

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS DE AMOSTRAS DE SOLO AMAZÔNICO COM
POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE PIGMENTOS

JESSYCA DOS REIS CELESTINO

MANAUS

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS DE AMOSTRAS DE SOLO AMAZÔNICO COM
POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE PIGMENTOS**

JESSYCA DOS REIS CELESTINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas de Manaus, visando defesa para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria da Paz Lima

MANAUS

2013

Ficha catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

C421b Celestino, Jessyca dos Reis
Bioprospecção de fungos de amostras de solo Amazônico com potencial para a produção de pigmentos / Jessyca dos Reis Celestino. - Manaus: UFAM, 2013.
85 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) — Universidade Federal do Amazonas.
Orientador: Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria da Paz Lima

1. Fungos – Amazônia - Pigmentos 2. Micro-organismos do solo – Amazônia - Pigmentos I. Souza, João Vicente Braga de (Orient.) II. Lima, Maria da Paz (Orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU (1997): 582.28:547.97(811)(043.2)

JESSYCA DOS REIS CELESTINO

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS DE AMOSTRAS DE SOLO AMAZÔNICO COM
POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE PIGMENTOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas de
Manaus, visando defesa para obtenção do
título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA

Profa. Dra. Karen Regina Carim da Costa Magalhães
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Prof^ª. Dr^ª. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes
Fundação Oswaldo Cruz- FIOCRUZ

*Dedico este trabalho à minha mãe, Maria Joana
Reis, e em memória de minha vó, Joana de Azevedo dos
Reis*

AGRADECIMENTOS

Ao Espírito Santo, o Deus esquecido! Ele é nosso amigo, consolador, ajudador e detentor de toda inteligência e sabedoria, o qual me capacitou para que pudesse chegar até aqui.

À minha família que amo muito, meus amigos, meu orientador João Vicente, minha co-orientadora Maria da paz e nossos colaboradores Alita Lima, Loretta Ennes e Maurício Ogusku.

Aos colegas do laboratório de Microbiologia Médica e Química de Produtos Naturais, aos técnicos, e aos meus professores da FCF-UFAM por ajudarem na minha formação acadêmica.

A todos que estiveram comigo nesta caminhada e que torceram e acreditaram em mim, em especial à minha mãe Maria, minha irmã Dani, meus tios Nonato e Antônio, Carolina Pacheco, Hellen Sena, Ana Cortez, Ana Karla Freire, Silviane Pinheiro, Nayara Diniz, Dona Lili, prof. João Vicente, prof^a Maria da Paz, prof^a. Aya Sadahiro, prof^a. Marne Vasconcellos, prof. José Neto e prof. Émerson Lima.

RESUMO

Isolados ambientais de fungos filamentosos são amplamente estudados por sua capacidade de secretar metabólitos de grande valor comercial, entre eles os pigmentos. Estes, por sua vez, encontram aplicação como corantes de matérias-primas têxteis, alimentos e medicamentos. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi selecionar fungos de amostras de solo Amazônico com potencial para a produção de pigmentos. Para isso, foram coletadas amostras de solo superficial e colônias foram isoladas pela técnica da diluição em série. As características macro e microscópicas das colônias crescidas em até 72 horas foram utilizadas para a determinação do gênero dos isolados e a região ITS do DNA ribossomal dos fungos produtores de pigmentos foi sequenciada para permitir a identificação em nível de espécie. Para conservar as linhagens com potencial biotecnológico foi empregada uma técnica de criopreservação e armazenamento a -70 °C. Um bioprocessamento realizado em caldo Czapeck possibilitou a seleção dos fungos produtores de compostos coloridos. Frações contendo os pigmentos foram extraídas pelo uso de solventes de diferentes polaridades e o pigmento de interesse foi selecionado pela intensidade da cor da substância presente nas frações. A metodologia para isolamento e caracterização química da amostra envolveu técnicas de fracionamento cromatográfico (coluna Sephadex LH-20 e coluna de celulose microcristalina), recristalização e análises de RMN (Ressonância magnética nuclear). A influência das fontes de carbono e nitrogênio sobre o rendimento da substância isolada também foi estudada nesse trabalho. A partir das amostras coletadas foi possível isolar 50 fungos do solo. Desses, 5 cepas foram capazes de produzir pigmentos durante a fermentação. Os fungos produtores foram identificados como *Penicillium sclerotiorum* 2AV2, *Penicillium sclerotiorum* 2AV6, *Aspergillus calidoustus* 4BV13, *Penicillium citrinum* 2AV18 e *Penicillium purpurogenum* 2BV41. *Penicillium sclerotiorum* 2AV2 produziu frações muito coloridas e foi escolhido para prosseguir as atividades de caracterização química. Após o isolamento da substância, obteve-se um pó amarelo-alaranjado, que foi identificado por RMN como esclerotiorina, um importante metabólito que ainda não havia sido descrito pela síntese por fungos da Amazônia. A influência das fontes de carbono e nitrogênio para a produção de esclerotiorina foi analisada, e verificou-se que ramnose e peptona aumentaram o rendimento quando utilizadas separadamente. Estes resultados indicam que a bioprospecção de fungos Amazônicos é uma alternativa para a pesquisa por novas fontes de corantes naturais, pois permite explorar o

potencial biotecnológico da nossa região, ao mesmo tempo em que possibilita o conhecimento das espécies de micro-organismos produtores.

Palavras-chave: Fungos Amazônicos, pigmentos, caracterização química, otimização.

ABSTRACT

Environmental isolates of filamentous fungi are widely studied for their ability to secrete metabolites of great commercial value, including pigments. These, in turn, find application to color textile raw materials, foods and medicines. In this context, the aim of this work was to select fungi from soil samples Amazon with potential for the production of pigments. For this, samples were collected from surface soil and colonies were isolated by serial dilution technique. The macro and microscopic characteristics of colonies grown within 72 hours were used for determining the gender of the isolates and the ITS region of the ribosomal DNA of fungal pigment producers was sequenced for identification to the species level. A cryopreservation technique and conservation at -70 °C was employed to preserve the lines with biotechnological potential. A bioprocess performed in broth Czapeck enabled the selection of fungi which produce colored compounds. Fractions containing the pigments were extracted by use of solvents of different polarity and selection of the pigment of interest was due to the color intensity of the substance present in the fractions. The techniques used for the isolation and structural elucidation of the sample of interest involved chromatographic fractioning (Sephadex LH-20 column and microcrystalline cellulose column), recrystallization and NMR (Nuclear Magnetic Resonance). The influence of carbon sources and nitrogen on the yield of the isolated substance was also studied in this work. From samples collected was possible to isolate 50 soil fungi. Of these five strains were able to produce pigments during fermentation. Producing fungi were identified as *Penicillium sclerotiorum* 2AV2, *Penicillium sclerotiorum* 2AV6, *Aspergillus calidoustus* 4BV13, *Penicillium citrinum* 2AV18 e *Penicillium purpurogenum* 2BV41. *Penicillium sclerotiorum* 2AV2 produced fractions very colorful and was chosen to continue the activities of the chemical characterisation. After isolation of the substance was obtained as a yellow-orange powder, which was identified by NMR as sclerotiorin, a major metabolite that has not been previously described by synthesis by fungi from the Amazon. The influence of carbon and nitrogen sources for production of sclerotiorin was analysed and it was found that rhamnose and peptone increased yield when used separately. These results indicate that Amazonian fungi bioprospecting is an alternative to search for new sources of natural dyes, since it allows to exploit the biotechnological potential of our region while allowing knowledge of species of microorganisms producers.

Keywords: Amazonian fungi, pigments, chemical characterisation, optimisation

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Extração de pigmentos produzidos por fungos isolados do solo Amazônico com solventes de diferentes polaridades. 44
- Figura 2:** Estrutura química da esclerotiorina. 45
- Figura 3:** Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de esclerotiorina. 47
- Figura 4:** Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de esclerotiorina. 47

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Corantes sintéticos para uso em alimentos permitidos no Brasil e sua situação na União Européia (EU) e Estados Unidos (USA). 21
- Quadro 2:** Corantes provenientes de fontes naturais autorizados para uso em alimentos no Brasil, e que também são utilizados na União Européia e/ou Estados Unidos. 23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Codificação e identificação do gênero dos fungos isolados do solo Amazônico.	43
Tabela 2:	Dados de RMN para o pigmento isolado a partir de <i>Penicillium sclerotiorum</i> 2AV2.	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 O potencial biotecnológico dos fungos presentes no solo da Amazônia	16
2.2 Corantes	18
2.2.1 Importância industrial	18
2.2.2 Produção de pigmentos por fungos	25
2.3 Características químicas dos pigmentos produzidos por fungos	28
2.4 Fatores que influenciam a produção de pigmentos por fungos	30
3. OBJETIVOS	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Isolamento, identificação e preservação de fungos do solo Amazônico	32
4.2 Identificação das espécies dos fungos isolados através do sequenciamento da região ITS do DNAr	32
4.3 Criopreservação dos fungos produtores de pigmentos	33
4.4 Bioprospecção de fungos produtores de pigmentos	34
4.5 Extração dos pigmentos	34
4.6 Isolamento e caracterização química do pigmento produzido pelo fungo selecionado	34
4.7 Efeito das fontes de carbono e nitrogênio no rendimento do pigmento produzido pela linhagem selecionada	35
4.7.1 Efeito das fontes de carbono na produção do pigmento	35
4.7.2 Efeito das fontes de nitrogênio na produção do pigmento	36
5. RESULTADOS	37
6. CONCLUSÕES	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
APÊNDICE A	72
APÊNDICE B	73
APÊNDICE C	74
APÊNDICE D	75
APÊNDICE E	76

APÊNDICE F	77
APÊNDICE G	78
APÊNDICE H	79
APÊNDICE I	80
APÊNDICE J	81
APÊNDICE K	82
ANEXO A	83
ANEXO B	84
ANEXO C	85

1. INTRODUÇÃO

Devido às suas propriedades menos tóxicas e maior valor medicinal, os corantes naturais têm sido cada vez mais utilizados pela indústria farmacêutica e de alimentos (CHENGAIHAH *et al.*, 2010). Some-se a isto, o fato de os corantes sintéticos serem derivados de subprodutos do petróleo, que é uma fonte não-renovável, o que futuramente acarretará no decréscimo da produção (KOBYLEWSKI & JACOBSON, 2012).

Os corantes sintéticos são importantes agentes causadores da poluição ambiental, pois são compostos feitos para serem altamente estáveis, por isso suas moléculas complexas dificultam a degradação pelos fungos ambientais (ALI, 2010). Além disso, legislações cada vez mais severas impõem restrições sobre os corantes permitidos, principalmente quando se trata de aditivos alimentares, pelo fato de serem ingeridos diariamente (MAPARI *et al.*, 2010). Como nos alimentos a cor tem um importante papel na aceitação do produto pelo consumidor, esses corantes continuam a ser utilizados, embora alguns sejam comprovadamente tóxicos para os humanos (KASHANIAN & ZEIDALI, 2011). Apesar disso, a grande vantagem desses compostos em relação aos pigmentos naturais ainda é a melhor estabilidade frente a fatores físicos e químicos (SILVEIRA *et al.*, 2011).

Os fungos têm sido bastante explorados como produtores de diferentes substâncias de interesse econômico, tais como: enzimas, ácidos orgânicos, antibióticos, vitaminas, aminoácidos, esteróides e pigmentos (CHAKRABORTY *et al.*, 2010). Esses pigmentos fúngicos, por sua vez, encontram aplicação como potenciais corantes para a indústria, além de apresentarem importantes propriedades farmacológicas, como atividade antimicrobiana, antioxidante, imunossupressora, antiviral, anticancerígena e redutora do colesterol (MOHARRAM *et al.*, 2012).

Entre as fontes naturais para produção de corantes, as substâncias de origem fúngica sobressaem-se sobre as oriundas de plantas, pelas facilidades em termos de produtividade, associadas ao cultivo contínuo e rápida reprodução desses micro-organismos (VALDUGA *et al.*, 2009). Outra vantagem é a possibilidade de cultivo *in house* e da otimização das condições da fermentação, que pode elevar o rendimento final do produto (MAPARI *et al.*, 2006). Tendo em vista que a síntese química de produtos naturais é pouco viável, pois em geral ocasiona custos elevados e baixo rendimento, as pesquisas por fontes biológicas que gerem colorantes em quantidades significativas para a indústria têm aumentado substancialmente (DAWSON, 2009).

O fungo *Monascus* tem sido alvo de muitos estudos para a produção de pigmentos (VOLP et al., 2009; KONGRUANG, 2011; MIYAKE et al., 2008). Contudo, ele produz micotoxinas que reduzem o seu valor comercial e bloqueiam sua aplicação como corante em países como a União Européia e Estados Unidos (MAPARI et al., 2008). Espécies de fungos ambientais, como linhagens do gênero *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Fusarium* também são importantes produtoras de metabólitos, entre eles substâncias que podem ser aplicadas na indústria de corantes (BOONYAPRANAI et al., 2008; DUFOSSÉ, 2006; KONGRUANG, 2011).

Dessa forma, é notória a existência de muitos trabalhos sendo publicados sobre fungos com potencial para a produção de pigmentos em todo mundo. Entretanto, poucos trabalhos de pesquisa foram publicados sobre fungos da Amazônia produtores desses compostos, destacando-se o de Durán et al. (2002) e Teixeira et al. (2012).

Por tudo isso, a grande diversidade de espécies de fungos Amazônicos com potencial biotecnológico, somada à necessidade de buscar novos corantes de fontes naturais e à carência de trabalhos que busquem o aproveitamento industrial de seus metabólitos, comprovam a importância de mais estudos para o conhecimento e desenvolvimento de nossa região.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O potencial biotecnológico dos fungos presentes no solo da Amazônia

Os fungos estão presentes em quase todos os ambientes da Terra, e a maior diversidade é encontrada nas regiões tropicais do mundo, cujo clima quente e úmido é favorável a sua multiplicação (BLACKWELL, 2011). Entre os biomas tropicais, a floresta Amazônica compreende a mais rica biodiversidade existente, com um grande número de plantas, animais e micro-organismos pouco conhecidos (CALDERON et al., 2009).

Os fungos destacam-se pela produção de alimentos, enzimas, álcoois, ácidos orgânicos e produtos farmacêuticos, entre eles os medicamentos (CHAKRABORTY et al., 2010). Os micro-organismos presentes no solo são particularmente importantes porque frequentemente degradam moléculas complexas presentes nesse meio, como tecidos de plantas, animais, e até mesmo pesticidas e outros xenobióticos (GADD, 2007). O ambiente afeta diretamente o metabolismo microbiano. Por isso, os fungos do solo são capazes de ativar muitas rotas metabólicas para a degradação de variados componentes, dependendo das condições do meio em que se encontram e da disponibilidade de nutrientes (PETIT et al., 2009). Eles liberam enzimas extracelulares, as quais degradam essas substâncias antes de serem internalizadas por suas células, e utilizam-nas como fonte de energia (ŠNAJDR et al., 2011).

O solo Amazônico é pobre em matéria orgânica, e o que garante a manutenção de uma floresta tão rica é a inúmera diversidade microbiana presente no solo, que reutiliza os componentes dos próprios vegetais e animais presentes no ambiente (MELO et al., 2012; SOUZA et al., 2011). Com o uso dessas substâncias ocorre a redistribuição de elementos primários, como carbono, nitrogênio, oxigênio, fósforo e outros, entre os organismos e o ambiente (GADD, 2007). Logo, os micro-organismos são muito importantes porque participam da reciclagem dos componentes da natureza através dos ciclos biogeoquímicos (PETIT et al., 2009).

Os fungos do solo têm sido extensamente isolados da natureza por sua reconhecida capacidade de produzir moléculas farmacologicamente ativas, como os antibióticos (TAKAHASHI et al., 2008). Entre os organismos vivos, os fungos filamentosos são os principais produtores de bioativos microbianos com atividade

biológica (42%), seguidos dos *Streptomyces* (32,1%) (BRAKHAGE & SCHROECKH, 2011). Trata-se de substâncias que são produtos do metabolismo secundário, ou seja, são formadas a partir dos produtos do metabolismo primário, e, em geral, são produzidos em resposta às condições de estresse sofridas pelo micro-organismo (NGUYEN et al., 2012). Esses metabólitos geralmente são produzidos durante a fase estacionária do crescimento microbiano, em que se inicia a escassez de nutrientes, e esses produtos do metabolismo começam a ser liberados por algumas cepas para bloquear o crescimento dos competidores (RUIZ et al., 2010). Por isso, muitas substâncias com potencial antimicrobiano e inibidor do crescimento celular são produzidas na disputa com organismos vizinhos em ambientes pobres em nutrientes, para matar ou atrasar o crescimento dos competidores, ou até mesmo para reduzir o seu próprio metabolismo, e assim suas necessidades energéticas (O'BRIEN & WRIGHT, 2011). Fungos endófitos ou aqueles que habitam em simbiose com artrópodes ou organismos marinhos podem produzir metabólitos para afugentar os predadores, seja através de toxicidade ou simplesmente pela produção de substâncias com sabor desagradável (DEBBAB et al., 2012; LIU et al., 2012; ROHLFS & CHURCHILL, 2011; ZHONG & XIAO, 2009). Como essas moléculas têm sido fonte de novas drogas para o mercado farmacêutico, os esforços para a purificação desses compostos têm sido maiores do que a busca pela compreensão de sua real função para o organismo produtor (O'BRIEN & WRIGHT, 2011).

Entre os fungos Amazônicos, existem trabalhos apontando a produção de compostos com atividade sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (ATHAYDE, 2011; GARBIN, 2011; LIMA, 2011; SILVA, 2010; SILVA et al., 2010; SIQUEIRA, 2011; SOUZA et al., 2004; TONIAL, 2010), leveduras de interesse médico (GARBIN, 2011; SILVA et al., 2010; TONIAL, 2010), fitopatógenos (FIGUEIREDO, 2006; SIQUEIRA, 2011) e também herbicida (SANTOS et al., 2008).

Vários fármacos existentes hoje no mercado foram obtidos a partir de produtos do metabolismo de fungos, como os antibióticos do grupo dos β -lactâmicos, tais como penicilinas, cefalosporinas e griseofulvina (CHAKRABORTY et al., 2010), drogas anticâncer como o paclitaxel, vincristina, podofilotoxina, camptotecina e hipericina (GUIMARÃES et al., 2010; KHARWAR et al., 2011), imunossupressoras como a ciclosporina A (SURVASE et al., 2011) ou antilipêmicas como as estatinas (BARREIRO & BOLZANI, 2009). Entre os metabólitos secundários estão inclusos

também peptídeos, carboidratos, lipídios, esteróides e pigmentos (O'BRIEN & WRIGHT, 2011; ROHLFS & CHURCHILL, 2011).

Acredita-se que os pigmentos sejam produzidos por uma necessidade do fungo em proteger-se contra a radiação UV (carotenóides, melanina), para atuar como co-fator em reações químicas (vitaminas), ou até mesmo para afugentar concorrentes, dado que muitos deles são descritos como antimicrobianos e citotóxicos (JALMI et al., 2012; MAPARI et al., 2005). Contudo, essas moléculas têm chamado a atenção como fontes de corantes naturais, dada a intensidade e variedade de cores produzidas por diferentes linhagens de fungos ambientais e o grande valor a elas agregado (GUNASEKARAN & POORNIAMMAL, 2008; SCHUSTER & SCHMOLL, 2010).

2.2 Corantes

2.2.1 Importância industrial

Colorantes são aditivos utilizados com a finalidade de atribuir cor. Eles podem ser classificados como pigmentos (insolúveis no meio aplicado) ou corantes (solúveis no meio aplicado), mas usualmente esses termos são empregados como sinônimos (MAPARI et al., 2010; SARON & FELISBERTI, 2006).

Arqueólogos acreditam que os colorantes passaram a ser empregados em alimentos por volta de 1500 A.C. Eram obtidos a partir de fontes naturais, como páprica, açafrão, pétalas de flores, extrato de beterraba, entre outros (BURROWS, 2009). Os corantes têm sido utilizados no mundo inteiro como aditivos em alimentos para melhorar a aceitabilidade de produtos, tornando-os mais atrativos por meio da cor (UENOJO et al., 2007; VOLP et al., 2009). Isso porque durante o processamento ou estocagem é comum a perda ou diminuição da coloração natural do mesmo, o que prejudica sua aparência frente ao consumidor (SERDAR & KNEŽEVIĆ, 2009). Também podem ser adicionados para mascarar a ausência do ingrediente natural, sugerindo sua existência no produto (KOBYLEWSKI & JACOBSON, 2012).

Atualmente, há um crescente interesse na descoberta de novas substâncias de origem natural capazes de conferir cor, uma vez que os corantes sintéticos têm sido descritos como carcinógenos, mutagênicos e causadores de alergias (GUNASEKARAN & POORNIAMMAL, 2008; MÉNDEZ et al., 2011; POLÔNIO & PERES, 2009).

É dito natural o corante que for derivado de plantas, animais, algas, micro-organismos, ou seja, que são originados de organismos vivos e obtidos por extração física ou química de seus pigmentos (MORTENSEN, 2006). Vários organismos, como bactérias, leveduras, fungos filamentosos e algumas algas são capazes de sintetizar pigmentos, mas os fungos se sobressaem por sua alta produtividade e liberação extracelular de metabólitos (HAILEI et al., 2011; MAPARI et al., 2010). O corante carmim, por exemplo, é obtido do corpo das fêmeas secas do inseto cochineal, e são necessários 14.000 artrópodes para produzir apenas 100g do corante (DAWSON, 2009; MAPARI et al., 2005). As microalgas também são capazes de excretar pigmentos, mas devido à baixa produtividade são pouco exploradas (MAPARI et al., 2005). A obtenção de corantes de origem fúngica, por sua vez, é viável por seu alto rendimento, pois não depende de efeitos sazonais, como as plantas, e permite a produção em um pequeno espaço e em larga escala (MAPARI et al., 2009; VALDUGA et al., 2009; VELMURUGAN et al., 2010b). Os corantes sintetizados em laboratório, por sua vez, não têm se mostrado uma boa alternativa, pois, em geral, ocasionam baixo rendimento do produto desejado, além de serem necessárias muitas etapas para sua síntese e alto investimento (DAWSON, 2009).

Os colorantes sintéticos enfrentam hoje uma legislação muito mais severa, que tem reduzido o número de substâncias que podem ser usadas em alimentos pelos efeitos prejudiciais à saúde a curto ou longo prazo (MAPARI et al., 2010). Isso ocorre porque os alimentos estão entre uma das principais fontes de exposição do homem a substâncias capazes de induzir ao câncer (SUTANDYO, 2010). Na Inglaterra do século XIX, por exemplo, foram vivenciados alguns abusos em relação à coloração de alimentos, como o tingimento de conservas de pickles com sulfato de cobre para a manutenção da cor verde e até mesmo uso de elementos venenosos para colorir doces e atrair a atenção de crianças, como chumbo vermelho, mercúrio, cobre e arsênio (BURROWS, 2009). Casos semelhantes ocorreram em outros países, fazendo com que os corantes sofressem, ao longo dos anos, maiores regulações por questões de segurança alimentar (SERDAR & KNEŽEVIĆ, 2009).

As substâncias pertencentes ao grupo azo são hoje o grupo de corantes sintéticos mais utilizados em todo o mundo, e são empregadas não só na indústria de tecidos, mas também na indústria de couro, plásticos, cosméticos, medicamentos e alimentos (MU et al., 2009). Apesar da toxicidade comprovada de muitos deles, esses aditivos ainda são

os mais utilizados pela indústria de alimentos, porque são mais baratos e mais estáveis frente ao pH, temperatura e exposição à luz (KANAREK, 2011).

A lista de corantes aprovados varia entre cada país, isto porque cada um deles têm sua própria agência regulatória, e assim, a sua própria lista de corantes aceitos, incluindo o limite máximo de ingestão diária. (MORTENSEN, 2006; RYMBAI et al., 2011). No Brasil, a legislação vigente admite que onze corantes sintéticos são permitidos para uso em alimentos, através das Resoluções da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) de nº382 a 388, de 9 de agosto de 1999 (BRASIL, 1999a; BRASIL, 1999b; BRASIL, 1999c; BRASIL, 1999d; BRASIL, 1999e; BRASIL, 1999f; BRASIL, 1999g). Já nos Estados Unidos são aceitos apenas nove (FDA, 2009), enquanto na União Européia são admitidos dezessete (FOOD STANDARDS AGENCY, 2012). No quadro 1, estão listados os corantes sintéticos permitidos no Brasil e sua condição em países como Estados Unidos e União Européia.

CORANTE	CLASSE	COR	BRASIL	EU	USA
Amaranto	Azo	Vermelho	INS 123	E123	Proibido
Amarelo Crepúsculo	Azo	Amarelo	INS 110	E110	FD & C Yellow N. 6
Azorrubina	Azo	Vermelho	INS 122	E122	Proibido
Azul Brilhante FCF	Trifenilmetano	Azul	INS 133	E133	FD & C Blue N. 1
Indigotina	Indigóide	Azul	INS 132	E132	FD & C Blue N. 2
Azul Patente V	Trifenilmetano	Azul	INS 131	E131	Proibido
Eritrosina	Xanteno	Vermelho	INS 127	E127	FD & C Red N. 3
Tartrazina	Azo	Amarelo	INS 102	E102	FD & C Yellow N. 5
Ponceau 4R	Azo	Vermelho	INS 124	E124	Proibido
Verde Rápido FCF	Trifenilmetano	Verde	INS 143	Proibido	FD & C Green N. 3
Vermelho 40	Azo	Vermelho	INS 129	E129	FD & C Red N. 40

Quadro 1: Corantes sintéticos para uso em alimentos permitidos no Brasil e sua situação na União Européia (EU) e Estados Unidos (USA).

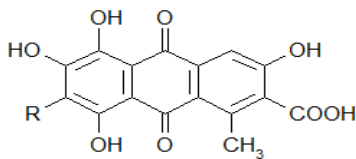
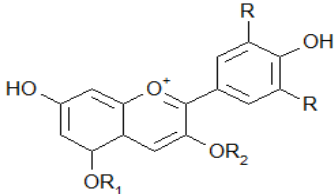
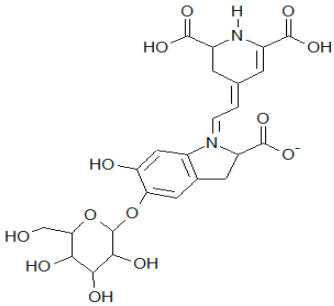
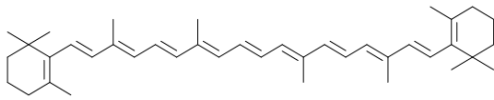
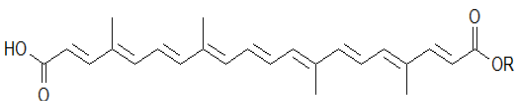
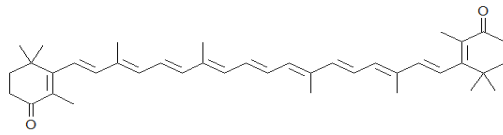
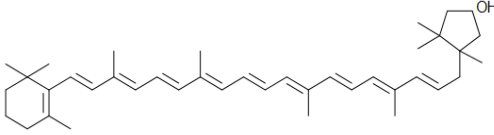
Fonte: BRASIL, 1999a a 1999e; FDA, 2009; FOOD STANDARDS AGENCY, 2012.

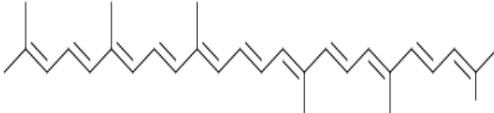
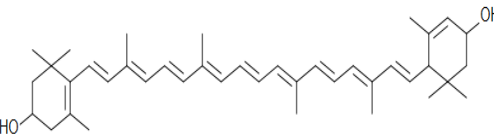
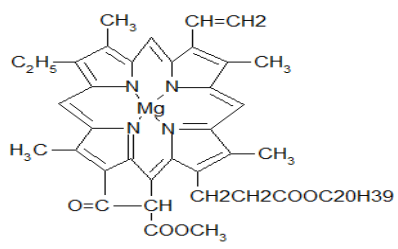
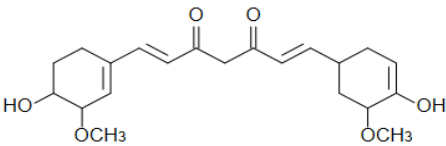
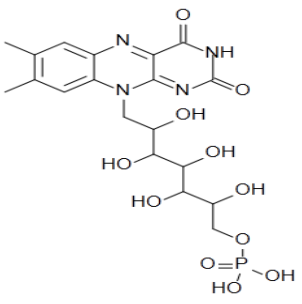
Existe muita divergência sobre os estudos que determinam carcinogenicidade nesses corantes, uma vez que eles são conduzidos pelos próprios fabricantes do produto e muitos deles não levam em consideração o seu uso a longo prazo, a exposição uterina ou as doses diárias recomendadas para crianças (KOBYLEWSKI & JACOBSON, 2010). Outrossim, grande parte dos testes aplicados verifica o potencial tóxico dos colorantes apenas *in vitro* ou em animais, e em doses muito acima das que são utilizadas pelos consumidores (HASHIM et al., 2010). Estudos mostram que o corante amarelo de tartrazina, comumente usado em medicamentos e alimentos, está relacionado ao

desenvolvimento de reações alérgicas, hiperatividade em crianças e danos no DNA de ratos (KASHANIAN & ZEIDALI, 2011). Assim como a tartrazina, os corantes vermelho 40 e amarelo crepúsculo podem ser metabolizados ao carcinógeno benzidina, um conhecido indutor de câncer em humanos e tumores em alguns experimentos com animais (POTERA, 2010). Também existem trabalhos mostrando que os corantes amaranço e eritrosina apresentaram-se genotóxicos pelo teste do cometa, mas são permitidos em baixas concentrações, as quais são presumivelmente seguras (DÜSMAN et al., 2012). Ensaio com camundongos que ingeriram grandes quantidades do corante eritrosina mostraram a propensão desses animais ao desenvolvimento de câncer de tireóide (BURROWS, 2009). Mesmo assim, as companhias alegam que a realização de novos testes é dispendiosa e desnecessária, pois o efeito prejudicial se pronuncia apenas em altas doses, muito acima daquelas que são ingeridas pelo consumidor (KOBYLEWSKI & JACOBSON, 2012).

Por isso, os colorantes sintéticos têm sido muito criticados em todo o mundo, mesmo porque são aditivos adicionados sem nenhuma finalidade nutricional, apenas com o objetivo de atribuir cor (KASHANIAN & ZEIDALI, 2011). Por outro lado, os biocolorantes assumem grande importância para a indústria, devido ao valor nutricional de alguns deles, presença de atividades farmacêuticas e consciência ambiental (CHATTOPADHYAY et al., 2008).

Os corantes naturais permitidos para uso em alimentos no Brasil, e que também são utilizados nos Estados Unidos e/ou União Européia, bem como suas fontes de obtenção, estão apresentados no quadro 2.

Pigmentos	Fonte	Tonalidade	Classe Química
Ácido carmínico/ Carmim	Corpo da fêmea seca de insetos <i>Dactylopius coccus</i> (cochineal)	Vermelho- alaranjado	Derivado poliidroxi-antraquinona 
Antocianinas	Pele de uva preta, cenoura preta, repolho vermelho, sabugueiro	Rosa à vermelho/ Azul à Lilás (varia com o pH)	Antocianidina 
Betanina	Beterraba vermelha	Roa à vermelho	Betalaína 
β-Caroteno	Azeite-de-dendê/ Fermentação pelo fungo <i>Blakeslea trispota</i>	Amarelo- alaranjado	Carotenóide 
Bixina/ Norbixina	Sementes de <i>Bixa orellana</i> (urucum)	alaranjado	Carotenóide 
Cantaxantina	Salmão, camarão e flamingos	alaranjado	Carotenóide 
Capsantina/ Capsorubina	<i>Capsicum annum</i> L. (Páprica)	alaranjado à vermelho	Carotenóide 

Licopeno	<i>Lycopersicum esculentum</i> (tomate)	Vermelho-alaranjado	Carotenóide 
Luteína	Flores da planta <i>Tagetas erecta</i>	Amarelo ouro	Carotenóide 
Clorofila e clorofilinas	Gramíneas, alfafa, urtiga e outros vegetais	Verde	Porfirina 
Curcumina	Raíz da planta <i>Curcuma longa</i> (açafrão)	Amarelo	Polifenol 
Riboflavina	Fermentação pelo fungo <i>Ashbya gossypii</i> ou semissíntese pelo uso de carboidrato (ribose)	Amarelo	Flavona 

Quadro 2: Corantes provenientes de fontes naturais autorizados para uso em alimentos no Brasil, e que também são utilizados na União Européia e/ou Estados Unidos.

Fonte: Adaptado de MAPARI et al., 2005; Contém informações de BRASIL, 1999a a 1999e; DAWSON, 2009; FDA, 2009, FOOD STANDARDS AGENCY, 2012 e MORTENSEN, 2006.

Obs: As estruturas químicas foram desenhadas com auxílio do programa BKChem.

Na indústria têxtil, a substituição de corantes sintéticos por outros de fonte não-sintética também seria viável pela diminuição da toxicidade ambiental gerada, porquanto essas indústrias utilizam extensamente os corantes como matéria-prima, e por isso, geram uma grande quantidade de resíduos tóxicos (MIRJALIL et al., 2011; VELMURUGAN et al., 2010a). Esses resíduos podem contaminar o solo e as fontes naturais de água, e são responsáveis por causar sérios problemas de poluição ambiental (ALI, 2010; MIRJALIL et al., 2011). Isso ocorre pelo fato de que esses compostos, derivados do petróleo, são em sua maioria xenobióticos, ou seja, os micro-organismos ambientais não contêm enzimas específicas para a degradação deste tipo de composto. Já os corantes naturais são biodegradados mais facilmente, o que evita o seu acúmulo na natureza (ALI, 2010; MIRJALIL et al., 2011).

Nesse contexto, pesquisas com fungos capazes de produzir corantes são relevantes para suprir as necessidades crescentes da indústria, que precisa adequar-se às exigências para a redução do uso de substâncias tóxicas (CHATTOPADHYAY et al., 2008; CHENGAIHAH *et al.*, 2010).

2.2.2 Produção de pigmentos por fungos

Fungos filamentosos pertencentes ao filo dos ascomicetos estão sendo cada vez mais estudados por sua admirável habilidade de produzir pigmentos (MAPARI et al., 2010). Entre os fungos produtores, destacam-se os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Monascus* (GUNASEKARAN & POORNIAMMAL, 2008; MÉNDEZ et al., 2011).

Monascus ruber é um fungo cosmopolita que pode ser isolado de alimentos como batata, arroz, aveia, ou até mesmo ser encontrado no solo (MOHARRAM et al., 2012). Fungos desse gênero são tradicionalmente utilizados em muitos países do sudeste da Ásia para a produção de vinhos de arroz, queijo de soja e anka ou arroz vermelho fermentado (PISAREVA & KUJUMDZIEVA, 2010). Nesses países, a substância vermelha produzida por espécies de *Monascus* é utilizada como corante de alimentos (DIKSHIT & TALLAPRAGADA, 2011). Esse fungo produz pelo menos seis tipos de pigmentos descritos na literatura: dois com coloração amarela (ankaflavina e monascina), dois com tonalidade alaranjada (rubropunctatina e monascorrubrina) e outros dois que apresentam cor vermelha (rubropunctamina e monascorrubramina) (HAMANO & KILIKIAN, 2006; KONGRUANG, 2011). Essas substâncias pertencem

ao grupo químico das azafilonas (MIYAKE et al., 2008). Os pigmentos vermelhos produzido pelas linhagens de *Monascus ruber* AUMC 4066 e AUMC 5705 têm importantes propriedades redutoras do colesterol e antioxidante (MOHARRAM et al., 2012). Além disso, melhoram a digestão e a circulação sanguínea (VOLP et al., 2009); Os pigmentos amarelos, como a monascina, têm sido relatados como potentes anti-inflamatórios (KONGRUANG, 2011). Já os pigmentos alaranjados são citados por sua atividade antimicrobiana (MIYAKE et al., 2008). Outros pigmentos descritos são as xantomonasinas A e B, monancarinas, monacolinhas e estatinas (que apresentam atividade redutora do colesterol) (MAPARI et al., 2005). Os corantes vermelhos produzidos por várias linhagens do fungo *Monascus* são os que apresentam a maior demanda, particularmente pelo seu uso como corante em carnes, em substituição aos nitratos e nitritos, reconhecidamente carcinogênicos (CHATTERJEE et al., 2009; HAMANO & KILIKIAN, 2006). Contudo, durante o processo fermentativo, esse fungo produz metabólitos tóxicos, entre eles a micotoxina citrinina, que induz hepatotoxicidade e nefrotoxicidade em humanos, e essa co-produção de pigmentos e toxinas restringe o seu uso na indústria de alimentos (DIKSHIT & TALLAPRAGADA, 2011; HAILEI et al., 2011). Por isso, apesar das azafilonas produzidas por *Monascus* spp. serem comumente usadas na Ásia para colorir alimentos, seu uso não foi aprovado nos Estados Unidos ou União Européia (MAPARI et al., 2008; DAWSON, 2009).

Além do *Monascus*, outros fungos são capazes de produzir azafilonas. Entre eles, destacam-se as espécies do gênero *Penicillium*, *Chaetomium* e *Talaromyces* (OSMANOVA & AYOUB, 2010). Os fungos do gênero *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Fusarium*, por sua vez, estão entre os mais citados como produtores de metabólitos com atividade. Existem muitos trabalhos mostrando que esses fungos podem ser isolados do solo (PETIT et al., 2009; TAKAHASHI et al., 2008), do interior de plantas (endofíticos) (DEBBAB et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2010; QIU et al., 2010), de organismos marinhos (LIU et al., 2012; TAKAHASHI & LUCAS, 2008; THIRUNAVUKKARASU et al., 2012) ou até mesmo do gelo glacial ártico (SONJAK et al., 2006; SONJAK et al., 2007).

Espécies de *Penicillium* são capazes de produzir substâncias químicas de variadas cores (GUNASEKARAN & POORNIAMMAL, 2008). Linhagens desse gênero são relatadas por sua capacidade de produzir pigmentos semelhantes aos obtidos por *Monascus*, com a vantagem de não haver a produção concomitante da micotoxina

citrinina (MAPARI et al., 2008; MÉNDEZ et al., 2011). Ademais, o *Penicillium* é um micro-organismo considerado GRAS (geralmente reconhecido como seguro) pelo FDA, devido ao seu uso por muito tempo na produção de queijos e medicamentos (SCHUBER et al., 2012). As espécies de *Penicillium* têm sido extensamente estudadas, e desde a descoberta da penicilina até hoje, muitos metabólitos secundários com potencial farmacêutico já foram identificados (PETIT et al., 2009). As linhagens *P. sclerotiorum* LAB18, *P. sclerotiorum* X11853 e *P. sclerotiorum* PSU-A13, por exemplo, produzem o pigmento esclerotiorina, uma azafilona que apresenta atividade antimicrobiana e inibidora de algumas enzimas importantes, como a aldose redutase, lipase e integrases e proteases do vírus da imunodeficiência humana HIV-1 (LUCAS et al., 2010; OSMANOVA et al., 2010; ARUNPANICHLERT et al., 2010). Muitas espécies de *Talaromyces* e *Penicillium* produzem substâncias que podem ser usadas como corantes, como o mitorubrinol, a mitorubrina, o mitorubrinal e o ácido mitorubrínico (SAMSON et al., 2011). Também foi descrita uma linhagem de *Penicillium* sp. produtora de um cromóforo do tipo antraquinona (GUNASEKARAN & POORNIAMMAL, 2008). O corante Arpink Red™ é uma antraquinona produzida por *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* e comercializada pela Ascolor Biotech da República Tcheca. (JALMI et al., 2012; MAPARI et al., 2010; TAKAHASHI & CARVALHO, 2010). Foi aprovado temporariamente para uso na União Européia e encontra-se sob avaliação pelas autoridades de segurança alimentar (MAPARI et al., 2010).

Chaetomium cupreum CC3003 isolado da Tailândia foi descrito como produtor de rotiorinóis, que são azafilonas de coloração vermelha com atividade antifúngica comparável à anfotericina (KANOKMEDHAKUL et al., 2006). Espécies do gênero *Trichoderma* são habitantes do solo e são capazes de produzir pigmentos de diversas tonalidades, que podem variar do amarelo-esverdeado ao vermelho (SCHUSTER & SCHMOLL, 2010). *Fusarium* sp. FN080326 já foi citado pela produção de fusarisetina A (JANG et al., 2011). *Fusarium* sp. LN-12 produz a azafilona fusarona (YANG et al., 2012). *F. verticillioides* isolado do solo de Chiang Mai, Tailândia, também foi referido como produtor de pigmentos da classe das naftoquinonas, com atividade citotóxica e antimicrobiana (BOONYAPRANAI et al., 2008).

Blakeslea trispora é um fungo não-toxigênico isolado de plantas tropicais, que é capaz de sintetizar β -caroteno em grandes concentrações (DUFOSSÉ, 2006). Mas

existem outras linhagens produtoras, como os fungos filamentosos *Phycomyces blakesleeanus* e *Mucor circinelloides* e as leveduras do gênero *Rhodotorula* (DUFOSSÉ, 2006; OH et al., 2009; TAKAHASHI & CARVALHO, 2010). A levedura *Phaffia rhodozyma* CBS6938 (=ATCC 96594) pode produzir grandes quantidades do carotenóide astaxantina, o mesmo pigmento que confere a coloração característica de algumas aves, crustáceos e salmão (OJIMA et al., 2006). A riboflavina (vitamina B2) pode ser sintetizada pelo fungo filamentoso *Ashbya gossypii* e é muito utilizada como corante de alimentos. (DAWSON, 2009; DUFOSSÉ, 2006).

Policetídeos de tonalidades vermelha, amarela e lilás foram encontrados em fungos Amazônicos isolados do solo, flores e serragem (DURÁN et al., 2002). Mais recentemente, o trabalho publicado por Teixeira et al. (2012) apresentou três linhagens Amazônicas (*Penicillium simplicissimum* DPUA 1379, *Penicillium melinii* S.M. 683 e *Aspergillus sclerotiorum* DPUA-585) que produziram os pigmentos xantoepocina (amarelo), atrovenetina (amarelo) e ácido neoaspergílico (amarelo-esverdeado), respectivamente, os quais apresentaram alta viabilidade econômica e baixa toxicidade. Xantoepocina é metabólito com atividade antibiótica. Sua síntese já foi descrita por outros fungos, como *Penicillium bialowiezense* EXF-1307 e *Penicillium bialowiezense* EXF-1319; (SONJAK et al., 2006), *Penicillium milanense* EX-F 2789 e *Penicillium milanense* EX-F 2793 (SONJAK et al., 2011). Atrovenetina é um corante que tem propriedades antioxidantes e é sintetizada por várias espécies de *Penicillium* (TAKAHASHI & CARVALHO, 2010). Ácido neoaspergílico já foi isolado de linhagens de fungos endófitos marinhos do gênero *Aspergillus* sp., e foi citado por suas propriedades antibacterianas e anticancerígenas (WAN et al., 2010).

Diante disso, é notória a disposição dos fungos para produzirem pigmentos provenientes do seu metabolismo com diferentes estruturas químicas (VEIGA et al., 2012). Isso advém do crescente número de cepas produtoras encontradas e versatilidade da genética microbiana (PETIT et al., 2009; SOMOZA et al., 2012).

2.3 Características químicas dos pigmentos produzidos por fungos

Uma substância química é capaz de apresentar cor quando absorve radiação eletromagnética na região do espectro visível. Isso ocorre pela presença das duplas ligações conjugadas, que apresentam alta capacidade de absorção luminosa (SARON & FELISBERTI, 2006). Os pigmentos produzidos por fungos são classificados por sua

estrutura química em dois grupos principais: policetídeos e carotenóides (MAPARI et al., 2010).

Os policetídeos compreendem um vasto grupo de substâncias, entre elas estão as quinonas (antraquinonas, hidroxiantraquinonas e naftoquinonas), flavonóides, melaninas e azafilonas (JALMI et al., 2012; MAPARI et al., 2005; MAPARI et al., 2010). A maioria dos pigmentos fúngicos pertence ao grupo dos policetídeos aromáticos poli-hidroxiados (PASTRE et al., 2007). Em geral, são formados pela condensação de unidades acetil CoA e malonil CoA, moduladas pelas enzimas policetídeo sintases, que alongam as cadeias dessas moléculas e são responsáveis pela grande diversidade de estruturas formadas (RENHE et al., 2006).

Os carotenóides constituem um grupo químico com mais de 600 estruturas distintas e estão presentes na natureza nas cores amarela, vermelha e laranja, podendo ser produzidos por organismos como plantas, algas, fungos, bactérias e alguns animais (UENOJO et al., 2007; VALDUGA et al., 2009). Eles são sintetizados através da via de biossíntese dos terpenóides, e consistem de sucessivas unidades de isopreno, unidas de maneira que os dois grupos metílicos centrais ficam separados por três carbonos, além da possível presença de estruturas cíclicas (JULSING et al., 2006). As enzimas que participam da síntese dessas estruturas são as terpeno ciclases, prenilttransferases e não-ribossomal peptídeo sintases (NRPSs) (BRAKHAGE & SCHROECKH, 2011). Elas utilizam moléculas simples do meio, como aminoácidos ou outros produtos do metabolismo primário, e constroem outras substâncias, em geral de baixo peso molecular (BRAKHAGE & SCHROECKH, 2011; (RUIZ et al., 2010).

A expressão dos genes que codificam essas enzimas depende de fatores ainda pouco conhecidos, mas sabe-se que elas podem atuar em conjunto, resultando nas variações estruturais desses compostos (PASTRE et al., 2007). Certamente a produção dessas enzimas é regulada geneticamente, mas sofre influência do ambiente no qual o micro-organismo está inserido (RUIZ et al., 2010). Sendo assim, fatores físicos como a temperatura e o pH, ou a presença de um determinado nutriente pode direcionar rotas metabólicas para a produção de compostos distintos pela mesma espécie fúngica (FURTADO et al., 2005).

2.4 Fatores que influenciam a produção de pigmentos por fungos

A produção de pigmentos ocorre durante o processo fermentativo e é influenciada pelos fatores físicos e também pela composição nutricional do meio (PISAREVA & KUJUMDZIEVA, 2010; PURWADARIA et al., 2010). Assim, uma mesma linhagem pode produzir diversas substâncias, pois sofre influência direta das condições da cultura (MIYAKE et al., 2008).

As fontes de carbono e nitrogênio influenciam no crescimento do fungo, no tipo de pigmento produzido e no rendimento da substância desejada (PISAREVA & KUJUMDZIEVA, 2010; RUIZ et al., 2010). O carbono é necessário ao metabolismo celular para a obtenção de energia e está relacionado à formação de biomassa (CHATTERJEE et al., 2009). Muitos metabólitos secundários são produzidos em resposta às condições adversas do ambiente, por isso altas concentrações de glicose podem reprimir a produção de pigmentos (MARCOLETA et al., 2011; RUIZ et al., 2010). Estudos têm mostrado a influência dos carboidratos na quantidade de colorantes produzidos por fungos ou até mesmo na depleção da produção (MARCOLETA et al., 2011; VELMURUGAN et al., 2010). As fontes nitrogenadas regulam a expressão de genes de interesse e podem ativar vias metabólicas importantes na produção de pigmentos, além de participarem da estrutura química dos mesmos, sendo um importante fator a ser considerado na produção desses compostos (CHATTERJEE et al., 2009; HAJJAJ et al., 2012). Portanto, alternativas para melhorar a produção em larga escala do pigmento fúngico, como o estudo das fontes de carbono e nitrogênio de meios de cultivo, podem diminuir os custos e aumentar o rendimento, melhorando a viabilidade da produção industrial, uma vez que são executadas muitas etapas desde o processo fermentativo até a purificação, o que pode ocasionar baixas concentrações do produto de interesse (MAPARI et al., 2010).

Diante da necessidade emergente de novos corantes para a aplicação em diversos tipos de indústrias e da grande diversidade de micro-organismos pouco conhecidos e com alto potencial biotecnológico presentes em nossa região, esse trabalho visa contribuir com a busca de pigmentos originários de fungos isolados de amostras de solo Amazônico.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- ✓ Investigar fungos do solo Amazônico com potencial para a produção de pigmentos.

3.2 Específicos

- ✓ Identificar quais fungos podem ser isolados de amostras superficiais de solo Amazônico;
- ✓ Determinar quais os isolados fúngicos possuem potencial para a produção de pigmentos;
- ✓ Caracterizar quimicamente um dos pigmentos produzidos por um isolado selecionado;
- ✓ Verificar a influência da composição do meio de cultura no rendimento do pigmento produzido pela linhagem fúngica selecionada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolamento, identificação e preservação de fungos do solo Amazônico

Foram coletadas quatro amostras de solo superficial (1-3 cm de profundidade), sob densa vegetação, oriundas da mata situada no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus-Amazonas, Brasil (Latitude-Sul 03°09'39'' e Longitude-Oeste 59°08'77''). As amostras foram colhidas a uma distância de aproximadamente 20 metros entre uma coleta e outra.

Para o isolamento, 1 g de solo foi transferido para um tubo contendo 9 mL de água destilada estéril, que foi agitado por 10 segundos. A partir desse tubo de concentração 10^{-1} g/mL, foram realizadas quatro diluições sucessivas, partindo de 10^{-2} a 10^{-5} g/mL, e 0.1mL de cada tubo foram inoculados nas placas de Petri contendo o meio de cultura ágar batata dextrose (BDA) com cloranfenicol (250 mg/L), e espalhados sobre o meio com alça de Drigalsky. O experimento foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas à temperatura ambiente (± 28 °C). As colônias que cresceram até 72 horas foram transferidas das placas para os tubos e codificadas de acordo com os padrões do laboratório. Após o crescimento em tubo, os fungos foram semeados em placas de BDA para a obtenção de colônias isoladas. Depois de isolados, os fungos foram repicados para dois tubos, um foi estocado a 4°C (tubo mãe) e o outro foi utilizado nos ensaios.

O gênero dos fungos isolados foi definido através das características macro e microscópicas das colônias, como sugerido por LACAZ et al. (2001) e BARNETT & HUNTER (1998).

4.2 Identificação das espécies dos fungos isolados através do sequenciamento da região ITS do DNAr

Foi realizada uma análise visual dos erlenmeyers após os 14 dias de fermentação e apenas os fungos que liberaram pigmentos no meio Czapeck durante esse período foram submetidos à identificação da espécie por biologia molecular.

A) O DNA fúngico foi extraído a partir do micélio. A Extração foi realizada utilizando-se o kit de extração QIAamp Tissue and Blood, Qiagen, Hilden, Germany, de acordo com as recomendações do fabricante.

B) O Espaço Interno Transcrito (ITS) foi amplificado empregando-se os primers ITS1/ITS4 (WHITE et al., 1990). A Reação de PCR teve um volume final de 50 μ L, consistindo de tampão de PCR (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.5 μ M dos primers ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 200 μ M dNTPs, 1.5 U ampli-tag DNA polimerase e 100 ng do DNA fúngico. As amostras foram levadas ao termociclador, onde após desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos foram realizados 35 ciclos, que consistiram de desnaturação do DNA a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos, e por fim foi realizada uma extensão final a 72 °C por 10 minutos. Dois controles positivos e um controle negativo foram incluídos na amplificação. Eletroforese se deu em gel de agarose 1.5 %, em tampão TBE 1X (100mM de Tris base, 100mM de ácido bórico e 2 mM de EDTA pH 8,0), acrescido de 7 μ L de Siber Green SYBR[®] Safe 0.01%. Os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta.

C) Os produtos de PCR foram purificados com polietilenoglicol, baseado no protocolo descrito por LIS & SCHLEIF (1975), com modificações de LIS (1980) e PAITHANKAR & PRASAD (1991).

D) A reação de sequenciamento foi executada com o kit BigDye[®] (Applied Biosystem). O sequenciamento foi realizado no Seq 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystem). As sequências obtidas foram comparadas com as existentes no GenBank (base de dados que incorpora sequências de DNA de todas as fontes públicas disponíveis).

4.3 Criopreservação dos fungos produtores de pigmentos

Os fungos produtores de pigmentos foram preservados utilizando-se miçangas e armazenamento a -70 °C, através de uma metodologia desenvolvida pelo laboratório de Microbiologia Médica do INPA. Nessa técnica, foram acrescidos 0.4 mL de água destilada, 0.025 mL de dimetilsulfóxido-DMSO (crioprotetor), 0.050 mL de glicerol (crioprotetor) e 10 g de miçangas (com orifício) nos criotubos, que foram autoclavados. Em seguida, aproximadamente 250 mg de pequenos fragmentos das culturas crescidas

em placas de BDA durante 7 dias, à temperatura ambiente ($\pm 28\text{ }^{\circ}\text{C}$), foram transferidas para o criotubo. Esse procedimento foi realizado em triplicata. Em seguida, os criotubos foram encaminhados à micoteca do INPA, onde foram armazenados no freezer ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$).

4.4 Bioprospecção de fungos produtores de pigmentos

Para verificar se entre os fungos isolados do solo havia algum com potencial para a produção de pigmentos, foi realizado um bioprocessamento em meio submerso. Inicialmente, os fungos isolados foram repicados para um tubo contendo BDA e incubados à temperatura ambiente ($\pm 28\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 72 horas. Após três dias, os esporos de cada fungo isolado foram suspensos com água destilada estéril (cerca de 2 mL) e quantificados em câmara de Neubauer. Essa suspensão de esporos foi utilizada para inocular frascos de erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL do caldo Czapeck contendo 3.0 g/L de NaNO_3 , 1.0 g/L de K_2HPO_4 , 0.5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L de KCl, 0.01 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30.0 g/L de sacarose e 1 L de água destilada para um pH final de 5.0 e concentração de 1×10^4 esporos/mL de meio. Os erlenmeyers foram incubados à temperatura ambiente ($\pm 28\text{ }^{\circ}\text{C}$) por 14 dias e mantidos em local escuro. A fermentação ocorreu em condições estáticas.

4.5 Extração dos pigmentos

Após 14 dias de fermentação, os meios de cultura contendo pigmentos (50 mL) foram submetidos a sucessivas extrações com hexano (30 mL), acetato de etila (30 mL) e butanol (30 mL). Após a extração foram obtidas 3 frações de cada fungo produtor para cada solvente utilizado. Foi realizada uma análise visual das frações derivadas e uma linhagem fúngica foi selecionada para posterior caracterização química, sendo escolhida aquela que produziu o maior número de frações coloridas nos solventes empregados e cujas frações eram visualmente mais intensas.

4.6 Isolamento e caracterização química do pigmento produzido pelo fungo selecionado

Usando a linhagem selecionada foram preparados 4 L do fermentado. O caldo contendo o micélio foi submetido a sucessivas extrações com 100 mL de acetato de etila, até um volume final de 2 L. O extrato foi concentrado em evaporador rotatório

(IKA RV10 digital, Santa Clara, CA, EUA) e, em seguida, fracionado por meio de cromatografia em coluna Sephadex LH-20 (h x Ø = 52.0 x 3.0 cm) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO), usando metanol 100% como eluente, do qual obtiveram-se 22 frações. A presença de pigmento de coloração laranja e o perfil da cromatografia em camada delgada (CCD), no qual as amostras foram eluídas em hexano: acetato de etila (8:2 v/v), e permitiu a escolha da fração 11 (197.3 mg) para posterior análise, adicionando-a, em seguida, a uma coluna de celulose microcristalina (hx Ø = 25,0 x 2,0 cm) (Merck, Darmstadt, Alemanha), eluída com 375 mL de hexano, seguido de 125 mL de hexano: acetato de etila (98:2 v/v), 100 mL de hexano: acetato de etila (96:4 v/v), 50 mL de hexano: acetato de etila (90:10 v/v), 75 mL de hexano: acetato de etila (70:30 v/v), 50 mL de hexano: acetato de etila (1:1 v/v), 50 mL de acetato de etila, 75 mL de acetato de etila: metanol (1:1 v/v) e 100 mL de metanol. Foram obtidas 33 frações, que foram combinadas em 13 grupos, de acordo com os resultados da CCD, em que as amostras foram eluídas em hexano: acetato de etila (8:2 v/v). As frações 9-11 foram combinadas e recristalizadas em hexano: éter etílico, originando um precipitado, o qual foi separado da água-mãe para se obter o composto **1** (sólido laranja, 6 mg). A elucidação da estrutura do pigmento foi realizada por RMN num aparelho Bruker Fourier 300; os desvios químicos (δ) foram expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz. Espectrofotômetro de UV/VIS (Modelo No. UV SP-1102) foi usado para identificar a máxima absorbância (λ_{max}) do pigmento, partindo de 320 a 700 nm.

4.7 Efeito das fontes de carbono e nitrogênio no rendimento do pigmento produzido pela linhagem selecionada

4.7.1 Efeito das fontes de carbono na produção do pigmento

Para definir qual fonte de carbono é mais favorável para a produção do pigmento, o caldo Czapeck foi preparado com os seus constituintes específicos, e somente a fonte de carbono foi modificada em cada experimento por 30 g de diferentes carboidratos: sacarose, glicose, frutose, galactose, lactose, ramnose e xilose. O bioprocessamento seguiu como descrito no item 4.4 [erlenmeyers de 250 mL, 50 mL de caldo Czapeck, sem agitação, mantidos no escuro, à temperatura ambiente ($\pm 28^\circ\text{C}$), com 14 dias de fermentação]. Para extrair o pigmento, 30 mL de acetato de etila foram adicionados ao erlenmeyer, sendo coletados após 24 horas. A análise da produção de pigmentos foi

medida por espectrofotômetro de UV/VIS (Modelo No. UV-1102 SP), através da máxima absorbância do pigmento analisado (λ_{max}), um valor proporcional à concentração do pigmento.

4.7.2 Efeito das fontes de nitrogênio na produção do pigmento

Para investigar qual fonte de nitrogênio é mais favorável para a produção do pigmento, o caldo Czapeck foi preparado com os seus constituintes específicos, e somente a fonte de nitrogênio foi modificada em cada experimento por 3 g de diferentes nitrogenados: nitrato de sódio, nitrato de potássio, peptona, extrato de malte, extrato de levedura e glutamato monossódico. O bioprocesso foi conduzido como descrito no item 4.4 [erlenmeyers de 250 mL, 50 mL de caldo Czapeck, sem agitação, mantidos no escuro, à temperatura ambiente (± 28 °C), com 14 dias de fermentação]. Para extrair o pigmento, 30 mL de acetato de etila foram adicionados ao erlenmeyer, sendo coletados após 24 horas. A análise da produção de pigmentos foi medida por espectrofotômetro de UV/VIS (Modelo No. UV-1102 SP), através da máxima absorbância do pigmento analisado (λ_{max}), um valor proporcional à concentração do pigmento.

5. RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho encontram-se expostos na forma de artigo, o qual foi submetido à revista *Process Biochemistry* em 17 de julho de 2013 e aceito com correções em 15 de outubro de 2013. Logo, eles apresentam-se nesta dissertação com a formatação exigida pela revista, porém aqui em português.

Bioprospecção de fungos do solo Amazônico com potencial para a produção de pigmentos

Jessyca dos Reis Celestino^a, Loretta Ennes de Carvalho^b, Maria da Paz Lima^c, Alita Moura Lima^d, Mauricio Morishi Ogusku^e, João Vicente Braga de Souza^e

^a *Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas - UFAM. R. Alexandre Amorin 330, 69010-300 Amazonas, Brazil.*

^b *Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Av. General Rodrigo Otavio Jordan Ramos 3000, 69077-000 Amazonas, Brazil.*

^c *Departamento de Produtos Naturais, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Av. André Araújo 2936, 69080-971 Amazonas, Brazil.*

^d *Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Av. General Rodrigo Otavio Jordan Ramos 3000, 69077-000 Amazonas, Brazil.*

^e *Departamento de Microbiologia Médica, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA. Av. André Araújo 2936, 69080-971 Amazonas, Brazil.*

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi isolar fungos do solo Amazônico capazes de produzir pigmentos. Cinquenta linhagens fúngicas foram isoladas por meio da técnica convencional de diluição em série. Para a seleção de fungos capazes de sintetizar pigmentos, foi realizada uma fermentação submersa em caldo Czapeck. Cinco linhagens foram capazes de sintetizar pigmentos na condição experimental, por isso foram submetidas à identificação por análise da sequência da região ITS do rDNA. Os fungos foram identificados como *Penicillium sclerotiorum* 2AV2, *Penicillium sclerotiorum* 2AV6, *Aspergillus calidoustus* 4BV13, *Penicillium citrinum* 2AV18 e *Penicillium purpurogenum* 2BV41. A extração das substâncias coloridas foi realizada com solventes

de polaridade crescente para cada linhagem produtora. Os pigmentos produzidos por *P. sclerotiorum* 2AV2 mostraram-se interessantes pela intensa coloração das frações obtidas, portanto, foram selecionados para o isolamento e caracterização química. O pigmento foi isolado utilizando-se coluna Sephadex LH-20, coluna de celulose microcristalina e recristalização. Os dados de RMN permitiram a identificação do pigmento esclerotiorina, um importante metabólito já descrito por sua síntese por esta e outras espécies de fungos filamentosos. Neste trabalho, estudou-se também a influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção de esclerotiorina, e verificou-se que ramnose e peptona favoreceram o aumento da produção quando utilizadas separadamente. Estes resultados indicam que a bioprospecção de fungos Amazônicos é uma alternativa para pesquisar novas fontes de corantes naturais.

Palavras-chave: Fungos Amazônicos, pigmentos, caracterização química, otimização

1. Introdução

Os fungos estão presentes em quase todos os ambientes da terra, onde a maior diversidade é encontrada nas regiões tropicais, onde o clima quente e úmido favorece a sua multiplicação [1]. Entre os biomas tropicais, a floresta Amazônica contém a mais rica biodiversidade existente, com um grande número de plantas, animais e micro-organismos pouco conhecidos [2]. O solo desta floresta, ao contrário do que se imagina, é pobre em nutrientes, e o que garante a manutenção de uma floresta tão rica é a inumerável diversidade microbiana presente no solo, que permite que a floresta se alimente dos seus próprios componentes vegetais e animais, através da reciclagem da matéria orgânica [3–5]. Por serem metabolicamente muito ativos, os fungos do solo são capazes de produzir muitas substâncias de valor econômico, incluindo enzimas de interesse industrial [6], metabólitos com atividade farmacológica [7] e também pigmentos [8].

Os corantes derivados de fontes naturais, por sua vez, têm sido cada vez mais utilizados pelas indústrias farmacêuticas, têxteis e de alimentos, por sua menor toxicidade para o meio ambiente e para o homem, quando comparados aos corantes sintéticos [9,10]. Vários organismos, como plantas, animais, bactérias, fungos e algas são capazes de sintetizar pigmentos, mas os fungos destacam-se pela possibilidade de produção em pequenos espaços e em larga escala [11,12]. Entre os fungos produtores, a

maioria pertence às espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Monascus* [8,13]. Os fungos produzem um vasto grupo de substâncias, tais como quinonas, flavonóides, melaninas e azafilonas, as quais pertencem ao grupo químico dos policetídeos aromáticos [14], e têm sido amplamente descritos por suas propriedades medicinais e potencial utilização como corantes [15,16]. Visto que muitos corantes sintéticos utilizados hoje são severamente criticados pelo potencial carcinogênico e mutagênico causado pelo seu uso a longo prazo, as legislações impõem restrições cada vez mais severas sobre os corantes sintéticos, especialmente quando se trata de aditivos alimentares [11,17]. Uma vez que a síntese química de produtos naturais não é muito viável, pois geralmente leva a altos custos e baixos rendimentos, a busca por fontes biológicas que gerem quantidades significativas de corantes para a indústria aumentou substancialmente [18].

Neste contexto, com o objetivo de aumentar a capacidade de produção de corantes naturais por fungos, fermentações em meio submerso têm sido realizadas, e os fatores que influenciam a biossíntese destes metabolitos, tais como a composição nutricional do meio de cultura, têm sido extensamente estudados [19]. As fontes de carbono e nitrogênio influenciam no crescimento do fungo, no tipo de pigmento produzido e no rendimento da substância desejada [20]. Neste trabalho, com o objetivo de investigar fungos de amostras de solo da Amazônia com potencial para a produção de pigmentos, foram realizados: (i) o isolamento e identificação de fungos do solo Amazônico produtores de pigmento, (ii) a caracterização química do pigmento produzido por um isolado selecionado, e (iii) a avaliação da influência de alguns açúcares e compostos nitrogenados na produção do pigmento isolado.

2. Materiais e Métodos

2.1 Isolamento, identificação e preservação de fungos do solo

Para o isolamento de fungos do solo, foram coletadas quatro amostras de solo superficial (1-3 cm de profundidade) derivadas da floresta localizada no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas, Brasil (Latitude-Sul 03° 09'39" e Longitude Oeste 59° 98'77"). Para o isolamento, 1 g de solo foi transferido para um tubo contendo 9 mL de água destilada estéril, o qual foi diluído seriadamente a partir de 10^{-2} a 10^{-5} g/mL e 0.1 mL de cada diluição foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar Batata Dextrose (BDA) com cloranfenicol (250 mg/L).

O experimento foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas à temperatura ambiente ($\pm 28\text{ }^{\circ}\text{C}$). Colônias que cresceram em 72 horas foram semeadas em placas de BDA até a obtenção de colônias isoladas. Os gêneros das espécies de fungos foram identificados com base nas características macro e micromorfológicas, como sugerido por Lacaz et al. [21] e Barnett e Hunter [22].

Foi realizada uma análise visual dos erlenmeyers após os 14 dias de fermentação e apenas os fungos que liberaram pigmentos no caldo Czapeck foram submetidos à identificação das espécies por biologia molecular. O DNA dos fungos foi extraído a partir do micélio. A extração foi realizada utilizando-se o kit QIAamp Tissue and Blood, Qiagen®, Hilden, Germany, de acordo com as recomendações do fabricante. O Espaço Interno Transcrito (ITS) foi amplificado empregando-se os primers ITS1/ITS4 [23]. Os produtos de PCR foram purificados com polietilenoglicol, baseado no protocolo descrito por Lis e Schleif [24], com modificações de Lis [25] e Paithankar e Prasad [26]. O sequenciamento foi realizado em Seq 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystem). As seqüências obtidas foram comparadas com as existentes no banco de dados GenBank (banco de dados que incorpora seqüências de DNA de todas as fontes públicas disponíveis).

Para preservar as linhagens isoladas capazes de sintetizar pigmentos foi utilizada uma metodologia desenvolvida pelo laboratório de Microbiologia Médica do INPA. Nessa técnica, foram adicionados 0.4 mL de água destilada, 0.025 mL de DMSO dimetilsulfóxido (crioprotetor), 0.050 mL de glicerol (crioprotetor) e 10 g de miçangas (com furo) em criotubos, que foram autoclavados. Em seguida, cerca de 250 mg de pequenos fragmentos das culturas crescidas em placas de BDA por 7 dias, à temperatura ambiente ($\pm 28\text{ }^{\circ}\text{C}$), foram transferidas para os criotubos. Este procedimento foi realizado em triplicata. Os criotubos foram enviados para a micoteca do INPA, os quais foram armazenados no freezer a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2 Bioprospecção de fungos produtores de pigmentos

Para verificar quais os fungos isolados do solo tinham algum potencial para a produção de pigmentos foi realizada uma fermentação submersa. Inicialmente, os fungos isolados foram transferidos para um tubo contendo BDA e incubados à temperatura ambiente ($\pm 28\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 72 horas. Após três dias, os esporos de cada fungo isolado foram suspensos em água destilada estéril (cerca de 2 mL) e contados em

câmara de Neubauer. Essa suspensão de esporos foi utilizada para inocular frascos de Erlenmeyer (250 mL) com 50 mL de caldo Czapeck contendo 3.0 g/L de NaNO_3 , 1.0 g/L de K_2HPO_4 , 0.5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g/L de KCl, 0.01 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30.0 g/L de sacarose, 1 L de água destilada para um pH final de 5,0 e uma concentração de 1×10^4 esporos/mL de meio. Os frascos foram incubados à temperatura ambiente ($\pm 28^\circ\text{C}$) durante 14 dias e mantidos em local escuro. A fermentação decorreu em condições estáticas. Os meios de cultura contendo pigmentos (50 mL) foram submetidos a sucessivas extrações com solventes de diferentes polaridades: hexano (30 mL), acetato de etila (30 mL) e butanol (30 mL). Após a extração foram obtidas três frações de cada solvente, para cada linhagem produtora. Em seguida, foi realizada uma análise visual dessas frações, e uma linhagem fúngica foi selecionada para a etapa de caracterização química do pigmento, sendo escolhida aquela com o maior número de frações coloridas nos solventes empregados para extração, e cujas frações obtidas continham os pigmentos visualmente mais intensos.

2.3 Isolamento e caracterização química do pigmento produzido pelo fungo selecionado

Usando a linhagem selecionada foram preparados 4 L do fermentado. O pigmento foi extraído a partir do caldo contendo o micélio. Extrações sucessivas com 100 mL de acetato de etila foram realizadas até um volume total de 2 L. O extrato foi concentrado em evaporador rotatório (IKA RV10 digital, Santa Clara, CA, EUA) e, em seguida, fracionado por meio de cromatografia em coluna Sephadex LH-20 ($h \times \varnothing = 52.0 \times 3.0$ cm) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO), usando metanol 100% como eluente, da qual obtiveram-se 22 frações. O perfil da cromatografia em camada delgada permitiu a escolha da fração 11 (197,3 mg) para posterior análise, a qual foi adicionada a uma coluna de celulose microcristalina ($h \times \varnothing = 25,0 \times 2,0$ cm) (Merck, Darmstadt, Alemanha) e eluída com gradientes de hexano: acetato de etila, acetato de etila: metanol e metanol. As frações 9-11 foram combinadas, originando um precipitado, que foi recristalizado com hexano: éter etílico para se obter o composto **1** (sólido laranja, 6 mg). A elucidação da estrutura do pigmento foi realizada por RMN num aparelho Bruker Fourier 300; os desvios químicos (δ) foram expressos em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz. Espectrofotômetro de UV/VIS (Modelo No. UV SP-1102)

foi usado para identificar a máxima absorvância ($\lambda_{\max}$) do pigmento, partindo de 320 a 700 nm.

2.4 Efeito das fontes de carbono e nitrogênio na produção de pigmentos

Para investigar a influência da composição do meio de cultura na produção do pigmento, o caldo Czapeck foi preparado com os seus constituintes específicos, e somente a fonte de carbono (30 g/L) ou nitrogênio (3 g/L) foram modificados separadamente, em cada experimento. Os açúcares avaliados foram sacarose, glicose, frutose, galactose, lactose, ramnose e xilose. As fontes de nitrogênio analisadas foram nitrato de sódio, nitrato de potássio, peptona, extrato de malte, extrato de levedura e glutamato monossódico. Os experimentos foram realizados em triplicata, onde o bioprocesso foi conduzido como descrito no item 2.2 [Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de caldo Czapeck, em condições estáticas, mantidos no escuro, à temperatura ambiente ($\pm 28^\circ\text{C}$), com 14 dias de fermentação]. Para extrair o pigmento, 30 mL de acetato de etila foram adicionados ao frasco e coletados após 24 horas. A análise da produção de pigmentos foi medida por espectrofotômetro de UV/VIS (Modelo No. UV-1102 SP), através da máxima absorvância do pigmento analisado ($\lambda_{\max}$).

3. Resultados

3.1 Isolamento e identificação de fungos do solo Amazônico

A fim de isolar micro-organismos a serem investigados para a produção de pigmentos, amostras de solo foram submetidas à diluição em série e plaqueadas em meio BDA, para a obtenção de colônias isoladas. As culturas isoladas obtidas foram identificadas como pertencentes ao filo Ascomycota. Obtiveram-se cinquenta fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Penicillium* (dezessete), *Aspergillus* (oito), *Trichoderma* (onze), *Fusarium* (dez), *Paecilomyces* (dois), *Verticillium* (um) e *Scedosporium* (um). Houve predomínio de espécies de *Penicillium* spp. compondo a microbiota do solo Amazônico nos locais onde foram colhidas as amostras, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1

Codificação e identificação do gênero dos fungos isolados do solo Amazônico.

Número de isolados	Código	Gênero	Número de isolados	Código	Gênero
1	2LIV1	<i>Fusarium</i> sp.	26	2RV26	<i>Trichoderma</i> sp.
2	2AV2	<i>Penicillium</i> sp.	27	2VV27	<i>Penicillium</i> sp.
3	2AC3	<i>Trichoderma</i> sp.	28	2VV28	<i>Trichoderma</i> sp.
4	2VV4	<i>Penicillium</i> sp.	29	2LAC29	<i>Fusarium</i> sp.
5	2LAC5	<i>Aspergillus</i> sp.	30	2RV30	<i>Trichoderma</i> sp.
6	2AV6	<i>Penicillium</i> sp.	31	2MV31	<i>Penicillium</i> sp.
7	2LAV7	<i>Fusarium</i> sp.	32	2MV32	<i>Aspergillus</i> sp.
8	2AC8	<i>Paecilomyces</i> sp.	33	2AC33	<i>Fusarium</i> sp.
9	3BV9	<i>Fusarium</i> sp.	34	2RC34	<i>Aspergillus</i> sp.
10	3BV10	<i>Verticillium</i> sp.	35	3VV35	<i>Aspergillus</i> sp.
11	3NV11	<i>Aspergillus</i> sp.	36	3BC36	<i>Penicillium</i> sp.
12	5MV12	<i>Fusarium</i> sp.	37	3VV37	<i>Fusarium</i> sp.
13	4BV13	<i>Aspergillus</i> sp.	38	3BV38	<i>Paecilomyces</i> sp.
14	4AV14	<i>Penicillium</i> sp.	39	4BV39	<i>Scedosporium</i> sp.
15	4MV15	<i>Penicillium</i> sp.	40	4BV40	<i>Trichoderma</i> sp.
16	3BV16	<i>Penicillium</i> sp.	41	2BV41	<i>Penicillium</i> sp.
17	2CC17	<i>Trichoderma</i> sp.	42	2VV42	<i>Penicillium</i> sp.
18	2AV18	<i>Penicillium</i> sp.	43	2VV43	<i>Penicillium</i> sp.
19	2NV19	<i>Aspergillus</i> sp.	44	3AC44	<i>Trichoderma</i> sp.
20	2AC20	<i>Trichoderma</i> sp.	45	3AC45	<i>Trichoderma</i> sp.
21	3AV21	<i>Trichoderma</i> sp.	46	3BC46	<i>Trichoderma</i> sp.
22	2BV22	<i>Penicillium</i> sp.	47	3VV47	<i>Penicillium</i> sp.
23	2LV23	<i>Fusarium</i> sp.	48	4BC48	<i>Fusarium</i> sp.
24	2RV24	<i>Aspergillus</i> sp.	49	4VV49	<i>Penicillium</i> sp.
25	2AC25	<i>Fusarium</i> sp.	50	5VV50	<i>Penicillium</i> sp.

3.2 Bioprospecção de fungos do solo produtores de pigmentos e identificação da espécie por biologia molecular

Para investigar linhagens produtoras de pigmentos, os fungos isolados foram submetidos à fermentação submersa em caldo Czapeck. Como resultado, verificou-se que dos cinquenta fungos testados, cinco foram capazes de sintetizar pigmentos. Os pigmentos produzidos foram extraídos após a fermentação, através da partição sucessiva com hexano, acetato de etila e butanol. Foi possível a obtenção de frações com coloração variando do amarelo ao vermelho, como exposto na Figura 1. Os cinco fungos produtores de pigmentos isolados foram identificados por amplificação do DNA

ribossomal (região de rDNA) e mostraram semelhança com as espécies *Penicillium sclerotiorum*, *Aspergillus calidoustus*, *Penicillium citrinum* e *Penicillium purpurogenum*.

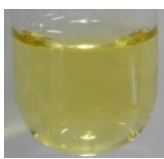
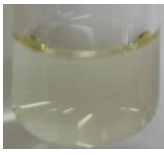
Fungos isolados a partir de amostras de solo	pH final	Hexano	Frações Acetato de Etila	Butanol
<i>Penicillium sclerotiorum</i> 2AV2	3.1			
<i>Penicillium sclerotiorum</i> 2AV6	3.3			
<i>Aspergillus calidoustus</i> 4BV13	7.5			
<i>Penicillium citrinum</i> 2AV18	4.3			
<i>Penicillium purpurogenum</i> 2BV41	5.4			

Fig. 1. Extração de pigmentos produzidos por fungos isolados do solo Amazônico com solventes de diferentes polaridades.

3.3 Caracterização química

Penicillium sclerotiorum 2AV2 liberou substâncias intensamente coloridas nos solventes utilizados para extração, por isso foi selecionado para a caracterização química de pigmentos. Os procedimentos de purificação resultaram em uma substância de cor amarelo-alaranjada. A atribuição de átomos de carbono foi realizada com base em dados de HSQC e HMBC. As correlações de longo alcance observadas (experimento de HMBC) possibilitaram a atribuição de todos os sinais de carbono da molécula. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 2) foram comparados com a (+)-esclerotiorina identificada por Paired et al. [27] e confirmaram a identificação do pigmento esclerotiorina. Varredura em espectrofotômetro mostrou que o pigmento tem uma absorbância máxima (λ_{max}) em acetato de etila a 350 nm.

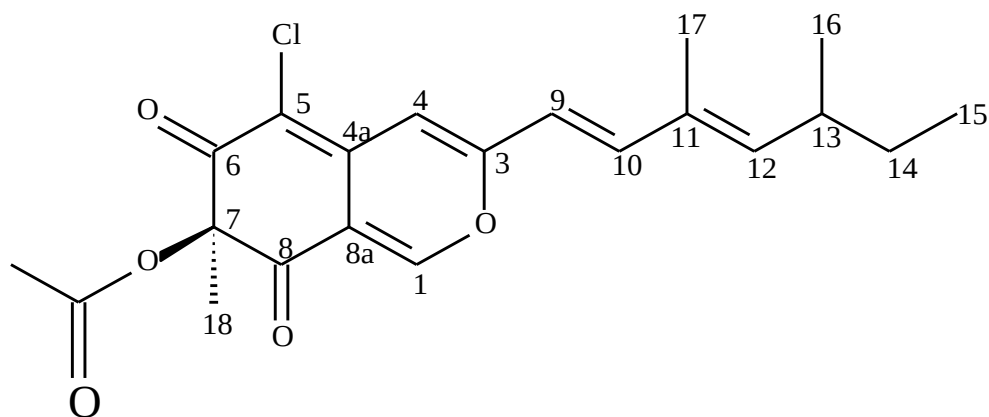


Fig 2. Estrutura química da esclerotiorina.

Tabela 2Dados de RMN para o pigmento isolado a partir de *Penicillium sclerotiorum* 2AV2.

Posição	δ_H (300 MHz, CDCl ₃)	δ_C^a (75 MHz, CDCl ₃)	Correlações de HMBC (300/75 MHz, CDCl ₃)
1	7.95 (s)	152.7	C-1, C-3, C-4a, C-9
2			
3		157.9	
4	6.66 (s)	106.7	C-3, C-5, C-8a, C-9
4a		138.8	
5		110.6	
6		191.3	
7		84.4	
8		185.8	
8a		114.0	
9	6.09 (d; $J = 15.6$ Hz)	115.7	C-3, C-4, C-11
10	7.08 (d; $J = 15.6$ Hz)	142.9	C-3, C-12
11		131.8	
12	5.72 (d; $J = 9.8$ Hz)	148.8	C-10
13	2.50 (m)	34.9	
14	1.27 (sl)	29.6	C-12
	1.40 (m)		C-16
15	0.88 (t; $J = 7.4$ Hz)	12.2	C-13, C-14
16	1.03 (d; $J = 6.6$ Hz)	20.2	C-12, C-13, C-14
17	1.86 (s)	12.2	C-10, C-11, C-12
18	1.59 (s)	22.3	C-6, C-7, C-8
COMe		170.1	
COMe	2.19 (s)	19.9	170.1

^a Baseado em dados de HSQC e HMBC.

3.4 Influência das fontes de carbono e nitrogênio para a síntese do pigmento

Para estudar a influência da composição do meio de cultivo na produção de esclerotiorina, o fungo selecionado foi cultivado no meio base Czapeck, que foi modificado com diferentes fontes de carbono ou nitrogênio em cada experimento. As fontes de carbono foram compostas por carboidratos e as fontes de nitrogênio foram representadas por sais inorgânicos ou orgânicos nitrogenados. A máxima absorbância a 350 nm foi alcançada quando a ramnose foi utilizada como açúcar no meio base durante

a fermentação (dados são mostrados na Figura 3). Peptona e extrato de levedura foram as fontes de nitrogênio que permitiram a maior absorbância no comprimento de onda analisado (λ_{max} 350 nm) (os dados são apresentados na Figura 4).

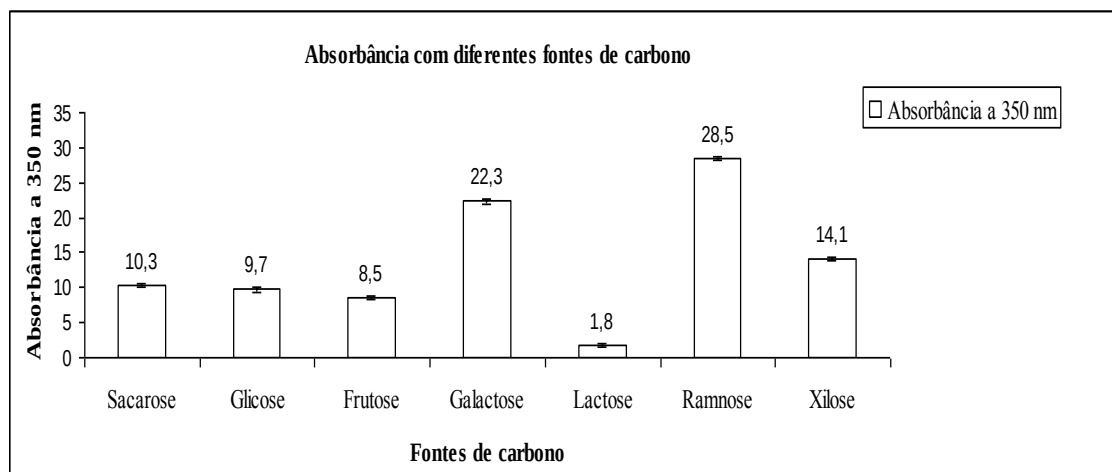


Fig. 3. Efeito de diferentes fontes de carbono na produção de esclerotiorina.

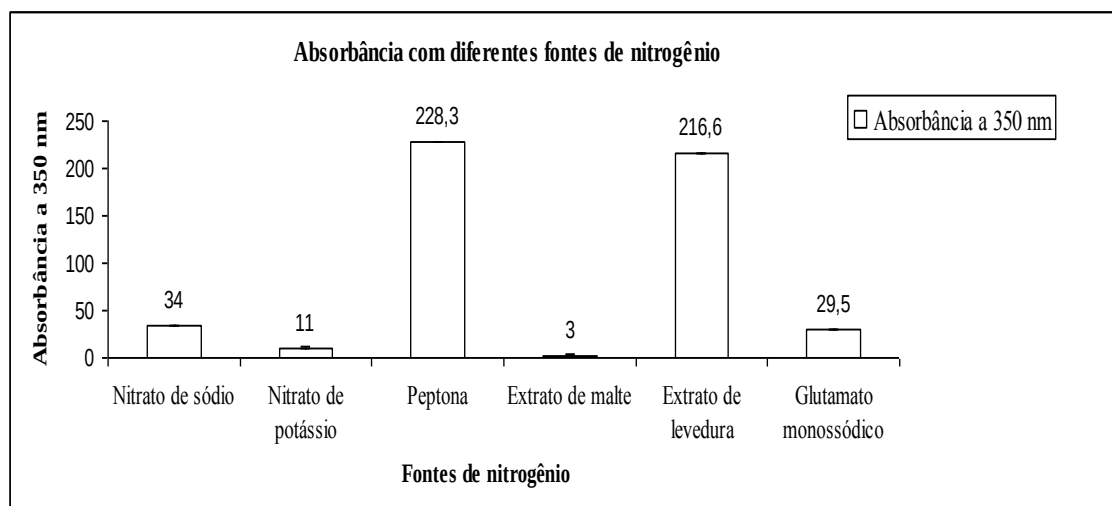


Fig. 4. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de esclerotiorina.

3. Discussão

Os fungos do solo têm sido extensamente isolados da natureza por sua reconhecida capacidade de produzir moléculas farmacologicamente ativas [7]. Esses micro-organismos têm se destacado também pela produção de pigmentos naturais para as indústrias de corantes, dada a intensidade e variedade de cores produzidas por diferentes linhagens de fungos ambientais, e o grande valor a elas agregado [8,28]. Sabendo-se que a floresta Amazônica abriga uma grande diversidade de micro-

organismos, mas que apesar disso há poucos relatos de trabalhos que busquem o aproveitamento de fungos Amazônicos capazes de produzir pigmentos, esse trabalho teve por objetivo buscar fungos do solo Amazônico capazes de produzir pigmentos.

Nesse trabalho, a identificação de micro-organismos presentes em amostras coletadas de solo revelou a existência de cinquenta fungos filamentosos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Verticillium* e *Scedosporium*. Esses fungos são cosmopolitas, e já foram isolados de amostras ambientais de solo [6,29], da água [30,31], do interior de plantas (fungos endofíticos) [32,33], de organismos marinhos [34,35] e até mesmo do gelo glacial ártico [36,37]. Diluição seriada foi empregada para o isolamento de fungos do solo. Essa é uma técnica muito usual para o isolamento de micro-organismos de amostras ambientais, já que estas frequentemente abrigam um grande número de células microbianas viáveis. Assim, para que fosse possível a obtenção de colônias isoladas, as amostras de solo Amazônico precisaram ser diluídas antes da semeadura em meios de cultivo. Por outro lado, a diluição restringiu o número de linhagens fúngicas e permitiu que apenas uma pequena fração dos fungos presentes nesse solo fossem identificadas, no local onde as amostras foram coletadas.

Das 50 linhagens isoladas, alguns fungos produziram pigmentos em caldo Czapeck durante a fermentação submersa. Os fungos produtores foram identificados através da região ITS do rDNA como *Penicillium sclerotiorum* 2AV2, *Penicillium sclerotiorum* 2AV6, *Aspergillus calidoustus* 4BV13, *Penicillium citrinum* 2AV18 e *Penicillium purpurogenum* 2BV41.

P. sclerotiorum é um reconhecido produtor de azafilonas, incluindo rotiorina, isocromofilona e esclerotiorina, sendo esta última a mais reportada para esta espécie [38,39]. Os trabalhos encontrados sobre *A. calidoustus* descrevem-no como um patógeno raro que pode causar infecções, principalmente em imunodeprimidos [40], mas que também pode produzir metabólitos de interesse industrial [41]. *P. citrinum* é produtor de cromóforos do tipo antraquinona [42], e é frequentemente descrito pela produção da micotoxina citrinina, um metabólito amarelo que induz nefrotoxicidade e hepatotoxicidade em humanos [43]. *P. purpurogenum* é produtor de azafilonas, como mitorubrina e mitorubrinol, e quinonas como purpurogenona e purpurquinonas [44,45]. Linhagem Amazônica de *P. purpurogenum* DPUA 1275 também foi descrita pela produção de substâncias coloridas [16].

Nesse trabalho, os pigmentos produzidos por *P. sclerotiorum* 2AV2 foram escolhidos para a caracterização química por apresentarem forte coloração e estarem presentes nos três solventes, indicando um fungo com boa capacidade produtiva. A substância foi identificada por RMN unidimensional e bidimensional como esclerotiorina, um pigmento amarelo-alaranjado que tem uma boa solubilidade em solventes orgânicos, tais como acetato de etila e éter, mas é insolúvel em água, sendo pela primeira vez relatada sua síntese por fungo da Amazônia.

Esclerotiorina foi originalmente isolada a partir de *Penicillium sclerotiorum* [46]; contudo também pode ser produzida por outros fungos [47-48]. Ela já foi descrita com importantes atividades biológicas, entre elas algumas podem ser citadas, como a atividade ligadora de receptores de endotelina [27], inibidora da aldose-redutase [48], antimicrobiana [39,48], atividade antifúngica [50], indutora de apoptose em células cancerosas HCT-116 [47] e efeito inibitório sobre integrases e proteases do vírus da imunodeficiência humana HIV-1 [49].

A síntese de pigmentos por fungos é diretamente influenciada pelos nutrientes disponíveis no meio, como as fontes de carbono e nitrogênio, bem como pela seleção da cepa fúngica, dada a variação interespecie [19]. Certos carboidratos ou compostos contendo nitrogênio podem ser mais facilmente assimilados por determinadas linhagens do que por outras, o que justifica os maiores ou menores rendimentos do produto desejado [20]. No presente estudo, a síntese de esclerotiorina por *Penicillium sclerotiorum* 2AV2 foi em média três vezes superior quando o meio foi preparado com o açúcar ramnose (28.5 ± 0.12), quando comparado à sacarose (10.3 ± 0.1) (açúcar usual do meio Czapeck). A galactose (22.3 ± 0.3) foi a segunda escolha para a obtenção de maiores concentrações do bioproduto. Esses resultados mostram que fontes pouco usuais nos meios de cultivo disponíveis podem elevar significativamente a síntese desse pigmento pela linhagem fúngica *P. sclerotiorum* 2AV2 isolada de amostra do solo Amazônico. A lactose, por sua vez, é uma fonte de carbono conveniente para muitos micro-organismos [50]. Contudo, para a linhagem estudada, causou um elevado declínio da produção da substância de interesse (1.8 ± 0.03).

Os resultados indicam que a influência das fontes nitrogenadas sobre a síntese de esclerotiorina foi muito superior à exercida pelos carboidratos. A literatura descreve as fontes nitrogenadas como muito importantes na síntese de pigmentos

porque regulam a expressão de genes de interesse e podem ativar vias metabólicas importantes na produção desses compostos [51]. No presente estudo, peptona (228.3 ± 0.05) e extrato de levedura (216.6 ± 0.1) foram os nitrogenados que mais favoreceram o rendimento do pigmento quando comparadas ao nitrato de sódio (fonte de nitrogênio usual do meio Czapeck), apresentando um rendimento mais de seis vezes superior ao meio Czapeck convencional (34.6 ± 0.07). A peptona é comumente usada em vários meios de cultura, e muitos fungos parecem ter a habilidade de utilizá-la durante o metabolismo, conduzindo a uma maior produção de pigmentos [52]. Além de nitrogênio, os compostos nitrogenados orgânicos fornecem ao meio de cultivo carbono, enxofre e possibilitam a obtenção de energia pelo fungo. Extratos de levedura e malte, por sua vez, fornecem também vitaminas e coenzimas, favorecendo o crescimento dos micro-organismos mais exigentes. Porém, de maneira geral, sabe-se que a produção de pigmentos é favorecida quando o meio contém fontes nitrogenadas, em especial as de origem orgânica [53]. No presente estudo, constatamos que extrato de levedura apresentou resultado compatível com a peptona, elevando a síntese de esclerotiorina. Porém, o uso de extrato de malte, para a linhagem fúngica em estudo, causou repressão da produção (3.0 ± 0.04). Em fermentação que avaliou o uso de peptona, malte e arroz como fonte de nitrogênio para *P. sclerotiorum* LAB18 isolado a partir de amostras de solo do Cerrado brasileiro, a peptona também foi o nutriente que mais aumentou a produção do pigmento esclerotiorina, enquanto os demais mostraram baixos níveis de produção [54]. No presente trabalho, quando uma nova fermentação em meio submerso foi preparada com ramnose e peptona (as fontes de carbono e nitrogênio que mais aumentaram a produção da esclerotiorina quando modificadas do meio base Czapeck), sob as mesmas condições da fermentação descritas anteriormente, a leitura da máxima absorbância (λ_{max}) a 350 nm foi de 69 ± 0.15 , mostrando que a combinação reprimiu a síntese da esclerotiorina em comparação com o bioprocessamento que utilizou apenas peptona (228.3 ± 0.05) sem modificar o açúcar usual do meio Czapeck (sacarose). Como já foi mencionado acima, a peptona é uma fonte nitrogenada orgânica, por isso também fornece moléculas de carbono, deixando o meio de cultivo provido de muitos nutrientes. O uso da ramnose, nesse caso, deixou o meio ainda mais rico e isso pode ter ocasionado o fenômeno da repressão catabólica, no qual a presença de duas ou mais fontes facilmente assimiláveis pelo fungo pode reprimir a produção do metabólito de interesse.

Considerando os resultados encontrados, conclui-se que os fungos do solo da Amazônia podem ser potenciais produtores de pigmentos. Dos 50 isolados fúngicos, 5 espécies destacaram-se pela síntese de compostos coloridos em caldo Czapeck, sendo elas pertencentes aos gêneros *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. Esclerotiorina foi isolada a partir de *Penicillium sclerotiorum* 2AV2, sendo um importante pigmento que ainda não havia sido descrito para linhagens Amazônicas. Através da padronização de fontes de carbono e nitrogênio foi possível aumentar a produção dessa substância. No entanto, mais estudos são necessários para otimizar a produção pelo fungo selecionado. Diante desses resultados, conclui-se que a grande diversidade de micro-organismos da Amazônia com potencial biotecnológico e a necessidade crescente de novos biocolorantes para a indústria demonstram a importância de mais estudos de bioprospecção.

Referências

- [1] Blackwell M. The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. *Am J Bot* 2011; 98:426–38.
- [2] Calderon AL, Silva-Jardim I, Zuliani JP, Silva AA, Ciancaglini P, Da Silva LHP, et al. Amazonian biodiversity: a view of drug development for leishmaniasis and malaria. *J Braz Chem Soc* 2009; 20:1011–23.
- [3] Melo VS, Desjardins T, Silva Jr ML, Santos ER, Sarrazin M, Santos MMLS. Consequences of forest conversion to pasture and fallow on soil microbial biomass and activity in the eastern Amazon. *Soil Use Manage* 2012; 28:530–5.
- [4] Petit P, Lucas EMF, Abreu LM, Pfenning LH, Takahashi JA. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Electron J Biotechn* 2009; 12:8–9.
- [5] De Souza JV, Lima AM, Martins ESDJ, Salem JI. Anti-mycobacterium activity from culture filtrates obtained from the dematiaceous fungus C10. *J Yeast Fungal Res* 2011; 2:39–43.
- [6] Kulkarni P, Gupta N. Screening and evaluation of soil fungal isolates for xylanase production. *Rec Res Sci Tech* 2013; 5:33–6.
- [7] Takahashi JA, De Castro MCM, Souza GG, Lucas EMF, Bracarense AAP, Abreu LM, et al. Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. *J. Mycol Med* 2008; 18:98–204.

- [8] Gunasekaran S, Poorniammal R. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp. under submerged cultivation. *Afr J Biotechnol* 2008; 7:1894–8.
- [9] Ali H. Biodegradation of synthetic dyes—a review. *Water Air Soil Pollut* 2010; 213:251–73.
- [10] Chengaiah B, Rao KM, Kumar KM, Alagusundaram M, Chetty CM. Medicinal importance of natural dyes—a review. *Int J Pharm Tech Res* 2010; 2:144–54.
- [11] Mapari SAS, Thrane U, Meyer AS. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? *Trends Biotechnol* 2010; 28:300–7.
- [12] Mortensen A. Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure Appl Chem* 2006; 78:1477–91.
- [13] Méndez A, Pérez C, Montañéz JC, Martínez G, Aguilar CN. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 2011; 12:961–8.
- [14] Pastre R, Marinho AMR, Rodrigues-Filho E, Souza AQL, Pereira JO. Diversity of polyketides produced by *Penicillium* species isolated from *Melia azedarach* and *Murraya paniculata*. *Quim Nova* 2007; 30:1867–71.
- [15] Kongruang S. Growth kinetics of biopigment production by Thai isolated *Monascus purpureus* in a stirred tank bioreactor. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2011; 38:93–9.
- [16] Teixeira MFS, Martins MS, Da Silva JC, Kirsch LS, Fernandes OCC, Carneiro ALB, et al. Amazonian biodiversity: pigments from *Aspergillus* and *Penicillium*—characterizations, antibacterial activities and their toxicities. *Curr Trends Biotechnol Pharm* 2012; 6:300–11.
- [17] Kobylewski S, Jacobson MF. Toxicology of food dyes. *Int J Occup Environ Health* 2012; 18:220–246.
- [18] Dawson TL. Biosynthesis and synthesis of natural colours. *Color Technol* 2009; 125:61–73.
- [19] Mukherjee G, Singh SK. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Process Biochem* 2011; 46:188–192.
- [20] Pisareva EI, Kujumdzieva AV. Influence of carbon and nitrogen sources on growth and pigment production by *Monascus Pilosus* C₁ strain. *Biotechnol & Biotechnol Eq special edition/on line* 2010; 501–6.
- [21] Lacaz C, Porto E, Martins J. Microbiologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. 8^a ed. São Paulo: Sarvier, 2001.

- [22] Barnett HL, Hunter BB. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4^a ed. USA: Burgess Publishing Co., 1998.
- [23] White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315–322. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. (Eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press, 1990.
- [24] Lis JT, Schleif R. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. Nucl Acids Res 1975; 2:383–90.
- [25] Lis JT. Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. Methods Enzymol 1980; 65:347–53.
- [26] Paithankar KR, Prasad KS. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. Nucl Acids Res 1991; 19:1346.
- [27] Pairet L, Wrigley SK, Chetland I, Reynolds EE, Hayes MA, Holloway J, et al. Azaphilones with endothelin receptor binding activity produced by *Penicillium sclerotiorum*: taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity. J Antibiot 1995; 48:913–23.
- [28] Schuster A, Schmoll M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 87:787–99.
- [29] Vancov T, Keen B. Amplification of soil fungal community DNA using the ITS86F and ITS4 primers. FEMS Microbiol Lett 2009; 296:91–6.
- [30] Gomes DNF, Cavalcanti MAQ, Fernandes MJS, Lima DMM, Passavante JZO. Filamentous fungi isolated from sand and water of “Bairro Novo” and “Casa Caiada” beaches, Olinda, Pernambuco, Brazil. Braz J Biol 2008; 68:577–82.
- [31] Hussain T, Ch MI, Hussain A, Mehmood T, Sultana K, Ashraf M. Incidence of fungi in water springs of Samahni Valley, District Bhimber, Azad Kashmir, Pakistan. International Journal of Biology 2010; 2:94–101.
- [32] Debbab A, Aly AM, Proksch P. Bioactive secondary metabolites from endophytes and associated marine derived fungi. Fungal Divers 2011; 49:1–12.
- [33] Guimarães DO, Borges WS, Vieira NJ, De Oliveira LF, Da Silva CHTP, Lopes NP, et al. Diketopiperazines produced by endophytic fungi found in association with two Asteraceae species. Phytochemistry 2010; 71:1423–9.
- [34] Liu X, Chen C, He W, Huang P, Liu M, Wang Q, et al. Exploring anti-TB leads from natural products library originated from marine microbes and medicinal plants. Antonie Van Leeuwenhoek 2012; 102:447–61.

- [35] Wiese J, Ohlendorf B, Blümel M, Schmaljohann R, Imhoff JF. Phylogenetic identification of fungi isolated from the marine sponge *Tethya aurantium* and identification of their secondary metabolites. *Mar Drugs* 2011; 9:561–85.
- [36] Sonjak S, Uršič V, Frisvad J, Gunde-Cimerman N. *Penicillium* mycobiota in arctic subglacial ice. *Microb Ecol* 2006; 52:207–16.
- [37] Sonjak S, Uršič V, Frisvad J, Gunde-Cimerman N. *Penicillium svalbardense*, a new species from Arctic glacial ice. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2007; 92:43–51.
- [38] Eade RA, Page H, Robertson A, Turner K, Whalley WB. 986. The chemistry of fungi. Part XXVIII. Sclerotiorin and its hydrogenation products. *J Chem Soc* 1957; 4913–24.
- [39] Lucas EMF, De Castro MCM, Takahashi JA. Antimicrobial properties of sclerotiorin, isochromophilone vi and pencolide, metabolites from a Brazilian cerrado isolate of *Penicillium sclerotiorum* van Beyma. *Braz J Microbiol* 2007; 38:785–9.
- [40] Varga J, Houbraken J, Van Der Lee HA, Verweij PE, Samson RA. *Aspergillus calidoustus* sp. nov., causative agent of human infections previously assigned to *Aspergillus ustus*. *Eukaryot Cell* 2008; 7:630–8.
- [41] Finefield JM, Frisvad JC, Sherman DH, Williams RM. Fungal origins of the bicyclo[2.2.2]diazaoctane ring system of prenylated indole alkaloids. *J Nat Prod* 2012; 75:812–33.
- [42] Malmstrøm J, Christophersen C, Frisvad JC. Secondary metabolites characteristic of *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* and related species. *Phytochemistry* 2000; 54:301–9.
- [43] Dikshit R, Tallapragada P. *Monascus purpureus*: a potential source for natural pigment production. *J Microbiol Biotech Res* 2011; 1:164–74.
- [44] Espinoza-Hernández TC, Rodríguez-Herrera R, Aguilar-González CN, Lara-Victoriano F, Reyes-Valdés MH, Castillo-Reyes F. Characterization of three novel pigment-producing *Penicillium* strains isolated from the Mexican semi-desert. *Afr J Biotechnol* 2013; 12:3405–13.
- [45] Wang H, Wang Y, Wang W, Fu P, Liu P, Zhu W. Anti-influenza virus polyketides from the acid-tolerant fungus *Penicillium purpurogenum* JS03-21. *J Nat Prod* 2011; 74: 2014–8.
- [46] Curtin TM, Reilly J. Sclerotiorin, C₂₀H₂₀O₅Cl, a chlorine-containing metabolic product of *Penicillium sclerotiorum* van Beyma. *Biochem J* 1940; 34:1419–1421.
- [47] Giridharan P, Verekar SA, Khanna A, Mishra PD, Deshmukh SK. Anticancer activity of sclerotiorin, isolated from an endophytic fungus *Cephalotheca faveolata* Yaguchi, Nishim. & Udagawa. *Indian J Exp Biol* 2012; 50:464–8.

- [48] Chidananda C, Rao LJM, Sattur AP. Sclerotiorin, from *Penicillium frequentans*, a potent inhibitor of aldose reductase. *Biotechnol Lett* 2006; 28:1633–6.
- [49] Arunpanichlert J, Rukachaisirikul V, Sukpondma Y, Phongpaichit S, Tewtrakul S, Rungjindamai N, et al. Azaphilone and isocoumarin derivatives from the endophytic fungus *Penicillium sclerotiorum* PSU-A13. *Chem Pharm Bull* 2010; 58:1033–6.
- [50] Aksu Z, Eren AT. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochem* 2005; 40:2985–91.
- [51] Chatterjee S, Maity S, Chattopadhyay P, Sarkar A, Laskar S, Sen SK. Characterization of red pigment from *Monascus* in submerged culture red pigment from *Monascus Purpureus*. *J Appl Sci Res* 2009; 5:2102–8.
- [52] Quereshi S, Pandey AK, Singh J. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Phoma herbarum* (FGCC#54) under submerged cultivation. *J Phyto* 2010; 9:1–8.
- [53] Pradeep FS, Begam MS, Palaniswamy M, Pradeep BV. Influence of culture media on growth and pigment production by *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 isolated from paddy field soil. *World Appl Sci J* 2013; 22:70–7.
- [54] Lucas EMF, Machado Y, Ferreira AA, Dolabella LMP, Takahashi JA. Improved production of pharmacologically-active sclerotiorin by *Penicillium sclerotiorum*. *Trop J Pharm Res* 2010; 9:365–71.

6. CONCLUSÕES

- ✓ Foi possível o isolamento de fungos filamentosos pertencentes ao filo Ascomycota a partir de amostras de solo Amazônico;
- ✓ Os fungos isolados do solo pela técnica da diluição seriada eram pertencentes aos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Verticillium* e *Scedosporium*, os quais têm sido frequentemente isolados de amostras ambientais;
- ✓ As espécies codificadas e identificadas como *Penicillium sclerotiorum* 2AV2, *Penicillium sclerotiorum* 2AV6, *Aspergillus calidoustus* 4BV13, *Penicillium citrinum* 2AV18 e *Penicillium purpurogenum* 2BV41 produziram pigmentos quando submetidas à fermentação submersa em meio Czapeck;
- ✓ Uma substância amarelo-alaranjada produzida por *Penicillium sclerotiorum* 2AV2 foi caracterizada quimicamente como esclerotiorina, sendo este pigmento já descrito pela produção por linhagens isoladas de outras regiões, que não a Amazônica;
- ✓ Os experimentos realizados para verificar a influência do meio de cultivo sobre o rendimento da esclerotiorina mostraram que a modificação das fontes de carbono e nitrogênio pode exercer grande influência sobre o aumento ou diminuição da síntese do pigmento, pela cepa fúngica estudada;
- ✓ Por tudo isso, esse trabalho de bioprospecção espera ter contribuído para o enriquecimento das pesquisas sobre linhagens Amazônicas produtoras de pigmentos, demonstrando a necessidade de mais estudos que visem acrescentar conhecimento sobre a biodiversidade local e explorar seu potencial biotecnológico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALI, H. Biodegradation of synthetic dyes - a review. **Water Air Soil Pollut**, v. 213, n. 1-4, p. 251-273, 2010.
2. ARUNPANICHLERT, J; RUKACHAISIRIKUL, V; SUKPONDMA, Y; PHONGPAICHIT, S; TEWTRAKUL, S; RUNGJINDAMAI, N; SAKAYAROJ, J. Azaphilone and isocoumarin derivatives from the endophytic fungus *Penicillium sclerotiorum* PSU-A13. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, n.8, p. 1033-1036, 2010.
3. ATHAYDE, M. Citotoxicidade e atividade antimicrobiana de extratos de duas cepas do fungo *Pycnopus sanguineus* oriundas da Amazônia. 2011. 51f. Tese (Doutorado em Odontologia na área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba.
4. BARREIRO, E; BOLZANI, V. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
5. BARROS NETO, B; SCARMINIO, I; BRUNS, R. Planejamento e otimização de experimentos. Campinas: Ed. Unicamp, 1995.
6. BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426–438. 2011.
7. BOONYAPRANAI, K; TUNGPRADIT, R; LHIEOCHAIPHANT, S; PHUTRAKUL, S. Optimization of submerged culture for the production of naphthoquinones pigment by *Fusarium verticillioides*. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 35, n. 3, p. 457-466, 2008.
8. BRAKHAGE, A; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites – strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 1, p. 15-22, 2011.
9. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 13: Molhos e condimentos. Resolução nº 382, de 5 de agosto de 1999a.

10. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 7: Produtos de panificação e biscoitos. Resolução nº 383, de 5 de agosto de 1999b.
11. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 3: Gelados comestíveis. Resolução nº 384, de 5 de agosto de 1999c.
12. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 6: Cereais e produtos de ou a base de cereais. Resolução nº 385, de 5 de agosto de 1999d.
13. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Aprova o "Regulamento técnico sobre aditivos utilizados segundo as boas práticas de fabricação e suas funções". Resolução nº 386, de 5 de agosto de 1999e.
14. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 5: Balas, confeitos, bombons, chocolates e similares. Resolução nº 387, de 05 de agosto de 1999f.
15. BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 19: Sobremesas. Resolução nº 388, de 5 de agosto de 1999g.
16. BURROWS, J. Palette of our palates: a brief history of food coloring and its regulation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 8, n. 4, p. 394-408, 2009.
17. CALDERON, L; SILVA-JARDIM, I; ZULIANI, J; SILVA, A; CIANCAGLINI, P; SILVA, L; STÁBELI, R. Amazonian Biodiversity: A View of Drug Development for Leishmaniasis and Malaria. *Journal of the Brazillian Chemical Society*, v. 20, n. 6, p. 1011-1023, 2009.
18. CHAKRABORTY, S; GHOSH, U; CHAKRABORTY, S. Fungi: Its importance in biotechnology -A review on its past, present and future prospects. *Journal of Pharmacy Research*, v. 3, n. 12, p. 3059-3060, 2010.

19. CHATTERJEE, S; MAITY, S; CHATTOPADHYAY, P; SARKAR, A; LASKAR, S; KUMAR SEN, S. Characterization of red pigment from *Monascus* in submerged culture red pigment from *Monascus Purpureus*. ***Journal of Applied Sciences Research***, v. 5, n. 12, p. 2102-2108, 2009.
20. CHATTOPADHYAY, P; CHATTERJEE, S; SEN, S. Biotechnological potential of natural food grade biocolorants. ***African Journal of Biotechnology***, v. 7, n. 17, p. 2972-2985, 2008.
21. CHENGAIHAH, B; MALLIKARJUNA RAO, K; MAHESH KUMAR, K; ALAGUSUNDARAM, M; MADHUSUDHANA CHETTY, C. Medicinal importance of natural dyes a review. ***International Journal of PharmTech Research***, v. 2, n. 1, p. 144-154, 2010.
22. CHEQUER, F; DORTA, D; OLIVEIRA, D. Azo dyes and their metabolites: does the discharge of the azo dye into water bodies represent human and ecological risks? ***Advances in treating textile effluent***, p. 28-48, 2011.
23. CLARK, F. Agar-plate method for total microbial count. In: C.A. BLACK; D. EVANS; J.L. WHITE; L.E. ENSMINGER; F.E. CLARK & R.C. DINAUER (eds.). *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*, p. 1460-1466, New York, 1965.
24. DAWSON, T. Biosynthesis and synthesis of natural colours. ***Coloration Technology***, v. 125, n. 2, p. 61-73, 2009.
25. DEBBAB, A; ALY, A; PROKSCH, P. Bioactive secondary metabolites from endophytes and associated marine derived fungi. ***Fungal Diversity***, v. 49, n. 1, p. 1-12, 2011.
26. DIKSHIT, R; TALLAPRAGADA, P. *Monascus purpureus*: a potencial source for natural pigment production. ***Journal of Microbiology and Biotechnology Research***, v. 1, n. 4, p. 164-174, 2011.
27. DUFOSSÉ, L. Microbial production of food grade pigments. ***Food Technology and Biotechnology***, v. 44, n. 3, p. 313-321, 2006;
28. DURÁN, N; TEIXEIRA, M; DE CONTI, R; ESPÓSITO, E. Ecological-friendly pigments from fungi. ***Critical Reviews in Food Science and Nutrition***, v. 42, n. 1, p. 53-66, 2002.

29. FDA. Color Additive Status List (2009). Disponível em: <<http://www.fda.gov/ForIndustry/ColorAdditives/ColorAdditiveInventories/ucm10662.htm>>. Acesso em 4 de janeiro de 2012.

30. FIGUEIREDO, J. Bioprospecção, caracterização morfológica e molecular de endófitos de *Maytenus ilicifolia*, com ênfase em *Pestalotiopsis* spp. 2006. 152f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Patologia e Parasitologia) – Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

31. FOOD STANDARDS AGENCY. Current EU approved additives and their E Numbers (2012). Disponível em: <http://www.food.gov.uk/policy-advice/additivesbranch/enumberlist#anchor_2> Current EU approved additives and their E Numbers. Acesso em 4 de janeiro de 2012.

32. FURTADO, N; FONSECA, M; BASTOS, J. The potential of an *aspergillus fumigatus* brazilian strain to produce antimicrobial secondary metabolites. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 357-362, 2005.

33. GADD, G. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. **Mycological Research**, v. 111, n. 1, p. 3-49, 2007.

34. GARBIN, V. Análise da atividade antimicrobiana dos extratos dos frutos, óleos das sementes e fungos isolados da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius 1824). 2011. 86f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Patologia e Parasitologia) – Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

35. GUIMARÃES, D; BORGES, W; VIEIRA, N; OLIVEIRA, L; SILVA, C; LOPES, N; DIAS, L; DURÁN-PATRÓN, R; COLLADO, I; PUPO, M. Diketopiperazines produced by endophytic fungi found in association with two Asteraceae species. **Phytochemistry**, v. 71, n. 11, p. 1423–1429, 2010.

36. GUNASEKARAN, S; POORNIAMMAL, R. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp. Under submerged cultivation. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1894-1898, 2008.

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

38. HAJJAJ, H; FRANCOIS, J; GOMA, G; BLANC, P. Effect of amino acids on red pigments and citrinin production in *Monascus ruber*. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 3, p. 156-159, 2012.
39. HAMANO, P; KILIKIAN, B. Production of red pigments by *monascus ruber* in culture media containing corn steep liquor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 443-449, 2006.
40. HASHEM, M; ATTA, A; ARBID, M; NADA, S; ASAAD, G. Immunological studies on amaranth, sunset yellow and curcumin as food colouring agents in albino rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 6, p. 1581–1586, 2010.
41. HORISAWA, S; SAKUMA, Y; DOI, S. Qualitative and quantitative PCR methods using species-specific primer for detection and identification of Wood rot fungi. **The Japan Wood Research Society**, v. 55, n. 2, p. 133-138, 2009.
42. JALMI, P; BODKE, P; WAHIDULLAH, S; RAGHUKUMAR, S. The fungus *Gliocephalotrichum simplex* as a source of abundant, extracellular melanin for biotechnological applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 505-512, 2012.
43. JANG, J; ASAMI, Y; JANG, J; KIM, S; MOON, DO; SHIN, K; HASHIZUME, D; MUROI, M; SAITO, T; OH, H; KIM, BY; OSADA, H; AHN, J. Fusarisetin A, an acinar morphogenesis inhibitor from a soil fungus, *Fusarium* sp. FN080326. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 18, p. 6865-6867, 2011.
44. JIMENEZ, P; FORTIER, S; LOTUFO, T; PESSOA, C; MORAES, M. E; MORAES, M. O; COSTA-LOTUFO, L. Biological activity in extracts of ascidians (Tunicata, Ascidiacea) from the northeastern Brazilian coast. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 287, n. 1, p. 93-101, 2003.
45. JULSING, M; KOULMAN, A; HERMAN J. WOERDENBAG, H; QUAX, W; KAYSER, O. Combinatorial biosynthesis of medicinal plant secondary metabolites. **Biomolecular Engineering**, v. 23, n. 6, p. 265-279, 2006.
46. KANAREK, R. Artificial food dyes and attention deficit hyperactivity disorder. **Nutrition Reviews**, v. 69, n. 7, p. 385-391, 2011.
47. KANOKMEDHAKUL, S; KANOKMEDHAKUL, K; NASOMJAI, P; LOUANGSYSOUPHANH, S; SOYTONG, K; ISOBE, M; KONGSAEREE, P;

- PRABPAI, S; SUKSAMRARN, A. Antifungal Azaphilones from the Fungus *C. cupreum* CC3003. **Journal of natural products**, v. 69, n. 6, p. 891-895, 2006.
48. KASHANIAN, S; ZEIDALI, S. DNA binding studies of tartrazine food additive. **DNA and Cell Biology**, v. 30, n. 7, p. 499-505, 2011.
49. KHARWAR, R; MISHRA, A; GOND, S; STIERLE, A; STIERLE, D. Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 7, p. 1208–1228, 2011.
50. KOBYLEWSKI, S; JACOBSON, M. Food dyes: A rainbow of risks. Washington, D. C.: Center for Science in the Public Interest. 2010.
51. KOBYLEWSKI, S; JACOBSON, M. Toxicology of food dyes. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v.18, n. 3, p. 220-246, 2012.
52. KONGRUANG, S. Growth kinetics of biopigment production by Thai isolated *Monascus purpureus* in a stirred tank bioreactor. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 93-99, 2011.
53. LACAZ, C; PORTO, E; MARTINS, J. Microbiologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. 8ª ed. São Paulo: Sarvier, 2001.
54. LIMA, A.M.; SALEM, J.I.; SOUZA, J.V.B.; CORTEZ, A.C.A; CARVALHO, C.M.; CHAVES, F.C.M. and VEIGA Jr., V.F. Effects of culture filtrates of endophytic fungi obtained from *Piper aduncum* L. on the growth of *Mycobacterium tuberculosis*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 1-6, 2011.
55. LIS, J. Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. **Methods in enzymology**, v. 65, n. 1, p. 347-353, 1980.
56. LIS, J; SCHLEIF, R. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. **Nucleic acids research**, v. 2, n. 3, p. 383-390, 1975.
57. LIU, X; CHEN, C; HE, W; HUANG, P; LIU, M; WANG, Q; GUO, H; BOLLA, K; LU, Y; SONG, F; DAI, H; LIU, M; ZHANG, L. Exploring anti-TB leads from natural products library originated from marine microbes and medicinal plants. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 102, n. 3, p. 447-461, 2012.

58. LUCAS, E; MACHADO, Y; FERREIRA, A; DOLABELLA, L; TAKAHASHI, J. Improved production of pharmacologically-active sclerotiorin by *Penicillium sclerotiorum*. ***Tropical Journal of Pharmaceutical Research***, v. 9, n. 4, p. 365-371, 2010.
59. MAPARI, S; HANSEN, M; MEYER, A; THRANE, U. Computerized screening for novel producers of *Monascus*-like food pigments in *Penicillium* species. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 56, n. 21, p. 9981-9989, 2008.
60. MAPARI, S; MEYER, A; THRANE, U. Colorimetric characterization for comparative analysis of fungal pigments and natural food colorants. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 54, n. 19, p. 7027-7035, 2006.
61. MAPARI, S; MEYER, A; THRANE, U. Photostability of natural orange-red and yellow fungal pigments in liquid food model systems. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 57, n. 14, p. 6253-6261, 2009.
62. MAPARI, S; NIELSEN, K; LARSEN, T; FRISVAD, J; MEYER, A; THRANE, U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. ***Current Opinion in Biotechnology***, v. 16, n. 2, p. 231-238, 2005.
63. MAPARI, S; THRANE, U; MEYER, A. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? ***Trends in Biotechnology***, v. 28, n. 6, p. 300-307, 2010.
64. MARCOLETA, A; NIKLITSCHKE, M; WOZNIAK, A; LOZANO, C; ALCAÍNO, J; BAEZA, M; CIFUENTES, V. "Glucose and ethanol-dependent transcriptional regulation of the astaxanthin biosynthesis pathway in *Xanthophyllomyces dendrorhous*". ***BMC Microbiology***, p. 1-11, v. 190, 2011.
65. MELO, V; DESJARDINS, T; SILVA JR, M; SANTOS, E; SARRAZIN, M; SANTOS, M. Consequences of forest conversion to pasture and fallow on soil microbial biomass and activity in the eastern Amazon. ***Soil Use and Management***, v. 28, n. 4, p. 530-535, 2012.
66. MÉNDEZ, A; PÉREZ, C; MONTAÑÉZ, J; MARTÍNEZ, G; AGUILAR, C. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. ***Journal of Zhejiang University SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)***, v. 12, n. 12, p. 961-968, 2011.

67. MENEZES, J; LUPATINI, M; ANTONIOLLI, Z; BLUME, E; JUNGES, E; MANZONI, C. Variabilidade genética na região do ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n.1, p. 132-139, 2010.

68. MICHAELSEN, A; PINZARI, F; RIPKA, K; LUBITZ, W; PINAR, G. Application of molecular techniques for identification of fungal communities colonising paper material. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 58, n. 3-4, p. 133-141, 2006.

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

70. MIYAKE, T; KONO, I; NOZAKI, N; SAMMOTO, H. Analysis of pigment compositions in various *Monascus* cultures. **Food Science and Technology Research**, v. 14, n. 2, p. 194-197, 2008.

71. MOHARRAM, A; MOSTAFA, E; ISMAIL, M. Chemical profile of *Monascus ruber* strains. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, n. 4, p. 490-499, 2012.

72. MORTENSEN, A. Carotenoids and other pigments as natural colorants. **Pure and Applied Chemistry**, v. 78, n. 8, p. 1477-1491, 2006.

73. MU, Y; RABAEY, K; ROZENDAL, R; YUAN, Z; KELLER, J. Decolorization of azo dyes in bioelectrochemical systems. **Environmental Science Technology**, v. 43, n. 13, p. 5137-5143, 2009.

74. NAKAYAMA, G; CATON, M; NOVA, M; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*. **Journal of Immunological Methods**, v. 204, n. 2, p. 205-208, 1997.

75. NGUYEN, Q; MERLO, M; MEDEMA, M; JANKEVICS, A; BREITLING, R; TAKANO, E. Metabolomics methods for the synthetic biology of secondary metabolism. **FEBS Letters**, v. 586, n. 15, p. 2177-2183, 2012.

76. O'BRIEN, J; WRIGHT, G. An ecological perspective of microbial secondary metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 552-558, 2011.

77. OH, J; JEONG, H; OH, S. Characterization of optimal growth conditions and carotenoid production of strain *Rhodotorula mucilaginosa* HP isolated from larvae of *Pieris rapae*. **Entomological Research**, v. 39, n. 6, p. 380-387, 2009.
78. OJIMA, K; BREITENBACH, J; VISSER, H; SETOGUCHI, Y; TABATA, K; HOSHINO, T; BERG, J; SANDMANN, G. Cloning of the astaxanthin synthase gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*) and its assignment as a *b*-carotene 3-hydroxylase/4-ketolase. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 275, n. 2, p.148-158, 2006.
79. OSMANOVA, N; SCHULTZE, W; AYOUB, N. Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 2, p. 315-342, 2010.
80. PAITHANKAR, K; PRASAD, K. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 6, p. 1346, 1991.
81. PASSARINI, M; SANTOS, C; LIMA, N; BERLINCK, R; SETTE, L. Filamentous fungi from the Atlantic marine sponge *Dragmacidon reticulatum*. **Archives of Microbiology**, v. 195, n. 2, p. 99-111, 2013.
82. PASTRE, R; MARINHO, A; RODRIGUES-FILHO, E. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1867-1871, 2007.
83. PETIT, P; LUCAS, E; ABREU, L; PFENNING, L; TAKAHASHI, J. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. Isolated from Brazilian cerrado soil. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 1-9, 2009.
84. PETTI, C. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. **Medical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 1108-1114, 2007.
85. PISAREVA, E; KUJUMDZIEVA, A. Influence of carbon and nitrogen sources on growth and pigment production by *Monascus Pilosus* C₁ strain. **Biotechnology & Biotechnoogical Equipment**, special edition/on line, p. 501-506, 2010.
86. POLÔNIO, M; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, n. 8, p. 1653-1666, 2009.

87. POTERA, C. Diet and nutrition: the artificial food dye blues. *Environmental Health Perspectives*, v. 118, n. 10, p. A428, 2010.
88. PURWADARIA, T; GUNAWAN, L; GUNAWAN, A. The production of nata colored by *Monascus purpureus* J1 pigments as functional food. *Microbiology Indonesia*, v. 4, n. 1, p. 6-10, 2010.
89. QIU, M; XIE, R; SHI, Y; ZHANG, H; CHEN, H. Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* L. *Annals of Microbiology*, v. 60, n. 1, p. 143-150, 2010.
90. RENHE, I; VOLP, A; VIDIGAL, J; STRINGHETA, P. *Monascus* na nutrição e saúde. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 17, n. 3, p. 337-343, 2006.
91. RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycology*, v. 42, p.265-270, 1950.
92. ROHLFS, M; CHURCHILL, A. Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. *Fungal Genetics and Biology*, v. 48, n. 1, p. 23-34, 2011.
93. ROMANELLI, A; SUTTON, D; THOMPSON, E; RINALDI, M; WICKES, B. Sequence-based identification of filamentous basidiomycetous fungi from clinical specimens: a cautionary note. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 3, p. 741-752, 2010.
94. RUIZ, B; CHÁVEZ, A; FORERO, A; GARCÍA-HUANTE, Y; ROMERO, A; SÁNCHEZ, M; ROCHA, D; SÁNCHEZ, B; RODRÍGUEZ-SANOJA, R; SÁNCHEZ, S; LANGLEY, E. Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 36, n. 2, p. 146-167, 2010.
95. RYMBAL, H; SHARMA, R; SRIVASTAV, M. Biocolorants and its implications in health and food industry - A Review. *International Journal of PharmTech Research*, v. 3, n. 4, p. 2228-2244, 2011.
96. SAMSON, R; YILMAZ, N; HOUBRAKEN, J; SPIERENBURG, H; SEIFERT, K; PETERSON, S; VARGA, J; FRISVAD, J. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in Mycology*, v. 70, n.1, p. 159-183, 2011.

97. SANTOS, L; OLIVEIRA, M; GUILHON, G; SANTOS, A; FERREIRA, I; LOPES-JÚNIOR, M; ARRUDA, M; SAILVA, M; SOUZA FILHO, A; RODRIGUES-FILHO, E; OLIVEIRA, M. Potencial herbicida da biomassa e de substâncias químicas produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii*. **Planta Daninha**, v. 26, n. 3, p. 539-548, 2008.
98. SARON, C; FELISBERTI, M. Ação de colorantes na degradação e estabilização de polímeros. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 124-128, 2006.
99. SCHUBER, L; CRUZ, M; BONFIM, T; BRAND, D; PASTORE, G; ALMEIDA, M. Isolamento e seleção de fungos produtores de β -galactosidase. **Evidência**, v. 12 n. 1, p. 19-40, 2012.
100. SCHUSTER, A; SCHMOLL, M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 787-799, 2010.
101. SILVA, J; FERNANDES, O; MARTINS, M; RODRIGUES JR, A; TEIXEIRA, M. Atividade antimicrobiana de espécies de *Penicillium* mantidas sob duas condições de preservação. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 30, n. 1, p. 48-54, 2010.
102. SILVA, A; FONSECA, S; ARRAIS, P; FRANCELINO, E. Presença de excipientes com potencial para indução de reações adversas em medicamentos comercializados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 397-405, 2008.
103. SERDAR, M; KNEŽEVIĆ, Z. Simultaneous LC analysis of food dyes in soft drinks. **Chromatographia**, v. 70, n. 9, p. 1519-1521, 2009.
104. SILVA, N. Avaliação do potencial antimicrobiano, enzimático e crescimento de um isolado amazônico do fungo *Pycnoporus sanguineus*. 2010. 157f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) – Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus.
105. SILVEIRA, S; DAROIT, D; SANT'ANNA, V; BRANDELLI, A. Stability modeling of red pigments produced by *Monascus purpureus* in submerged cultivations with sugarcane bagasse. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 4, p. 1007-1014, 2011.
106. SIQUEIRA, D. Bioprospecção de fungos amazônicos com atividade antifúngica frente aos fitopatógenos de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke).

2011. 73f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) – Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus.
- 107.SOMOZA, A; LEE, K; CHIANG, Y; OAKLEY, B; WANG, C. Reengineering an azaphilone biosynthesis pathway in *Aspergillus nidulans* to create lipoxygenase inhibitors. **Organic Letters**, v. 14, n. 4, p. 972-975, 2012.
- 108.SONJAK, S; URSIC, V; FRISVAD, J; GUNDE-CIMERMAN, N. *Penicillium* mycobiota in arctic subglacial ice. **Microbial Ecology**, v. 52, n. 2, p. 207-216, 2006.
- 109.SONJAK, S; URSIC, V; FRISVAD, J; GUNDE-CIMERMAN, N. *Penicillium svalbardense*, a new species from Arctic glacial ice. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 92, n. 1, p. 43-51, 2007.
- 110.SONJAK, S; LICEN, M; FRISVAD, J; GUNDE-CIMERMAN, N. The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia. **Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 373-376, 2011.
- 111.SOUZA, J; LIMA, A; MARTINS, E; SALEM, J. Anti-mycobacterium activity from culture filtrates obtained from the dematiaceous fungus C10. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 2, n. 3, p. 28-32, 2011.
- 112.SOUZA, J; SILVA, E; SILVA, F; PAIVA, T. Fungal treatment of a delignification effluent from a nitrocellulose industry. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 1, p. 1936–1942, 2005.
- 113.SOUZA, A. Q; SOUZA, A. D; ASTOLFI FILHO, S; PINHEIRO, M; SARQUIS, M; PEREIRA, J. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. **Acta Amazônica**, v. 34, n. 2, p. 185-195, 2004.
- 114.ŠNAJDR, J; DOBIÁŠOVÁ, P; VĚTROVSKÝ, T; VALÁŠKOVÁ, V; ALAWI, A; BODDY, L; BALDRIAN, P. Saprotrophic basidiomycete mycelia and their interspecific interactions affect the spatial distribution of extracellular enzymes in soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v.78, n. 1, p. 80-90, 2011.
- 115.SURVASE, S; KAGLIWAL, L; ANNAPURE, U; SINGHAL, R. Cyclosporin A - A review on fermentative production, downstream processing and

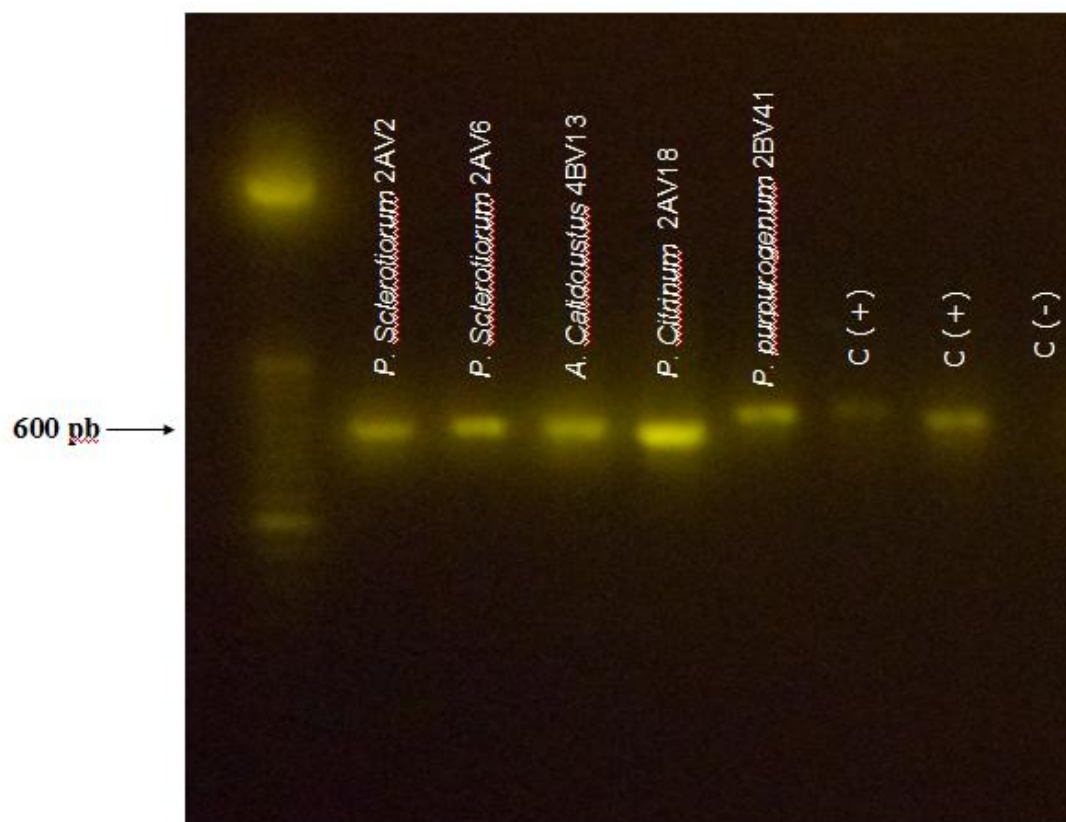
- pharmacological applications. *Biotechnology Advances*, v. 29, n. 4, p. 418-435, 2011.
- 116.SUTANDYO, N. Nutritional Carcinogenesis, *Acta Medica Indonesiana: The Indonesian Journal of Internal Medicine*, v. 42, n. 1, p. 36-42, 2010.
- 117.TAKAHASHI, J; CARVALHO, S. Nutritional potential of biomass and metabolites from filamentous fungi. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, p. 1126-1135, 2010.
- 118.TAKAHASHI, J; CASTRO, M; SOUZA, G; LUCAS, E; BRACARENSE, A; ABREU, L; MARRIEL, I; OLIVEIRA, M; FLOREANO, M; OLIVEIRA, T. Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. *Journal de Mycologie Médicale*, v. 18, n. 4, p. 198-204, 2008.
- 119.TAKAHASHI, J; LUCAS, E. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. *Química Nova*, v. 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.
- 120.TAN, M; GAN, D; WEI, L; PAN, Y; TANG, S; WANG, H. Isolation and characterization of pigment from *Cinnamomum burmannii* peel. *Food Research International*, v. 44, n. 7, p. 2289-2294, 2011.
- 121.TEIXEIRA, M; MARTINS, M; SILVA, J; KIRSCH, L; FERNANDES, O; CARNEIRO, A; CONTI, R; DURÁN, N. Amazonian biodiversity: pigments from *Aspergillus* and *Penicillium*-characterizations, antibacterial activities and their toxicities. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, v. 6, n. 3, p. 300-311, 2012.
- 122.THIRUNAVUKKARASU, N; SURYANARAYANAN, T; GIRIVASAN, K; VENKATACHALAM, A; GEETHA, V; RAVISHANKAR, J; DOBLE, M. Fungal symbionts of marine sponges from Rameswaram, southern India: species composition and bioactive metabolites. *Fungal Diversity*, v. 55, n. 1, p. 37-46, 2012.
- 123.TONIAL, F. Atividade antimicrobiana de endófitos e de extratos foliares de *Schinus terebenthifolius* Raddi (Aroeira). 2010. 138f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Patologia e Parasitologia) – Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

- 124.UENOJO, M; MARÓSTICA JÚNIOR, M; PASTORE, G. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007.
- 125.VALDUGA, E; TATSCH, P; TIGGEMANN, L; TREICHEL, H; TONIAZZO, G; ZENI, J; DI LUCCIO, M. Produção de carotenóides: micro-organismos como fonte de pigmentos naturais. *Química Nova*, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.
- 126.VEIGA, T; NIJLAND, J; DRIESSEN, A; BOVENBERG, R; TOUW, H; VAN DEN BERG, M; PRONK, J; DARAN, J. Impact of velvet complex on transcriptome and penicillin G production in glucose-limited chemostat cultures of a *b*-lactam high-producing *Penicillium chrysogenum* strain. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, v. 16, n. 6, p. 320-333, 2012.
- 127.VELMURUGAN, P; KAMALA-KANNAN, S; BALACHANDAR, V; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P; CHAE, J; OH, B. Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. *Carbohydrate Polymers*, v. 79, n. 2, p. 262-268, 2010a.
- 128.VELMURUGAN, P; LEE, Y; VENIL, C; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P; CHAE, J; OH, B. Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 109, n. 4, p. 346–350, 2010b.
- 129.VOLP, A; RENHE, I; STRINGUETA, P. Pigmentos naturais bioativos. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v.20, n.1, p. 157-166, 2009.
- 130.WAN, X; ZHU, F; CHEN, G; LI, H; TAN, S; PAN, Y; HONG, Y. Biological evaluation of neoaspergillilic acid, a pyrazine hydroxamic acid produced by mixed cultures of two marine-derived mangrove epiphytic fungi. In: **3rd International Conference on Biomedical Engineering and Informatics (BMEI)**, v. 55, p. 1932-1935, 2010.
- 131.WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p. 315–322. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J. (Eds.). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, 1990.
- 132.YANG, S; GAO, J; LAATSCH, H; TIAN, J; GPESCITELLI, G. Absolute configuration of fusarone, a new azaphilone from the endophytic fungus

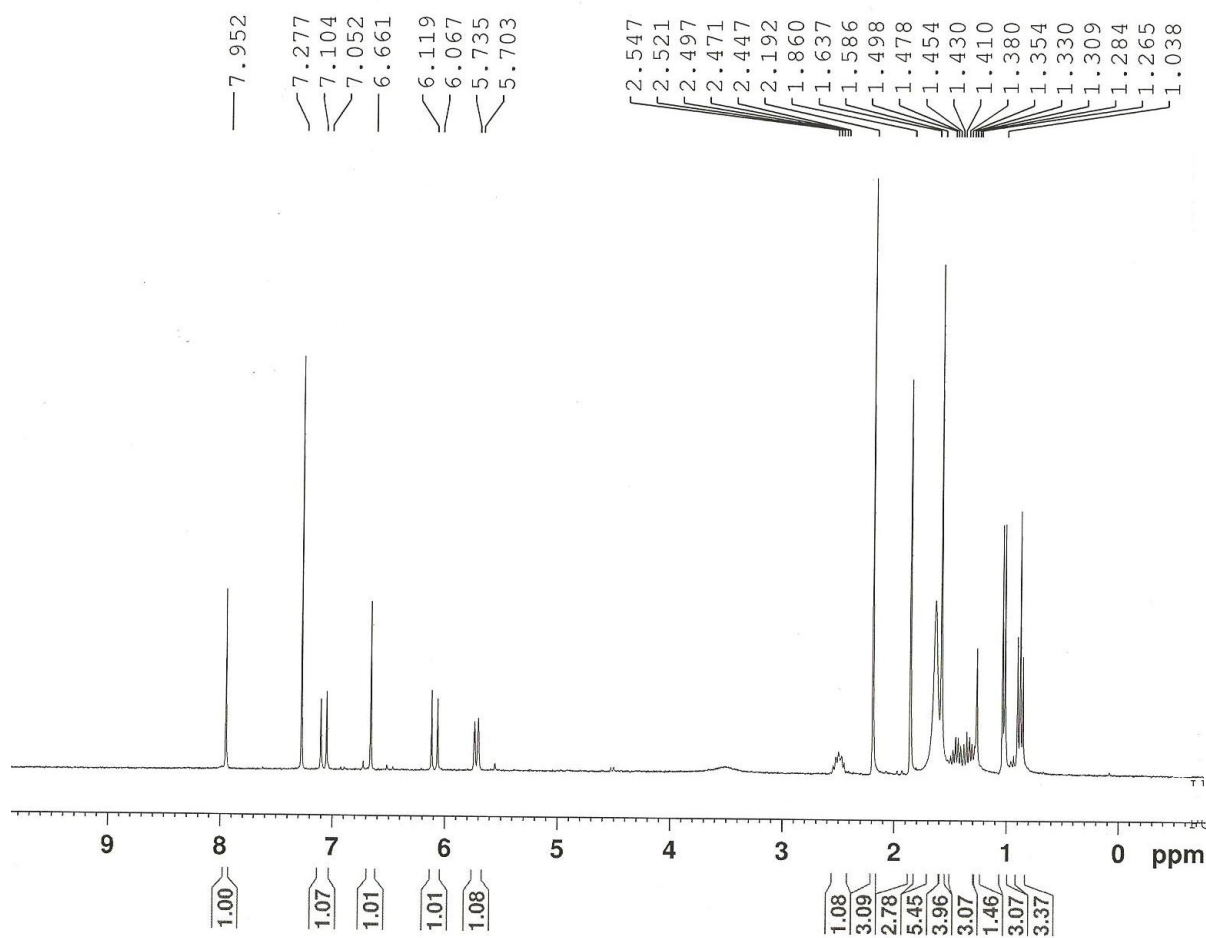
Fusarium sp. isolated from *Melia azedarach*, and of related azaphilones. **Chirality**, v. 24, n. 8, p. 621–627, 2012.

133. ZHONG, J; XIAO, J. Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction. **Biotechnology in China I**, v. 113, p. 79-150, 2009.

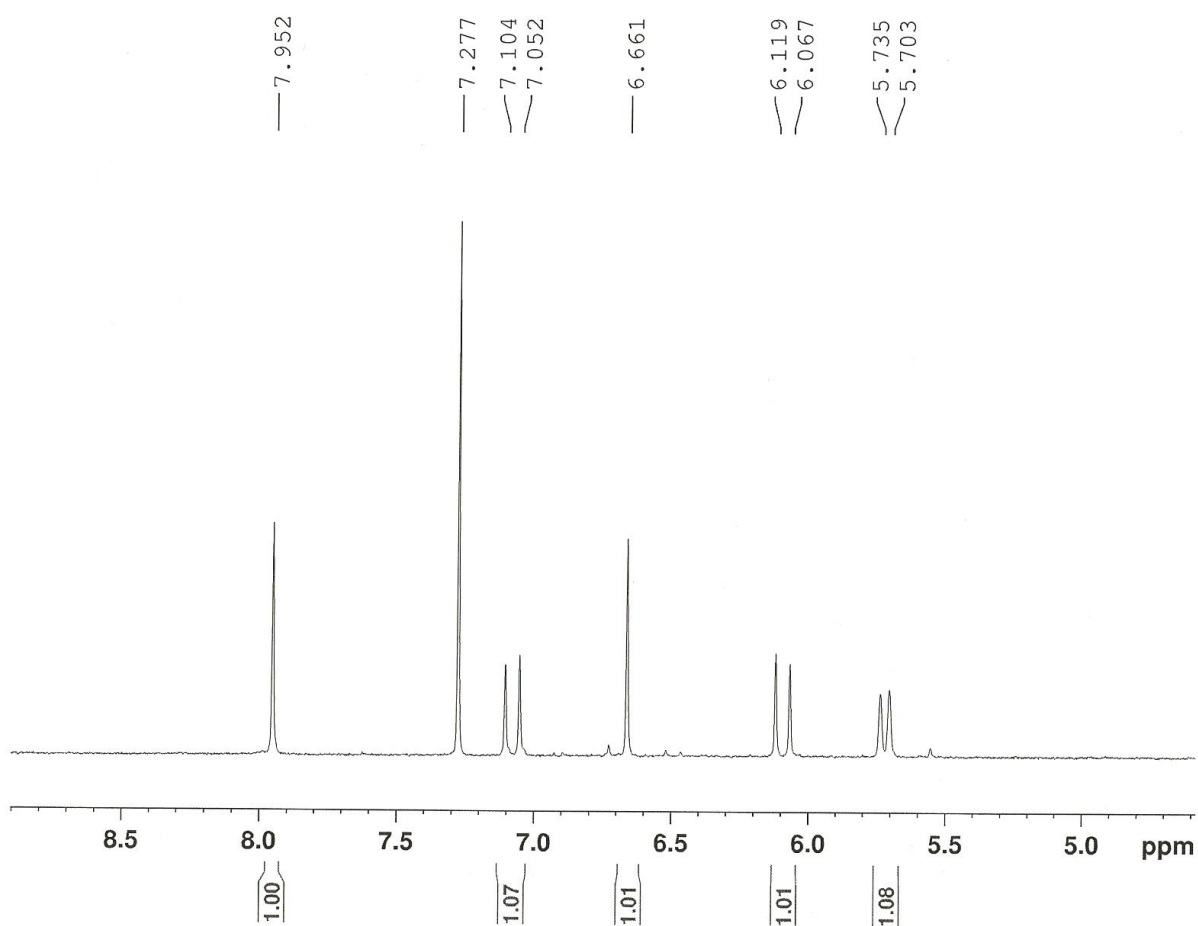
APÊNDICE A – Produtos de amplificação por PCR da região ITS do rDNA dos fungos produtores de pigmentos, visualizados em gel de agarose 1.5 % e corados com Sybersafe Invitrogen 0.01%.



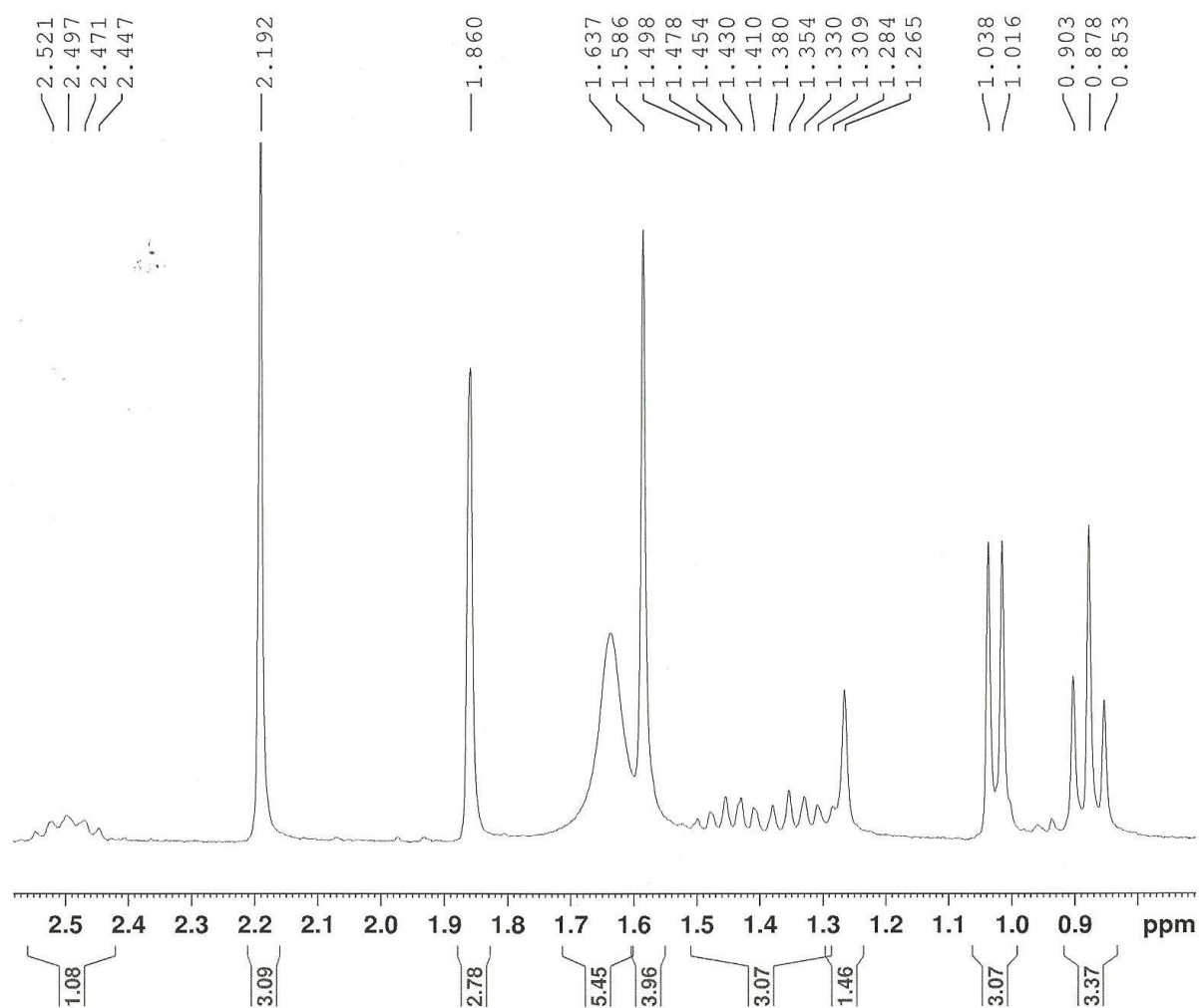
APÊNDICE B – Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) do pigmento isolado esclerotiorina.



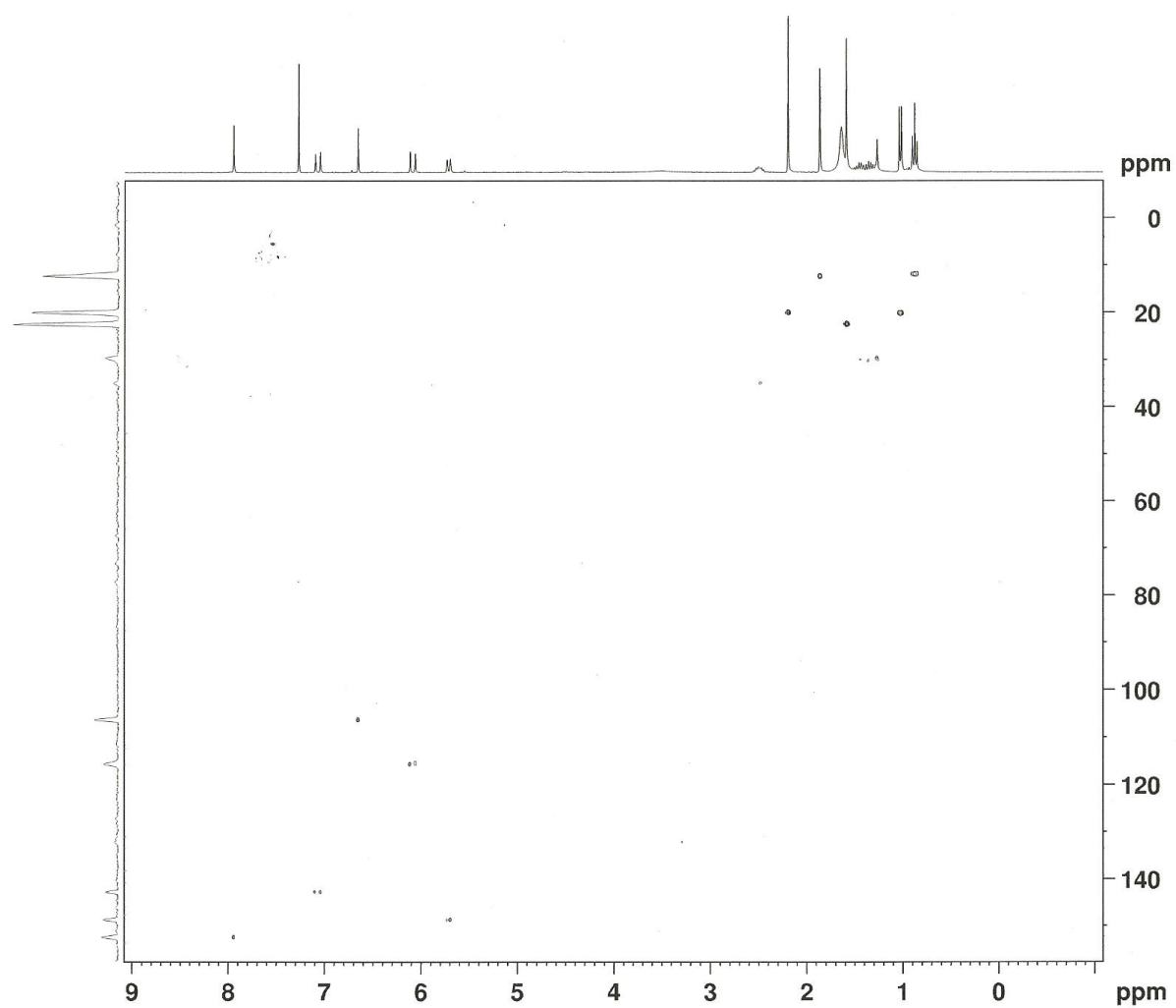
APÊNDICE C – Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) expandido na região entre 8.5 a 5.0 ppm do pigmento isolado esclerotiorina.



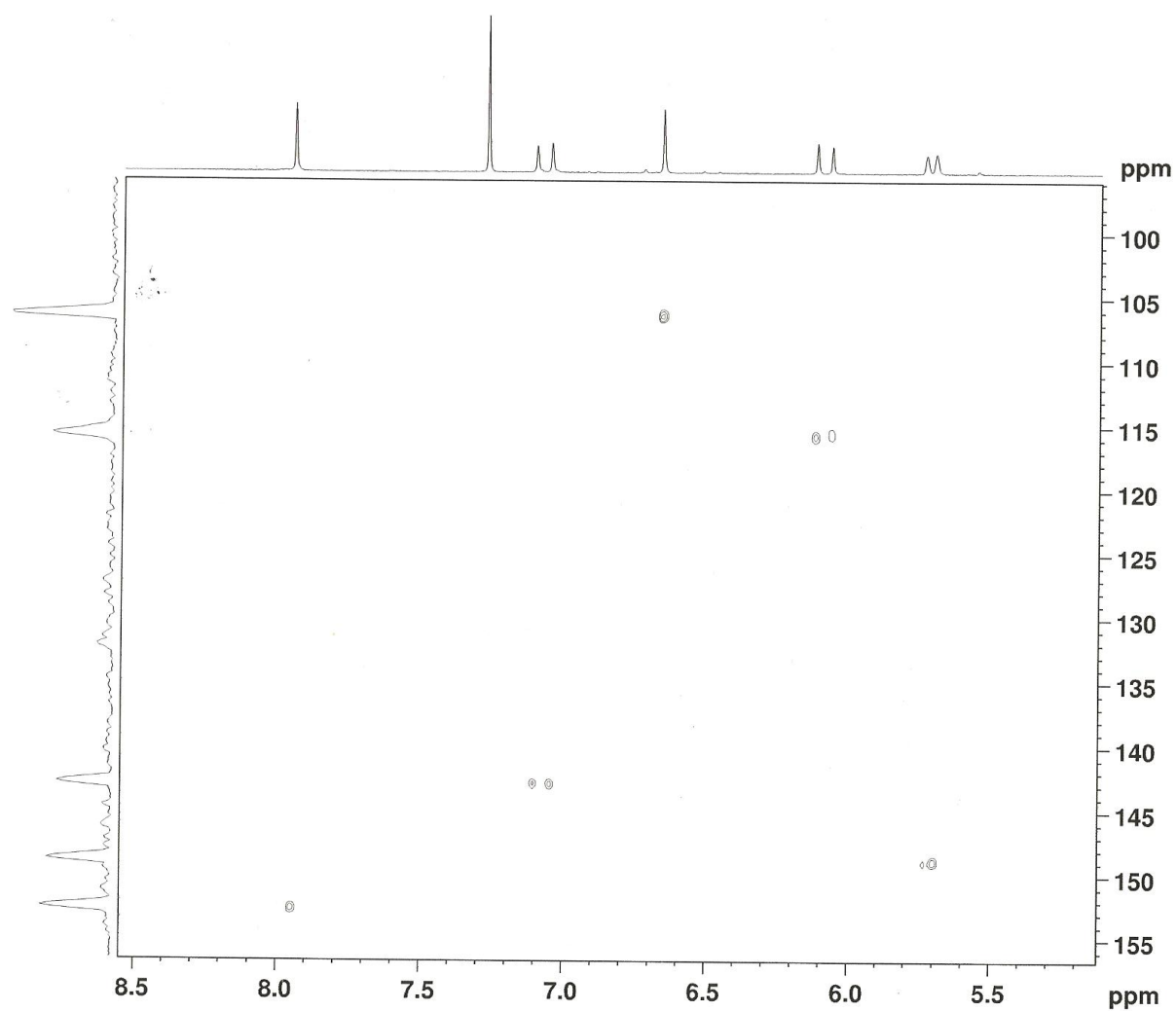
APÊNDICE D – Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) expandido na região entre 2.5 a 0.9 ppm do pigmento isolado esclerotiorina.



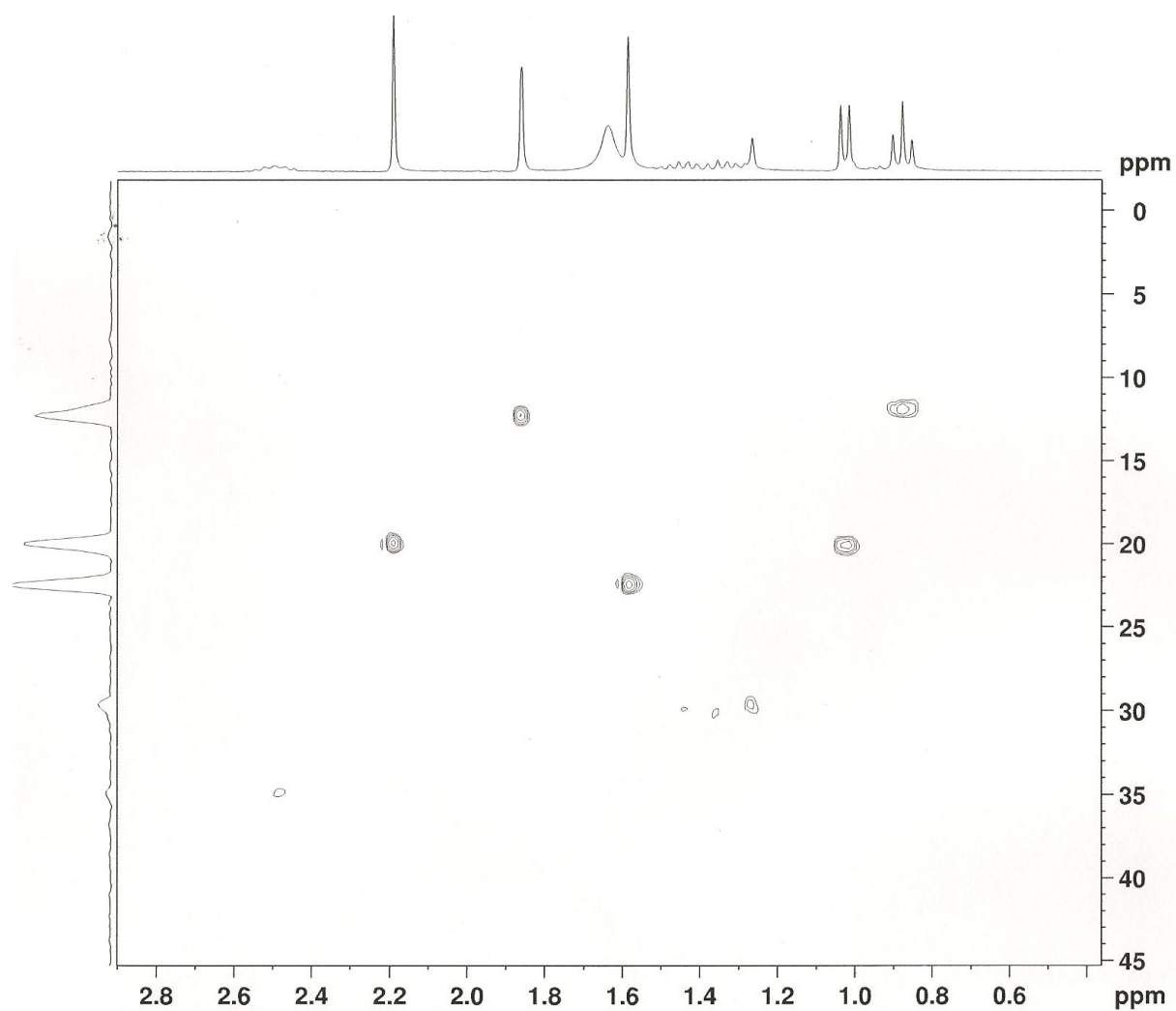
APÊNDICE E – Mapa de contorno de HSQC (300/75 MHz, CDCl₃) do pigmento isolado esclerotiorina.



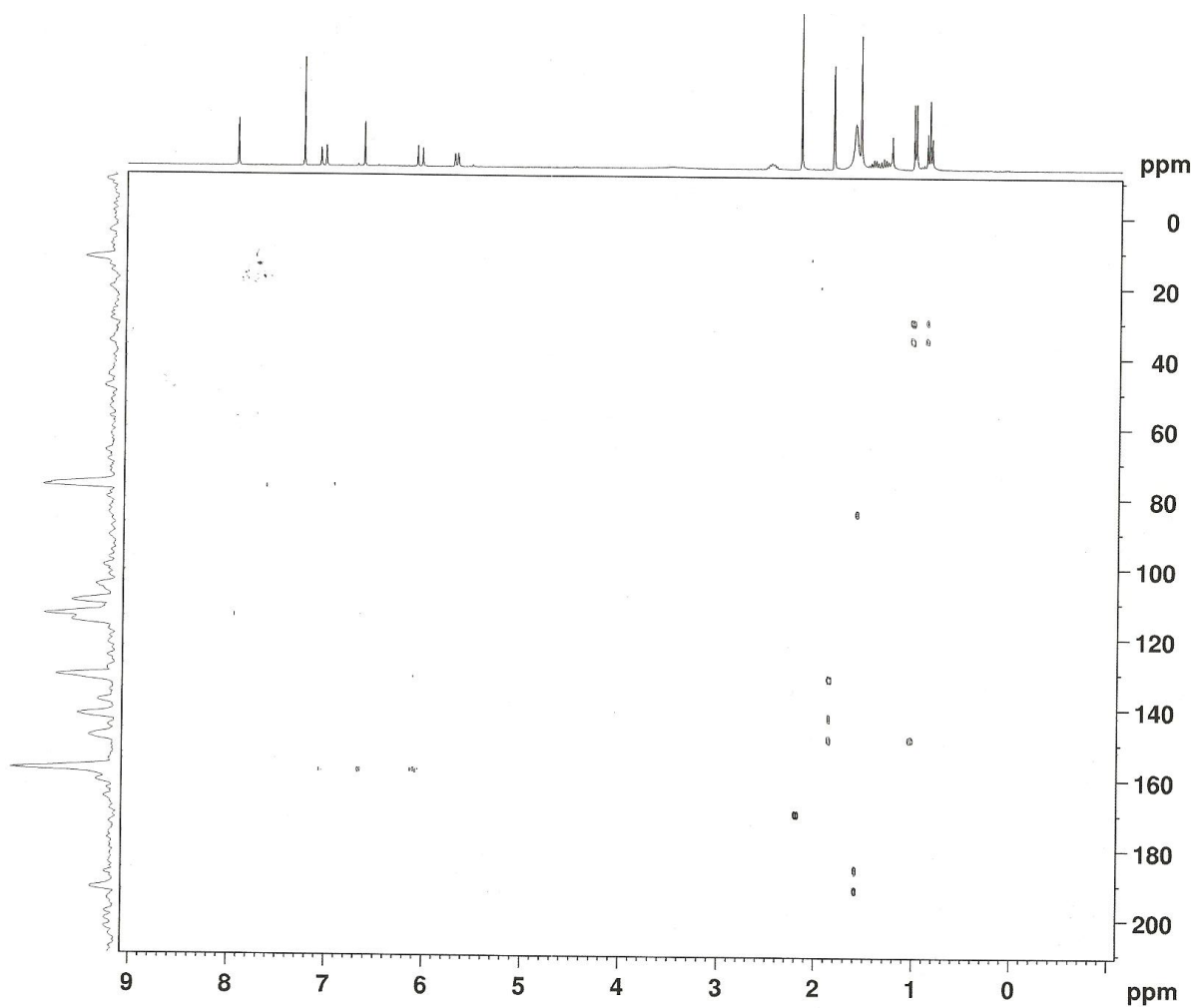
APÊNDICE F – Mapa de contorno de HSQC (300/75 MHz, CDCl₃) expandido na região entre 8.5 a 5.5 ppm do pigmento isolado esclerotiorina.



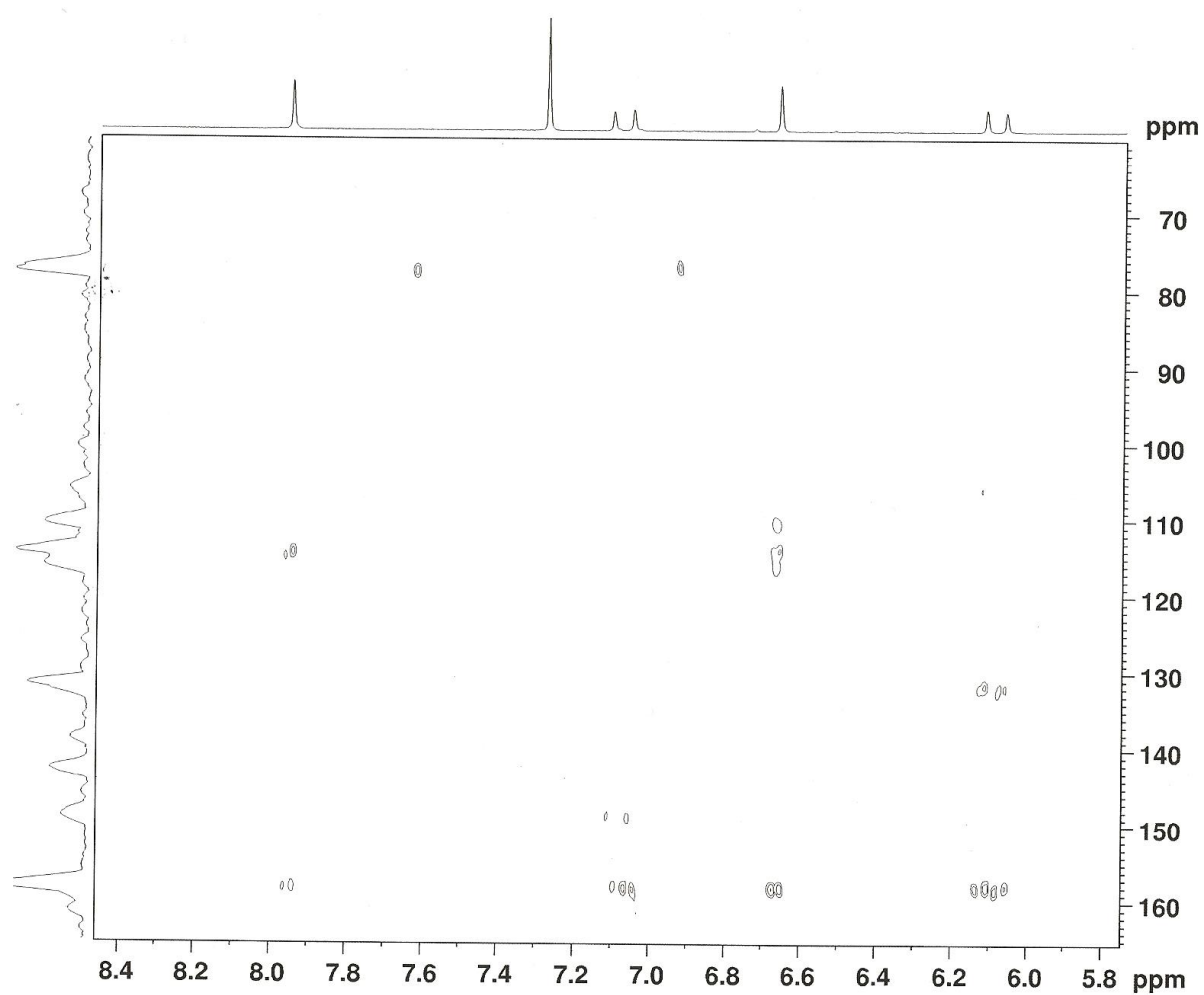
APÊNDICE G – Mapa de contorno de HSQC (300/75 MHz, CDCl₃) expandido na região entre 2.8 a 0.6 ppm do pigmento isolado esclerotiorina.



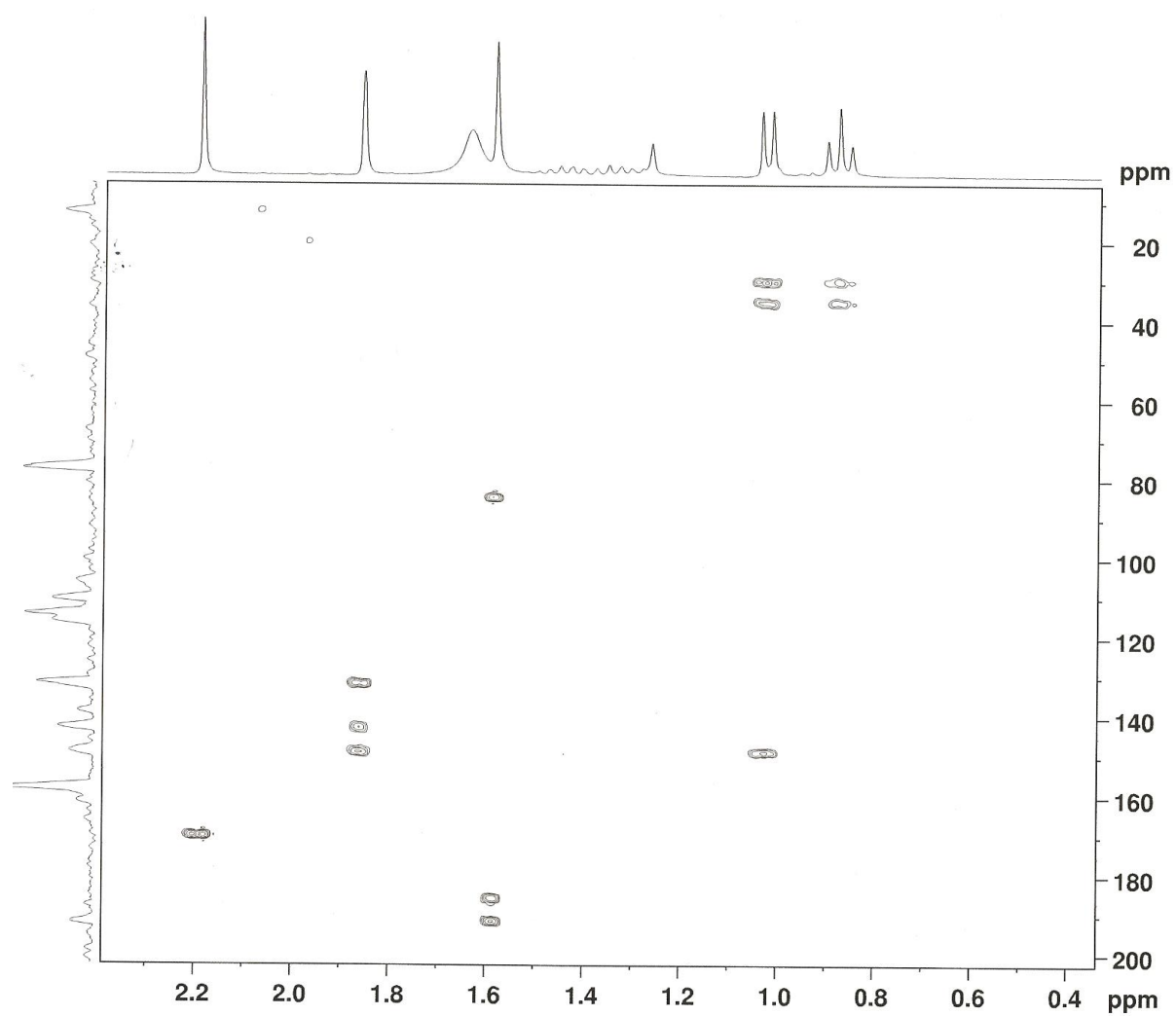
APÊNDICE H – Mapa de contorno de HMBC (300/75 MHz, CDCl₃) do pigmento isolado esclerotiorina.



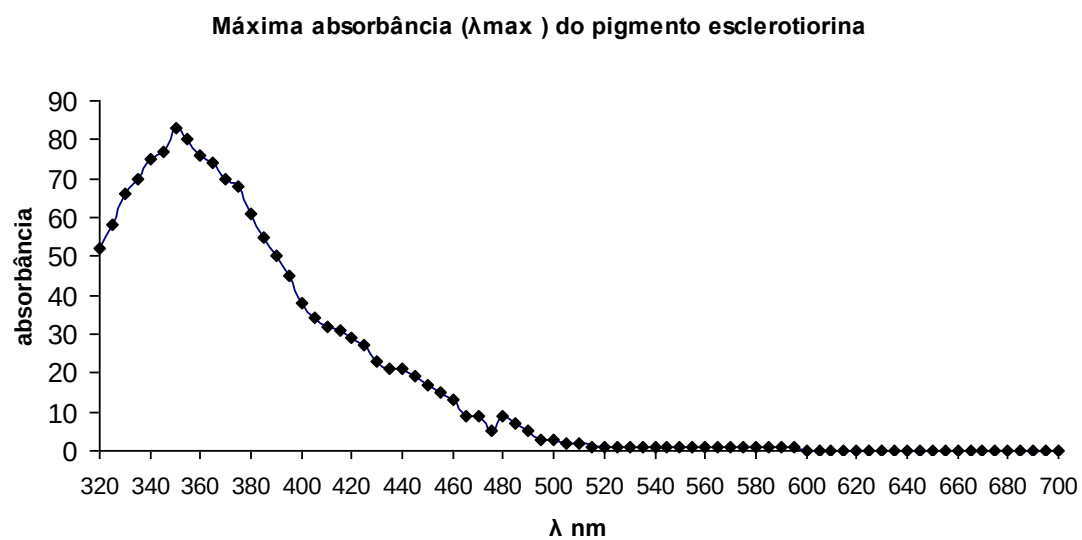
APÊNDICE I – Mapa de contorno de HMBC (300/75 MHz, CDCl₃) expandido na região entre 8.4 a 6 ppm do pigmento isolado esclerotiorina.



APÊNDICE J – Mapa de contorno de HMBC (300/75 MHz, CDCl₃) expandido na região entre 2.2 a 0.6 ppm do pigmento isolado esclerotiorina.



APÊNDICE K – Varredura em espectro de UV/VIS do pigmento isolado esclerotiorina, partindo de 320 a 700 nm.



ANEXO A – Carta de aceite com as correções do artigo submetido à revista Process Biochemistry.

ANEXO B - Meio Ágar Batata Dextrose

- Batata inglesa - 140g
- Dextrose - 20g
- Ágar - 20g
- Cloranfenicol - 250g
- Água Destilada - q.s.p. 1000 mL

Técnica: Descascar a batata e pesar 140g. Cortar em fatias bem finas, juntar 500 mL de água destilada e deixar ferver por cerca de 5 minutos. Filtrar a infusão, adicionar o ágar, a dextrose e o cloranfenicol. Completar o volume para 1000 mL. Esterilizar por 20 minutos a 130° C (LACAZ et al., 2001).

ANEXO C - Caldo Czapeck

- Nitrato de sódio - 3g
- Fosfato monoácido de potássio -1g
- Sulfato de magnésio - 0,5g
- Cloreto de potássio - 0,5g
- Sulfato ferroso - 0,01g
- Sacarose - 30g
- Cloranfenicol -250g
- Água destilada - q.s.p. 1000 mL

Técnica: Dissolver o ágar em 500 mL de água destilada. Aquecer até a completa dissolução. Adicionar os sais e agitar. Acrescentar a sacarose e o cloranfenicol. Completar o volume para 1000 mL. Homogeneizar com bastão de vidro. Esterilizar por 20 minutos a 130°C (LACAZ et al., 2001).