was observed. The antioxidant activity of the samples was also evaluated, using the DPPH scavenging activity method, with an IC₅₀ result of 1000 µg/mL for fraction 1 and 1143 µg/mL for fraction 2. Although the genus *Pseudogymnoascus* sp. is quite common in the Antarctic environment, there are not many studies regarding its production of pigments so far, specially pheomelanin. The extracellular, water-soluble red pigment produced by *Pseudogymnoascus* sp. 6DC415-I could then represent a potential for biotechnological applications.

Keywords: Antarctic fungus, natural pigments, pheomelanin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de fungos filamentosos produtores de pigmentos.....	18
Figura 2. Exemplos da estrutura química de alguns pigmentos produzidos por fungos filamentosos.....	22
Figura 3. Mapa da Ilha de Rei George, localizada ao norte do continente Antártico (voltado para a América do Sul).....	29
Figura 4. Extração dos pigmentos do meio sólido Ágar Malte 1% após 20 dias de incubação à 15 °C.....	32
Figura 5. Esquema de uma microplaca de 96 poços utilizada para o teste de atividade antibacteriana.....	34
Figura 6. Produção de pigmentos após o período de 20 dias de incubação a 15 °C e agitação a 150 rpm.....	38
Figura 7. Produção de pigmentos após o período de 20 dias de incubação a 25 °C e agitação a 150 rpm.....	41
Figura 8. Resultado da produção de pigmentos em meio sólido MA 1%.....	43
Figura 9. Placas de sílica da cromatografia em camada delgada do extrato obtido do fungo <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 6DC145-I.....	43
Figura 10. Coluna cromatográfica C18 no decorrer do procedimento de fracionamento do extrato obtido do fungo <i>Pseudogymnoascus</i> sp. 6DC145-I.....	44
Figura 11. Amostras eluídas da purificação do extrato de <i>Pseudogymnoascus</i> sp 6DC415 em coluna C18 e fase móvel gradiente.....	45
Figura 12. Análise de RMN de ¹ H da fração 1 em D ₂ O.....	46
Figura 13. Análise de RMN de ¹ H da fração 2 em D ₂ O.....	46
Figura 14. Espectro de RMN de ¹ H da melanina biossintetizada em D ₂ O/amônia aquosa.....	47
Figura 15. Estrutura da feomelanina.....	48
Figura 16. Espectros de infravermelho (FT-IR) das frações 1 (F1) e 2 (F2).....	48
Figura 17. Espectro de infravermelho (FT-IR) da melanina intracelular do micélio de <i>Lachnum singerianum</i> YM296 (LIM-a).....	49
Figura 18. Teste de atividade antioxidante pelo método de captura de DPPH.....	52
Figura 19. Gráfico com os valores da porcentagem de inibição de DPPH x concentração (µg/mL) das frações e do ácido ascórbico.....	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1. Corantes e pigmentos.....	11
2.1.1. História e novas tendências.....	11
2.1.2. Pigmentos naturais.....	14
2.1.3. Pigmentos produzidos por fungos filamentosos.....	17
2.2. Produção de pigmentos por fungos filamentosos antárticos.....	24
2.3. Gênero <i>Pseudogymnoascus</i>	26
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. Objetivos gerais.....	28
3.2. Objetivos específicos.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1. Origem do fungo antártico.....	28
4.2. Avaliação da influência do pH e temperatura na produção de pigmentos.....	29
4.3. Produção e extração dos pigmentos naturais em meio sólido.....	30
4.4. Fracionamento do extrato.....	32
4.5. Identificação dos pigmentos.....	32
4.5.1. Análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹ H).....	32
4.5.2. Análise de infravermelho com transformação de Fourier (FT-IR).....	33
4.6. Avaliação <i>in vitro</i> da bioatividade dos pigmentos extraídos.....	33
4.6.1. Atividade antibacteriana.....	33
4.6.2. Atividade antioxidante.....	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1. Avaliação da influência do pH e temperatura na produção dos pigmentos.....	37
5.1.1. Cultivo em diferentes pHs sob temperatura de 15 °C.....	37
5.1.2. Cultivo em diferentes pHs sob temperatura de 25 °C.....	40
5.2. Produção e extração dos pigmentos naturais em meio sólido.....	42

5.3. Fracionamento do extrato.....	43
5.3.1. Teste em cromatografia de camada delgada.....	43
5.3.2. Cromatografia em coluna de fase reversa C18.....	44
5.4. Identificação dos pigmentos.....	46
5.4.1. Análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹ H).....	46
5.4.2. Análise de Infravermelho com transformação de Fourier (FT-IR).....	48
5.5. Avaliação <i>in vitro</i> da bioatividade dos pigmentos extraídos.....	51
5.5.1. Atividade antibacteriana.....	51
5.5.2. Atividade antioxidante.....	52
6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
7. REFERÊNCIAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

Corantes são substâncias químicas capazes de atribuir cor a algum material e são essenciais na fabricação de bens de consumo em múltiplos setores da indústria, como a de alimentos, cosméticos, têxtil, de plásticos, entre outras (ALMEIDA et al., 2018). A necessidade de colorir produtos data de milhares de anos atrás, com registros do uso de pigmentos como agentes colorantes em comidas, vestuários, cosméticos e utensílios por povos de diversas localidades do globo (ABEROUMAND, 2011; COOKSEY, 2018; ARDILA-LEAL et al., 2021 VENIL et al., 2020). Esses pigmentos eram obtidos de produtos naturais vegetais, animais ou minerais (RAO et al., 2017), até o desenvolvimento da mauveína, a primeira cor sintética, em 1856, por Sir William Henry Perkin, dando início a uma revolução na história dos corantes sintéticos, que se propagaram rapidamente (DOWNHAM; COLLINS, 2000; ZANONI; YAMANAKA, 2016).

O mercado de cores sintéticas se fortaleceu devido às vantagens que estas apresentaram, como facilidade de produção, baixo custo e maior capacidade de colorir em relação aos corantes que existiam até então, fazendo com que seu uso fosse disseminado em diversos setores da indústria (LAGASHETTI et al., 2019 VENIL, et al. 2020). Porém, muitos desses corantes sintéticos são compostos por substâncias que podem ser nocivas à saúde e também ao ambiente, por apresentarem uma longa estabilidade, sendo de difícil degradação e, conseqüentemente, persistindo por muito tempo no ambiente (MANIKPRABHU; LINGAPPA, 2013; HASSAN; CARR, 2018). Assim, torna-se prioridade retomar a utilização de produtos naturais como alternativa aos sintéticos.

Plantas e micro-organismos são as principais fontes de pigmentos naturais (RAO et al., 2017). Os micro-organismos são produtores mais vantajosos que os vegetais, devido ao seu crescimento fácil e rápido, o qual independe de condições climáticas e geográficas, por permitirem um rendimento controlável e previsível, alta produtividade, além da possibilidade de produção a partir de resíduos industriais (MANIKPRABHU; LINGAPPA, 2013; PANESAR et al., 2015).

É conhecido que os fungos filamentosos são produtores de uma enorme variedade de pigmentos. Os pigmentos são produzidos pelos fungos como parte de seu metabolismo secundário, no qual passam a produzir compostos com funções antibióticas, tóxicas, inibitórias, entre outras, para auxiliar na sua sobrevivência e que podem trazer vantagens sobre outros organismos (LOPES, 2011; BRAKHAGE, 2013), possuindo uma função

ecológica para seus produtores (O'BRIEN; WRIGHT, 2011). Os pigmentos fúngicos podem então, além de serem utilizados para colorir, trazer potenciais benéficos para a saúde humana.

São inúmeros os gêneros de fungos que são produtores de pigmentos. O gênero mais popular e antigo no uso de pigmento fúngico é o *Monascus*, produtor de pigmentos amarelos, laranjas e roxos (RAO et al., 2017; CHEN et al 2017). Outros gêneros populares pela produção de pigmentos são *Fusarium* (FRANSEN et al., 2016; SHAH et al. 2017; LEBEAU et al., 2018), *Aspergillus* (PAL et al., 2013; SARAVANAN et al., 2020), *Penicillium* (DUFOSSÉ, 2018; JIN et al., 2018; KHAN et al., 2021), e *Talaromyces* (CHADNI et al., 2017; MORALES-OYERVIDES et al., 2020). Busca-se a aplicação desses pigmentos fúngicos na indústria alimentícia (BABITHA, 2009; DUFOSSÉ, 2018) e para tingimento de tecidos, couro e madeira (HERNÁNDEZ et al.,2018; FUCK et al., 2018; YAN et al., 2019; LIU et al., 2020).

Na busca pela produção de novos compostos naturais como os pigmentos, há um interesse por organismos que vivem em ambientes extremos, por serem nichos poucos explorados e apresentarem características ambientais que induzem os micro-organismos a produzirem substâncias únicas, através de adaptações bioquímicas e fisiológicas e vias metabólicas diferenciadas, para enfrentar as condições extremas em que vivem (TIAN et al., 2017; DUFOSSÉ et al., 2014). Um desses ambientes é a Antártica, caracterizada pela temperatura extrema e com grandes variações, salinidade, escassez de nutrientes, mudanças climáticas acentuadas, alta incidência de radiação ultravioleta alternada com longos períodos de ausência de luz, além dos ciclos de congelamento e degelo (CLARKE, 2003; PIKUTA et al., 2007; ROSA, 2019). Assim, os organismos que ali habitam possuem um grande potencial biotecnológico (DUARTE et al, 2019).

Alguns dos relatos de fungos antárticos produtores de pigmentos envolvem aqueles conhecidos por produzirem melaninas (HASSAN et al., 2016; PACELLI et. al 2017), carotenoides (SINGH et al, 2014 ARCANGELI, CANNISTRARO et al., 2000), *Geomyces* sp.WNF-15A produtor de pigmento vermelho-púrpura (WANG et al., 2013) e o endêmico *Antarctomyces pellizariae* de coloração intracelular azul (MENEZES et al. 2017).

O fungo alvo deste estudo pertence ao gênero *Pseudogymnoascus*, espécies que estão presentes em abundância na Antártica, sendo relatadas em ambientes de solo (ARENZ; BLANCHETTE, 2011; GOMES et al., 2018; ROSA et al., 2020), associadas a líquens (SANTIAGO et al., 2015), musgos (TOSI et al., 2002), em permafrost (solo permanentemente

congelado) (DA SILVA et al., 2020), associadas a macroalgas endêmicas (FURBINO et al., 2014), invertebrados marinhos (GODINHO et al., 2019) e isoladas de lagos (GONÇALVES et al., 2012). Apesar de ser um gênero bastante presente no ambiente antártico, ainda não há estudos focados na produção de pigmentos por *Pseudogymnoascus* spp. isolados da Antártica.

Dessa maneira, considerando o potencial dos micro-organismos da Antártica para a obtenção de pigmentos naturais e outros produtos com usos biotecnológicos, o presente trabalho buscou purificar e identificar os pigmentos naturais produzidos pelo fungo *Pseudogymnoascus* sp. 6DC415-I, além de otimizar a produção de pigmentos pelo fungo em diferentes pHs e temperaturas. Buscou-se também avaliar a bioatividade dos pigmentos, avaliando sua atividade antibacteriana e antioxidante.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Corantes e pigmentos

2.1.1. História e novas tendências

Corantes e pigmentos são substâncias químicas capazes de atribuir cor a algum material. Estão presentes desde os primórdios da humanidade, existindo registros da utilização de agentes colorantes desde os tempos pré-históricos, em diversas localidades do globo e por diferentes povos (RAO et al., 2017).

Os primeiros registros na África e Europa datam desde a Idade da Pedra média, num período entre 150 mil a 30.000 a.C, onde utilizavam rochas e outros componentes geológicos para se obter pigmentos (ARDILA-LEAL et al., 2021). Registros arqueológicos trazem evidências do uso de vestuários e utensílios coloridos datados de 40.000 a 10.000 a.C (MASCARENHAS, 1998). A utilização de pigmentos foi se tornando cada vez mais expressiva, tendo seu destaque na Europa durante a Idade do Bronze (3000-1200 a.C), durante o período do Vale do Indo (2500 a.C) na Índia, há 5000 anos na China, nas civilizações da Mesopotâmia (3000-2000 a.C), dos Maias (2000 a.C-900 d.C) e por aí vai (RAO et al., 2017; ARDILA-LEAL et al., 2021).

No Egito, por volta de 4000 a.C, deu-se início a manufatura de corantes, com novas técnicas para melhorar as qualidades dos seus pigmentos (BARNETT et al., 2006). O pigmento mais famoso era o Azul Egípcio, uma cor difícil de se conseguir, proveniente de uma combinação de minerais e sedimentos e seu período de maior utilização coincide com a época de maior produção artística do Egito Antigo (BARNETT et al., 2006; BERKE, 2002).

Corantes eram utilizados em alimentos desde 1500 A.C, em cidades egípcias, onde extratos naturais, como cúrcuma, páprica e açafrão, e vinho eram adicionados por doceiros em seus produtos com o intuito de melhorar sua aparência (DOWNHAM; COLLINS, 2000); assim como há registros do uso de corantes em alimentos no Japão durante o século 8 (ABEROUMAND, 2011).

Para o tingimento de tecidos, os povos utilizavam pigmentos azuis extraídos das plantas *Isatis tinctoria* e *Indigofera anil*, e pigmentos vermelhos/púrpura extraídos de moluscos (VENIL et al., 2020; MASCARENHAS,1998). Esse pigmento roxo obtido dos moluscos *Murex* spp. atribuía status de nobreza, devido a grande quantidade de unidades de molusco necessária para obter poucas gramas do corante (ZANONI; YAMANAKA, 2016). Gregos também foram famosos por utilizar corantes e muito de seus métodos e conhecimentos foram adquiridos dos egípcios (ABEL, 2012). Fenícios, chineses e indianos também realizavam processos de tingimento (ZANONI; YAMANAKA, 2016). Nativos do México e do Peru (Astecas, Incas e Maias) extraíam pigmentos vermelhos de cochonilhas (*Dactylopius coccus*), um inseto de cactos, e, com a invasão espanhola, esses pigmentos passaram a serem exportados da América e tiveram ampla utilização na Europa (COOKSEY, 2018). O Brasil também despertou interesse na exploração para a produção de corantes, em especial pela árvore Pau-Brasil (*Cesalpinia echinata*), uma fonte de corante de cor avermelhada e que inspirou o nome do país (GUARATINI; ZANONI, 2000). Em relação ao Brasil, também é possível citar o urucum, pigmento extraído das sementes da planta *Bixa orellana* L., como uma das principais fontes de corantes naturais no país, tendo como principal aplicação seu uso como aditivos e corantes alimentares (DEMCZUK e RIBANI, 2015).

Corantes derivados de produtos naturais, como plantas, animais e minerais eram utilizados em tecidos, utensílios, cosméticos, em alimentos, na arte, entre outras aplicações, e seus usos foram sendo aprimorados no decorrer da história. Durante os séculos XVIII e XIX houve uma intensa busca por substâncias que fossem mais eficientes no tingimento (ZANONI; YAMANAKA, 2016). Esses estudos culminaram no desenvolvimento da primeira cor sintética, em 1856, pelo químico Sir William Henry Perkin, que, ao tentar investigar a síntese da quinina, acabou obtendo uma solução de cor roxa intensa que se provou eficiente para o tingimento de tecidos (BARNETT et al., 2006). O composto foi nomeado e patentado como mauveína e passou a ser comercializado em 1857 (ZANONI; YAMANAKA, 2016).

Esse desenvolvimento incentivou outros pesquisadores a realizarem experimentos semelhantes e deu-se início a uma revolução na história dos corantes sintéticos, que se propagaram e se diversificaram rapidamente (DOWNHAM; COLLINS, 2000; ARDILA-LEAL et al., 2021). Custos de produção mais baratos, facilidade na produção e propriedades colorantes superiores aos corantes que existiam até então, foram características essenciais para o estabelecimento do mercado de cores sintéticas (LAGASHETTI et al., 2019). A intensa inovação tecnológica ocorrida no século XX, em plena Revolução Industrial, e as vantagens que apresentavam fez com que a indústria de corantes sintéticos se fortalecesse e eles passaram a ser amplamente utilizados por vários setores, como o têxtil, de cosméticos, alimentos, farmacêutico, entre outros (GUARATINI; ZANONI, 2000; VENIL et al., 2020).

Entretanto, muitos dos corantes sintéticos que passaram a ser utilizados podem apresentar toxicidade ou produzir outros efeitos negativos, trazendo prejuízos à saúde e ao meio ambiente. Existem corantes sintéticos que eram utilizados em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos e foram descobertos como potenciais alergênicos e cancerígenos e foram retirados de uso (RAO et al., 2017). Corantes da classe Azo e benzidinas, por exemplo, são bastante estudados e comprovadamente mutagênicos, podendo levar a doenças como o câncer, mas outras classes de corantes sintéticos, como triarilmetanos e antraquinonas, apresentam riscos aos seres vivos, além de genotoxicidade (LELLIS et al., 2019; ARDILA-LEAL et al., 2021).

Ademais, devido às suas estruturas e propriedades químicas, corantes sintéticos não são biodegradáveis e costumam apresentar longa estabilidade, fazendo com que persistam por muito tempo no ambiente e, dessa maneira, o descarte de efluentes industriais contendo corantes sintéticos causam prejuízos significativos ao meio ambiente e diversos ecossistemas (MANIKPRABHU; LINGAPPA, 2013). Podem contaminar solos, mananciais de água e proporcionar uma série de doenças em animais e humanos (KHAN;MALIK, 2018). Muitos apresentam solubilidade em água, tornando-os mais difíceis de serem removidos por meios convencionais de separação (HASSAN; CARR, 2018). Uma vez nos ambientes aquáticos, os corantes podem modificar a cor dos efluentes e impedir a entrada de luz, afetando os seres vivos daquele habitat dependentes de fotossíntese, e alguns corantes ainda liberam metais pesados tóxicos no ambiente conforme degradam (HASSAN; CARR, 2018). A título de exemplo, a indústria têxtil é uma das maiores poluidoras globais, descartando toneladas de águas residuais no ambiente sem qualquer tratamento (KHAN;MALIK, 2018).

Considerando, então, que os corantes sintéticos podem ser recalcitrantes, bioacumulativos, tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (ARDILA-LEAL et al., 2021) e que há um crescente interesse em utilizar produtos que sejam mais sustentáveis e ecologicamente corretos, os corantes provenientes de produtos naturais podem ser uma alternativa para os sintéticos.

Além de serem mais ecológicos, os pigmentos naturais também podem trazer outros benefícios em sua utilização, pois muitos deles também apresentam propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anti radiação UV, citotóxica e anticâncer (YUSUF et al, 2017). Essas atividades podem refletir nos produtos em que forem aplicados, servindo para fins que vão além de apenas atribuir cor a algum material, tornando o escopo de aplicações desses pigmentos ainda maior.

2.1.2. Pigmentos naturais

Pigmentos naturais podem ser classificados de acordo com sua fonte de obtenção, pela sua estrutura química ou pela forma de aplicação (YUSUF et al, 2017). A classificação por estrutura química é preferível, por ser mais fácil de reconhecer ao grupo em que pertencem e já ter conhecimento das características próprias do determinado grupo (YUSUF et al, 2017). O Quadro 1 apresenta as principais classes de pigmentos naturais, bem como algumas de suas características, cores, principais pigmentos e produtores.

Quadro 1 - Principais classes de pigmentos naturais, com suas características, principais pigmentos e organismos produtores.

Classes	Características	Principais pigmentos	Produtores	Referências
Carotenoides	São substâncias tetraterpênicas, lipossolúveis e apresentam moléculas oxidáveis. Um dos mais comuns pigmentos no mercado, desenvolvem várias funções ecológicas nos organismos. Cores: vermelho, laranja e amarelo.	Carotenos, β -carotenos, licopenos, xantofilas, neurosporaxantinas, luteínas	Plantas, fungos e procariotos	Yusuf et al (2017); Gmoser et al. (2017)
Flavonoides	São, em sua maioria, pigmentos de plantas, responsáveis por atribuir cor às partes do vegetal, auxiliando na taxonomia. Exibem funções como regulagem do crescimento da planta e proteção contra patógenos. Cores: amarelo claro e escuro, laranja, vermelho, azul e roxo.	Antocianinas, flavonas, flavonois, isoflavonoides, chalconas, auronas	Plantas	Havsteen (2002); Yusuf et al (2017)
Melaninas	São polímeros de alto peso molecular, cujas estruturas moleculares são variadas e permanecem indefinidas. Exibem diversas funções biológicas na natureza (ex: proteção contra radiação UV) e são insolúveis na maioria dos solventes. Cores: preto, marrom, amarelo, vermelho	Eumelanina, feomelanina, neuromelanina, alomelanina e piomelanina	Animais, plantas, fungos e bactérias	Solano (2014); Cordero e Casadevall (2020)
Policetídeos	Principais metabólitos secundários dos micro-organismos, trazem a maior variedade de pigmentos produzidos, dentre eles as quinonas. Característicos por serem sintetizados pelas enzimas PKS (policetídeo-sintases). Suas cores variam entre amarelo, laranja, vermelho, marrom, rosa e roxo	Antraquinonas, hidroxiantraquinonas, naftoquinonas, azafilonas	Fungos, bactérias e plantas	Mukherjee et al. (2017); Mapari et al. (2010); Caro et al. (2015)
Tetrapirróis	Essenciais para processos biológicos como fotossíntese e respiração. Transportam oxigênio e elétrons. Cor: verde (clorofila)	Clorofila, heme (sangue), bile	Plantas, Animais, Algas, Cianobactérias	Battersby (2000)
Outros	Indigo - um dos mais antigos pigmentos naturais utilizado; agora é produzido majoritariamente de forma sintética, em especial na indústria de jeans. Cor: azul		Plantas	Yusuf et al (2017)
	Violaceína - Pigmento bacteriano derivado de indol, com importantes atividades antibacterianas, antiparasitas, antivirais e antitumorais. Cor: púrpura		Bactérias	Durán et al (2007)
	Fenazina - Pigmentos heterocíclicos nitrogenados produzidos por bactérias, comumente em espécies associadas a plantas. Cores: azul, verde e roxo		Bactérias	Mavrodi et al. (2010); Turner e Messenger (1986)

Plantas e micro-organismos são as principais fontes de pigmentos naturais (RAO et al., 2017). Micro-organismos, no entanto, apresentam vantagens para sua exploração em relação às plantas. Eles produzem pigmentos mais rapidamente, conseguem ser mais produtivos devido aos processos de fermentação e ter um processamento mais simples, independem das condições ambientais e climáticas e da sazonalidade, além de não possuírem limitações geográficas e não necessitarem de extensas regiões territoriais para serem cultivados (KUMAR et al., 2019; LAGASHETTI et al., 2019; SÁNCHEZ-MUÑOZ et al., 2020). Permitem controlar as condições de cultivo, garantindo a produção dos metabólitos desejados e não variam tanto de um indivíduo para o outro (MAPARI et al., 2010). Também é possível fazer uso de resíduos agro-industriais como substrato para os micro-organismos, podendo baratear os custos dos procedimentos de obtenção de pigmentos, ser uma solução mais sustentável e eliminar os problemas que o descarte desses resíduos poderiam causar (PANESAR et al., 2015). Ademais, possuem um potencial enorme a ser explorado, com moléculas produzidas exclusivamente por micro-organismo; têm maiores possibilidades de otimização da produção de pigmentos e correm menos risco da extinção de algum exemplar devido ao seu uso extensivo, diferentemente das plantas (LAGASHETTI et al., 2019; SÁNCHEZ-MUÑOZ et al., 2020).

Existem inúmeras espécies de fungos, bactérias e leveduras capazes de produzir pigmentos (WANG et al., 2017). Os estudos sobre os pigmentos fúngicos estão mais avançados em comparação com os de bactérias e eles são produtores de uma vasta gama de moléculas (SARAVANAN et al., 2020). Fungos são mais preferíveis para a exploração de metabólitos com intuito de aplicação humana, visto que também são eucariotos e podem oferecer menos riscos que as bactérias, as quais muitas vezes possuem natureza patogênica (LAGASHETTI et al., 2019; ARIKAN et al. 2020; ORLANDI et al., 2021). Os pigmentos podem ser produzidos de forma intracelular ou extracelular, porém estes últimos possuem métodos de extração mais simples e menos especializados do que os necessários para os intracelulares, tornando sua produção mais barata (KALRA et al., 2020).

É necessário que cumpram diversos critérios para que os pigmentos de micro-organismos possam realmente ser utilizados. Critérios como estabilidade, capacidade de utilizar uma gama variada de fontes de carbono e nitrogênio, ter fácil extração, rendimento razoável do pigmento, condições moderáveis de crescimento, suportar altas temperaturas e pH extremos (condições para a produção industrial) além, é claro, de não serem tóxicos ou

patogênicos e de não produzirem micotoxinas (BABITHA, 2009; RAO et al., 2017; KALRA et al. 2020).

É importante conhecer o micro-organismo do qual se deseja extrair pigmentos, pois, sabendo sobre sua toxicidade, formas de cultivo e ter ciência de suas atividades e mecanismos, permite compreender quais os limites, possibilidades de melhoria e aplicações seriam possíveis para tal pigmento. Mais estudos referentes à biotecnologia da produção de pigmentos e também a busca por novos compostos podem tornar a utilização de pigmentos de micro-organismos na indústria cada vez mais presente e desenvolvida.

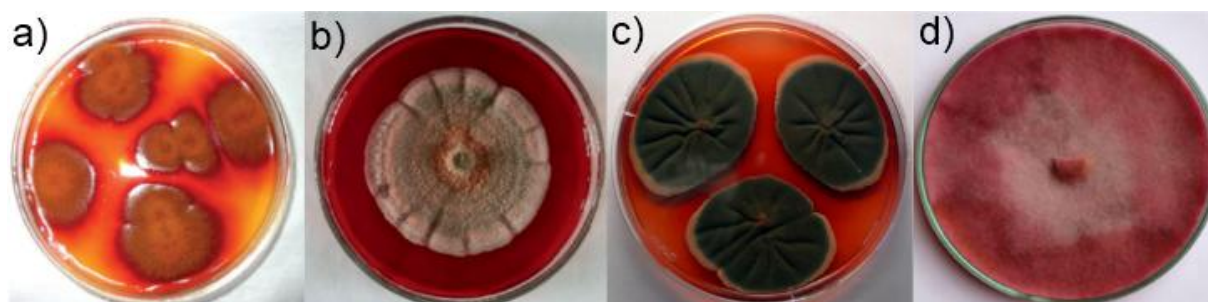
2.1.3. Pigmentos produzidos por fungos filamentosos

Os pigmentos são produzidos pelos fungos como parte de seu metabolismo secundário. Esse metabolismo ocorre na fase estacionária do crescimento microbiano, sendo um momento em que os micro-organismos deixam de produzir substâncias relacionadas a seu crescimento e reprodução e passam a produzir compostos com outras funções (LOPES, 2011).

Os metabólitos secundários são moléculas utilizadas pelos micro-organismos para os auxiliar em sua sobrevivência, trazendo vantagens sobre outros organismos competidores, e que apresentam propriedades antibióticas, tóxicas, inibitórias, farmacológicas, entre outras (LOPES, 2011; BRAKHAGE, 2013). São compostos que evoluíram de acordo com a necessidade de adaptação de seus produtores, por questões fisiológicas, sociais e predatórias, possuindo uma importante função ecológica para os fungos (O'BRIEN; WRIGHT, 2011). Carotenoides, por exemplo, servem como proteção contra foto-oxidação; melaninas protegem contra o estresse ambiental; enquanto flavinas agem como cofatores na catálise enzimática (BABITHA, 2009; KALRA et al., 2020).

Os fungos filamentosos são produtores de uma enorme variedade de pigmentos e são inúmeros os gêneros que exibem essa produção, tendo como os mais expressivos os gêneros *Monascus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Aspergillus* e *Trichoderma*. A Figura 1 ilustra alguns exemplos de fungos filamentosos produtores de pigmentos.

Figura 1. Exemplos de fungos filamentosos produtores de pigmentos



a) *Monascus purpureus*, de Babitha (2009); b) *Talaromyces verruculosus*, de Chadni et al. (2017); c) *Penicillium purpurogenum* (atualmente descrito no gênero *Talaromyces*), de Mapari et al. (2009); d) *Fusarium chlamydsporum*, de Soumya et al (2018).

O registro mais antigo da utilização de um pigmento fúngico pertence ao gênero *Monascus*, utilizado como ingrediente na preparação do arroz de mofo vermelho, conhecido como angkak (RAO et al., 2017). São continuamente encontrados em alimentos orientais, especialmente no Sudeste Asiático, em países como China, Filipinas, Japão, Tailândia e Indonésia, fazendo parte da cultura alimentar dessa região (CHEN et al., 2017). Também são utilizados substituindo sais para realçar cor e preservar carnes e embutidos (VENDRUSCULO et al., 2014). É um gênero produtor de pigmentos amarelos, laranjas, vermelhos e roxos e já possui mais de 50 moléculas identificadas e estudadas, existindo muitas patentes emitidas com os pigmentos deste gênero e também estudos buscando compreender os caminhos biossintéticos de sua produção (RAO et al., 2017; CHEN et al 2017).

Os principais pigmentos de *Monascus* são compostos azafilonas, moléculas da classe dos policetídeos e os primeiros a serem identificados foram a monascina e ankaflavina, de cor amarela; a monascorubina e rubropunctatina, de cor laranja; e os de coloração vermelha, monascorubramina e rubropunctamina (TOLBORG et al., 2017). As condições de cultivo como temperatura, pH, tipo de substrato, fonte de nitrogênio e agitação influenciam na estrutura dos pigmentos a serem formados (SILBIR; GOKSUNGUR, 2019). Seus pigmentos costumam ser estáveis em calor e em uma grande faixa de variação de pH (WANG et al., 2017). As espécies mais expressivas quanto à produção de pigmentos desse gênero são *Monascus purpureus* (HSU et al., 2011; MUKHERJEE; SINGH, 2011; SILBIR; GOKSUNGUR, 2019) e *Monascus ruber* (VENDRUSCOLO et al., 2013; MEINICKE et al., 2012).

Vários pigmentos produzidos por *Monascus* spp. também exibiram atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e anticâncer (HSU et al., 2011; LIN et al., 2011; VENDRUSCOLO et al., 2014; TAN et al., 2018), indicando o potencial desses pigmentos fúngicos não somente como colorantes, mas também para a aplicação em fármacos com benefícios para a saúde humana.

Em relação ao gênero *Fusarium*, muitas de suas espécies aparecem como produtoras de pigmentos com diversidade de estruturas e atividades biológicas, com suas colônias variando entre cores cremes, amarelo, marrom, vermelho, rosa e violeta. (CARO et al., 2015; ABDEL-AZEEM et al., 2019). Os policetídeos são o grupo mais expressivo e diverso de metabólitos secundários produzidos por este grupo, juntamente com os carotenoides (GMOSEK et al. 2017).

As naftoquinonas são o principal grupo de policetídeos e suas cores variam entre amarelo, laranja, vermelho e marrom (DURÁN et al., 2002). Espécies como *Fusarium oxysporum* (LEBEAU et al., 2018), *F. acuminatum*, *F. crookwellens*, *F. culmorum*, *F. pseudograminearum*, *F. sambucinum*, *F. sporotrichioides*, *F. tricinctum* (FRANSEN et al., 2016) *F. fujikuroi*, *F. proliferatum* (STUDT et al., 2012; DAME et al. 2015); *F. agapanthi* (EDWARDS et al., 2016); *F. solani* (SHAH et al. 2017), *F. verticillioides* e *F. graminearum* (STEPIEN et al. 2018) produzem uma variedade de pigmentos que incluem as bicaverinas, aurofusarinas e fusarubinas, as quais são as principais classes de naftoquinonas. Anthraquinonas, outro grupo de policetídeos, também são bastante produzidas por este gênero, sendo de coloração amarelo, laranja, vermelho e marrom (GESSLER et al. 2013), e aparecem em espécies como *F. oxysporum* (NAGIA; EL-MOHAMEDY, 2007), *F. aquaeductuum* (DUAN et al., 2017); *F. solani* (KHAN et al. 2018a), *F. proliferatum* (DAME et al. 2015) e *F. equiseti* (FOUILLAUD et al., 2017). *F. oxysporum*, *F. fujikuroi* e *F. aquaeductuum* (AVALOS et al., 2017) também são capazes de produzir carotenoides.

Muitos desses pigmentos de *Fusarium* spp. apresentam atividade contra bactérias, leveduras, fungos, protozoários, insetos (LEBEAU et al., 2018) e nemátodos (ZHAN et al., 2007; KUNDU et al. 2016). Também se destacam por apresentar citotoxicidade e genotoxicidade contra células carcinogênicas (JAROLIM et al. 2018). Bikaverinas, por exemplo, são pigmentos vermelhos que são potenciais compostos antitumorais (ZHAN et al., 2007; HAIDAR et al., 2019) e também aparecem como agentes antioxidantes e anti neurodegeneração (NIRMALADEVI et al., 2014). Fusarubinas já exibiram ação contra

Mycobacterium tuberculosis demonstrando um potencial para remédios anti-tuberculose (SHAH et al. 2017), além de ação citotóxica contra células de câncer renal (KHAN et al. 2018a).

Fungos do gênero *Aspergillus* produzem uma grande variedade de pigmentos. Espécies como *Aspergillus nidulans* (GONÇALVES et al., 2011), *Aspergillus bridgeri* (KUMAR et al., 2011), *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *A. tamarii*, *A. terreus*, *A. tubingensis*, *A. sydowii* (PAL et al., 2013) e *Aspergillus fumigatus* (YOUNGCHIM et al., 2004) são produtoras de melanina. *A. niger* também exibe produção de azafilonas (ZABALA et al., 2012). Antocianinas, pigmentos roxos mais comumente encontrados em plantas, foram obtidos de *Aspergillus sydowii* (BU et al., 2020). *Aspergillus carneus*, *A. sclerotiorum*, *A. sparsus*, *A. sydowii* e *A. terricola* provenientes da floresta amazônica produziram pigmentos que exibiram atividade antimicrobiana (TEIXEIRA et al., 2012). O fungo *Aspergillus tamarii*, isolado de frutas romã, produziu pigmentos vermelhos que apresentavam atividade antibacteriana e antifúngica (SARAVANAN et al., 2020). *Aspergillus glaucus* já foi reportado como produtor de anthraquinonas com capacidade antibacteriana e citotóxica contra células de linhas cancerígenas (FOUILLAUD et al., 2017). Também há registro de um pigmento amarelo identificado como anishidiol produzido por *Aspergillus nishimurae* que possui capacidade antifúngica (HOSOE et al., 2010).

O gênero *Penicillium* se destaca na produção de pigmentos por conter o pigmento vermelho comercializado Arpink Red™, produzido por *Penicillium oxalicum* e da classe das anthraquinonas (DUFOSSÉ, 2018). Espécies como *Penicillium Mallochii* (BOUHRI et al., 2019), *Penicillium miczynskii* (HEO et al., 2018), *Penicillium aculeatum* (KRISHNAMURTHY et al., 2018), *P. marneffeii* (WOO et al., 2014), *P. verruculosum* (SHAH et al., 2014), *P. purpurogenum* (JIN et al., 2018) e *P. minioluteum* (ZAHAN et al., 2020) são produtoras de pigmentos laranjas e vermelhos. *Penicillium sclerotiorum* 2AV2 isolado de solo amazônico produziu um pigmento amarelo-alaranjado que foi identificado como esclerotiorina, uma azafilona. (CELESTINO et al. 2014). *Penicillium mallochi* também aparece como produtor de esclerotina, possuindo atividade antioxidante e anti bactérias (DOS SANTOS et al., 2019). Outro isolado de *P. mallochi* apresentou pigmentos com propriedades antioxidantes, antimicrobianas e anti biofilmes (AYYOLATH et al., 2020). *Penicillium chrysogenum* também produz um pigmento amarelo, identificado como chrysogine (VIGGIANO et al., 2017). Pigmento de coloração rosa amarelada foi extraído de *Penicillium*

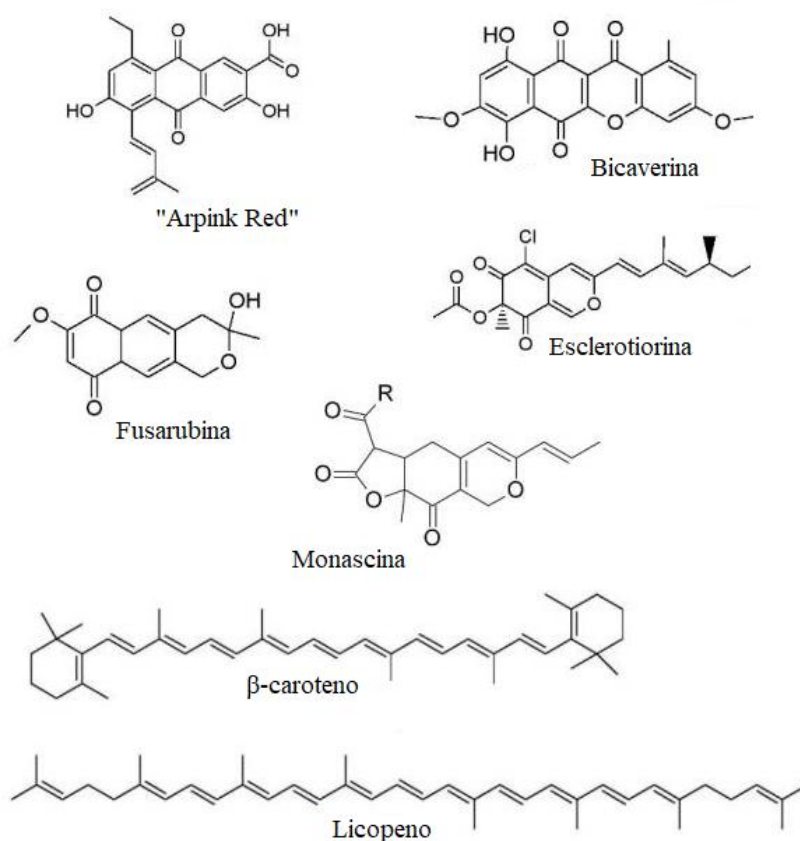
europium e identificado como uma molécula benzoquinona (KHAN et al., 2021). Em Atalla e colaboradores (2011), várias espécies de *Penicillium* são relatadas como produtoras de pigmentos marrons.

Em *Talaromyces* spp., há um predomínio da produção de pigmentos nas cores laranja e vermelho e as moléculas isoladas costumam ser azafilonas e pigmentos semelhantes aos de *Monascus* spp (MORALES-OYERVIDES et al., 2020). Espécies como *Talaromyces ruber* (YILMAZ et al., 2012), *Talaromyces verruculosus* (CHADNI et al., 2017), *Talaromyces australis* (HERNÁNDEZ et al., 2019) e *Talaromyces albobiverticillius* (VENKATACHALAM et al., 2018), um fungo de ambiente marinho, produzem pigmentos vermelhos e laranja-amarelado. *Talaromyces atroroseus* produz pigmentos vermelhos em grande quantidade, identificados como atrorosinas, e não produz micotoxinas (FRISVAD et al., 2013; ISBRANDT et al., 2020). *Talaromyces amestolkiae*, proveniente da Amazônia, também é relatado como produtor de pigmento vermelho, o qual apresentou atividade antibacteriana, e sem produção de compostos tóxicos (ZACCARIM et al., 2019). O pigmento vermelho obtido de *Talaromyces purpureogenus* por Keekan e colaboradores (2019) possuía atividade antioxidante promissora, e o de Pandit e colaboradores (2018) além de antioxidante também se mostrou ser contra bactérias. A ausência de compostos tóxicos e a bioatividade desses pigmentos produzidos pelas espécies citadas do gênero *Talaromyces* os torna atraentes para aplicações alimentícias e farmacêuticas.

Fungos produtores de pigmentos pertencentes a outros gêneros também são relatados. Um exemplo é o *Blakeslea trispora*, produtor de licopenos (WANG et al., 2012) e β -Carotenos (YAN et al., 2013). Há o *Trichoderma harzianum*, produtor de emodin, um composto da família das antraquinonas de coloração amarela (LIN et al., 2012). Do gênero *Trichoderma*, outras espécies aparecem como produtoras de pigmentos amarelos e laranja-avermelhados, como *Trichoderma aureoviride*, *T. polysporum*, *T. viride* (CARO et al., 2015) e *T. reesei* (DERNTL et al., 2016). De *Trypethelium eluteriae* foram isolados pigmentos amarelo e violeta escuro avermelhado, identificados como pertencentes à classe das naftoquinonas (BASNET et al., 2019). O fungo *Gonatophragmium triuniae* isolado da planta *Maytenus rothiana* produz pigmento laranja com atividade antioxidante e antibacteriana (LAGASHETTI et al., 2022). Outros exemplos são *Scytalidium cuboideum*, que produz pigmento vermelho, e *Chlorociboria aeruginosa*, fungo com pigmentação azul-esverdeada (GUTIERREZ et al., 2021).

Considerando os variáveis tipos de pigmentos produzidos pelos fungos filamentosos, a Figura 2 representa as estruturas químicas de alguns dos principais pigmentos relacionados:

Figura 2 - Exemplo das estruturas químicas de alguns pigmentos produzidos por fungos filamentosos



A figura foi adaptada de Lagashetti et al. (2019).

Uma forma de aumentar as possibilidades de se obter e utilizar pigmentos fúngicos é através da otimização da produção por estes organismos. A otimização pode ser feita através da manipulação do cultivo dos micro-organismos e dos processos de fermentação ou então por manipulação genética. A manipulação das condições de cultivo e fermentação envolve variação nos tipos, fontes e concentrações de nutrientes, como carbono e nitrogênio, alterações de pH, temperatura, agitação, oxigênio dissolvido, luz incidente e co-fatores como íons e sais presentes (OGBONNA, 2016; GMOSER et al., 2017). Assim, estará sendo alterado fatores que irão influenciar no metabolismo dos organismos de forma que produzam pigmentos em maior quantidade e/ou variedade.

Muitos trabalhos buscam então definir quais são os parâmetros ideais para a maior obtenção dos pigmentos de interesse. Em Suwannarach e colaboradores (2019), por exemplo, definiu-se a melhor fonte de carbono, de nitrogênio, melhor pH, temperatura e agitação na obtenção de pigmento pelo fungo *Nigrospora aurantiaca*. *Penicillium murcianum* teve sua maior produção de pigmentos amarelos em meio alcalino, enquanto *Talaromyces australis* teve melhores resultados em pH ácido e ambos se beneficiaram da adição de NaCl ao meio (HERNÁNDEZ et al., 2019). No caso de *Monascus* spp., a alteração das condições do meio influenciam no tipo de pigmento a ser produzido, como, por exemplo, possuindo coloração amarela em pH ácido e vermelha em pH mais básico (AGBOYIBOR et al., 2018).

Com relação à manipulação genética, é necessário ter o conhecimento das vias biossintéticas e os genes responsáveis pela produção de pigmentos e, assim, trabalhar nesses caminhos com a intenção de intensificar a produção pelo fungo. Alguns exemplos a serem citados incluem a utilização de engenharia genética para induzir a maior produção de carotenoides em geral (HEIDER et al., 2014), de aurofusarins em *Fusarium graminearum* (WESTPHAL et al., 2018) e dos pigmentos de *Monascus pilosus* (LEE et al., 2013).

A otimização também permite contornar empecilhos que podem ocorrer na obtenção e aplicação de pigmentos por fungos filamentosos, como a produção de micotoxinas. As micotoxinas são produzidas como parte do metabolismo secundário de vários fungos, como, por exemplo, em espécies de *Fusarium* (CAMBAZA, 2018) e a citrinina, produzida por espécies de *Monascus*, *Penicillium*, entre outros (VENDRUSCOLO et al., 2016). Através dos procedimentos de otimização, a produção dessas micotoxinas pode ser diminuída ou inibida (JIA et al., 2010; HAJJAJ et al., 2012; HUANG et al., 2019; GU et al., 2021). Isso é feito alterando as condições de cultivo de maneira que a produção de micotoxinas seja afetada, ou então trabalhar de modo que os genes responsáveis pela expressão desses compostos sejam modificados ou anulados, através de técnicas de manipulação genética, criando mutantes que não irão produzi-los. Tornando, assim, as biomoléculas desses fungos mais atrativas e com maiores possibilidades de aplicações.

Alguns dos pigmentos fúngicos que já estão disponíveis no mercado, especialmente para o uso alimentício, são: riboflavinas, uma pigmentação amarela, de *Ashbya gossypi* e *Eremothecium ashbyii*; os pigmentos de *Monascus* (*M. purpureus* e *M. ruber*), Natural Red™ de *Penicillium oxalicum*; e licopeno e β -caroteno de *Blakeslea trisporai* (BABITHA, 2009; DUFOSSE, 2018).

Além de aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica, também há procura para a utilização de pigmentos fúngicos em aplicações têxteis e tingimento de outros materiais. Pigmentos de coloração amarela de espécies de *Penicillium*, coloração rosa de *Isaria* spp. e pigmentos vermelhos de espécies de *Fusarium*, *Emericella* (VELMURUGAN et al., 2010) e de *Monascus purpureus* (FUCK et al., 2018) obtiveram êxito no tingimento de couro. Pigmentos de *Talaromyces verruculosus* foram eficientes no tingimento de tecido de algodão (CHADNI et al., 2017); pigmentos de *Talaromyces australis* e *Penicillium murcianum* se mostraram com grande potencial para o tingimento de lã (HERNANDÉZ et al., 2018; HERNANDÉZ et al., 2019), enquanto o pigmento amarelo de *Metarhizium anisopliae* se mostrou eficiente no tingimento de lã e seda (YAN et al., 2019). Espécies de *Trichoderma* e *Aspergillus* também podem ser utilizadas para aplicações têxteis (AISHWARYA, 2014). Pigmentos fúngicos também se provaram potenciais colorantes para madeiras (ROBINSON et al., 2012; LIU et al., 2020; AGURTO et al., 2020).

Os pigmentos fúngicos além de serem biodegradáveis, podem não possuir citotoxicidade, não sendo tóxico, por exemplo, em contato a pele humana (VENIL et al., 2020). Ademais, podem trazer benefícios extras como proteção à radiação UV (NAMBELA et al., 2020) e atividade antimicrobiana (GUPTA et al., 2013; POORNIAMMAL et al., 2013), mostrando-se substitutos promissores aos corantes sintéticos.

2.2. Produção de pigmentos por fungos filamentosos antárticos

Na procura por metabólitos de interesse biotecnológico produzidos por micro-organismos, há uma crescente busca por organismos de ambientes extremos e nichos ecológicos pouco explorados, por esses estarem sujeitos às características únicas do seu habitat, podendo produzir substâncias únicas e diferenciadas (DUFOSSE et al., 2014; TIAN et al., 2017). Um desses ambientes é a Antártica.

A Antártica é localizada no extremo sul do globo terrestre, com 14 milhões de km² de extensão, sendo considerada o continente mais frio (com temperaturas médias abaixo de 0 °C) e mais seco do planeta (CIRM). É constituída pela Antártica continental, com ambientes de gelo, desertos polares e pradarias, e a Antártica Marítima, constituída pelas ilhas e arquipélagos (CONVEY et al., 2014). Possui uma variedade de ambientes marinhos e terrestres, com paisagens de gelo, neve e áreas de solo e os organismos que ali habitam envolvem algumas espécies de animais, musgos, algas e micro-organismos (ROSA, 2019).

As comunidades microbianas antárticas são temas de grande interesse por estarem suscetíveis a longos períodos de isolamento e a baixos níveis de perturbação, o que pode implicar em micro-organismos únicos daquela região, tornando este um ambiente propício para estudos em taxonomia, diversidade, evolução e biotecnologia (VINCENT, 2000; MENEZES et al., 2017). Essas comunidades estão sujeitas às condições ambientais da Antártica, as quais envolvem grandes variações de temperatura, salinidade, escassez de nutrientes, desidratação, mudanças climáticas acentuadas, ventos fortes, alta incidência de radiação ultravioleta alternada com longos períodos de ausência de luz, além dos ciclos de congelamento e degelo (CLARKE, 2003; PIKUTA et al., 2007; ROSA, 2019). Para sobreviver a essas áreas remotas, então, é necessário que esses organismos apresentem adaptações bioquímicas e fisiológicas, que, geralmente, surgem a partir de modificações genéticas e de vias metabólicas diferenciadas, as quais aumentam as chances de serem encontrados metabólitos exclusivos (TIAN et al. 2017).

Os pigmentos se incluem entre esses metabólitos exclusivos produzidos pelos organismos para auxiliar em sua sobrevivência. Um dos problemas que podem enfrentar é a exposição à alta incidência de radiação ultravioleta, e esta desencadeia a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), podendo levar as células dos organismos a um estresse oxidativo, que pode alterar o metabolismo desses organismos e causar danos ao seu DNA, lipídeos e proteínas (LLANTEN et al., 2012). Uma forma de proteção contra a radiação UV é através da produção de melanina, a qual também protege contra dessecação, radiação ionizante, agentes oxidantes, condições de estresse em geral e também podem possuir papel na patogênese dos micro-organismos (HASSAN et al., 2016; PACELLI et al. 2017; DUARTE et al., 2019). É possível citar alguns fungos filamentosos da Antártica que possuem sua cepa melanizada, como a espécie endêmica *Friedmanniomyces endolithicus*, que vive em rochas sob constante seca e é tolerante a raios gama (PACELLI et al., 2018). Outras espécies como *Alternaria alternat*, *Stachybotrys chartarum*, *Ulocladium consortiale* (HASSAN et al., 2016), *Cryomyces antarcticus* (PACELLI et al., 2017) e *Cryomyces minteri* (ONOFRI et al., 2018) também são altamente melanizadas e adaptadas às condições extremas em que habitam.

Além da melanina, também há outros registros como a da produção de carotenoides, outro composto fotoprotetor e que auxilia na tolerância ao frio (DUARTE et al, 2019). O fungo *Thelebolus microsporus* aparece como produtor de carotenoides, sendo β -caroteno o composto predominante (SINGH et al, 2014), e também o fungo *Arthrobotrys ferox*, cujos

pigmentos carotenoides servem para sua proteção contra radiação UV-B (ARCANGELI, CANNISTRARO et al., 2000).

Outro exemplo de fungo antártico produtor de pigmentos é a espécie endêmica *Antarctomyces pellizariae*, isolada de neve, psicrofílica e de coloração azul devido a sua pigmentação intracelular (MENEZES et al., 2017). Também é possível citar o fungo *Geomyces* sp.WNF-15A descrito por Wang e colaboradores (2013), secretor de uma pigmentação vermelho-púrpura solúvel em água com capacidade antioxidante e estabilidade frente a ácidos, íons metálicos e aditivos alimentares superiores a pigmentos de *Monascus* spp. e cochonilha (WANG et al., 2013; JIN et al., 2014; JIE et al. 2017). A principal substância obtida do pigmento vermelho apresenta similaridade molecular aos pigmentos de *Monascus* spp. e foi patenteada como “geomycamine”, podendo ter aplicação como aditivo alimentar (WANG et al., 2015; HUANG et al., 2020).

Com o crescente interesse por compostos bioativos obtidos de micro-organismos do ambiente antártico, os pigmentos produzidos pelos seus fungos filamentosos se tornam uma opção promissora para aplicações em processos biotecnológicos, sendo merecedora de maior atenção e mais estudos.

2.3. Gênero *Pseudogymnoascus*

O fungo a ser estudado neste trabalho pertence ao gênero *Pseudogymnoascus*. Esse gênero pertence à família Pseudeurotiaceae, ordem Thelebolales e classe Leotiomycetes (VILLANUEVA et al. 2021). Foi designado por Raillo (1929) para acomodar as espécies *P. roseus* e *P. vinaceus*. Por muito tempo, poucas espécies foram descritas pertencentes a este gênero, até ocorrer uma reorganização filogenética e algumas espécies consideradas como sendo do gênero *Geomyces* passarem a ser reconhecidas como pertencentes a *Pseudogymnoascus* (MINNIS e LINDNER, 2013).

Essa reorganização foi decorrente do crescente interesse em estudar o fungo *Pseudogymnoascus destructans* (antigo *Geomyces destructans*), descoberto como causador da doença do nariz-branco (do inglês, white-nose syndrome ou WNS), condição que estava elevando a taxa de mortalidade de morcegos na América do Norte (MINNIS e LINDNER, 2013), sendo uma espécie representativa importante deste gênero.

As espécies do gênero *Pseudogymnoascus* são comumente encontradas nas maiores latitudes do globo terrestre, estando presentes em ambientes polares e de clima temperado (LORCH et al., 2013; GARZOLI et al., 2019; ROBICHEAU et al., 2019; GUPTA et al., 2020;

ZHANG et al., 2021). São, geralmente, psicrófilas, assim conseguem sobreviver nesses ecossistemas de baixas temperaturas (entre 4-15° C) e também com poucos nutrientes (HAYES, 2012; OGAKI et al., 2020). Também podem ser tolerantes a altas salinidades e serem capazes de degradar queratina e celulose (HAYES, 2012; LEUSHKIN et al., 2015).

Na Antártica, as espécies desse gênero costumam ser uma das mais reportadas, estando extremamente adaptadas a este ambiente. Estão presentes em abundância isoladas de solo (ARENZ; BLANCHETTE, 2011; GOMES et al., 2018; ROSA et al., 2020), de solo de recuo de geleira (DOS SANTOS et al., 2020), associadas a líquens (SANTIAGO et al., 2015), musgos (TOSI et al., 2002, CARVALHO et al., 2020), em permafrost (DA SILVA et al., 2020), associadas a macroalgas endêmicas (FURBINO et al., 2014), invertebrados marinhos (GODINHO et al., 2019), isoladas de lagos (GONÇALVES et al., 2012) e de sedimentos marinhos (WENTZEL et al., 2018; OGAKI et al., 2020). Considerando a ampla distribuição e alta presença desse gênero, este pode desempenhar papel importante na decomposição e ciclagem de nutrientes do ambiente antártico (ARENZ et al., 2006).

No trabalho de Villanueva e colaboradores (2021), as primeiras quatro espécies antárticas do gênero *Pseudogymnoascus* foram descritas. Esses fungos foram isolados de esponjas marinhas de diferentes gêneros. As espécies propostas são *Pseudogymnoascus antarcticus* Vaca & R. Chávez, sp. nov.; *Pseudogymnoascus australis* Vaca & R. Chávez, sp. nov.; *Pseudogymnoascus griseus* Vaca & R. Chávez, sp. nov. e *Pseudogymnoascus lanuginosus* Vaca & R. Chávez sp. nov. Tanto *P. antarcticus* quanto *P. lanuginosus* liberaram pigmentos solúveis nas cores amarela e marrom, respectivamente, quando cultivadas em meio Sabouraud agar. O trabalho também marca a primeira descrição de espécies desse gênero provenientes do hemisfério Sul do planeta (VILLANUEVA et al. 2021).

Em relação a produção de pigmentos pelos fungos desse gênero, os trabalhos são um pouco escassos. Um bom exemplo de estudo nessa área é o trabalho de Fujita e colaboradores (2021). Isolado de amostra de solo de Tóquio, no Japão, foi descoberto o fungo *Pseudogymnoascus* sp. PF1464, produtor de um pigmento vermelho. Esse pigmento foi purificado e fracionado através de cromatografia e HPLC, sendo identificado como amphiol e teve sua estrutura determinada através de RMN de 1H. O amphiol não apresentou ação antibacteriana, porém teve ação contra fungos patogênicos, consistindo em um pigmento com potencial antifúngico (FUJITA et al., 2021). Entretanto, praticamente não há trabalhos que sejam focados na produção de pigmentos por *Pseudogymnoascus* spp. isolados da Antártica.

O presente trabalho, portanto, pretende auxiliar em diminuir a defasagem nessa linha de estudos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Este trabalho buscou otimizar a produção, purificar e identificar os pigmentos vermelhos extracelulares produzidos pelo fungo filamentosso *Pseudogymnoascus* sp 6DC415-I isolado de sedimento marinho da Antártica.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a influência da temperatura e do pH do meio de cultura na produção de pigmentos pelo fungo *Pseudogymnoascus* sp 6DC415-I, através do cultivo em meio líquido;
- Produzir e extrair pigmentos do fungo *Pseudogymnoascus* sp 6DC415-I através do cultivo em meio sólido;
- Purificar o extrato obtido da extração em coluna cromatográfica, para obter frações puras dos pigmentos;
- Identificar os pigmentos obtidos pelas frações através das técnicas de: UV, RMN de ^1H e ^{13}C ;
- Avaliar se o extrato e as frações obtidas possuem compostos bioativos, verificando se apresentam atividade antibacteriana e antioxidante.

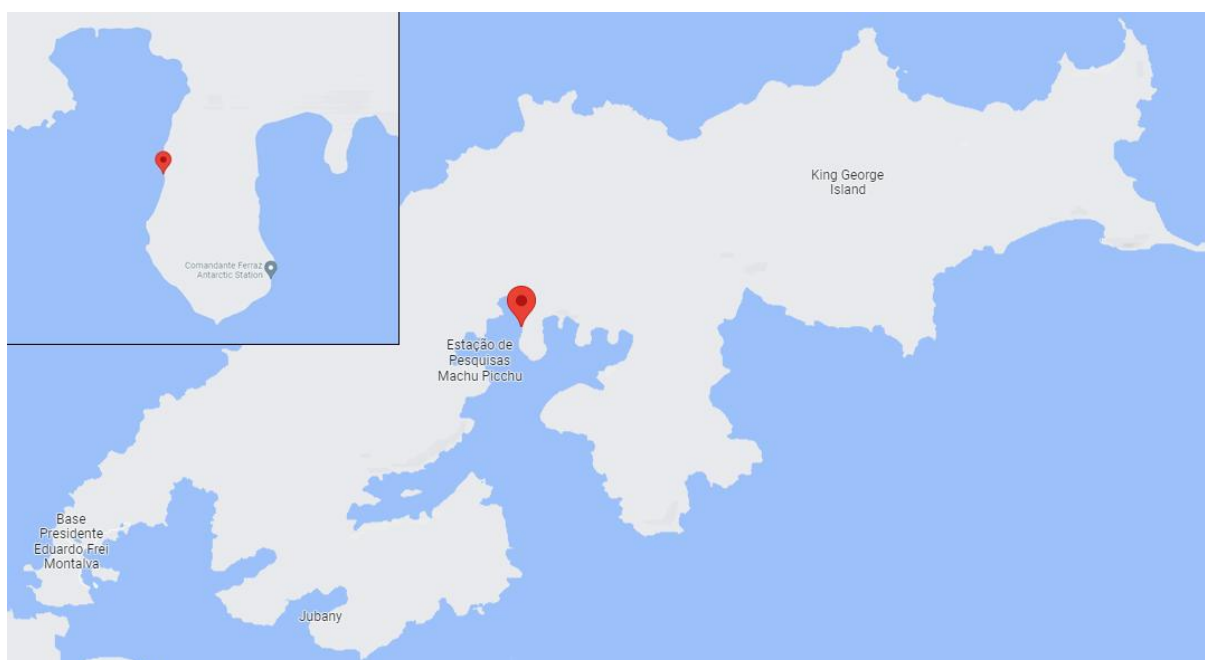
4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Origem do fungo antártico

O fungo alvo deste estudo é proveniente de sedimentos marinhos coletados pela Profa. Lara Durães Sette durante a fase IV da OPERANTAR XXXIII (Janeiro de 2015), no âmbito do projeto PROANTAR/CNPq intitulado "A vida microbiana na criosfera antártica: mudanças climáticas e bioprospecção - MICROSFERA" sob a coordenação da Profa. Vivian Pellizari (IO/USP). Os sedimentos foram coletados no Refúgio 2 na zona entre marés, nas coordenadas 62° 04.341' S 58° 25.233' W, localizado na região da Baía do Almirantado (Ilha Rei George, Ilhas Shetlands do Sul, Antártica Marítima). As amostras foram coletadas superficialmente (5 cm de profundidade), com a utilização de uma draga Van Venn e apresentavam temperatura

de 2,4 °C (WENTZEL et al., 2019). O sedimento foi classificado como franco arenoso (composição de 57,50% areia, 27,50% sílica e 15% argila), tendo pH de 6.89, com presença de alumínio e ferro (WENTZEL et al., 2019). A Figura 3 traz o mapa da região em que o fungo foi isolado.

Figura 3 - Mapa da Ilha de Rei George, localizada ao norte do continente Antártico (voltado para a América do Sul). No destaque, uma aproximação do local de coleta do fungo *Pseudogymnoascus* sp. 6DC415-I, com a marcação em vermelho das coordenadas exatas.



O micro-organismo faz parte do acervo de fungos da coleção de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP), onde se encontra preservado por meio de ultracongelamento a -80°C e identificado pelo código 6DC415-I. Para a identificação do micro-organismo, foi realizada taxonomia molecular através da região ITS do DNA ribossomal e a sequência obtida foi comparada com as bases de dados no GenBank, identificando o fungo como pertencente ao gênero *Pseudogymnoascus*. Todo o procedimento e também uma árvore filogenética com esse isolado pode ser verificada na dissertação de Inforsato (2017). O código da sequência desse fungo depositada no GenBank é MH128283.

4.2. Avaliação da influência do pH e temperatura na produção de pigmentos

Afim de verificar a influência da temperatura e do pH na produção de pigmentos pelo fungo, foi utilizado o cultivo em meio líquido em diferentes pHs e temperaturas. Do fungo

cultivado em meio sólido, foram retirados pedaços de meio de cultura com micélio de aproximadamente 5mm x 5 mm de área e transferidos para Erlenmeyers de 250 mL contendo 150 mL de caldo malte 2% (20 g/L de extrato de malte). Foram transferidos dois plugs de meio de cultura para cada Erlenmeyer. O pH inicial do meio de cultura foi ajustado sob agitação constante, utilizando um agitador magnético, com soluções de HCl e NaOH 1.0 M para os valores de 3, 5, 7 e 9, sendo o pH 5 o valor inicial do meio de extrato de malte. Foi utilizado um pHmetro de bancada DM-22 Digicrom para as aferições. Dois experimentos foram conduzidos, um primeiro mantendo os frascos em incubadora de rotação orbital por 20 dias a 15 °C e 150 rpm e o segundo pelo mesmo período e agitação, porém a 25 °C. Cada tratamento foi realizado em seis repetições.

Depois do período de incubação, a biomassa seca foi quantificada através da filtração do meio de cultivo com papel qualitativo. Os papéis de filtro foram previamente secos em estufa a 105 °C por 24 horas e quantificados em balança analítica. Após este procedimento, o cultivo foi filtrado com auxílio de uma bomba à vácuo, a biomassa foi transferida para estufa a 105 °C por 24 horas e, posteriormente, quantificada em balança analítica. Previamente ao processo de filtração, os cultivos foram centrifugados a 7000 rpm a 8 °C por 12 minutos.

Do meio de cultura filtrado, foram coletadas amostras do extrato para avaliação da produção dos pigmentos através de espectrometria com detector UV-Vis Biochrom 5504 v 1.0 4. A quantificação foi realizada a partir da leitura de absorbância das amostras a 500 nm, que é o comprimento de onda de máxima absorção para pigmentos vermelhos (MÉNDEZ et al., 2011; SOUMYA et al., 2018).

As repetições com resultados de produção de pigmentos visualmente ruins foram desconsideradas nas análises estatísticas, sendo analisadas apenas triplicatas de cada tratamento. Foi realizado os testes ANOVA e Tukey através do software BioEstat 5.0.

4.3. Produção e extração dos pigmentos naturais em meio sólido

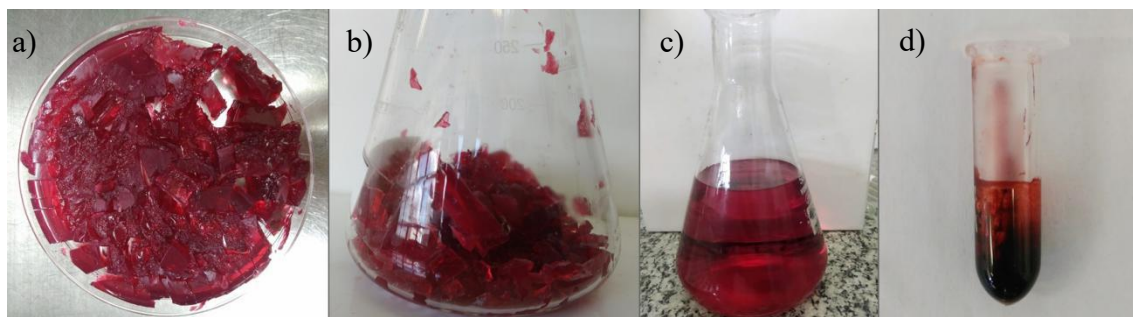
O meio de cultura e solvente ideais para os procedimentos de produção e extração foram estabelecidos previamente no Trabalho de Conclusão de Curso de autoria própria. Nele, testou-se a produção de pigmentos pelo fungo *Pseudogymnoascus* sp. 6DC415-I nos meios de cultura sólido Batata-Dextrose Ágar (BDA - 39 g/L e 15 g/L de ágar), Ágar Malte 2% (MA 2%, 20 g/L de extrato de malte e 15 g/L de ágar) e Czapek (34 g/L e 15 g/L de ágar). O melhor resultado foi obtido no meio MA 2%. Para extrair os pigmentos do meio de cultura,

testou-se os solventes água destilada (H₂O), metanol (CH₃OH), acetona (CH₃(CO)CH₃), acetonitrila (CH₃CN), etanol (CH₃CH₂OH) e acetato de etila (C₄H₈O₂) e a acetona apresentou o melhor resultado. Como forma de facilitar o processo de purificação dos pigmentos obtidos, testou-se o cultivo do fungo em meio Ágar Malte 1% (MA 1%, 10 g/L de extrato de malte e 15 g/L de ágar) e, como o crescimento e a produção de pigmentos foi semelhante em meio MA 2%, o meio 1% foi preferido.

O fungo encontrava-se preservado pelo método de Castellani (CASTELLANI, 1939) em acervo pessoal no nosso laboratório e foi reativado em placas de Petri de 90 x 15 mm contendo meio MA 1% e mantido em B.O.D à 15°C pelo período de 5 a 7 dias, até ter um crescimento razoável. Em seguida, para obter os pigmentos a serem extraídos, o fungo reativado foi repicado em novas placas com o mesmo meio (MA 1%) e mantido em B.O.D à 15°C pelo período de 15 a 20 dias, para a produção de pigmentos no meio de cultura.

Para realizar a extração dos pigmentos, os micélios foram retirados do ágar por raspagem e descartados, enquanto os meios de cultivo com a coloração foram cortados em fragmentos menores e transferidos para Erlenmeyers com 150 mL de acetona. Os fragmentos de meio de cultura foram mantidos em imersão no solvente por um dia nos Erlenmeyers, que ficaram armazenados na geladeira. Em seguida, o sobrenadante do extrato obtido foi filtrado com papel de filtro e descartado. O solvente foi evaporado, inicialmente, em evaporador rotativo e secado por completo em concentrador de amostra. Os extratos secos obtidos foram reservados em microtubos, onde tiveram sua massa determinada em balança analítica e foram mantidos ao abrigo da luz e em geladeira à 10 °C. Os procedimentos para obtenção dos pigmentos em meio sólido podem ser observados na Figura 4.

Figura 4 - Extração dos pigmentos do meio sólido Ágar Malte 1% após 20 dias de incubação à 15 °C.



a) Após a raspagem de micélio; b) corte do meio em fragmentos menores; c) extrato obtido em acetona e d) extrato obtido após secagem. Fonte: A autora.

4.4. Fracionamento do extrato

Cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica gel 60 (0,20 mm) foi aplicada para determinar a melhor opção de fase estacionária e fase móvel na purificação dos pigmentos produzidos. Foram avaliados os solventes: acetato de etila ($C_4H_8O_2$), acetato de etila e hexano ($CH_3(CH_2)_4CH_3$) na proporção de 1:1 e metanol (CH_3OH). As placas de CCD foram avaliadas sob luz ultravioleta a 254 nm e com ajuda do revelador *p-anisaldeído*. Além disso, a CCD foi utilizada para o acompanhamento da coluna.

Para a separação em coluna foi utilizada sílica gel de fase reversa C18, poro de 90 Å, como fase estacionária e a fase móvel consistiu em um gradiente utilizando como solvente metanol em água a 20, 50, 90 e 100%. A troca de fase móvel ocorreu conforme os pigmentos eram eluídos da coluna. As frações foram coletadas em tubos de vidro de 10 a 20 mL. Em seguida, a coluna foi eluída com acetonitrila. As frações obtidas foram analisadas em CCD com metanol como eluente e concentradas por pressão de ar e através de liofilizador. Essas frações foram mantidas em microtubos e tiveram suas massas determinadas.

4.5. Identificação dos pigmentos

4.5.1. Análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de 1H)

As amostras foram enviadas para análises no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP USP). A amostra foi preparada em tubos de RMN de 5 mm e

submetida à experimentos envolvendo ¹H RMN no espectrômetro de RMN Bruker Advance DRX 400 e foi utilizado água deuterada (D₂O) como solvente para as análises.

4.5.2. Análise de infravermelho com transformação de Fourier (FT-IR)

A análise de infravermelho com transformação de Fourier (FT-IR) foi realizada utilizando o equipamento modelo IR Prestige-21 da marca Shimadzu. As amostras foram pastilhadas em KBr e analisadas por transmitância (%) com uma resolução de 4 cm⁻¹, em uma faixa de comprimento de onda de 4000-400 cm⁻¹ e 64 scans.

4.6. Avaliação *in vitro* da bioatividade dos pigmentos extraídos

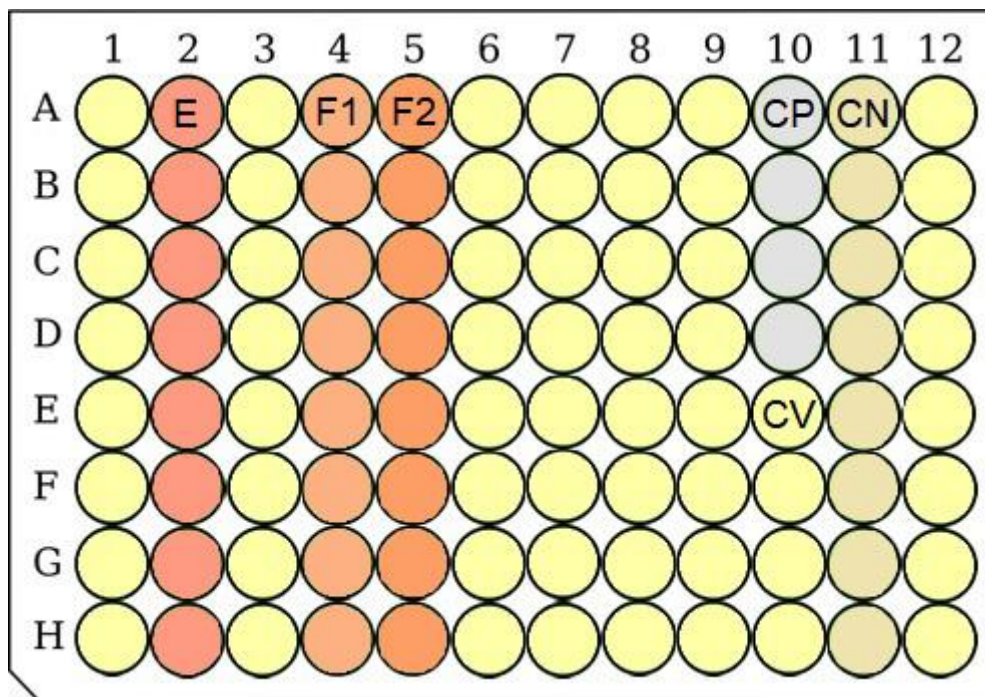
4.6.1. Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos pigmentos extraídos foi avaliada utilizando as seguintes bactérias: dois isolados fitopagênicos do gênero *Xanthomonas*, um sendo *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*X. citri*) linhagem selvagem 306, cedido pelo Prof. Dr. Henrique Ferreira da Unesp de Rio claro, e o outro *X. axonopodis* pv. *passiflorae* (isolado LM4a), isolada de maracujá azedo em Limeira – SP, cedido pela Prof.^a Dr^a Maria Lúcia Carneiro Vieira da ESALQ/USP. Também foram testadas as bactérias de interesse clínico *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), cedidas pelo Prof. Dr. Henrique Ferreira da Unesp de Rio claro.

Para determinar a atividade antibacteriana, utilizou-se o método de microdiluição em caldo para avaliar a capacidade de inibição de crescimento dos isolados bacterianos pelo extrato bruto e pelas duas frações purificadas (obtidas do fungo *Pseudogymnoascus* sp. 6DC415-I) e, assim, identificar a Concentração Inibitória Mínima (MIC) desses compostos. A quantificação do crescimento bacteriano dos inóculos foi realizada pela medição da densidade óptica a 600 nm (D.O₆₀₀). O bioensaio foi conduzido através de uma adaptação dos protocolos de Silva et al. (2013) e La Fuente et al. (2006).

Os testes foram realizados em microplacas de 96 poços (12,5 x 8,5 cm) e a configuração utilizada pode ser vista na Figura 5:

Figura 5 - Esquema de uma microplaca de 96 poços utilizada para o teste de atividade antibacteriana.



A placa contém meio de cultura, o extrato bruto (E), as frações (F1 e F2), o controle positivo (CP), controle negativo (CN) e controle veicular (CV).

Para a montagem da microplaca, 90 μ L de meio de cultivo foi adicionado em todos os poços da coluna 1, 3, 6-9 e 12. Nas colunas 2, 4 e 5 também foi adicionado 90 μ L de meio, exceto no primeiro poço de cada uma (fileira A). Para preparar as amostras, o extrato bruto e as frações foram solubilizados em água destilada na concentração de 5 mg/mL e, em seguida, foram feitas soluções com meio de cultivo nas seguintes concentrações: 3 mg/mL para o extrato bruto e 0,5 mg/mL para as frações. Foram adicionados 200 μ L dessas soluções das amostras na microplaca no primeiro poço (linha A) das colunas 2 (solução do extrato), 4 (solução da fração 1) e 5 (solução da fração 2). Pipetou-se 100 μ L da linha A dessas colunas para o poço seguinte (linha B) e assim sucessivamente, realizando-se uma diluição seriada das amostras. Ao fim da diluição, as concentrações para o extrato ficaram: linha A- 3 mg/mL; B- 1,5 mg/mL; C- 0,75 mg/mL; D- 0,375 mg/mL; E- 0,1875 mg/mL; F- 0,09375 mg/mL; G- 0,046875 mg/mL; H- 0,0234375 mg/mL. Para as frações, foram preparadas soluções mais diluídas com as seguintes concentrações: linha A- 0,5 mg/mL; B- 0,25 mg/mL ; C- 0,125 mg/mL ; D- 0,0625 mg/mL; E- 0,03125 mg/mL; F- 0,015625 mg/mL; G- 0,0078125 mg/mL; H- 0,00390625 mg/mL.

O controle veicular (CV - poços das linhas E, F, G e H da coluna 10) foi feito apenas adicionando-se 90 µL de meio de cultivo, já que o solvente utilizado para as soluções das amostras foi apenas água destilada. O controle positivo (CP - poços das linhas A, B, C e D da coluna 10) foi feito com a adição de 100 µL da solução do antibiótico referente à cada bactéria (informações no Quadro 2). O controle negativo (CN - coluna 11) foi feito adicionando-se 90 µL do meio de cultivo mais 10 µL do inóculo das bactérias.

Quadro 2 - Informações referentes ao procedimento de cada bactéria utilizada nos testes de atividade antibacteriana.

Bactéria	Meio*	D.O ₆₀₀	Diluição	Antibiótico	Tempo de incubação da microplaca	Temperatura de incubação
<i>Xanthomonas</i> spp.	NYG	0,8	1:10	Canamicina (20 µg/mL)	16h	29 °C
<i>Bacillus subtilis</i>	LB	0,4	1:10	Canamicina (20 µg/mL)	16h	30 °C
<i>Staphylococcus aureus</i>	TSA/B	0,2	1:10	Vancomicina (2 µg/mL)	16h	37 °C
<i>Escherichia coli</i>	TSA/B	0,2	1:100	Ampicilina (20 µg/mL)	8h	37 °C

*O meio NYG consiste em 3 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona bacteriológica e 20 mL/L de glicerol. O meio LB é composto por 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de triptona e 10 g/L de cloreto de sódio. O meio TSA consiste em 30 g/L de tripticaseína de soja. Para solidificar esses meios foi adicionado 15 g de ágar por litro de água destilada.

As bactérias estavam mantidas sob preservação em ultrafreezer à -80 °C e foram reativadas em placas de Petri com meio sólido específico para cada uma (Quadro 2). As placas com *Xanthomonas* spp. foram incubadas em estufa B.O.D à 29 °C por dois dias, enquanto as outras bactérias foram mantidas em temperatura ambiente, também por dois dias. À partir das placas, foram feitos inóculos das bactérias em frascos coletores com 10 a 20 mL de seus respectivos meios líquidos. Os inóculos foram mantidos sob agitação em incubadora SHAKER a 150 rpm sob temperatura de 29 °C para as *Xanthomonas*, 30 °C para *B. subtilis* e 37 °C para *E. coli* e *S. aureus*.

Os inóculos permaneceram incubados até atingirem a O.D₆₀₀ desejada e diluídas em seu respectivos meios (Quadro 2). Em seguida, foram adicionados 10 µL aos poços da microplaca, de forma que a concentração de células em cada poço fosse de 10⁵UFC. As

microplacas então foram fechadas e incubadas na B.O.D pelo tempo e temperatura indicados no Quadro 2.

Ao fim do tempo de incubação, foi medida a densidade óptica das microplacas a 600 nm em um espectrômetro Biotek Synergy H1MFD. Com os valores obtidos pela leitura foi definida a porcentagem de inibição de crescimento bacteriano pela seguinte fórmula:

$$I\% = \left[\frac{(\text{Média Controle negativo} - \text{Amostra})}{\text{Média Controle negativo}} \right] \times 100$$

Em que: I% é a porcentagem de inibição de crescimento; Média controle negativo é o valor médio da leitura do controle negativo; e Amostra é a leitura para cada concentração das amostras (extrato, fração 1 e 2). Foi feita uma microplaca sem adição do inóculo bacteriano como valor em branco, o qual foi subtraído de cada leitura.

Foi obtido a porcentagem de inibição de crescimento média dos testes, os quais foram realizados em triplicata, para cada amostra referente às bactérias testadas. Buscou-se um resultado que estivesse entre 50 a 90% de inibição.

4.6.2. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos pigmentos obtidos foi avaliada através do método de captura do radical DPPH•. O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é uma molécula caracterizada por ser um radical livre orgânico e estável, o qual pode ser neutralizado ou eliminado recebendo elétrons ou hidrogênio de algum composto que tenha capacidade antioxidante (OLIVEIRA, 2015). A reação de captura do radical DPPH• modifica a coloração da solução do teste, do seu original violeta para violeta mais claro, até uma tonalidade amarelo claro, dependendo do quanto de radical for capturado (OLIVEIRA, 2015). Essa modificação da cor pode ser medida em espectrofotômetro UV-vis em comprimento de onda entre 515-517 nm, permitindo quantificar o quanto de DPPH• foi inibido e, assim, definir a capacidade antioxidante da amostra testada (OLIVEIRA, 2015).

O ensaio para a avaliação da atividade antioxidante realizado neste estudo seguiu os protocolos de Rufino et al. (2007) e Tavares et al. (2018), com modificações. Inicialmente, foi feita uma solução de DPPH a 0,06 mM diluindo 2,4 mg do reagente em 100 mL de metanol. As amostras (o extrato bruto e as duas frações purificadas obtidas do fungo *Pseudogymnoascus* sp. 6DC415-I), foram diluídas em metanol nas concentrações de 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 50 µg/mL e 10 µg/mL. Para as frações também foi testada a concentração de 1000 µg/mL.

Para os testes, pipetou-se 900 µL da solução de DPPH em microtubos juntamente com 100 µL das amostras em cada uma das concentrações. Foi utilizado como controle positivo uma solução de ácido ascórbico em metanol nas mesmas concentrações que as amostras e este foi feito com 900 µL da solução de DPPH com 100 µL da solução de ácido ascórbico. O controle negativo foi feito adicionando 100 µL de metanol ao invés das amostras. Os microtubos foram homogeneizados em agitador vórtex de bancada e mantidos abrigados de luz por durante 3 horas, para que ocorra a reação. Todo o procedimento foi realizado em ambiente escuro.

Passado as 3 horas de reação, as amostras foram transferidas para cubetas de plástico para a leitura da absorbância em espectrofotômetro com detector UV-vis Biochrom 5504 v 1.0 4 no comprimento de onda de 517 nm. Metanol foi utilizado para calibrar o espectrofotômetro. Com os valores de absorbância, a porcentagem de inibição de DPPH foi calculada através da seguinte fórmula:

$$I_{DPPH}\% = \left[\frac{(Abs\ neg - Abs\ amostra)}{Abs\ neg} \right] \times 100$$

Em que, $I_{DPPH}\%$ é a porcentagem de inibição de DPPH; Abs neg. é o valor de absorbância do controle negativo e Abs amostra o valor das amostras.

Com as porcentagens de inibição foi possível plotar uma curva padrão e, a partir dela, encontrar a IC_{50} , que indica a concentração mínima das amostras necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH.

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados trazem os valores médios de inibição, bem como o desvio padrão referente a cada um. Os testes ANOVA e Tukey foram realizados pelo software BioEstat 5.0.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da influência do pH e temperatura na produção dos pigmentos

5.1.1. Cultivo em diferentes pHs sob temperatura de 15 °C

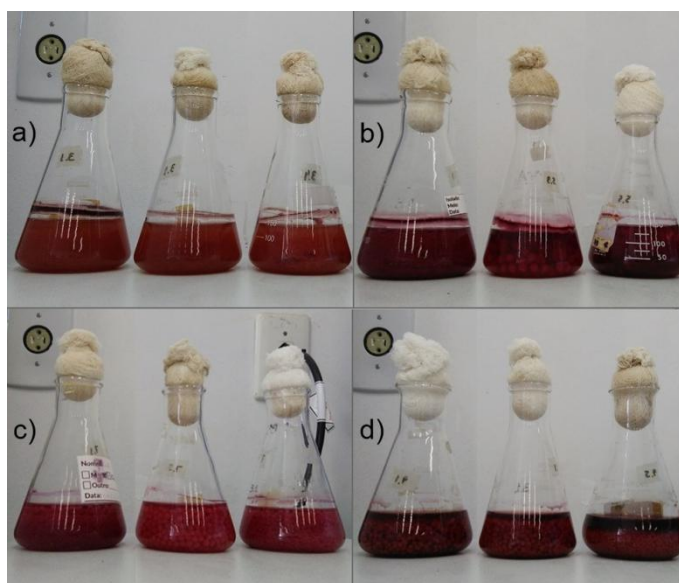
Os resultados obtidos após 20 dias de incubação em meio líquido estão apresentados na Tabela 1 e na Figura 6.

Tabela 1 - Valores de absorvância na leitura em 500 nm dos pigmentos vermelhos produzidos e valores da biomassa obtida em diferentes pHs.

pH	Absorvância	Biomassa (g/L)
3	0,396±0,066 ^A	3,531±0,534 ^A
5	2,063±0,058 ^B	7,555±0,847 ^B
7	1,281±0,230 ^C	6,536±0,679 ^B
9	1,208±0,047 ^C	8,245±2,317 ^B

Na tabela estão representados os valores médios (n=3) juntamente com o desvio padrão de cada um. O teste de ANOVA não indicou diferença significativa entre as repetições. Os valores indicados com letras diferentes em uma mesma coluna são considerados significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)

Figura 6 - Produção de pigmentos após o período de 20 dias de incubação a 15 °C e agitação a 150 rpm



a) pH 3; b) pH 5; c) pH 7; d) pH 9. Fonte: A autora.

É possível verificar que ocorreu a produção de pigmentos vermelhos em todos os níveis de pH. Visualmente (Figura 6), a produção foi menor em pH 3 e o tratamento que apresentou uma coloração mais intensa foi o do meio de cultura a pH 5. Tais resultados também foram corroborados pelos valores de absorvância obtidos no produto final de cada experimento (Tabela 1): em pH 3 foi obtido o menor valor médio de absorvância (0,396), enquanto pH 5 teve o maior valor de absorvância (2,063), ou seja, em pH 5 foi produzido uma maior quantidade de pigmentos quando comparado com os experimentos utilizando outros pH.

Em pH 7 e 9 os valores de absorvância foram bem próximos (1,281 e 1,208, respectivamente) e também não foi indicada diferença significativa entre eles.

Em um pH muito ácido, não somente a produção de pigmentos vermelhos por essa espécie foi afetada, como também o crescimento fúngico. O tratamento em pH 3 também constou a menor produção de biomassa (3,531 g/L). Os outros tratamentos tiveram uma produção de biomassa bem superior, porém não foram significativamente diferentes entre si, conforme apontado pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Ademais, a maior produção de biomassa (8,245 g/L) ocorrida no cultivo a pH 9 não refletiu em uma maior produção de pigmentos. Assim, percebe-se que não houve uma correlação direta entre o crescimento fúngico e a produção de pigmentos. Conclusões semelhantes foram obtidas nos trabalhos de Méndez e colaboradores (2011) e Afshari e colaboradores (2015).

O pH é uma variável de importância na avaliação da produção de pigmentos, por ser um fator determinante para o metabolismo de micro-organismos e, conseqüentemente, na produção de metabólitos (AFSHARI et al., 2015). As mudanças de pH podem alterar a atividade de enzimas e processos de redução e oxidação das moléculas das células, devido ao papel que os íons de hidrogênio desempenham na permeabilidade de membranas celulares, afetando, por exemplo, na produção de ATP, na entrada e saída de nutrientes e outros íons, na biossíntese e solubilidade de substâncias e na morfologia e estrutura das células (KANE, 2016; GMOSEK et al., 2017).

Dessa maneira, a alteração do pH no ambiente de desenvolvimento do fungo pode implicar na produção ou não de pigmentos, ou então em quais pigmentos serão produzidos. Isso ocorre nos pigmentos de *Monascus*, que variam de coloração amarela em pHs mais ácidos, a laranjas a vermelhos conforme o aumento do pH (VENDRUSCOLO et al., 2016) e em naftoquinonas, que também podem variar sua cor de acordo com o pH do meio (CARO et al., 2015). Outro exemplo são os pigmentos produzidos por *Scytalidium cuboideum*, que apresentavam coloração vermelha em condições ácidas, tendo seu valor máximo de produção em pH 6.5, e em pH básico, com máxima intensidade em pH 8 apresentava pigmentação de cor azul escura (TUDOR et al., 2013). Outros fungos produtores de pigmentos vermelhos que também obtiveram maior produção em pH 5 podem ser citados, como o *Penicillium purpurogenum* GH2 (atual *Talaromyces purpureogenus*) (MÉNDEZ et al., 2011), *Penicillium mallochii* (BOUHRI et al., 2019) e *Nigrospora aurantiaca* CMU-ZY2045 (SUWANNARACH et al., 2019).

Os valores ideais para a produção de pigmentos estão predominantemente entre pH 4 a 7, mas podem variar entre pH 3 até 9 (OGBONNA, 2016). Esses valores irão variar e depender da espécie do fungo e da classe de pigmentos produzidas pelos micro-organismos. Neste estudo, a condição ideal de cultivo do *Pseudogymnoascus* sp. 6DC415-I para produção do pigmento vermelho foi em pH 5, mas a produção em pHs mais básicos não pode ser descartada.

5.1.2. Cultivo em diferentes pHs sob temperatura de 25 °C

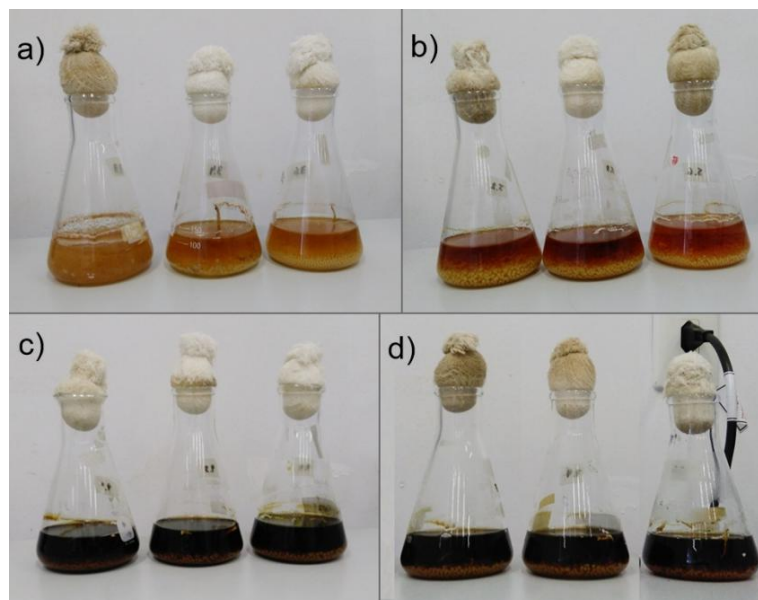
Os resultados obtidos após 20 dias de incubação em meio líquido estão apresentados na Tabela 2 e na Figura 7.

Tabela 2 - Valores de absorvância na leitura em 500 nm dos pigmentos vermelhos produzidos e valores da biomassa obtida em diferentes pHs.

pH	Absorbância	Biomassa (g/L)
3	0,010±0,030 ^A	5,399±0,629
5	0,120±0,067 ^B	5,357±0,440
7	0,898±0,041 ^C	4,655±0,133
9	1,119±0,116 ^C	4,640±0,103

Na tabela estão representados os valores médios (n=3) juntamente com o desvio padrão de cada um. O teste de ANOVA não indicou diferença significativa entre as repetições. Os valores indicados com letras diferentes em uma mesma coluna são considerados significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$)

Figura 7 - Produção de pigmentos após o período de 20 dias de incubação a 25 °C e agitação a 150 rpm.



a) pH 3; b) pH 5; c) pH 7; d) pH 9. Fonte: A autora.

No experimento conduzido a 25 °C, visualmente não foi observado a produção de pigmentos vermelhos em nenhum dos tratamentos de pH. O fungo em si, enquanto cresce apresentando uma coloração rosada a 15 °C, a 25 °C cresce sem coloração, na forma de micelas esbranquiçadas. Em pH 3 a média dos valores de absorvância foi próxima a zero, indicando que quase não houve alteração no meio de cultivo. Foi obtido valores baixos de absorvância nos outros tratamentos, indicando que provavelmente nesta temperatura ocorreu produção de alguma substância ou até mesmo dos pigmentos, porém em baixa quantidade. Entretanto, é possível notar que os meios de cultivos em pHs 7 e 9 adquiriram uma coloração marrom bem escura, provavelmente devido a presença de alguma substância diferente da esperada, por ser algo que não esteve presente no experimento posterior a 15 °C.

Quanto à biomassa, o teste de ANOVA não indicou diferenças significativas entre os tratamentos quanto à diferentes pHs, não sendo necessário aplicar o teste de Tukey ($p > 0,05$). Isso evidencia que o crescimento do fungo não foi tão afetado pelas diferenças de pH, por todos os tratamentos apresentarem um crescimento similar, mas sim pela temperatura, apresentando produção de biomassa inferior aos tratamentos a 15 °C.

O efeito da temperatura, então, foi o que mais impactou na produção de pigmentos. A temperatura desenvolve um papel importante na fisiologia dos seres vivos, influenciando as propriedades de compostos essenciais para a execução das funções celulares (TAJUDDIN et

al., 2018). Esta envolvida na regulação de processos enzimáticos e também pode impactar na fluidez de membranas, afetando a entrada de nutrientes e excreção de produtos pelos micro-organismos (AFSHARI et al. 2015; OGBONNA, 2016).

Considerando que o fungo deste estudo é proveniente do ambiente antártico, este se mostrou incapaz de conduzir seu metabolismo normalmente e produzir os pigmentos em temperaturas maiores, em decorrência da sua adaptação metabólica a baixas temperaturas.

Esses resultados indicam que o pH e a temperatura influenciaram na produção dos pigmentos vermelhos por esta espécie de *Pseudogymnoascus*. Essas duas variáveis possuem a capacidade de alterar as vias metabólicas de micro-organismos e afetar na produção de compostos metabólicos, por serem responsáveis pela regulação e alterações nas atividades enzimáticas dos organismos, sendo fatores importantes em processos biotecnológicos e que necessitam de monitoramento durante bioprocessos (MÉNDEZ et al., 2011).

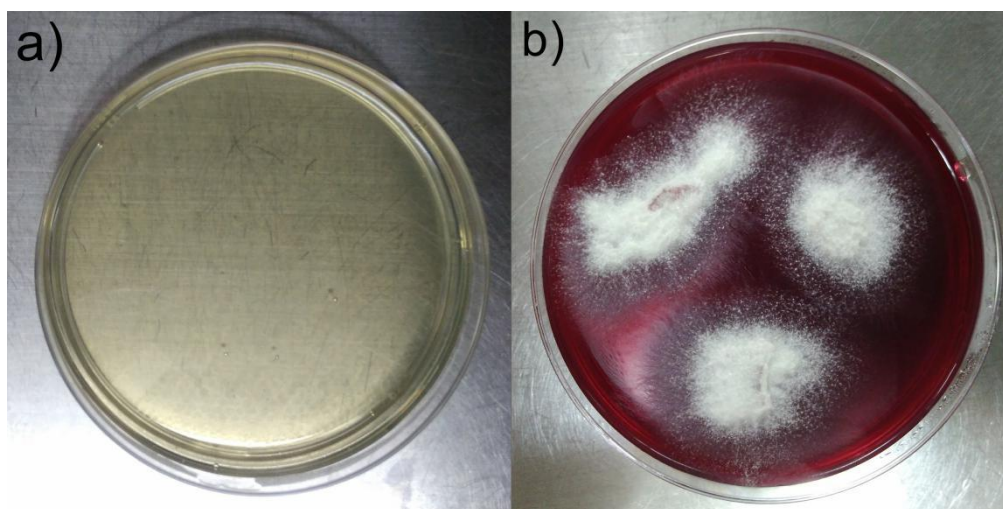
Uma forma de otimizar a produção de pigmentos em fungos psicofílicos/psicrotolerantes em temperaturas mais elevadas ou mesofílicas, que são costumamente utilizadas em processos de fermentação em larga escala, é através da modificação genética. O estudo de Ding e colaboradores (2021), por exemplo, buscou desenvolver um método de mutação de inserção de transposon no fungo antártico *Geomyces* sp. WNF15-A, para obter maior crescimento e produção de pigmentos vermelhos pelo fungo em temperaturas mais elevadas. Um de seus mutantes conseguiu duplicar a produção de pigmentos em relação a cepa selvagem em cultivo a 20 °C e outros dois foram capazes de sintetizar pigmentos a 25 °C (DING et al., 2021).

Por fim, nas condições avaliadas neste estudo, a condição ideal para a produção de pigmentos vermelhos por este fungo foi a 15 °C e em pH 5.

5.2. Produção e extração dos pigmentos naturais em meio sólido

O fungo *Pseudogymnoascus* sp 6DC415-I após o período de 20 dias de incubação à 15 °C e com produção de pigmentos vermelhos extracelulares em meio sólido está representado na Figura 8.

Figura 8 - Resultado da produção de pigmentos em meio sólido MA 1%



a) Placa contendo meio de cultivo MA 1%; b) *Pseudogymnoascus* sp. 6DC415-I cultivado em meio MA 1% após 20 dias de incubação à 15 °C. Fonte: A autora.

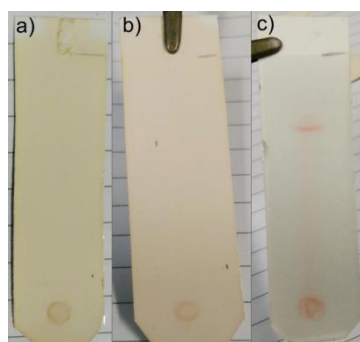
Foram realizadas extrações em acetona de cerca de 40 placas para a obtenção de 1 g de extrato bruto. Buscou-se uma produção alta para o posterior processo de purificação.

5.3. Fracionamento do extrato

5.3.1. Teste em cromatografia de camada delgada

As análises em cromatografia em camada delgada podem ser visualizadas na Figura 9.

Figura 9 - Placas de sílica da cromatografia em camada delgada do extrato obtido do fungo *Pseudogymnoascus* sp. 6DC145-I



Fases móveis: a) Hexano 1:1 Acetato de etila; b) Acetato de etila; c) Metanol. Fonte: A autora.

Como é possível observar, nas análises realizadas com os eluentes menos polares (Figura 9a e Figura 9b) os compostos da amostra ficaram todos retidos na fase estacionária e nenhum composto foi eluído com a fase móvel. Quando utilizado metanol como fase móvel

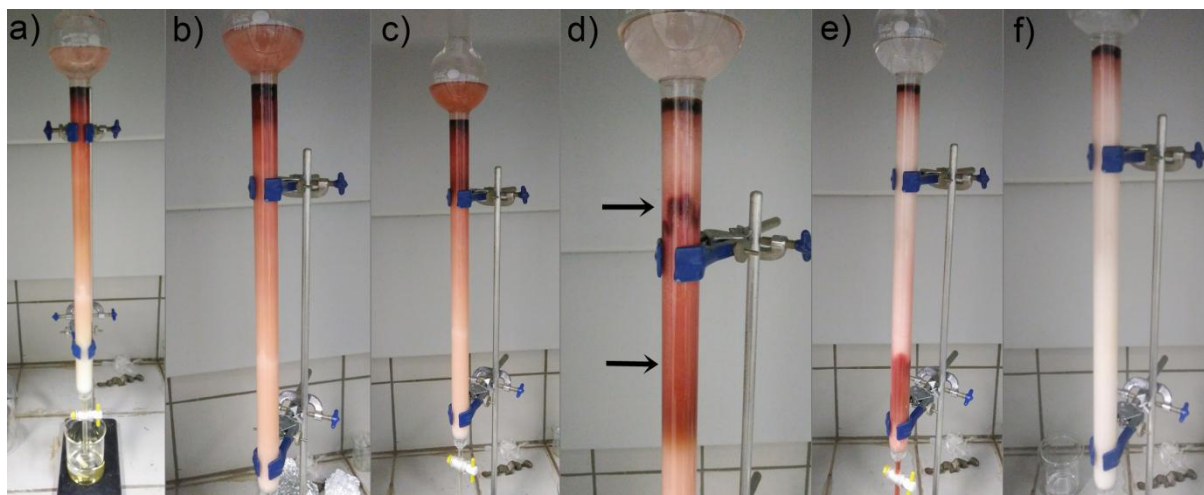
(Figura 9c), que é um solvente com uma polaridade maior, é possível verificar a eluição de pelo menos um composto, apresentando ainda compostos retidos totalmente na fase estacionária.

Com os resultados de cromatografia em placas de sílica, foi possível verificar que a mistura contendo os pigmentos apresenta uma alta polaridade, pois, mesmo utilizando o metanol, que é um solvente com uma polaridade alta, ainda houve compostos retidos na fase estacionária (sílica) da placa, a qual é altamente polar. Dessa maneira, ficaria inviável realizar uma cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária a sílica, pois, provavelmente, alguns compostos iriam ficar retidos na fase estacionária e não seriam possíveis de serem eluídos com nenhum solvente. Assim, optou-se por realizar a cromatografia em coluna utilizando uma fase estacionária reversa C18, que é uma fase estacionária apolar.

5.3.2. Cromatografia em coluna de fase reversa C18

A Figura 10 apresenta a eluição dos compostos ao longo do tempo na cromatografia de fase reversa C18.

Figura 10 - Coluna cromatográfica C18 no decorrer do procedimento de fracionamento do extrato obtido do fungo *Pseudogymnoascus* sp. 6DC145-I.



a) Coluna com fase móvel de 20% metanol; b) Coluna com fase móvel de 50% metanol; c) Coluna com fase móvel de 90% metanol; d) Ainda em 90% metanol, as setas indicam as frações se separando; e) Ainda em 90% de metanol, é possível ver a última fração sendo eluída; f) Coluna ao seu fim, após 100% metanol e eluição com 100% de acetonitrila. Fonte: a autora.

As frações foram sendo coletadas durante toda a cromatografia. A cromatografia foi realizada com fase móvel gradiente iniciando em 20% de metanol. De 20-50% de metanol houve a eluição de compostos com coloração amarela (dos tubos 1 ao 9 da Figura 11). Em seguida, de 90-100% de metanol houve a eluição de compostos com coloração vermelha. A fase líquida de 100% de acetonitrila não eluiu nenhuma outra amostra diferente. A Figura 11 apresenta a sequência de amostras eluídas da purificação do extrato de *Pseudogymnoascus* sp 6DC415-1 em coluna C18.

Figura 11 - Amostras eluídas da purificação do extrato de *Pseudogymnoascus* sp 6DC415 em coluna C18 e fase móvel gradiente



Fonte: a autora.

A partir do tubo 14 (Figura 11), a amostra eluída foi se tornando mais vermelha e nesse momento a fase líquida era de 90% metanol. As frações com coloração vermelha, que são de interesse para este estudo, foram agrupadas, considerando tanto o comportamento durante a cromatografia em coluna quanto o comportamento na CCD com metanol, resultando em três frações. A primeira fração vermelha foi coletada nos tubos 17, 18 e 19; a segunda fração nos tubos 21 ao 25 e os restantes (do 26 ao 33) constituíram a terceira fração. Após a evaporação completa do solvente das amostras, as frações foram enviadas para análise de

Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e análise de Infravermelho (FT-IR) para a elucidação de suas estruturas químicas.

5.4. Identificação dos pigmentos

5.4.1. Análise de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H)

As análises de RMN de ^1H das frações 1 e 2 foram as que apresentaram um resultado melhor em relação a pureza e os espectros obtidos estão apresentadas nas Figuras 12 e 13.

Figura 12 - Espectro da análise de RMN de ^1H da fração 1 em D_2O .

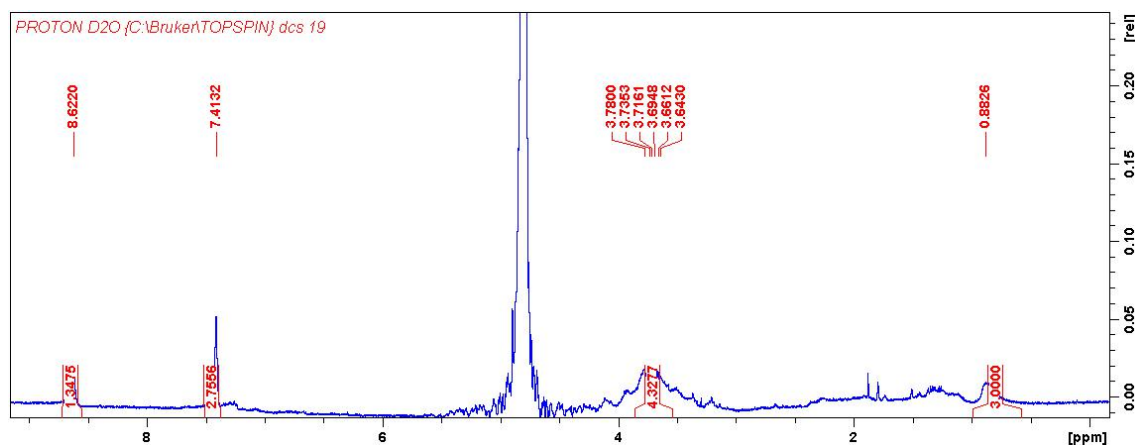
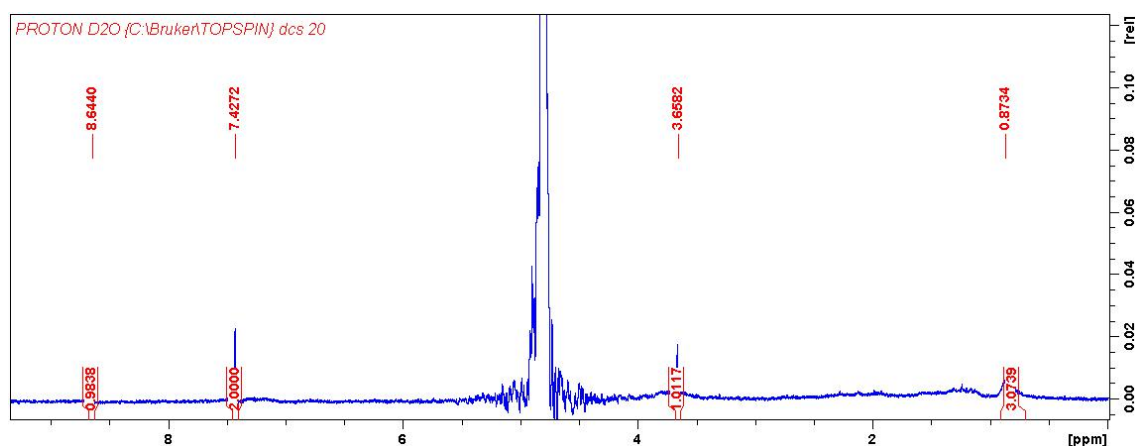


Figura 13 - Espectro da análise de RMN de ^1H da fração 2 em D_2O .



Como é possível observar nos espectros de RMN de ^1H das frações 1 e 2, as amostras apresentam, além do sinal do solvente D_2O (o maior sinal dos dois espectros em 4,8 ppm), sinais de hidrogênio em regiões semelhantes (3,65; 7,42 e 8,64 ppm). Isso pode caracterizar que estas frações provavelmente pertencem à mesma classe de composto, tendo uma diferença

no sinal na região de 3,65 ppm, em que para a fração 2 há apenas um sinal, enquanto que para a fração 1 há vários sinais nesta região.

Em uma análise comparativa dos espectros com os dados na literatura (KURIAN, BHAT, 2017; SAINI, MELO; 2015; ZONG et al. 2017), os deslocamentos químicos obtidos para as frações são semelhantes aos de compostos da classe de melaninas, mais especificamente da feomelanina. A Figura 14 traz o exemplo de um espectro de RMN de ^1H de uma melanina, como forma de comparação da semelhança entre a figura e os espectros obtidos na análise aqui feita.

Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H da melanina biossintetizada em D_2O /amônia aquosa.

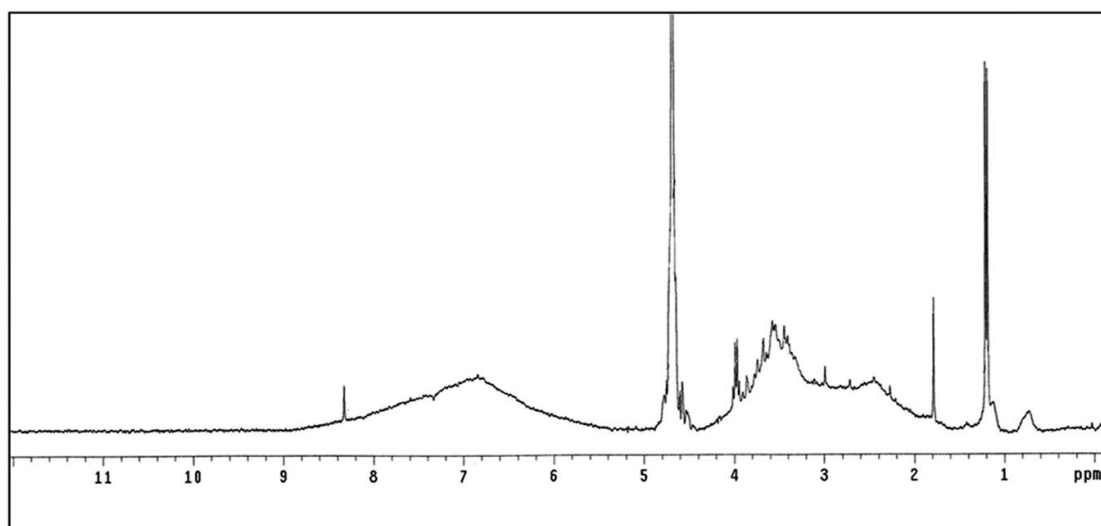


Figura retirada de Saini e Melo (2015).

De acordo com a literatura (PRALEA et al., 2019; KURIAN e BHAT; 2017; SAINI e MELO; 2015; ZONG et al., 2017; LIU et al., 2018), nas regiões aromáticas, os deslocamentos químicos entre 7-9 ppm são atribuídos aos hidrogênios aromáticos dos anéis indol e/ou outros hidrogênios aromáticos da cadeia polimérica da melanina. Os picos na região de absorção de 3,7-4,2 ppm podem ser devido aos prótons no carbono ligados a nitrogênio ou oxigênio. A presença de um grupo NH ligado ao indol foi atribuída aos sinais dentro da faixa de 1,3–2,5 ppm. Além disso, os deslocamentos químicos entre 0,2-2 ppm são geralmente atribuídos à vibração de estiramento dos fragmentos de alquila (grupos metil ou metileno). A Figura 15 apresenta a estrutura de uma feomelanina.

Figura 15 - Estrutura de feomelanina

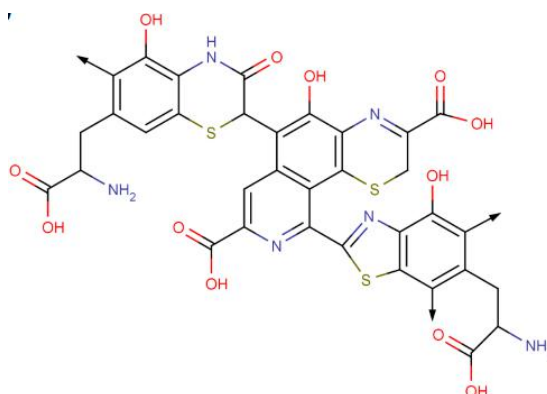
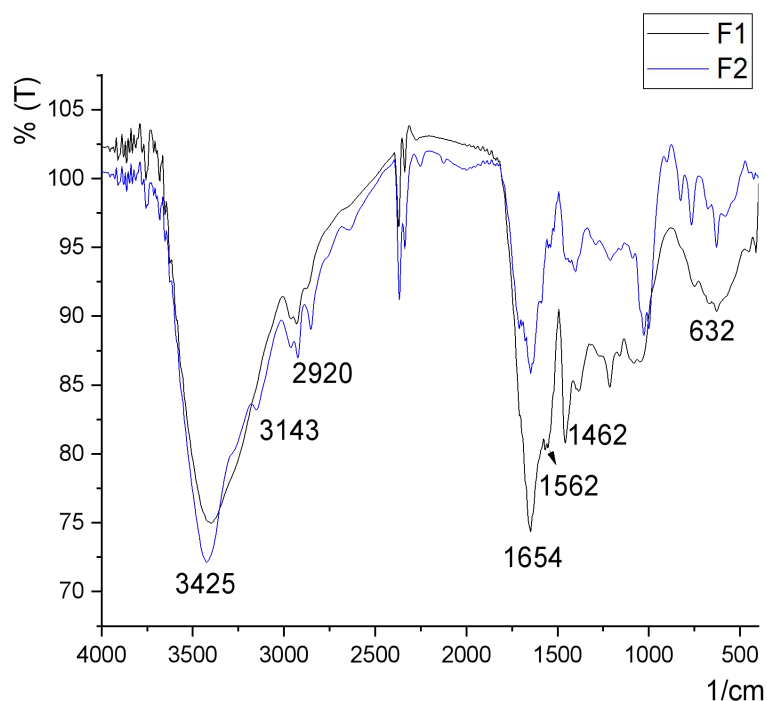


Figura retirada de Pralea et al. (2019).

5.4.2. Análise de Infravermelho com transformação de Fourier (FT-IR)

As duas amostras foram também submetidas a análise de Infravermelho (FT-IR) e seus espectros estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 - Espectros de infravermelho (FT-IR) das frações 1 (F1) e 2 (F2).



Como podemos observar na Figura 16, os espectros de infravermelho das frações 1 e 2 são semelhantes, e em comparação com os dados da literatura (SELVAKUMAR, et al., 2008; YE et al., 2014; OBEID et al., 2015; KURIAN, BHAT, 2017; , ZONG et al., 2017; LI et al.,

2018; KHATIB et al., 2018; YE et al. 2019) são característicos de feomelanina. A Figura 17 traz o exemplo de um espectro de FT-IR de uma feomelanina, como forma de comparação da semelhança entre a figura e os espectros obtidos na análise aqui feita.

Figura 17 - Espectro de infravermelho (FT-IR) da melanina intracelular do micélio de *Lachnum singerianum* YM296 (LIM-a)

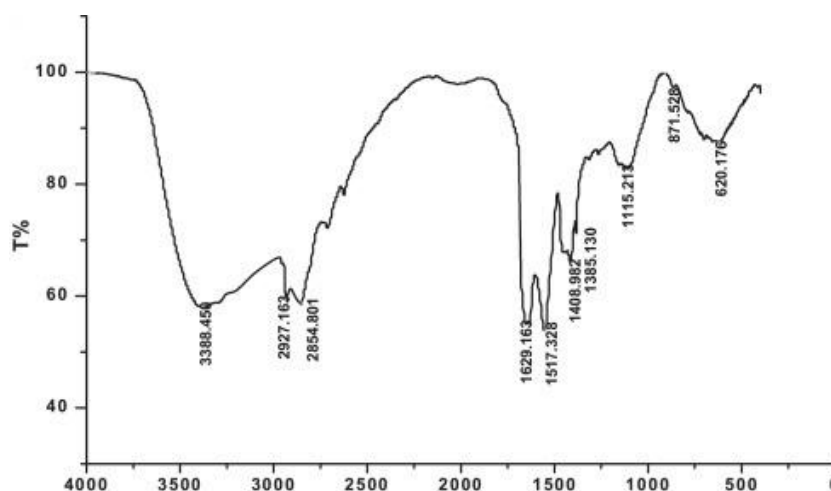


Figura retirada de YE et al. 2019

Os dois espectros das frações apresentam sinais na região de 3100-3500 cm^{-1} , indicando a presença de grupos $-\text{OH}$ e $-\text{NH}$; os sinais em 2920, 1654 e 1562 cm^{-1} , que indicam a presença de C-H alifático, carbonila ($\text{C}=\text{O}$) e $\text{C}=\text{C}$ aromático, respectivamente (OBEID et al., 2015), o sinal em 1462 cm^{-1} pode ser atribuído a vibração de flexão N-H ou de alongamento C-N (amina secundária) de um sistema indólico (YE et al., 2019; YE et al., 2014; LI et al., 2018, ZONG et al., 2017; PRALEA et al., 2019), por fim, o sinal em 632 cm^{-1} , indica a presença do pico de vibração de estiramento C-S. Geralmente, a presença do sinal na faixa 700-600 cm^{-1} é usada para identificar a presença de feomelanina em amostras naturais, já que a sua estrutura apresenta a ligação C-S (LI et al., 2018; YE et al., 2014; YE et al. 2018; KHATIB et al., 2018).

As feomelaninas são uma categoria de melaninas que apresentam coloração entre amarelo e vermelho (PRALEA et al., 2019). Quimicamente se diferenciam das eumelaninas por possuírem mais enxofre em sua estrutura (SOLANO, 2014). Entretanto, as feomelaninas são mais difíceis de serem encontradas em fungos no geral. É possível citar o fungo de solo *Cladosporium cladosporioides*, do qual uma pequena porção de sua melanina produzida era feomelanina (BUSZMAN et al., 2006). Também há registro do saprófito *Lachnum*

singerianum (YE, et al., 2011) e do fungo endofítico *Plenodomus biglobosus* (PUKALSKI et al., 2020), cujos pigmentos foram identificados como do tipo feomelanina. Alguns cogumelos também aparecem como produtores desse tipo de pigmento, como *Pleurotus djamor* (ZHANG et al., 2022), *Termitomyces albuminosus* (DE SOUZA et al., 2018) e *Auricularia auricula* (ZOU et al., 2015a; ZOU et al., 2015b).

A produção de melaninas por fungos da Antártica é bem comum (HASSAN et al., 2016; PACELLI et al., 2017; PACELLI et al., 2018; ONOFRI et al., 2018). Em relação à produção de melanina por fungos do gênero *Pseudogymnoascus*, há relatos de *P. destructans* da América do norte com cepa melanizada (KHANKHET et al., 2014) e com presença de genes para a produção de melanina (PALMER et al., 2018). Quanto aos fungos *Pseudogymnoascus* spp. isolados da Antártica, ainda não há relatos referentes à sua produção de melanina, nem de outros pigmentos, sendo este o primeiro estudo referente a esse tema.

As melaninas são pigmentos importantes para organismos de ambientes extremos, considerando que estas possuem papel na proteção destes organismos contra radiação UV, radiação ionizante, dessecação, agentes oxidantes, metais pesados e também contribuem para a sua patogênese (HASSAN et al., 2016; PACELLI et al. 2017). Melaninas também aparecem presentes em micro-organismos em ambientes com alta concentração de sal (GESSLER et al., 2014; PACELLI et al., 2018), podendo ter algum papel em auxiliar os fungos em sua halotolerância. Devido às suas propriedades, as melaninas podem ter aplicações biomédicas, em produtos farmacêuticos, cosméticos, alimentícios e também aplicações ambientais, antimicrobianas, têxtil e tecnológicas (GHATTAVI et al., 2022; SINGH et al., 2021; TRAN-LY, et al., 2020)

A atividade fotoprotetora da melanina é uma de suas propriedades mais conhecidas, devido a sua capacidade de absorção da radiação UV e também outros tipos de radiação como raios gama e raios-x (WONG et al, 2019). Entretanto, a feomelanina pode desempenhar um papel oposto ao da eumelanina: por ser fotossensível e levar a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) quando exposta à radiação, ela torna vertebrados, principalmente seres humanos com fenótipo ruivo, mais suscetíveis ao câncer de melanoma (SOLANO, 2014; MICILLO et al., 2016).

Como a feomelanina é mais rara em micro-organismos, não se tem muito conhecimento do papel que esse tipo de melanina poderia exercer nesses organismos. Por ser extracelular, há a possibilidade dos pigmentos estarem mais relacionados à interação do fungo

com o ambiente e outros micro-organismos. Seria necessário uma investigação mais aprofundada da produção, bioatividade e propriedades dos pigmentos para determinar suas funções no fungo.

As melaninas encontradas na natureza são moléculas comumente não solúveis em água ou outros solventes orgânicos (SINGH et al., 2021). Os pigmentos produzidos pelo fungo *Pseudogymnoascus* sp. 6DC415-I, entretanto, possuem alta solubilidade em água. Existem alguns poucos relatos sobre a obtenção de melanina solúvel em água de bactérias (KIMURA et al., 2015; AGHAJANYAN et al., 2005; AGHAJANYAN et al., 2011; DREWNOWSKA et al., 2015; ZERRAD et al., 2014) e também no fungo *Inonotus obliquus* (LEE, HYUN, 2014). Há também um outro tipo de melanina descrito, a piomelanina, caracterizada por possuir solubilidade em água (PEREZ-CUESTA et al., 2020; TURICK et al., 2010; VASANTHAKUMAR et al., 2015).

Tal característica de serem solúveis em água, juntamente com o fato de serem produzidos em abundância no meio extracelular, tornam os pigmentos deste estudo mais fáceis de serem obtidos em processos de fermentação e extraídos, aumentando as possibilidades de suas aplicações biotecnológicas.

5.5. Avaliação *in vitro* da bioatividade dos pigmentos extraídos

5.5.1. Atividade antibacteriana

O potencial antibacteriano do extrato bruto e das frações obtidos do fungo *Pseudogymnoascus* sp. 6DC415-I contra as bactérias *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*, *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi avaliado. Os resultados obtidos mostraram que os extratos e as duas frações não apresentaram inibição do crescimento bacteriano maior que 50% para as bactérias testadas, mesmo nas maiores concentrações testadas, que foram de 3 mg/mL para o extrato e 0,5 mg/mL para as frações.

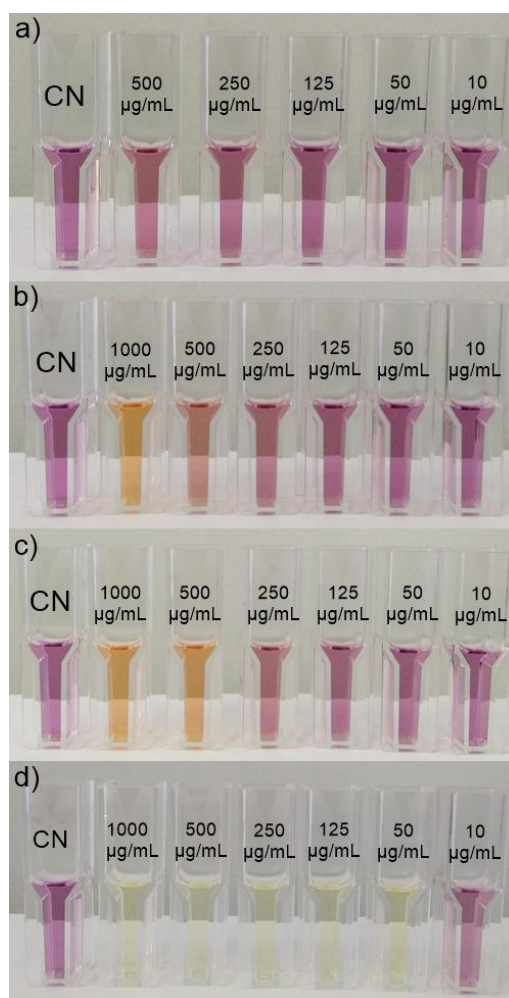
Na literatura, o extrato bruto extracelular do mesmo fungo (*Pseudogymnoascus* sp. 6DC415-I) apresentou MIC₉₀ na concentração de 2,091 mg/mL e de 3 mg/mL para *X. citri* subsp. *citri* e *X. a. passiflorae*, respectivamente (VIEIRA et al. 2018; PURIC et al. 2018). Essa diferença nos resultados deve-se provavelmente a diferença de metodologia utilizada na obtenção do extrato bruto. Nos trabalhos citados, a obtenção do extrato bruto foi realizada a partir do crescimento do fungo por 20 dias a 15 °C sob agitação de 150 rpm em meio líquido

caldo malte 2% e, em seguida, foi realizada extração líquido-líquido com solvente acetato de etila. Enquanto isso, neste estudo, realizou-se o crescimento do fungo em meio sólido MA 1%, sendo uma menor concentração de nutrientes, e a extração desse meio foi feita utilizando acetona, a qual possui polaridade diferente a do acetato de etila, podendo interferir no conteúdo extraído. Assim, a que tudo indica os compostos com atividade antibacteriana produzidos pelo fungo podem não ter sido produzidos e/ou extraídos na mesma quantidade e, provavelmente, eles não estão relacionados com os pigmentos em si.

5.5.2. Atividade antioxidante

A capacidade de inibir o radical DPPH pelo extrato bruto e pelas frações purificadas obtidas do fungo *Pseudogymnoascus* sp. 6DC415-I foram avaliadas e os resultados obtidos estão apresentados na Figura 18 e na Tabela 3.

Figura 18 - Resultado do teste de atividade antioxidante pelo método de captura de DPPH.



Amostras após o tempo de reação de 3 horas. **a)** Extrato bruto; **b)** fração 1; **c)** fração 2; **d)** ácido ascórbico. CN = controle negativo.

Os valores da porcentagem de inibição podem ser vistos na Tabela 3:

Tabela 3 - Tabela com a porcentagem de inibição de DPPH das amostras após 3 horas de reação.

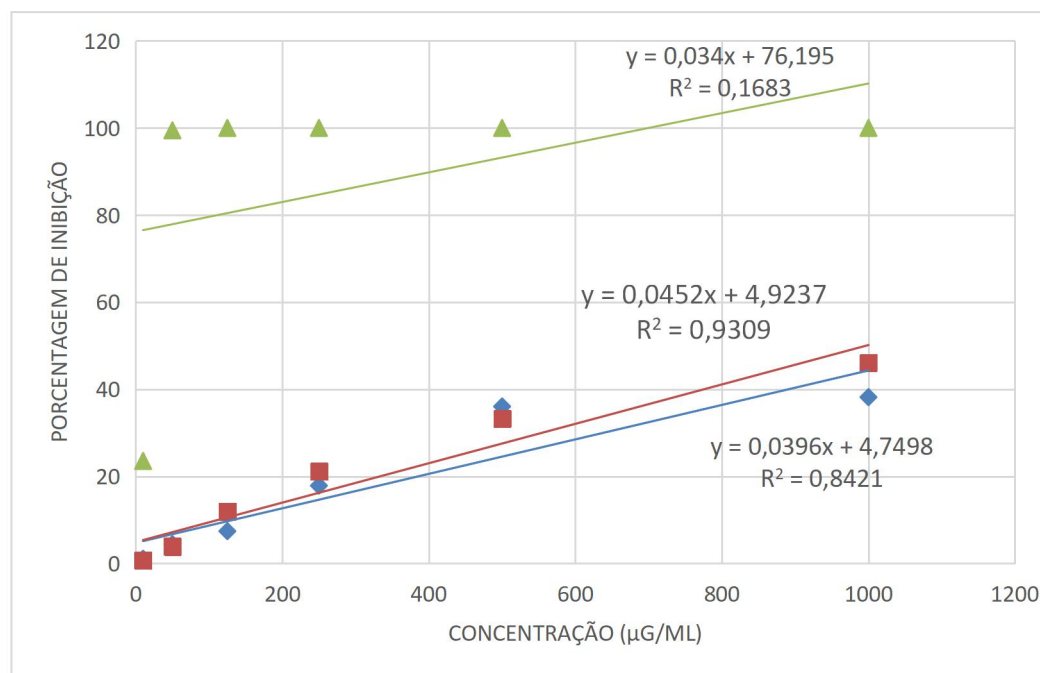
Concentração da amostra	Extrato	Fração 1	Fração 2	Ácido ascórbico
1000 µg/mL	-	46,12±1,89 ^A	38,19±2,63 ^A	100 ^A
500 µg/mL	14,78±2,62 ^A	33,22±1,88 ^B	36,05±4,48 ^A	100 ^A
250 µg/mL	7,93±0,23 ^B	21,14±1,81 ^C	17,87±0,34 ^B	100 ^A
125 µg/mL	4,23±2,56 ^{B,C}	11,98±0,92 ^D	7,42±4,44 ^C	100 ^A
50 µg/mL	2,30±1,88 ^C	3,90±0,86 ^E	4,44±2,01 ^C	99,46±0,76 ^A
10 µg/mL	1,34±1,37 ^C	0,70±0,66 ^E	1,09±0,51 ^C	23,54±0,32 ^B

Na tabela estão representados os valores médios (n=3) juntamente com o desvio padrão de cada um. O teste de ANOVA não indicou diferença significativa entre as repetições (p>0,05). Os valores indicados com letras diferentes em uma mesma coluna são considerados significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (p<0,05)

A partir dos resultados obtidos foi possível verificar que a inibição de DPPH pelo extrato foi bem baixa, enquanto que as frações apresentaram uma maior atividade antioxidante, em torno de 30-50% de inibição nas concentrações de 1000 µg/mL e 500 µg/mL. De acordo com o teste de Tukey (p<0,05), na fração 1 a diferença das concentrações teve mais impacto no resultado do que na fração 2.

Foi possível plotar os resultados das porcentagens de inibição dos testes para as frações e para o ácido ascórbico em um gráfico, representado na Figura 19.

Figura 19 - Gráfico com os valores da porcentagem de inibição de DPPH x concentração ($\mu\text{g/mL}$) das frações e do ácido ascórbico.



Os triângulos verdes são referentes ao ácido ascórbico, os quadrados vermelhos à fração 1 e os losangos azuis à fração 2. A equação da reta juntamente com o valor de R^2 de cada amostra é apresentada.

Através das equações das retas plotadas é possível encontrar o valor da IC_{50} para as frações, substituindo y por 50. O valor de IC_{50} para a fração 1 deu $1000 \mu\text{g/mL}$ e para a fração 2 deu $1143 \mu\text{g/mL}$, significando que, nessas concentrações, as frações seriam capazes de inibir metade da concentração de DPPH presente. O valor encontrado pela equação da reta para a fração 1 é o mesmo do que foi testado, porém nos resultados do experimento ele não chegou a inibir 50%, apesar de bem próximo. É possível notar que a capacidade de inibição das frações foi bem inferior a do controle positivo (ácido ascórbico), que foi capaz de inibir completamente o DPPH nas concentrações de $50 \mu\text{g/mL}$ em diante.

A produção de compostos antioxidantes por organismos da Antártica é bem comum (TOSI et al., 2010; LONDOÑE-BAILON et al., 2019), incluindo os pigmentos (DUARTE et al., 2019). Espécies do gênero *Pseudogymnoascus* na Antártica também aparecem como produtores de compostos com atividade antioxidante. Espécies como *P. pannorum* (antigo *Geomyces pannorum*) e outras não identificadas do gênero, isoladas de esponjas antárticas,

foram relatadas com atividade antioxidante moderada, obtida pelo método de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) (HENRIQUÉZ et al., 2014). Em Maggi et al. (2013), pelo método de DPPH, *P. pannorum* (antigo *Geomyces pannorum*) apresentou uma forte resposta antioxidante, através da produção de compostos fenólicos, a qual foi mais intensa quando submetido por um período de 72h mantido a 4 °C. O estresse causado pelo frio intenso do ambiente em que esses fungos vivem pode gerar espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais são prejudiciais para seus componentes celulares, portanto a produção de compostos antioxidantes por esses fungos é uma forma de superar essas condições (MAGGI et al., 2013).

Há vários relatos de melaninas produzidas por fungos com atividade antioxidante (SURENDIRAKUMAR et al, 2022; ARUN et al., 2015; WU et al., 2018; KUMAR et al., 2011) e também de feomelanina (ZOU et al., 2015a; ZOU et al., 2015b).

Os pigmentos produzidos pelo fungo *Pseudogymnoascus* sp. 6DC145-I deste estudo apresentaram atividade antioxidante, significando que esses compostos produzidos podem desempenhar alguma função de auxiliar esse organismo a sobreviver ao estresse ambiental no ambiente em que vive.

Esses pigmentos podem ter maior valor em suas aplicações devido a sua atividade antioxidante. Essas aplicações podem envolver utilização em alimentos, cosméticos e fármacos, trazendo os benefícios de sua atividade antioxidante aos produtos em que seriam aplicados. Assim, podendo auxiliar na eliminação de radicais livres prejudiciais à saúde e proteger contra danos oxidativos (VENDRUSCOLO et al., 2016).

6. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fungo antártico *Pseudogymnoascus* sp. 6DC415-I produziu pigmentos vermelhos, liberados em meio extracelular. Na avaliação do efeito da temperatura e pH na produção desses pigmentos pelo *Pseudogymnoascus* sp. 6DC415- pode-se verificar que a temperatura foi a variável de maior influência. Na temperatura de 25 °C, não se obteve produção de pigmentos vermelhos, devido à natureza psicrotrófica do fungo. O melhor resultado de produção nas condições testadas foi o cultivo na temperatura de 15°C e pH 5.

A partir da purificação utilizando cromatografia em coluna de fase reversa C18 do extrato vermelho produzido pelo *Pseudogymnoascus* sp. 6DC415-I, foi possível obter três frações de coloração vermelha, das quais duas frações apresentaram alto nível de pureza. A partir das análises dos espectros de RMN de ¹H e de infravermelho (FT-IR) das duas frações, foi possível sugerir que os compostos são provavelmente melaninas, mais especificamente da categoria das feomelaninas. Este é seu primeiro registro da produção deste tipo de composto por um fungo do gênero *Pseudogymnoascus* isolado da Antártica.

O extrato bruto e as frações obtidas do extrato produzido pelo *Pseudogymnoascus* sp. 6DC415-I não apresentaram atividade antibacteriana contra as bactérias testadas (*X. citri*, *X. passiflorae*, *E. coli*, *S. aureus* e *B. subtilis*), no intervalo de concentrações de 3 mg/mL para o extrato e 0,5 mg/mL para as frações.

Na avaliação da atividade antioxidante dos pigmentos produzidos, através do método da captura do radical DPPH, as frações apresentam atividade antioxidante com IC₅₀ nas concentrações de 1000 µg/mL e 1143 µg/mL para as frações 1 e 2, respectivamente.

Os pigmentos vermelhos produzidos pelo fungo antártico *Pseudogymnoascus* sp. 6DC415-I possuem o diferencial de serem solúveis em água, não exigindo solventes orgânicos. Isso os torna mais sustentáveis e menos custosos, podendo ser uma boa alternativa para substituir corantes sintéticos em aplicações nas indústrias de cosméticos, têxtil, farmacêutica e de alimentos.

7. REFERÊNCIAS

ABDEL-AZEEM, A. M., ABDEL-AZEEM, M. A., DARWISH, A. G., NAFADY, N. A., IBRAHIM, N. A. *Fusarium: biodiversity, ecological significances, and industrial applications*. Em: YADAV, A., MISHRA, S., SINGH, S., GUPTA, A., (eds). *Recent advancement in white biotechnology through fungi*. Fungal biology, volume 1: diversity and enzymes perspectives, 1 ed. Basel: Springer Nature, p. 201–261, 2019.

ABEL, A. *The history of dyes and pigments*. 2 ed. Sawston (UK): Woodhead Publishing, p. 557–587, 2012.

ABEROUMAND, A. A Review Article on Edible Pigments Properties and Sources as Natural Biocolorants in Foodstuff and Food Industry. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, v. 6, n. 1, p. 71-78, 2011

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. 1300-6, 2015.

AGBOYIBOR, C., KONG, W.-B., CHEN, D., ZHANG, A. M., NIU, S. Q. *Monascus* pigments production, composition, bioactivity and its application: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2018.

AGHAJANYAN, A. A., ASATURIAN, R. A., HAMBARDZUMYAN, A. A., SARGSYAN, L. B., et al. Obtaining of water soluble microbial melanin and study of its some properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 47, n. 5, p. 500–506, 2011.

AGHAJANYAN, A. E., HAMBARDZUMYAN, A. A., HOVSEPYAN, A. S., ASATURIAN, et al. Isolation, purification and physicochemical characterization of water-soluble *Bacillus thuringiensis* melanin. *Pigment Cell Research*, v. 18, n. 2, p. 130–135, 2005.

AGURTO, P., VEGA-GUTIERREZ, M. E., VAN COURT, S. M. , CHEN, H. L., ROBINSON, S. C. Oil-Based Fungal Pigment from *Scytalidium cuboideum* as a Textile Dye. *J Fungi (Basel)*., v. 6, n. 2, p. 53, 2020.

AISHWARYA. A. D. Extraction of natural dyes from fungus—an alternative for textile dyeing. *J Nat Sci Res*, v. 4, p. 1–6, 2014.

ALMEIDA, L. M. S. et al. Seleção de fungos quanto à capacidade de utilização de corantes. *Ceuma Perspectivas*, v. 31., 2018.

ARCANGELI C, CANNISTRARO S. In situ Raman microspectroscopic identification and localization of carotenoids: approach to monitoring of UV-B irradiation stress on Antarctic fungus. *Biopolymers*, v. 57, p.179–186, 2000.

ARDILA-LEAL, L.D.; POUTOU-PIÑALES, R.A.; PEDROZA-RODRÍGUEZ, A.M.; Quevedo-Hidalgo, B.E. A Brief History of Colour, the Environmental Impact of Synthetic Dyes and Removal by Using Laccases. *Molecules*, v. 26, p. 3813, 2021.

ARENZ, B. E., BLANCHETTE, R. A. Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica at sites on the Peninsula, Ross Sea Region and McMurdo Dry Valleys. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 43, n. 2, p. 308–315, 2011.

ARENZ, B.E., HELD, B.H., JURGENS, J.A., FARRELL, R.L., BLANCHETTE, R.A. Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. *Soil Biology & Biochemistry*, Elmsford, v. 38, n. 10, p. 3057–3064, 2006.

ARIKAN, B. E.; Canli, O.; Caro, Y.; Dufossé, L.; Dizge, N. Production of Bio-Based Pigments from Food Processing Industry By-Products (Apple, Pomegranate, Black Carrot, Red Beet Pulps) Using *Aspergillus carbonarius*. *J. Fungi*, v. 6 p. 240, 2020.

ARUN, G., EYINI, M., GUNASEKARAN, P. Characterization and biological activities of extracellular melanin produced by *Schizophyllum commune* (Fries). *Indian J Exp Biol.*, v. 53, n. 6, p. 380-7, 2015.

ATALLA, M. M., EL-KHRISY, E. A. M., YOUSSEF, Y. A., MOHAMED, A. A., Production of textile reddish brown dyes by fungi. *Malays. J. Microbiol.*, v. 7, p. 33–40, 2011.

AVALOS, J., PARDO-MEDINA, J., PARRA-RIVERO, O., RUGER-HERREROS, M., RODRÍGUEZ-ORTIZ, R., HORNERO-MÉNDEZ, D., LIMÓN, M. Carotenoid Biosynthesis in *Fusarium*. *Journal of Fungi*, v. 3, n. 3, p. 39, 2017.

AYYOLATH, A., KALLINGAL, A., THACHAN KUNDIL, V., VARIYAR, E. J. Studies on the bioactive properties of *Penicillium mallochi* ARA-1 pigment isolated from coffee plantation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 30, 2020.

BABITHA, S. *Microbial pigments*. In: PANDEY, A.; NIGAM, P. S. *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*, Dordrecht:Springer, p. 147–162, 2009.

BARNETT, J. R., MILLER, S., PEARCE, E. Colour and art: A brief history of pigments. *Optics & Laser Technology*, v. 38, p. 445–453, 2006.

BASNET, B. B., LIU, L., ZHAO, W., LIU, R., MA, K., BAO, L., ... LIU, H. New 1, 2-naphthoquinone-derived pigments from the mycobiont of lichen *Trypethelium eluteriae* Sprengel. *Natural Product Research*, p. 1–7, 2018.

BATTERSBY, A. R. Tetrapyrroles: the pigments of life. *Natural Product Reports*, v. 17, n. 6, p. 507–526, 2000.

BERKE, H. Chemistry in ancient times: The development of blue and purple pigments. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v. 41, p. 2483–2487, 2002.

- BRAKHAGE, A. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat Rev Microbiol*, v. 11, p. 21–32, 2013.
- BOUHRI, Y., ASKUN, T., TUNCA, B., DENIZ, G., AKSOY, S. A., MUTLU, M. The orange-red pigment from *Penicillium mallochii*: Pigment production, optimization, and pigment efficacy against Glioblastoma cell lines. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2019.
- BU, C., ZHANG, Q., ZENG, J. et al. Identification of a novel anthocyanin synthesis pathway in the fungus *Aspergillus sydowii* H-1. *BMC Genomics*, v. 21, n. 29, 2020.
- BUSZMAN, E.; PILAWA, B.; ZDYBEL, M.; et al EPR examination of Zn²⁺ and Cu²⁺ binding by pigmented soil fungi *Cladosporium cladosporioides*. *Science of The Total Environment*, v. 363(1-3), p. 195–205, 2006.
- CAMBAZA, E. Comprehensive Description of *Fusarium graminearum* Pigments and Related Compounds. *Foods*, v. 7, n. 10, p. 165, 2018.
- CARO, Y., VENKATACHALAM, M., LEBEAU, J., FOUILLAUD, M., DUFOSSÉ, L. *Pigments and Colorants from Filamentous Fungi*. In: J.-M. MÉRILLON, J. M., RAMAWAT, K. G (eds.). *Fungal Metabolites*, Springer: Suíca, p. 1–70, 2015.
- CARVALHO, C., FERREIRA, M., GONÇALVES, V., SANTOS, A. R., CARVALHO-SILVA, M., CAMARA, P., et al. Cultivable fungi associated with bryosphere of bipolar mosses *Polytrichastrum alpinum alpinum* and *Polytrichum juniperinum* in Antarctica. *Polar Biol.*, v. 43, p. 545–553, 2020.
- CELESTINO, J. D. R., DE CARVALHO, L. E., LIMA, M. D. P., et al. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. *Process Biochem*, v. 49, p. 569–575, 2014.
- CHADNI, Z., RAHAMAN, M. H., JERIN, I., HOQUE, K. M., REZA, M. A. Extraction and optimisation of red pigment production as secondary metabolites from *Talaromyces verruculosus* and its potential use in textile industries. *Mycology*, v. 8, n.1, p. 48–57, 2017.
- CHEN, W. et al. Orange, red, yellow: biosynthesis of azaphilone pigments in *Monascus* fungi. *Chemical Science*, v. 8, p. 4917, abril 2017.
- CIRM. Sobre o continente. Programa Antártico Brasileiro. Disponível em: <<https://www.marinha.mil.br/secirm/pt-br/proantar/a-antartica>>. Acesso em: 28 de fevereiro de 2022.
- CLARKE A. *Evolution, adaptation and diversity: global ecology in an Antarctic context*. In: HUIKES, A. H. L, et al. (Ed.) *Antarctic biology in a global context*. Leiden: Backhuys Publishers, p. 3-17, 2003.
- CONVEY, P.; CHOWN, S. L.; CLARKE, A.; BARNES, S. B.; et al. The spatial structure of Antarctic biodiversity. *Ecological Monographs*, v. 84, n. 2, p. 203-244, 2014.

- COOKSEY, C. J. The red insect dyes: carminic, kermesic and laccaic acids and their derivatives. *Biotechnic & Histochemistry*, v. 94, n. 2, p. 1–8, 2018.
- CORDERO, R. J. B., CASADEVALL, A. Quick Guide: Melanin. *Current Biology*, v. 30, R135–R158, 24 de fev., 2020.
- DA SILVA, T. H.; SILVA, D. A. S.; DE OLIVEIRA, F. S. et al. Diversity, distribution, and ecology of viable fungi in permafrost and active layer of Maritime Antarctica. *Extremophiles*, v. 24, p. 565–576, 2020.
- DAME, Z. T., SILIMA, B., GRYZENHOUT, M., VAN REE, T. Bioactive compounds from the endophytic fungus *Fusarium proliferatum*. *Nat. Prod. Res.*, v. 30, n. 11, p. 1301–1304, 2015.
- DE SOUZA, R.A., KAMAT, N.M., NADKARNI, V.S. Purification and characterization of a sulphur rich melanin from edible mushroom *Termitomyces albuminosus* Heim. *Mycology*, v. 9, p. 296–306, 2018.
- DERNTL, C., RASSINGER, A., SREBOTNIK, E., MACH, R. L., MACH-AIGNER, A. R. Identification of the Main Regulator Responsible for Synthesis of the Typical Yellow Pigment Produced by *Trichoderma reesei*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 82, n. 20, p. 6247–6257, 2016.
- DIESER, M.; GREENWOOD, M.; FOREMAN, C. M. Carotenoid Pigmentation in Antarctic Heterotrophic Bacteria as a Strategy to Withstand Environmental Stresses. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, v. 42, p. 396, 2010.
- DING, L., HUANG, H., LU, F., LU, J., ZHOU, X., ZHANG, Y., CAI, M. Transposon insertion mutation of Antarctic psychrotrophic fungus for red pigment production adaptive to normal temperature, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 49, n. 1, 2022.
- DOS SANTOS, J. A.; MEYER, E.; SETTE, L. D. Fungal Community in Antarctic Soil Along the Retreating Collins Glacier (Fildes Peninsula, King George Island). *Microorganisms*, v. 8, 2020.
- DOS SANTOS, P.O., FERRAZ, C.G., RIBEIRO, P.R., MIRANDA, F.M., DA SILVA, F., et al. Antioxidant and antibacterial activities of the chlorine pigment sclerotiorin from *Penicillium mallochii* and its chemotaxonomic significance. *Biochem. Syst. Ecol.*, v. 86, 2019.
- DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Coloring our foods in the last and next millennium. *Journal of Food Science and Technology*, v. 35, p. 5–22, 2000.
- DREWNOWSKA, J. M., ZAMBRZYCKA, M., KALSKA-SZOSTKO, B., FIEDORUK, K., SWIECICKA, I. Melanin-Like Pigment Synthesis by Soil *Bacillus weihenstephanensis* Isolates from Northeastern Poland. *PLOS ONE*, v. 10, n. 4, 2015.

- DUAN, F., XIN, G., NIU, H., HUANG, W. Chlorinated emodin as a natural antibacterial agent against drug-resistant bacteria through dual influence on bacterial cell membranes and DNA. *Sci. Rep.*, v. 7, n.1, 2017.
- DUARTE, A. W. F.; MENEZES, G. C. A. de; SILVA, T. R.; BICAS, J. L.; OLIVEIRA, V. M.; ROSA, L. H. *Antarctic Fungi as Producers of Pigments*. In: ROSA, L. H. (ed). *Fungi of Antarctica: Diversity, Ecology and Biotechnological Applications*. Springer, 2019.
- DUFOSSÉ, L.; FOUILLAUD, M.; CARO, Y.; MAPARI, S.A.; SUTTHIWONG, N. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 26, p. 56, 2014.
- DUFOSSÉ, L. Red colourants from filamentous fungi: are they ready for the food industry?. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 69, 2018.
- DURÁN, N., JUSTO, G. Z., FERREIRA C. V., MELO, P. S., CORDI, L., MARTINS, D. Violacein: properties and biological activities. *Biotechnol. Appl. Biochem.* v. 48, p. 127–133, 2007.
- DURÁN, N., TEIXEIRA, M. F. S., DE CONTI, R., ESPOSITO, E. Ecological-Friendly Pigments From Fungi. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, v. 42, n. 1, p. 53–66, 2002.
- EDWARDS, J., AUER, D., de ALWIS, S. K., SUMMERELL, B., AOKI, T., PROCTOR, RH, ... O'DONNELL, K. *Fusarium agapanthi* sp. nov., a novel bikaverin and fusarubin-producing leaf and stem spot pathogen of *Agapanthus praecox* (African lily) from Australia and Italy. *Mycologia*, v. 108, n. 5, p. 981–992, 2016.
- FOUILLAUD, M., VENKATACHALAM, M., GIRARD-VALENCIENNES, E., CARO, Y., DUFOSSÉ, L. Anthraquinones and Derivatives from Marine-Derived Fungi: Structural Diversity and Selected Biological Activities. *Mar Drugs*, v. 14, n. 4, p. 64, mar. 2017.
- FRANSEN, R. J. N., RASMUSSEN, S. A., KNUDSEN, P. B., UHLIG, S., PETERSEN, D., LYSOE, E., ... LARSEN, T. O. Black perithecial pigmentation in *Fusarium* species is due to the accumulation of 5-deoxybostrycoidin-based melanin. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, 2016.
- FRISVAD, J. C., YILMAZ, N., THRANE, U., RASMUSSEN, K. B., HOUBRAKEN, J., SAMSON, R. A. *Talaromyces atroseus*, a New Species Efficiently Producing Industrially Relevant Red Pigments. *PLoS ONE*, v. 8, n. 12, 2013.
- FUCK, W. F. et al. Screening of natural dyes from filamentous fungi and leather dyeing with *monascus purpureus* extract. *Journal-Society of Leather Technologists and Chemists*, v. 102, n. 2, p. 69-74, mar. 2018.
- FUJITA, K., IKUTA, M., NISHIMURA, S., SUGIYAMA, R., YOSHIMURA, A., KAKEYA, H. Amphiol, an Antifungal Fungal Pigment from *Pseudogymnoascus* sp. PF1464. *Journal of Natural Products*, v. 84, n. 4, p. 986–992, 2021.

- FURBINO, L. E.; GODINHO, V. M.; SANTIAGO, I. F. et al. Diversity Patterns, Ecology and Biological Activities of Fungal Communities Associated with the Endemic Macroalgae Across the Antarctic Peninsula. *Microb Ecol*, v. 67, p. 775–787, 2014.
- GARZOLI, L., RICCUCCI, M., PATRIARCA, E. et al. First Isolation of *Pseudogymnoascus destructans*, the Fungal Causative Agent of White-Nose Disease, in Bats from Italy. *Mycopathologia* 184, 637–644, 2019.
- GESSLER, N. N., EGOROVA, A. S., BELOZERSKAYA, T. A. Fungal anthraquinones. *Appl. Biochem. Microbiol.*, v. 49, n. 2, p. 85–99. doi:10.1134/s000368381302004x, 2013.
- GHATTAVI, K., HOMAELI, H., KAMRANI, E., KIM, S. Melanin pigment derived from marine organisms and its industrial applications. *Dyes and Pigments*, v. 201, 2022.
- GMOSEK, R., FERREIRA, J.A., LENNARTSSON, P.R. et al. Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. *Fungal Biol Biotechnol*, v. 4, n. 4, 2017.
- GODINHO, V. M.; DE PAULA, M. T. R.; SARAIVA, D. A. S., PARESQUE, K.; MARTINS, A. P., et al. Diversity and distribution of hidden cultivable fungi associated with marine animals of Antarctica. *Fungal Biology*, v. 123, p. 507-516.
- GOMES, E. C. Q., GODINHO, V. M., SILVA, D. A. S. et al. Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. *Extremophiles*, v. 22, p. 381–393, 2018.
- GONÇALVES, R. C. R., LISBOA, H. C. F., POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R. Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.28, n. 4, p. 1467–1474, 2011.
- GONÇALVES, V. N.; VAZ, A. B. M.; ROSA, C. A.; ROSA, L. H. Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *Microbiology Ecology*, v. 82, n. 2, p. 459–471, 2012.
- GU, S.; CHEN, Z.; WANG, F.; WANG, X. Characterization and inhibition of four fungi producing citrinin in various culture media. *Biotechnol Lett*. 2021 Mar;43(3):701-710. doi: 10.1007/s10529-020-03061-2.
- GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B.; Corantes têxteis. *Química Nova*, v. 23, n. 1, 2000.
- GUPTA, C.; SHARMA, D.; AGGARWAL, S.; NAGPAL, N. Pigment production from *Trichoderma* sp. for dyeing of silk and wool. *Int. J. Sci. Nat.*, v. 4, p. 351–355, 2013.
- GUPTA, P., VAKHLU, J., SHARMA, Y.P. et al. Metagenomic insights into the fungal assemblages of the northwest Himalayan cold desert. *Extremophiles*, v. 24, p. 749–758, 2020.
- GUTIERREZ, V. S. M.; STONE, D.W.; HE, R.; VEGA GUTIERREZ, P.T.; WALSH, Z.M.; ROBINSON, S.C. Potential Use of the Pigments from *Scytalidium cuboideum* and

Chlorociboria aeruginosa to Prevent 'Greying' Decking and Other Outdoor Wood Products. *Coatings*, v. 11, p. 511, 2021.

Haidar, S., AICHELE, D., BIRUS, R., HIELSCHER, J., LAITINEN, T., POSO, A., JOSE, J. In Vitro and in Silico Evaluation of Bikaverin as a Potent Inhibitor of Human Protein Kinase CK2. *Molecules*, v. 24, n. 7, p. 1380, 2019.

Hajjaj, H., FRANÇOIS, J. M., GOMA, G., BLANC, P. J. Effect of Amino Acids on Red Pigments and Citrinin Production in *Monascus ruber*. *J. Food Sci.*, v. 77, n. 3, p. 156-159, 2012.

HASSAN, M. M.; CARR, C. M. A critical review on recent advancements of the removal of reactive dyes from dyehouse effluent by ion-exchange adsorbents. *Chemosphere*, v. 209, n. 1, p. 201-219, 2018.

HASSAN, N.; RAFIQ, M.; HAYAT, M.; SHAH, A. A.; HASAN, F. Psychrophilic and psychrotrophic fungi: a comprehensive review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, v. 15, p. 137-172, 2016.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.

HAYES, M. A. The Geomyces Fungi: ecology and distribution. *BioScience*, Washington, v. 62, n. 9, p. 819-823, 2012.

HEIDER, S. A. E., PETERS-WENDISCH, P., WENDISCH, V. F., BEEKWILDER, J., BRAUTASET, T. Metabolic engineering for the microbial production of carotenoids and related products with a focus on the rare C50 carotenoids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, n. 10, p. 4355-4368, 2014.

HENRÍQUEZ, M., VERGARA, K., NORAMBUENA, J., BEIZA, A., MAZA, F., UBILLA, P., ... VACA, I. Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 1, p. 65-76, 2014.

HEO, Y. M., KIM, K., KWON, S. L., NA, J., LEE, H., JANG, S., ... KIM, J. J. Investigation of Filamentous Fungi Producing Safe, Functional Water-Soluble Pigments. *Mycobiology*, v. 46, n. 3, p. 269-277, 2018.

HERNÁNDEZ V, GALLEGUILLOS F, SAGREDO N, MACHUCA A. A Note on the dyeing of wool fabrics using natural dyes extracted from rotten wood-inhabiting fungi. *Coatings*, v. 8, p.7, 2018.

HERNÁNDEZ, V.A., MACHUCA, Á., SAAVEDRA, I. et al. *Talaromyces australis* and *Penicillium murcianum* pigment production in optimized liquid cultures and evaluation of their cytotoxicity in textile applications. *World J Microbiol Biotechnol*, v. 35, n. 60, 2019a.

- HERNÁNDEZ, V.A., GALLEGUILLOS, F., THIBAUT, R., MÜLLER, A., Fungal dyes for textile applications: testing of industrial conditions for wool fabrics dyeing. *J. Text. Inst.*, v. 110, p. 61–66, 2019b.
- HOSOE, T., MORI, N., KAMANO, K. et al. A new antifungal yellow pigment from *Aspergillus nishimurae*. *J Antibiot*, v. 64, p. 211–212, 2011.
- HSU, Y. W., HSU, L. C., LIANG, Y. H., KUO, Y. H., PAN, T.M. New Bioactive Orange Pigments with Yellow Fluorescence from *Monascus*-Fermented Dioscorea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 9, p. 4512–4518, 2011.
- HUANG, D., CUI, L., SAJID, A., ZAINAB, F., WU, Q., WANG, X., YUAN, Z. The epigenetic mechanisms in *Fusarium* mycotoxins induced toxicities. *Food and Chemical Toxicology*, v. 123, p. 595-601, 2019.
- HUANG, H., DING, L., LU, J., WANG, N., & CAI, M. Combinatorial strategies for production improvement of red pigments from Antarctic fungus *Geomyces* sp. *Journal of Food Science*, v. 85, n. 10, p. 3061–3071, 2020.
- HUGHES, K. A.; LAWLEY, B.; NEWSHAM, K. K. Solar UV-B Radiation Inhibits the Growth of Antarctic Terrestrial Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p.1488, 2003.
- INFORSATO. Fungos de sedimentos marinhos da Antártica: diversidade e prospecção de enzimas. Tese (Mestrado). 134 p. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro - SP, 2017.
- ISBRANDT, T., TOLBORG, G., ØDUM, A., WORKMAN, M., LARSEN, T. O. Atrososins: a new subgroup of *Monascus* pigments from *Talaromyces atroseus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019.
- JIA, X. Q.; XU, Z. N.; ZHOU L. P.; SUNG, C. K. Elimination of the mycotoxin citrinin production in the industrial important strain *Monascus purpureus* SM001. *Metab Eng.*, v. 12, n.1, p. 1-7, 2010.
- JAROLIM, K., WOLTERS, K., WOELFLINGSSEDER, L., PAHLKE, G., BEISL, J., PUNTSCHER, H., MARKO, D. The secondary *Fusarium* metabolite aurofusarin induces oxidative stress, cytotoxicity and genotoxicity in human colon cells. *Toxicol. Lett.*, v. 284, p. 170–183, 2018.
- JIE, L.; LONGLONG, D.; YUDONG, G.; YUE, M.; NENGFEI, W. The comparison stability between Antarctic fungus red pigment and *Monascus* red pigment. *Food and Fermentation Industries*, v. 43, n.2, p. 90-94, 2017.
- JIN, B., WANG, N., ZHANG, M., ZHAO, Q., WANG, Y., ZANG, J. The stability comparison of Antarctic red pigment and cochineal pigment. *Food and Fermentation Industries*, v. 40, n. 2, p. 164–169, 2014.
- JIN, H. J., ZHANG, X., CAO, H., NIU, Y. J., LI, C., LIU, H. Chemical composition, security and bioactivity of the red pigment from *Penicillium purpurogenum* Li-3. *Chem.*

Biodivers., v. 15, 2018.

KALRA, R., CONLAN, X. A., GOEL, M. Fungi as a Potential Source of Pigments: Harnessing Filamentous Fungi. *Frontiers in Chemistry*, v. 8, 2020.

KANE, P. M. Proton Transport and pH Control in Fungi. *Adv Exp Med Biol.*, v. 892, p. 33-68, 2016.

KEEKAN, K.K., HALLUR, S., MODI, P.K. et al. Antioxidant Activity and Role of Culture Condition in the Optimization of Red Pigment Production by *Talaromyces purpureogenus* KKP Through Response Surface Methodology. *Curr Microbiol*, v. 77, p. 1780–1789, 2020.

KHAN, N., AFROZ, F., BEGUM, M. N., ROY, S. R., SHARMIN, S., MONI, F., MAHMOOD, C. H., SHAHA, K, SOHRAB, M. H. Endophytic *Fusarium solani*: A rich source of cytotoxic and antimicrobial naphthaquinone and aza-anthraquinone derivatives. *Toxicol. Repts.*, v. 5, p. 970–976, 2018a.

KHAN, S.; MALIK, A. Toxicity evaluation of textile effluents and role of native soil bacterium in biodegradation of a textile dye. *Environmental Science and Pollution Research - International*, v. 25, n. 5, p. 4446-4458, 2018.

KHAN, A. A., ALSHABI, A. M., ALQAHTANI, Y. S., ALQAHTANI, A. M., BENNUR, R. S., SHAIKH, I. A., ... MAQBUL, M. S. Extraction and identification of fungal pigment from *Penicillium europium* using different spectral studies. *Journal of King Saud University - Science*, v. 33, n. 4, 2021.

KHANKHET, J., VANDERWOLF, K. J., MCALPINE, D. F., MCBURNEY, S., OVERY, D. P., SLAVIC, D., XU, J. Clonal Expansion of the *Pseudogymnoascus destructans* Genotype in North America Is Accompanied by Significant Variation in Phenotypic Expression. *PLoS ONE*, v. 9, n. 8, 2014.

KHATIB, M.A.; HARIR, M.; COSTA, J.; BARATTO, M.C.; SCHIAVO, I.; TRABALZINI, L. Spectroscopic Characterization of Natural Melanin from a *Streptomyces cyaneofuscatus* Strain and Comparison with Melanin Enzymatically Synthesized by Tyrosinase and Laccase. *Molecules*, v. 23, p. 1916, 2018.

KIMURA, T., FUKUDA, W., SANADA, T., IMANAKA, T. Characterization of water-soluble dark-brown pigment from Antarctic bacterium, *Lysobacter oligotrophicus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 120, n. 1, p. 58–61, 2015.

KISCHKELL, B. et al. Produção de pigmentos extracelulares por espécies de *Fusarium* e *Aspergillus*. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 16, n.4, p. 115-119, out./dez. 2018.

KRISHNAMURTHY, S., NARASIMHA MURTHY, K., THIRUMALE, S. Characterization of ankaflavin from *Penicillium aculeatum* and its cytotoxic properties. *Natural Product Research*, 1–6, 2018.

- KUMAR, C. G., MONGOLLA P., POMBALA, S., KAMLE, A., JOSEPH, J. Physicochemical characterization and antioxidant activity of melanin from a novel strain of *Aspergillus bridgeri* ICTF-201. *Lett Appl Microbiol.* v. 53, n.3, p 350-8, 2011.
- KUMAR, A.; PRAJAPATI, S.; NIKHIL, N. S.; NEOGI, T. G. *Industrially Important Pigments from Different Groups of Fungi*. Industrially Important Pigments from Different Groups of Fungi. In: YADAV, A., SINGH, S., MISHRA, S., GUPTA, A. (eds). Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi. Fungal Biology. Springer, Cham., p. 285–301, 2019
- KUNDU, A., SAHA, S., WALIA, S., DUTTA, T. K. Anti-nemic secondary metabolites produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *J. Asia Pac. Entomol.*, v. 19, n. 3, p. 631–636, 2016.
- KURIAN, N. K.; BHAT, S. G. Photoprotection and Anti-Inflammatory Properties of Non-Cytotoxic Melanin from Marine Isolate *Providencia rettgeri* Strain BTKKS1. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, v. 14, n.4, p. 1475-1484, dec. 2017.
- LA FUENTE, R., SONAWANE, N. D., ARUMAINAYAGAM, D., VERKMAN, A. S. Small molecules with antimicrobial activity against *E. coli* and *P. aeruginosa* identified by high-throughput screening. *British Journal of Pharmacology*, v. 149, n. 5, p. 551–559, 2006.
- LAGASHETTI, A. C.; DUFOSSÉ, L; SINGH, S.K.; SINGH, P.N. Fungal Pigments and Their Prospects in Different Industries. *Microorganisms*, v. 7, n. 12, p. 604, 2019.
- LAGASHETTI, A.C.; SINGH, S.K.; DUFOSSÉ, L.; SRIVASTAVA, P.; SINGH, P.N. Antioxidant, Antibacterial and Dyeing Potential of Crude Pigment Extract of *Gonatophragmium triuniae* and Its Chemical Characterization. *Molecules*, v. 27, n. 2, 2022.
- LEBEAU, J., PETIT, T., CLERC, P., DUFOSSÉ, L., CARO Y. Isolation of two novel purple naphthoquinone pigments concomitant with the bioactive red bikaverin and derivatives thereof produced by *Fusarium oxysporum*. *Biotechnol. Prog.*, v. 35, n. 1, 2018.
- LEE, J. H., HYUN, C. K. Insulin-Sensitizing and Beneficial Lipid-Metabolic Effects of the Water-Soluble Melanin Complex Extracted from *Inonotus obliquus*. *Phytotherapy Research*, v. 28, n. 9, p. 1320–1328, 2014.
- LEE, S.S.; LEE, J.H.; LEE, I. Strain improvement by overexpression of the *laeA* gene in *Monascus pilosus* for the production of monascus-fermented rice. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 23, p. 959–965, 2013
- LELLIS, B.; FÁVARO-POLONIO, C. Z.; PAMPHILE, J. A.; POLONIO, J. C.; Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. *Biotechnology Research and Innovation*, v. 3, n. 2, 2019.
- LEUSHKIN, E.V., LOGACHEVA, M.D., PENIN, A.A. et al. Comparative genome analysis of *Pseudogymnoascus* spp. reveals primarily clonal evolution with small genome fragments exchanged between lineages. *BMC Genomics*, v. 16, p. 400, 2015.

- LI, C.; JI, C.; TANG, B. Purification, characterization and biological activity of melanin from *Streptomyces* sp. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 365, n. 19, 2018.
- LIN, C. P., LIN, Y. L., HUANG, P. H., TSAI, H. S., CHEN, Y. H. Inhibition of endothelial adhesion molecule expression by *Monascus purpureus*-fermented rice metabolites, monacolins K, ankaflavin, and monascin. *J Sci Food Agri*, v. 91, n. 10, p. 1751–1758, 2011.
- LIN, Y. R., LO, C. T., LIU, S.-Y., PENG, K. C. Involvement of Pachybasin and Emodin in Self-Regulation of *Trichoderma harzianum* Mycoparasitic Coiling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, n. 9, p. 2123–2128, 2012.
- LIU, Q.; XIAO, J.; LIU, B.; ZHUANG, Y.; SUN, L. Study on the Preparation and Chemical Structure Characterization of Melanin from *Boletus griseus*. *International Journal of Molecular Science*, v. 19, n. 12, p. 3736, 2018.
- LIU, Y et al. Microbial dyes: dyeing of poplar veneer with melanin secreted by *Lasioidiplodia theobromae* isolated from wood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, n. 1, april 2020.
- LLANTEN, D. N.; AMENABAR, M. J.; BLAMEY, J. M. Antioxidant Capacity of Novel Pigments from an Antarctic Bacterium. *The Journal of Microbiology*, v. 50, p. 374–379, 2012.
- LOPES, F. C. *Produção e análise de metabólitos secundários de fungos filamentosos*. *Dissertação* (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.
- LONDOÑE-BAILON, P., SÁNCHEZ-ROBINET, C., ALVAREZ-GUZMAN, G. In vitro antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of methanol-acetone extracts from Antarctic lichens (*Usnea antarctica* and *Usnea aurantiaco-atra*), *Polar Science*, v. 22, 2019.
- LORCH, J. M., LINDNER, D. L., GARGAS, A., MULLER, L. K., MINNIS, A. M., BLEHER, D. S. A culture-based survey of fungi in soil from bat hibernacula in the eastern United States and its implications for detection of *Geomyces destructans*, the causal agent of bat white-nose syndrome. *Mycologia*, v. 105, n. 2, 2013.
- MAGGI, O., TOSI, S., ANGELOVA, M., LAGOSTINA, E., FABBRI, A. A., PECORARO, L., ... BUZZINI, P. Adaptation of fungi, including yeasts, to cold environments. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*, v. 147, n. 1, p. 247–258, 2013.
- MAPARI, S. A.; MEYER, A. S.; THRANE, U.; FRISVAD, J. C. Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale. *Microbial Cell Factories*, v. 8(1), p. 24, 2009.
- MAPARI, S. A. S.; THRANE, U.; MEYER, A. S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants. *Trends Biotechnol*, v. 28, p. 300–307, 2010.

- MANIKPRABHU, D.; LINGAPPA, K. Actinorhodin a natural and attorneysource for synthetic dye to detect acid production of fungi. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 20, p. 163–168, 2013.
- MASCARENHAS, J. M. O. *Corantes em alimentos: perspectivas, usos e restrições*. Tese (Mestrado). 158 p. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 1998.
- MAVRODI, D. V., PEEVER, T. L., MAVRODI, O. V., PAREJKO, J. A., et al. Diversity and Evolution of the Phenazine Biosynthesis Pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 3, p. 866–879, 2010.
- MEINICKE, R. M., VENDRUSCOLO, F., MORITZ, D. E., de OLIVEIRA, D., et al. Potential use of glycerol as substrate for the production of red pigments by *Monascus ruber* in submerged fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 1, n. 3, p. 238–242, 2012.
- MÉNDEZ, A., PÉREZ, C. et al. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)*, v. 12, n. 12, 961-968, 2011.
- MENEZES, G. C. A.; GODINHO, V. M.; PORTO, B. A.; GONÇALVES, V. N.; ROSA, L. H. *Antarctomyces pellizariae* sp. nov., a new, endemic, blue, snow resident psychrophilic ascomycete fungus from Antarctica. *Extremophiles*, v. 21, p. 259-269, 2017.
- MÉRILLON, J. M., RAMAWAT, K. G. (eds.) *Co-Evolution of Secondary Metabolites*. Springer Nature, Switzerland, pp 1–37, 2018.
- MINNIS, A. M., LINDNER, D. L. Phylogenetic evaluation of *Geomyces* and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. nov., in bat hibernacula of eastern North America. *Fungal Biol.*, v. 117, p. 638–649, 2013.
- MICILLO, R.; PANZELLA, L.; KOIKE, K.; MONFRECOLA, G.; NAPOLITANO, A.; D'ISCHIA, M. “Fifty Shades” of Black and Red or How Carboxyl Groups Fine Tune Eumelanin and Pheomelanin Properties. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 17, 746, 2016.
- MOJIB, N.; PHILPOTT, R.; HUANG, J. P.; NIEDERWEIS, M.; BEJ, A. K. Antimycobacterial activity in vitro of pigments isolated from Antarctic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoekv.*, v. 98, p. 531, 2010.
- MORALES-OYERVIDES, L., RUIZ-SÁNCHEZ, J. P., OLIVEIRA, J. C., et al. Biotechnological approaches for the production of natural colorants by *Talaromyces/Penicillium*: A review. *Biotechnology Advances*, 2020.
- MUKHERJEE, G., MISHRA, T., DESHMUKH, S. K. Fungal Pigments: An Overview. *Developments in Fungal Biology and Applied Mycology*, p. 25–541, 2017.
- MUKHERJEE, G., SINGH, S. K. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 188–192, 2011.

- NAGIA, F. A., EL-MOHAMEDY, R. S. R. Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from *Fusarium oxysporum*. *Dyes and Pigments*, v. 75, n. 3, p. 550–555, 2007.
- NAMBELA, L., HAULE, L. V., MGANI, Q. A review on source, chemistry, green synthesis and application of textile colorants. *Journal of Cleaner Production*, v. 246, 2020.
- NIRMALADEVI, D., VENKATARAMANA, M., CHANDRANAYAKA, S. et al. Neuroprotective Effects of Bikaverin on H₂O₂-Induced Oxidative Stress Mediated Neuronal Damage in SH-SY5Y Cell Line. *Cell Mol. Neurobiology*, v. 34, p. 973–985, 2014.
- OBEID, M. T., HUSSAIN, W. A., RADHI, W. A., JABIR, A. A., ABD-ALAMMAM, D. A. Linear optical properties of pheomelanine pigment extraction from red wool. *JZS*, v. 17, n. 1, 2015.
- O'BRIEN, J., WRIGHT, G. D. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 22, n. 4, p. 552–558, 2011.
- OGAKI, M.B., COELHO, L.C., VIEIRA, R. et al. Cultivable fungi present in deep-sea sediments of Antarctica: taxonomy, diversity, and bioprospecting of bioactive compounds. *Extremophiles*, v. 24, p. 227–238, 2020.
- OGBONNA, C. N. Production of food colourants by filamentous fungi. *African Journal of Microbiology Research*, v. 10, n. 26, p. 960–971, 2016.
- OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. *Rev. bras. plantas med.*, v. 17, n. 1, jan-mar, 2015.
- OLIVEIRA, F. PEDROLI, D. B., TEIXEIRA, M. F. S., SANTOS-EBINUMA, V. C. Water-soluble fluorescent red colorant production by *Talaromyces amestolkiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 103, p. 6529-6541, jun. 2019.
- ONOFRI, S.; SELBMANN, L.; PACELLI, C.; DE VERA, J.P.; HORNECK, G.; HALLSWORTH, J.E.; ZUCCONI, L. Integrity of the DNA and Cellular Ultrastructure of Cryptoendolithic Fungi in Space or Mars Conditions: A 1.5-Year Study at the International Space Station. *Life*, v. 8, n. 23, 2018.
- ORLANDI, V. T., MARTEGANI, E., GIARONI, C., BAJ, A., BOLOGNESE, F. Bacterial pigments: A colorful palette reservoir for biotechnological applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2021.
- PACELLI, C.; BRYAN, R. A.; ONOFRI, S. et al. Melanin is effective in protecting fast and slow growing fungi from various types of ionizing radiation. *Environmental Microbiology*, v. 19, p. 1612–1624, 2017.
- PACELLI, C.; BRYAN, R. A.; ONOFRI, S.; SELBMANN, L., et al. Survival and redox activity of *Friedmanniomyces endolithicus*, an Antarctic endemic black meristematic fungus, after gamma rays exposure. *Fungal Biology*, v. 122, p. 1222-1227, 2018.

- PACELLI, C.; CASSARO, A.; MATURILLI, A. et al. Multidisciplinary characterization of melanin pigments from the black fungus *Cryomyces antarcticus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 104, p. 6385–6395, 2020.
- PAL, A. K., GAJJAR, D. U., VASAVADA, A. R. DOPA and DHN pathway orchestrate melanin synthesis in *Aspergillus* species. *Medical Mycology*, 2013.
- PALMER, J.M., DREES, K.P., FOSTER, J.T. et al. Extreme sensitivity to ultraviolet light in the fungal pathogen causing white-nose syndrome of bats. *Nat Commun*, v. 9, n. 35, 2018.
- PANDIT, S. G., PUTTANANJAIH, M. H., HAROHALLY, N. V., DHALE, M. A. Functional attributes of a new molecule-2-hydroxymethyl-benzoic acid 2'-hydroxy-tetradecyl ester isolated from *Talaromyces purpureogenus* CFRM02. *Food Chemistry*, v. 255, p. 89–96, 2018.
- PANESAR, R.; SHUBHNEET, K.; PANESAR, P. S. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. *Current Opinion in Food Science*, v. 1, p. 70-76, 2015.
- PEREZ-CUESTA, U., APARICIO-FERNANDEZ, L., GURUCEAGA, X. et al. Melanin and pyomelanin in *Aspergillus fumigatus*: from its genetics to host interaction. *Int Microbiol.*, v 23, p 55–63, 2020.
- PIKUTA, E. V.; HOOVER, R. B.; TANG, J. Microbial Extremophiles at the Limits of Life. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 33, p. 183-209, 2007.
- POORNIAMMAL, R.; PARTHIBAN, M.; GUNASEKARAN, S.; MURUGESAN, R.; THILAGAVATHI, G. Natural dye production from *Thermomyces* sp fungi for textile application. *Indian J. Fibre Text. Res.*, p. 276–279, 2013.
- PRALEA, I. C.; MOLDOVAN, R. C.; PETRACHE, A. M.; ILIEȘ, M.; HEGHEȘ, S. C.; IELCIU, I.; NICOARĂ, R. From Extraction to Advanced Analytical Methods: The Challenges of Melanin Analysis *Int. J. Mol. Sci.*, v. 20, p. 3943, 2019.
- PUKALSKI, J., MARCOL, N., WOLAN, N., PŁONKA, P. M., RYSZKA, P., KOWALSKI, T., LATOWSKI, D. Detection of a pheomelanin-like pigment by EPR spectroscopy in the mycelium of *Plenodomus biglobosus*. *Acta Biochim Pol.*, v. 67, n.3, p. 295-301, 2020.
- PURIC, J., VIEIRA, G., CAVALCA, L. B., SETTE, L. D., FERREIRA, H., VIEIRA, M. L. C., SASS, D. C. Activity of Antarctic fungi extracts against phytopathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, v. 66, n. 6, p. 530–536, 2018.
- RAILLO, A. Beitrage zur Kenntniss der Boden-Pilze. Centralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. *Zweite Abtheilung*, v. 78: 515e524., 1929.

- RAO, M. P. N.; XIAO, M.; LI, W. Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications. *Frontiers in Microbiology*. v.8, p. 1113, 2017.
- ROBICHEAU, B., ADAMS, S., PROVENCHER, J., ROBERTSON, G., MALLORY, M., WALKER, A., et al. Diversity and keratin degrading ability of fungi isolated from Canadian Arctic marine bird feathers. *Arctic*, v. 72, 3p. 47–359, 2019.
- ROBINSON, S. C, TUDOR, D., COOPER, P. A. Utilizing pigment-producing fungi to add commercial value to American beech (*Fagus grandifolia*). *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 93, n. 3, p. 1041-8, 2012.
- ROSA, L. H. (Ed). Fungi of Antarctica - Diversity, Ecology and Biotechnological Applications. Springer Nature: Switzerland, 2019.
- ROSA, L. H., PINTO, O. H. B., ŠANTL-TEMKIV, T. et al. DNA metabarcoding of fungal diversity in air and snow of Livingston Island, South Shetland Islands, Antarctica. *Sci Rep*, v. 10, 2020.
- RUFINO, M. S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., MORAIS, S. M. et al. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. Comunicado técnico online - EMBRAPA, 2007.
- SAINI, A. S; MELO, J. S. One-pot green synthesis of eumelanin: process optimization and its characterization. *RSC Adv.*, v. 5, p. 47671–47680, 2015.
- SÁNCHEZ-MUÑOZ, S., MARIANO-SILVA, G., LEITE, M. O., MURA, F. B., VERMA, M. L., SILVA, S. S., CHANDEL, A. K. *Chapter 11 - Production of fungal and bacterial pigments and their applications*. Em: VERMA, M. L., CHANDEL, A. K (eds). *Biotechnological Production of Bioactive Compounds*, Elsevier, p. 327-361, 2020.
- SANTIAGO, I. F., SOARES, M. A., ROSA, C. A. et al. Lichensphere: a protected natural microhabitat of the non-lichenised fungal communities living in extreme environments of Antarctica. *Extremophiles*, v. 19, p. 1087–1097, 2015.
- SARAVANAN, A.; JAYASREE, R.; KUMAR, et al. Production of pigment using *Aspergillus tamarii*: New potentials for synthesizing natural metabolites. *Environmental Technology & Innovation*, v. 19, 2020.
- SELVAKUMAR, R. S., PERIASAMY, K., RAAMAN, N. Isolation and characterization of melanin pigment from *Pleurotus cystidios* (telomorph of *Antromyces macrocapa*). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 24, p. 2125-2131, 2008.
- SHAH, A., RATHER, M. A., HASSAN, Q. P., AGA, M. A., MUSHTAQ, S., SHAH, A. M., HUSSAIN, A., BABA, S. A., AHMAD, Z. Discovery of anti-microbial and anti-tubercular molecules from *Fusarium solani*: an endophyte of *Glycyrrhiza glabra* . *J. Appl. Microbiol.*, v. 122, n. 5, p. 1168–1176, 2017.

SHAH, S.G., SHIER, W.T., JAMALUDDIN, TAHIR, N., HAMEED, A., AHMAD, S., ALI, N. *Penicillium verruculosum* SG: a source of polyketide and bioactive compounds with varying cytotoxic activities against normal and cancer lines. *Arch. Microbiol.* 196, 267–278, 2014.

SILBIR, S., GOKSUNGUR, Y. Natural Red Pigment Production by *Monascus Purpureus* in Submerged Fermentation Systems Using a Food Industry Waste: Brewer's Spent Grain. *Foods*, v. 8, n. 5, p. 161, 2019.

SILVA, I. C.; REGASINI, L. O.; PETRÔNIO, M. S.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; BELASQUE JR, J.; SACRAMENTO, L. V. S.; FERREIRA, H. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Journal of Bacteriology*, v. 195, n. 1, p. 85-94, 2013.

SIMON, J. D.; PELES, D. N. The Red and the Black. *Accounts of Chemical Research*, v. 43, n. 11, p. 1452–1460, 2010.

SINGH, S. M.; SINGH, P. N; et al. Pigment, fatty acid and extracellular enzyme analysis of a fungal strain *Thelebolus microsporus* from Larsemann Hills, Antarctica. *Polar Record*, v. 50, p 31-35, 2014.

SINGH, S., NIMSE, S. B., MATHEW, D. E., DHIMMAR, A., SAHASTRABUDHE, H., et al. Microbial melanin: Recent advances in biosynthesis, extraction, characterization, and applications. *Biotechnology Advances*, 2021.

SOLANO, F. Melanins: Skin Pigments and Much More—Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes. *New Journal of Science*, v. 2014, 2014.

SOUMYA, K.; NARASIMHA, K. M., SREELATHA, G. L.; TIRUMALE, S. (2018). Characterization of a red pigment from *Fusarium chlamydosporum* exhibiting selective cytotoxicity against human breast cancer MCF-7 cell lines. *Journal of Applied Microbiology*, v. 125, n. 1, p. 148–158, 2018.

STEPIEN, Ł., LALAK-KANCZUGOWSKA, J., WITASZAK, N., URBANIAK, M. *Fusarium* Secondary Metabolism Biosynthetic Pathways: So Close but So Far Away. Em:

STUDT, L., TRONCOSO, C., GONG, F., HEDDEN, P., TOOMAJIAN, C., LESLIE, J. F., HUMPF, H. U., ROJA, M. C., TUDZYNSKI, B. Segregation of secondary metabolite biosynthesis in hybrids of *Fusarium fujikuroi* and *Fusarium proliferatum*. *Fungal Genet. Biol.*, v. 49, n. 7, p. 567–577, 2012.

SURENDIRAKUMAR, K., PANDEY, R. R., MUTHUKUMAR, T. et al. Characterization and biological activities of melanin pigment from root endophytic fungus, *Phoma* sp. RDSE17. *Arch Microbiol*, v. 204, 171, 2022.

SUWANNARACH, N., KUMLA, J., NISHIZAKI, Y. et al. Optimization and characterization of red pigment production from an endophytic fungus, *Nigrospora*

aurantiaca CMU-ZY2045, and its potential source of natural dye for use in textile dyeing. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 103, p. 6973–6987, 2019.

TAJUDDIN, N., RIZMAN-IDID, M., CONVEY, P., ALIAS, S. A. Thermal adaptation in a marine-derived tropical strain of *Fusarium equiseti* and polar strains of *Pseudogymnoascus* spp. under different nutrient sources. *Botanica Marina*, v. 61, n. 1, p. 9–20, 2018.

TAN, H., XING, Z., CHEN, G., TIAN, X., WU, Z. Evaluating Antitumor and Antioxidant Activities of Yellow *Monascus* Pigments from *Monascus ruber* Fermentation. *Molecules*, v. 23, n. 12, p. 3242, 2018.

TAVARES, D. G., BARBOSA, B. V. L., FERREIRA, R. L., DUARTE, W. F., CARDOSO, P. G. Antioxidant activity and phenolic compounds of the extract from pigment producing fungi isolated from Brazilian caves. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 16, p. 148-154, 2018.

TEIXEIRA, M. F. S., MARTINS, M. S., SILVA, J. C. D., KIRSCH, L. S., et al. Amazonian biodiversity: pigments from *Aspergillus* and *Penicillium* - characterizations, antibacterial activities and their toxicities. *Curr Trends Biotechnol Pharm*, v. 6, p. 300–311, 2012.

TIAN, Y.; LI, Y. L; ZHAO, F.C. Secondary Metabolites from Polar Organisms. *Marine Drugs*, v. 15, p. 28, 2017.

TOLBORG, G., ISBRANDT, T., LARSEN, T. O., WORKMAN, M. *Establishing novel cell factories producing natural pigments in Europe*. Em: SINGH, O. V. *Bio-pigmentation and biotechnological implementations*. John Wiley & Sons, 2017.

TOSI, S.; CASADO, B.; GERDOL, R. Fungi isolated from Antarctic mosses. *Polar Biol*, v. 25, p. 262–268, 2002.

TOSI, S., KOSTADINOVA, N., KRUMOVA, E. et al. Antioxidant enzyme activity of filamentous fungi isolated from Livingston Island, Maritime Antarctica. *Polar Biol*, v. 33, p. 1227–1237, 2010.

TRAN-LY, A. N., REYES, C., SCHWARZE, F., RIBERA, J. Microbial production of melanin and its various applications. *World journal of microbiology & biotechnology*, v. 36, n. 11, p. 170, 2020.

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

TURICK C. E., KNOX A. S., BECNEL J. M., EKECHUKWU A. A., MILLIKEN C. E. Properties and function of pyomelanin. *Biopolymers*, p. 449–472, 2010.

TURNER, J. M., MESSENGER, A. J. Occurrence, Biochemistry and Physiology of Phenazine Pigment Production. *Advances in Microbial Physiology*, v. 27, p. 211–275, 1986.

- VASANTHAKUMAR, A., DE ARAUJO, A., SCHILLING, M., MAZUREK, J., MITCHELL, R. Pyomelanin production in *Penicillium chrysogenum* is stimulated by l-tyrosine. *Microbiology*, v. 161, n.6, p. 1211–1218, 2015.
- VELMURUGAN, P., KAMALA-KANNAN, S., BALACHANDAR, V., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P., CHAE, J. C., OH, B. T. Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. *Carbohydrate Polymers*, v. 79, n. 2, p. 262–268, 2010.
- VENDRUSCOLO, F., BÜHLER, R.M.M., DE CARVALHO, J.C. et al. *Monascus*: a Reality on the Production and Application of Microbial Pigments. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 178, p. 211–223, 2016.
- VENDRUSCOLO, F., MÜLLER, B. L., MORITZ, D. E., de OLIVEIRA, D., SCHMIDELL, W., NINOW, J. L. Thermal stability of natural pigments produced by *Monascus ruber* in submerged fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 2, n.3, p. 278–284, 2013.
- VENDRUSCOLO, F., TOSIN, I., GIACHINI, A. J., SCHMIDELL, W., NINOW, J. L. Antimicrobial activity of *Monascus* pigments produced in submerged fermentation. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 38, n. 4, p. 1860–1865, 2014.
- VENIL, C.K.; VELMURUGAN, P.; DUFOSSÉ, L.; RENUKA DEVI, P.; VEERA RAVI, A. Fungal Pigments: Potential Coloring Compounds for Wide Ranging Applications in Textile Dyeing. *J. Fungi*, v. 6, n. 68, 2020.
- VENKATACHALAM, M., MAGALON, H., DUFOSSÉ, L., FOUILLAUD, M. Production of pigments from the tropical marine-derived fungi *Talaromyces albobiverticillius*: new resources for natural red-colored metabolites. *J. Food Compos. Anal.*, v. 70, p. 35–48, 2018.
- VIEIRA, G., PURIĆ, J., MORÃO, L. G., DOS SANTOS, J. A., INFORSATO, F. J., SETTE, L. D., ... SASS, D. C. Terrestrial and marine Antarctic fungi extracts active against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 67, n. 1, p. 64–71, 2018.
- VIGGIANO, A., SALO, O., ALI, H., SZYMANSKI, W., LANKHORST, P. P., NYGÅRD, Y., ... DRIESSEN, A. J. M. Pathway for the Biosynthesis of the Pigment Chrysogine by *Penicillium chrysogenum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 84, n. 4, 2017.
- VILLANUEVA, P., VÁSQUEZ, G., GIL-DURÁN, C., OLIVA, V., DÍAZ A., et al. Description of the First Four Species of the Genus *Pseudogymnoascus* From Antarctica. *Front. Microbiol.*, v. 12, nov. 2021.
- VINCENT, W. F., Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. *Antarctic Science*, v. 12, n. 3, p. 374-385, 2000.
- WANG, C.; CHEN, D.; QI, J. *Biochemistry and Molecular Mechanisms of Monascus Pigments*. In: SINGH, O. V (Org). *Bio-Pigmentation and Biotechnological Implementations*, p. 173–191, 2017.

WANG, F.; XU, B.; SUN, Y.; ZANG, J.; LI, X.; WANG, N. Identification of an Antarctic fungus and property analysis of its secretory pigment. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, v. 13, p. 189-195, 2013.

WANG, J. F., LIU, X. J., LIU, R. S., LI, H. M., TANG, Y. J. Optimization of the mated fermentation process for the production of lycopene by *Blakeslea trispora* NRRL 2895 (+) and NRRL 2896 (-). *Bioprocess Biosyst Eng.*, v. 35, n. 4, p. 553-64, 2012.

WANG, N., ZHAO, Q., ZHANG, P. Antarctic fungus coloring compound. Patent. People's Republic of China: CN 104804007 A, 2015.07.29. 2015.

WOO, P. C. Y., LAM, C.-W., TAM, E. W. T., LEE, K.-C., YUNG, K. K. Y., LEUNG, C. K. F., ... YUEN, K.Y. The biosynthetic pathway for a thousand-year-old natural food colorant and citrinin in *Penicillium marneffeii*. *Scientific Reports*, v. 4, n.1, 2014.

WENTZEL, L.C.P., INFORSATO, F.J., MONTOYA, Q.V. et al. Fungi from Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) Soils and Marine Sediments. *Microb Ecol.*, v. 77, p. 12–24, 2019.

WESTPHAL, K.R.; WOLLENBERG, R.D.; HERBST, F.A.; SØRENSEN, J.L.; SONDERGAARD, T.E.; WIMMER, R. Enhancing the production of the fungal pigment aurofusarin in *Fusarium graminearum*. *Toxins*, v. 10, 485, 2018.

WU, Z., Zhang, M., Yang, H., Zhou, H., Yang H. Production, physico-chemical characterization and antioxidant activity of natural melanin from submerged cultures of the mushroom *Auricularia auricula*. *Food Bioscience*, v. 26, p. 49-56, 2018.

YAN, B. Yellow pigment of *Metarhizium anisopliae* and its application to the dyeing of fabrics. *Color Technology*, 2019.

YE, M.; CHEN, X.; LI, G. W.; GUO, G. Y.; YANG, L. Structural Characteristics of Pheomelanin-Like Pigment from *Lachnum singerianum*. *Advanced Materials Research*, v. 284-286, p. 1742–1745, 2011.

YE, M.; GUO, G.; LU, Y.; SONG, S.; WANG, H.; YANG, L. Purification, structure and anti-radiation activity of melanin from *Lachnum YM404*. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 63, p. 170–176, 2014.

YE, Z.; LU, Y.; ZONG, S.; YANG, L.; SHAIKH, F.; LI, J.; YE, M. Structure, molecular modification and anti-tumor activity of melanin from *Lachnum singerianum*. *Process Biochemistry*, v. 76, p 203-212, 2019.

YILMAZ, N., HOUBRAKEN, J., HOEKSTRA, E.S.S., FRISVAD, J.C.C., VISAGIE, C.M.M., SAMSON, R.A.A. Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species. *Persoonia - Mol. Phylogeny Evol. Fungi*, v. 29, p. 39–54, 2012.

YOUNGCHIM, S.; MORRIS-JONES, R.; HAY, R. J.; HAMILTON, A. J. Production of melanin by *Aspergillus fumigatus*. *J. Med. Microbiol.*, v. 53, p. 175–181, 2004.

YUSUF, M.; SHABBIR, M.; MOHAMMAD. Natural Colorants: Historical, Processing and Sustainable Prospects. *Natural products and bioprospecting*, v.7, n. 1, p. 123–145, 2017.

ZABALA, A. O., XU, W., CHOOI, Y.H., TANG, Y. Characterization of a Silent Azaphilone Gene Cluster from *Aspergillus niger* ATCC 1015 Reveals a Hydroxylation-Mediated Pyran-Ring Formation. *Chemistry & Biology*, v. 19, n. 8, p. 1049–1059, 2012.

ZACCARIM, B. R. et al. Sequencing and phylogenetic analyses of *Talaromyces amestolkiae* from Amazon: A producer of natural colorants. *Biotechnology Progress*, jul. 2019.

ZAHAN, K. A., ISMAIL, N. S., LEONG, C. R., RASHID, S. A., TONG, W. Y. Monascorubin production by *Penicillium minioluteum* ED24 in a solid-state fermentation using sesame seed cake as substrate. *Materials Today: Proceedings*, 2020.

ZANONI, M. V. B.; YAMANAKA, H. (Org). *Corantes: caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento*. 1 ed. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016.

ZERRAD A., ANISSI J., GHANAM J., SENDIDE K., EL HASSOUNI, M. Antioxidant and antimicrobial activities of melanin produced by a *Pseudomonas balearica* strain. *Journal of Biotechnology Letters*, v. 5, n. 1, 2014.

ZHAN, J., BURNS, A. M.; LIU, M. X.; FAETH, S. H.; GUNATILAKA, A. A. Search for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. *J Nat Prod*, v. 70, p. 227–232, 2007.

ZHANG, Z. Y., SHAO, Q. Y., LI, X., CHEN, W. H., LIANG J. D, HAN, Y. F., et al. Culturable fungi from urban soils in China I: description of 10 new taxa. *Microbiol. Spectr.*, 2021.

ZHANG, Y., WU, X., HUANG, C., ZHANG, Z., GAO, W. Isolation and identification of pigments from oyster mushrooms with black, yellow and pink caps. *Food Chemistry*, v. 375, mar. 2022.

ZONG, S., LI, L., LI, J. et al. Structure Characterization and Lead Detoxification Effect of Carboxymethylated Melanin Derived from *Lachnum* Sp.. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 182, p. 669–686, 2017.

ZOU, Y., HU, W., MA, K., TIAN, M. Physicochemical properties and antioxidant activities of melanin and fractions from *Auricularia auricula* fruiting bodies. *Food Science and Biotechnology*, v. 24, n. 1, p. 15–21, 2015a.

ZOU, Y.; ZHAO, Y.; HU, W. Chemical composition and radical scavenging activity of melanin from *Auricularia auricula* fruiting bodies. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 35, n. 2, p. 253-258, 2015b.