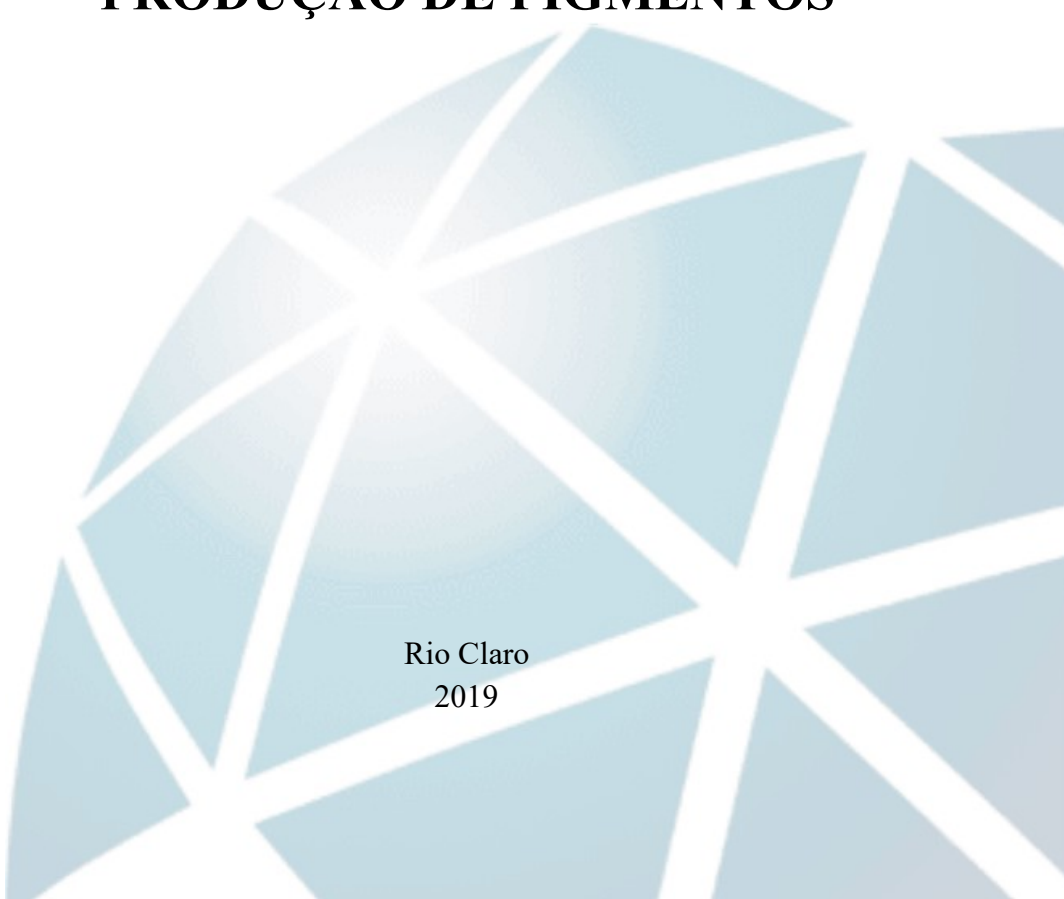

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ISABELA FERNANDA DA SILVA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS DA
ANTÁRTICA COM POTENCIAL PARA A
PRODUÇÃO DE PIGMENTOS**



Rio Claro
2019

ISABELA FERNANDA DA SILVA

BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS DA ANTÁRTICA COM POTENCIAL
PARA A PRODUÇÃO DE PIGMENTOS

Orientadora: Prof^a Dr^a Daiane Cristina Sass

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio
Claro, para obtenção do grau de Bacharela e
Licenciada em Ciências Biológicas.

Rio Claro
2019

S586b Silva, Isabela Fernanda da
Bioprospecção de fungos da Antártica com potencial
para a produção de pigmentos / Isabela Fernanda da Silva.
-- Rio Claro, 2019
30 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (-) - Universidade
Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio
Claro
Orientadora: Daiane Cristina Sass

1. Biotecnologia de fungos. 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.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à minha orientadora Prof^a Dr^a Daiane, por me dar a oportunidade de trabalhar em seu laboratório e de sempre estar de prontidão para me ajudar quando necessário, por ter sido compreensiva e contribuir para minha experiência profissional e pessoal na universidade. Agradecer a todo o pessoal do LaQBim, por serem sempre prestativos e manterem um ambiente agradável de trabalho, fazendo com que eu me sentisse à vontade desde o início e em especial à Gabrielle Vieira, que esteve me ensinando desde o começo e por ser minha mentora, ajudando-me em toda a trajetória, principalmente durante os perrengues, e por ser uma pessoa vital para o desenvolvimento do meu trabalho: Muito obrigada por tudo!

Agradeço, é claro, à minha família, meus irmãos Bruno e Carol e, principalmente, aos meus pais, Sonia e Ari, por terem me apoiado na decisão de cursar uma universidade pública em outra cidade e por ter me dado o suporte financeiro e emocional durante todos esses anos, sem os quais eu nunca teria conseguido.

Agradeço à minhas amigas Giselle, Jessica, Juliana e Tamiris, por todos os momentos que vivemos juntas, todos os surtos, os apoios, as risadas, por terem deixado uma marca em minha vida e contribuído tanto para que eu crescesse como pessoa. Ao Coral Uirapuru, por serem pessoas incríveis que sempre me deram um boost de energia nesses dois últimos anos, e também a todos que contribuíram nos meus cinco anos de faculdade, seja direta ou indiretamente, não podendo faltar um agradecimento às Borgias, amigas tão importantes para mim.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. OBJETIVO GERAL.....	10
2.1. Objetivos Específicos.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. Fungos Antárticos.....	10
3.2. Triagem dos fungos produtores de pigmentos.....	11
3.3. Extração dos pigmentos.....	11
3.4. Fracionamentos dos extratos.....	11
3.4.1. Extrato 2MA.....	11
3.4.1.1. Fracionamento em coluna de fase reversa (C8).....	12
3.4.1.2. Fracionamento em coluna de sílica.....	12
3.4.2. Extrato 6DC415-I.....	12
3.4.2.1. Fracionamento em coluna de sílica.....	12
3.4.2.2. Purificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
4.1. Triagem dos fungos produtores de pigmentos.....	13
4.2. Extração de pigmentos.....	22
4.3. Fracionamento dos extratos.....	23
4.3.1. Extrato 2MA.....	23
4.3.1.1. Fracionamento em coluna de fase reversa (C8).....	25
4.3.1.2. Fracionamento em coluna de sílica.....	25
4.3.2. Extrato 6DC415-I.....	26
5. CONCLUSÃO.....	27
6. REFERÊNCIAS.....	28

RESUMO

A demanda por pigmentos naturais vem crescendo devido a efeitos nocivos de alguns corantes sintéticos. Os pigmentos bacterianos e fúngicos fornecem uma alternativa, prontamente disponível, como fonte de corantes naturais, possuindo vantagens como o crescimento rápido do micro-organismo, processamento fácil e independência de condições do tempo. 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. Recentemente, na literatura, vem sendo relatados vários estudos envolvendo a produção de pigmentos, como carotenoides, violaceína, flexirubin, entre outros, por micro-organismos provenientes da Antártica. Além disso, devido ao seu isolamento, as comunidades microbianas antárticas podem ser uma fonte rica de novos micro-organismos e/ou novos produtos naturais baseados em estruturas químicas únicas. Este trabalho visou realizar uma investigação de fungos da Antártica com potencial para produção de pigmentos e ampliar o conhecimento da diversidade fúngica e metabólica da comunidade microbiana da Antártica através da bioprospecção de 51 fungos isolados dessa região. Testou-se dois meios de cultivo, o BDA e Malte ágar 2%, e foi considerado resultados positivos aqueles que produzissem pigmentos no meio extracelular. Quatro isolados foram selecionados na produção de pigmentos: 2MA, 10.6MP, 6DC4-I e 6DC415-I, dos quais os dois últimos são do gênero *Pseudogymnoascus*. A extração do pigmento foi realizada com os solventes acetona e metanol e o pigmento rosa produzido pelo exemplar de 6DC415-I foi selecionado para a purificação, realizada através de CLAE-semi-preparativa com coluna C18 utilizando um gradiente de 20 a 95% de metanol como eluente. O composto purificado, responsável pela coloração rosa, foi enviado para análise de RMN ^1H e ^{13}C para identificação estrutural. Os resultados mostram o potencial de micro-organismos de regiões extremas como uma nova fonte de produtos naturais que poderão ser utilizados para produção de pigmentos naturais.

Palavras-chave: Pigmentos naturais, fungos antárticos, cromatografia.

1. INTRODUÇÃO

Os pigmentos são utilizados como agentes colorantes desde os tempos pré-históricos e em diversas localidades do globo (RAO et al., 2017). Registros arqueológicos trazem evidências do uso de pigmentos, bem como de “vestuários e utensílios coloridos” datados de 40.000 a 10.000 a.C (MASCARENHAS, 1998). Já se usavam corantes em produtos cosméticos desde 5.000 a.C e desde 3.000 a.C já se produzia no Egito corantes amarelos e vermelhos a partir de plantas da região, além de múmias enroladas em tecidos coloridos terem sido encontradas (MASCARENHAS, 1998, RAO et al., 2017). Registros datados de há mais de 5.000 anos retratam o uso de corantes naturais na China (RAO et al., 2017). Corantes eram utilizados em alimentos desde 1500 A.C, em cidades egípcias, onde extratos naturais 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 século 8 no Japão (RAO et al., 2017). Substâncias extraídas de cúrcuma, páprica e açafrão eram utilizadas para dar cor à comida, enquanto o Indigo da planta *Indigofera anil* e o púrpura de alguns tipos de caramujos eram utilizados na coloração de tecidos (MASCARENHAS, 1998).

Os corantes eram então derivados de produtos naturais, como “folhas, ramos, raízes, frutos ou flores de várias plantas e de substâncias extraídas de animais”, além de minerais (GUARATINI; ZANONI, 2000; MASCARENHAS, 1998), até o desenvolvimento da primeira cor sintética em 1856, por Sir William Henry Perkin, sendo esta a mauveína, também conhecida como anilina púrpura e malva, e este desenvolvimento iniciou uma revolução na história dos corantes sintéticos, que se propagaram rapidamente (DOWNHAM; COLLINS, 2000), especialmente devido a intensa inovação tecnológica ocorrida no século XX (GUARATINI; ZANONI, 2000). O Brasil sempre esteve relacionado com a produção de corantes, inclusive em seu nome, recebido em homenagem à árvore Pau-Brasil (*Cesalpinia echinata*), uma fonte de corante de cor avermelhada muito procurada pelos europeus, sendo a produção industrial de corantes sintéticos introduzida em nosso país após a Primeira Guerra Mundial (GUARATINI; ZANONI, 2000).

O mercado de cores sintéticas se fortaleceu devido às vantagens que estas apresentaram, como sua facilidade de produção, o baixo custo, por não ocasionarem sabores indesejáveis quando utilizados em alimentos, por possuírem propriedades colorantes superiores, misturarem-se com maior facilidade, ser necessário uma pequena quantia para colorir, entre outras razões (DOWNHAM; COLLINS, 2000). Assim, os corantes sintéticos

são amplamente utilizados em indústrias como as têxteis, farmacêuticas, alimentícias, de papel e de cosméticos (MANIKPRABHU; LINGAPPA, 2013). Entretanto, muitos corantes sintéticos que passaram a ser utilizados não haviam sido testados quanto à sua toxicidade ou outros efeitos negativos que poderiam causar, o que acabou levando à prejuízos à saúde e ao meio ambiente (RAO et al., 2017). Existem corantes sintéticos utilizados em alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos que, apesar de já terem sido aprovados pela Food and Drug Administration (FDA), foram depois descobertos como potenciais cancerígenos e foram retirados de uso, como, por exemplo, corantes de benzidina, causadores de câncer de intestino (RAO et al., 2017).

Corantes sintéticos costumam apresentar uma longa estabilidade fazendo com que persistam por muito tempo no ambiente e, dessa maneira, o descarte incorreto de efluentes industriais contendo corantes sintéticos causam prejuízos significativos ao meio ambiente (MANIKPRABHU; LINGAPPA, 2013; RAO et al., 2017), como, por exemplo, contaminação de mananciais de água, de solo e morte de organismos aquáticos. A título de exemplo, a indústria têxtil libera toneladas de corantes sintéticos no ambiente decorrente de suas etapas de produção (GUARATINI; ZANONI, 2000), sendo uma das maiores poluidoras. Por estas razões, há um aumento na demanda por pigmentos naturais em detrimento dos corantes sintéticos. (MANIKPRABHU; LINGAPPA, 2013). O mercado de produtos naturais veio crescendo na última década e se tornando mais atrativo, sendo possível que seus custos se tornem mais baratos que os de sintéticos com o aumento da demanda e se forem produzidos em massa (BABITHA, 2009).

Plantas e micro-organismos são as principais fontes de pigmentos naturais (RAO et al., 2017). As plantas, no entanto, apresentam desvantagens no seu uso para a produção de pigmentos, visto que podem não estar disponíveis durante o ano inteiro, devido a sua sazonalidade e condições geográficas, além de ser impossibilitado o uso em grande escala de plantas, pois este poderia levar à perda de espécies, não sendo um processo viável (MANIKPRABHU; LINGAPPA, 2013; RAO et al., 2017). Os micro-organismos, sejam eles fungos ou bactérias, por outro lado, aparecem como uma fonte alternativa natural com vantagens sobre os pigmentos vegetais, incluindo crescimento fácil e rápido, o qual independe de condições climáticas e outros fatores da natureza, permitem um rendimento controlável e previsível, alta produtividade, processamento simples e estabilidade, além de alguns pigmentos de micro-organismos poderem ser produzidos a partir de resíduos industriais (BABITHA, 2009; MANIKPRABHU; LINGAPPA, 2013).

Existem inúmeras espécies de fungos, bactérias e leveduras capazes de produzir pigmentos, entretanto é necessário que cumpram diversos critérios para que possam realmente serem utilizados, tais como estabilidade, capacidade de utilizar uma gama variada de fontes de carbono e nitrogênio, ter fácil extração, produção 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 (BABITHA, 2009; RAO et al., 2017). Derivados de *Monascus*, por exemplo, são capazes de tolerar pH e calor (BABITHA, 2009), os quais, por sinal, são o mais antigo registro de uso de um pigmento fúngico, ingrediente utilizado na preparação do arroz de mofo vermelho, conhecido como ang-kak (RAO et al., 2017). Os *Monascus* produzem pigmentos amarelos, laranjas e roxos, que são continuamente encontrados em alimentos orientais, especialmente no Sudeste Asiático, China e Japão (RAO et al., 2017). Mais de 50 pigmentos de *Monascus* foram identificados e estudados e muitas patentes foram emitidas sobre o uso destes pigmentos em alimentos (RAO et al., 2017).

É conhecido que os fungos filamentosos são produtores de uma enorme variedade de pigmentos, tais como carotenoides, melaninas, flavinas, fenazinas, quinonas, monascinas, violaceínas e índigo (RAO et al., 2017). Gêneros como *Phycomyces*, *Blakeslea*, *Mucor*, *Rhodosporidium*, *Sclerotium*, *Sclerotinia*, *Sporidiobolus*, *Ustilago*, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Penicillium* e *Aschersonia* foram relacionados com a produção desses compostos (AVALOS; LIMON, 2015 apud RAO et al., 2017). Só em relação a carotenos, é relatado a existência de mais de 200 espécies de fungos produtores deste pigmento (DUFOSSE, et al., 2005 apud RAO et al., 2017). Foi relatado a produção de pigmentos como di-hidroxinaftaleno melanina, flavinas (riboflavina) e quinonas, como as naftaquinonas e antraquinonas, das quais incluem chrysophanol, helminthosporin, tritisporin, e eritroglaucina, por fungos dos gêneros *Eurotium*, *Fusarium*, *Curvularia* e *Drechslera* (BABITHA, 2009).

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 funções antibióticas, tóxicas, inibitórias, entre outras, para auxiliar na sua sobrevivência e que podem trazer vantagens sobre outros organismos (LOPES, 2011). Esses metabólitos, geralmente, são produzidos devido às condições de cultivo, como a composição do meio de cultura, em que estão inseridos (LOPES, 2011). Os pigmentos, então, são importantes para seus produtores, pois possuem uma função

ecológica, a qual pode variar dependendo dos compostos produzidos, os quais apresentam estruturas químicas únicas e diversas (BABITHA, 2009). 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).

Pigmentos fúngicos foram capazes de adentrar o mercado e competir com as cores sintéticas e a tendência é que isso somente aumente (RAO et al., 2017). Alguns dos pigmentos 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*), Arpink red™ de *Penicillium oxalicum*; e licopeno e b-caroteno de *Blakeslea trispori* (BABITHA, 2009; DUFOSSE et al., 2014).

Nas últimas duas décadas, a literatura vem relatando o interesse em organismos que vivem em ambientes extremos, como, por exemplo, marinhos e antárticos, em relação à produção de novos compostos naturais com diversas funções, incluindo novos pigmentos (TIAN et al., 2017; DUFOSSE et al., 2014). De fato, muitos nichos ecológicos que ainda são pouco explorados, como os ambientes marinhos e antárticos, apresentam características únicas que induzem os micro-organismos a produzirem substâncias únicas (DUFOSSE et al., 2014). Nos ambientes marinhos, os organismos precisam se adaptar a condições como a alta pressão e salinidade, baixas temperaturas e ausência de luz solar, produzindo metabólitos diferenciados de outros ambientes (DUFOSSE et al., 2014).

Fungos do ambiente marinho pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma* e *Eurotium* foram relatados na literatura como produtores de pigmentos (HE et al., 2012; DHALER; VIJAY RAJ, 2009; BLASZCZYK et al., 2014). Apesar dos pigmentos fúngicos derivados do mar serem bastante parecidos aos derivados terrestres, há pigmentos obtidos apenas de fungos marinhos, sendo um exemplo o antraceno-glicosídeo asperflavinribofuranosídeo, um pigmento de coloração amarela, produzido pelo isolado de mar *Microsporum* sp. (LI et al., 2006; RAO et al., 2017).

As comunidades microbianas antárticas são temas de grande interesse por estarem suscetíveis a períodos longos 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). Ademais, as comunidades estão sujeitas às condições ambientais da Artártica, podendo ocorrer grandes variações de temperatura, 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). 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).

A exposição à alta incidência de radiação ultravioleta 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). Nessas condições, estes micro-organismos devem apresentar um importante sistema de defesa antioxidante para prevenir danos oxidativos (LLANTEN et al., 2012). Alguns componentes da defesa antioxidante não enzimática a serem citados são as vitaminas, glutathione e pigmentos, sendo os últimos de grande importância por serem capazes de neutralizar radicais livres das células (LLANTEN et al., 2012). Dessa maneira, vários micro-organismos (fungos e bactérias) provenientes da Antártica têm sido relatados na literatura como produtores de pigmentos como melanina, carotenoides, violaceína, flexirubin, entre outros (HUGHES et al., 2003; MOJIB et al., 2010; DIESER et al., 2010; LLANTEN et al., 2012).

Fungos antárticos são bem conhecidos por produzirem melanina, a qual os auxilia na resistência à radiação UV, essencial para a sobrevivência destes no ambiente extremo em que vivem, além de proteger contra dessecação, radiação ionizante, agentes oxidantes e de possuir um papel em sua patogênese (HASSAN et al., 2016; PACELLI et al. 2017). Exemplos de fungos da Antártica que possuem suas cepas melanizadas são *Alternaria alternat*, *Stachybotrys chartarum*, *Ulocladium consortiale* e *Cryomyces antarcticus* (HASSAN et al., 2016; PACELLI et al. 2017).

Fungos que enfrentam temperaturas baixas severas também podem produzir pigmentos/lipídios (ex. carotenoides), tendo relatos de maior produção de lipídeos como triglicerídeos poliinsaturados e ácidos graxos, os quais os auxiliam na tolerância ao frio (HASSAN et al., 2016). Em 2014, Singh e colaboradores descreveram a produção de carotenoides pelo fungo *Thelebolus microsporus*, um isolado da Antártica.

Além dos já citados, recentemente foi isolada da Antártica uma nova espécie de fungo (*Antarctomyces pellizariae*) de coloração azul devido a sua pigmentação intracelular (MENEZES et al. 2017). Wang e colaboradores (2013) descreveram a identificação do fungo *Geomyces* WNF-15A, isolado da Antártica, secretor de uma pigmentação vermelho-púrpura

(WANG et al., 2013), a qual foi patenteada e recentemente descoberta se tratar de uma pigmentação vermelha com maior capacidade antioxidante e maior estabilidade frente a ácidos, íons metálicos e aditivos alimentares, quando comparado ao pigmento vermelho de *Monascus* (JIE et al. 2017).

Dessa maneira, considerando o potencial dos fungos da Antártica para a obtenção de compostos naturais de interesse, o presente trabalho vem contribuir para a descoberta de pigmentos que esses possam produzir, além de ampliar o conhecimento da diversidade fúngica e metabólica da comunidade microbiana antártica, na qual é possível encontrar espécies e substâncias inéditas.

2. OBJETIVO GERAL

Investigar fungos da Antártica com potencial para a produção de pigmentos.

2.1. Objetivos Específicos

- Realizar triagem de fungos Antárticos produtores de pigmentos naturais em pelo menos dois meios de cultura;
- Identificar os fungos produtores de pigmentos;
- Produzir os pigmentos naturais utilizando os fungos mais promissores;
- Realizar extração seletiva e quantificação dos pigmentos naturais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Fungos Antárticos

Foram avaliados 31 fungos filamentosos provenientes de amostras do solo abaixo de madeira podre coletados na Ilha de Deception na Antártica por Alysson Wagner Fernandes Duarte sob orientação da Prof.^a Dr.^a Lara Durães Sette (UNESP, Rio Claro) durante expedição PROANTAR (OPERANTAR XXXII) realizada em novembro/dezembro de 2013 no âmbito do projeto INCT Criosfera (Coordenado pelo Prof. Jefferson Simões, UFRGS) e 20 fungos filamentosos provenientes de sedimentos marinhos coletados em diversos locais na Antártica 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 micro-organismos fazem parte do acervo de fungos da coleção de pesquisa da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP) onde se encontram preservados por meio

de ultracongelamento a -80°C e estão identificados por códigos pelos quais serão referidos neste trabalho. Os fungos foram disponibilizados pela Prof.^a Dr.^a Lara Durães Sette.

3.2. Triagem dos fungos produtores de pigmentos

Os fungos filamentosos foram reativados em placas de Petri contendo meio Ágar Malte 2% (MA 2%) e mantidos em B.O.D à 15°C por, aproximadamente, 15 dias e repicados em novas placas contendo meios de cultivo para avaliação da produção de pigmentos. Meio MA 2% e BDA foram utilizados e os fungos foram incubados em B.O.D. à 15°C por um período de 10 a 15 dias. Todos os fungos foram preservados pelo método de Castellani (CASTELLANI, 1939). As linhagens que apresentaram pigmentações liberadas no meio extracelular foram selecionadas para a extração e replicadas em triplicata para aumentar a massa de extrato com corante obtida.

3.3. Extração dos pigmentos

Para realizar a extração dos pigmentos, os micélios foram retirados do ágar por raspagem e os meios de cultivo com a coloração foram cortados em pedaços menores e imersos nos solventes a serem testados. Água destilada (H_2O), metanol (CH_3OH), acetona ($\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$), acetonitrila (CH_3CN), etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) e acetato de etila ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) foram utilizados para verificar qual solvente utilizar para cada corante produzido. Os meios foram colocados em um erlenmeyer com 100 mL de solvente e deixados sob agitação de 30 minutos a uma hora em um agitador magnético para auxiliar na extração. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado com papel de filtro e o solvente evaporado por pressão de ar. Os pigmentos foram reservados em tubos de vidro e mantidos ao abrigo da luz e em geladeira à 10°C .

3.4. Fracionamentos dos extratos

3.4.1. Extrato 2MA

O corante produzido por 2MA extraído com acetona, acetonitrila e etanol foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para verificação de diferenças entre as extrações e determinar qual o melhor solvente a ser utilizado no processo. Os extratos foram dissolvidos em metanol (1 mg/mL) e 20 μL de cada amostra foram injetados em coluna de fase reversa C18 com metanol a 95% como fase móvel. Cada corrida teve duração de 25 minutos em caráter isocrático e fluxo de 0,2 mL/min. Utilizou-se como detectores Índice de Refração (IR) e Ultravioleta-Visível (UV-Vis) a 254 nm.

O extrato de acetona de 2MA foi selecionado para prosseguir com a análise da composição e purificação do corante. O extrato foi dissolvido para 1 mg/mL em metanol e

filtrado em filtro de seringa com membrana de PTFE hidrofílico de poro com diâmetro de 0,45 µm. Visando uma melhor separação dos picos detectados, a amostra dissolvida foi injetada em coluna de fase reversa C18 para análise da composição em com detectores UV-Vis 254 nm e IR em acetonitrila 10% como fase móvel durante toda a corrida, com um fluxo de 0,2 mL/min por 40 minutos.

3.4.1.1. *Fracionamento em coluna de fase reversa (C8)*

Após análise em CLAE para verificar a composição dos extratos obtidos, optou-se pela realização de fracionamento da amostra por cromatografia em coluna. Para o fracionamento o extrato foi dissolvido em 200 µL de metanol e algumas gotas de água.

O extrato foi injetado em coluna C8 HiperOctyl FF 16/10 da GE Healthcare, usando como eluente acetonitrila 10%. As frações foram coletadas em microtubos *eppendorf* a cada 0,5 mL.

3.4.1.2. *Fracionamento em coluna de sílica*

Cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica gel 60 (0,20 mm) foi aplicada para determinar a melhor opção de solvente como fase móvel na purificação do corante produzido por 2MA. Foram avaliados os solventes: hexano ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$), acetato de etila, acetonitrila, metanol com água nas proporções (1:1, 2:1 e 3:1), metanol com acetato e hexano nas proporções (5:2:3 e 6:2:2), e metanol com clorofórmio (CHCl_3) (7:3). As placas de CCD foram avaliadas sob luz ultravioleta a 254 nm e 365 nm, e com ajuda do revelador *p-anisaldeído*.

Após seleção da fase móvel, uma coluna de 25 mL foi empacotada com sílica gel 60 (0,2-0,5 mm e malha 35-70) para o fracionamento. A coluna foi coberta por papel alumínio para prevenir que a luz degradasse os pigmentos. Utilizou-se como fase móvel uma mistura de metanol, acetato de etila e hexano 6:2:2 seguida da mistura na proporção 7:2:1; metanol e acetato de etila (8:2); metanol e, por fim, metanol e água na proporção de 1:1. A troca de fase ocorreu conforme os pigmentos foram fracionados. As frações foram coletadas em microtubos de *eppendorf*, sendo coletados 0,5 mL quando coloridas e 1,0 ou 1,5 mL quando sem coloração.

3.4.2. Extrato 6DC415-I

3.4.2.1. *Fracionamento em coluna de sílica*

Para o corante do fungo 6DC415-I, testes de cromatografia de camada delgada com metanol, acetato de etila e metanol com acetato de etila na proporção de 1:1 foram realizados.

O fracionamento ocorreu em coluna de sílica em pó em uma coluna de 10 mL, que também foi recoberta por papel alumínio. O procedimento foi igual ao descrito acima (no tópico 3.4.1.2), exceto que as fases móveis utilizadas foram acetato de etila, acetato de etila e metanol nas proporções 9:1, 7:3, 1:1, 3:7, 1:9 e, por fim, apenas metanol. As frações coletadas foram secadas e armazenadas em freezer.

3.4.2.2. *Purificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)*

A amostra do corante do fungo 6DC415-I foi dissolvida em metanol e filtrada com uma seringa utilizando um filtro com membrana de PTFE hidrofílico de poro com diâmetro de 0,22 µm. A amostra então foi injetada em coluna de fase reversa C18 em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) semi-preparativa, com detector UV-Vis 254 nm. Foram testadas diversas condições para definir o melhor método, sendo estas: (A) acetonitrila 10% por 120 minutos; (B) acetonitrila 20% por 120 minutos; (C) acetonitrila 30% por 120 minutos e 100% por mais 35 minutos; (D) acetonitrila 5% por 90 minutos; (E) metanol 10% por 90 minutos; (F) metanol 5% por 90 minutos; (G) metanol 90% por 60 minutos; (H) metanol 80% por 60 minutos; (I) metanol 50% por 60 minutos; (J) metanol 40% por 60 minutos; (K) metanol 20% por 60 minutos; (L) metanol 20% por 20 minutos; 10 minutos de um gradiente de 20 a 95% de metanol, finalizado por mais 20 minutos de metanol 95%. O fluxo utilizado foi sempre 1 mL/min, exceto em (E) e (J), com 0,5 mL/min, e em (K), com 0,3 mL/min.

Selecionado o melhor método para o fracionamento, a amostra foi diluída em metanol para uma concentração de 30 mg/mL e foi injetado 200 µL na coluna. A amostra de interesse após a purificação foi coletada em tubos de vidro e o solvente através de um evaporador rotativo sob pressão reduzida.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. **Triagem dos fungos produtores de pigmentos**

Os resultados da triagem dos 51 fungos submetidos ao crescimento nos meios de cultivo BDA e MA 2%, para avaliar a produção de pigmentos em meio extracelular, são apresentados na Tabela 1 para fungos de solo e na Tabela 2 para os isolados de sedimentos marinhos.

Dentre os 31 fungos filamentosos isolados de solo antártico avaliados, os isolados 2MA e 10.6MP produziram pigmentos nos meios de cultura avaliados. Para os isolados de sedimentos marinhos, 2 dentre os 20 fungos avaliados apresentaram produção extracelular de

corantes. Os fungos 6DC4-I e 6DC415-I produziram pigmentos de coloração rosa nos dois meios de avaliação.

Tabela 1. Produção de pigmentos extracelulares por fungos de solo abaixo de madeira em dois meios de cultivo.

Isolado	Meio de cultivo		Isolado	Meio de cultivo	
	BDA	MA 2%		BDA	MA 2%
1MA	-	-	9MP	-	-
2MA	+	+	10.1MP	-	-
3MA	-	-	10.2MP	-	-
4MA	-	-	10.4MP	-	-
5MA	-	-	10.5MP	-	-
6MA	-	-	10.6MP	-	-
8MA			10.7MP	-	+
9MA	-	-	10.8MP	-	-
10MA	-	-	10.AMP	-	-
2MP	-	-	10.BMP	-	-
3MP	-	-	BMP	-	-
4MP	-	-	CMP	-	-
5MP	-	-	DMP	-	-
6MP	-	-	EMP	-	-
7MP	-	-	FMP	-	-
8MP	-	-			

BDA: Batata Dextrose Ágar; MA 2%: Ágar Malte 2%; (+) positivo para produção de pigmentos (-) negativo para produção de pigmentos.

O isolado 2MA apresentou pigmentos rosa em ambos os meios, embora uma menor quantidade e coloração sejam observadas para o meio BDA. Já 10.6MP liberou pigmentos apenas em meio MA 2%. Ambos esses fungos não possuem a identificação do gênero a que pertencem.

Tabela 2. Produção de pigmentos extracelulares por fungos de sedimentos marinhos para dois meios de cultivo.

Fungo	Gênero	Meio de cultivo	
		BDA	MA 2%
2A1C115II	<i>Penicillium</i>	-	-
2DC615I	<i>Pseudogymnoascus</i>	-	-
2D3C115III	<i>Pseudogymnoascus</i>	-	-
2D3C115III	<i>Pseudogymnoascus</i>	-	-
3A1C215IV	não identificado	-	-
3DC615I	<i>Penicillium</i>	-	-
3D3C615I	<i>Penicillium</i>	-	-
4A1C115IV	<i>Penicillium</i>	-	-
4A1C315IV	<i>Penicillium</i>	-	-
4A1C615III	<i>Pseudogymnoascus</i>	-	-
5A1C115II	<i>Paraconiothyrium</i>	-	-
5A1C315IV	<i>Pseudogymnoascus</i>	-	-
5A1C715IV	<i>Pseudogymnoascus</i>	-	-
5B1C315IV	<i>Penicillium</i>	-	-
5DC1IV	<i>Pseudogymnoascus</i>	-	-
5DC815I	<i>Penicillium</i>	-	-
6DC215IV	<i>Pseudogymnoascus</i>	-	-
6DC315I	<i>Pseudogymnoascus</i>	-	-
6DC4I	<i>Pseudogymnoascus</i>	+	+
6DC415I	<i>Pseudogymnoascus</i>	+	+

BDA: Batata Dextrose Ágar; MA 2%: Ágar Malte 2%; (+) positivo para produção de pigmentos (-) negativo para produção de pigmentos.

Os fungos de sedimento marinho com resultados positivos para a produção de pigmentos extracelulares foram os isolados 6DC4-1 e 6DC415-I, sendo ambos produtores de um pigmento de cor rosa nos dois meios avaliados. Estes fungos foram identificados como sendo do gênero *Pseudogymnoascus*. Este gênero, historicamente conhecido como *Geomyces*, é comum em locais frios por ser um organismo psicrófilico, sendo um dos gêneros mais abundantes da Antártica e encontrado em diversos substratos antárticos, como solo, lagos ou

folhas (GODINHO et al., 2015; DING et al., 2016). Existem registros de isolados antárticos de *Pseudogymnoascus* apresentando a produção de pigmento avermelhado/rosa, como no trabalho de Galleguillos (2019) e Duarte et al. (2019); e da produção de pigmento vermelho por exemplares antárticos de *Geomyces* descrito por Wang et al. (2013).

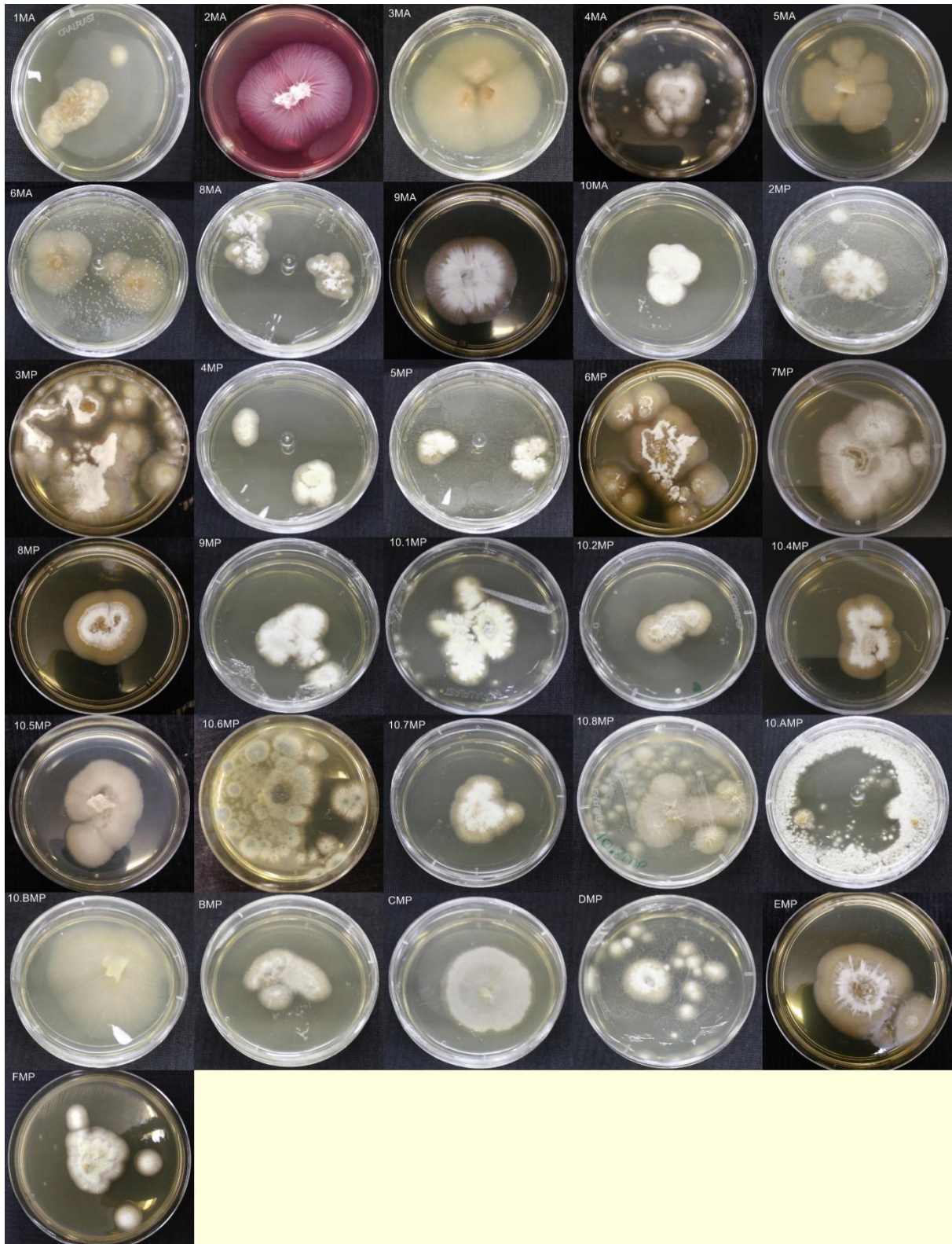
A produção de pigmentos extracelulares para os fungos de solo abaixo de madeira pode ser observada na Figura 1 para meio BDA e na Figura 2 para meio MA 2%. As Figuras 3 e 4 trazem, respectivamente, o crescimento dos isolados de sedimentos marinhos em BDA e MA 2%. Alguns isolados de solo parecem produzir pigmentos intracelulares em meio BDA (Figura 1), o que consiste em outra fonte de pigmentos a ser explorada.

Figura 1. Fungos de solo abaixo de madeira no meio
BDA



Fonte: Gabrielle Vieira

Figura 2. Fungos de solo abaixo de madeira em meio malte 2%.



Fonte: A autora.

Figura 3. Fungos de sedimentos marinhos em BDA



Fonte: A autora.

Figura 4. Fungos de sedimentos marinhos no meio malte 2%.

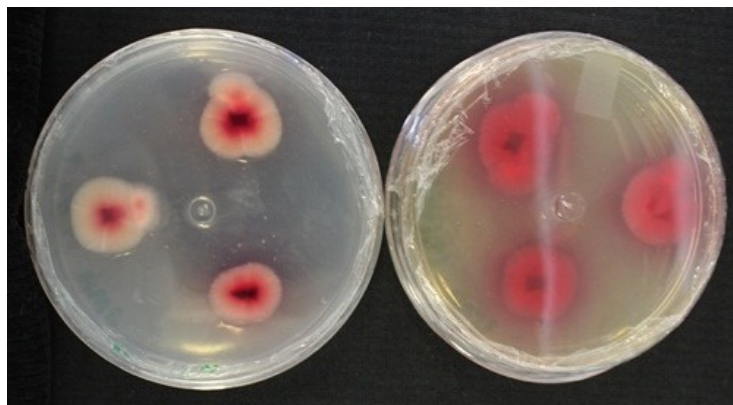


Fonte: A autora.

Isolados que liberaram pigmentos em ambos os meios, apresentaram coloração mais intensa no meio malte 2%. Esse evento provavelmente deve-se as vias metabólicas ativadas para o crescimento em cada meio devido a diferente composição deles, sendo BDA considerado um meio mais rico em açúcares e nutrientes quando comparado com o meio malte preparado. Em trabalhos como o de Palacio-Barrera et al. (2018), em que se buscava a produção de pigmentos em fungos filamentosos, obteve-se uma alta produção desses em meio malte de cultivo, o qual é característico por possuir concentração baixa de nitrogênio e alta de carbono. Em Valduga et al. (2009), também foi produzido uma maior quantidade de pigmentos carotenoides quando utilizado meio com maltose.

A diferença na produção de pigmentos para 2MA conforme o meio de cultivo pode ser visualizada na Figura 5.

Figura 5. Fungo 2MA em crescimento no meio BDA, à esquerda, e em MA 2%, à direita.



Fonte: A autora.

4.2. Extração de pigmentos

Para os isolados dos fungos 2MA, 6DC415-I e 6DC4-I a acetona foi o solvente que apresentou melhor resultado na extração (menos tempo para extrair e coloração mais intensa). A Figura 6 apresenta os resultados do teste de extração para 2MA com vários solventes.

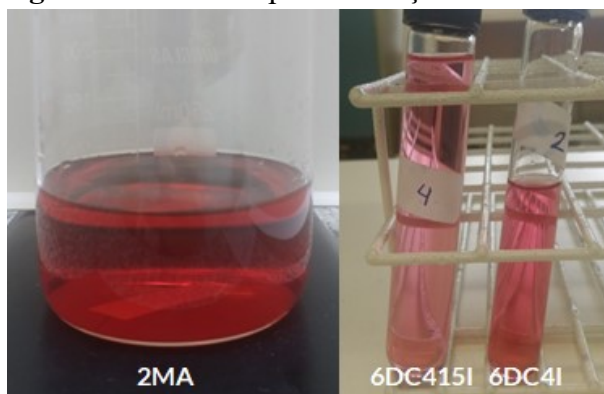
Assim como 2MA, os pigmentos de 6DC415-I e 6DC4-I foram extraídos do meio sólido com acetona (Figura 7).

Figura 6. Extração de 2MA com diversos solventes.



Extração utilizando água destilada, acetonitrila, etanol e acetona, respectivamente. Fonte: a autora.

Figura 7. Corantes após a extração com acetona

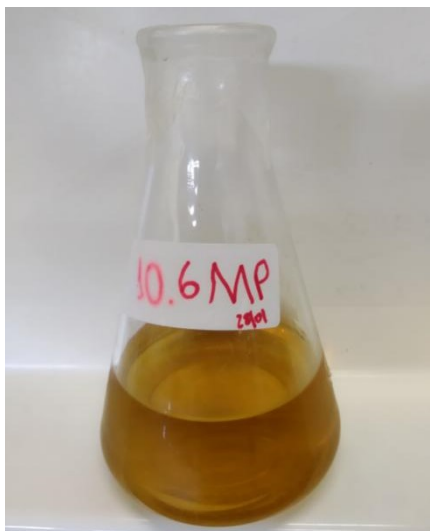


Corantes extraídos do meio sólido de 2MA, 6DC415I e 6DC4I.
Fonte: a autora.

A coloração do pigmento secretado por 6DC415I e 6DC4I é, aparentemente, igual, porém na foto um deles está mais concentrado que o outro, por isso a diferença na intensidade da cor.

Para a extração do pigmento amarelado do fungo 10.6MP foram testados acetona, metanol e acetato de etila e o pigmento só foi extraído na presença de metanol (Figura 8).

Figura 8. Corante extraído com metanol



Isolado 10.6MP, produtor de corante em meio MA 2%. Fonte: a autora.

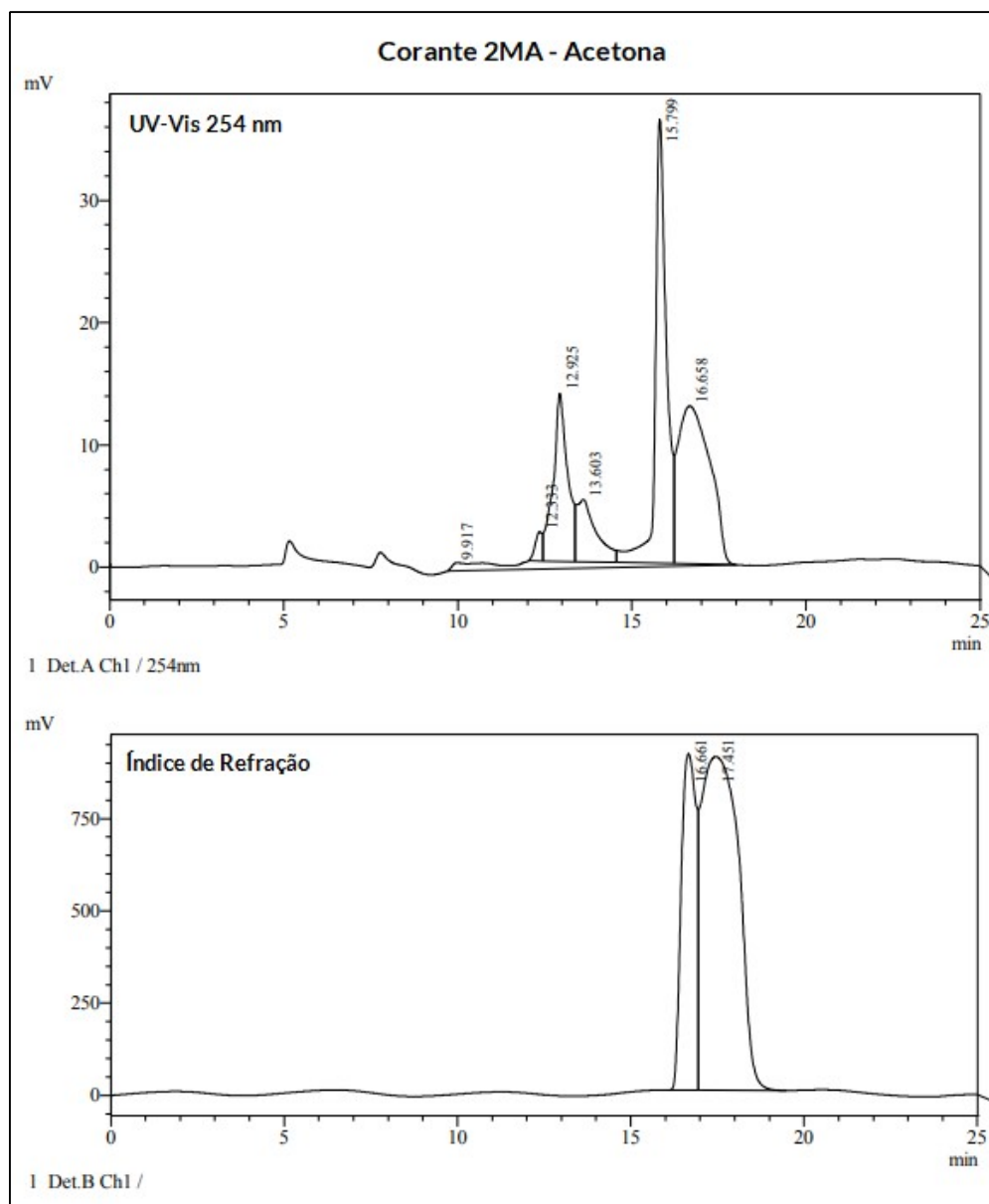
4.3. Fracionamento dos extratos

4.3.1. Extrato 2MA

A análise dos extratos de 2MA obtidos por extração com acetona, acetonitrila e etanol não mostrou diferenças entre os compostos extraídos por cada solvente. A Figura 9 apresenta o cromatograma do corante extraído com acetona em CLAE usando metanol 95% como fase móvel.

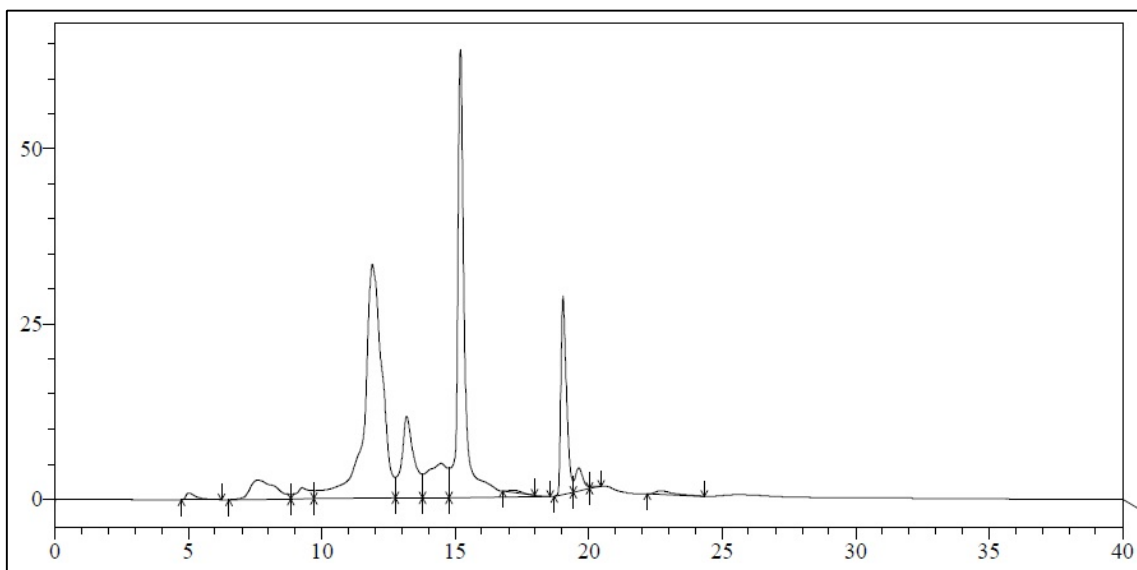
Como não houve diferenças entre os extratos considerando os detectores usados, a acetona foi selecionada como solvente de extração preferencial e as subsequentes análises do corante produzido por 2MA foram realizadas com esse extrato.

Figura 9. Cromatograma de corante extraído com acetona. Detecção em UV-Vis 254 nm e IR



Após nova análise de 2MA em CLAE usando acetonitrila 10% como fase móvel, obteve-se o cromatograma apresentado na Figura 10.

Figura 10. Cromatograma do corante de 2MA em acetonitrila 10%



Devido à presença de vários picos no cromatograma, indicando mais de um componente presente no corante extraído, o fracionamento da amostra foi realizado a fim de purificar o composto responsável pela pigmentação.

4.3.1.1. *Fracionamento em coluna de fase reversa (C8)*

O corante extraído de 2MA com acetona foi injetado em coluna C8 e as frações coletadas conforme descrito em 3.4.1.1. Cromatografia de camada delgada das frações resultantes da cromatografia com a coluna foi realizada e as frações apresentaram poucas diferenças entre si, mostrando que este método não foi eficiente para a purificação. Além disso, o pigmento perdeu a coloração original do vermelho para um tom amarelado, podendo ter sido degradado na coluna durante o processo de fracionamento.

4.3.1.2. *Fracionamento em coluna de sílica*

Análises de CCD apontaram para o caráter polar do corante extraído, assim, na tentativa de separar as moléculas de interesse dos demais componentes do extrato, optou-se pelo gradual aumento da polaridade da fase móvel no fracionamento como descrito no item 3.4.1.2. As frações de coloração mais intensa do corante foram coletadas apenas quando a fase móvel metanol:água foi empregada. As amostras obtidas no fracionamento em coluna de sílica foram analisadas em CLAE para verificar se a purificação foi efetiva. As frações coletadas no final da purificação apresentaram maior pureza, no entanto a massa obtida dessas frações foi baixa para a realização de uma análise de espectrometria e RMN de ^1H e ^{13}C . Devido à dificuldade de obtenção de massa dos compostos presentes neste extrato e como o

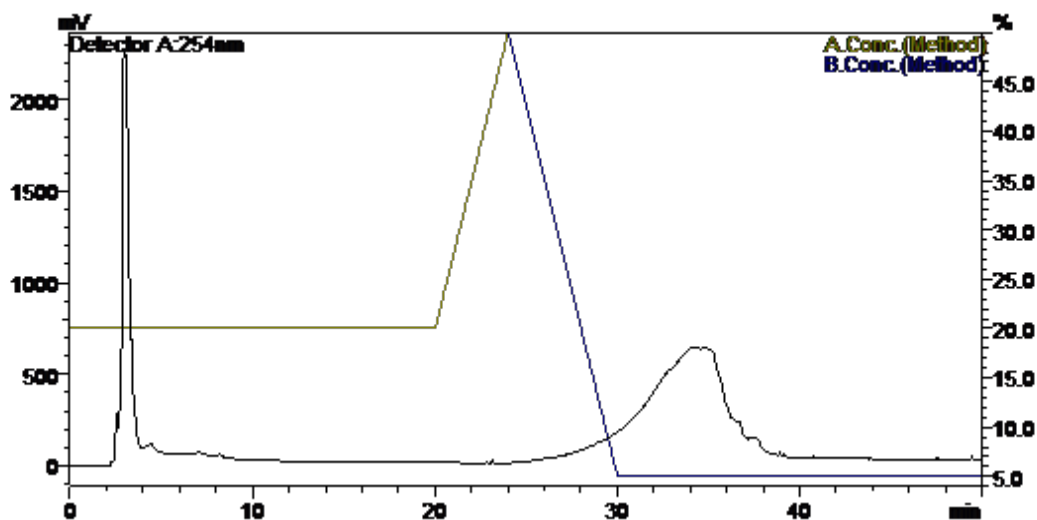
micro-organismo 2MA não apresentava até o momento identificação, optou-se por se dedicar a purificação do isolado 6DC415-I, identificado como *Pseudogymnoascus*.

4.3.2. Extrato 6DC415-I

Para a purificação do pigmento produzido pelo fungo 6DC415-I, primeiramente optou-se pela purificação em coluna normal de sílica, entretanto não foi obtido resultados satisfatórios, pois as frações aparentemente estavam se degradando na coluna cromatográfica. Dessa forma, optou-se por prosseguir a purificação deste corante em CLAE-semi-preparativo utilizando coluna C18.

Dentre as variadas condições testadas, como descrito no tópico 3.4.2.1., o método (L) – fluxo de 1mL/min de metanol 20% por 20 minutos; 10 minutos de um gradiente de 20 a 95% de metanol, finalizado por mais 20 minutos de metanol 95% – foi o mais eficiente. O cromatograma obtido para o extrato de 6DC415-I neste método está exibido na Figura 11.

Figura 11. Cromatograma do extrato do fungo 6DC415-I



A amostra foi coletada no tempo de retenção de 32 minutos, no segundo maior pico apresentado no cromatograma, possuindo uma coloração rósea, conforme ilustrado na Figura 12.

Figura 12. Amostra coletada após o fracionamento.



Fonte: a autora

Após diversas aplicações do extrato no CLAE-semi-preparativo, foram obtidos, aproximadamente, 10 mg da fração contendo o corante rosa. A amostra foi enviada para análise de RMN ^1H e ^{13}C , para verificação da pureza da fração e identificação do composto responsável pela coloração rosa. Sabendo-se do que se trata o pigmento obtido, poderá ser inferido qual a função que ele exerce e sua importância para o fungo que o produz.

5. CONCLUSÃO

Os fungos da Antártica analisados produziram pigmentos extracelulares e intracelulares, dos quais dois isolados de solo abaixo de madeira podre e dois isolados de sedimentos marinhos da Antártica produziram pigmentos no meio extracelular. Dos fungos selecionados, dois foram identificados como pertencentes ao gênero *Pseudogymnoascus*, um dos mais comumente encontrados na Antártica e já relatado como produtor de pigmentos coloridos.

Dentre os dois meios de cultivo testados, o malte 2% foi o melhor para a obtenção dos pigmentos, possibilitando que os fungos produzam pigmento em maior quantidade e, conseqüentemente, cores mais intensas.

Os pigmentos extracelulares foram facilmente extraídos, utilizando acetona e metanol e os extratos contendo corantes dos fungos 2MA e 6DC415-I possuem mais de um componente em sua composição. A cromatografia líquida de alta eficiência se mostrou uma ferramenta importante no fracionamento dos extratos e para a obtenção de frações puras do composto de interesse.

Com a necessidade por produtos naturais e o potencial biotecnológico que os micro-organismos possuem, nota-se a importância desses organismos de ambientes extremos, principalmente os fungos, os quais são promissores para a obtenção de corantes naturais.

6. REFERÊNCIAS

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

BLASZCZYK, L.; SIWULSKI, M.; SOBIERALSKI, K. et al. *Trichoderma* spp. – application and prospects for use in organic farming and industry. *Journal of Plant Protection Research*, v. 54, n. 4, 2014.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 24, 1939.

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.

DHALER, M. A.; VIJAY RAJ, A. S. Pigment and amylase production in *Penicillium* sp NIOM-02 and its radical scavenging activity. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 44, p. 2424-2430, 2009.

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, Z.; LI, L.; CHE, Q.; LI, D.; GU, Q.; ZHU, T. Richness and bioactivity of culturable soil fungi from the Fildes Peninsula, Antarctica. *Extremophiles*, v. 20, n. 4, p. 425–435, 2016.

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.

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.

DUFOSSE, 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.

- GALLEGUILLOS, V. E. O. *Estudio de genes codificantes para enzimas policétido sintasa de la cepa fúngica antártica Pseudogymnoascus sp. 131309-E2A-C5II-EB*. Tese. Universidade do Chile, Santiago - Chile, 2019.
- GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B.; Corantes têxteis. *Química Nova*, v. 23, n. 1, 2000.
- GODINHO, V. M., et al. Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. *Extremophiles*, v. 19, n. 3, p. 585–596, 2015.
- 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.
- HE, F.; SUN Y. L.; LIU K. S.; ZHANG X. Y.; QIAN, P. Y.; WANG, Y. F., et al. Indole alkaloids from marine-derived fungus *Aspergillus sydowii* SCSIO 00305. *The Journal of Antibiotics*, v. 65, p. 109-111, 2012.
- 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.
- 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.
- LI, Y.; LI, X.; LEE, U.; KANG, J. S.; CHOI, H. D.; SON, B. W. A new radical scavenging anthracene glycoside, asperflavin ribofuranoside, and polyketides from a marine isolate of the fungus *Microsporum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 54, p. 882–883, 2006.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- 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.
- PALACIO-BARRERA, A. M.; AREIZA, D.; ZAPATA, P.; ATEHORTÚA, L.; CORREA, C.; PEÑUELA-VÁSQUEZ, M. Induction of pigment production through media composition, abiotic and biotic factors in two filamentous fungi. *Biotechnology Reports*, v. 20, 2018.
- 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.
- RAO, M. P. N.; XIAO, M.; LI, W. Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications. *Frontiers in Microbiology*. v.8, a. 1113, 2017.
- 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.
- TIAN, Y.; LI, Y. L; ZHAO, F.C. Secondary Metabolites from Polar Organisms. *Marine Drugs*, v. 15, p. 28, 2017.
- VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M.; JÚNIOR, A. F. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 9, 2009.
- VINCENT WF, Evolutionary origins of Antarctic microbiota: invasion, selection and endemism. *Antarctic Science*, v. 12, p. 374-385, 2000.
- 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.