



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

BRISA ROSATTI PEREIRA GONÇALVES

**PRODUÇÃO E IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE METABÓLITO
SECUNDÁRIO DE FUNGO ENDOFÍTICO *Pseudofusicoccum sp.***

Salvador -BA

2019

BRISA ROSATTI PEREIRA GONÇALVES

**PRODUÇÃO E IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE METABÓLITO
SECUNDÁRIO DE FUNGO ENDOFÍTICO *Pseudofusicoccum sp.***

Orientador: Marcelo Andrés Umsza Guez
Coorientadoras: Samira Abdallah Hanna e
Eliane de Oliveira Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal da Bahia em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Salvador- BA

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Gonçalves, Brisa Rosatti Pereira
Produção e identificação estrutural de metabólito
secundário de fungo endofítico *Pseudofusicoccum* sp. /
Brisa Rosatti Pereira Gonçalves. -- Salvador, 2019.
85 f. : il

Orientador: Marcelo Andrés Umsza Guez.
Coorientadora: Eliane de Oliveira Silva.
Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciência de
Alimentos) -- Universidade Federal da Bahia,
Faculdade de Farmácia, 2019.

1. Fungo endofítico. 2. Pigmentos. 3. *Manilkara*
salzmannii. 4. Identificação estrutural. 5. Ressonância
Magnética Nuclear. I. Umsza Guez, Marcelo Andrés. II.
Silva, Eliane de Oliveira. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

TERMO DE APROVAÇÃO

BRISA ROSATTI PEREIRA GONÇALVES

PRODUÇÃO E IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE METABÓLITO
SECUNDÁRIO DE FUNGO ENDOFÍTICO PSEUDOFUSICOCUM SP.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 26 de abril de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Marcelo Andrés Umsza Guez
Universidade Federal da Bahia
Orientador

Dr. Ricardo Wagner Portela
Universidade Federal da Bahia

Dr. Warley de Souza Borges
Universidade Federal do Espírito Santo

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, pelo amor, carinho, paciência e seus ensinamentos.

Agradeço de forma especial à minha mãe Kátia de Oliveira Pereira, por não medir esforços para que eu pudesse levar meus estudos adiante e por confiar em mim.

Agradeço aos meus amigos, em especial Suelen Rodrigues da Conceição e Luciano Silva Pinto, por estarem ao meu lado em todos os momentos especiais da minha vida.

Agradeço também ao meu noivo José Pereira Brito Junior por me apoiar em todas as decisões importantes da minha vida.

Agradeço especialmente ao meu orientador Marcelo Andrés Umsza Guez e as minhas coorientadoras Samira Abdallah Hanna e Eliane de Oliveira Silva pela paciência, dedicação e força de vontade inabaláveis que possibilitaram a realização desse trabalho.

Agradeço ao professor Warley de Souza Borges do Departamento de Química da Universidade Federal do Espírito Santo pela relevante colaboração e dedicação à esta pesquisa.

Agradeço ao colega João Carlos Silva Conceição do Instituto de Química da UFBA, pelo aprendizado e pela paciência.

Agradeço também as colegas de laboratório do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA, Bianca Alves e Letícia Jambeiro pelo apoio e aprendizado.

A esta Universidade e todo seu corpo docente, além da direção, a administração e servidores técnicos que realizam seu trabalho com tanta dedicação, trabalhando para que nós alunos possamos contar com um ambiente adequado e ensino de extrema qualidade.

A todas os indivíduos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, muito obrigada!

“Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até aonde os outros já foram.”

Alexander Graham Bell

RESUMO

A busca por novas fontes de pigmentos naturais tem aumentado devido à sua ampla aplicação na indústria e em detrimento aos efeitos danosos de alguns pigmentos sintéticos. Dentre os colorantes produzidos por microrganismos, atenção especial tem sido direcionada a fungos filamentosos, visto que podem ser cultivados em condições controladas produzindo grandes quantidades de metabólitos. Os fungos do grupo dos endofíticos são microrganismos promissores que podem produzir metabólitos idênticos às das plantas hospedeiras, com atividades metabólicas importantes. Portanto, o presente estudo teve como objetivo a identificação morfológica e molecular do fungo endofítico C2C3 isolado da planta *Manilkara salzmannii*, assim como, a produção de pigmentos em meio Sabouraud Dextrose, o isolamento dos pigmentos e identificação estrutural por Ressonância Magnética Nuclear. Para identificação em nível de espécie, foi utilizada a análise dos fragmentos parciais de genes de RNAr 18S (SSU) e 28S (LSU) e o fator de alongamento da tradução 1-alfa (TEF1- α). O fungo C2C3 foi identificado como pertencente ao gênero *Pseudofusicoccum sp.*, pela análise do marcador genético 18S (SSU), da família *Botryosphaeriaceae*. Em cultivo submerso, o fungo endofítico C2C3 produziu pigmentos solúveis com aparência vermelha escura, depois de 21 dias à 28 °C em repouso. Os pigmentos foram extraídos com acetato de etila e submetidos a purificação através de técnicas de cromatografia em coluna aberta utilizando solventes com polaridades diferentes. A técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi utilizada para determinar a provável pureza dos pigmentos isolados. A partir dos dados espectroscópicos obtidos por ¹H, as correlações das ligações entre H e C (HSQC) e correlações entre H e C de longa distância HMBC, foi elucidada a estrutura do composto 4 isolado. Um pigmento laranja da classe policetídeo, 4-hidroxi-5-(4-hidroxifenil) tetrahydro-2H-piran-2-ona, foi identificado no extrato produzido pelo *Pseudofusicoccum sp.* C2C3. Várias frações com pigmentos isoláveis de amarelo, laranja e vermelho foram detectadas durante esse trabalho, dessa forma, estudos mais aprofundados são requeridos para possíveis aplicações na indústria.

Palavras-chave: fungos filamentosos; pigmentos; *Manilkara salzmannii*; RMN; HPLC

ABSTRACT

The search for new sources of natural pigments has increased due to its wide application in the industry and to the detriment of the harmful effects of some synthetic pigments. Among the colorants produced by microorganisms, special attention has been directed to filamentous fungi, since they can be cultivated under controlled conditions and produce large amounts of metabolites. The endophytic fungi group are promising microorganisms that can produce metabolites identical to that of the host plants, with important biological activities. Therefore, the present study aimed the morphological and molecular identification of the endophytic fungus C2C3 isolated from the *Manilkara salzmannii* plant, as well as the production of pigments in Sabouraud Dextrose medium, the isolation of pigments and structural identification using Nuclear Magnetic Resonance technique. For species-level identification, the analysis of the partial genes fragments of RNAr 18S (SSU), 28S (LSU) and the elongation factor of 1- α (TEF1- α) were used. The fungus C2C3 was identified as belonging to the genus *Pseudofusicoccum* sp., by the analysis of the genetic marker 18S (SSU) of the family *Botryosphaeriaceae*. In submerged cultivation, the C2C3 endophytic fungus produced soluble pigments with dark red appearance, after 21 days at 28 ° C, at static conditions. The pigments were extracted with ethyl acetate and subjected to purification through open column chromatography techniques using solvents with different polarities. High Performance Liquid Chromatography technique was used to determine the probable purity of the isolated pigments. From the spectroscopic data obtained by ^1H , the correlations between H and C (HSQC) and long-distance correlations between H and C (HMBC) structure of the isolated compound 4 was elucidated. An orange polyketide pigment, 4-hydroxy-5-(4-hydroxyphenyl) tetrahydro-2H-piran-2-one was identified in the extract produced by *Pseudofusicoccum* sp. C2C3. Several fractions with isolable pigments of yellow, orange and red were detected during this work, so further studies are required for possible applications in the industry.

Key words: filamentous fungus; pigments; *Manilkara salzmannii*; NMR; HPLC

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Principais códigos da Classificação Internacional de Patentes (CIP) e suas respectivas definições segundo a base de dados Espacenet.....	58
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

CAPÍTULO III

Tabela 1. Sequências com alinhamentos significantes com o isolado C2C3.....	73
Tabela 2. Dados espectroscópicos de ¹ H, HSQC e HMBC em metanol deuterado (CD ₃ OD) para composto 4.....	75

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I

Quadro 1. Colorantes orgânicos naturais permitidos no Brasil para uso na indústria alimentícia.	22
Quadro 2. Classificação de colorantes produzidos por fungos usados na indústria alimentícia ou com alto potencial para uso.	27
Quadro 3. Lista de colorantes produzidos por fungos endofíticos e suas atividades biológicas.	30
Quadro 4. Classificação dos tipos de cultivo utilizado para produção de colorantes por fungos filamentosos e os meios de cultivo utilizados.	34

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Estrutura química de alguns colorantes sintéticos, respectivo nome e classificação química.	17
Figura 2. Estrutura, respectivo nome e classificação química de alguns colorantes naturais.	18

Figura 3. Algumas classes de colorantes policetídicos de fungos exibindo as respectivas cores e esqueleto estrutural típico.	26
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------

CAPÍTULO II

Figura 1. Evolução anual das patentes relacionadas a colorantes microbianos.....	52
Figura 2. Evolução anual acumulativa de patentes relacionadas a colorantes de origem microbiana.....	53
Figura 3. Número de patentes por país relacionado a colorantes de origem microbiana.....	54
Figura 4. A. Classificação dos tipos de instituição depositante; B. Empresas mais relevantes no depósito de patentes para colorantes de origem microbiana.....	55
Figura 5. Número de patentes por área/aplicação de colorantes de origem microbiana.....	56
Figura 6. Número de patentes por código de maior relevância referente a colorantes de origem microbiana.....	57
Figura 7. Classificação dos microrganismos produtores de colorantes utilizados nas tecnologias patenteadas.....	58

CAPÍTULO III

Figura 1. Características morfológicas de <i>Pseudofusicoccum sp.</i> C2C3.....	72
Figura 2. A árvore filogenética (SSU, primers: NS1 e NS4) inferida pelo algoritmo Neighbor Joining posiciona o isolado C2C3 na família <i>Botryosphaeriaceae</i>, como <i>Pseudofusicoccum sp.</i>.....	73
Figura 3. Cromatograma de HPLC-DAD analisado a 248 nm correspondente à fração purificada por coluna cromatográfica (composto 4) do extrato de <i>Pseudofusicoccum sp.</i> C2C3.....	74
Figura 4. (a) Estrutura e fórmula molecular do composto 4. Nome IUPAC: 4-hidroxi-5-(4-hidroxifenil) tetrahydro-2H-piran-2-one. (b) Numeração de átomos e correlações selecionadas de HMBC (setas) para composto 4.....	75

APÊNDICE

Figura 1. A árvore filogenética (LSU, primers: LR0R e LR5) inferida pelo algoritmo Neighbor Joining posiciona o isolado C2C3 na família <i>Botryosphaeriaceae</i>, próximo ao gênero <i>Pseudofusicoccum</i>.....	83
Figura 2. A árvore filogenética (TEF1, primers: EF1-728F e EF1-986R) inferida pelo algoritmo Neighbor Joining posiciona o isolado C2C3 na família <i>Botryosphaeriaceae</i>, como <i>Pseudofusicoccum sp</i>.....	84
Figura 3. Espectro de RMN do composto isolado do extrato de acetato de etila do cultivo do fungo <i>Pseudofusicoccum sp</i>.....	85

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	A COR E OS COLORANTES.....	16
2.1.1	Classificação dos colorantes	16
2.1.2	Colorantes sintéticos	16
2.1.3	Colorantes naturais.....	18
2.2	HISTÓRICO DOS COLORANTES	19
2.3	LEGISLAÇÃO DOS COLORANTES NO BRASIL	20
2.4	MERCADO DOS COLORANTES NATURAIS	22
2.5	COLORANTES NATURAIS DE ORIGEM MICROBIANA	23
2.5.1	Colorantes de fungos.....	24
2.5.2	Classificação dos colorantes de fungos.....	25
2.5.3	Metabólitos secundários de fungos endofíticos	28
2.6	Família <i>Botryosphaeriaceae</i>	31
2.6.1	Fungos da família <i>Botryosphaeriaceae</i> isolados como endofíticos	32
2.6.2	Gênero <i>Pseudofusicoccum sp.</i>	32
2.7	PRODUÇÃO DE COLORANTES POR CULTIVO SEMI-SÓLIDO E SUBMERSO .	33
2.7.1	Cultivo semi-sólido	33
2.7.2	Cultivo submerso.....	33
2.8	ESTRATÉGIAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE COLORANTES PRODUZIDOS POR FUNGOS	35
2.8.1	Técnicas cromatográficas	35
2.8.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	35
2.8.3	Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	36
2.9	IMPORTÂNCIA DA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA NO ESTUDO DE NOVAS TECNOLOGIAS	36
	REFERÊNCIAS	37
3	OBJETIVOS	46
3.1	OBJETIVO GERAL	46
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
4	CAPÍTULO II: ARTIGO 01 - ESTUDO PROSPECTIVO DE COLORANTES MICROBIANOS SOB O ENFOQUE DE DOCUMENTOS DE PATENTES	47

RESUMO.....	48
ABSTRACT	49
4.1 INTRODUÇÃO	49
4.2 METODOLOGIA	51
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.4 CONCLUSÃO	60
4.5 AGRADECIMENTOS.....	61
REFERÊNCIAS	61
5 CAPÍTULO III: ARTIGO 02 - NEW POLYKETIDE PIGMENT FROM ENDOPHYTIC FUNGUS <i>Pseudofusicoccum sp. C2C3</i>.....	64
RESUMO.....	65
ABSTRACT	66
5.1 INTRODUÇÃO	66
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS	68
5.2.1 Isolamento do fungo endofítico	68
5.2.2 Características morfológicas do fungo endofítico	68
5.2.3 Identificação molecular do fungo endofítico.....	69
5.2.4 Cultivo e isolamento de metabólitos	69
5.2.5 Análise estrutural dos compostos isolados.....	70
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.3.1 Caracterização morfológica e molecular do fungo <i>Pseudofusicoccum sp. C2C3</i>	71
5.3.2 Elucidação estrutural dos compostos isolados.....	74
5.4 CONCLUSÃO	76
5.5 AGRADECIMENTOS.....	77
REFERÊNCIAS	77
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
APÊNDICE	83

INTRODUÇÃO

Colorantes derivados de microrganismos estão continuamente ganhando mercado na indústria, principalmente na de alimentos. Esforços têm sido feitos para a redução dos custos de produção de colorantes naturais de microrganismos, uma vez que colorantes sintéticos e os extraídos de plantas são geralmente produzidos mais economicamente (DUFOSSE, 2016), entretanto, estudos vem mostrando que corantes artificiais podem ser danosos a saúde e ao meio ambiente (MOHAMED; GALAL; ELEWA, 2015).

Dessa forma, o mercado consumidor procura cada vez mais produtos saudáveis e uma alternativa constituiria na utilização de colorantes naturais. (MEINICKE et al., 2012). Dentre os colorantes de microrganismos, uma atenção especial tem sido direcionada a fungos filamentosos visto que são mais adequados para a produção de colorantes, pois podem ser cultivados a fim de produzir grandes quantidades de metabólitos, são geralmente estáveis a variação de pH, temperatura e tem capacidade de utilizar uma grande variedade de fontes de carbono e nitrogênio, e ainda são produtores potenciais de colorantes com inúmeros tons (MAPARI; THRANE; MEYER, 2010).

Dentre os ecossistemas existentes na terra, aqueles que têm a maior biodiversidade de vida parecem ser os que também têm o maior número e mais diversidade de endófitos (STROBEL, G.; DAISY, 2003). Os fungos endofíticos são microrganismos promissores e podem produzir metabólitos com atividade similar à planta hospedeira, abrindo assim novas possibilidades para o desenvolvimento e a proteção de plantas medicinais raras (CHITHRA et al., 2014). Dessa forma, a descoberta de fungos endofíticos que produzem colorantes pode acelerar o ritmo em que os colorantes naturais poderão substituir os sintéticos (CELESTINO et al., 2014)

A colonização da planta hospedeira pelos fungos endofíticos contribui para a adaptação da planta a fatores de estresse ambientais bióticos e abióticos (ALY et al., 2010). É de especial interesse que em muitos casos a tolerância a estresse biótico da planta hospedeira tem sido correlacionada com os produtos naturais oriundos dos fungos endofíticos (STROBEL et al., 2004). Fora do tecido das plantas, em cultivo, os fungos endofíticos tem mostrado ser uma fonte importante e inovadora de produtos naturais também conhecidos por apresentarem uma variedade de cores que tem atividades biológicas e podem agir como citotóxicos, antioxidantes e antimicrobianos com potencial aplicação na agricultura e nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia (SARANG et al., 2017).

As florestas tropicais e temperadas são exemplos de regiões com ecossistemas mais biologicamente diversos do planeta (STROBEL, G.; DAISY, 2003). Espécies de fungos do

gênero *Pseudofusicoccum* são consideradas restritas a regiões tropicais e subtropicais e podem ocorrer, principalmente, como endofíticos (PAVLIC et al., 2008). Espécies desse gênero foram identificadas pela primeira vez em plantas assintomáticas de *Adansonia gibbosa* no oeste da Austrália (PAVLIC et al., 2008). No Brasil, as espécies de *P. stromaticum* e *P. adansoniae* foram identificadas como endofíticos em plantas nativas da Caatinga no Ceará. Estudos envolvendo espécies de fungos endofíticos, principalmente no Brasil, ainda são muito incipientes. Endófitos de plantas tropicais têm sido pouco explorados para busca de metabólitos secundários mesmo apresentando evidências diretas e indiretas na literatura sobre o potencial de exploração desses compostos (LOPES et al., 2011).

CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A COR E OS COLORANTES

Classificação dos colorantes

Os aditivos inseridos para conferir cores nas mais diversos produtos são os colorantes (HERBST et al., 2004). Eles podem ser classificados como corantes ou pigmentos dependendo de algumas características físico-químicas (BROADBENT, 2003). A principal diferença entre corantes e pigmentos é que os corantes são solúveis no substrato o qual estão inseridos e, portanto, se dispersam em um nível molecular, enquanto que os pigmentos são insolúveis e são dispersos como partículas (YUSUF; SHABBIR; MOHAMMAD, 2017)

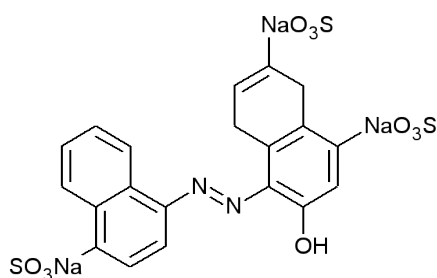
Os pigmentos referem-se principalmente a sais e óxidos inorgânicos, como óxidos de ferro e cromo, que geralmente são dispersos em forma de cristal ou em pó no meio aplicado. Pigmentos tendem a ser altamente duráveis, termoestáveis, resistentes à solventes, a luz e a migração. Por outro lado, eles também tendem a ser difíceis para processar e são pobres no brilho e força da cor (GÜRSES et al., 2016). Os corantes são convencionalmente entendidos como referentes a moléculas orgânicas que são facilmente dissolvidas no meio de aplicação, e sua estrutura molecular contém um cromóforo que é responsável pela característica da cor desses compostos. Exemplos são os corantes azo, corantes cumarínicos, e corantes de perilenos (SIGURDSON; TANG; GIUSTI, 2017). As propriedades físico-químicas dos corantes são opostas à dos pigmentos. Os termos, tintura, pigmento, cor, corante e tinta são frequentemente utilizados erroneamente como se todos tivessem o mesmo significado (GÜRSES et al., 2016). A maioria dos autores utilizam o senso comum, empregando o termo pigmento para referir-se a qualquer molécula com cromóforo produzida por um ser vivo.

Colorantes sintéticos

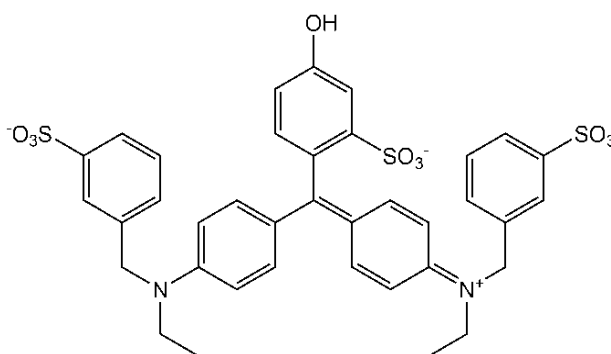
Os colorantes sintéticos são produzidos majoritariamente por síntese química e não podem ser encontrados naturalmente. Eles eram originalmente fabricados a partir de alcatrão de carvão e atualmente são obtidos a partir de produtos não renováveis altamente purificados (AMCHOVA; KOTOLOVA; RUDA-KUCEROVA, 2015). A maioria dos colorantes artificiais apresenta alta estabilidade (luz, oxigênio, calor e pH), uniformidade na cor conferida, alto poder tintorial,

isenção de contaminação microbiológica e custo de produção relativamente baixo (WROLSTAD; CULVER, 2012). Os colorantes sintéticos utilizados na indústria de alimentos são divididos em 4 principais grupos: azo; trifenilmetanos; indigóides e xantenos. Na Figura 1 está ilustrada as estruturas de alguns colorantes artificiais, no qual pode-se observar os principais grupos químicos de cada classe.

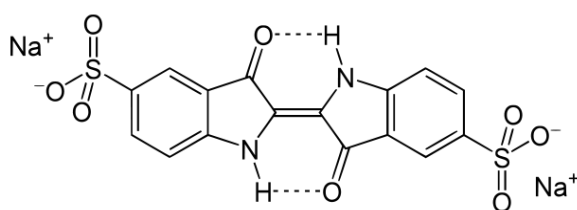
Figura 1. Estrutura química de alguns colorantes sintéticos, com o respectivo nome e classificação química.



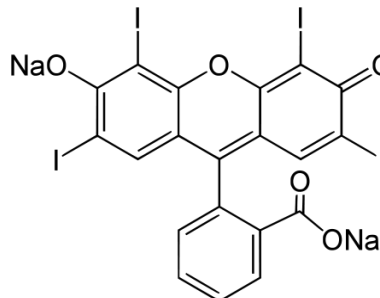
Amaranto ou Vermelho bordeaux (Azo)



Verde rápido FCF
(Trifenilometano)



Azul de indigotina (Indigóide)



Eritrosina (Xanteno)

Fonte: ResearchGate.net, 2019

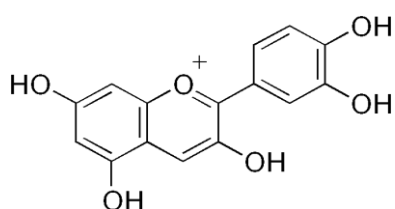
Os colorantes sintéticos da classe azo são os mais produzidos e diversificados na indústria, possuindo amplo uso na fabricação de vários tipos de itens, tanto na indústria têxtil como no processamento de papéis, medicamentos, cosméticos, fotografias, alimentos e suplementos, entre outros (CHUNG, 2016). Estima-se que a produção mundial de colorantes azo esteja em cerca de um milhão de toneladas por ano, havendo mais de 2000 tipos diferentes desses pigmentos em uso, o que determina que mais da metade de todos os colorantes no mundo seja dessa classe química (ELBANNA et al., 2017).

Colorantes naturais

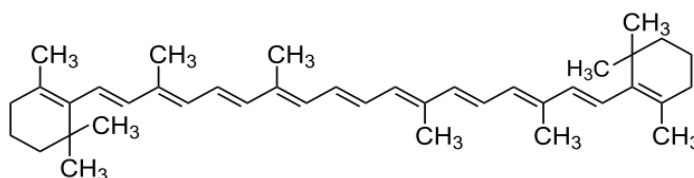
Os colorantes naturais podem ser obtidos a partir de uma variedade de plantas (BOO et al., 2012; SHANG et al., 2018), insetos (DEVEOGLU; KARADAG; YURDUN, 2011; SANTOS et al., 2015) e microrganismos (ASKER et al., 2018; VELMURUGAN; et al., 2010; YANG, et al., 2018). Geralmente, colorantes obtidos pela modificação de compostos, como caramelo e clorofila, são considerados naturais (HARASYM; BOGACZ-RADOMSKA, 2016).

Apesar das estruturas diversificadas e variedade de fontes, os colorantes naturais podem ser agrupados em algumas classes químicas tais como: antocianinas, antraquinonas, betalaínas, clorofilas, curcuminóides, carotenóides, ficocianinas, flavinas e melanoidinas. O membro mais importante dos tetrapirróis é a clorofila, encontrada em plantas superiores. Carotenóides são tetraterpenóides que são parte do processo de fotossíntese, sendo também responsáveis pela coloração amarelo-laranja-vermelho de muitas frutas. Antocianinas são um grupo de flavonóides que fornecem a coloração vermelho-roxo de muitas frutas como morango, mirtilo e groselha. Outra importante classe de colorantes são as antraquinonas (carmim, laca) e as betalaínas (beterraba) (DUFOSSE, 2016). Na Figura 2 está ilustrada as estruturas de alguns colorantes naturais, no qual pode-se observar os principais grupos químicos de cada classe.

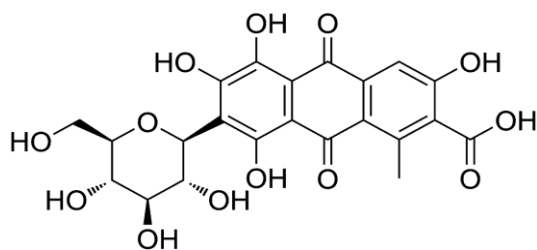
Figura 2. Estrutura, respectivo nome e classificação química de alguns colorantes naturais.



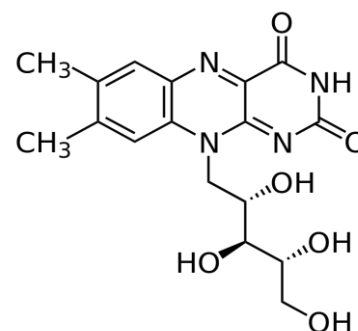
Cianidina (Antocianina)



Beta caroteno (Carotenóide)



Ácido carmínico (Antraquinona)



Riboflavina (Flavina)

Fonte: ResearchGate.net, 2019

Esses compostos são amplamente utilizados na indústria têxtil, farmacêutica, alimentícia, química, cosmética e fotográfica (GÜRSES et al., 2016). Por exemplo, na indústria têxtil os colorantes naturais são utilizados nas fibras para aumentar resistência à lavagens (MUKHERJEE; SINGH, 2011) como proteção UV e para tornar o tecido resistente a fungos, bactérias e repelente à insetos (VELMURUGAN et al., 2010). Na indústria farmacêutica vêm sendo utilizados para dar cor aos medicamentos, produtos de higiene e cosméticos diminuindo a probabilidade de reações alérgicas e na produção de alimentos têm função de tornar o produto mais atraente (YUSUF; SHABBIR; MOHAMMAD, 2017).

Além disso, o valor nutricional que pode ser acompanhado com a adição de alguns colorantes, como é o caso dos β -carotenos, que enriquecem os alimentos com atividade provitamina A, fortalece o sistema imunológico e diminui a suscetibilidade de doenças degenerativas (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2010). No entanto, colorantes provenientes de plantas e animais possuem desvantagens tais como: problemas de sazonalidade, instabilidade à luz, calor ou pH, baixa solubilidade em água e são frequentemente insuficientes para suprir as necessidades industriais ao longo do ano (GUNASEKARAN; POORNIAMMAL, 2008).

HISTÓRICO DOS COLORANTES

O homem sempre se interessou por cores. De acordo com os registros mais antigos encontrados na China colorantes naturais foram usados pela primeira vez em 2.600 a.C. No Egito, no túmulo do rei Tutankamon, as múmias eram embrulhadas com roupas coloridas feitas com Alizarin, um colorante isolado de *Rubia tinctorum*, confirmando o uso de colorantes naturais nessa região. Os Astecas e os povos da América Central e do Norte usaram o corante camim de cochonilha extraído do inseto *Dactylopius coccus* (YANGILAR; YILDIZ, 2016).

O uso de colorantes naturais na alimentação mais antigo vem do Japão, descrito no texto do período de Nara (século VIII), que contém referências aos grãos de soja e de bolos de feijão Azuki coloridos (ABEROUMAND, 2011). Há séculos que povos asiáticos colorem seus alimentos com colorantes, e o principal exemplo é o vermelho koji ou angkak, de arroz fermentado por um fungo da espécie do gênero *Monascus*, utilizado na fabricação de vinho de arroz vermelho, queijo de soja vermelho, carne e produtos de pescado (LIN et al., 2008).

Em 1856, o químico inglês William H. Perkin sintetizou o primeiro colorante orgânico, o Mauve, também conhecido como anilina roxa. Em 1862, o estabelecimento de uma fábrica que produzia essa substância comercialmente marcou o início da indústria moderna de colorantes.

A partir de então e com o desenvolvimento da química, diversos compostos inorgânicos de forte coloração passaram a ser usados extensivamente como colorantes (CAÑAMARES et al., 2014). Assim, os colorantes naturais foram rapidamente substituídos, por colorantes sintéticos no final do século XIX e continuou assim até o século XX, devido ao baixo custo, da produção em larga escala, da flexibilidade do local de produção e da homogeneidade da composição (BECHTOLD, 2009).

Nos anos iniciais de aplicação dos colorantes artificiais, não havia regulamentação quanto ao uso ou à pureza dessas substâncias (CARVALHO, 2004). Assim, a partir do século XX a Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA (FDA, sigla em inglês) começou a realizar testes toxicológicos com os colorantes sintéticos usados na indústria de alimentos. Tais estudos mostraram que os colorantes sintéticos têm sido responsáveis por reações alérgicas e intolerância (LELEU et al., 2013), podem ser neurotóxicos (MOHAMED; GALAL; ELEWA, 2015), inclusive alguns são potencialmente mutagênicos e carcinogênicos (MA et al., 2014), o que representa um possível perigo para humanos quando expostos cronicamente. Além disso, colorantes artificiais são uma potente fonte de poluição ambiental e seu uso excessivo ou prolongado leva a perturbações ao eco equilíbrio da natureza (BULUT; AKAR, 2012).

Sendo a segurança dos colorantes sintéticos questionada, houve uma redução do número de colorantes sintéticos permitidos pelas agências reguladoras em diversos países (AMCHOVA; KOTOLOVA; RUDA-KUCEROVA, 2015). Além disso, houve o retorno dos colorantes naturais ao mercado, particularmente no setor de alimentos (MAPARI; THRANE; MEYER, 2010) em roupas de crianças e de couro (VELMURUGAN et al., 2010).

LEGISLAÇÃO DOS COLORANTES NO BRASIL

A legislação brasileira prevê a utilização de corantes, através do Ministério da Saúde e sua Agência Nacional de Vigilância Sanitária. A lei No 6.360, de 23 de setembro de 1976 define corantes como “substâncias adicionais aos medicamentos, produtos dietéticos, cosméticos, perfumes, produtos de higiene e similares, saneantes domissanitários e similares, com o efeito de lhes conferir cor e, em determinados tipos de cosméticos, transferi-la para a superfície cutânea e anexos da pele” (ANVISA, 2018). Em 1977, a Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) através da Resolução nº 44, estabelece as condições gerais de elaboração, apresentação, classificação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes usado na indústria alimentícia. Nela, define-se corante como “Substância que confere, intensifica ou restaura a cor de um alimento”. Excluem-se da definição

acima, os sucos e/ou os extratos de vegetais e outros ingredientes utilizados na elaboração de alimentos que possuem coloração própria, salvo se adicionados com a finalidade de conferir ou intensificar a coloração própria do produto (ANVISA, 2018). Pela Resolução nº 44, citada acima, os corantes são classificados em:

- Corante orgânico natural - aquele obtido a partir de vegetal, ou eventualmente, de animal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado.
- Corante orgânico sintético - aquele obtido por síntese orgânica mediante o emprego de processo tecnológico adequado.
- Corante artificial - é o corante orgânico sintético não encontrado em produtos naturais.
- Corante orgânico sintético idêntico ao natural - é o corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural.
- Corante inorgânico - aquele obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados a seu emprego em alimento.
- Caramelo - o corante natural obtido pelo aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão.
- Caramelo (processo amônia) - é o corante orgânico sintético idêntico ao natural obtido pelo processo amônia, desde que o teor de 4-metilimidazol não exceda no mesmo a 200mgkg⁻¹ (duzentos miligramas por quilo).

Atualmente a legislação brasileira permite o uso de 16 corantes sintéticos, 4 corantes orgânicos sintéticos idênticos aos naturais, 21 corantes orgânicos naturais e 7 corantes inorgânicos para uso alimentício segundo o Informe Técnico nº. 68/2015 (ANVISA, 2018). No Quadro 1 estão apresentados os corantes orgânicos naturais utilizados no Brasil assim como suas fontes e as classificações químicas.

Quadro 1. Colorantes orgânicos naturais permitidos no Brasil para uso na indústria alimentícia.

Classificação química	Corante	Cor	Fonte
Antocianinas	Pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, malvidina	Vermelho-Violeta-Azul	Extrato de casca de uva, Frutas e hortaliças
Antraquinona	Ácido carmínico	Laranja-vermelho	Extrato de cochonilha (<i>Dactylopius coccus</i>)
Betalaínas	Pó de beterraba	Rosa-vermelho	Beterraba (<i>Beta L.</i>)
	Colorau		Urucum (<i>Bixa orellana L.</i>)

Carotenóides	Astaxantina	Amarelo- Laranja- Vermelho	Bactéria (<i>Paracoccus carotinifaciens</i>), Levedura (<i>Phaffia rhodozyma</i>), Microalga (<i>Haematococcus pluvialis</i>)
	Cantaxantina		Camarão
	Luteína		Vegetais verde escuros, gema de ovo
	β -Caroteno		Microalga (<i>Dunaliella salina</i>) Cenoura (<i>Daucus carota L.</i>)
	Páprica		Pimentão (<i>Capsicum annum L.</i>)
	Açafrão		Estigma (<i>Crocus sativus L.</i>)
	Licopeno		Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)
Clorofila	Clorofilina cúprica de sódio	Verde	Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)
	Clorofila cúprica		
	Clorofilina		
-	Carvão vegetal	Preto	Carbonização da madeira
Curcuminóide	Cúrcuma	Amarelo	Rizoma (<i>Curcuma longa L.</i>)
Ficocianina	Extrato de spirulina	Azul-Verde	Microalga (<i>Arthrospira platensis</i>)
Flavina	Riboflavina	Amarelo	Bactérias (<i>A. gossypii</i>) entre outras
Melanoidina	Caramelo I	Marrom	Aquecimento de açúcares

Fonte: ANVISA, 2018; SIGURDSON et al., 2016.

MERCADO DOS COLORANTES NATURAIS

O mercado de colorantes naturais na área de alimentos cresce constantemente, apesar da turbulência econômica. Estimado como um mercado de 35 milhões de dólares americanos no final dos anos 1980, 250 milhões em 2000, e 600 milhões em 2011, o emprego desses colorantes cresceram dentro da área alimentícia de 11% em 1987 para 27% em 2000 (YARNELL, 2019). O aumento acentuado do mercado de colorantes naturais pode ser atribuído a uma combinação de regulamentações mais rigorosas em relação às cores sintéticas, ao desenvolvimento de novas formulações de colorantes e ao aumento da produção de peixes (utilização de colorantes na alimentação de peixes em cativeiro). Considerando a industrialização e o aumento do consumo de alimentos processados por países como China, Índia e Brasil, uma estimativa seria que o mercado de colorantes naturais chegará a mais de 1.5 bilhões de dólares em 2020 (DE CARVALHO et al., 2014).

Os carotenóides (naturais e sintéticos) são os colorantes com maior sucesso de vendas no mercado global e espera-se que o mercado de carotenóides de origem natural atinja 1.7 bilhões de dólares até o ano de 2022. O tamanho do mercado de alimentos funcionais derivados de microalgas aumentou cinco vezes desde o início do século. Microalgas são atualmente utilizadas tanto na sua forma inteira desidratada e também como fonte para a extração de suplementos alimentares de alto valor, tais como carotenóides e ácidos graxos de ômega-3. *Chlorella* e *Spirulina* são as algas mais comercializadas em todo o mundo, com valores de produção estimados em cerca de \$40 milhões/ano (TORREGROSA-CRESPO et al., 2018).

Embora colorantes microbianos sejam várias vezes mais caros – a produção microbiana de β -caroteno custa aproximadamente 1000 dólares por quilo enquanto os sintéticos chegam a 500/kg - eles ainda podem competir com colorantes sintéticos por serem naturais e seguros (VENIL; ZAKARIA; AHMAD, 2013). Há um aumento nos esforços para reduzir os custos de produção desses colorantes usando substratos de baixo custo ou cepas melhoradas e, no futuro próximo, pode haver um monopólio do mercado de cores produzidos por microrganismos (NARSING RAO; XIAO; LI, 2017).

Na Europa, a primeira história de sucesso da produção de colorantes por microrganismos foi do fungo *Blakerlea trispora* que produz o β -caroteno. O primeiro produto comercial da família da antraquinona foi o colorante Arpink Red™ (Natural Red™), produzido pela companhia ASCOLOR BIOTECH, da república tcheca, pelo fungo *Penicillium oxalicum* var. *Armeniaca* CCM 8242 (DUFOSSÉ, 2014).

O sucesso de qualquer produto fabricado com colorante microbiano depende de sua aceitabilidade no mercado, aprovação das agências regulatórias e a quantidade de capital investido necessário para levar o produto ao mercado. O êxito mercadológico de colorantes microbianos da classe alimentar, tais como β -caroteno, luteína e astaxantina - derivada de microalgas - reflete a importância do nicho no mercado em que os consumidores estão dispostos a pagar mais por colorantes naturais (DUFOSSÉ, 2017).

COLORANTES NATURAIS DE ORIGEM MICROBIANA

Os microrganismos produtores de colorantes são os fungos, leveduras, microalgas e bactérias. Os colorantes microbianos são uma alternativa promissora e têm ganhado atenção da indústria de alimentos na Europa e Estados Unidos, levando em conta que o processo de fermentação é inerentemente mais rápido e mais produtivo do que outros processos químicos (VELMURUGAN et al., 2010), também devido a estabilidade do colorante produzido e a

viabilidade da tecnologia a qual pode ser otimizada em larga escala (MAPARI et al., 2005). Além disso, alguns colorantes microbianos podem ser produzidos a partir de resíduos agroindustriais o que torna o processo mais favorável em termos financeiro e ambiental (TULI et al., 2015).

Os maiores obstáculos para a pesquisa de novos colorantes derivados de microrganismos são: exigência da legislação de testes toxicológicos extensivos e caros, custo do processamento incluindo o cultivo ou produção e também a aceitação pelos consumidores de um produto previamente não conhecido (MAPARI et al., 2005). Ademais, existe uma diversidade de microrganismos nas regiões tropicais e subtropicais que oferecem uma variedade promissora de compostos colorantes que podem ser usados para diferentes aplicações. Assim, os colorantes microbianos surgem como uma alternativa para superar a crescente preocupação do uso de colorantes sintéticos como aditivos alimentares (VENTURA; CALADO; JESUS, 2013).

Microrganismos como as bactérias e os fungos (além de plantas e alguns animais) produzem um grupo de metabólitos secundários muito importante conhecido como policetídeos. Esses metabólitos têm notável diversidade, tanto em termos de sua estrutura como função. Os produtos naturais de policetídeos são conhecidos por possuírem inúmeras atividades farmacologicamente importantes, incluindo propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antiparasitárias, antitumorais e agroquímicas. O largo espectro de propriedades químicas dos policetídeos torna essas moléculas muito procuradas tanto econômica, quanto clínica e industrialmente (GOKHALE; SANKARANARAYANAN; MOHANTY, 2007).

Colorantes de fungos

Os fungos estão presentes em quase todos os ambientes da terra, com uma maior diversidade encontrada em regiões tropicais que têm um clima quente e úmido, a qual favorece a multiplicação fúngica. Esses microrganismos produzem enorme quantidade de metabólitos secundários que são importantes na indústria, inclusive na de colorantes. Os colorantes produzidos por esses microrganismos podem ser considerados como uma fonte natural de colorantes seguros com funcionalidade aprimorada (MAPARI; MEYER; THRANE, 2009). A diversidade de colorantes de fungos não é apenas devido a suas estruturas químicas, mas também a sua gama de cores, que podem incrementar novas cores ou tonalidades extras à paleta de cores existente das fontes de colorantes atuais (SANTOS-EBINUMA et al., 2013).

Os fungos, particularmente os ascomicetos e basidiomicetos, sintetizam e secretam uma vasta classe de colorantes que apresentam diversas cores. Cogumelos e líquens apresentam

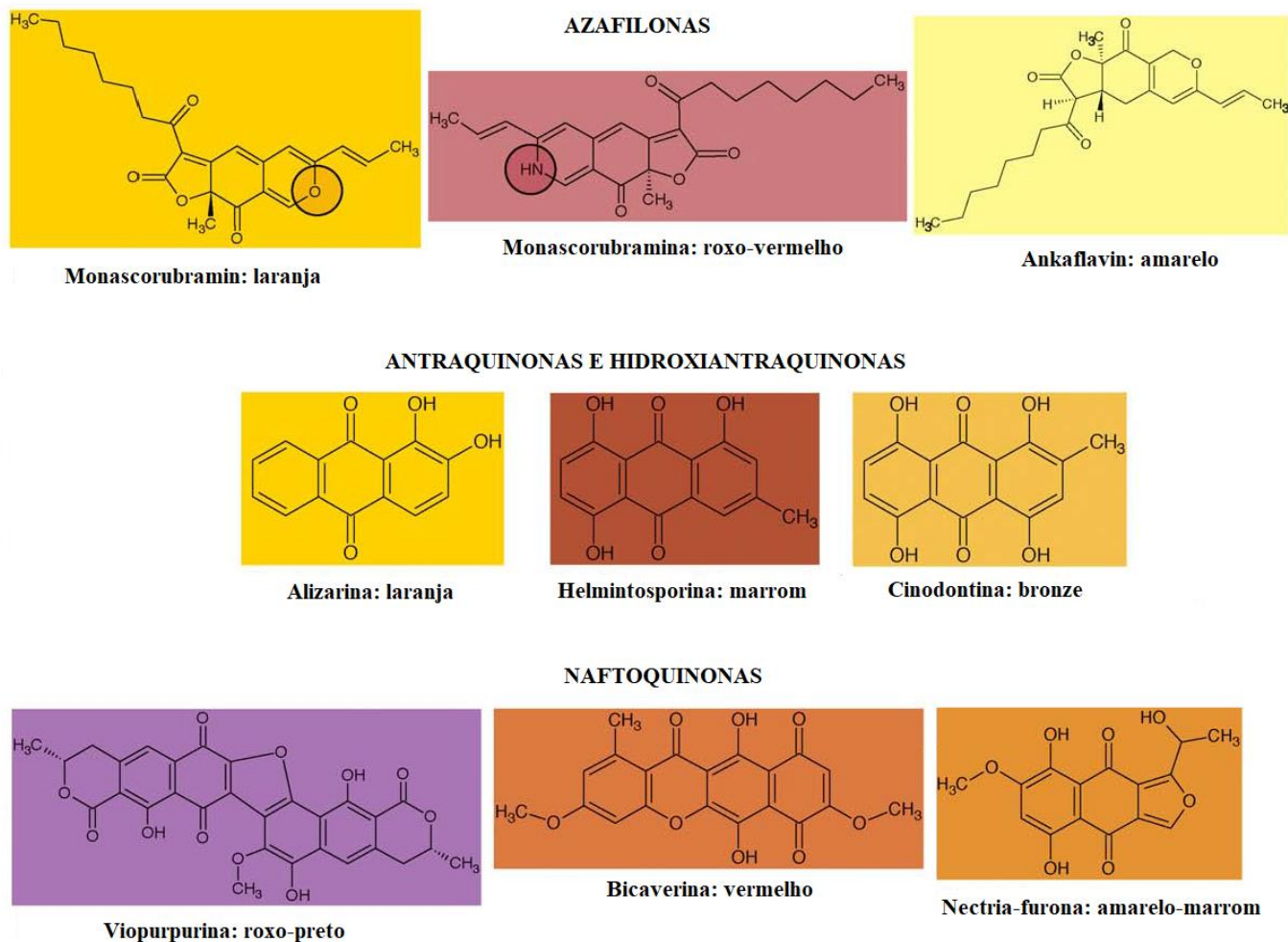
dificuldades de cultivo em condições laboratoriais, além disso, não são apropriados para produção em larga escala devido ao seu crescimento lento. Contudo, muitos ascomicetos são mais adequados para a produção de colorantes, pois estes podem ser cultivados a fim de produzir grandes quantidades destes compostos (MAPARI; THRANE; MEYER, 2010).

Colorantes são comumente produzidos por fungos e são conhecidos por protegê-los de vários estresses ambientais (EISENMAN; CASADEVALL, 2012). Por exemplo, os carotenóides fúngicos desempenham um papel protetor contra estresse oxidativo e luz UV (AVALOS; LIMÓN, 2015). Asp-melanina é um colorante característico de *Aspergillus terreus* que confere resistência contra irradiação UV e bloqueia fagocitose por ameba de solo (GEIB et al., 2016). Em *A. Flavus*, o colorante castanho escuro, asparasona, derivado de antraquinonas, é importante para a sua sobrevivência quando infecta a esclera do olho humano (CARY et al., 2014). O colorante laranja endocrocina do esporo e a melanina dos conídios são, em *A. fumigatus*, fatores de virulência que funcionam respectivamente através da inibição da migração de neutrófilos e dificulta a fagocitose associada ao LC3 (um marcador de autofagossomos) pelo hospedeiro (AKOUMIANAKI et al., 2016). As fusarubinas são colorantes vermelhos responsáveis principalmente pela coloração do corpo frutífero sexual, o peritécio, em *Fusarium fujikuroi* (STUDT et al., 2012).

Classificação dos colorantes de fungos

De forma ampla, os colorantes de fungos podem ser classificados quimicamente como carotenóides ou policetídeos. Colorantes policetídeos de fungos variam em estruturas de tetracetídeos para octacetídeos, os quais tem de quatro a oito unidades de C₂ respectivamente e que contribuem para a cadeia policetídic. Alguns deles são produzidos através de biossíntese mista, o que significa que eles estão envolvidos em outras rotas (por exemplo: síntese de aminoácidos ou terpenóides), além da rota policetídic. As classes representativas dos policetídeos incluem as antraquinonas, hidroxiantraquinonas, naftoquinonas e azafilonas, e cada classe contendo moléculas que possuem uma diversidade de cores. A unidade aminofílica mostrada na monascorubamin (produzida por espécies de *Monascus* e *Penicillium*) resulta numa variação da cor laranja para a cor roxo-vermelho, pela incorporação do aminoácido arginina, e o composto resultante é a monascorubramina (MAPARI; THRANE; MEYER, 2010) (Figura 3).

Figura 3. Algumas classes de colorantes policetídeos de fungos exibindo as respectivas cores e esqueleto estrutural típico.



Fonte: Adaptado de MAPARI et al., 2010

A maioria dos fungos que produzem colorantes são as espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Monascus* (CELESTINO et al., 2014). Fungos do gênero *Monascus* são os maiores produtores conhecidos de colorantes naturais. Esses colorantes são em maior parte as azafilonas; as seis azafilonas mais produzidas por *Monascus* são as monascina e ankaflavina (colorantes amarelos), monascorubramina e rubropunctatina (laranjas), monascorubramina e rubropunctamina (vermelhos) (FRISVAD et al., 2013). Além dos fungos do gênero *Monascus*, fungos pertencentes a outros gêneros são capazes de produzir colorantes diversos como pode ser visto no Quadro 2.

Quadro 2. Classificação de colorantes produzidos por fungos usados na indústria alimentícia ou com alto potencial para uso.

Molécula	Cor	Microrganismo	Status*
Ankaflavina (azafilona)	Amarelo	<i>Monascus sp.</i>	PI
Antraquinonas	Vermelho e outras cores	<i>Penicillium oxalicum</i> (e muitos outros fungos)	PI
Astaxantina	Rosa-vermelho	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	ED
Azafilonas	Vermelho	<i>Talaromyces atroroseus</i>	ED
		<i>Penicillium purpurogenum</i>	ED
Azulenos	Azul	<i>Lactarius sp.</i>	PP
β-carotenos	Amarelo-laranja	<i>Blakeslea trispora</i>	PI
		<i>Fusarium sporotrichioides</i>	PP
		<i>Mucor circinelloides</i>	ED
		<i>Neurospora crassa</i>	PP
		<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	PP
Monascorubramina (azafilona)	Vermelho	<i>Monascus sp.</i>	PI
Naftoquinona	Vermelho sangue	<i>Cordyceps unilateralis</i>	PP
Licopeno	Vermelho	<i>Blakeslea trispora</i>	PI
		<i>Fusarium sporotrichioides</i>	PP
Melanina	Preto	<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>nigricans</i>	PP
Monascorubramina (azafilona)	Vermelho	<i>Monascus sp.</i>	PI
Naftoquinona	Vermelho sangue	<i>Cordyceps unilateralis</i>	PP
Riboflavina	Amarelo	<i>Ashbya gossypi</i> , <i>Candida famata</i>	PI
Rubropunctatina (azafilona)	Laranja	<i>Monascus sp.</i>	PI
Torularodina	Laranja-vermelho	<i>Rhodotorula sp.</i>	ED
Desconhecido	Vermelho	<i>Paecilomyces sinclairii</i>	PP
*PI, produção industrial; ED, estágio de desenvolvimento; PP, projeto de pesquisa.			

Fonte: Adaptado de DUFOSSÉ, 2016

A indústria de colorantes tem grande importância econômica. A autorização da utilização dos colorantes produzidos por fungos em países desenvolvidos tem fortalecido projetos de pesquisa com o objetivo de explorar a diversidade fúngica (QIU et al., 2010). Alguns critérios devem ser levados em consideração para a seleção de fungos produtores de colorantes tais como: apresentar tolerância a diferentes valores de pH, temperaturas e minerais, capacidade de utilizar uma grande variedade de fontes de carbono e nitrogênio e produzir colorantes em rendimentos elevados. Além disso, não devem produzir micotoxinas nas condições de cultivo em questão, não devem ser patogênicos ao homem e devem ser de fácil manipulação (MAPARI, 2010).

Metabólitos secundários de fungos endofíticos

Fungos endofíticos são definidos como fungos que vivem uma parte ou todo seu ciclo de vida colonizando inter e/ou intracelularmente tecidos saudáveis da planta hospedeira, tipicamente sem causar sintomas de doenças visíveis (FISHER; PETRINI; SUTTON, 1993). Evidências de associação entre plantas e microrganismos encontradas em tecidos fossilizados de caules e folhas revelou que associação endófito-planta pode ter evoluído desde a primeira aparição das plantas superiores na Terra (REDECKER; KODNER; GRAHAM, 2000).

Uma vez dentro da planta hospedeira, endófitos geralmente assumem seu estado quiescente (latente) seja por todo seu ciclo de vida dentro do tecido da planta ou por um período estendido (RODRIGUEZ; REDMAN, 2008). É importante mencionar que há, aproximadamente, 300.000 espécies de plantas superiores no planeta, e cada planta contém uma diversidade de endófitos. Da miríade de ecossistemas na terra, aqueles que têm a maior biodiversidade de vida parecem ser os que também têm o maior número e mais diversidade de endófitos. As florestas tropicais e temperadas são exemplos de regiões com ecossistemas mais biologicamente diversos do planeta (STROBEL, G.; DAISY, 2003).

Embora a primeira descoberta de endófitos remonte a 1904, esse grupo de microrganismos não recebeu muita atenção nas décadas que se seguiram. Esse fato mudou drasticamente depois da detecção do paclitaxel (taxol®) no fungo endofítico *Taxomyces andreanae* que foi isolado de *Taxus brevifolia*, essa sendo a fonte original desse importante fármaco anticâncer (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993). Após alguns anos começou a ser demonstrado que a produção de compostos naturais conhecidos em endofíticos se estende a outros produtos farmacologicamente importantes como a camptotecina (PURI et al., 2005), podofilotoxina (PURI et al., 2006) entre outras.

A colonização da planta hospedeira pelos fungos endofíticos contribui para a adaptação da planta a fatores de estresse ambientais bióticos e abióticos (ALY et al., 2010). É de especial interesse que em muitos casos a tolerância a estresse biótico da planta hospedeira tem sido correlacionada com os produtos naturais oriundos dos fungos endofíticos (STROBEL et al., 2004). Fora do tecido das plantas, em cultivo, os fungos endofíticos tem mostrado ser uma fonte importante e inovadora de produtos naturais também conhecidos por produzirem uma variedade de cores que tem atividades biológicas e podem agir como anticâncer, antioxidantes e antimicrobianos com potencial aplicação na agricultura, na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia (SARANG et al., 2017), como pode ser visto no Quadro 3.

Quadro 3. Lista de colorantes produzidos por fungos endofíticos e suas atividades biológicas.

Molécula	Cor	Microrganismo	Hospedeiro	Atividade biológica	Referência
Antraquinonas	Amarelo; Laranja; Vermelho	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Halimeda opuntia</i>	Antimicrobiana, citotóxico, anti-HCV	Hawas et al., 2012
Antraquinonas (derivados)	Vermelho; amarelo	<i>Fusarium solani</i>	<i>Aponogeton undulatus Roxb.</i>	Citotóxico (câncer mama, pulmão, pâncreas)	Chowdhury et al., 2017
Azafilonas	Amarelo	<i>Colletotrichum sp. BS4</i>	<i>Buxus sinica</i>	Antimicrobiana, citotóxico	Wang et al., 2016
Fenalenonas (derivados)	Marrom	<i>Aspergillus sp. CPCC400735</i>	<i>Kadsura longipedunculata</i>	Anti-HIV	Pang et al., 2017
Hidroantraquino nas (derivados)	Amarelo	<i>Nigrospora sp. YE3033</i>	<i>Aconitum carmichaeli</i>	Antivírus (H1N1)	Zhang et al., 2016
Indol terpenos	Laranja avermelhado	<i>Mycocleptodiscus sp.</i>	<i>Desmotes incomparabilis</i>	Citotóxico	Ortega et al., 2013
Isocumarinas	Marrom	<i>Pestalotiopsis sp.</i>	<i>Photinia fraseri</i>	Antifúngico - <i>Candida glabrata</i>	Song et al., 2017
Melanina	Preto	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	<i>Rhizophora mucronata</i>	Antioxidante	Yu et al., 2015
Naftoquinonas	Vermelho alaranjado	<i>Gibberella moniliformis</i>	<i>Lawsonia inermis L.</i>	Antimicrobiana, antiparasitária	Hatnagar et al., 2017
Sesquiterpenos	Amarelo	<i>Camarops sp</i>	<i>Alibertia macrophylla</i>	Citotóxico (Linfoma, melanoma)	Gubaini et al., 2016
Vermelhotin	Laranja	<i>MEXU 26343</i>	<i>Hintonia latiflora</i>	Inibidor de Calmodulina	Leyte-lugo et al, 2012
Xantonas (derivados)	Amarelo	<i>Emericella sp. XL029</i>	<i>Panax notoginseng</i>	Antifúngico -pragas	Wu et al., 2017

Fonte: Autoria Própria, 2018.

Família *Botryosphaeriaceae*

A família *Botryosphaeriaceae* pertence ao Domínio *Eukarya*; Reino *Fungi*; Filo *Ascomycota*; Classe *Dothideomycetes* e Ordem *Botryosphaeriales* (SCHOCH et al., 2006). Seus membros são diferenciados por caracteres morfológicos e moleculares em 17 gêneros e cerca de 110 espécies. Os gêneros que compõem a família são: *Lasiodipodia spp.*, *Barriopsis spp.*, *Botryosphaeria spp.*, *Botryobambusa spp.*, *Cophinforma spp.*, *Diplodia spp.*, *Dothiorella spp.*, *Neodeightonia spp.*, *Macrophomina spp.*, *Phaeobotryon spp.*, *Sphaeropsis spp.*, *Tiarosporella spp.*, *Neoscytalidium spp.*, *Neofusicoccum spp.*, *Spencermartinsia spp.*, *Endomelanconiopsis spp.*, *Pseudofusicoccum spp.* (CARDOSO; VIANA; MARTINS, 2018). Espécies de *Botryosphaeriaceae* apresentam distribuição mundial, sendo encontradas em quase todas as regiões geográficas e climas do mundo, exceto em regiões polares, infectando plantas de diversos grupos, dentre elas plantas de interesse agrônomo, florestal e ornamental (CROUS et al., 2006). A relação desses fungos com seus hospedeiros pode se apresentar de forma endofítica, colonizando os tecidos internos do vegetal sem provocar danos; de forma patogênica, desencadeada por alguma condição de estresse como, por exemplo, elevação da temperatura, ocorrendo tanto em espécies lenhosas quanto em plantas herbáceas (SLIPPERS et al., 2013). A utilização de dados filogenéticos juntamente com amostragem em regiões pouco exploradas no Brasil, contribui para o aumento no número de espécies reconhecidas de *Botryosphaeriaceae* (COSTA et al., 2010).

Os caracteres morfológicos de valor taxonômico utilizados para a identificação são: tamanho, forma, cor, septação e espessura da parede celular dos conídios, presença de paráfises, células conidiogênicas e formato de picnídios. Na presença da fase sexual, formato e dimensões de ascos e ascósporos juntamente com os caracteres mencionados anteriormente auxiliam na identificação (CROUS et al., 2006). A morfologia da colônia e o crescimento micelial são aspectos culturais que também auxiliam na identificação de espécies de *Botryosphaeriaceae*, no entanto com um valor limitado devido à grande variabilidade desses caracteres entre isolados de uma mesma espécie (MOHALI; SLIPPERS; WINGFIELD, 2007).

Os marcadores moleculares utilizados para o sequenciamento gênico de espécies dessa família são capazes de mapear regiões específicas do DNA, dentre elas estão a região ITS (do inglês, Internal Transcribed Spacer), do DNA ribossômico 18S e 28S, e regiões codificadoras de proteínas como os genes da β tubulina (β -tub) e do fator de alongamento da tradução 1-alfa (TEF-1 α) (SLIPPERS et al., 2013). Para algumas espécies há a necessidade da combinação de

pelo menos duas sequências gênicas para uma análise filogenética mais precisa (MACHADO; PINHO; PEREIRA, 2014)

Fungos da família *Botryosphaeriaceae* isolados como endofíticos

O processo de infecção e colonização por espécies de *Botryosphaeriaceae* em seus hospedeiros ocorre principalmente por transmissão horizontal, através de esporos, podendo o fungo infectar a planta por meio de aberturas naturais ou ferimentos (MOHALI; SLIPPERS; WINGFIELD, 2007). A capacidade desses fungos de conviver como endófitos em plantas assintomáticas por longos períodos de tempo, os torna séria ameaça para a agricultura, pois plantas assintomáticas infectadas servem de fonte de inóculo para outras plantas. Preocupante também é a capacidade de movimento horizontal do fungo de hospedeiros nativos e introduzidos, para hospedeiros cultivados (GONÇALVES et al., 2016). A patogenicidade de espécies de *Botryosphaeriaceae* está intimamente ligada a algum tipo de condição de estresse ou de crescimento não ideal de plantas. Esses fatores podem, em conjunto com a pressão biológica dos patógenos, favorecer o desenvolvimento de doenças, sendo responsáveis por incitar em plantas infectadas sintomas como a morte descendente de ramos e galhos, cancrios, gomose, podridões pedunculares em frutos, morte de plantas jovens, adultas e porta-enxertos, além de se apresentarem como patógenos importantes de sementes (MOHALI; SLIPPERS; WINGFIELD, 2007).

Gênero *Pseudofusicoccum* sp.

Esse gênero foi descrito originalmente pela espécie *P. stromaticum*, e hoje possui oito espécies descritas (*P. violaceum*, *P. adansoniae*, *P. kimberleyense*, *P. stromaticum*, *P. olivaceum*, *P. ardesiacum* e *P. artocarpi*; *P. africanum*) que se distinguem principalmente pelas dimensões de seus conídios e pela produção de pigmentos em cultura (SLIPPERS et al., 2013). O Gênero *Pseudofusicoccum* foi introduzido por Crous et al. (2006) que o descreveram como intimamente relacionado com *Fusicoccum* e *Neofusicoccum* morfológicamente, mas diferia filogeneticamente de ambos os gêneros. *Pseudofusicoccum stromaticum* é considerado como espécie-típica deste gênero. A espécie *Pseudofusicoccum adansoniae* foi descrita pela primeira vez por Pavlic et al. (2008), isolado dos ramos mortos de *Adansonia gibbosa* na Austrália Ocidental. Esta espécie também foi relatada na Índia isolada das folhas e frutos de *Jatropha podagrica* (SHARMA et al. 2013). Na Tailândia, *P. adansoniae* foi isolado de caules e folhas de *Tectona grandis* (DOILOM et al. 2015)., também encontrada em folhas de *Senna siamea*,

Cassia fistula, *Dimocarpus longan* e *Hevea brasiliensis*, e fungo da espécie *P. ardesiacum* foi isolado de *Veitchia merrillii* e *Caesalpinia pulcherrima*. Nesse estudo uma espécie nova do gênero, identificada como *P. artocarpi*, foi isolada de folhas de *Artocarpus heterophyllus* (TRAKUNYINGCHAROEN et al. 2015).

No Brasil, espécies de *P. stromaticum* e *P. adansoniae* foram relatadas como endofíticas em espécies arbóreas da Caatinga cearense, porém mostrando-se patogênico quando inoculadas em frutos de manga e plantas de umbu-cajá (*Spondia sp.*) (GONÇALVES et al., 2016), sendo essas espécies anteriormente já relatadas no Brasil associadas a cancrios e a morte descendente em plantas de mangueira (MARQUES et al., 2011). Além disso, *P. stromaticum* também foi relatado como endofítico de *Anacardium occidentale* (cajuzeiro) no Ceará (NETTO et al., 2016). Tais relatos evidenciam a versatilidade taxonômica e epidemiológica do gênero, sendo esta uma característica típica da família *Botryosphaeriaceae* (GONÇALVES et al., 2016).

PRODUÇÃO DE COLORANTES POR CULTIVO SEMI-SÓLIDO E SUBMERSO

Cultivo semi-sólido

Avanços nas técnicas de cultivo tem levado a uma facilidade da produção e isolamento de diversos metabólitos secundários dentre eles os colorantes. Colorantes microbianos podem ser produzidos tanto por cultivo semi-sólido, também chamado de cultivo sólido ou em estado sólido quanto por cultivo submerso. De um modo geral, o cultivo semi-sólido é um processo microbiano que se desenvolve na superfície de materiais sólidos, apresentando a propriedade de absorver ou de conter água, com ou sem nutrientes solúveis, e estes materiais podem ser biodegradáveis ou não (MEINICKE, 2013). Para esse tipo de cultivo, é necessário que os microrganismos cresçam com nutrientes difusíveis sob ou sobre a interface líquido-sólido. O cultivo sólido apresenta algumas desvantagens, como o uso de microrganismos que crescem em baixos níveis de umidade, as dificuldades para a remoção do calor gerado pelo processo de respiração dos microrganismos, a escassez de dados e de projeto para fermentadores, a dificuldade na medida e no controle de umidade, de pH, de oxigênio, de gás carbônico e produtos formados (DE OLIVEIRA, 2017).

Cultivo submerso

O cultivo submerso tem como característica principal a utilização de um meio líquido com nutrientes solúveis, sendo o sistema mais empregado industrialmente para obtenção de metabólitos produzidos por fungos filamentosos. Uma das principais vantagens desse bioprocessos é a facilidade da manipulação das vazões líquidas e saída do biorreator, permitindo então, diferentes manipulações dos métodos de cultivo, tais como, processos em batelada, em contínuo (estacionário) ou retroalimentados. Nesses últimos dois procedimentos, a produtividade e a eficiência são aumentadas em determinados processos com relação aos de batelada (WONGSORN; WONGJEWBOOT; KONGRUANG, 2011)

Esse tipo de cultivo pode ser realizado em frascos agitados (Erlenmeyer aletados ou convencionais), biorreatores de bancada ou em escala industrial. A técnica de cultivo submerso possui relativa facilidade de produção em grande escala, já que a homogeneidade do meio e facilidade no controle de processos estão presentes principalmente se monitorados por sensores adequados. Sendo assim, a fermentação submersa vem se destacando por apresentar vantagens, como alto teor de água e a natureza diluída no meio, a qual facilita o controle da temperatura, reduzindo a degradação dos produtos (MEINICKE, 2013). Além disso, os processos difusionais e de mistura são facilitados devido ao caráter homogêneo do sistema, ocorrendo a minimização dos problemas de espaço, de escala e de controle de processos (KIM et al., 2002). Entretanto, existe maior chance de contaminação, pela maior quantidade de água e outro inconveniente é a viabilidade econômica frente ao cultivo sólido, já que os reagentes apresentam alto custo (COUTO; SANROMÁN, 2006). Sendo assim, ultimamente meios de cultivo utilizando matérias-primas de reaproveitamento de resíduos agroindustriais vem sendo empregados com a finalidade de diminuir custos e impactos ambientais, alguns exemplos de tipos de meios de cultivos empregados para produção de colorantes de fungos podem ser visto no Quadro 4 (DE OLIVEIRA, 2017).

Quadro 4. Classificação dos tipos de cultivo utilizado para produção de colorantes por fungos filamentosos e os meios de cultivo utilizados.

Tipo de cultivo	Microrganismos	Meio de cultivo	Cores	Fonte
Cultivo líquido	<i>Talaromyces albobiverticillius</i>	Batata Dextrose	Vermelho	Venkatachalam et al., 2018
	<i>Penicillium purpurogenum</i> BKS9	Sabouraud Dextrose	Vermelho	Kumar et al., 2016
	<i>Trichoderma gamsii</i>	Arroz	Laranja	Chen et al., 2017
	<i>Emericella sp.</i> XL029	Arroz e glicose	Amarelo	Wu et al., 2017

Cultivo semi-sólido	<i>Monascus purpureus</i>	Milho	Vermelho	Vemulruga et al., 2011
	<i>Monascus purpureus</i>	Folhas de palmeira	Vermelho	Hamid and Said et al., 2018
	<i>Gibberella moniliformis</i>	Ágar Batata	Laranja	Sarang et al., 2017

Fonte: Adaptado de DE OLIVEIRA, 2017

ESTRATÉGIAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE COLORANTES PRODUZIDOS POR FUNGOS

Técnicas cromatográficas

Cromatografia pode ser definida como método físico-químico de separação de componentes de mistura, com o uso de duas fases imiscíveis: uma estacionária e outra móvel. Existem várias técnicas cromatográficas que são o resultado de combinações entre diferentes fases estacionárias e fases móveis (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Técnicas de separação são usadas na identificação de compostos por comparação com padrões, purificação de compostos, separando-os de componentes de uma mistura, seja ela biológica, farmacêutica ou alimentícia (DAS NEVES, 2016).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

CLAE é um tipo de cromatografia líquida que emprega geralmente pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas e qualitativas de uma grande quantidade de compostos em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006)

A versatilidade desta técnica reside no grande número de fases estacionárias existentes, as quais possibilitam análises e separações de uma ampla gama de compostos com alta eficiência. Tem sido utilizada em várias áreas da ciência, no acompanhamento de sínteses, em análises de pesticidas, feromônios, no isolamento de produtos naturais e sintéticos e na produção e controle de qualidade de medicamentos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Além de permitir excelente separação, esta técnica possibilita simultaneamente, separar e quantificar pigmentos sem requerer purificação excessiva dos extratos (VENDRUSCOLO, 2009).

Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A RMN é uma técnica de física experimental conhecida há cerca de 50 anos. Ela tem várias aplicações, não só na física, mas também na química, na biologia e na medicina. Na química e na biologia, a RMN tem sido um poderoso auxiliar para o estudo das estruturas de moléculas complexas, tais como polímeros e proteínas, entre outras (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005). Os elétrons de determinado elemento, incluindo os de ^1H e os de ^{13}C (carbono 13) comportam-se como se fossem ímãs girando em torno de um eixo. Quando uma substância contendo elétrons ^1H ou ^{13}C é colocada em um campo magnético o qual irradia uma energia eletromagnética de frequência apropriada, esses elétrons entram em ressonância magnética com o campo magnético, absorvendo energia (SOLOMONS; FRYHLE, 2009). Ao absorver energia os elétrons passam do estado de rotação, spin α (menor energia), para o estado spin β (maior energia) e após um tempo retornam ao seu estado de rotação inicial liberando a energia absorvida. O aparelho de RMN detecta o quanto de energia foi descartado por cada elétron, produzindo um espectro característico para cada molécula denominado espectro de RMN (SOLOMONS; FRYHLE, 2009).

O espectro de RMN fornece informações valiosas sobre a estrutura molecular as quais podem auxiliar na confirmação da identidade de uma substância ou elucidar a estrutura de uma substância desconhecida. Além disso, uma das vantagens da técnica é que ela não degrada a amostra, permitindo que esta seja reutilizada em análises posteriores (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

IMPORTÂNCIA DA PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA NO ESTUDO DE NOVAS TECNOLOGIAS

Em termos gerais, os estudos de prospecção podem ser definidos como “qualquer exploração do que deve acontecer e do que nós devemos querer que venha a acontecer” ou como “o estudo do futuro para o desenvolvimento de uma atitude estratégica para a criação de um futuro desejável”. Especificamente, a prospecção tecnológica pode ser definida como “um meio sistemático de mapear desenvolvimentos científicos e tecnológicos futuros capazes de influenciar de forma significativa uma indústria, a economia ou a sociedade como um todo” (MAYERHOFF, 2008).

Os métodos de Prospecção Tecnológica são usados há várias décadas em diversos países, como uma ferramenta para orientar os esforços empreendidos para a pesquisa, desenvolvimento e

inovação. (AMPARO; RIBEIRO; GUARIEIRO, 2010). As informações históricas empregadas nos métodos de prospecção devem ser obtidas através de séries contínuas e confiáveis. Os estudos de Prospecção Tecnológica que necessitam destas informações encontram, no sistema de Propriedade Intelectual, especificamente no sistema de Patentes, um recurso valioso, uma vez que este sistema alimenta uma base de dados que vem crescendo significativamente nas últimas décadas, em função da crescente importância das patentes na economia. A patente constitui um direito temporário de exclusividade na exploração de uma nova tecnologia concedido pelo Estado. Esta concessão exige, como contrapartida do titular, a disponibilização da informação necessária para a obtenção da tecnologia objeto da proteção. Assim sendo, o patenteamento resulta na revelação de invenções que poderiam, de outra forma, ser mantidas em segredo (KUPFER; TIGRE, 2004).

Atualmente, em sua maioria, os escritórios de patentes de cada país disponibilizam a informação que publicam através de sua página na Internet. No Brasil, esta documentação vem sendo disponibilizada por este meio desde 1994. Os documentos publicados no Brasil podem também ser acessados através da base de dados do Escritório Europeu de Patentes (Espacenet®), que indexa, além de suas próprias publicações, os documentos publicados em mais de 70 países, além de disponibilizar a versão integral, em formato PDF, de grande parte desta documentação (MAYERHOFF, 2008).

O Brasil é reconhecido mundialmente por ter uma biodiversidade singular, sendo esta potencial fonte de processos de identificação de moléculas bioativas novas, e ainda assim, ocupa a 25ª posição no ranking de pedidos de patentes mundial (INPI, 2018). Para reverter essa situação é necessário investimento tecnológico, fortalecimento e inovação da indústria nacional e proteção dos recursos naturais brasileiros. Uma ferramenta que pode ajudar nesse processo é a prospecção tecnológica e a proteção das inovações através dos depósitos de patentes.

REFERÊNCIAS

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

AMPARO, K. K. D. S; RIBEIRO, M. D. C. O.; GUARIEIRO, L. L. N. Estudo de caso utilizando mapeamento de prospecção tecnológica como principal ferramenta de busca científica. **Perspectivas em Ciência da Informação**, v. 17, n. 4, p. 195–209, 2012.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução CNNPA 44. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/RESOLUCAO_CNNPA_44_1977.pdf>. Acesso em: 4 de dezembro de 2018.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Lei nº 6.360. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33864/284972/lei_6360.pdf>. Acesso em : 4 de dezembro de 2018.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Informe técnico nº 68. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Informe+T%C3%A9cnico+n%C2%BA+68%2C+de+3+de+setembro+de+2015>. Acesso em: 4 de dezembro de 2018.

AKOUMIANAKI, T.; KYRMIZI, I.; VALSECCHI, I.; ; GRESNIGT, M.S.; SAMONIS, G.; DRAKOS, E.; BOUMPAS, D.; ; MUSZKIETA, L.; PREVOST, M. C.; KONTOYIANNIS, D. P.; CHAVAKIS, T.; NETEA, M. G.; VAN DE VEERDONK, F. L.; BRAKHAGE, A. A.; EL-BENNA, J.; BEAUVAIS, A.; LATGE, J.P.; CHAMILOS, G. *Aspergillus* Cell Wall Melanin Blocks LC3-Associated Phagocytosis to Promote Pathogenicity. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 1, p. 79–90, 2016. doi: 10.1016/j.chom.2015.12.002.

ALY, A.H; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: A prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v. 41, p. 1–16, 2010. doi: 10.1007/s13225-010-0034-4.

AMCHOVA, P.; KOTOLOVA, H.; RUDA-KUCEROVA, J. Health safety issues of synthetic food colorants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 914–922, 2015. doi:10.1016/j.yrtph.2015.09.026.

ASKER, D.; AWAD, T. S.; BEPPU, T.; UEDA, K. Screening and profiling of natural ketocarotenoids from environmental aquatic bacterial isolates. **Food Chemistry**, v. 253, n. October 2017, p. 247–254, 2018. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.066

AVALOS, J.; LIMÓN, M.C. Biological roles of fungal carotenoids. **Current Genetics**, v. 61, n. 3, p. 309–324, 2015. doi: 10.1007/s00294-014-0454-x.

BECHTOLD, T. **Natural Colorants - Quinoid, Naphthoquinoid and Anthraquinoid Dyes**. Handbook of Natural Colorants, John Wiley & Sons, Ltd, 2009, p. 151-182, ISBN: 978-0-470-51199-2.

BOO, H.O.; HWANG, S. J.; BAE, C. S.; PARK, S. H.; HEO, B. G.; GORINSTEIN, S. Extraction and characterization of some natural plant pigments. **Industrial Crops and Products**, v. 40, n. 1, p. 129–135, 2012. doi: 10.1016/j.indcrop.2012.02.042.

BROADBENT, A. D. **Basic principles of textile coloration**. Color Research & Application, 2003 v. 28, n. 3, p. 230–231, ISBN: 0901956767.

BULUT, O. M.; AKAR, E. Ecological dyeing with some plant pulps on woolen yarn and cationized cotton fabric. **Journal of Cleaner Production**, v. 32, p. 1–9, 2012. doi:10.1016/j.jclepro.2012.03.010.

CARDOSO, J.E. ; VIANA, F.M.P.; MARTINS, M.V.V. Doenças Causadas por Fungos da Família *Botryosphaeriaceae* em Cajueiro. **Circular Técnica 47**, março, 2018, p. 1–18, ISSN 1679-2254.

DE CARVALHO, J. C. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de pigmentos a partir de *Monascus* por fermentação em substrato sólido**, 2004. p.1-101, Tese (Doutor em Processos Biotecnológicos) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, 2004.

CARY, J. W.; HARRIS-COWARD, P. Y.; EHRLICH, K. C.; DI MAVUNGU, J.D.; MALYSHEVA, S. V.; DE SAEGER, S.; DOWD, P. F.; SHANTAPPA, S.; MARTENS, S. L.; CALVO, A. M. Functional characterization of a veA-dependent polyketide synthase gene in *Aspergillus flavus* necessary for the synthesis of asparasone, a sclerotium-specific pigment. **Fungal Genetics and Biology**, v. 64, p. 25–35, 2014. doi: 10.1016/j.fgb.2014.01.001.

CELESTINO, J. DOS R.; CARVALHO, L.E. DE; LIMA, M. DA P.; LIMA, A. M.; OGUSKU, M. M.; SOUZA, J.V. B. DE. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 569–575, 2014. doi:10.1016/j.procbio.2014.01.018.

CHITHRA, S.; JASIM, B.; SACHIDANANDAN, P.; JYOTHIS, M.; RADHAKRISHNAN, E. K. Piperine production by endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Piper nigrum*. **Phytomedicine**, v. 21, n. 4, p. 534–540, 2014. doi: 10.1016/j.phymed.2013.10.020.

CHUNG, K.T. Azo dyes and human health: A review. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, v. 34, n. 4, p. 233–261, 2016. doi:10.1080/10590501.2016.1236602.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 5ª ed, Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

COSTA, V. S. O.; MICHEREFF, S. J.; MARTINS, R. B.; GAVA, C. A. T.; MIZUBUTI, E. S. G.; CÂMARA, M. P. S. Species of *Botryosphaeriaceae* associated on mango in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 127, n. 4, p. 509–519, 2010. doi:10.1007/s10658-010-9616-y.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry- A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291–302, 2006. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022.

CROUS, P. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W. F.O.; PHILIPS, A. J.L.; ALVES, A.; BURGESS, T.; BARBER, P.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. **Studies in Mycology**, v. 55, n. 1915, p. 235–253, 2006. doi: 10.3114/sim.55.1.235.

DE CARVALHO, J. C.; CARDOSO, L. C.; GHIGGI, V.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L. P. DE S.; SOCCOL, C. R. **Microbial Pigments**. Biotransformation Waste Biomass into High Value Biochem. Curitiba: Springer Science+Business Media New York, 2014. p. 1–504. ISBN 9781461480051.

DE OLIVEIRA, C.F.D. **Produção de pigmentos por *Monascus ruber* cct 3802 a partir do xarope de maltose como substrato**. 2017. 87 F. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, 2017.

DEVEOGLU, O.; KARADAG, R.; YURDUN, T. Qualitative hplc determination of main

anthraquinone and lake pigment contents from *Dactylopius coccus* dye insect. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 1, p. 103–104, 2011. doi: 10.1007/s10600-011-9842-3.

DUFOSSÉ, L. **Current and Potential Natural Pigments From Microorganisms (Bacteria, Yeasts, Fungi, Microalgae)**. Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color, Elsevier Ltd, 2016, p. 337-354, ISBN: 9780081003923. doi: 10.1016/B978-0-08-100371-8.00016-6.

DUFOSSÉ, L. Anthraquinones, the Dr Jekyll and Mr Hyde of the food pigment family. **Food Research International**, v. 65, n. PB, p. 132–136, 2014. doi:10.1016/j.foodres.2014.09.012.

DUFOSSÉ, L. Red colourants from filamentous fungi: Are they ready for the food industry? **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 69, p. 1-6, 2017. doi:10.1016/j.jfca.2017.11.002.

EISENMAN, H. C.; CASADEVALL, A. Synthesis and Assembly of fungal melanin. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 931–940, 2012. doi: 10.1007/s00253-011-3777-2.

ELBANNA, K.; SARHAN, O. M.; KHIDER, M.; ELMOGY, M.; ABULREESH, H. H.; SHAABAN, M.R. Microbiological, histological, and biochemical evidence for the adverse effects of food azo dyes on rats. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 3, p. 667–680, 2017. doi:10.1016/j.jfda.2017.01.005.

FISHER, P. J.; PETRINI, O.; SUTTON, B. C. A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of *Eucalyptus* in Australia and England. **Sydowia**, v. 45, n. 2, p. 338–345, 1993. doi: 10.1016/S0953-7562(09)80356-0.

FRISVAD, J.C.; THRANE, U.; HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A.; RASMUSSEN, K. B.; YILMAZ, N. *Talaromyces atroroseus*, a New Species Efficiently Producing Industrially Relevant Red Pigments. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0084102.

GEIB, E.; NIETZSCHE, S.; HILLMANN, F.; VIEDIERNIKOVA, I.; HERTWECK, C.; GRESSLER, M.; JACOBSEN, I. D.; BROCK, M. A Non-canonical Melanin Biosynthesis Pathway Protects *Aspergillus terreus* Conidia from Environmental Stress. **Cell Chemical Biology**, v. 23, n. 5, p. 587–597, 2016. doi:10.1016/j.chembiol.2016.03.014.

GOKHALE, R. S.; SANKARANARAYANAN, R.; MOHANTY, D. Versatility of polyketide synthases in generating metabolic diversity. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 17, n. 6, p. 736–743, 2007. doi: 10.1016/j.sbi.2007.08.021.

GONÇALVES, F.J.T.; FREIRE, F. C. O.; LIMA, J. S.; MELO, J. G. M.; CÂMARA, M. P.S. Patogenicidade de espécies de *Botryosphaeriaceae* endofíticas de plantas da Caatinga do estado do Ceará em manga e umbu-cajá. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 1, p. 43–52, 2016. doi: 10.1590/0100-5405/2099.

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. doi 10.5897/ajb2008.000-5037.

GÜRSSES, A. AÇIKYILDIZ, M.; GÜNEŞ, K.; GÜRSSES, M. S. **Dyes and Pigments: Their Structure and Properties**. In: Springer Briefs in Green Chemistry for Sustainability. Springer, 2016, p. 13-29. doi: 10.1007/978-3-319-33892-7.

HARASYM, J.; BOGACZ-RADOMSKA, L. Colorants in Foods - From Past To Present. **Engineering Sciences & Technologies / Nauki Inzynierskie i Technologie**, v. 3, n. 22, p. 21–35, 2016. doi: 10.15611/nit.2016.3.02.

HERBST, W.; HERBST, W.; HUNGER, K.; WILKER, G.; OHLEIER, H.; WINTER, R. **Industrial Organic Pigments: Production, Properties, Applications**, 3^a ed, Germany: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2004, p. 1–181, ISBN: 9783527602421, doi:10.1002/3527602429.

INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial). INPI lança boletim com ranking de escritórios nacionais de PI. Disponível em: <<http://www.inpi.gov.br/noticias/inpi-lanca-boletim-com-ranking-de-escritorios-nacionais-de-pi>>. Acesso em: 04 de 04 de 2019.

KIM, J. H.; OH, H. J.; SHIN, C.S. Morphology control of *Monascus* cells and scale-up of pigment fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 649–655, 2002.doi: 10.1016/S0032-9592(02)00095-X.

KUPFER, D.; TIGRE, P. B. Modelo SENAI de prospecção: documento metodológico. Capítulo 2: prospecção tecnológica. In: ORGANIZACION INTERNACIONAL DEL TRABAJO CINTERFOR. **Papeles de La Oficina Técnica**. Montevideo: OIT/CINTERFOR, 2004. n. 14.

LELEU, C.; Boulitrop, C.; Bel, B.; Jeudy, G.; Vabres, P.; Collet, E. Quinoline Yellow dye-induced fixed food-and-drug eruption. **Contact Dermatitis**, v. 68, n. 3, p. 187–188, 2013.doi: 10.1111/cod.12019.

LIN, Z.; ZHU, T.; FANG, Y.; GU, Q.; ZHU, W. Polyketides from *Penicillium* sp. JP-1, an endophytic fungus associated with the mangrove plant *Aegiceras corniculatum*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 5, p. 1273–1278, 2008.doi: 10.1016/j.phytochem.2007.10.030.

LOPES, F. C. **Produção e Análise de metabólitos secundários de fungos filamentosos**. 130 f. Dissertação (Mestrado em Biologia celular e molecular) - Universidade federal do rio Grande do Sul, 2011

MA, M.; REN, Q.; ZHANG, J. C.; HASHIMOTO, K. Effects of brilliant blue G on serum tumor necrosis factor- α levels and depression-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 31–36, 2014. doi: 10.9758/cpn.2014.12.1.31.

MACHADO, A.R.; PINHO, D. B.; PEREIRA, O. L. Phylogeny, identification and pathogenicity of the *Botryosphaeriaceae* associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity**, v. 67, n. 1, p. 231–247, 2014.doi: 10.1007/s13225-013-0274-1.

MAPARI, S.A.S.; NIELSEN, K. F.; LARSEN, T.O.; FRISVAD, J. C.; MEYER, A. S.; 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. doi: 10.1016/j.copbio.2005.03.004.

MAPARI, S.A.S.; THRANE, U.; MEYER, A.S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 300–307, 2010. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.03.004.

MAPARI, S.A S; MEYER, A.S.; 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. doi: 10.1021/jf900113q.

MARQUES, M. W.; LIMA, N. B.; MICHEREFF, S. J.; CÂMARA, M. P. S.; SOUZA, C. R. B. First Report of Mango Dieback Caused by *Pseudofusicoccum stromaticum* in Brazil. **Plant Disease**, v. 96, n. 1, p. 144–144, 2011. doi: 10.1094/pdis-05-11-0425.

MAYERHOFF, Z. D. V. L. Uma Análise Sobre os Estudos de Prospecção Tecnológica. **Cadernos de Prospecção**, v. 1, n. 1, p. 7–9, 2008.

MEINICKE, R.M. **Produção de pigmentos por *Monascus ruber* utilizando co-produtos da produção do biodiesel**. 2013. 117 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, 05 abr. 2013.

MEINICKE, R. M.; VENDRUSCOLO, F.; ESTEVES MORITZ, D.; DE OLIVEIRA, D.; SCHMIDELL, W.; SAMOHYL, R. W.; NINOW, J.L. Potential use of glycerol as substrate for the production of red pigments by *Monascus ruber* in submerged fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 238–242, 2012. doi: 10.1016/j.bcab.2012.03.001.

MOHALI, SR; SLIPPERS, B; WINGFIELD, M.J. Identification of *Botryosphaeriaceae* from Eucalyptus, Acacia and Pinus in Venezuela. **Fungal Diversity**, v. 25, n. April, p. 103–125, 2007.

MOHAMED, A. A.R.; GALAL, A. A.A; ELEWA, Y. H. A. Comparative protective effects of royal jelly and cod liver oil against neurotoxic impact of tartrazine on male rat pups brain. **Acta Histochemica**, v. 117, n. 7, p. 649–658, 2015. doi: 10.1016/j.acthis.2015.07.002.

MUKHERJEE, G. SINGH, K. S. Colour and fastness of natural dyes: Revival of traditional dyeing techniques. **Food Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 18–27, 2011. doi: 10.1111/j.1478-4408.2010.00273.x.

NARSING RAO, M. P.; XIAO, M.; LI, W.J. Fungal and bacterial pigments: Secondary metabolites with wide applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–13, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.01113.

DAS NEVES, M. R. P. **Produção de colorantes e atividade biológica de esclerotiorina**. 2016. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal Do Amazonas, 2016.

PAVLIC, D; WINGFIELD, M. J.; BARBER, P.; SLIPPERS, B.; HARDY, G. E. ST. J.; BURGESS, T. I. Seven new species of the *Botryosphaeriaceae* from baobab and other native trees in Western Australia. **Mycologia**, v. 100, n. 6, p. 851–866, 2008. doi: 10.3852/08-020.

PURI, S.C.; NAZIR, A.; CHAWLA, R.; ARORA, R.; RIYAZ-UL-HASAN, S; AMNA, T.; AHMED, B.; VERMA, VI; SINGH, S.; SAGAR, R.; SHARMA, A.; KUMAR, R.; SHARMA, R. K.; QAZI, G. N. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **Journal of Biotechnology**, v. 122, n. 4, p. 494–510, 2006.doi:10.1016/j.jbiotec.2005.10.015.

PURI, S. G.; VERMA, VI.; AMNA, T.; QAZI, G. N.; SPITELLER, M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 12, p. 1717–1719, 2005. doi: 10.1021/np0502802.

QIU, M.; XIE, R.; SHI, Y.; CHEN, H.; WEN, Y.; GAO, Y.; HU, X. Isolation and identification of endophytic fungus SX01, a red pigment producer from *Ginkgo biloba* L. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 993–998, 2010.doi: 10.1007/s11274-009-0261-6.

REDECKER, D; KODNER, R; GRAHAM, L. Glomalean fungi from the Ordovician. **Science**, v. 289, n. 5486, p. 1920, 2000.doi: 10.1126/science.289.5486.1920.

RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Supply of precursors for carotenoid biosynthesis in plants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 504, n. 1, p. 118–122, 2010.doi 10.1016/j.abb.2010.06.016.

RODRIGUEZ, R.; REDMAN, R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: Plant stress tolerance via fungal symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 5, p. 1109–1114, 2008.doi 10.1093/jxb/erm342.

SANTOS-EBINUMA, V. C.; ROBERTO, I. C.; Teixeira, M. F.S.; Pessoa, A. Improving of red colorants production by a new *Penicillium purpurogenum* strain in submerged culture and the effect of different parameters in their stability. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 3, p. 778–785, 2013.doi: 10.1002/btpr.1720.

SANTOS, R.; HALLETT, J.; OLIVEIRA, M. C.; SOUSA, M. M.; SARRAGUÇA, J.; SIMMONDS, M. S. J.; NESBITT, M. HPLC-DAD-MS analysis of colorant and resinous components of lac-dye: A comparison between *Kerria* and *Paratachardina* genera. **Dyes and Pigments**, v. 118, p. 129–136, 2015. doi: 10.1016/j.dyepig.2015.02.024.

SARANG, H.; RAJANI, P.; VASANTHAKUMARI, M. M.; KUMARA, P. M.; SIVA, R.; RAVIKANTH, G.; UMA S. R. An endophytic fungus, *Gibberella moniliformis* from *Lawsonia inermis* L. produces lawsone, an orange-red pigment. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 110, n. 7, p. 853–862, 2017.doi: 10.1007/s10482-017-0858-y.

SCHOCH, C. L. SHOEMAKER, R. A.; SEIFERT, K. A.; HAMBLETON, S.; SPATAFORA, J. W.; CROUS, P. W. A multigene phylogeny of the *Dothideomycetes* using four nuclear loci. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 1041–1052, 2006.doi: 10.3852/mycologia.98.6.1041.

SHANG, X.Y.; XU, C.L.; NIU, W.N.; DING, Y.; LI, Y.; QIN, C.G. Composition analysis and structural identification of anthocyanins in fruit of waxberry. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 29, n. No. 2, p. 171–180, 2018.doi: 10.17221/177/2010-cjfs.

SIGURDSON, G.T.; TANG, P.; GIUSTI, M. M. Natural Colorants: Food Colorants from

Natural Sources. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, n. 1, p. 261–280, 2017. doi:10.1146/annurev-food-030216-025923.

SILVERSTEIN, RM; WEBSTER, FX; KIEMLE, D.J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, 7th ed, New York, John Wiley & Sons, INC, 2005, f. 550, ISBN: 0-471-39362-2.

SLIPPERS, B.; BOISSIN, E.; PHILLIPS, A. J.L.; GROENEWALD, J. Z.; LOMBARD, L.; WINGFIELD, M. J.; POSTMA, A.; BURGESS, T.; CROUS, P. W. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriales*: A systematic and evolutionary framework. **Studies in Mycology**, v. 76, p. 31–49, 2013. doi: 10.3114/sim0020

SOLOMONS, T. W. G; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 9^a ed., Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos, 2009, f. 708, ISBN: 978-85-216-1678-8.

STIERLE, A; STROBEL, G; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v. 260, n. 5105, p. 214 LP – 216, 9 abr. 1993. doi: 10.1126/science.8097061.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491–502, 2003. doi: 10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003.

STROBEL, G.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural Products from Endophytic Microorganisms. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 257–268, 2004. doi: 10.1021/np030397v.

STUDT, L.; STUDT, LENA.; WIEMANN, P.; KLEIGREWE, K.; HUMPF, H. U.; TUDZYNSKI, B. Biosynthesis of fusarubins accounts for pigmentation of *Fusarium fujikuroi* perithecia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 12, p. 4468–4480, 2012. doi: 10.1128/AEM.00823-12.

TEIXEIRA, M. F.; Carneiro, A. L.; Kirsch, L.; Duran, 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. ISSN 2230-7303.

TORREGROSA-CRESPO, J.; MONTERO, Z.; FUENTES, J.; GARCÍA-GALBIS, M.; GARBAYO, I.; VÍLCHEZ, C.; MARTÍNEZ-ESPINOSA, R. Exploring the Valuable Carotenoids for the Large-Scale Production by Marine Microorganisms. **Marine Drugs**, v. 16, n. 6, p. 203, 2018. doi: 10.3390/md16060203.

TORRES, F. A. E.; ZACCARIM, B. R. NOVAES, L. D.C. L.; JOZALA, A. F.; DOS SANTOS, C. A.; TEIXEIRA, M. F. S.; SANTOS-EBINUMA, V.C. Natural colorants from filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2511–2521, 2016. doi: 10.1007/s00253-015-7274-x

TULI, H. S.; CHAUDHARY, P.; BENIWAL, V.; SHARMA, A. K. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 4669–4678, 2015. doi: 10.1007/s13197-014-1601-6.

- VELMURUGAN, P.; KAMALA-KANNAN, S.; BALACHANDAR, V.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; CHAE, J.C.; OH, B.T. Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 2, p. 262–268, 2010. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.07.058.
- VELMURUGAN, P.; LEE, Y.H.; NANTHAKUMAR, K.; KAMALA-KANNAN, S.; DUFOSSÉ, L.; MAPARI, S. A.S.; OH, B.T. Water-soluble red pigments from *Isaria farinosa* and structural characterization of the main colored component. **Journal of Basic Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 581–590, 2010. doi: 10.1002/jobm.201000097.
- VENDRUSCOLO, F. **Produção de pigmento vermelho a partir de pigmento laranja produzido por *Monascus ruber* cct 3802**. 2009. 255 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.
- VENIL, C. K.; ZAKARIA, Z. A.; AHMAD, W. A. Bacterial pigments and their applications. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1065–1079, 2013. doi:10.1016/j.procbio.2013.06.006.
- VENTURA, P.; CALADO, G.; JESUS, B. Photosynthetic efficiency and kleptoplast pigment diversity in the sea slug *Thuridilla hopei* (Vérany, 1853). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 441, p. 105–109, 2013. doi:10.1016/j.jembe.2013.01.022.
- WONGSORN, H.; WONGJEWBOOT, I.; KONGRUANG, S. Solvent stability of ultrasonic mutants of *Monascus purpureus* pigments. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 1, n. 3, p. 206–210, 2011. doi: 10.7763/ijbbb.2011.v1.37.
- WROLSTAD, R.E.; CULVER, C.A. Alternatives to Those Artificial FD&C Food Colorants. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 59–77, 2012. doi: 10.1146/annurev-food-022811-101118>.
- YANG, H.; LI, J.; WANG, Y.; GAN, C. Identification of water-soluble *Monascus* yellow pigments using HPLC-PAD-ELSD, high-resolution ESI-MS, and MS-MS. **Food Chemistry**, v. 245, p. 536–541, 2018. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.10.121.
- YANGILAR, F.; YILDIZ, P.O. Microbial Pigments and the Important for Food Industry. **Journal of Science and Technology**, v. 9, n. 2, p. 118-142, 2016. doi: 10.18185/eufbed.55880.
- YARNELL, A. Bringing Blue To A Plate Near You. **Chemical and Engineering News**. Disponível em: <https://cen.acs.org/articles/90/i37/Bringing-Blue-Plate-Near.html>. Acesso em: 12 de Janeiro de 2019.
- YUSUF, M.; SHABBIR, M.; MOHAMMAD, F. Natural Colorants: Historical, Processing and Sustainable Prospects. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 7, n. 1, p. 123–145, 2017. doi:10.1007/s13659-017-0119-9.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como principal objetivo a produção de pigmentos a partir do cultivo submerso do fungo endofítico C2C3 isolado da planta *Manilkara salzmannii*, o isolamento e identificação estrutural dos pigmentos purificados através de técnicas cromatográficas e espectroscópicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a identificação morfológica e molecular do fungo endofítico C2C3;
- Extrair os pigmentos utilizando solvente acetato de etila;
- Isolar os pigmentos produzidos através das técnicas de cromatografia em coluna aberta e camada delgada;
- Identificar a provável pureza dos pigmentos isolados através da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizando o detector de fotodiodo;
- Realizar a elucidação estrutural dos pigmentos purificados através da técnica espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear utilizando os dados de ^1H , HSQC e HMBC.

CAPÍTULO II: ARTIGO 01 - ESTUDO PROSPECTIVO DE COLORANTES MICROBIANOS SOB O ENFOQUE DE DOCUMENTOS DE PATENTES

Artigo submetido ao periódico Recent Patents on Biotechnology.

PROSPECTIVE STUDY OF MICROBIAL COLORANTS UNDER THE FOCUS OF PATENT DOCUMENTS

Brisa Rosatti Pereira Gonçalves¹; Bruna Aparecida Souza Machado²; Samira Abdallah
Hanna³; Marcelo Andrés Umsza-Guez⁴

¹Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA – Brasil

brisa.rosatti@ufba.br

²Faculdade de Tecnologia SENAI CIMATEC, Salvador – BA - Brasil

brunam@fieb.org.br

³Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA – Brasil

samira.ufba@gmail.com

⁴Universidade Federal da Bahia, Salvador – BA – Brasil

marcelo.umsza@ufba.br

RESUMO

Microrganismos produtores de colorantes são comuns na natureza. Estas biomoléculas apresentam muitas atividades biológicas como antitumorais, antimicrobianos e antioxidantes, além das várias nuances de cor, tornando-as de especial importância tecnológica para os setores industriais. Assim, este artigo tem como objetivo a prospecção de patentes relacionadas a corantes microbianos e suas aplicações nas indústrias. O delineamento experimental foi realizado pelo escopo direcionado por palavras-chave através da pesquisa avançada na base de dados Espacenet do European Patent Office (EPO). As palavras-chave selecionadas foram (*bacteria or fung* ou yeast or algae or microorganism**) *not plant* and (pigment* or color* or corant* or dye*)* e o código de Classificação Internacional de Patentes (CIP), C09B61, para prospecção de interesse. A pesquisa resultou em 139 registros de patentes em diferentes países, instituições, CIP, área industrial e tipos de microrganismos. Nessa perspectiva, houve um aumento linear nos depósitos de patentes nos últimos 20 anos, tendo o Japão como o maior depositante na área, as empresas Dainippon Ink e Chemicals e Ajinomoto, ambas japonesas, são as maiores depositantes com 20% de todas as patentes. Entre os microrganismos, os fungos filamentosos apareceram em primeiro lugar com 32% de documentos e os fungos do gênero *Monascus* foram os mais utilizados. O uso de corantes microbianos vem crescendo entre as

indústrias, principalmente nos setores de alimentos, devido à crescente demanda por produtos de origem natural. Assim, o aumento da pesquisa e do desenvolvimento tecnológico na área de corantes microbianos pode se tornar uma estratégia economicamente viável e promissora para os diversos setores industriais.

Palavras-chave: colorantes; microrganismos; *Monascus*; banco de dados de patentes

ABSTRACT

Colorant-producing microorganisms are common in nature. These biomolecules present many biological activities such as antitumoral, antimicrobial and antioxidant, in addition to the various nuances of color, making them of special technological importance to the industrial sectors. Thus, this article aims to prospect patents related to microbial colorants and applications in the industry. The experimental design was carried out by the keyword-driven scope through the advanced search in the Espacenet database European Patent Office (EPO). Keywords selected were (Bacteria or fung* or yeast or algae or microorganism*) not plant* and (pigment* or color* or corant* or dye*) and the International Patent Classification (IPC), C09B61, for prospecting of interest. The research resulted in 139 patent records in different countries, institutions, IPC, industrial area and types of microorganisms. From this perspective, there was a linear increase in patent deposits in the last 20 years, with Japan as the largest depositor in the area, the companies Dainippon Ink and Chemicals and Ajinomoto, both Japanese, are the largest depositors with 20% of all patents. Among the microorganisms, the filamentous fungi appeared in the first place with 32% of documents and the fungi of the genus *Monascus* was the most used. The use of microbial colorants has been growing among industries, mainly in food sectors, due to the growing demand for products of natural origin. Thus, the increase in research and technological development in the area of microbial colorants can become an economically viable and promising strategy for the various industrial sectors.

Keywords: colorants; microorganisms; *Monascus*; patents database

INTRODUÇÃO

Os ingredientes derivados de cultivo microbiano vêm ganhando continuamente espaço nas indústrias de alimento. A comercialização bem-sucedida de pigmentos naturais como β -caroteno, luteína e astaxantina derivados de microalgas (ou seja, fontes não convencionais) ou extraídas de plantas (fontes convencionais), tanto como corantes alimentares como suplementos

nutricionais, reflete a presença e a importância dos nichos de mercado em que os consumidores estão dispostos a pagar um mais por ingredientes saudáveis naturais (DUFOSSÉ et al., 2014). Esforços têm sido feitos, para reduzir os custos da produção de origem microbiana, uma vez que os pigmentos sintéticos ou aqueles extraídos de fontes vegetais naturais podem muitas vezes ser produzidos mais economicamente (DUFOSSÉ, 2017).

Atualmente, os colorantes sintéticos vêm sendo gradualmente substituídos por naturais, pois pesquisas científicas comprovaram os efeitos tóxicos para saúde e sua baixa-biodegradabilidade, levando ao acúmulo dos mesmos no ambiente (MALIK; TOKKAS; GOYAL, 2012). Dentre os colorantes naturais os mais utilizados atualmente são os de fontes vegetais, mas estes, têm certas desvantagens tais como a instabilidade à luz, ao calor ou a variação de pH, à baixa solubilidade na água e na maioria das vezes dependem da sazonalidade (NIGAM; LUKE, 2016).

Os colorantes de fontes microbiana possuem algumas características interessantes, pois, além de cores, produzem moléculas que apresentam diversas atividades biológicas (MAPARI; THRANE; MEYER, 2010). Por exemplo, a melanina produzida pela bactéria *Streptomyces glaucescens* foi reportada com atividade antitumoral contra o melasma (EL-NAGGAR; EL-EWASY, 2017), as antraquinonas sintetizadas pelo fungo endofítico *Stemphylium lycopersici* com excelente atividade antioxidante (LI; XUE; YU, 2017), e o pigmento do fungo *Monascus ruber* mostrou atividade antimicrobiana contra bactérias de origem alimentícia (VENDRUSCOLO et al., 2014).

Assim, é possível aplicar esses colorantes microbianos, explorando o seu potencial multifuncional, em praticamente todas as indústrias, como a alimentícia, farmacêutica, cosmética e têxtil (DUFOSSÉ, 2016). Além disso, cepas microbianas que produzem colorantes podem ser isoladas, extraídas, caracterizadas e purificadas a partir de diferentes fontes ambientais, tais como: solo, água, plantas e animais, o que pode levar a descobertas de novas moléculas com diferentes aplicabilidades (PANESAR; KAUR; PANESAR, 2015).

Uma ferramenta muito utilizada para analisar tais tecnologias é a prospecção tecnológica, e pode ser definida como um meio sistemático de mapear desenvolvimentos científicos e tecnológicos futuros capazes de influenciar de forma significativa uma indústria, a economia ou a sociedade como um todo (MAYERHOFF, 2008). Ao utilizar as informações oriundas das patentes numa prospecção tecnológica, é possível identificar tecnologias relevantes, concorrentes no mercado, investimentos, processos, produtos, dentre outros (AMPARO; RIBEIRO; GUARIEIRO, 2012).

Nesse contexto o objetivo desse trabalho foi realizar um mapeamento tecnológico na base de patente do European Patent Office (EPO), com intuito de avaliar o panorama mundial da

utilização de colorantes microbianos, ter conhecimento das tecnologias utilizadas nos processos de produção, verificar quais tipos de instituições predominam nos registros de patentes, as áreas de aplicabilidade nas indústrias e os microrganismos produtores.

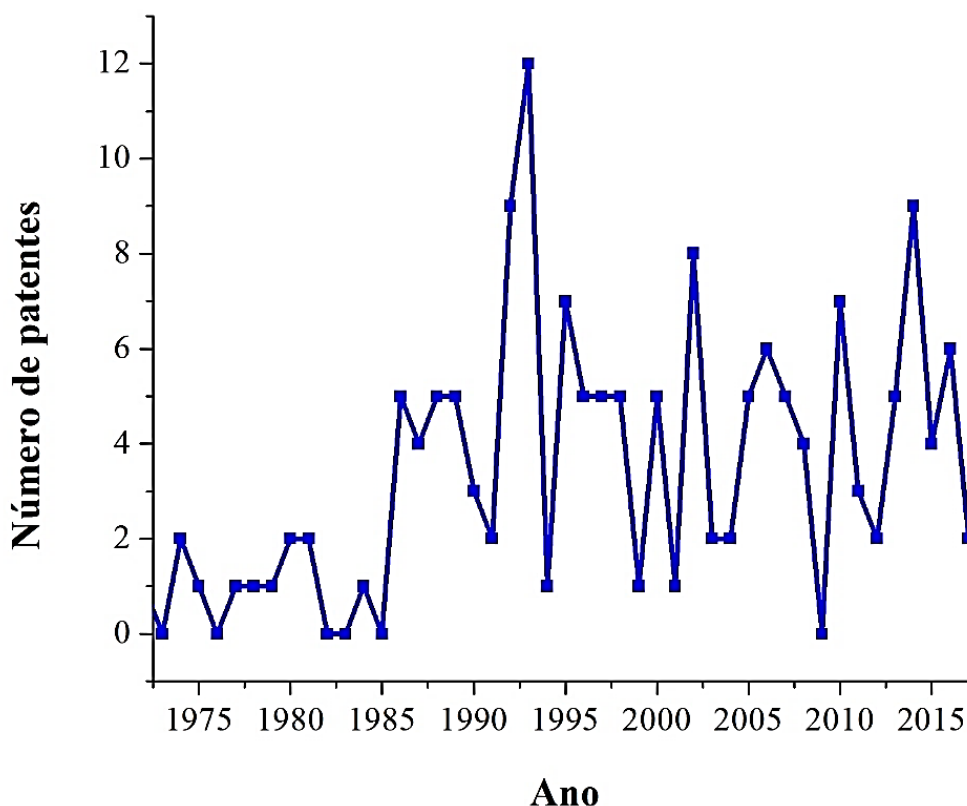
METODOLOGIA

Esta prospecção tecnológica foi realizada entre os meses de maio e junho de 2018, tendo como base os pedidos de patentes depositados no European Patent Office (EPO). A EPO é uma base mundial de acesso livre usualmente escolhida para prospecção e dispõe de uma base de dados que compila um acervo de patentes depositadas em mais de 90 países incluindo os pedidos de patentes depositados no Brasil (Instituto Nacional de Propriedade Industrial - INPI), além de disponibilizar a versão integral de grande parte desta documentação. O foco da pesquisa foi o levantamento de dados a respeito de colorantes de origem microbiana e aplicações na indústria. Para a obtenção dos dados foi elaborada uma estratégia de busca levando-se em consideração palavras-chave como: (*Bacteria or fung* or yeast or algae or microorganism**) *not plant* and (pigment* or color* or corant* or dye*)* associadas com o código de classificação internacional (C09B61), correspondente a corantes naturais preparados a partir de fontes naturais. Foram excluídos documentos pertencentes às mesmas famílias e documentos que reportavam colorantes de origens não microbianas como de plantas e animais. A prospecção tecnológica foi realizada por meio de coleta, tratamento e análise das informações extraídas dos documentos de patentes encontrados totalizando 139 documentos prioritários.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A evolução anual de patentes dos dados estudados nessa prospecção, encontrados no período de 1972 a 2017 (Figura 1) mostra que a tecnologia se encontra numa etapa de acúmulo do conhecimento, onde o número de patentes depositadas ainda é reduzido, com total de 139 patentes depositadas na área de colorantes microbianos em um período de 45 anos. Essa etapa é importante para o desenvolvimento e aprimoramento das técnicas, mostrando uma grande possibilidade de investimentos (QUINTELLA et al., 2011).

Figura 1. Evolução anual das patentes relacionadas a colorantes microbianos



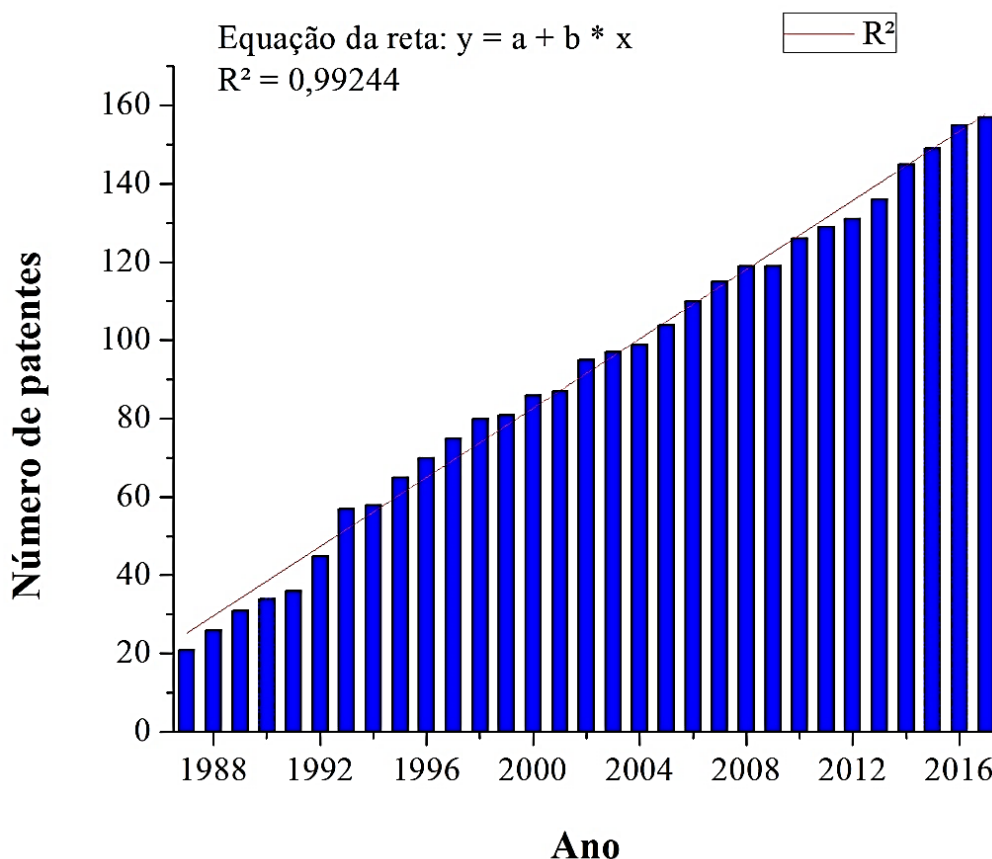
Fonte: Autoria própria (2018)

A primeira patente depositada em 1972 pertence aos Estados Unidos e se refere a técnicas de produção de colorantes solúveis em água pelo fungo *Monascus*. Entre os anos de 1972 e 1985 houve pouca variação nos depósitos de patentes, alternando anualmente entre zero a dois pedidos. O período entre os anos de 1992 e 1993 houve um maior depósito de patentes na área pesquisada e das 21 patentes depositadas nesses dois anos, 12 pertencem ao Japão correspondendo a 57% dos pedidos. A falta de dados entre o período de 2017 e 2018 é devido ao fato de não se dispor informações completas devido ao período de 18 meses de sigilo das patentes.

Ao observar a evolução acumulativa anual das patentes no período entre 1987 e 2017 (Figura 2) é notável um aumento no registro dos documentos de patentes, através do valor de $R^2 = 0,99244$, calculado por regressão linear, confirmou-se o aumento linear nos registros dos documentos de patentes referentes a colorantes microbianos ao longo dos últimos 20 anos. Na verdade, há uma tendência mundial de crescimento no número de depósitos de patentes; mais

de 3 milhões de aplicações de patentes foram preenchidas no mundo em 2016, o maior número alcançado até essa data (WIPO, 2017).

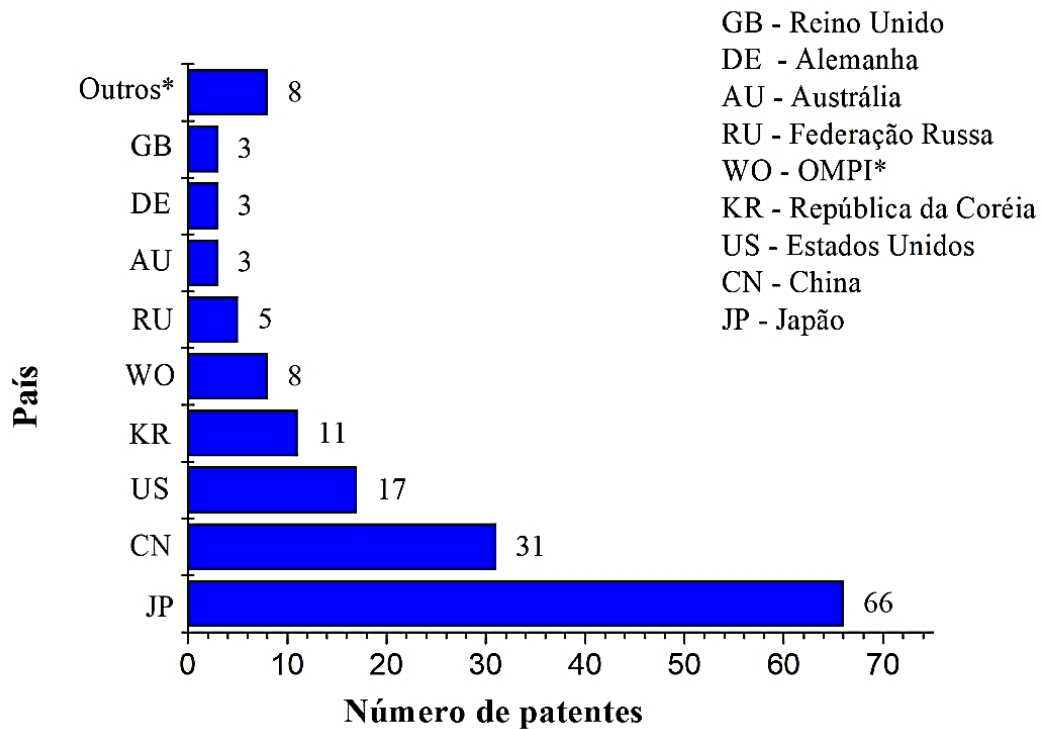
Figura 2. Evolução anual acumulativa de patentes relacionadas a colorantes de origem microbiana



Fonte: Autoria própria (2018)

O Japão é o maior detentor das tecnologias patentárias depositadas na área de colorantes microbianos com 66 patentes, 42,5 % do total, e em segundo lugar a China com 31 patentes, 20% dos registros, assim ambos os países totalizam 62,5 % dos registros de patentes, como pode ser verificado na Figura 3. O Brasil não aparece na lista de países depositantes. Houve uma tendência de aumento no número de patentes entre os cinco maiores escritórios do mundo - China, EUA, Japão, República da Coreia e EPO - de 74% em 2006 para 84% em 2016 (WIPO, 2017), corroborando para os dados coletados nessa pesquisa, nos quais esses cinco países citados aparecem nos primeiros lugares em depósitos de patentes de colorantes microbianos (Figura 3).

Figura 3. Número de patentes por país relacionado a colorantes de origem microbiana



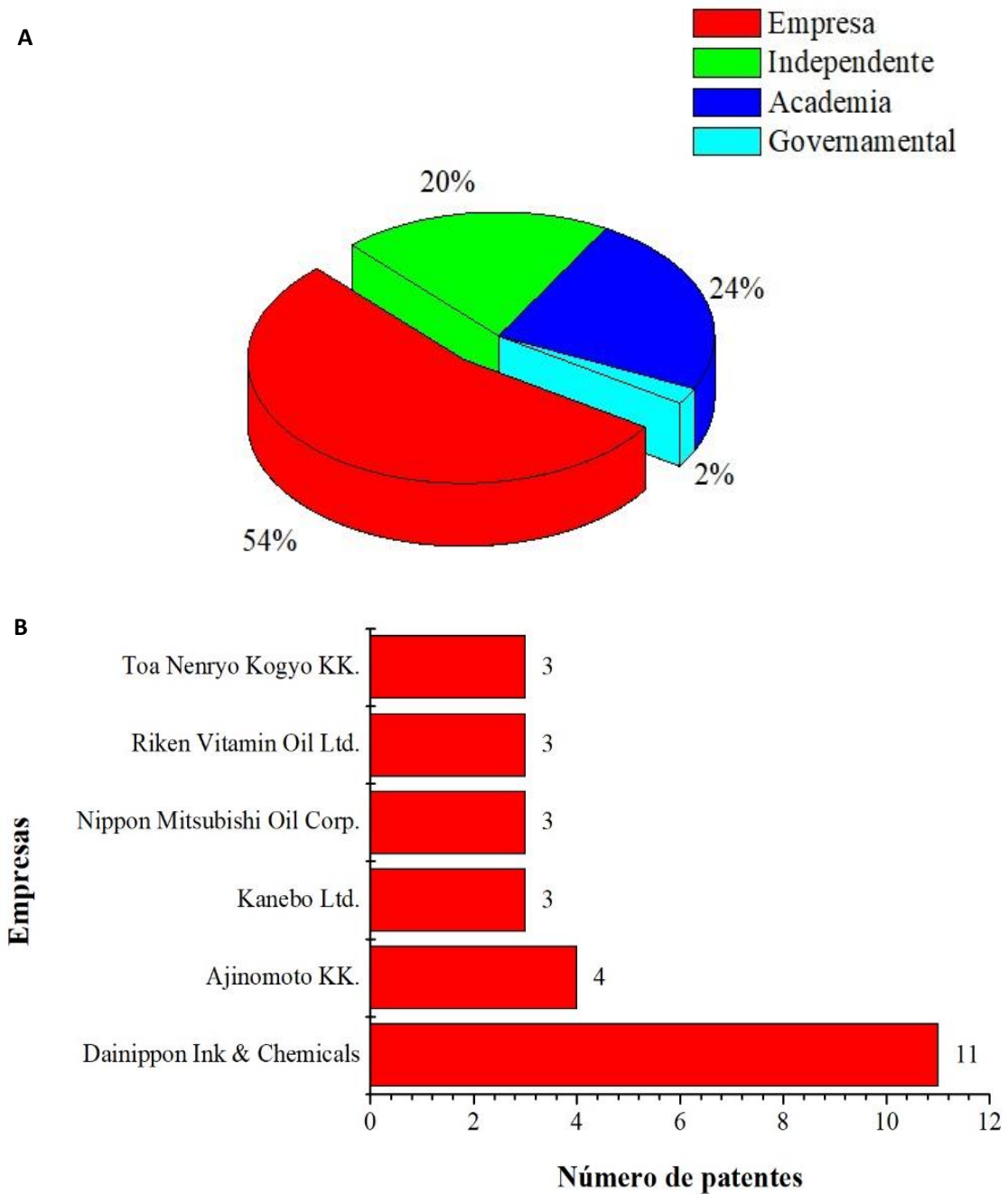
Outros*: União das Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS), Bulgária, Suíça, República Checa, Organização Europeia de Patentes (EPO), Israel, Ucrânia; França; OMPI*: Organização Mundial da Propriedade Intelectual

Fonte: Autoria Própria (2018)

Ao analisar os tipos de instituições depositantes (Figura 4A) é possível identificar o percentual de patentes que foram depositadas pela academia, por pessoas físicas, pelas corporações empresariais ou por instituições governamentais. Observa-se que as empresas detêm a maior parte da tecnologia com 75 patentes, representando 54%. As universidades e instituições governamentais possuem juntas 36 patentes (26%) e pessoas físicas possuem 28 depósitos de patentes (20%).

Na Figura 4B estão listadas em ordem crescente as 6 empresas com maior número de patentes depositadas, do total de 36 instituições privadas encontradas nessa prospecção. As empresas japonesas Dainippon Ink & Chemicals; que produz tintas, pigmentos orgânicos e polímeros e Ajinomoto; produtora de gêneros alimentícios humano e animal, nutrição especializada e fertilizantes, são as empresas que mais depositaram na área com 11 e 4 das patentes registradas, respectivamente.

Figura 4. A. Classificação dos tipos de instituição depositante; B. Empresas mais relevantes no depósito de patentes para colorantes de origem microbiana



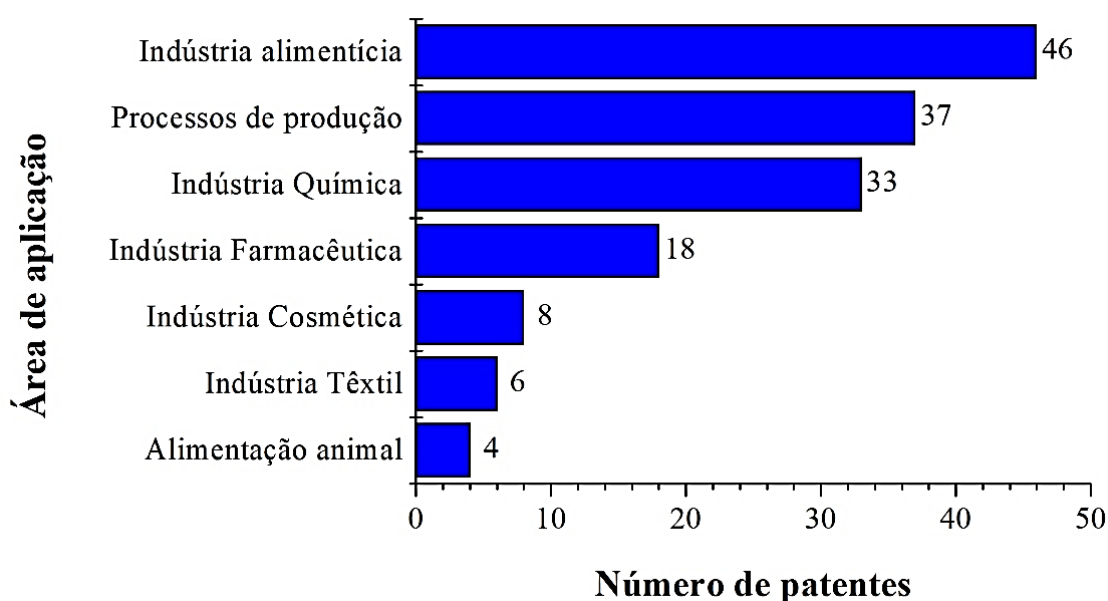
Fonte: Autoria própria (2018)

Analisando a área da aplicação das patentes de colorantes microbianos, a indústria de alimentos possui o maior número de registros, como é visto na Figura 5, totalizando 46 pedidos de patentes, e em seguida as patentes relacionadas aos processos de produção de colorantes com 37 registros, ambos somando 54,5 % do total de depósitos.

Os colorantes microbianos têm diversas aplicações, além da atual utilização em alimentos e bebidas, podem ser usados na indústria química em tintas, plásticos, papel; na indústria farmacêutica, explorando o potencial antimicrobiano, anti-inflamatório, anticâncer entre outros; e ainda em formulações cosméticas (TULI et al., 2015).

A produção de colorantes naturais tem crescido bastante nos últimos anos, este fato é comprovado observando a dinâmica do mercado internacional de colorantes alimentícios que no ano de 2016 foi estimado em cerca de 1.3 bilhões de dólares americanos, à uma taxa de crescimento anual de 6.8% e a expectativa é que os colorantes naturais alcancem até 2026 uma venda de 2.2 bilhões de dólares americanos (HARASYM; BOGACZ-RADOMSKA, 2016), devido à crescente conscientização entre os consumidores sobre os benefícios na saúde associados ao produto (DUFOSSE et al., 2014).

Figura 5. Número de patentes por área/aplicação de colorantes de origem microbiana



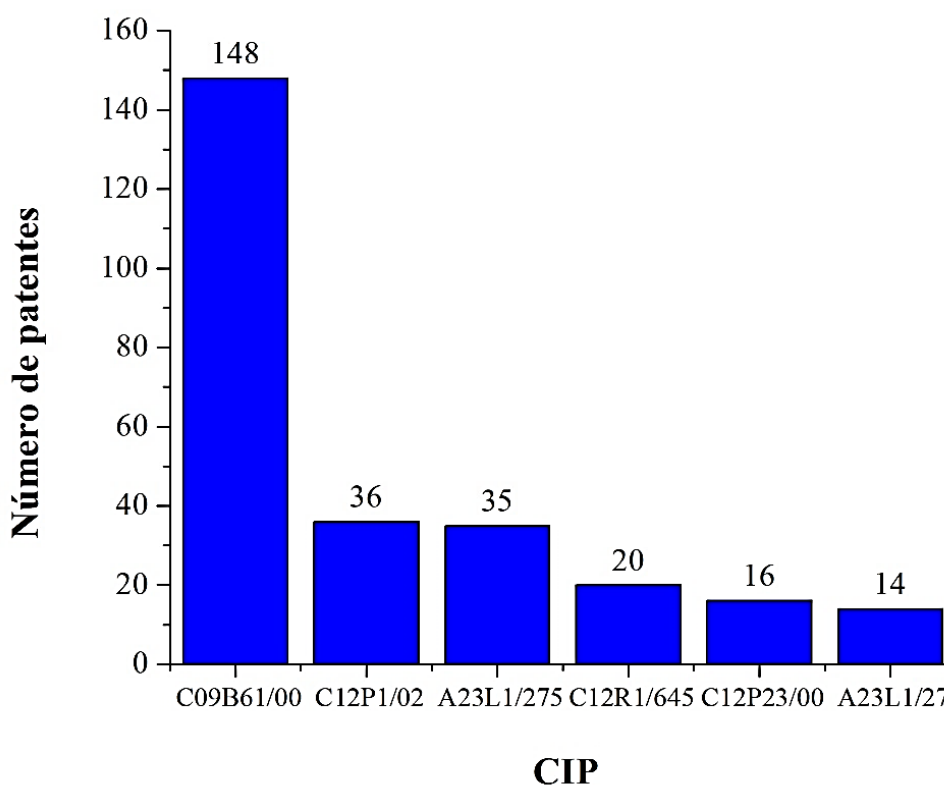
Fonte: Autoria própria (2018)

Os colorantes naturais além das inúmeras vantagens já citadas, possuem pouca ou não apresentam toxicidade em relação aos sintéticos, que podem causar efeitos toxicológicos (MALIK; TOKKAS; GOYAL, 2012) como reações alérgicas e intolerância (CHUNG, 2016) efeitos carcinogênicos (AMCHOVA; KOTOLOVA; RUDA-KUCEROVA, 2015) e afetam o comportamento infantil, tendo a hiperatividade como desordem mais comum (MASONE; CHANFORAN, 2015). Como resultado, a preocupação em relação aos colorantes sintéticos

vem crescendo, o que resultou na implementação em regulações em vários países, na redução do número de colorantes sintéticos aprovados para alimentos pelas agências reguladoras (RYMBAY et al., 2011), assim como o retorno dos colorantes naturais no mercado principalmente no setor alimentício (SIVAKUMAR et al., 2011).

Nas patentes estudadas foi possível verificar os códigos mais utilizados em relação às tecnologias de colorantes microbianos. Pela Figura 6 verifica-se que o código mais utilizado é o C09B61/00, relacionado a colorantes naturais obtidos a partir de fontes naturais, com 148 registros, e em segundo lugar o C12P1/02, relacionado à preparação de compostos ou composições pelo uso de micro-organismos ou enzimas; pelo uso de fungos, com 36 patentes. Na tabela 1 estão listadas as descrições dos Códigos de Classificação Internacional e suas respectivas descrições.

Figura 6. Número de patentes por código de maior relevância referente a colorantes de origem microbiana



Fonte: Autoria própria (2018)

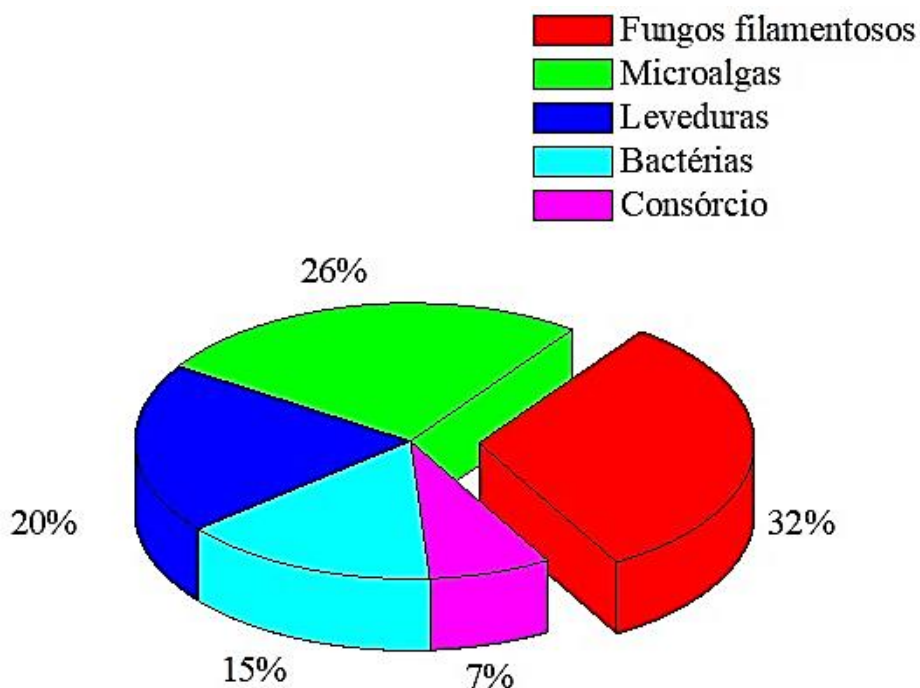
Tabela 1. Principais códigos da Classificação Internacional de Patentes (CIP) e suas respectivas definições segundo a base de dados Espacenet

CIP	Definição
C09B61/00	Corantes naturais preparados a partir de fontes naturais
C12P1/02	Pelo uso de fungos
A23L1/275	Adição de corantes ou pigmentos com ou sem clareadores ópticos
C12R1/645	Fungos
C12P23/00	Preparação de compostos contendo um anel ciclohexeno tendo uma cadeia lateral insaturada contendo pelo menos dez átomos de carbono ligados por duplas ligações conjugadas, p. ex. carotenos
A23L1/27	Coloração ou descoloração dos alimentos

Fonte: Autoria própria (2018)

Através da análise dos documentos patentários os tipos de microrganismos empregados nas tecnologias descritas foram classificados conforme a seguir. Os fungos filamentosos apareceram com maior porcentagem, 32% dos registros; as microalgas, com 26%; as leveduras, bactérias e o consórcio entre dois ou mais microrganismos ficaram com 20%, 15% e 7%, respectivamente do total de patentes depositadas (Figura 7).

Figura 7. Classificação dos microrganismos produtores de colorantes utilizados nas tecnologias patenteadas



Fonte: Autoria própria (2018)

Apesar de cientistas saberem há muito tempo das habilidades dos microrganismos em produzirem colorantes, apenas na década de 1950 foi publicado o primeiro artigo sobre produção de carotenóides pelo fungo *Blakeslea trispora*, e o primeiro carotenóide fúngico lançado industrialmente foi o β -caroteno em 1995, durante o Food Ingredients Europe em Londres, pela companhia Holandesa Gist Brocades, agora DSM (DUFOSSÉ, 2006).

Hoje, a indústria de alimentos na Europa e EUA já vem obtendo colorantes naturais de microrganismos devido a suas vantagens em relação ao de plantas e animais como estabilidade, produção em larga escala, alta taxa de crescimento, amplo espectro de cores, e devido a suas atividades biológicas (TORRES et al., 2016). Pela perspectiva da indústria, colorantes produzidos por microrganismos são relevantes pois é possível garantir que o metabólito de interesse será produzido sob condições controladas, independente de fatores externos e suprimentos sazonais de matéria-prima (VELMURUGAN et al., 2010).

Dentre as fontes não convencionais de colorantes, os fungos filamentosos são conhecidos por produzirem uma extraordinária variedade de cores que incluem diversas classes químicas como os carotenóides, as melaninas, as azafilonas, flavinas, fenazinas, quinonas e mais especificamente as monascinas, violaceínas e índigo (DUFOSSÉ et al., 2014). Essa diversidade dos colorantes de fungos não se deve apenas pelas suas estruturas químicas, mas também pela sua ampla nuance de cores indo do vermelho ao azul (SANTOS-EBINUMA; TEIXEIRA; PESSOA, 2013), e além disso, esses microrganismos são mais adequados para produção em larga escala porque podem crescer mais facilmente de forma a atingir altos rendimentos usando condições otimizadas de tecnologia (VENIL et al., 2014).

Atualmente, alguns colorantes naturais de microrganismos já existem no mercado, dentre eles está o colorante Natural Red™ produzido pelo fungo *Penicillium oxalicum*; ficocianina da microalga *Arthrospira (Spirulina) platensis*; riboflavina do fungo *Ashbya gossypii*; licopeno e β -caroteno do fungo tropical *Blakeslea trispora*; β -caroteno da microalga *Dunaliella salina*, e astaxantina da bactéria *Paracoccus carotinifaciens* e da microalga *Haematococcus Pluvialis*, respectivamente (DUFOSSÉ et al., 2014).

Analisando os documentos patentários foi verificado que a maioria dessas patentes estão relacionadas a produção e aplicação de colorantes produzidos por fungos do gênero *Monascus*. É de conhecimento que fungos do gênero *Monascus* são utilizados para produzir colorantes naturais e como suplemento alimentar, através da fermentação do arroz, por mais de mil anos na Ásia, e bilhões de asiáticos consomem produtos fermentados na sua dieta diária (DUFOSSÉ, 2016).

As regulamentações dos corantes alimentícios variam em todo o mundo, tornando a legalidade universal de todos os pigmentos difícil de discutir. Muitos países da América Latina e Europa adotaram as especificações do Codex Alimentarius ou do Joint FAO (Organização Alimentar e Agrícola) /WHO (Organização Mundial de Saúde) Comité de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA). Outros, como os Estados Unidos, Coréia e Japão, regulam os aditivos de corantes alimentares de forma independente (WROLSTAD; CULVER, 2012).

De acordo com a Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA (FDA, sigla em inglês), os corantes alimentícios são regulados aparte de outros aditivos de alimentos e não podem receber o status como Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS). Uma substância só pode ser GRAS se o seu reconhecimento geral de segurança se basear nas inspeções de peritos qualificados ou basear-se em um histórico de utilização segura ou em procedimentos científicos (FDA, 2015).

Os produtos derivados do fungo *Monascus* não são aprovados pela FDA dos EUA para uso em medicamentos ou em corantes de alimentos, mas têm um status de GRAS na Ásia (MARTINS et al., 2016). Essa proibição pela FDA é válida pois a falta de uma padronização na produção desses produtos fermentados pode conter pequenas quantidades dos compostos como a monacolina K e citrina que podem levar a miopatia, insuficiência renal e toxicidade no fígado (GORDON et al., 2010).

CONCLUSÃO

Os 139 documentos de patentes prospectados nesse artigo no período de 1972 a 2017, mostram que a maioria das tecnologias relacionadas a corantes de microrganismos pertencem ao Japão e a China com 42,5% e 20% respectivamente, assegurando seus conhecimentos e técnicas desenvolvidas através de depósitos patentários no banco de dados do European Patent Office. As instituições privadas são as maiores depositantes, com 54% de todos os registros e dentre as 36 empresas que apareceram nos dados, as empresas japonesas Dainippon Ink & Chemicals e Ajinomoto detém a maioria das patentes, com 15% e 5%, respectivamente. A indústria alimentícia e os processos tecnológicos de produção são as áreas em que estão depositadas a maior parte das tecnologias relacionadas a corantes microbianos, ambos somando 54,5 % dos registros de patentes.

Os dados levantados sobre os tipos de microrganismos utilizados para produção de corantes, correlacionam os fungos filamentosos como os principais produtores, com 32% das patentes, e as microalgas em segundo lugar com 26%. Dentre esses fungos, foi constatado através da leitura

dos documentos, que o fungo do gênero *Monascus* é o principal microrganismo envolvido nessa tecnologia até o ano de 2017. Dessa forma, o incremento de pesquisas e o desenvolvimento tecnológico na área de colorantes microbianos poderá se tornar uma estratégia economicamente viável e promissora para os vários setores industriais.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

AMCHOVA, P.; KOTOLOVA, H.; RUDA-KUCEROVA, J. Health safety issues of synthetic food colorants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 3, p. 914–922, 2015.

AMPARO, K. K. D. S.; RIBEIRO, M. D. C. O.; GUARIEIRO, L. L. N. Estudo de caso utilizando mapeamento de prospecção tecnológica como principal ferramenta de busca científica. **Perspectivas em Ciência da Informação**, v. 17, n. 4, p. 195–209, 2012.

ARULDASS, C. A.; DUFOSSÉ, L.; AHMAD, W. A. Current perspective of yellowish-orange pigments from microorganisms- a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 180, p. 168–182, 2018.

CHUNG, K. T. Azo dyes and human health: A review. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, v. 34, n. 4, p. 233–261, 2016.

DUFOSSÉ, L. **Current and Potential Natural Pigments From Microorganisms (Bacteria, Yeasts, Fungi, Microalgae)**. Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color, Elsevier Ltd, 2016, p. 337-354, ISBN: 9780081003923. doi: 10.1016/B978-0-08-100371-8.00016-6.

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

DUFOSSÉ, L. Microbial Production of Food Grade Pigments Microbial Production of Food Grade Pigments. **Food Technol. Biotechnol**, v. 44 (3), p. 313–321, 2006.

EL-NAGGAR, N. E. A.; EL-EWASY, S. M. Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

FDA. Microorganisms & Microbial-Derived Ingredients Used in Food (Partial List). **Food And Drug Administration**, p.1–5, 2015. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/MicroorganismsMicrobialDerivedIngredients/default.htm>>. Acesso em: 03 setembro 2018

GORDON, R. Y.; COOPERMAN, T.; OBERMEYER, W.; BECKER, D. J. Marked variability of monacolin levels in commercial red yeast rice products: Buyer beware! **Archives of Internal Medicine**, v. 170, n. 19, p. 1722–1727, 2010.

HARASYM, J.; BOGACZ-RADOMSKA, L. Colorants in Foods - From Past To Present. **Engineering Sciences & Technologies / Nauki Inzynierskie i Technologie**, v. 3, n. 22, p. 21–35, 2016.

LI, F.; XUE, F.; YU, X. H. GC-MS, FTIR and Raman Analysis of Antioxidant Components of Red Pigments from *Stemphylium lycopersici*. **Current Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 532–539, 2017.

MALIK, K.; TOKKAS, J.; GOYAL, S. Microbial Pigments: A review. **International Journal of Microbial Resource Technology**, v. 41, n. 4, p. 361–365, 2012.

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

MARTINS, N.; RORIZ, C. L.; MORALES, P.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F R. Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. **Trends in Food Science and Technology**, v. 52, p. 1–15, 2016.

MASONE, D.; CHANFORAN, C. Study on the interaction of artificial and natural food colorants with human serum albumin: A computational point of view. **Computational Biology and Chemistry**, v. 56, p. 152–158, 2015.

MAYERHOFF, Z. D. V. L. Uma Análise Sobre os Estudos de Prospecção Tecnológica. **Cadernos de Prospecção**, v. 1, n. 1, p. 7–9, 2008.

NIGAM, P. S.; LUKE, J. S. Food additives: Production of microbial pigments and their antioxidant properties. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 93–100, 2016.

PANESAR, R.; KAUR, S.; PANESAR, P. S. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: A review. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, n. 1, p. 70–76, 2015.

QUINTELLA, C. M.; MEIRA, M.; GUIMARÃES, A. K.; TANAJURA, A.D. S.; DA SILVA, H. R. G. Prospecção Tecnológica como uma Ferramenta Aplicada em Ciência e Tecnologia para se Chegar à Inovação. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 5, p. 406–415, 2011.

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

TORRES, F. A. E.; ZACCARIM, B. R. NOVAES, L. D.C. L.; JOZALA, A. F.; DOS SANTOS, C. A.; TEIXEIRA, M. F. S.; SANTOS-EBINUMA, V.C. Natural colorants from filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2511–2521, 2016.

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

VELMURUGAN, P.; LEE, Y.H.; NANTHAKUMAR, K.; KAMALA-KANNAN, S.; DUFOSSÉ, L.; MAPARI, S. A.S.; OH, B.T. Water-soluble red pigments from *Isaria farinosa* and structural characterization of the main colored component. **Journal of Basic Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 581–590, 2010.doi: 10.1002/jobm.201000097.

VENDRUSCOLO, F.; TOSIN, I.; GIACHINI, A. J.; SCHMIDELL, W.; NINOW, J. L. Antimicrobial activity of monascus pigments produced in submerged fermentation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, n. 4, p. 1860–1865, 2014.doi: 10.1111/jfpp.12157.

VENIL, C. K.; ARULDASS, C. A.; DUFOSSÉ, L.; ZAKARIA, Z. A.; AHMAD, W.A. Current perspective on bacterial pigments: Emerging sustainable compounds with coloring and biological properties for the industry-an incisive evaluation. **RSC Advances**, v. 4, n. 74, p. 39523–39529, 2014.

WIPO. Patent. 2017. Disponível em:

<http://www.wipo.int/edocs/pubdocs/en/wipo_pub_941_2017-chapter2.pdf>. Acesso em: 23 agosto 2018

WROLSTAD, R. E.; CULVER, C. A. Alternatives to Those Artificial FD&C Food Colorants. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 59–77, 2012.

**CAPÍTULO III: ARTIGO 02 - NEW POLYKETIDE PIGMENT FROM
ENDOPHYTIC FUNGUS *Pseudofusicoccum sp. C2C3***

Artigo a ser submetido ao periódico Brazilian Journal of Microbiology

Novo pigmento policetídeo isolado de *Pseudofusicoccum sp.* C2C3

Brisa Rosatti Pereira Gonçalves¹, João Carlos Silva Conceição¹, Bruna Aparecida Souza Machado², Eliane Oliveira Silva¹, Samira Abdallah Hanna¹, Warley Souza Borges³, Marcelo Andrés Umsza Guez¹

¹ Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil;

² Centro Universitário SENAI CIMATEC, Salvador, Bahia, Brasil;

³ Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

Correspondência para: B.R.P Gonçalves (E-mail: brisa.rosatti@ufba.br)

RESUMO

Dentre os colorantes produzidos por microrganismos, atenção especial tem sido direcionada a fungos filamentosos, visto que podem ser cultivados em condições controladas produzindo grandes quantidades de metabólitos. Os fungos do grupo dos endofíticos são microrganismos promissores que podem produzir metabólitos idênticos às das plantas hospedeiras, com atividades metabólicas importantes. Nesse contexto, esse estudo teve como objetivo a identificação morfológica e molecular do fungo endofítico C2C3 isolado da planta *Manilkara salzmannii*, assim como, a produção de pigmentos em meio Sabouraud Dextrose, o isolamento desses pigmentos por técnicas cromatográficas e identificação estrutural das estruturas, pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear. Para identificação em nível de espécie, foi utilizada a análise dos fragmentos parciais de genes de RNAr 18S (SSU) e 28S (LSU) e o fator de alongamento da tradução 1-alfa (TEF1- α). O fungo C2C3 foi identificado como pertencente ao gênero *Pseudofusicoccum sp.*, pela análise do marcador genético 18S (SSU). Em cultivo submerso, o fungo endofítico C2C3 produziu pigmentos solúveis com aparência vermelha escura, depois de 21 dias à 28 °C em repouso. O extrato bruto extraído com acetato de etila foi submetido a cromatografia em coluna aberta e cromatografia delgada utilizando solventes com polaridades diferentes para isolamento dos diferentes pigmentos. A técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi utilizada para determinar a provável pureza dos pigmentos isolados. A partir dos dados espectroscópicos obtidos por ¹H, HSQC e HMBC, foi elucidada a estrutura do composto isolado. Um pigmento laranja da classe policetídeo, 4-hidroxi-5-(4-hidroxifenil) tetrahydro-2H-piran-2-ona, foi identificado no extrato produzido pelo

Pseudofusicoccum sp. C2C3. Várias frações semi-purificadas com pigmentos isoláveis de amarelo, laranja e vermelho foram detectadas durante esse trabalho, dessa forma, estudos mais aprofundados são requeridos para possíveis aplicações na indústria.

Palavras-chave: Fungos; *Botryosphaeriaceae*; *Manilkara salzmannii*; RMN; HPLC; policetídeo.

ABSTRACT

Among the colorants produced by microorganisms, special attention has been directed to filamentous fungi, since they can be cultivated under controlled conditions producing large amounts of metabolites. The fungi of the endophytic group are promising microorganisms that can produce metabolites identical to that of the host plants, with important metabolic activities. In this context, the objective of this study was the morphological and molecular identification of the C2C3 endophytic fungus isolated from the *Manilkara salzmannii* plant, as well as the production of pigments in Sabouraud Dextrose medium, the isolation of these pigments by chromatographic techniques and structural identification of the structures by the Nuclear magnetic resonance. For species-level identification, the analysis of the partial genes fragments of RNAr 18S (SSU), 28S (LSU) and the elongation factor of 1- α (TEF1- α) were used. The fungus C2C3 was identified as belonging to the genus *Pseudofusicoccum* sp., by the analysis of the genetic marker 18S (SSU). In submerged cultivation, the C2C3 endophytic fungus produced soluble pigments with dark red appearance, after 21 days at 28 ° C, at rest. The crude extract extracted with ethyl acetate was submitted to open column chromatography and thin chromatography using solvents with different polarities for isolation of the different pigments. The High Performance Liquid Chromatography technique was used to determine the probable purity of the isolated pigments. From the spectroscopic data obtained by ¹H, HSQC and HMBC, the structure of the isolated compound was elucidated. A polyketide orange pigment, 4-hydroxy-5-(4-hydroxyphenyl) tetrahydro-2H-piran-2-one, was identified in the extract of *Pseudofusicoccum* sp. C2C3. Several fractions with isolable pigments of yellow, orange and red were detected during this work, so further studies are required for possible applications in the industry.

Key words: Fungi; *Botryosphaeriaceae*; *Manilkara salzmannii*; RMN; HPLC; polyketide

INTRODUÇÃO

Fungos endofíticos são um grupo de microrganismos diversos, que passam todo ou parte de seu ciclo de vida em tecidos vegetais vivos sem causar qualquer sintoma perceptível da doença (STROBEL, 2002). Quase todas as plantas possuem bactérias e/ou fungos endofíticos, entretanto, os mais frequentemente isolados são os fungos (STROBEL e DAISY, 2003). A simbiose entre plantas e endófitos é bem conhecida; especificamente, o primeiro protege e alimenta o último, que "em troca" produz bioativos para a planta, tornando-se mais resistente à ambientes com intenso estresse causado por fatores bióticos (insetos, herbívoros, nematoides parasitas e microrganismos fitopatogênicos) ou abióticos (pH, temperatura, estresse hídrico, ventos fortes, salinidade), melhorando dessa forma, o crescimento e a competitividade do hospedeiro na natureza (KUSARI HERTWECK SPITELLER, 2012).

Há um crescente interesse para o uso de colorantes naturais principalmente devido aos malefícios causados pelos corantes sintéticos, tais como desenvolvimento de alergias e doenças degenerativas (DUFOSSÉ et al., 2005). Pigmentos naturais são derivados de várias fontes, principalmente de plantas e microalgas e têm aplicações em muitos alimentos e bebidas. No entanto, eles têm vários inconvenientes como instabilidade, disponibilidade sazonal e alto custo ao considerar a aplicação industrial (MAPARI; THRANE; MEYER, 2010). Além dessas fontes, os microrganismos fornecem uma alternativa aos pigmentos sintéticos, pois crescem em diferentes sistemas de cultura, são independentes das condições climáticas e fornecimento de matéria-prima agrícola (YANG, Guodong et al., 2018) . Também, alguns dos pigmentos produzidos pelos microrganismos possuem uma estabilidade elevada a condições extremas de luz, temperatura e pH (ZHENG et al., 2016).

Com estas vantagens, atenção especial tem sido direcionada a fungos filamentosos que são produtores potenciais de inúmeros tons de pigmentos que incluem várias classes químicas, tais como carotenóides, melaninas, flavinas, fenazinas, quinonas, monascinas, violaceína ou Indigo (DUFOSSÉ, Laurent, 2014), variando de amarelo, vermelho, castanho avermelhado e bronze (MALIK; TOKKAS; GOYAL, 2012)

Apesar deste potencial, um repertório de plantas continua pouco estudada em relação à sua composição endofítica, como exemplo *Manilkara salzmannii* (A. DC.) Lam (*Sapotaceae*). Essa planta, também conhecida como maçaranduba, é muito comum em áreas de transição entre vários biomas e também é utilizada para reflorestamento de áreas da restinga na costa da Bahia (GONÇALVES et al., 2016). Apesar desse ser um ambiente extremo, esta espécie vegetal não é afetada por muitos fitopatógenos, apresentando resistência e sua aparência é atrativa (DE ALMEIDA et al., 2011).

O bioma da restinga pode ser caracterizado por áreas arenosas, de alta salinidade e com uma vegetação típica, com plantas adaptadas e de ocorrência descontínua no litoral brasileiro, sendo inclusive um bioma de transição para a Mata Atlântica (ARAÚJO e LACERDA, 1987). Estudos com espécies do gênero *Manilkara* indicaram a presença de várias atividades biológicas, como a antimicrobiana (DE BRUM VIEIRA et al., 2016), inseticida (FERNANDES et al., 2014) e antioxidante (PARIKH; PATEL, 2016) que indica o grande potencial biológico de gênero. Assim, o presente estudo teve como objetivo a identificação morfológica e molecular do fungo endofítico C2C3 isolado de folhas de *Manilkara salzmannii*, a produção de pigmentos em meio líquido, o isolamento desses pigmentos produzidos através de técnicas cromatográficas e a elucidação estrutural do composto isolado utilizando a técnica espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento do fungo endofítico

Folhas saudáveis da planta *Manilkara salzmannii* (A. DC.) H. J. Lam, foram coletadas crescendo na área de preservação ambiental Parque das Dunas, em Salvador, Bahia, Brasil. As coletas foram realizadas em julho de 2016. As amostras foram transportadas para o laboratório em sacos de papel fechados e processadas dentro de 24 h de coleta. As folhas foram lavadas com água da torneira, esterilizadas mergulhando sequencialmente em etanol 70% durante 2 min, hipoclorito de sódio 3% por 3 min, e etanol 70% em 30 segundos e depois lavadas 3 vezes em água estéril e secas em condições estéreis (QIU et al., 2010). Após secas, foram cortadas em pedaços de 0,5 cm × 0,5 cm usando tesouras esterilizadas e inseridas em placas de Petri contendo sabouraud dextrose ágar 2% (SDA) à 28° C. As placas de Petri foram observadas diariamente, e as hifas das colônias emergentes foram reinoculadas em novas placas de SDA até que culturas puras fossem obtidas. Um dos isolados, a cepa C2C3, produzindo pigmento de cor vermelha foi preservado pelo método de Castellani para as análises futuras (URDANETA; LACAZ, 1965).

Características morfológicas do fungo endofítico

Para observar a morfologia das colônias, a cepa C2C3 foi cultivada em placas de SDA a 28 ° C por 5 dias no escuro. As características macroscópicas como tamanho, forma, cor, odor e textura

da superfície das colônias foram descritas conforme o método estabelecido por Crous et al., (2006). As características microscópicas (tamanho e forma das hifas, conídios e conidiósporos) foram medidas a partir de cepas de C2C3 cultivadas em placas de SDA por 2 – 3 dias (YANG, Guodong et al., 2018). O Microscópio Nikon Eclipse E200 com câmera digital Panasonic WV-CP470/CH e o software Motic foram empregados para capturar as imagens.

Identificação molecular do fungo endofítico

O isolado foi cultivado previamente em ágar Malte 2% e o micélio foi coletado para extração de DNA genômico. A extração foi realizada com lise físico-química descrita anteriormente em LACERDA; GUSMÃO; RODRIGUES, 2018. Fragmentos parciais das sequências de genes para as subunidades ribossomais 18s (SSU) e 28s (LSU), e o fator de alongamento da tradução 1-alfa (TEF1- α), foram amplificados e utilizados na análise molecular. Os amplicons foram purificados usando o kit Product Cleanup Exosap-Ittm PCR (Thermo Fisher Scientific) e sequenciados com o kit BigDye Terminator® v. 3,1 (Thermo Fisher Scientific). As sequências de primers usadas foram geradas no sequenciador ABI 3500 (Thermo Fisher Scientific) e montadas utilizando o software BioEdit v. 7.0.5 (HALL, 1999). As sequências LSU, SSU e TEF1- α foram amplificadas utilizando os seguintes primers: SSU (NS1 - GTAGTCATATGCTTGTCTC; NS4 - CTTCCGTCAATTCCTTTAAG); LSU (LR0R - ACCCGCTGAACTTAAGC; LR5 - TCCTGAGGGAAACTTCG); TEF1- α (EF1-728F - CATCGAGAAGTTCGAGAAGG; EF1-986R - TACTTGAAGGAACCCTTACC). As sequências consensos foram comparadas com sequências homologas depositadas no GenBank (similaridade para cada marcador disponível na tabela 1). Para as análises filogenéticas, cada região foi alinhada por meio do software MAFFT v. 7. com o conjunto de dados disponível em (SLIPPERS et al., 2013) e com outras sequências depositadas no GenBank. As análises evolutivas foram realizadas no software MegaX (KUMAR et al., 2018) e as árvores filogenéticas foram inferidas pelo algoritmo Neighbor Joining, com 1000 repetições geradas pelo teste de bootstrap. As distâncias evolutivas foram calculadas utilizando-se o método Kimura-2-Parâmetros.

Cultivo e isolamento de metabólitos

O isolado C2C3 foi cultivado em uma placa SDA à 28 °C por 7 dias. O crescimento da massa fúngica foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL ($\times 12$). Cinco pedaços ($5 \times 5 \text{ mm}^2$) de

plugues de ágar contendo micélio foram inoculados em meio líquido Sabouraud Dextrose 5%, e o cultivo foi mantido a 28 °C por 21 dias em condições estáticas (SHI et al., 2017). O cultivo foi filtrado para separação do micélio e então submetido a extração com acetato de etila (EtOAc) (1:3 v/v) por 3 vezes. O extrato de acetato de etila foi seco com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e evaporado sob pressão reduzida usando evaporador rotatório (IKA, RV 10D, EUA) à 45 °C e resultou em um extrato bruto semi-sólido vermelho (791 mg) (WIJERATNE et al., 2014). O extrato bruto foi submetido a cromatografia em coluna aberta (4 x 20 cm) utilizando sílica gel 60 (Merck) e diferentes solventes de polaridade crescente, hexano/acetato de etila/metanol, para produzir 18 frações as quais foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD) e aquelas com perfis semelhantes foram combinadas para dar onze frações (fr. A-L). Essas frações foram submetidas a uma nova cromatografia com sílica gel (1,5 x 24 cm) eluída com gradiente de hexano/acetato de etila/metanol, para resultar nas quatro frações principais [1 (25, 7 mg), 2 (23 mg), 3 (11, 9 mg) e 4 (18,8 mg)], em que a fração 4 foi detectada contendo um composto puro. As cromatografias em camada delgada foram realizadas com sílica gel 60 F254 (0,25 mm; Merck, Alemanha) e submetidas à luz ultravioleta (WANG et al., 2016).

Análise estrutural dos compostos isolados

A pureza das frações foi analisada por HPLC em fase reversa utilizando o sistema de Shimadzu LC-20AD (Shimadzu, Japão) equipado com uma coluna Shim-pack C18 (250 mm x 4.6 mm), tamanho de poro de 5 µm (Shimadzu, Japão), um detector de arranjo de fotodiodo SPD-M 20^a e um degaseificador com amostrador automático SIL020AXR. O fluxo foi ajustado para 0,8 mLmin⁻¹ com um volume de injeção de 20 µL e temperatura do forno 25° C (WU et al., 2017). A fase móvel consistiu de água ultrapura: ácido acético (bomba A) e metanol (bomba B). A fração foi preparada com 100% de metanol na concentração de 1mgmL⁻¹, diluída a 10% e 20 µL da solução foi injetada no sistema de HPLC com eluição total de 30 min. Os dados foram processados com o software Shimadzu LabSolution.

Os espectros de RMN foram processados em um espectrômetro de 400 MHz Bruker avance II (400,6 MHz de ¹H à 27 ° C) em metanol deuterado (CD₃OD 99,8 %). Os sinais residuais de solventes foram utilizados como padrão interno (δH 3,32 ppm) e (δH 4.80 ppm). As análises de ¹H NMR, HSQC e HMBC foram realizadas usando o software ACDLabs. Os dados de ¹H RMN, HSQC e HMBC do composto 4 estão apresentados na tabela 2.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização morfológica e molecular do fungo *Pseudofusicoccum* sp. C2C3

Após sete dias de cultivo em SDA à 5%, as culturas atingiram a borda da placa com 5 cm de diâmetro e apresentaram micélio denso formando anéis concêntricos e regulares algumas vezes apresentando exsudatos, a cor é variável, de branco ou verde acinzentado à vermelho escuro, com odor frutado. O micélio aéreo apresenta-se branco e o micélio submerso vermelho (Figura 1a-b). É observável os conidiósporos submergindo das hifas basais e o esporo sexual está ausente (Figura 1d). Após 21 dias de cultivo submerso em sabouraud dextrose os pigmentos solúveis são presentes no meio apresentando cor avermelhada (Figura 1c).

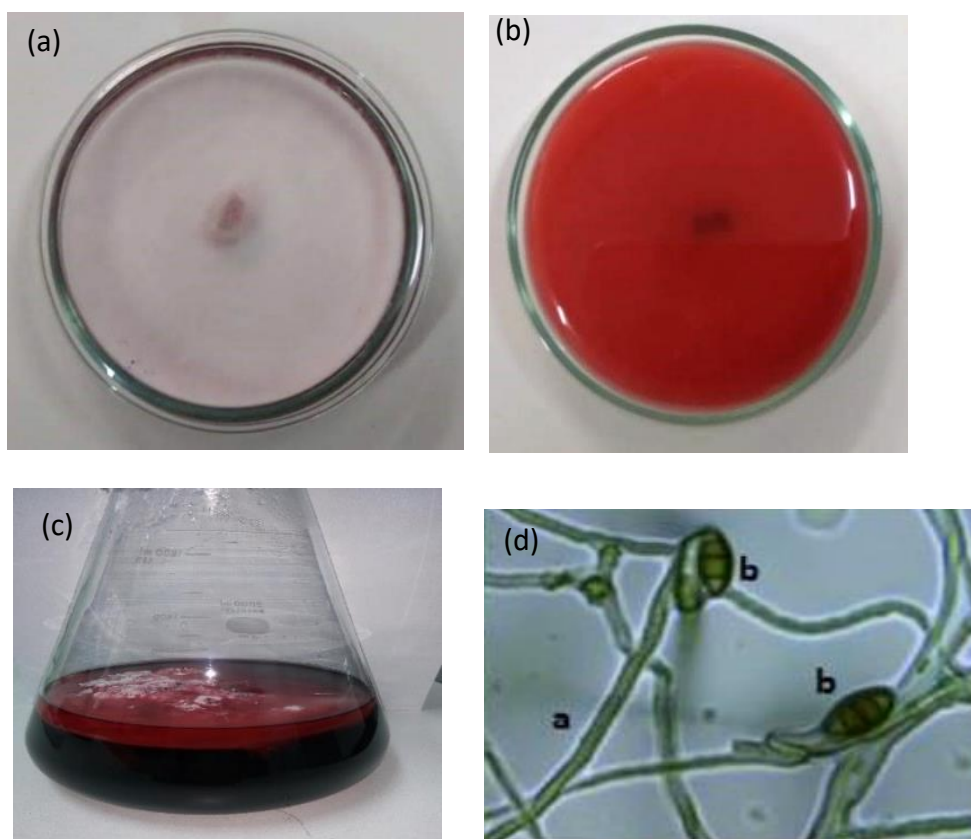


Figura 1. Características morfológicas de *Pseudofusicoccum* sp. C2C3. (a) face superior do fungo cultivado no meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA); (b) Fase reversa; (c) Produção de pigmentos vermelhos em caldo Sabouraud Dextrose (SD) incubados por 21 dias à 28 ° C; (d) hifas e conidiósporos produzidos em SDA, corados com azul de lactofenol (barra de escala 5 μ m).

O aspecto geral das colônias foi comparado com outras espécies do gênero *Pseudofusicoccum* e mostrou semelhanças com *P. ardesiacum* e *P. violaceum* (CROUS et al., 2006) (MEHL et al., 2011) (PAVLIC et al., 2008). As análises das sequências de RNAr 18S e 28S e da sequência

do gene do fator de alongamento da tradução 1-alfa (TEF1- α) da cepa C2C3, baseadas na sistemática atual da família *Botryosphaeriaceae*, apresentou características filogenéticas mais próximas ao gênero *Pseudofusicoccum*.

A análise filogenética da sequência do gene do RNA ribossomal 18S (SSU) forneceu evidência de que a cepa C2C3 foi incluída no mesmo clado da espécie *Pseudofusicoccum adansoniae* (CMW 26147) com suporte de 99% bootstrap. Porém, os marcadores 28S (LSU) e o fator de alongamento da tradução 1-alfa (TEF1- α) posicionaram a cepa C2C3 fora do clado do gênero *Pseudofusicoccum sp.* com suporte de 98% e 96% de bootstrap respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies de microrganismos com alinhamentos significantes com o isolado C2C3.

Marcador	Espécie	Cepa Id	E value	Similaridade (%)	Acesso GenBank
LSU	<i>Kellermania uniseptata</i>	BPI:882826	0,0	98	JX444881
SSU	<i>Pseudofusicoccum adansoniae</i>	CMW 26147	0,0	99	KF766306
TEF1	<i>Pseudofusicoccum ardesiacum</i>	D0151	7 ⁻¹³⁷	96	KM006490

Assim, os marcadores genéticos múltiplos (SSU, LSU e TEF1- α) usados mostram que este isolado pode não pertencer a este gênero, desde que somente um marcador molecular (SSU,) posicionou o isolado C2C3 dentro do clado *Pseudofusicoccum spp* (Figura 2). Devido à falta de sequências no banco de dados que estão mais próximas da cepa C2C3, temporariamente tal fungo é identificado como *Pseudofusicoccum sp.* Futuramente, o sequenciamento de novas cepas com similaridade genética ao isolado C2C3, poderá posicioná-lo como uma nova espécie de *Pseudofusicoccum* ou um novo gênero (i.e. grupo irmão do gênero *Pseudofusicoccum*) pertencente à família *Botryosphaeriaceae*.

Pseudofusicoccum é um gênero de fungos da família *Botryosphaeriaceae*. e existe como um endófito em tecidos de plantas saudáveis e doentes. Esse gênero têm sido relatado como causador de doenças como o cancro em algumas plantas como manga e umbu-cajá (MEHL et al., 2011; PAVLIC et al., 2008; TRAKUNYINGCHAROEN; CHEEWANGKOON; TO-ANUN, 2015). No Brasil, a presença de algumas espécies de endofíticos como *Pseudofusicoccum adansonieae* e *Pseudofusicoccum stromaticum* foi registrada em ramos de

Chrysobalanus icaco, *Eugenia sp.* e *Manilkara triflora* presentes no bioma Caatinga, região semiárida brasileira (GONÇALVES et al., 2016). Além disso, espécies de *P. stromaticum* foram isoladas do caju nativo (*Anacardium othonianum*) da floresta amazônica (LIMA et al., 2016) e de caules de *Mangifera indica L.* mostrando sintomas de exantema coletados no vale do São Francisco (MARQUES et al., 2011)

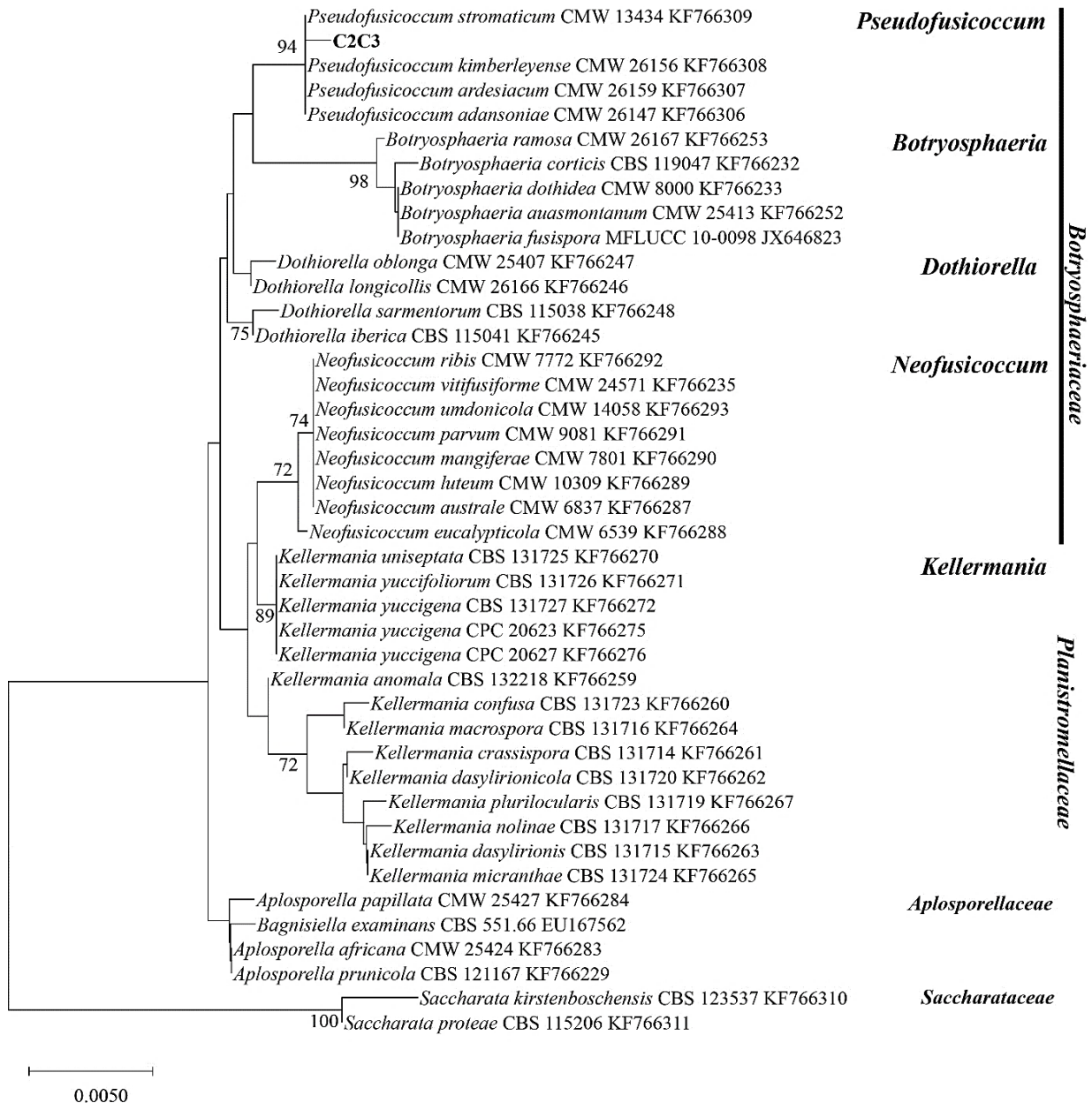


Figura 2. A árvore filogenética (SSU, primers: NS1 e NS4) inferida pelo algoritmo Neighbor Joining posiciona o isolado C2C3 na família *Botryosphaeriaceae*, como *Pseudofusicoccum sp.* A porcentagem de árvores replicadas em que os taxa associados se agrupam pelo teste de bootstrap (1000 réplicas) é indicada ao lado dos ramos. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura-2-parâmetros, envolvendo 42 sequências de ITS com um total de 989 sítios no conjunto de dados final. Sequências de *Botryosphaeriales* foram obtidas de estudos prévios (código de acesso do GenBank, seguido do código do isolado presente nas ramificações). Sequências de isolados da família *Saccharataceae* foram utilizadas como grupo externo.

Na Índia, *P. stromaticum* foi relatado como endofítico de *Jatropha podagrica*, isolado de Maharastra (Sul da Índia) (SHARMA; KULKARNI; SHOUCHE, 2013) e em *Eucalipto sp.* e *Acacia spp.* Na Venezuela (MOHALI; SLIPPERS; WINGFIELD, 2007). Além disso, algumas espécies de *Pseudofusicoccum sp.* foram isoladas de *Hevea brasiliensis* (como um endófito e um fungo patogênico das folhas e dos pecíolos), de *Senna siamea*, *Cassia fistula* e *Dimocarpus longan* (como fungo do caulículo) (TRAKUNYINGCHAROEN et al., 2015) na Tailândia. No sudeste da Nigéria, as espécies de *Pseudofusicoccum sp.* foram isoladas das folhas de *Annona muricata* (ABBA et al., 2018). Entretanto, este estudo constitui o primeiro registro de *Pseudofusicoccum sp.* C2C3 isolado de folhas de *Manilkara salzmannii* no Brasil.

Elucidação estrutural dos compostos isolados

Após a purificação através da cromatografia em coluna de sílica gel, a amostra foi submetida ao HPLC-PAD para verificação da pureza. O cromatograma que foi obtido em 248 nm, é mostrado na Figura 3. Como pode ser observado, há uma banda no cromatograma no intervalo de tempo de retenção entre 9 -10 min, indicando a presença do pigmento na fração 4.

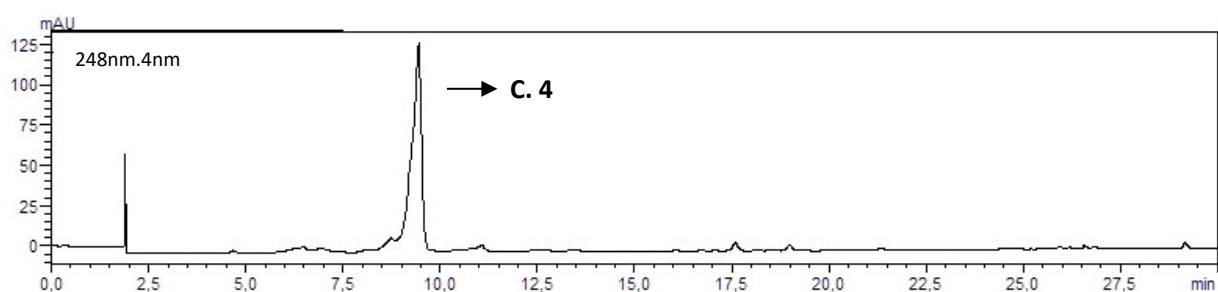


Figura 3. Cromatograma de HPLC-PAD gravado a 248 nm correspondente à fração purificada por coluna cromatográfica (composto 4) do extrato de *Pseudofusicoccum sp.* C2C3.

A estrutura proposta foi determinada pelos dados espectroscópicos ^1H NMR, HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos (δ) obtidos a partir da análise de ^1H NMR do composto 4 está relatado na Tabela 2. O pigmento, 4-hidroxi-5-(4-hidroxifenil) tetrahydro-2H-piran-2-ona, foi obtido por cromatografia em coluna como uma goma alaranjada. Sua fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$ foi determinada pela análise de dados espectroscópicos de RMN. Os dados espectroscópicos de ^1H RMN e HSQC (Tabela 2) do composto 4 indicam a presença de um anel aromático, devido à presença de quatro hidrogênios aromáticos que aparecem como dubletos, com sinais em δH 7,10 (H-7, d, 2H), e δH 6,74 (H-8, d, 2H), quatro sinais de metilenos [δH

3,68 (H-5, m, 1H), δ H 3,94 (H-5', m, 1H), δ 2,60 (H-2, m, 1H) e δ 2,71 (H-2', m, 1H)], um sinal 3-oxi-metínico δ H 5,40 (H-3, m, 1H) e um sinal 4-metínico δ H 3,49 (H-4, m, 1H). O éster carboxílico cíclico formando lactona foi deduzido pelos dados espectroscópicos e suas principais correlações de HMBC dos hidrogênios H-2 e H2' para carbonos C-1 e C-2 e prótons H5 e H 5' para carbonos C-1, C-3 e C-5 (Figura 4).

Tabela 2. Dados espectroscópicos de ^1H , HSQC e HMBC em metanol deuterado (CD_3OD) para composto 4. Reportado na Figura 4.

Posição	δ ^1H (ppm)	H Multi. (J in Hz)	^{13}C / HSQC	HMBC
1	-	-	174,0	-
2	2,60; 2,71	m	29,0	C-1, C-2
2'	2,60; 2,71	m	29,0	C-1, C-2
3	5,40	m	98,0	C-3, C-5
4	3,49	m	40,0	C-1, C-4, C-6, C-7
5	3,68; 3,94	m	72,0	C-1, C-3, C-5
5'	3,68; 3,94	m	72,0	C-1, C-3, C-5
6	-	-	-	C7
7	7,10	d (8,5)	130,0	C-4, C-7, C-9
8	6,74	d (8,5)	115,0	C-6, C-8, C-9
9	-	-	155,0	-

^1H (400MHz)

Este tipo de estrutura (composto 4) é provavelmente biosintetizado a partir de uma enzima conhecida como policetídeo sintase que produz um amplo espectro de metabólitos secundários, e exibe notável diversidade na sua estrutura e função (GOKHALE; SANKARANARAYANAN; MOHANTY, 2007). Policetídeos têm sido extensivamente investigados em numerosos estudos (ARULDASS; DUFOSSÉ; AHMAD, 2018; DUFOSSÉ et al., 2014; TULI et al., 2015; VENKATACHALAM et al., 2018; YANGILAR; YILDIZ, 2016) e são bem conhecidos como tendo uma ampla gama de atividades biológicas, tais como antimicrobiana (BUNDALE et al., 2018), anticâncer (TAWFIKE et al., 2019), antifúngica (STODULKOVÁ et al., 2015) e propriedades antioxidantes (PAUDEL; BHATTARAI; BHATTARAI, 2018).

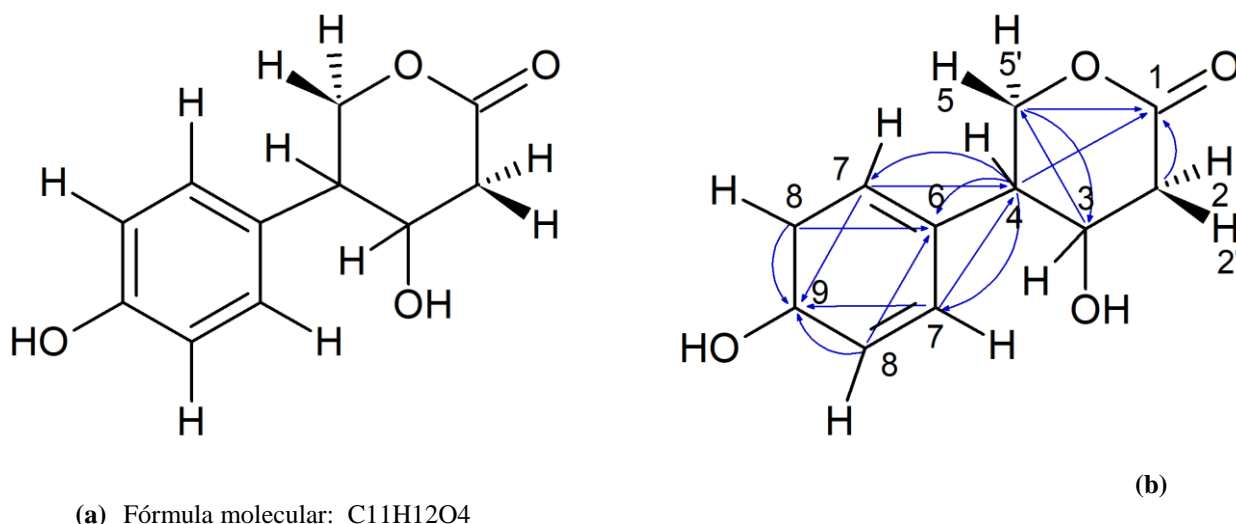


Figura 4. (a) Estrutura e fórmula molecular do composto 4. Nome IUPAC: 4-hidroxi-5-(4-hidroxifenil) tetrahidro-2H-pirano-2-ona. (b) Numeração de átomos e correlações selecionadas de HMBC (setas) para composto 4.

Também, foram investigados policetídeos de *P. stromaticum* associados à planta medicinal *Myracrodroun urundeuva* com forte atividade contra células de câncer de cólon (SOBREIRA et al., 2018). Além disso, alguns derivados dos policetídeos com subestruturas similares à lactona (composto 4) foram descritos como a seguir. Três metabólitos de policetídeos colletotrichones A-C, do fungo endofítico *Colletotricum sp.* BS4, apresentaram atividade antibacteriana contra *E. coli*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (WANG et al., 2016). Pleosporalone A de *Pleosporales sp.* CF09-1 foi relatado com excelente atividade antifúngica contra fungos patogênicos *Botrytis cinerea*, *Rhizopus oryzae* e *Phytophthora capsici* (CAO et al., 2016) e cinco policetídeos, os ácidos paralactônicos A-E foram isolados de *Paraconiothyrium sp.* SW-B-1, fungo endofítico isolado da alga marinha *Chondrus ocellatus*, com atividade antimicrobiana moderada contra *Staphylococcus aureus* (SUZUKI et al., 2019).

CONCLUSÃO

Este estudo foi o primeiro a detectar uma diversidade de pigmentos de *Pseudofusicoccum sp.* C2C3, isolado de *Manilkara salzmannii*, cultivado em meio Sabouraud Dextrose a 5%. Quatro frações principais contendo pigmentos foram isoladas do extrato de acetato de etila através das técnicas cromatográficas. Um pigmento da classe policetídeo, com nome IUPAC, 4-hidroxi-5-(4-hidroxifenil) tetrahidro-2H-pirano-2-ona, teve sua estrutura elucidada através dos dados espectroscópicos de ¹H RMN, HSQC e HMBC. As frações obtidas por cromatografia contendo

pigmentos de amarelo, laranja e vermelho mostram o potencial desses compostos para futuras aplicações.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Brasil (CAPES)-código de financiamento 001 e com apoio do Centro Universitário SENAI CIMATEC da Bahia, Brasil.

REFERÊNCIAS

ABBA, N. C.; OKOYE, F.; EBOKA, C.; EZE, P.; ABONYI, D.; PROKSCH, P. Phenolic Compounds from Endophytic *Pseudofusicoccum sp.* Isolated from *Annona muricata*. **Tropical Journal of Natural Product Research**, v. 2, n.7, p. 332–337, 8 jul. 2018. doi: 10.26538/tjnpr/v2i7.6.

DE ALMEIDA, E.; LIMA, L. F.; LIMA, P. B.; ZICKEL, C. S. Structural characterization of the woody plants in restinga of Brazil. **Journal of Ecology and the Natural Environment**, v. 3, n. 3, p. 95–103, 2011.

BUNDALE, S.; KADAM, T.; UPADHYAY, A.; PILLAI, D.; BEGDE, D.; NASHIKKAR, N.; GANGWANI, K. Novel aromatic polyketides from soil *Streptomyces spp.*: purification, characterization and bioactivity studies. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 5, p. 0, 2018. doi: 10.1007/s11274-018-2448-1.

CAO, F.; YANG, J. K.; LIU, Y. F.; ZHU, H. J.; WANG, C. Y. Pleosporalone A, the first azaphilone characterized with aromatic A-ring from a marine-derived *Pleosporales sp.* fungus. **Natural Product Research**, v. 30, n. 21, p. 2448–2452, 2016. doi:10.1080/14786419.2016.1198352.

CROUS, P. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W. F. O.; PHILIPS, A. J. L.; ALVES, A.; BURGESS, T.; BARBER, P.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. **Studies in Mycology**, v. 55, n. 1915, p. 235–253, 2006. doi: 10.3114/sim.55.1.235.

DUFOSSÉ, L. **Current and Potential Natural Pigments From Microorganisms (Bacteria, Yeasts, Fungi, Microalgae)**. Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color, Elsevier Ltd, 2016, p. 337-354, ISBN: 9780081003923. doi: 10.1016/B978-0-08-100371-8.00016-6

DUFOSSÉ, L.; FOUILLAUD, M.; CARO, Y.; MAPARI, S. A S; SUTTHIWONG, N. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 56–61, 2014. doi:10.1016/j.copbio.2013.09.007.

- DUFOSSÉ, L. Anthraquinones, the Dr Jekyll and Mr Hyde of the food pigment family. **Food Research International**, v. 65, n. PB, p. 132–136, 2014. doi:10.1016/j.foodres.2014.09.012.
- FERNANDES, C.; FALCÃO, D.; DE ALMEIDA, F.; SILVEIRA, A.; FEDER, D.; MELLO, C.; SANTOS, M.; GONZALEZ, M.; APOLINÁRIO, R.; TIETBOHL, L. A.; CARVALHO, J. C.; ROCHA, L. Development of an insecticidal nanoemulsion with *Manilkara subsericea* (*Sapotaceae*) extract. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, n. 1, p. 22, 2014. doi:10.1186/1477-3155-12-22.
- GOKHALE, R.S.; SANKARANARAYANAN, R.; MOHANTY, D.. Versatility of polyketide synthases in generating metabolic diversity. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 17, n. 6, p. 736–743, 2007. doi: 10.1016/j.sbi.2007.08.021.
- GONÇALVES, F.J.T.; FREIRE, F. C. O.; LIMA, J. S.; MELO, J. G. M.; CÂMARA, M. P.S. Patogenicidade de espécies de *Botryosphaeriaceae* endofíticas de plantas da Caatinga do estado do Ceará em manga e umbu-cajá. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 1, p. 43–52, 2016. doi: 10.1590/0100-5405/2099.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. **Oxford University Press**, v. 41, p. 95-98,1999.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. **Chemistry and Biology**, v. 19, n. 7, p. 792–798, 2012. doi:1016/j.chembiol.2012.06.004.
- LACERDA, L. T.; GUSMÃO, L. F.P.; RODRIGUES, A. Diversity of endophytic fungi in *Eucalyptus microcorys* assessed by complementary isolation methods. **Mycological Progress**, v. 17, n. 6, p. 719–727, 2018. doi: 10.1007/s11557-018-1385-6.
- LELEU, C.; BOULITROP, C.; BEL, B.; JEUDY, G.; VABRES, P.; COLLET, E. Quinoline Yellow dye-induced fixed food-and-drug eruption. **Contact Dermatitis**, v. 68, n. 3, p. 187–188, 2013. doi: 10.1111/cod.12019.
- LIMA, W. G.; CÂMARA, M.P.S.; THON, M.; MARTINS, R.B.; MICHEREFF, S. J.; DA SILVA, C. F.B; NETTO, M. S. B.; CORREIA, K. C.; MILLER, R. N.G. Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of *Botryosphaeriaceae* species associated with gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Biology**, v. 121, n. 4, p. 437–451, 2016. doi: 10.1016/j.funbio.2016.07.006.
- MA, M.; REN, Q.; ZHANG, J. C.; HASHIMOTO, K. Effects of brilliant blue G on serum tumor necrosis factor- α levels and depression-like behavior in mice after lipopolysaccharide administration. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 31–36, 2014. doi: 10.9758/cpn.2014.12.1.31.
- MALIK, K.; TOKKAS, J.; GOYAL, S. Microbial Pigments: A review. **International Journal of Microbial Resource Technology**, v. 41, n. 4, p. 361–365, 2012.

- MAPARI, S. A.S.; THRANE, U.; MEYER, A. S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 300–307, 2010. doi:10.1016/j.tibtech.2010.03.004.
- MARQUES, M. W.; LIMA, N. B.; MICHEREFF, S. J.; CÂMARA, M. P. S.; SOUZA, C. R. B. First Report of Mango Dieback Caused by *Pseudofusicoccum stromaticum* in Brazil. **Plant Disease**, v. 96, n. 1, p. 144–144, 2011. doi: 10.1094/pdis-05-11-0425.
- MEHL, J. W.M.; SLIPPERS, B.; ROUX, J.; WINGFIELD, MICHAEL J. *Botryosphaeriaceae* associated with *Pterocarpus angolensis* (kiaat) in South Africa . **Mycologia**, v. 103, n. 3, p. 534–553, 2011. doi: 10.3852/10-003.
- MOHALI, SR; SLIPPERS, B; WINGFIELD, M.J. Identification of *Botryosphaeriaceae* from Eucalyptus, Acacia and Pinus in Venezuela. **Fungal Diversity**, v. 25, p. 103–125, 2007.
- MOHAMED, A. A. R.; GALAL, A. A. A; ELEWA, Y. H. A. Comparative protective effects of royal jelly and cod liver oil against neurotoxic impact of tartrazine on male rat pups brain. **Acta Histochemica**, v. 117, n. 7, p. 649–658, 2015. doi: 10.1016/j.acthis.2015.07.002.
- PAUDEL, B.; BHATTARAI, K.; BHATTARAI, H. D. Antimicrobial and antioxidant activities of two polyketides from lichen-endophytic fungus *Preussia sp.* **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 73, n. 3–4, p. 161–163, 2018. doi: 10.1515/znc-2017-0105.
- PAVLIC, D; WINGFIELD, M. J.; BARBER, P.; SLIPPERS, B.; HARDY, G. E. ST. J.; BURGESS, T. I. Seven new species of the *Botryosphaeriaceae* from baobab and other native trees in Western Australia. **Mycologia**, v. 100, n. 6, p. 851–866, 2008. doi: 10.3852/08-020.
- QIU, M.; XIE, R.; SHI, Y.; CHEN, H.; WEN, Y.; GAO, Y.; HU, X. Isolation and identification of endophytic fungus SX01, a red pigment producer from *Ginkgo biloba L.* **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 993–998, 2010. doi: 10.1007/s11274-009-0261-6.
- SARANG, H.; RAJANI, P.; VASANTHAKUMARI, M. M.; KUMARA, P. M.; SIVA, R.; RAVIKANATH, G.; UMA S. R. An endophytic fungus, *Gibberella moniliformis* from *Lawsonia inermis L.* produces lawsone, an orange-red pigment. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 110, n. 7, p. 853–862, 2017. doi: 10.1007/s10482-017-0858-y.
- SHARMA, R.; KULKARNI, G.; SHOUCHE, Y. S. *Pseudofusicoccum adansoniae* isolated as an endophyte from *Jatropha podagrica*: new record for India. **Mycotaxon**, v. 123, p. 39–45, 2013. doi: 10.5248/123.39.
- SHI, K.; TANG, R.; HUANG, T.; WANG, L.; WU, Z. Pigment fingerprint profile during extractive fermentation with *Monascus anka* GIM 3.592. **BMC Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2017. doi: 10.1186/s12896-017-0366-1.
- SLIPPERS, B.; BOISSIN, E.; PHILLIPS, A. J.L.; GROENEWALD, J. Z.; LOMBARD, L.; WINGFIELD, M. J.; POSTMA, A.; BURGESS, T.; CROUS, P. W. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriales*: A systematic and evolutionary framework. **Studies in Mycology**, v. 76, p. 31–49, 2013. doi: 10.3114/sim0020.

SOBREIRA, ALINE C. M.; PINTO, F. D. C. L.; FLORÊNCIO, K. G. D.; WILKE, D. V.; STAATS, C. C.; STREIT, R. D. A. S.; FREIRE, F. D. C. O.; PESSOA, O. D. L.; TRINDADE-SILVA, A. E.; CANUTO, K. M. Endophytic fungus *Pseudofusicoccum stromaticum* produces cyclopeptides and plant-related bioactive rotenoids. **RSC Advances**, v. 8, n. 62, p. 35575–35586, 2018. doi: 10.1039/c8ra06824k.

STODULKOVÁ, E.; CÍSAŘOVÁ, I.; KOLAŘÍK, M.; CHUDIČČKOVÁ, M.; NOVÁK, P.; MAN., P.; KUZMA, M.; PAVLU, B.; ČERNÝ, J.; FLIEGER, M. Biologically active metabolites produced by the Basidiomycete *Quambalaria cyanescens*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 2–13, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0118913.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491–502, 2003. doi:10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003.

STROBEL, G. A. Rainforest endophytes and bioactive products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 315–333, 2002. doi: 10.1080/07388550290789531.

SUZUKI, Takuma et al. New polyketides, paralactonic acids A–E produced by *Paraconiothyrium* sp. SW-B-1, an endophytic fungus associated with a seaweed, *Chondrus ocellatus* Holmes. **Fitoterapia**, v. 132, n. June 2018, p. 75–81, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.11.017>>.

DE BRUM VIEIRA, P.; FEIJÓ SILVA, N.L.; SILVA, D.B.; LOPES, N.P.; GOMES DA SILVA, A.; VANUSA DA SILVA, M.; BASTIDA, J.; MACEDO, A.J.; TASCA, T. The Caatinga endemic *Manilkara rufula* possesses remarkable activity against *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus*. **Experimental Parasitology**, v. 173, n. 2017, p. 18–28, 2016. doi:10.1016/j.exppara.2016.12.006.

TAWFIKE, A.; ROMLI, M.; CLEMENTS, C.; ABBOTT, G.; YOUNG, L.; CHUMACHER, M.; DIEDERICH, M.; FARAG, M.; EDRADA-EBEL, R. A. Isolation of anticancer and anti-trypanosome secondary metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus flocculus* via bioactivity guided isolation and MS based metabolomics. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1106–1107, n.1, p. 71–83, 2019. doi:10.1016/j.jchromb.2018.12.032.

TRAKUNYINGCHAROEN, T.; LOMBARD, L.; GROENEWALD, J.Z.; CHEEWANGKOON, R.; TO-ANUN, C.; CROUS, P.W. Caulicolous *Botryosphaeriales* from Thailand. **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 34, n. 1, p. 87–99, 2015. doi: 10.3767/003158515X685841.

TRAKUNYINGCHAROEN, T.; CHEEWANGKOON, R.; TO-ANUN, C. Phylogenetic study of the *Botryosphaeriaceae* species associated with avocaodo and Pará rubber in Thailand. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 42, n. 1, p. 105–117, 2015.

TULI, H. S.; CHAUDHARY, P.; BENIWAL, V.; SHARMA, A. K. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 4669–4678, 2015. doi: 10.1007/s13197-014-1601-6.

URDANETA, M. S.; LACAZ, C. DA S. Preservation of fungi in distilled water. Preliminary

results. **Revista Instituto de Medicina tropical de São Paulo**. v.7, n.1, p. 24-26, 1965.

VENKATACHALAM, M.; ZELENÁ, M.; CACCIOLA, F.; CESLOVA, L.; GIRARD-VALENCIENNES, E.; CLERC, P.; DUGO, P.; MONDELLO, L.; FOUILLAUD, M.; ROTONDO, A.; GIUFFRIDA, D.; DUFOSSÉ, L. Partial characterization of the pigments produced by the marine-derived fungus *Talaromyces albobiverticillius* 30548. Towards a new fungal red colorant for the food industry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 67, n. November 2016, p. 38–47, 2018. doi: 10.1016/j.jfca.2017.12.036.

WANG, W.X.; KUSARI, S.; LAATSCH, H.; GOLZ, C.; KUSARI, P.; STROHMANN, C.; KAYSER, O.; SPITELLER, M. Antibacterial Azaphilones from an Endophytic Fungus, *Colletotrichum* sp. BS4. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 4, p. 704–710, 2016. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b00436.

WIJERATNE, E. M.K.; ESPINOSA-ARTILES, P.; GRUENER, R.; GUNATILAKA, A. A.L. Thielavialides A-E, nor -spiro-azaphilones, and a bis-spiro-azaphilone from *Thielavia* sp. PA0001, An endophytic fungus isolated from aeroponically grown *Physalis alkekengi*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 6, p. 1467–1472, 2014. doi: 10.1021/np500237h.

WU, X.; FANG, L. Z.; LIU, F. L.; PANG, X. J.; QIN, H. L.; ZHAO, T.; XU, L. L.; YANG, D.F.; YANG, X. L. New prenylxanthones, polyketide hemiterpenoid pigments from the endophytic fungus: *Emericella* sp. XL029 and their anti-agricultural pathogenic fungal and antibacterial activities. **RSC Advances**, v. 7, n. 49, p. 31115–31122, 2017. doi:10.1039/c7ra04762b.

YANG, G.; LI, P.; MENG, L.; LIN, L.; QIU, Y.; DONG, F.; HE, L.; XU, K. Diversity and communities of culturable endophytic fungi from different tree peonies (geoh herbs and non-geoh herbs), and their biosynthetic potential analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 47–58, 2018. doi:10.1016/j.bjm.2018.06.006.

YANGILAR, F.; YILDIZ, P.O. Microbial Pigments and the Important for Food Industry. **Journal of Science and Technology**, v. 9, n. 2, p. 118-142, 2016. doi: 10.18185/eufbed.55880.

ZHENG, Y.; ZHANG, Y.; CHEN, D.; CHEN, H.; LIN, L.; ZHENG, C.; GUO, Y. Monascus Pigment Rubropunctatin: A Potential Dual Agent for Cancer Chemotherapy and Phototherapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 12, p. 2541–2548, 2016. doi: 10.1021/acs.jafc.5b05343.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Fungo endofítico *Pseudofusicoccum sp.* C2C3 produziu pigmentos em meio semi-sólido de sabouraud dextrose ágar e colorantes hidrossolúveis em cultivo submerso de sabouraud dextrose;
- A identificação do fungo endofítico C2C3 utilizando técnicas moleculares como sequências genéticas de RNAr 18S (SSU) e 28S (LSU) e o fator de alongamento da tradução alfa (TEF1- α), utilizando primers NS1 e NS4 (SSU); LR0R e LR5 (LSU); EF1-728F e EF1-986R (TEF1- α), mostraram-se adequadas, porém apresentou resolução somente para identificação do fungo como gênero;
- O estudo do perfil químico por cromatografia em coluna aberta e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência apresentou importância no isolamento e identificação dos pigmentos produzidos;
- Através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear foi estudada e elucidada a estrutura do composto isolado (4) a partir dos dados espectroscópicos de hidrogênio (^1H) e das relações com os carbonos vizinhos (HSQC) e de longa distância (HMBC);
- Os pigmentos produzidos por *Pseudofusicoccum sp.* C2C3 podem ter diversas aplicações biológicas, por isso estudos aprofundando as possíveis atividades bioativas desses compostos devem ser realizados futuramente.

APÊNDICE - Resultados referentes ao Capítulo III

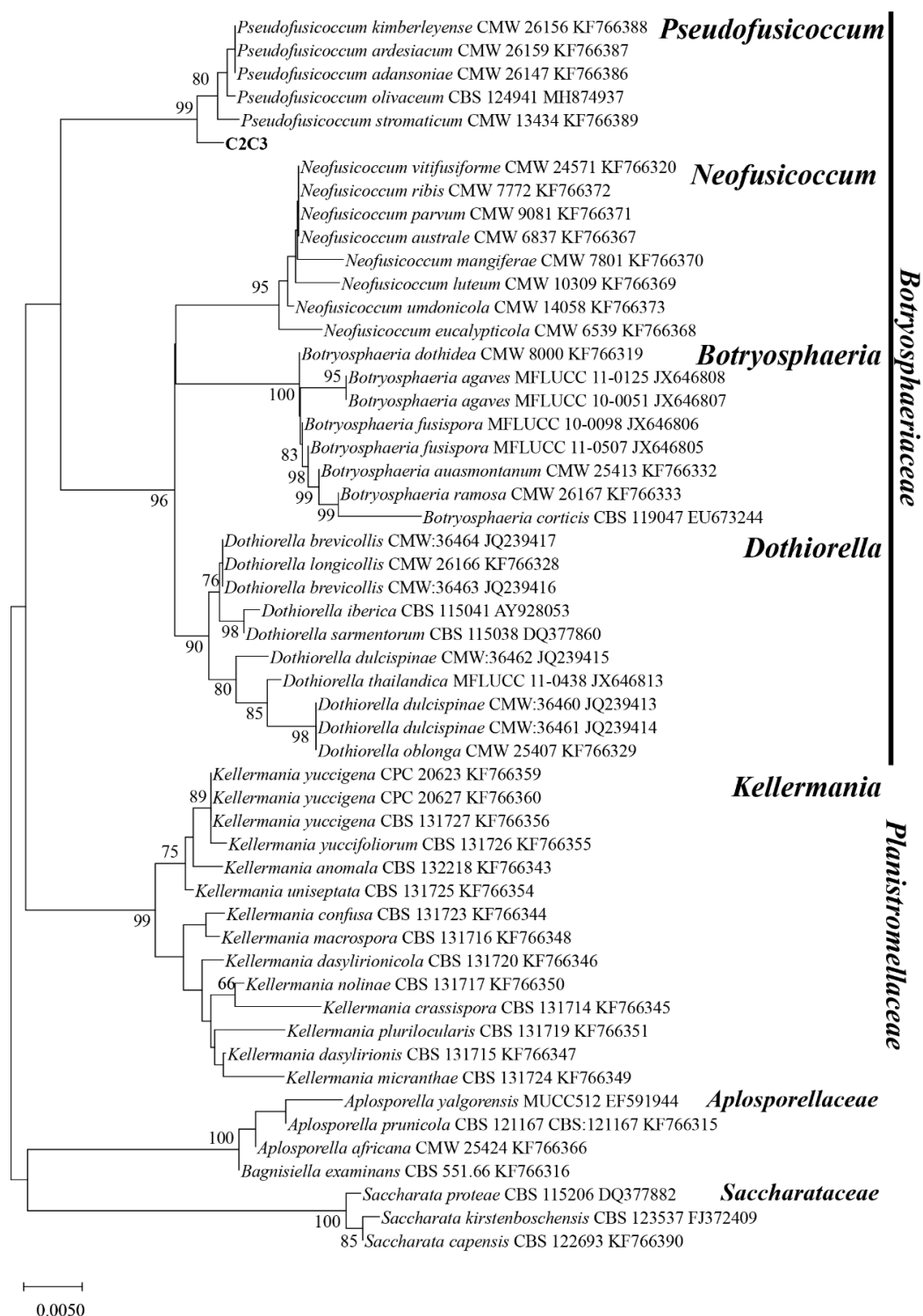


Figura 1. A árvore filogenética (LSU, primers: LR0R e LR5) inferida pelo algoritmo Neighbor Joining posiciona o isolado C2C3 na família *Botryosphaeriaceae*, próximo ao gênero *Pseudofusicoccum*. A porcentagem de árvores replicadas em que os taxa associados se agrupam pelo teste de bootstrap (100 réplicas) é indicada ao lado dos ramos. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura-2 parâmetros, envolvendo 53 seqüências de ITS, com um total de 749 sítios no conjunto de dados final. Sequências de *Botryosphaeriales* foram obtidas de estudos prévios (código de acesso do GenBank, seguido do código do isolado presente nas ramificações). Sequências de isolados das famílias *Aplosporellaceae* e *Saccharataceae* foram utilizadas como grupo externo.

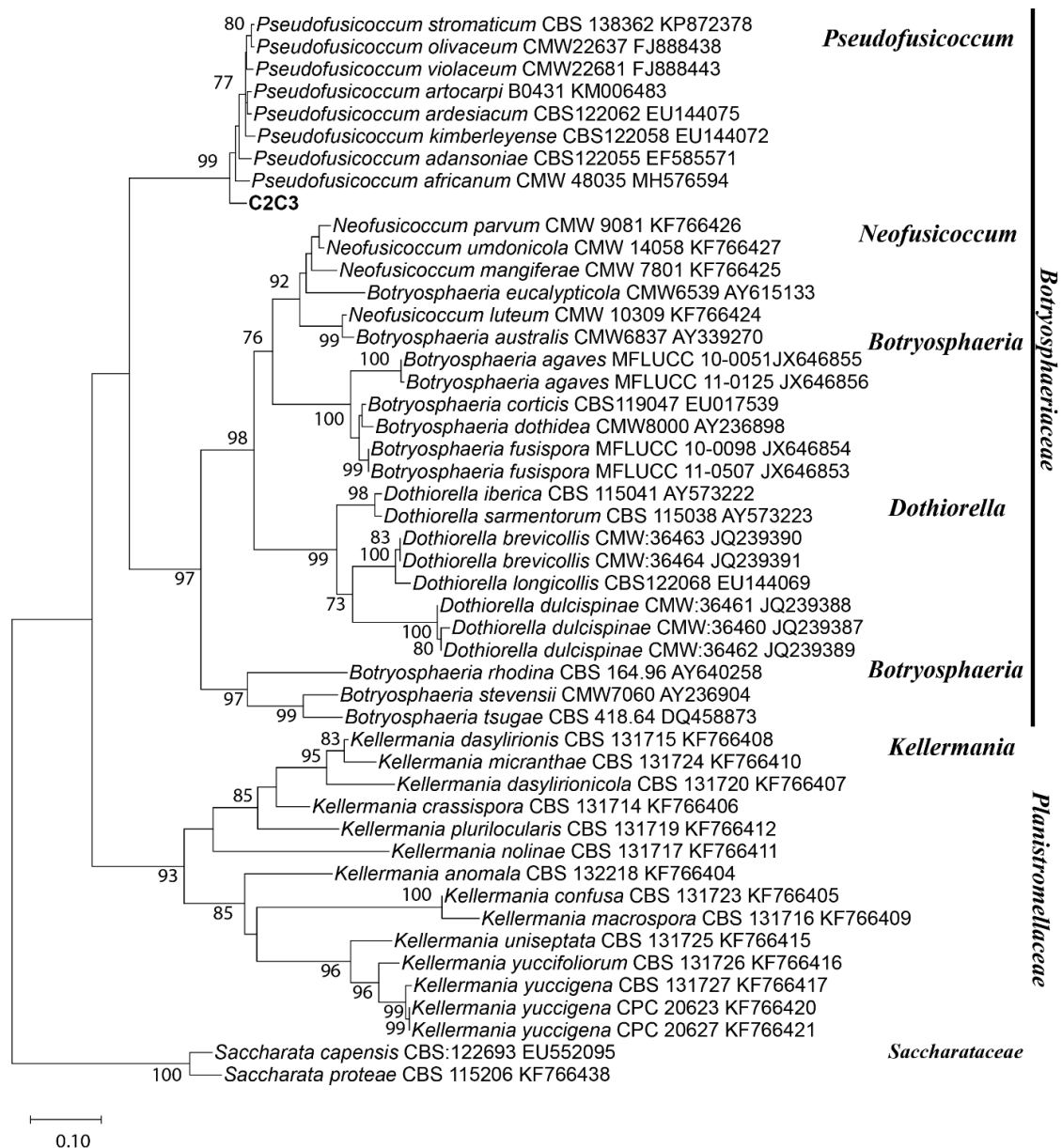
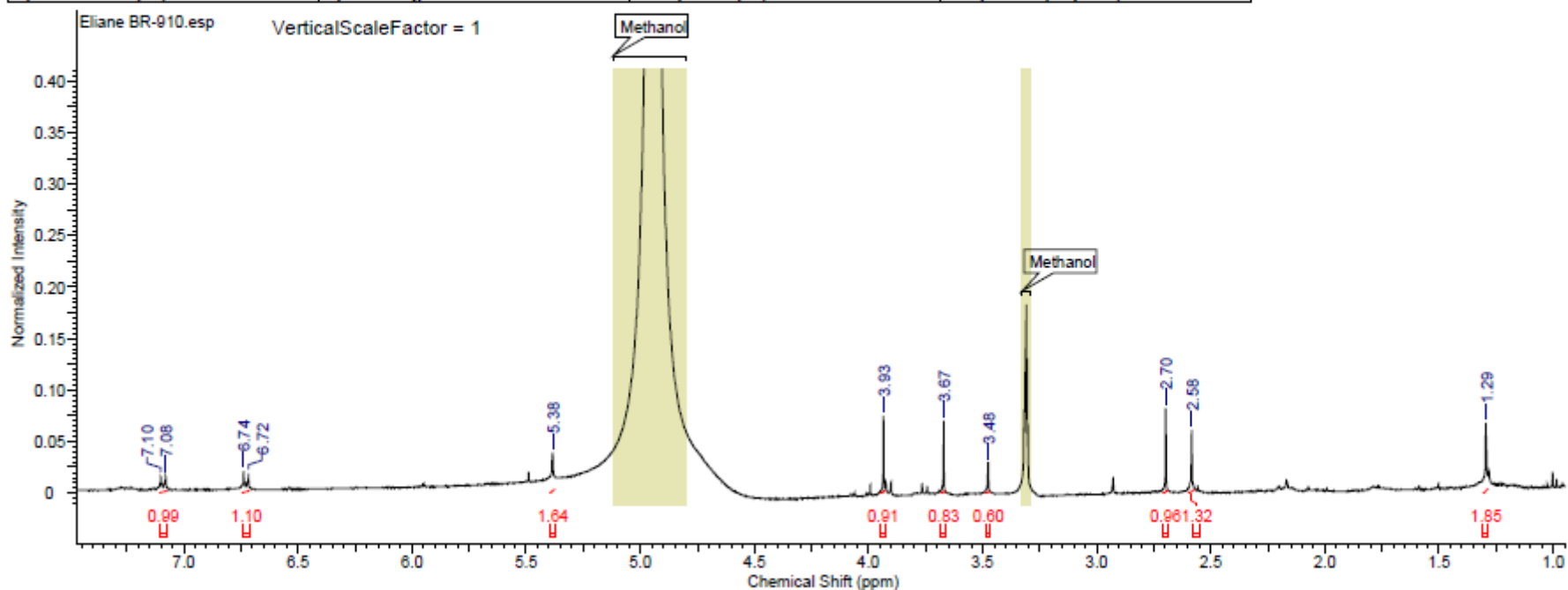


Figura 2. A árvore filogenética (TEF1, primers: EF1-728F e EF1-986R) inferida pelo algoritmo Neighbor Joining posiciona o isolado C2C3 na família *Botryosphaeriaceae*, como *Pseudofusicoccum* sp. A porcentagem de árvores replicadas em que os taxa associados se agrupam pelo teste de bootstrap (1000 réplicas) é indicada ao lado dos ramos. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Kimura-2parâmetros, envolvendo 48 seqüências de ITS com um total de 365 sítios no conjunto de dados final. Seqüências de *Botryosphaeriales* foram obtidas de estudos prévios (código de acesso do Genbank, seguido do código do isolado presente nas ramificações). Seqüências de isolados da família *Saccharataceae* foram utilizadas como grupo externo.

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

20/09/2018 13:52:47

Acquisition Time (sec)	3.9715	Comment	5 mm PABBO BB/19F-1H/D Z-GRD Z118098/0677	Date	20 Sep 2018 12:45:52
Date Stamp	20 Sep 2018 12:45:52	File Name	C:\Users\elian\Desktop\Eliane BR-910\fid	Frequency (MHz)	400.06
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Origin	spect
Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30	Original Points Count	32768
Spectrum Offset (Hz)	2466.2239	Receiver Gain	45.30	SW(cyclical) (Hz)	8250.83
Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	8250.57	Solvent	METHANOL-d 4
		Temperature (degree C)	27.000		



No.	(ppm)	Annotation	Layer No.	Created By	Created At	Modified By	Modified At
1	[3.29 .. 3.33]	Methanol	1	elian	qui 20/09/2018 13:51:25		
2	[4.80 .. 5.12]	Methanol	1	elian	qui 20/09/2018 13:51:25		

Figura. 3. Espectro de RMN do composto 4 isolado do extrato de acetato de etila do cultivo do fungo *Pseudofusicoccum sp.*