



PATRÍCIA NIRLANE DA COSTA SOUZA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS
FILAMENTOSOS ISOLADOS DE CAVERNAS
BRASILEIRAS PRODUTORES DE PIGMENTOS**

LAVRAS – MG

2015

PATRÍCIA NIRLANE DA COSTA SOUZA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE
CAVERNAS BRASILEIRAS PRODUTORES DE PIGMENTOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Patrícia Gomes Cardoso

LAVRAS – MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Costa Souza, Patrícia Nirlane da.

Bioprospecção de fungos filamentosos isolados de cavernas
brasileiras produtores de pigmentos / Patrícia Nirlane da Costa
Souza. – Lavras : UFLA, 2015.

87 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientadora: Patrícia Gomes Cardoso.

Bibliografia.

1. Pigmentos. 2. Fungos filamentosos. 3. Cavernas brasileiras. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

PATRÍCIA NIRLANE DA COSTA SOUZA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE
CAVERNAS BRASILEIRAS PRODUTORES DE PIGMENTOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 03 de fevereiro de 2015.

Dr. Cledir Rodrigues Santos	MUM
Dr. Whasley Ferreira Duarte	UFLA
Dra. Adelir Aparecida Saczk	UFLA
Dr. Disney Ribeiro Dias	UFLA

Dra. Patrícia Gomes Cardoso
Orientadora

**LAVRAS – MG
2015**

*À Deus, por ser o Pastor que me conduz, não me deixando nada faltar.
Ao meu marido Thales Henrique Souza pelo apoio, amor e força nas horas mais
difíceis desta caminhada.*

*Aos meus pais, Ernani Martins da Costa e Nirlei de Carvalho Lima Costa, pelo
incentivo, carinho e orações.*

À minha querida irmã Poliana pelo apoio, orações e amizade

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por ser o meu sustento, minha fortaleza nos momentos difíceis, por Seu amor e porque nunca me deixou nada faltar.

Ao meu marido e grande amor Thales Henrique Souza, por seu companheirismo e amizade, por acreditar no meu potencial e me incentivar. Pela paciência e apoio nos momentos difíceis. Por ser o primeiro a querer ver meu sucesso e torcer por mim. Pelo amor e carinho que sempre dedicou a mim.

Aos meus pais Ernani Martins da Costae Nirlei de Carvalho Lima Costa pelo amor, carinho, pelas orientações e orações que sempre me sustentaram.

À minha irmã Poliana de Lima Costa pelas palavras amigas, orações e apoio.

Aos familiares e amigos que torcem pelo meu sucesso.

Aos amigos da Fraternidade Católica Getsêmani pela amizade, apoio e incansáveis orações nos momentos que mais precisei.

À professora Patrícia Gomes Cardoso pela orientação, credibilidade, amizade, liberdade e confiança durante todos esses anos que trabalhamos juntas.

Ao Dr. Lucas M. Abreu por todas as horas de ensinamento e orientação.

Ao Prof. Luís Henrique Souza Guimarães da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – SP (USP) por todo interesse, incentivo e colaboração com meu trabalho de doutorado.

Ao Dr. Cledir Santos pela ajuda na condução de meus experimentos.

À Profa. Adelir Aparecida Saczk por disponibilizar o laboratório e os materiais para realização de parte de meus experimentos.

Ao pessoal do Laboratório de Espectrometria de Massas e Produtos Naturais da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto – SP (USP), em especial ao Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, por ter aberto as portas de seu laboratório para condução de meus experimentos e as alunas

Tahuana Bim Grigoletto e Anelize Bauermeister, por toda colaboração no desenvolvimento do meu trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de P & D em Processos Farmacêuticos – LAPROFAR da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – SP (USP), em especial ao Prof. Dr. Wanderley Pereira de Oliveira, Dra. Cláudia Regina Fernandes Souza e ao técnico Marcelo Luís Lombardi Martinez pela oportunidade de realizar parte de meus experimentos em seu laboratório, pela gentileza e colaboração.

Às colegas de apartamento em Ribeirão Preto-SP, Glauce, Vanessa e Angélica, por me acolherem durante o tempo que fiquei em Ribeirão Preto.

Ao órgão de pesquisa CAPES, pelo incentivo e concessão de bolsa.

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola, ao Departamento de Biologia e a Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade de realização da minha pós-graduação.

Aos professores do programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras, em especial Profa. Rosane Freitas Schwan, Prof. Eustáquio de Souza Dias, Prof. Whasley Ferreira Duarte, Prof. Disney Ribeiro Dias, Profa. Cristina Ferreira Silva e Batista, Prof. Luís Roberto Batista por contribuírem com minha formação profissional, por todo ensinamento, orientação e apoio durante todos os anos de pós-graduação.

Aos funcionários do departamento de Biologia, em especial a secretária Rose, pela prestação de serviços e gentileza.

Aos colegas de laboratório: Natália da Costa Maia, pela valiosa amizade e apoio, Géssica Souza, pela ajuda na condução dos experimentos, Natálie Martins, pela ajuda e companhia nos trabalhos realizados em Ribeirão Preto – SP, Mônica Monteiro, pelas horas de conversas e desabafos, Bárbara Godinho, Peterson Nunes, Dérica Gonçalves, Danielly Gama pela amizade e pelas contribuições para a realização deste trabalho.

"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota."

(Madre Tereza de Calcutá)

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram selecionar e identificar fungos filamentosos produtores de pigmentos isolados de cavernas brasileiras, avaliar o crescimento e produção de pigmentos pelos fungos selecionados em quatro meios de cultivo diferentes, caracterizar os principais metabólitos coloridos em seus extratos e secar os extratos coloridos, utilizando três diferentes adjuvantes, por meio da técnica de *spray dryer*. Entre os fungos avaliados, doze foram selecionados e identificados como: *Aspergillus sydowii* (GMA3) (1), *A. aureolatus* (E.2.5) (2), *A. keweii* (CF292) (2), *Penicillium flavigenum* (E.2.4) (3), *P. chermesinum* (102) (1), *Epicoccum nigrum* (185A) (1), *Lecanicillium aphanocladii* (ONI5) (1) e *Fusarium* sp. (FPW) (1). A produção de pigmentos foi influenciada pela composição do meio, sendo que os meios complexos parecem favorecer um maior crescimento e produção de pigmentos por estes microorganismos. Neste trabalho, foi possível identificar três compostos coloridos: oosporeína, orevactaeno e dihidrotricodimerol, nos extratos de *L. aphanocladii* (ONI5), *E. nigrum* (185A) e *P. flavigenum* (E.2.4), respectivamente. Além disso, foi observado que os extratos de *L. aphanocladii* (ONI5) e *P. flavigenum* (E.2.4) apresentaram efeito fitotóxico e inibidor de crescimento contra a planta aquática *Lemna minor*. Entre os fungos estudados, os filtrados coloridos de três espécies (*E. nigrum* (185A), *P. flavigenum* (E.2.4) e *A. keweii* (CF292)) foram secos pela técnica de *spray dryer*. A adição dos três adjuvantes (maltodextrina, amido modificado e goma arábica) resultou em pós finos com baixo teor de umidade e atividade de água. Além disso, todos os adjuvantes estudados garantiram uma alta retenção de cor e recuperação do produto, durante o processo de secagem. Assim, os resultados deste trabalho indicam que os fungos filamentosos isolados de cavernas brasileiras podem constituir novas fontes de pigmentos naturais e que seus extratos podem ser secos pela técnica de *spray dryer* a fim de facilitar o armazenamento e comercialização desses corantes.

Palavras-chave: Pigmentos. Fungos filamentosos. Cavernas brasileiras. Metabólitos secundários. *Spray dryer*.

ABSTRACT

The objectives of this study were to select and identify pigment-producing fungi isolated from Brazilian caves, evaluate the growth and pigment production by selected fungi in four different media, characterize the main colored metabolites in their extracts and dry the colored extracts using three different adjuvants through spray drying technique. Among the tested fungi, twelve were selected and identified as: *Aspergillus sydowii* (GMA3) (1), *A. aureolatus* (E.2.5) (2), *A. keweii* (CF292) (2), *Penicillium flavigenum* (E.2.4) (3), *P. chermesinum* (102) (1), *Epicoccum nigrum* (185A) (1), *Lecanicillium aphanocladii* (ONI5) (1) and *Fusarium* sp. (FPW) (1). The pigment production by these fungi was influenced by medium composition. The complex media seemed to favor a higher growth and production of pigments. In this study, we identify three colored compounds: oosporeina, oreovactaene and dihydrotrichodimerol in extracts of *L. aphanocladii* (ONI5), *E. nigrum* (185A) and *P. flavigenum* (E.2.4), respectively. Furthermore, it was observed that the extract of *L. aphanocladii* (ONI5) and *P. flavigenum* (E.2.4) showed phytotoxic and growth inhibitory effects against aquatic plant *Lemna minor*. Among the fungi studied, colored extracts of three species (*E. nigrum* (185A), *P. flavigenum* (E.2.4) and *A. keweii* (CF292)) were dried by spray drying technique. The addition of three adjuvants (maltodextrin, modified starch and gum arabic) resulted in fine powders with low moisture content and water activity. Moreover, all studied adjuvants ensured high color retention and product recovery during the drying process. Therefore, the results indicate that filamentous fungi isolated from Brazilian caves can be new sources of natural pigments and their extracts can be dried by spray drying technique to facilitate the storage and marketing of these dyes.

Keywords: Pigments. Filamentous fungi. Brazilian caves. Secondary metabolites. Spray dryer.

LISTA DE FIGURAS

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

- Figure 1 Fifty-percent majority-rule consensus tree based on ITS sequences of pigment- producing fungi and reference strains of identified species and species groups. Posterior probabilities ≥ 0.9 are given near the nodes. *Peziza ampelina* KH 00.011 (C) was used as outgroup47
- Figure 2 Pigment production by filamentous fungi on different media. PD (Potato Dextrose medium), ME (Malt Extract medium), CZP (Czapeck-Dox medium) and MD (Defined Medium).....50
- Figure 3 Effect of different media on biomass production of filamentous fungi. Results are mean of triplicates \pm SD and those with different letters are significantly different at $p < 0.01$ 51
- Figure 4 Chemical structure of compounds: oosporein (A) (NAGAOKA et al., 2004), orevactaene (B) (SHU et al., 1997) and dihydrotrichodimerol (C) (LEE et al., 2005).....55
- Figure 5 A) ^1H NMR spectra of the oosporein ($\delta = 1.88 - 6\text{H},\text{s}$) B) Fragmentation profile of ion at m/z 611 (negative mode) showing characteristic ions at m/z 403, 447, 491 and 521, confirming the structure of the orevactaene.....56
- Figure 6 A) Biological activity of fungal extracts against *L. minor*: 1) Fr 6, 7, 8 and 9, combined, of extract of *L. aphanocladii* (ON15); 2) Fr 7, 8 and 9, combined, of extract of *E. nigrum* (185A). 3) Crude extract of *P. flavigenum* (E.2.4). B) Controls: 1) Medium SIS; 2) DMSO 1%; 3) Atrazine commercial herbicide59

ARTIGO 2

- Figure 1 Powders obtained by spray drying process of the colored filtrate from filamentous fungi using three adjuvants82

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRA PARTE

Tabela 1	Cores da região visível do espectro	17
Tabela 2	Pigmentos de alimentos naturais autorizados e suas fontes	19
Tabela 3	Produção de pigmentos por micro-organismos	22

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Table 1	Culture media for pigment production in submerged culture	43
Table 2	Pigment production (UA x df)* of isolates in different media. PD (Potato Dextrose medium), ME (Malt Extract medium), CZP (Czapeck-Dox medium) and MD (Defined Medium)	51

ARTIGO 2

Table 1	Characteristics of the dye powder produced by spray drying with different adjuvants	83
---------	---	----

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Pigmentos	16
2.2	Pigmentos microbianos	20
2.3	Fungos filamentosos produtores de pigmentos	24
2.4	Influência das condições de cultivo na produção de pigmentos	27
2.5	Identificação de compostos coloridos por métodos espectrométricos	28
2.6	Aplicação dos pigmentos microbianos	30
2.7	Microencapsulação de pigmentos naturais por <i>Spray drying</i>	31
	REFERÊNCIAS	34
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS	39
	ARTIGO 1 Filamentous fungi from brazilian caves: species identification and screening of produced pigments	39
	ARTIGO 2 Spray drying of pigments produced by filamentous fungi isolated from brazilian caves	76

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Os pigmentos são substâncias químicas, de origem natural ou sintética, que conferem cor a outros materiais sobre o qual se fixam e devido a essa propriedade são usados nas indústrias têxteis, de cosméticos, papéis, alimentos entre outras. A utilização de pigmentos sintéticos apresenta algumas desvantagens, uma vez que podem causar efeitos tóxicos à saúde ou ao ambiente, por possuírem potencial mutagênico e carcinogênico e causarem alergias. Sendo assim, o interesse pela utilização de pigmentos naturais vem aumentando, principalmente devido à preocupação dos consumidores com uma alimentação saudável e balanceada e à preocupação com a questão ambiental (JOSHI et al., 2003).

Entre as fontes de pigmentos naturais, os micro-organismos são considerados potenciais produtores, pois seus pigmentos apresentam maior estabilidade a diferentes pHs e temperaturas, rendimento previsível e controlável, além de poder ser produzidos continuamente (DUFOSSÉ, 2006).

Os fungos filamentosos, particularmente ascomicetos, são conhecidos por sintetizar e secretar diversas classes de pigmentos como metabólitos secundários. Além do potencial desses compostos para o uso como corantes de alimentos, tecidos, cosméticos, os pigmentos fúngicos também são conhecidos por possuírem atividades biológicas importantes, como atividade antibacteriana, antifúngica, fitotóxica, antitumoral, antioxidante, entre outras, o que amplia a possibilidade de utilização desses compostos em inúmeras aplicações (GEWEELY, 2011; QUERESHI; PANDEY; SINGH, 2010; TEIXEIRA et al., 2012). Além disso, esses micro-organismos são potenciais para produção de pigmentos, uma vez que possuem crescimento relativamente rápido e podem

produzir altos rendimentos de pigmentos, usando condições de cultivo otimizadas (MAPARI et al., 2005).

A utilização dos pigmentos produzidos por fungos filamentosos em processos industriais requer a caracterização química e biológica de seus extratos. Para esse fim, empregam-se ferramentas como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) associada à espectrometria de massa (MS), ressonância magnética nuclear (RMN) entre outras, os quais acoplados ao conhecimento prévio da taxonomia do micro-organismo podem permitir a identificação dos pigmentos, bem como de eventuais metabólitos tóxicos, ajudando assim na seleção dos fungos para as diversas aplicações industriais (MAPARI et al., 2009).

Apesar do potencial de uso dos pigmentos fúngicos como corantes, uma das maiores desvantagens é a menor estabilidade destes quando comparados aos pigmentos sintéticos. Assim, estudos de secagem podem ajudar a aumentar a estabilidade desses corantes durante o armazenamento e facilitar o transporte, processamento e comercialização desses produtos (OBÓN et al., 2009). Uma das tecnologias que vem sendo utilizada para secagem de corantes naturais (provenientes principalmente de plantas) é a microencapsulação por *spray dryer*. Essa tecnologia é capaz de produzir pó fino e é amplamente utilizada na fabricação de alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos e de corantes, uma vez que diminui a atividade e o teor de água desses produtos, evitando assim o risco de degradação química ou biológica (KANDANSAMY; SOMASUNDARAM, 2012).

Nesse contexto, os objetivos neste estudo foram selecionar e identificar fungos filamentosos produtores de pigmentos, avaliar a produção de pigmentos pelos fungos selecionados em diferentes meios, identificar os principais metabólitos coloridos em seus extratos e investigar a possibilidade da

microencapsulação dos pigmentos produzidos por três fungos filamentosos por meio da técnica de *spray drying*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Pigmentos

O termo pigmento se refere às substâncias químicas que conferem cor a outros materiais sobre o qual se fixam. Essas moléculas também podem ser definidas como substâncias que quando estão em algum veículo líquido conferem cor a uma superfície (MENDÉZ-ZAVALA et al., 2007).

A cor emitida pelos pigmentos pode ser entendida como a parte da radiação eletromagnética possivelmente detectada pelo olho humano, ou seja, na faixa de comprimento de onda (λ) entre 380 e 780 nm, também conhecida como faixa espectral visível (SKOOG et al., 2005). Essa propriedade está associada à absorção ou reflexão da luz em comprimentos de ondas determinados. O pigmento absorve certa parte do espectro e a cor complementar é refletida. Por exemplo, se os raios absorvidos por um pigmento forem violetas ou azuis, ou seja, se o pigmento apresentar máxima absorção em λ próximo a 400 nm, a cor transmitida será amarela (WILSON; WALKER, 1985). Na Tabela 1 são demonstradas as cores transmitidas, correspondentes aos comprimentos de ondas individuais do espectro visível.

A porção do espectro que é absorvida pela molécula do pigmento depende do número de ligações insaturadas (duplas conjugadas) e da liberdade de seus elétrons. À medida que o comprimento do sistema de duplas ligações conjugadas aumenta o comprimento de onda de máxima absorção da molécula também aumenta. Além disso, essas moléculas podem apresentar cromóforos que são grupos de átomos (como oxigênio ou nitrogênio), que promovem o movimento de elétrons ou maior oscilação do sistema. Em pigmentos naturais, esses sistemas conjugados (duplas ligações) são observados com frequência, como por exemplo, nos carotenoides (MARGALITH, 1992).

Tabela 1 Cores da região visível do espectro

Comprimento de onda (nm)	Radiação absorvida	Cor complementar (transmitida)
400 – 465	Violeta	verde amarelado
465 – 482	Azul	Amarelo
482 – 487	azul esverdeado	Laranja
487 – 498	verde azulado	Vermelho
498 – 559	Verde	Púrpura
559 – 576	verde amarelado	Violeta
576 – 587	Amarelo	Azul
587 – 617	Laranja	azul esverdeado
617 – 780	Vermelho	verde azulado

Fonte: Skoog et al. (2005)

Devido à capacidade de conferir cor a outros materiais, os pigmentos são de grande importância para diversas indústrias como de alimentos, cosméticos, farmacêutica e têxtil e por essa razão vem sendo produzidos, isolados e caracterizados (MÉNDEZ et al., 2011).

Na indústria de alimentos, a cor é a principal qualidade organoléptica que atrai os consumidores, uma vez que traz uma perspectiva saudável ao alimento. Porém, a cor dos alimentos pode ser perdida ou alterada durante o processamento e estocagem dos mesmos, devido à sensibilidade ao calor, oxigênio, luz e acidez. Assim, torna-se indispensável ao fabricante a adição de pigmentos aos alimentos para melhorar o aspecto visual e conseqüentemente aumentar a aceitabilidade do consumidor (JOSHI et al., 2003). Na indústria de tecidos, a função dos pigmentos é tornar visualmente mais atraentes os artefatos como roupas, bolsas, carteiras, chapéus entre outros, tornando a aparência dos produtos tingidos mais agradáveis aos olhos do consumidor, além de aumentar a variabilidade das peças (VELMURUGAN et al., 2010b).

Os pigmentos podem ser de origem sintética ou natural. A partir do século XX, a utilização dos pigmentos sintéticos começou a ser questionada uma vez que esses compostos podem ser tóxicos, ter potencial carcinogênico, além de provocarem reações alérgicas (MAPARI et al., 2005). Outra preocupação com a utilização desses pigmentos deve-se a sua liberação indiscriminada no ambiente por indústrias têxteis e de tintas, interferindo na penetração da luz solar nas águas desses efluentes, retardando a fotossíntese, inibindo o crescimento da biota aquática e interferindo na solubilidade de gases nos corpos de água (CHANDER; ARORA, 2007). Devido aos efeitos negativos dos pigmentos sintéticos, cresce a necessidade de substituí-los pelos pigmentos naturais que são menos prejudiciais à saúde, podendo exibir melhor biodegradabilidade e maior compatibilidade com o meio ambiente (NAGIA; EL-MOHAMEDY, 2007).

Os pigmentos naturais podem ser extraídos de plantas como cerejas, uvas, beterrabas, de animais como as fêmeas de insetos (*Coccus cacti*) e de micro-organismos, como as espécies dos gêneros *Rhodotorula*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Yarrowia*, *Phaffia*, *Penicillium*, *Monascus* entre outros. A indústria alimentícia foi a pioneira na retomada da utilização dos pigmentos naturais e, atualmente, é sua principal consumidora (MAPARI et al., 2005). No processamento de alimentos, os pigmentos naturais, além de conferir ou intensificar a cor dos alimentos, podem ser aplicados como aditivos e antioxidantes (MÉNDEZ et al., 2011). Na Tabela 2 estão destacados os principais pigmentos naturais aplicados na produção de alimentos.

Tabela 2 Pigmentos de alimentos naturais autorizados e suas fontes

Pigmentos	Fontes	Faixa de coloração	Código EU	Comentários
Antocianinas	Cerejas, casca de uvas vermelhas, repolho-roxo	Rosa/vermelho a roxo/azul, dependendo do pH	E163	A cor é dependente do pH, sensível ao calor, e sujeito a oxidação
Betanina (Betalaína)	Beterraba vermelha	Rosa a vermelho	E162	Sensível ao calor, luz
Caramelo	Carboidratos de alimentos (Sacarose)	Marrom	E 150	Comumente utilizado como corante
Carbo medicinalis	Plantas, carvão vegetal	Preto	E153	A partir de material de plantas queimadas (banido nos EUA)
Carotenóides				
β -caroteno	Óleo de palma	Amarelo a laranja	E160a	Possuem atividade de pró-vitamina A , o que tornam os carotenoides favoráveis do ponto de vista estético e nutricional. Exibem boa estabilidade ao pH na maioria dos alimentos, são moderadamente solúveis em óleo, facilmente oxidáveis e possuem faixa de coloração limitada
Bixina ou norbixina	Sementes de urucum	Laranja	E160b	
Capsantina/capsorubina	Páprica	Laranja avermelhado	E160c	
Licopeno	Tomate	Vermelho alaranjado	E160d	
Luteína	Xantofila	amarelo dourado	E161b	
Cantaxantina	Salmão, camarão e flamingos	Rosa alaranjado	E161g	
Clorofila	Vegetais verdes	Verde	E140	
Clorofilina (complexo cúprico)	Vegetais verdes	Verde azulado	E141	Não é usualmente nomeado como corante natural em rótulos de alimentos
Curcumina	Cúrcuma (rizoma de plantas da Índia)	Amarelo-laranja	E100	Deve ser tratado para diminuir o odor e gosto apimentado
Riboflavina	Produzida por processo bacteriano	Amarelo	E101	Sensível à luz e gosto amargo

Fonte: Mapari et al.(2005)

A indústria têxtil e de papel também tem apresentado grande interesse na coloração com pigmentos naturais, devido à qualidade obtida com esses pigmentos, bem como à compatibilidade ambiental dessas substâncias (FRINHANI; OLIVEIRA, 2006; GUPTA et al., 2013). O interesse das indústrias têxteis nos pigmentos naturais também se deve ao fato de alguns pigmentos sintéticos apresentarem risco à saúde humana, quando em contato prolongado com o corpo, pois podem conter substâncias com potencial carcinogênico (SHARMA et al., 2012).

Apesar da necessidade em se utilizar pigmentos naturais, o custo de sua produção ainda é elevado, o que limita sua utilização frente aos pigmentos sintéticos. Além disso, o sucesso de qualquer pigmento depende da aceitabilidade no mercado, aprovação regulatória, além do tamanho do capital de investimento requerido para trazer o produto para o mercado (DUFOSSE, 2009). Assim, torna-se importante a procura por novas fontes e processos para melhorar a produção dos pigmentos naturais e substituir os pigmentos sintéticos.

2.2 Pigmentos microbianos

Grande parte dos pigmentos naturais utilizados nas indústrias é extraída de plantas, e em alguns casos de animais (*Coccus cacti*). Porém, a utilização desses pigmentos apresenta algumas desvantagens, como sensibilidade à oxidação e às mudanças de pH, como as antocianinas e sensibilidade à luz, ao calor e oxigênio, como as betaninas. Essas características limitam a utilização desses pigmentos durante o processamento, estocagem e transporte dos alimentos, nos quais eles são adicionados. Além disso, a extração desses pigmentos depende da disponibilidade de matéria-prima, ficando sujeita a condições climáticas e sazonalidade (MAPARI et al., 2005).

Uma alternativa para produção de pigmentos naturais é a utilização dos micro-organismos, uma vez que estes sempre foram utilizados para produção de diversos metabólitos ou moléculas de interesse industrial como antibióticos, enzimas, vitaminas, entre outros. Na natureza, bactérias, leveduras, microalgas e fungos filamentosos pigmentados são muito comuns (DUFOSSÉ, 2009). Entre as moléculas produzidas por micro-organismos podemos citar os carotenoides, melaninas, flavinas (riboflavinas), quinonas (antraquinonas e naftoquinonas), monascinas, violaceínas e ficocianinas (DUFOSSÉ et al., 2014).

Os pigmentos microbianos são de grande interesse industrial, uma vez que são mais estáveis e solúveis que os pigmentos extraídos de plantas ou animais. Além disso, os micro-organismos podem crescer mais rapidamente que outros organismos, produzir continuamente os pigmentos independente da sazonalidade, em processos fermentativos relativamente simples e a produção pode ser otimizada visando ao aumento do rendimento (MÉNDEZ et al., 2011).

Há alguns anos, a aplicabilidade dos pigmentos microbianos no mercado, principalmente em alimentos e cosméticos era questionada, devido aos longos e caros estudos em relação à toxicidade desses pigmentos requeridos pelas agências reguladoras. Outros obstáculos para sua aplicação incluem o custo de processamento (cultivo ou produção biotecnológica) e a própria aceitação pelos consumidores. Atualmente, esses obstáculos vêm sendo contornados e alguns pigmentos microbianos já estão disponíveis no mercado (DUFOSSÉ et al., 2014).

Entre os micro-organismos, espécies de bactérias, leveduras, microalgas e fungos filamentosos estão sendo estudadas para produção de pigmentos (Tabela 3). Existem alguns critérios para que um microrganismo possa ser considerado bom produtor de pigmentos como: 1) capacidade de utilizar diversas fontes de C e N; 2) apresentar bom rendimento de pigmentos; 3) não ser patogênico e não produzir toxinas nas condições da produção, principalmente

para aqueles aplicados em alimentos; 4) os pigmentos devem ser facilmente separados da massa celular (JOSHI et al., 2003).

Tabela 3 Produção de pigmentos por micro-organismos

Molécula	Cor	Microorganismo	Situação*
Ankaflavina	Amarelo	<i>Monascus</i> spp.	PI
Antraquinona	Vermelho	<i>Penicillium oxalium</i>	PI
Astaxantina	Vermelho/rosa	<i>Xanthophyllomyces</i>	ED
Astaxantina	Vermelho/rosa	<i>Agrobacterium</i>	PP
Astaxantina	Vermelho/rosa	<i>Paracoccus</i>	PP
Cantaxantina	Vermelho escuro	<i>Bradyrhizobium</i> ssp.	PP
Licopeno	Vermelho	<i>Blakeslea trispora</i>	ED
Licopeno	Vermelho	<i>Fusarium</i>	PP
Melanina	Preto	<i>Saccharomyces</i>	PP
Monascorubramina	Vermelho	<i>Monascus</i> spp.	PI
Nafitoquinona	Vermelho sangue	<i>Cordyceps</i>	PP
Riboflavina	Amarelo	<i>Ashbya gossypi</i>	PI
Rubrolone	Vermelho	<i>Streptomyces</i>	ED
Rubropunctatina	Laranja	<i>Monascus</i> spp.	PI
Torularodina	Laranja-vermelho	<i>Rhodotorula</i> spp.	ED
Zeaxantina	Amarelo	<i>Flavobacterium</i> spp.	ED
Zeaxantina	Amarelo	<i>Paracoccus</i>	PP
β -caroteno	Amarelo-laranja	<i>Blakeslea trispora</i>	PI
β -caroteno	Amarelo-laranja	<i>Fusarium</i>	PP
β -caroteno	Amarelo-laranja	<i>Mucor circinelloides</i>	ED
β -caroteno	Amarelo-laranja	<i>Neurospora crassa</i>	PP
β -caroteno	Amarelo-laranja	<i>Phycomyces</i>	PP
Desconhecido	Vermelho	<i>Penicillium</i>	ED
Desconhecido	Vermelho	<i>Paecilomyces</i>	PP

*PI – produção industrial; ED – estágio de desenvolvimento; PP – projeto de pesquisa.
Fonte: Dufossé (2006)

Entre as bactérias produtoras de pigmentos podemos citar espécies do gênero *Flavobacterium* que produzem zeaxantina e luteína e a espécie *Streptomyces chrestomyeticus* subsp. *rubescens* que produz licopeno, um intermediário na biossíntese de carotenoides dicíclicos, incluindo o β -caroteno (DUFOSSÉ, 2009; JOSHI et al., 2003).

Entre as leveduras, as espécies do gênero *Rhodotorula*, como *R. glutinis*, *R. gracilis*, *R. rubra* e *R. gaminis* apresentam capacidade de sintetizar carotenoides, principalmente toruleno (DUFOSSÉ, 2009). Outro exemplo é a produção de astaxantina pela levedura *Xanthophyllomyces dendrorhous* (anteriormente chamada de *Phaffia rhodozyma*), principalmente durante a fase exponencial do seu crescimento (JOSHI et al., 2003). A produção de astaxantina é de grande interesse, já que este pigmento apresenta propriedades antioxidantes e alto poder tintorial, sendo mais estável que outros carotenoides (DUFOSSÉ et al., 2005).

As microalgas são conhecidas por produzirem um grande número de pigmentos como clorofila a, b e c, β -caroteno, entre outros. A espécie *Dunaliella salina* produz cerca de 400 mg de β -caroteno/m² de área cultivada. Esse pigmento apresenta diversas aplicações em indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos, pois atua como precursor da vitamina-A e como antioxidante. A produção industrial de β -caroteno através dessa microalga é realizada em países como Índia, Austrália, EUA, China e Israel. Outro exemplo de uma microalga produtora de pigmentos é a espécie *Haematococcus pluvialis* que produz astaxantina, utilizada como aditivo nutricional (através de cápsulas) e aditivo na alimentação de peixes, em empresas do Japão, EUA e Índia (DUFOSSÉ et al., 2005).

2.3 Fungos filamentosos produtores de pigmentos

Entre os micro-organismos, os fungos filamentosos têm sido considerados promissoras fontes de pigmentos de importância comercial, pois seus pigmentos exibem uma ampla faixa de coloração e muitos são solúveis em água (MAPARI et al., 2005). Os pigmentos fúngicos são produzidos como metabólitos secundários, com função conhecida ou não, e podem ser classificados quimicamente como carotenoides e policetídeos. Entre os policetídeos pode-se citar as antraquinonas, naftoquinonas, hidroxiantraquinonas e azafilonas, cada um exibindo uma ampla gama de tons (DUFOSSÉ et al., 2014; MAPARI; THRANE; MEYER, 2010).

A utilização de fungos para produção de pigmentos não é uma prática recente. Os pigmentos produzidos pelos fungos do gênero *Monascus* são utilizados em alimentos há centenas de anos nos países da Ásia (MAPARI et al., 2005). O gênero *Monascus* é constituído por três principais espécies (*M. pilosus*, *M. purpureus* e *M. ruber*) que pertencem à família *Monascaceae* e à divisão *Ascomycota* (DUFOSSÉ et al., 2005). Em 1884, o primeiro fungo desse gênero foi isolado de batata e este foi então nomeado de *M. ruber*. Esse ascomiceto foi assim nomeado, pois apresenta apenas um único asco poliesporado. Em 1895, outra linhagem foi isolada, na Indonésia, a partir do arroz vermelho fermentado. Este fungo foi nomeado de *M. purpureus*. Mais tarde outras espécies do gênero *Monascus* foram isoladas ao redor do mundo (DUFOSSÉ, 2009). As espécies desse gênero produzem metabólitos secundários de estrutura policetídic, algumas delas com pigmentação amarela (ankaflavina e monascina), laranja (rubropunctatina e monascorubrina) e vermelha (rubropunctamina e monascorubramina) (MUKHERJE; SINGH, 2011). Entre os pigmentos produzidos por *Monascus* os vermelhos são geralmente de maior interesse, pois são possíveis substitutos de pigmentos sintéticos como a eritrosina, são estáveis

na faixa de pH 2-10, termoestáveis, podendo ser autoclavados (JOHNS; STUART, 1991).

O cultivo de *Monascus* em meio sólido é realizado em países da Ásia para produção de um corante vermelho nomeado de “Ang-Kak” ou “koji vermelho” que tem sido utilizado como um corante de alimentos. Atualmente, há mais de 50 patentes no Japão, Estados Unidos, França e Alemanha, envolvendo a utilização do pigmento *Monascus* em alimentos, como carnes processadas (presunto e salsicha), ketchup, entre outros. Entretanto, uma desvantagem dos processos fermentativos para produção do pigmento *Monascus*, é a coprodução de citrinina, uma micotoxina que possui propriedades nefrotóxicas e hepatotóxicas quando ingeridas por animais e pelo homem. Assim, a comercialização desse pigmento ainda é proibida nos países do Ocidente (DUFOSSE, 2006).

Além das espécies do gênero *Monascus*, outros fungos filamentosos possuem capacidade de produção de pigmentos. A empresa Ascolor Biotech na República Checa utiliza um isolado de *Penicillium oxalicum* para produção de um pigmento denominado de *Arpink Red* (um tipo de antraquinona). A síntese desse pigmento de cor vermelha é realizada em cultivo submerso com sacarose e melação de cana como fonte de carbono, extrato de levedura como fonte de nitrogênio, sais minerais como sulfato de zinco e magnésio, pH igual a 5,6-6,2 e temperatura de 27 a 29°C. O corante é liberado no segundo dia de cultivo e apresenta um rendimento de 1,5-2,0 g.L⁻¹ depois de 3 a 4 dias de incubação. Para a extração desse corante, o sobrenadante de cultivo é filtrado e centrifugado. O corante é precipitado com a redução do pH para 2,5-3,0. O precipitado é dissolvido em álcool etílico e filtrado. Após remoção do álcool, o corante na forma de pó pode ser utilizado em carnes e produtos de carne (em quantidades até 100 mg/kg), bebidas não alcoólicas (em quantidades até 100 mg/kg), bebidas alcoólicas (em quantidades até 200 mg/kg), produtos lácteos

(em quantidades até 150 mg/kg), sorvetes (em quantidades até 150 mg/kg), produtos de confeitaria (em quantidades até 300 mg/kg) (DUFOSSÉ, 2006).

O fungo filamentosso *Blakeslea trispora* também é utilizado na produção de pigmentos como β -caroteno e licopeno. A produção industrial desses carotenoides a partir do processo fermentativo é realizada por empresas em países Europeus, como Rússia, Ucrânia e Inglaterra (JOSHI et al., 2003). O fungo *Ashbya gossypii* produz riboflavina (vitamina B₂), um corante que apresenta uma variedade de aplicações em alimentos, como sobremesas, bebidas, sorvetes, produtos à base de cereais, entre outros. Porém, essas aplicações são limitadas devido ao seu odor e sabor naturalmente amargo (DUFOSSÉ, 2009).

Além dos exemplos citados acima, há estudos com outras espécies de fungos filamentosos produtores de pigmentos como *Penicillium sclerotiorum*, *Aspergillus calidoustus*, *P. citrinum* (CELESTINO et al., 2014); *P. chrysogenum*, *Fusarium graminearum*, *P. vasconiae* (LOPES et al., 2013); *P. purpurogenum* (MÉNDEZ et al., 2011); *Isaria farinosa*, *Emericella nidulans*, *Fusarium verticillioides*, *Penicillium purpurogenum* (VELMURUGAN et al., 2010a, 2010b); *Epicoccum nigrum* (MAPARI; MEYER, 2008); *Fusarium oxysporum* (NAGIA; EL-MOHAMEDY, 2007); entre outros.

Alguns pigmentos fúngicos, assim como outros metabólitos secundários, apresentam atividades biológicas importantes como antibacteriana, antifúngica, antitumoral, fitotóxica (GEWEELY, 2011; TEIXEIRA et al., 2012). Geweely (2011) relatou atividade antibiótica dos pigmentos de *Aspergillus nidulans*, *Fusarium moniliforme*, *Phoma herbarum* e *Penicillium purpurogenum*, destacando esta última espécie como a que apresentou maior efeito contra as espécies microbianas testadas (*Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Aspergillus fumigatus*). Perumal et al.

(2009) relataram que o extrato pigmentado de *Sclerotinia* sp. apresentou atividade antibacteriana contra *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans*. Assim, é importante ressaltar que nem todos os pigmentos fúngicos serão utilizados como corantes. Dependendo de sua atividade biológica, estes podem ser explorados para outras aplicações.

2.4 Influência das condições de cultivo na produção de pigmentos

Trabalhos relatam que a produção de pigmentos por fungos filamentosos é influenciada por fatores ambientais como fonte de carbono, nitrogênio, luz, pH e temperatura (CHO et al., 2002; MÉNDEZ et al., 2011; VELMURUGAN et al., 2010a).

As condições de cultivo otimizadas para produção de pigmentos vermelhos pelo fungo *Paecilomyces sinclairii* foram: inóculo de três dias, temperatura de 25°C, pH igual a 6,0, amido solúvel (1,5% p/v) como fonte de carbono e peptona da carne (1,5% p/v) como fonte de nitrogênio. Após a otimização, o rendimento de pigmento vermelho foi nove vezes maior (CHO et al., 2002).

Geweely (2011) avaliou influência de alguns fatores na produção de pigmentos de *A. nidulans*, *F. moliniforme*, *P. purpurogenum* e *Phoma herbarum*. O isolado *P. purpurogenum* foi o que apresentou maior produção de pigmentos na ausência de luz, temperatura de 30°C, pH igual a 9,0, amido solúvel como fonte de carbono e peptona como fonte de nitrogênio.

Velmurungan et al. (2010a) avaliaram o efeito da ausência e presença de luz de diferentes cores na produção de pigmentos de *M. purpureus*, *Isaria farinosa*, *Emericella nidulans*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium purpurogenum*. A incubação no escuro, seguida pela incubação sob luz

vermelha, azul e branca proporcionou boa produção de biomassa e pigmentos extra e intracelulares pelos fungos avaliados.

A síntese de esclerotiorina por *Penicillium sclerotiorum* 2 AV2 foi influenciada pela fonte de nitrogênio e carbono. Sua produção foi em média três vezes maior no meio preparado com ramnose quando comparado com o meio com sacarose. Além disso, as melhores fontes de nitrogênio para a produção desse pigmento foram extrato de levedura e peptona nitrogenada, sendo que o rendimento foi seis vezes maior quando comparado com o nitrato de sódio (fonte de nitrogênio usual do meio Czapeck) (CELESTINO et al., 2014).

Como foi demonstrado pelos exemplos citados acima, a produção de pigmentos, assim como outros metabólitos secundários, é altamente influenciada pelas mudanças no meio e/ou condições de cultivo, assim, a seleção de meios de cultivo ou de seus componentes é uma etapa importante para a aplicação industrial dos pigmentos produzidos por fungos filamentosos. O apropriado conhecimento da fisiologia da fermentação e do metabolismo dos fungos poderá permitir uma produção eficiente desses compostos em maiores escalas (MAPARI et al., 2005).

2.5 Identificação de compostos coloridos por métodos espectrométricos

Para identificação dos componentes presentes nos extratos obtidos a partir dos processos fermentativos de fungos filamentosos, vários métodos analíticos têm sido empregados como, por exemplo, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ultravioleta (UV), infravermelho (IR), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (MS) (LOPES et al., 2013; MUCKHERJEE; SINGH, 2011; VELMURUGAN et al., 2010c). Dentre as técnicas citadas, destaca-se a MS, uma vez que apresenta alta sensibilidade e rapidez na análise. A utilização da MS na identificação de novos pigmentos

provenientes de micro-organismos vem sendo muito utilizada como uma ferramenta inteligente na seleção de espécies promissoras para a produção desses compostos (MAPARI et al., 2005).

Todas as metodologias citadas são empregadas na desreplicação de moléculas, que consiste em identificar e diferenciar compostos ou classe de compostos ativos, que já tenham sido descritos na literatura contendo atividade idêntica ou similar àquela observada no extrato de interesse. A desreplicação envolve a caracterização rápida dos compostos através de bibliotecas e bancos de dados (NIESSEN, 2003).

Velmurugan et al. (2010c), por meio das técnicas de MS, IR e RMN, concluíram que a estrutura do principal pigmento produzido por *Isaria farinosa* é fortemente relacionada com estrutura de uma antraquinona.

O isolamento e caracterização estrutural de um pigmento já descrito como sclerotiorina a partir de *P. sclerotiorum* 2AV2 foram realizados através de análises por RMN (CELESTINO et al., 2014).

Lopes et al.(2013) identificaram, por meio da espectrometria de massa (TOF-MS e TOF-MS/MS), pigmentos e micotoxinas já descritos na literatura, nos extratos de quatro linhagens de fungos filamentosos (2 isolados de *P. chrysogenum*, 1 de *Fusarium graminearum* e 1 de *Monascus purpureus*).

Mukherjee e Singh (2011) extraíram e purificaram um novo pigmento de *Monascus purpureus* produzido em fermentação submersa, utilizando cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia em coluna e HPLC. Além disso, caracterizaram o pigmento por meio de UV-vis, infravermelho, cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e análises de RMN.

Sendo assim, o emprego da espectrometria de massas por inserção direta do extrato bruto, obtido pelo método de fermentação, acoplado ao conhecimento prévio da taxonomia do micro-organismo e ao emprego de outros métodos como RMN, UV e IR, possibilitam a caracterização química dos componentes

coloridos, além de permitir a identificação de eventuais metabólitos tóxicos, ajudando na seleção desses micro-organismos para as diversas aplicações industriais (MAPARI et al., 2005).

2.6 Aplicação dos pigmentos microbianos

Como mencionado, os pigmentos naturais são alternativas importantes para substituir os corantes sintéticos, que podem ser prejudiciais ao homem, nos mais diversos segmentos industriais como indústria de alimentos, de tecidos, cosméticos, de papel entre outras. A indústria alimentícia foi a pioneira na utilização dos pigmentos naturais e como citado acima, já utiliza pigmentos extraídos de fungos filamentosos, como por exemplo, os pigmentos de *Monascus spp.*, *Penicillium oxalicum*, *Blakeslea trispora* e *Ashbya gossypii* (DUFOSSÉ, 2006).

No tingimento de tecidos, de papel e produção de artigos em couro, o interesse na utilização de corantes naturais vem aumentando, uma vez que estes possuem melhor biodegradabilidade e compatibilidade com o meio ambiente em relação aos corantes sintéticos (FRIHANI; OLIVERIA, 2006; SHARMA et al., 2012; VELMURUNGAN et al., 2010b).

Trabalhos com a aplicação de corantes naturais em tecidos, extraídos de micro-organismos já foram realizados (NAGIA; EL-MOHAMEDY, 2007; PERUMAL et al., 2009; SHARMA et al., 2012; VELMURUNGAN et al., 2010b). A otimização do processo de tingimento de amostras de couros com corantes extraídos de cinco fungos filamentosos (*Monascus purpureus*, *Isaria spp.*, *Emericella spp.*, *Fusarium spp.*, e *Penicillium spp.*) foi realizada por Velmurugan et al. (2010b). Neste trabalho, as condições otimizadas referentes à penetração e fixação dos corantes e intensidade de cor foram: temperatura de 70 °C, pH 5,0, tempo de 120 min e concentração dos corantes de 6% em relação ao

peso do couro. A absorção máxima dos corantes nas amostras variou de 40 a 70% e os pigmentos fúngicos não alteraram as propriedades organolépticas das amostras de couro.

Nagia e EL-Mohamedy (2007), avaliaram compostos de antraquinona isolados a partir do cultivo líquido de *Fusarium oxysporum* no tingimento de lã. As amostras tingidas apresentaram boa estabilidade de cor e captação do corante nas seguintes condições: pH igual a 3, temperatura de 60 °C e tempo de 60 min.

Sharma et al. (2012) otimizaram as condições de cultivo de três fungos (*Trichoderma virens*, *Alternaria alternata* e *Curvularia lunata*) para produção de pigmentos para tingimento de amostras de lã e seda. As condições para produção de pigmentos foram encontradas em cultivo líquido, em meio BD (Batata-dextrose) a 28 °C por 25 dias em condições estáticas. As amostras de lã e seda tingidas com esses corantes apresentaram bons níveis de resistência à lavagem e à fricção.

Como pôde ser observado, os pigmentos fúngicos podem ser utilizados para as mais diversas aplicações, desde a coloração de alimentos até o tingimento de tecidos. Assim, estudos que proponham novas aplicações com esses pigmentos são necessários, principalmente visando à substituição dos pigmentos sintéticos, que tantos danos causam à saúde ao ambiente.

2.7 Microencapsulação de pigmentos naturais por *Spray drying*

Muitos pigmentos naturais tais como antocianinas, licopenos, carotenoides, são susceptíveis à perda da cor durante o processo de estocagem, pois são instáveis a condições ambientais como luz, ar, umidade e altas temperaturas (KANDANSAMY; SOMASUNDARAM, 2012). Assim, para aumentar a estabilidade dos corantes naturais, a tecnologia de microencapsulação vem sendo bastante estudada (ERSUS; YURDAGEL, 2007; PARIZE et al., 2008; QUECK; CHOK; SWEDLUND, 2007).

A microencapsulação é definida como um processo no qual micropartículas ou gotículas são envolvidas por um material de revestimento ou adjuvante, normalmente um polímero e este age como uma barreira física entre o núcleo e os outros materiais presentes no produto (PARIZE et al., 2008). Assim, essa técnica é utilizada para aumentar o tempo de prateleira dos produtos, uma vez que protege o material de condições ambientais indesejáveis (KANDANSAMY; SOMASUNDARAM, 2012).

Entre os vários métodos de microencapsulação, uma técnica conhecida por ser viável e de baixo custo é a secagem por atomização ou secagem por nebulização (*spray drying*). Esse é um processo de desidratação que envolve a atomização de um líquido, que contém sólidos em solução, emulsão ou suspensão, em pequenas gotículas dentro de uma câmara de secagem por onde passa um fluxo de ar quente. Essas gotículas são secas pelo ar quente, transformando-se em pequenas partículas sólidas (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

A microencapsulação por *spray drying* utiliza polissacarídeos (maltodextrinas, amido, gomas), proteínas e lipídeos como material de revestimento. O produto a ser encapsulado é misturado ao adjuvante e essa mistura é então levada ao *spray dryer* (KANDANSAMY; SOMASUNDARAM, 2012).

A secagem por nebulização tem sido utilizada na indústria alimentícia para garantir a estabilidade microbiana dos produtos, uma vez que diminui o teor de umidade e atividade de água dos mesmos, evitando o risco de degradação química e biológica (KANDANSAMY; SOMASUNDARAM, 2012).

O processo de *spray drying* tem sido utilizado para a encapsulação de vários corantes naturais, como o urucum extraído de sementes de *Bixa orellana*, o qual foi incorporado em quitosana por *spray dryer*, resultando em um pó seco, colorido e solúvel em água (PARIZE et al., 2008).

O pigmento antocianina extraído de cenoura (*Daucuscarota* L.) foi microencapsulado por *spray dryer* utilizando uma variedade de maltodextrinas como material de revestimento, sendo que o Glucodry 201 foi o melhor adjuvante para a incorporação desse pigmento (ERSUS; YURDAGEL, 2006).

A secagem por *spray dryer* do suco de melancia utilizando maltodextrina (Dridex 9) e temperatura de entrada de 155 °C, resultou em pós com melhores resultados colorimétricos, conteúdo de umidade e atividade de água razoavelmente baixos, além de assegurar bons conteúdos dos pigmentos licopeno e β -caroteno (QUECK; CHOK; SWEDLUND, 2007).

O corante de alimentos vermelho-púrpura extraído de *Opuntia stricta* foi seco pela técnica de *spray drying*, utilizando xarope de glicose (DE 29) como adjuvante. Após a otimização dos parâmetros de secagem, foi obtido um rendimento de 58% e mais de 98% da cor foi mantida durante o processo de secagem (OBÓN et al., 2009).

Como pôde ser observado, a microencapsulação de corantes obtidos de fontes naturais, principalmente extraídos de plantas, já constitui uma realidade. Assim, essa metodologia pode ser expandida para a secagem de corantes obtidos de outras fontes, como por exemplo, de micro-organismos.

REFERÊNCIAS

CELESTINO, J. R. et al. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, London, v. 49, n. 4, p. 569-575, Apr. 2014.

CHANDER, M.; ARORA, D.S. Evaluation of some white-rot fungi for their potential to descolourise industrial dyes. **Dyes and Pigments**, London, v. 72, n. 2, p. 192-198, 2007.

CHO, Y. J. et al. Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 195-202, Sept. 2002.

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

DUFOSSÉ, L. Pigments, microbial. In: _____. **Encyclopedia microbiology**. 3rd ed. Oxford: Academic, 2009. p. 457-471.

DUFOSSÉ, L. et al. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion of Biotechnology**, London, v. 26, p. 56-61, Apr. 2014.

DUFOSSÉ, L. et al. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 16, n. 9, p. 389-406, Sept. 2005.

ERSUS, S.; YURDAGEL, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 80, n. 3, p. 805-812, June 2007.

FRINHANI, E. M. D.; OLIVEIRA, R. C. The applicability of natural colorants in papermaking. **Tappi Journal**, Atlanta, v. 5, n. 7, p. 3-7, 2006.

GEWEELY, N. S. Investigation of the optimum condition and antimicrobial activities of pigments from four potent pigment-producing fungal species. **Journal of Life Sciences**, Varsóvia, v. 5, n. 9, p. 697-671, Sept. 2011.

GUPTA, C. et al. Pigment production from *Trichoderma* spp. for dyeing of silk and wool. **International Journal of Science and Nature**, London, v. 4, n. 2, p. 351-355, 2013.

JOHNS, M. R.; STUART, D. M. Production of pigments by *Monascus purpureus* in solid culture. **Journal of Industrial Microbiology**, Berlin, v. 8, n. 1, p. 23-38, July 1991.

JOSHI, V.K. et al. Microbial pigments. **Indian Journal of Biotechnology**, New Delhi, v. 2, n. 3, p. 362-369, July 2003.

KANDANSAMY, K.; SOMASUNDARAM, P. D. Microencapsulation of colors by spray drying: a review. **International Journal of Food Engineering**, New York, v. 8, n. 2, p. 1-15, May 2012.

LOPES, F. C. et al. Pigment production by filamentous fungi on agro-industrial byproducts: an eco-friendly alternative. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 171, p. 616-625, July 2013.

MAPARI, S. A. S. et al. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 16, n. 2, p. 231-238, Apr. 2005.

MAPARI, S. A. S. et al. Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale. **Microbial Cell Factories**, London, v. 8, n. 24, p. 1-15, 2009.

MAPARI, S. A.S.; MEYER, A.S. Evaluation of *Epicoccum nigrum* for growth, morphology and production of natural colorants in liquid media and on a solid rice medium. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 30, n. 12, p. 2183-2190, Dec. 2008.

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

MARGALITH, P. Z. **Pigment microbiology**. London: Chapman & Hall, 1992. 156 p.

MENDÉZ, A. et al. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. **Journal of Zhejiang University-Science**, Hangzhou, v. 12, n. 12, p. 961-968, 2011.

MÉNDEZ-ZAVALA, A. et al. Producción fungica de un pigmento rojo empleando la cepa xerofilica *Penicillium purpurogenum* gh-2. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, Brranquilla, v. 6, n. 3, p. 267-273, 2007.

MUKHERJEE, G.; SINGH, S. K. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 46, n. 1, p. 188-192, Jan. 2011.

NAGIA, F. A.; EL-MOHAMEDY, R.S.R. Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from *Fusarium oxysporum*. **Dyes and Pigments**, London, v. 75, n. 3, p. 550-555, 2007.

NIESSEN, W. M. A. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, n. 1000, p. 413-436, 2003.

OBÓN, J. M. et al. Production of a red–purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 90, n. 4, p. 471-479, Feb. 2009.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

PARIZE, A. L. et al. Microencapsulation of the natural urucum pigment with chitosan by spray drying in different solvents. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 7, n. 17, p. 3107-3114, 2008.

PERUMAL, K. et al. Extraction and characterization of pigment from *Sclerotinia* sp. and its use in dyeing cotton. **Textile Research Journal**, Research Triangle Park, v. 79, n. 13, p. 1178-1187, 2009.

QUECK, S. Y.; CHOK, N. K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. **Chemical Engineering and Processing**, Lausanne, v. 46, n. 5, p. 386-392, May 2007.

QUERESHI, S.; PANDEY, A. K.; SINGH, J. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Phoma herbarum* (FGCC#54) under submerged cultivation. **Journal of Phytology**, Humnabad, v. 2, n. 9, p. 1-8, 2010.

SHARMA, D. et al. Pigment extraction from fungus for textile dyeing. **Indian Journal of Fibre & Textile Research**, New Delhi, v. 37, n. 1, p. 68-73, Mar. 2012.

SKOOG, D.A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2005. 1124p.

TEIXEIRA, M. F. S. et al. Amazonian biodiversity: pigments from *Aspergillus* and *Penicillium*-characterizations, antibacterial activities and their toxicities. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, Guntur, v. 6, n. 3, p. 300-311, 2012.

VELMURUGAN, P. et al. Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 109, n. 4, p. 346-350, 2010a.

VELMURUGAN, P. et al. Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 79, n. 2, p. 262-268, Jan. 2010b.

VELMURUGAN, P. et al. Water-soluble red pigments from *Isaria farinose* and structural characterization of the main colored component. **Journal of Basic Microbiology**, Malden, v. 50, n. 6, p. 581-590, Dec. 2010c.

WILSON, K.; WALKER, J. P. **Practical biochemistry: principles and techniques**. 4th ed. London: Cambridge University, 1995. 802 p.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

FILAMENTOUS FUNGI FROM BRAZILIAN CAVES: SPECIES IDENTIFICATION AND SCREENING OF PRODUCED PIGMENTS

ABSTRACT

The interest in the production of pigments by filamentous fungi is increasing due to their use as food colorants, cosmetic or textiles and also due to the biological activities of these compounds. In this context, the objectives of this study were to select pigment-producing fungi, identify these fungi using the sequencing of internal transcribed spacer (ITS), evaluate the growth and pigment production by selected strains on four different media, characterize the main colored metabolites in their extracts and evaluate the phytotoxic activity of these extracts against *Lemna minor*. Among the evaluated fungi, twelve were able to grow and produce pigments on Potato Dextrose Agar (PDA) medium and were selected and identified as *Aspergillus sydowii* (GMA3) (1), *A. aureolatus* (E.2.5) (2), *A. keweii* (CF292) (2), *Penicillium flavigenum* (E.2.4) (3), *P. chermesinum* (102) (1), *Epicoccum nigrum* (185A) (1), *Lecanicillium aphanocladii* (ONI5) (1) and *Fusarium* sp. (FPW) (1). The pigment production by these fungi was influenced by medium composition. Complex media, used in this study, seemed to favor a higher growth and production of pigments because it provided a wider variety of nutrients. The colored compounds oosporein, oreovactaene and dihydrotrichodimerol were identified in extracts of *L. aphanocladii* (ONI5), *E. nigrum* (185A) and *P. flavigenum* (E.2.4), respectively. The extracts of *L. aphanocladii* (ONI5) and *P. flavigenum* (E.2.4) showed phytotoxic and growth-inhibitory effects against the aquatic plant *Lemna minor*. The results indicate that the fungi isolated from Brazilian caves can constitute new sources of pigments with important biological activities and industrial application.

Keywords: pigments, filamentous fungi, chemical characterization, secondary metabolites.

INTRODUCTION

Filamentous fungi are known to produce a wide variety of secondary metabolites which play an important role in diversification and adaptation of these microorganisms to various ecological niches (FOX; HOWLETT, 2008). These metabolites have attracted immense interest of various researchers due to their potential for biotechnological applications such as the development of drugs, cosmetics, food, and others (SHWAB; KELLER, 2008).

Among the metabolites produced by fungi, the pigments have been highlighted, due to their biological activity or due to their potential use as dyes (CELESTINO et al., 2014). The filamentous fungi secrete diverse classes of pigments as secondary metabolites such as carotenoids, melanins, flavins, phenazines and quinones (DUFOSSÉ et al., 2014; MAPARI; THRANE; MEYER, 2010). These compounds can be an alternative for the replacement of synthetic pigments, which exhibit some disadvantages as toxicity to health or environment and mutagenic and carcinogenic potential (LOPES et al., 2013). In addition, many pigments have important biological activities such as antibacterial, antifungal and herbicide potential and can be used in numerous applications (GEWEELY, 2011; PREMALATHA et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2012).

The exploration of secondary metabolites produced by these microorganisms can be facilitated because they may grow rapidly and produce high yields of the desired product using optimized culture conditions (MAPARI et al., 2005). Studies have shown that the change in media composition and/or culture conditions can result in enhanced pigment production, and, because of that, studies aim at selecting media or its components to increase the yield of these compounds (MUKHERJEE; SINGH, 2011; PRADEEP et al., 2013; QUERESHI; PANDEY; SINGH, 2010). Moreover, the identification of fungi

and the characterization of their extracts are important steps to select and direct the strains for various applications (MAPARI et al., 2009). Therefore, the objectives of this study were to screen and to identify pigment-producing fungi isolated from Brazilian caves, evaluate the influence of different media on pigment production, characterize the main colored metabolites produced by the selected strains and evaluate the phytotoxic activity of these extracts against *Lemna minor*.

MATERIAL AND METHODS

Screening and identification of pigment-producing fungi

For screening of pigment-producing filamentous fungi, twenty strains isolated from Brazilian caves and belonging to the collection of Bioprospecting and Genetics of Fungi Laboratory (Biogen) of the Federal University of Lavras, Brazil, were inoculated on Potato dextrose agar (PDA) medium (potatoes (200 g/L), glucose (20 g/L) and agar (20 g/L)) and were incubated at 25°C for 7 days. The strains that showed visual pigment production on PDA were selected and submitted to species identification based on molecular phylogenetic of the ITS-5.8S region of rDNA. Fungal DNA was extracted from mycelium scrapped from PDA plates using the “Mobio” UltraClean® Microbial extraction kit according to the manufacturer’s recommendations. The ITS region was amplified using primers: ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') as a forward primer and ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTTATTGATATGC-3') as a reverse primer (WHITE et al., 1990). Each 30 µL PCR reaction mix contained 15 µL Quiagen Kit, 12 µL Ultrapure water, 1 µL each primer (10 pmol) and 1 µL genomic DNA. PCR conditions were: initial denaturation at 95 °C for 2 min, 35 cycles of 95 °C for 1 min, 50 °C for 1 min, 72 °C for 1 min, and a final extension for 7 min at 72 °C. Samples

were sequenced by Macrogen in South Korea (MACROGEN, 2014). The sequences were edited using the SeqAssem Ver. 07/2008 software. Search for homologous sequences in GenBank was performed using BLAST (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI, 2014). ITS sequences of reference strains of fungal species that matched the BLAST searches were downloaded and aligned with sequences of the pigment-producing fungi using MUSCLE, as implemented in the MEGA 5 software (TAMURA et al., 2011). The alignment containing 592 bp, including gaps, was subjected to a bayesian phylogenetic analysis using Mr. Bayes 3.2 (RONQUIST et al., 2012). The SYM+I+G model of sequence evolution was estimated using jModeltest (DARRIBA et al., 2012) and applied to the Bayesian analysis. Two independent analyses were run in parallel for 2.5×10^6 generations in Mr. Bayes, and sampled every 500 generations. The convergence between runs was assessed by looking at the standard deviation of split frequencies. One fifty-percent majority-rule consensus tree was then generated after discarding 25 % of the initial trees. The sequences generated in this work were deposited in GenBank and the identified fungi were deposited in Coleção Micológica de Lavras (CML) of the Phytopathology Department, Lavras Federal University, Brazil.

Submerged culture on different media for pigment production

Pigment-producing fungi belonging to different species were selected and cultivated in four different media (Table 1) in 250 mL Erlenmeyer flasks with a volume of 100 mL of medium. The shake-flasks were inoculated with two mycelial plugs of approx. 9 mm diameter from a one-week-old culture grown on PDA medium. Incubation was carried out at 30 °C in the dark on a rotary shaker at 150 rpm for 7 days. The pigments and biomass production in each medium were investigated in triplicate and average values were reported.

The R program was used to compare the data by the Scott Knott test ($p < 0.01$) (SCOTT; KNOTT, 1974).

Table 1 Culture media for pigment production in submerged culture

Media	Composition	Reference
Potato Dextrose (PD)	Broth of baked potato; 2% (w/v) glucose	Sharma et al. (2012)
Malt Extract (ME)	2% (w/v) glucose; 2% (w/v) malt extract; 0.1% (w/v) peptone	Mapari, Meyer e Thrane (2008)
Czapeck-Dox (CZP)	3% (w/v) sucrose; 0.3% (w/v) NaNO ₃ ; 0.1% (w/v) K ₂ HPO ₄ ; 0.05% (w/v) MgSO ₄ .7H ₂ O; 0.05% (w/v) KCl; 0.01% (w/v) FeSO ₄ . 7H ₂ O	Mendéz et al.(2008)
Defined Medium (MD)	3% (w/v) glucose; 0.1% (w/v) (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0.05% (w/v) MgSO ₄ .7H ₂ O; 0.14% (w/v) K ₂ HPO ₄ ; 0.06% (w/v) KH ₂ PO ₄ ; 0.08% (w/v) ZnSO ₄ .7H ₂ O; 0.08% (w/v) FeCl ₃ .6H ₂ O; 0.08% (w/v) NaMoO ₄ .2H ₂ O; 0.04% (w/v) MnSO ₄ .2H ₂ O; 0.008% (w/v) CuSO ₄ .5H ₂ O	Velmurugan et al.(2010)

Extracellular pigment and biomass estimation

A known amount of pigment was taken from each fermented medium for estimating extracellular pigment using 90% ethanol. Five milliliters of solvent were added per milliliter of pigment taken. The solvent and sample were kept on a rotary shaker at 200 rpm for 1 h, allowed to stand for 15 min and filtered through Whatman paper No. 1. Ethanol extract of control medium was kept as the blank (consequently, any colored substances from the liquid medium were subtracted from the pigment produced by the fungi) and the analysis was carried out in spectrophotometer (Instrutherm UV-2000A, Ltd, São Paulo, Brazil). A scan was performed from 380-780nm to determine the wavelength of

maximum absorption. Pigment yield was expressed as units of absorbance at a given wavelength, multiplied by the dilution factor (UA x df).

For biomass estimation, the mycelium was filtered through a preweighed Whatman paper No. 1 and washed twice with distilled water followed by drying at 105 °C for 12–15 h and weighed to yield the biomass that was expressed as mycelial dry weight (g/L) (VELMURUGAN et al., 2010).

Chemical characterization of pigment produced by selected fungi

The production of pigments was performed by fermentation in a volume of 1L of the medium selected for each strain for 7 days at 30°C and 150 rpm. The cultures were filtered and the supernatant extracted twice with half volume of ethyl acetate. The extracts were concentrated in a rotary evaporator (IKA, RV10 digital) and subjected to a thin layer chromatography (TLC). The polar extracts were fractionated by chromatography on Sephadex LH20 (Sigma-Aldrich) column using methanol as eluent. The collected fractions were analyzed on a Waters Corp., Xevo TQ-S equipment for ID-MS and for the MS/MS experiments (CID). The nonpolar extract was fractionated by chromatography on a Silica gel stationary phase column (Acros, 35-70µm). For elution, mixtures of hexane:ethyl acetate and ethyl acetate:methanol with increasing polarity were employed. The collected fractions were analyzed by TLC on silica. Fractions showing the same chromatographic pattern were pooled and analyzed on Waters Corp., Xevo TQ-S equipment for ID-MS. The combined fractions that showed precursor ions of the metabolites of interest were separated by HPLC Shimadzu equipped with a CBM-20A system control, LC-6AD pump, detector UV-Vis SPD-20A (λ 301 and 370 nm) on an Eclipse XDB-C₁₈ semi-preparative column (Agilent, 9.4 x 250 mm, 5µm). For elution, it was employed a mixture of acetonitrile:water (50:50) under 3 mL.min⁻¹ flow.

The characterization of the pigments was performed by MS/MS and ^1H NMR experiments. MS parameters were: desolvation gas N_2 at 300°C ; scan time 0,5 s; ion source temperature 120°C ; capillary 3,2 kV and cone 60 V for ESI+, and capillary -3,2 kV and cone -60 V for ESI-. The collision energies went from 10eV to 50eV depending on the analyte. The software used to analyze the data was the MassLynx, version 4.1 (Waters Corp.). ^1H NMR experiments were performed by Bruker DRX - 400 spectrometer. The samples were dissolved in CD_3OD or CDCl_3 (Sigma-Aldrich), depending on their solubility.

Biological activity

The extracts were tested for the phytotoxic activity against *Lemna minor*. For bioassay, 30 μL aliquots of fraction of extracts in DMSO at 10 mg mL^{-1} were added into the well (triplicate) of a 3x4 ELISA plate and the volume completed to 3 mL of medium SIS (AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS -ASTM, 1993). One pair of healthy *L. minor* petals was put into each well. Medium SIS and DMSO 1% were used as negative control. Atrazine (Sigma-Aldrich), a synthetic commercial herbicide, was used as positive control. After 7 days, the phytotoxic activity of the extracts were visually evaluated by means of necrosis or proliferation inhibition of the petals.

RESULTS AND DISCUSSION

Screening and identification of pigment-producing fungi

Among twenty fungal strains evaluated, twelve had capacity to produce pigments in the PDA medium and were selected and identified. Fungal identification of the isolates selected in this work was based on molecular phylogenetic of the ITS-5.8S region of the rDNA. This region evolves rapidly and then is used for discriminating closely related species (WHITE et al.,

1990). In addition, the sequence variation within this region has been useful in phylogenetic studies of many fungi (BASTOLA et al., 2004). The phylogenetic tree of ITS sequences is shown in Figure 1.

Among the identified fungi, one isolate of *Aspergillus sydowii* (GMA3), two of *A. aureolatus* (E.4.1 and E.2.5), two of *A. Kewei* (ONI75 and CF292), three of *Penicillium flavigenum* (E.2.4; E.2.7 and 3.1.a), one of *P. chermesinum* (102), one of *Epicoccum nigrum* (185A), one of *Lecanicillium aphanocladii* (ONI5) and one isolate of *Fusarium* sp. (FPW) were obtained.

The species *Epicoccum nigrum*, identified in this work, is a recognized producer of a variety of secondary metabolites including pigments such as carotenoids (GRIBANOVSKI-SASSU; FOPPEN, 1967), flavonoids (SOPTICĂ; BAHRIM, 2005) and/or polyketide (SHU et al., 1997) with color hues in red-orange-yellow spectra. This species is also shown to be non-toxicogenic and therefore has been considered as a potential source of pigments (MAPARI; MEYER; THRANE, 2008).

Two pigment-producing species belonging to genus *Penicillium* were identified, *P. flavigenum* (E.2.4; E.2.7 and 3.1.a) and *P. chermesinum* (102). New azaphilones (chermesinones) were isolated from the culture of the mangrove endophytic fungus *Penicillium chermesinum* (ZH4-E2) (HUANG et al., 2011). However, there is no report about the potential of this species as a producer of pigments. The species *P. flavigenum* belongs to section *Crhysogena*, which has species producers of anthraquinones and other yellow polyketides (FRISVAD; SAMSON, 2004). Moreover, antibiotic xanthocillins have been found in two species in *Chrysogena* (*P. chrysogenum* and *P. flavigenum*) (FRISVAD et al., 2004). According to Mapari et al. (2009), the species *P. flavigenum* must be investigated as a possible source of pigments for industrial applications.

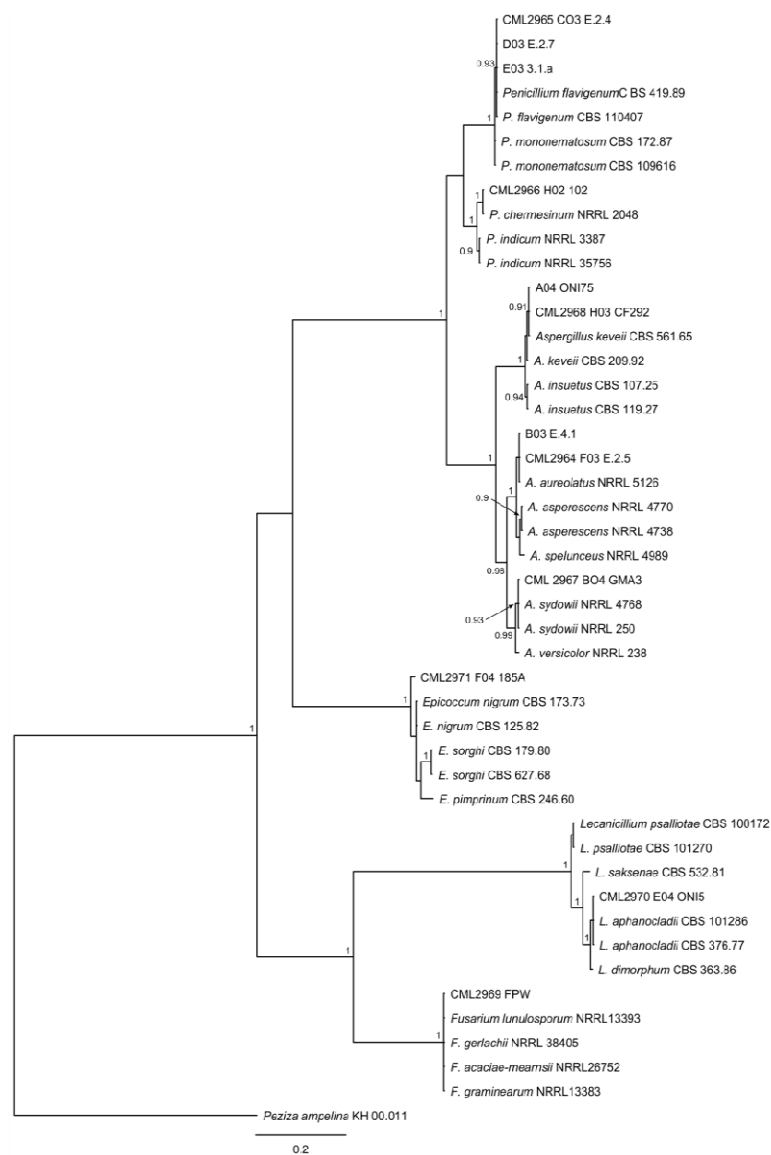


Figure1 Fifty-percent majority-rule consensus tree based on ITS sequences of pigment- producing fungi and reference strains of identified species and species groups. Posterior probabilities ≥ 0.9 are given near the nodes. *Peziza ampelina* KH 00.011 (C) was used as outgroup

Among the pigment-producing fungi, one isolated of genus *Fusarium* was identified. Species of this genus are sources of different bioactive metabolites, including pigments such as the anthraquinones compounds of *Fusarium oxysporum* (NAGIA; EL-MOHAMEDY, 2007), *F. verticillioides* (BOONYAPRANAI et al., 2008) and *F. moniliforme* (PREMALATHA et al., 2012).

The species *Lecanicillium aphanocladii* has been reported as parasitic fungus of *Agaricus* sp. and of *Sphaerotheca fuliginea* (HEIJWEGEN, 1988). In addition, it is also known as entomogenous (PECIULYTÈ; KACERGIUS, 2012) and as potential biological control agent against aphids (ZARE; MOHAMMADI, 2006). This species has been confused with *Aphanocladium album* (Preuss) and the use of this name in most of the literature refers to *L. aphanocladii*. One characteristic of this fungus is that almost all *L. aphanocladii* isolates produce a red pigment in agar (ZARE; GAMS, 2001), which was observed in the present work.

Three species of genus *Aspergillus* were identified as *A. aureolatus* (E.2.5 and E.4.1), *A. keveii* (CF 292 and ONI75) and *A. sydowii* (GMA3). There is not report about the potential of these species as pigment producers. Among the fungi belonging to the genus *Aspergillus*, only some species have been reported as possible sources of pigments, such as *A. glaucus*, *A. cristatus* and *A. repens* which were reported to produce known yellow and red hydroxyanthraquinoid pigments, such as emodin, physcion (yellow pigments), questin (yellow to orange-brown), erythroglaucon, catenarin and rubrocistin (red pigments) (CARO et al., 2012). Most of the species identified in this work have been little studied for the production of pigments and therefore may constitute new sources of colorants and/or metabolites with important biological activities.

Influence of different culture media on pigment production in submerged culture

Among the identified fungi, eight strains belonging to different species were selected to evaluate the influence of different media on growth and production of extracellular pigments in submerged culture. Media were selected based on the available literature for the pigment production by filamentous fungi in liquid cultures (Table 1). Extracellular pigments are preferred because they are soluble in culture media and downstream processing is simpler and cheaper (MAPARI et al., 2009). Therefore, only the extracellular production of pigments was evaluated in this study. The pigments produced by the selected fungi on various media are presented in Figure 2. Each filtrate was scanned at 400–700 nm to find the wavelength of maximum absorption (λ) of each pigment. Thus, the supernatant was read at 400 nm for yellow pigments of *Aspergillus sydowii* (GMA3), *A. aureolatus* (E.2.5), *A. Kewei* (CF292), *P. flavigenum* (E.2.4), *P. chermesinum* (102), and *Fusarium* sp. (FPW), at 430 nm for orange-yellow pigment of *E. nigrum* (185A), and at 500 nm for red pigment of *L. aphanocladii* (ONI5).

The tested strains grew in all examined media. The ME medium was the most favorable to the mycelial growth of all fungal species tested (Figure 3). However, the pigment production in this medium was significantly favorable only to three isolates, *A. Kewei* (CF292), *P. flavigenum* (E.2.4) and *Fusarium* sp. (FPW) ($p < 0.01$) (Table 2).

The ME medium is composed of glucose, malt extract and peptone. The malt extract is a source of vitamins and coenzymes that can promote the growth and production of pigments by these fungi (PRADEE et al., 2013). Furthermore, it has been reported that various types of peptone, commonly used in culture media as a source of nitrogen, increased the pigment production by many fungi species (CELESTINO et al., 2014; GEWEELY, 2011; PRADEEP et al., 2013;

QUERESHI; PANDEY; SINGH, 2010; VELMURUGAN et al., 2010). The peptone provides many nutrients as peptides and amino acids to the broth and it seems to be easily metabolized by most fungi, which can lead to increased production of their metabolites, including pigments (CELESTINO et al., 2014).

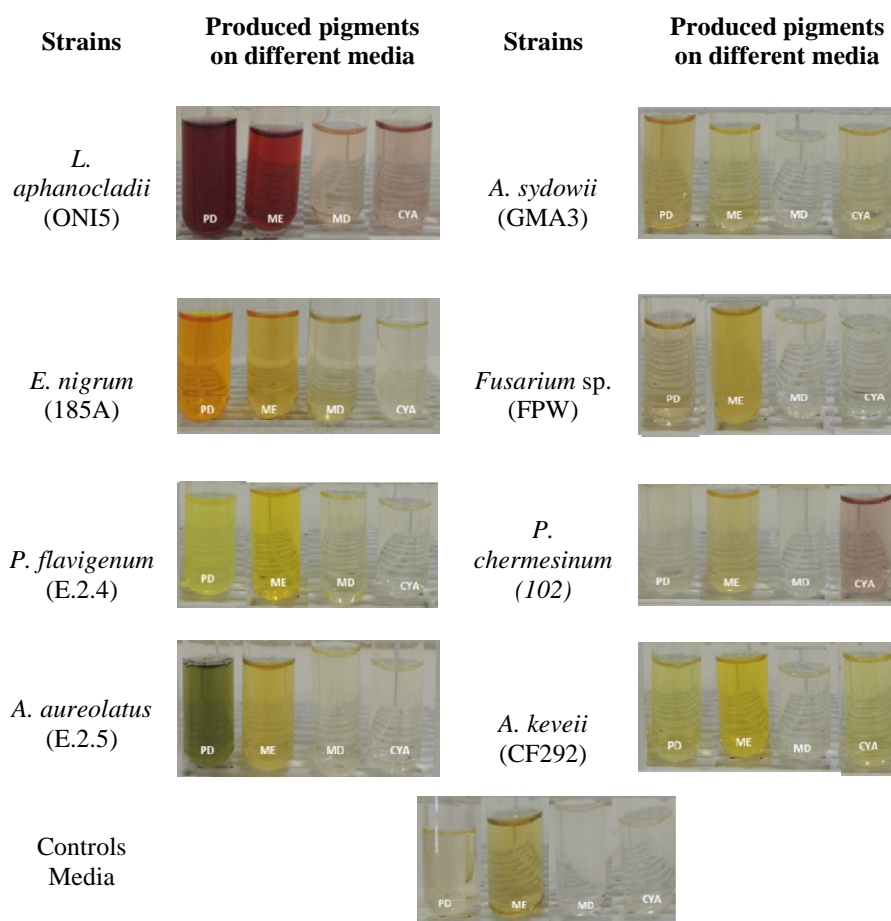


Figure 2 Pigment production by filamentous fungi on different media. **PD** (Potato Dextrose medium), **ME** (Malt Extract medium), **CZP** (Czapeck-Dox medium) and **MD** (Defined Medium)

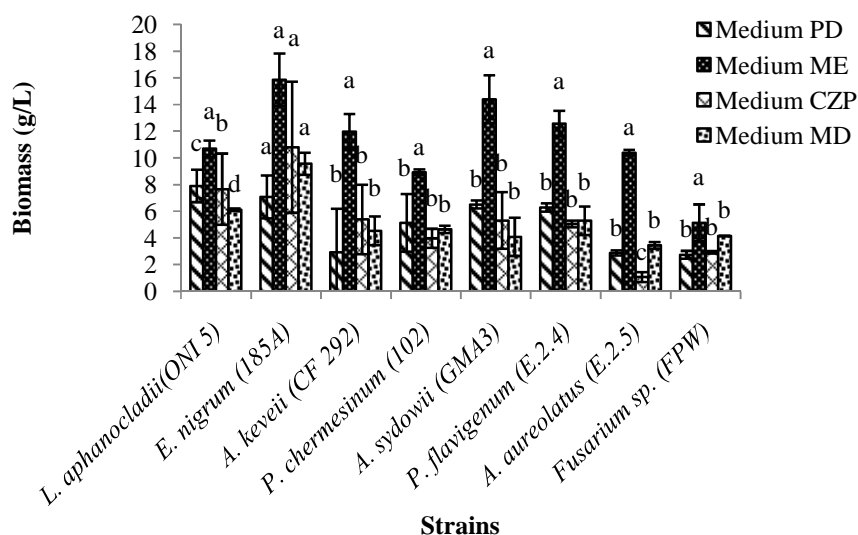


Figure 3 Effect of different media on biomass production of filamentous fungi. Results are mean of triplicates \pm SD and those with different letters are significantly different at $p < 0.01$

Table 2 Pigment production (UA \times df)* of isolates in different media. **PD** (Potato Dextrose medium), **ME** (Malt Extract medium), **CZP** (Czapeck-Dox medium) and **MD** (Defined Medium)

Isolates	λ (nm)	Media			
		PD	ME	CZP	MD
<i>L. aphanocladii</i> (ONI 5)	500	0.68 \pm 0.06 a	0.22 \pm 0.15 b	0.06 \pm 0.02 b	0.12 \pm 0.09 b
<i>E. nigrum</i> (185A)	430	8.19 \pm 3.04 a	0.22 \pm 0.08 b	0.22 \pm 0.06 b	0.29 \pm 0.09 b
<i>A. keveii</i> (CF 292)	400	0.20 \pm 0.06 b	1.79 \pm 0.06 a	0.37 \pm 0.11 b	0.10 \pm 0.07 b
<i>P. chermesinum</i> (102)	400	-	-	1.58 \pm 0.07 a	-
<i>A. sydowii</i> (GMA3)	400	0.98 \pm 0.66 a	-	0.09 \pm 0.03 b	-
<i>P. flavigenum</i> (E.2.4)	400	1.56 \pm 0.25 b	3.38 \pm 0.35 a	0.16 \pm 0.16 c	0.37 \pm 0.03 c
<i>A. aureolatus</i> (E.2.5)	400	0.68 \pm 0.24 a	0.72 \pm 0.17 a	0.08 \pm 0.08 b	0.14 \pm 0.05 b
<i>Fusarium sp.</i> (FPW)	400	0.54 \pm 0.13 b	2.03 \pm 0.05 a	-	0.23 \pm 0.1 b

*Values are means of triplicates \pm SD and those with different letters are significantly different at $p < 0.01$

For other evaluated fungal species, it was observed that the amount of biomass did not necessarily result in higher pigment production (Fig. 3 and Table 2). As observed on Table 2, for the isolate *E. nigrum* (185A), the maximum yellow-orange pigment production was observed in the PD medium (UA_{430nm} at 8.19 ± 3.04), on average 37 times higher than in the other tested media ($p < 0.01$). However, the growth in this medium was the lowest (7.09 ± 1.61 g/L) (Fig. 2). This result was also observed for the isolated *P. chermesinum* (102), which produced pigments only in the CZP medium, where its growth was the lowest compared to other media (3.98 ± 0.72 g/L). Moreover, *A. sydowii* (GMA3) and *P. chermesinum* (102) did not produce pigments in the ME medium, despite showing a higher biomass production in this medium. These results can be explained because the pigments produced by filamentous fungi are secondary metabolites whose production usually commences late in the growth of the microorganisms, often when entering the stationary phase (CALVO et al., 2002). Thus, the production of these compounds was higher in media where the fungi have reached the stationary phase more quickly, i.e., those means that do not favor its growth. Therefore, the growth and pigment-producing ability by filamentous fungi may not be positively correlated in the liquid culture.

The strains *L. aphanocladii* (ONI5) and *A. sydowii* (GMA3) showed the highest pigment production on PD medium in which the *L. aphanocladii* (ONI5) strain produced an intense reddish color (UA_{500nm} at 0.68 ± 0.6) and the *A. sydowii* (GMA3) strain produced yellow color (UA_{400nm} at 0.98 ± 0.66). To the *A. aureolatus* isolate (E.2.5), there is no significant difference on pigment production on PD and ME media at 400 nm. However, this isolate produced a dark green color in PD medium, presenting another absorption peak at a wavelength of 730 nm (UA_{730nm} at 0.17 ± 0.12) (Fig. 2). This result indicates that the PD medium favored the production of other pigments by strain *A. aureolatus* (E.2.5). Fungi such as the species of genus *Monascus*, also produce pigments of

different colors, and depending on the medium composition, the production of one pigment may be favored over others (MUKHERJEE; SINGH, 2011).

In this study, seven of the eight species evaluated showed higher pigment production in media of complex or undefined composition, such as ME and PD. These media contain glucose, which is a carbon source widely reported to induce the production of pigments (CHATTERJEE et al., 2009; MUKHERJEE; SINGH, 2011; PRADEEP et al., 2013). Besides, these media contain other components as malt extract, peptone, starch, which provide a series of nutrients like vitamins, coenzymes, peptides, amino acids, sulfur, molecules of carbon and nitrogen. These nutrients can regulate the expression of genes of interest and activate metabolic pathways important for the production of these compounds (PRADEEP et al., 2013). Thus, depending on the selected species, some sources of carbon and nitrogen can be more easily assimilated and promote higher yields of the desired product (CELESTINO et al., 2014).

The aim of these experiments with different media was to increase the pigment production to facilitate the downstream process of extraction and characterization. Moreover, these results start a discussion about the nutritional conditions for the pigment production by these fungi, which can help in the selection of substrates for future optimization purposes.

Chemical characterization of pigment produced by selected fungi

The eight selected species were cultured in a volume of 1L of selected medium for each isolate (PD medium for *L. aphanocladii* (ONI5), *E. nigrum* (185A), *A. aureolaus* (E.2.5) and *A. sydowii* (GM3), ME medium for *P. flavigenum* (E.2.4), *A. keveii* (CF292) and *Fusarium* sp. (FPW), and CZP medium for *P. chermesinum* (102)). For extractions of colored compounds, the cultures were filtered and the supernatant extracted twice with ethyl acetate in the ratio 2:1(v/v). The extraction of pigments using ethyl acetate was possible

only for the filtrate of isolates *L. aphanocladii* (ONI5), *E. nigrum* (185A) and *P. flavigenum* (E.2.4), since the pigments of the other isolates were not soluble in this solvent.

The extract of three strains was concentrated in a rotary evaporator and subjected to a TLC. According to the retention observed on the silica plate, it can be seen that the extracts of *L. aphanocladii* (ONI5) and *E. nigrum* (185A) are polar and, because of that, to prevent loss of compounds of interest on a silica column, the next step was to carry out the fractionation of these extracts on Sephadex column in which the separation of compounds is independent of their interaction with the stationary phase. In contrast, because of the nonpolar character of *P. flavigenum* (E.2.4) extract, this was fractionated on a silica column.

A total of 15 fractions of the extract *L. aphanocladii* (ONI5) and 12 fractions of the extract of *E. nigrum* (185A) were recovered of fractionation on Sephadex column. The fractions that showed color (5-13 of ONI5 extract and 3-9 of 185A extract) were directly analyzed in the mass spectrometer.

Analyzing the mass spectra of the fractions 6, 7, 8 and 9 of *L. aphanocladii* (ONI5) extract (APÊNDICE A) the precursor ions (m/z at 307 [$M + H^+$] and 329 [$M + Na^+$]) of a metabolite commonly produced by related species were found, called oosporein (Fig. 4A). These fractions were pooled, based on spectra analysis, and produced a red precipitate (8.5 mg) that was dissolved in CD_3OD to 1H NMR analysis. The spectral data of 1H NMR were in agreement with previous characterization of oosporein (NAGAOKA et al., 2004), exhibiting only one chemical shift at δ 1.88 (s) (6H, s) and confirming the identification of this pigment (Fig 5A).

Oosporein (2,5-dihydroxybenzoquinone) is a micotoxin originally isolated from the basidiomycete *Oospora colorants* (KOGI; WESSEM, 1994). It has also been found in other fungi like *Chaetomium trilaterale*, *Verticillium*

psalliotae, *Beauveria* sp., *Chaetomium cupreum* (COLE et al., 1974; LUO et al., 2014; MAO et al., 2010; NAGAOKA et al., 2004). This compound has important biological activities such as inhibition of growth in plants and phytotoxic effect (COLE et al., 1974). Moreover, oosporein showed antifungal activity against *Phytophthora infestans* (NAGAOKA et al., 2004), *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea* and *Pytium ultimum*, potential to inhibit proliferation of tumor cell lines (MAO et al., 2010), antiviral activity (TERRY et al., 1992) and has been reported to be toxic to various poultry including broiler chickens and turkeys, resulting in gout, kidney damage and even death (COLE et al., 1974; PEGRAM; WYATT; SMITH, 1981).

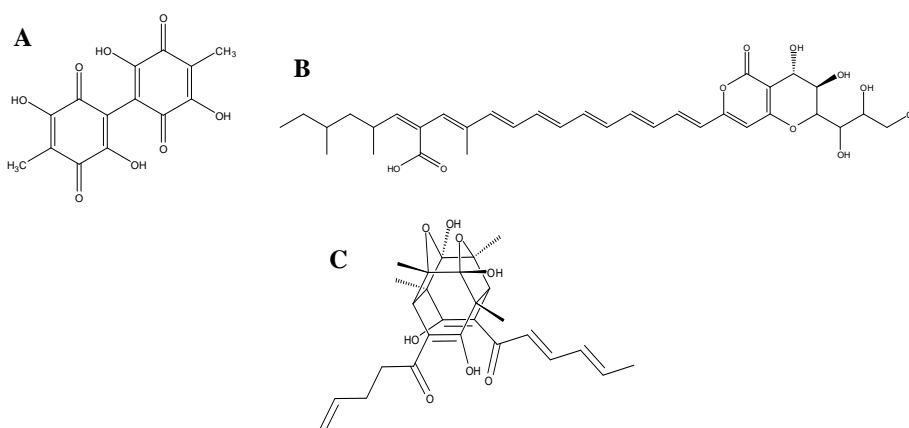


Figure 4 Chemical structure of compounds: oosporein (A) (NAGAOKA et al., 2004), orevactaene (B) (SHU et al., 1997) and dihydrotrichodimerol (C) (LEE et al., 2005)

The mass spectra of fraction 5, 6 and 7 of *E. nigrum* (185A) extract (APÊNDICE B) showed the ion precursor (m/z at 611 [M – H]) of orevactaene (Fig. 4B). The presence of this metabolite was confirmed by fragmentation profile (MS/MS) of ion 611, which showed the characteristic ions at m/z 403, 447, 491 and 521 in negative mode (Fig. 5 B), which are similar to previously reported patterns (GINKEL et al., 2012; SHU et al., 1997). These fragments are

a result of the cleavage of the hydroxylated side chain moiety, followed by the cleavage of the dihydroxypyranne ring and by the decarboxylation (GINKEL et al., 2012). Orevactaene is a yellow antioxidant compound, which was identified as the major color component of the extract of *E. nigrum* and has great potential as a food colorant (MAPARI; THRANE; MEYER, 2010). Moreover, orevactaene has potential for inhibition of HIV replication, because it was found to inhibit binding of HIV-1 regulatory protein and its viral RNA binding site (SHU et al., 1997).

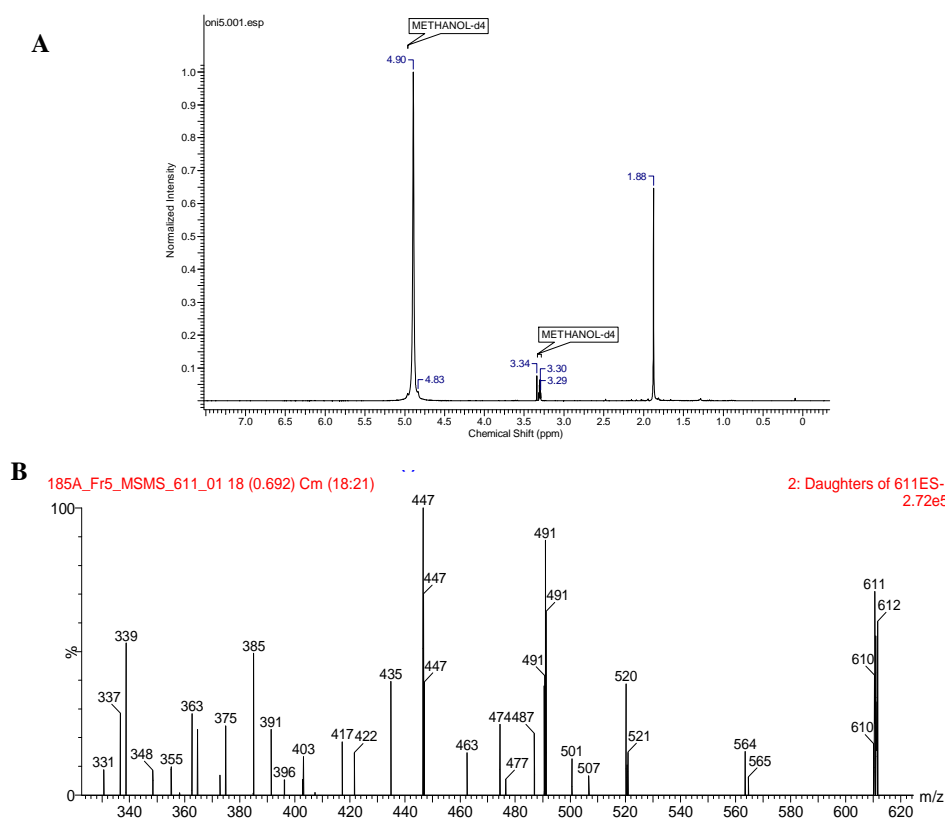


Figure 5 **A)** ^1H NMR spectra of the oosporein ($\delta = 1.88 - 6\text{H}, \text{s}$) **B)** Fragmentation profile of ion at m/z 611 (negative mode) showing characteristic ions at m/z 403, 447, 491 and 521, confirming the structure of the orevactaene

Fractionation on silica gel column of *P. flavigenum* (E.2.4) extract resulted in 50 fractions, which were subjected to TLC. The fractions that showed the same chromatographic profile were pooled and analyzed by mass spectrometry. Analyzing the mass spectra of the fractions 8-18, combined, of *P. flavigenum* (E.2.4) extract (APÊNDICE C), it was found the precursor ions (m/z at 499 $[M + H^+]$ and 521 $[M + Na^+]$) of a metabolite produced by species of genus *Penicillium* and *Trichoderma*, termed dihydrotrichodimerol (Fig. 4C). This fraction (8-18) was purified by HPLC. Among the 19 recovered fractions, the fractions 9 and 10, that showed the ions of m/z at 499 and 521 (APÊNDICE C) were pooled and yielded a yellow precipitate (4.43 mg) that was dissolved in $CDCl_3$ to 1H NMR analysis. The presence of dihydrotrichodimerol was confirmed by the spectral data of 1H NMR especially because of the presence of the signals with chemical shift at δ 5.49 (m), 6.14 (d), 6.2 (m), 6.3 (m) and 7.33 (dd) (APÊNDICE D). These chemical shifts are in agreement with previous characterization of the dihydrotrichodimerol by Lee et al. (2005), confirming the identification of this compound.

Dihydrotrichodimerol is a bisorbicillinoid polyketide, presenting an open-ended cage structure. These kinds of compounds are rare in nature and are unique metabolites from various terrestrial and marine fungi. These classes of polyketides have attracted interest due to their structural complexity and biological activity, such as antioxidant and antitumor activities (ABE; MURATA; HIROTA, 1998; LEE et al., 2005; LIU et al., 2005).

Dihydrotrichodimerol has been isolated from species as *Penicillium terrestre* (LIU et al., 2005) and *Trichoderma citrinoviride*. This compound reduced the feeding preference of the aphid *Schizaphis graminum*, one of the most important pests of cereal crops, suggesting a potential for the development of new agrochemicals for control of this pest (EVIDENTE et al., 2009). Moreover, dihydrotrichodimerol isolated from *P. terrestre* and from unidentified

fungal strain, showed, respectively, cytotoxic effects to cancer cell lines and effects on the activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), that are nuclear receptors with therapeutic potential in the treatment of type 2 diabetes, inflammatory disease, and certain cancers (LEE et al., 2005; LIU et al., 2005). To the best of our knowledge, this is the first time that this compound is isolated from the species *P. flavigenum*.

Biological activity

The phytotoxic activity of the three fungal extracts was tested against *L. minor* (Fig. 6). This species of duckweed belongs to the family Lemnaceae and is a small (1.5×1.5 mm) aquatic plant that consists of a central petal with two attached daughter petals and a filamentous root (RAHMAN; CHOUDHARY; THOMSEN, 2001). *L. minor* is often used in phytotoxicity assays for detecting new herbicides and assessing the toxicity of chemical compounds (FAIRCHILD et al., 1997; PETTA et al., 2013), because it presents advantages like ease of culture, small size, and rapid reproductive rate. In addition, very small sample quantities are required for testing and this bioassay is able to predict the growth stimulating effect of the evaluated sample (RAHMAN; CHOUDHARY; THOMSEN, 2001).

The results showed that the *E. nigrum* (185A) extract had no phytotoxic activity against this plant (Fig 6, 2A). In contrast, the petals of *L. minor* showed necrosis after the exposition to the *L. aphanocladii* extract (ONI5) (Fig. 6, 1A). This phytotoxic effect can be attributed to the presence of the red pigment oosporein, already known for its toxicity in plants (COLE et al., 1974). In addition, the extract of *P. flavigenum* (E.2.4) inhibited the proliferation of the petals of *L. minor* (Fig. 6, 3A). However, it cannot be inferred if the growth inhibition of this plant was caused by the presence of dihydrotrichodimerol on the extract, since the crude extract was used on this experiment and also because

there is no record in the literature about the phytotoxicity of this compound. Therefore, further studies need to be performed in order to isolate and identify the possible metabolites produced by *P. flavigenum* E.2.4 with potential for growth inhibition of the plants.

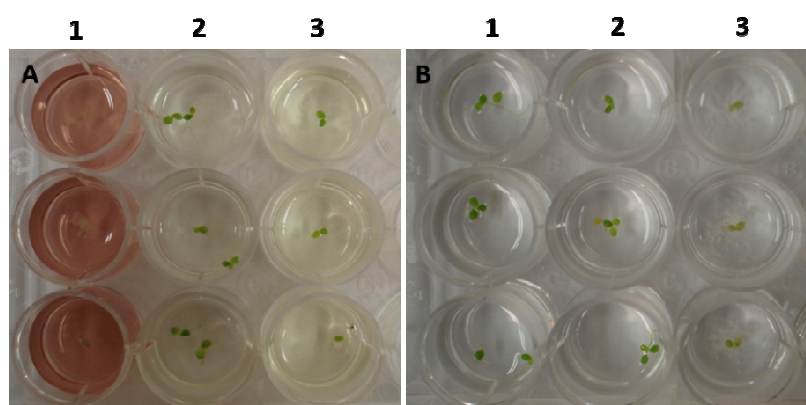


Figure 6 **A)** Biological activity of fungal extracts against *L. minor*: **1)** Fr 6, 7, 8 and 9, combined, of extract of *L. aphanocladii* (ONI5); **2)** Fr 7, 8 and 9, combined, of extract of *E. nigrum* (185A). **3)** Crude extract of *P. flavigenum* (E.2.4). **B)** Controls: **1)** Medium SIS; **2)** DMSO 1%; **3)** Atrazine commercial herbicide

CONCLUSIONS

Considering the results of this work, it was concluded that the studied fungi may have potential to produce pigments with biotechnological application. Among the twenty fungi evaluated, twelve were able to synthesize colored compounds and the molecular identification of these strains resulted in eight different species belonging to the genera *Penicillium*, *Aspergillus*, *Epicoccum*, *Lecanicillium* and *Fusarium*. In this study, the growth and pigment-producing ability were influenced by the species and media composition. Complex media seemed to favor a higher growth and production of these metabolites by providing a wider variety of nutrients. Colored compounds produced by these

fungi were identified such as the oosporein red mycotoxin in the *L. aphanocladii* (ONI5) extract, the oreovactaene orange antioxidant compound in the *E. nigrum* (185A) extract and the dihydrotichodimerol yellow compound in the *P. flavigenum* extract. Among the extracts evaluated on biological assay, the *L. aphanocladii* (ONI5) and *P. flavigenum* (E24) extracts showed phytotoxic and growth-inhibitory effects against the aquatic plant *L. minor*, indicating that the compounds present in these extracts have potential to be used as an herbicide, after further investigations. In addition, the presence of colored compounds with antioxidant potential in extracts of *E. nigrum* (185A) and *P. flavigenum* (E.2.4) indicate the possibility of using these isolates for the production of pigments with industrial application.

ACKNOWLEDGEMENTS: We acknowledge the financial support of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

- ABE, N.;MURATA, T.; HIROTA, A. Novel DPPH radical scavengers, bisorbicillinol and demethyltrichodimerol, from a fungus. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo,v. 62, n. 4, p. 661-666, 1998.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard guide for conducting toxicity tests with *Lemna gibba* G3**;practice E 1415-91. Philadelphia, 1993. 1232 p.
- BASTOLA, D. R. et al. Utilization of the relative complexity measure to construct a phylogenetic tree for fungi. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, n. 2, p. 117-125, 2004.
- BOONYAPRANAI, K. R. et al. Optimization of submerged culture for the production of naphthoquinones pigment by *Fusarium verticillioides*. **Chiang Mai Journal of Science**, Chiang Mai, v. 35, n. 3, p. 457-466, Sept. 2008.
- CALVO, A. M. et al. Relationship between secondary metabolism and fungal development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66, n. 3, p. 447-459, 2002.
- CARO, Y. et al. Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview. **Natural Products and Bioprospecting**, Berlin, v. 2, n. 5, p. 174-193, Oct. 2012.
- CELESTINO, J. R. et al. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, London, v. 49, n. 4, p. 569-575, Apr. 2014.
- CHATTERJEE, S. et al. Characterization of Red pigment from *Monascus* in Submerged Culture red pigment from *Monascus purpureus*. **Journal of Applied Sciences Research**, Madison,v. 5, n. 12, p. 2102-2108, 2009.
- COLE, R. J. et al. Toxic effects of oosporein from *Chaetomium trilaterale*. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 22, p. 517-520, 1974.
- DARRIBA, D. et al. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, London,v. 9, n. 8, p. 772, Aug. 2012.

- DUFOSSÉ, L. et al. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 26, p. 56-61, Apr. 2014.
- EVIDENTE, A. et al. Bisorbicillinoids produced by the fungus *Trichoderma citrinoviride* affect feeding preference of the aphid *Schizaphis graminum*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 35, n. 5, p. 533-541, May 2009.
- FAIRCHIL, J. F. et al. Comparative sensitivity of selenastrum capricornutum and *Lemna minor* to sixteen herbicides. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 32, n. 4, p. 353-357, May 1997.
- FOX, E. M.; HOWLETT, B. J. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 11, n. 6, p. 481-487, Dec. 2008.
- FRISVAD, J. C. et al. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 49, n. 1, p. 201-241, 2004.
- FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: a guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 49, n. 1, p. 1-174, 2004.
- GEWEELY, N. S. Investigation of the optimum condition and antimicrobial activities of pigments from four potent pigment-producing fungal species. **Journal of Life Sciences**, Varsóvia, v. 5, n. 9, p. 697-671, Sept. 2011.
- GINKEL, N. R. van et al. **Anti-microbial compositions**. US n. 2012/0108526 A1. 3 May 2012.
- GRIBANOVSKI-SASSU, O.; FOPPEN, F. H. The carotenoids of the fungus *Epicoccum nigrum* link. **Phytochemistry**, Oxford, v. 6, p. 907-909, 1967.
- HEIJWEGEN, T. Effect of seventeen fungicolous fungi on sporulation of cucumber powdery mildew. **Netherlands Journal of Plant Pathology**, Wageningen, v. 94, n. 4, p. 185-190, 1988.

HUANG, H. et al. Azaphilones and p-Terphenyls from the Mangrove Endophytic Fungus *Penicillium chermesinum* (ZH4-E2) isolated from the South China Sea. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 74, n. 5, p. 997-1002, Apr. 2011.

KOGL, F.; WESSEM, G. C. van. Analysis concerning pigments of fungi XIV Concerning oosporein, the pigment of *Oospora colorans* van Beyma. **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, Weinheim, v. 63, p. 5-24, 1944.

LEE, D. et al. Fungal metabolites, sorbicillinoid polyketides and their effects on the activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ . **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 58, n. 10, p. 615-620, 2005.

LIU, W. Z. et al. Didydrotrichodimerol and Tetrahydrotrichodimerol, two new bisorbicillinoids, from a Marine-derived *Penicillium terrestre*. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 58, n. 10, p. 621-624, 2005.

LOPES, F. C. et al. Pigment production by filamentous fungi on agro-industrial byproducts: an eco-friendly alternative. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 171, n. 3, p. 616-625, Oct. 2013.

LUO, Z. et al. Bbmsn2 acts as a pH-dependent negative regulator of secondary metabolite production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 1-26, Dec. 2004.

MACROGEN. Disponível em: <<http://dna.macrogen.com>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

MAO, B. Z. et al. Separation and determination of the bioactivity of oosporein from *Chaetomium cupreum*. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 9, n. 36, p. 5955-5961, Sept. 2010.

MAPARI, S. A. S. et al. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 16, n. 2, p. 231-238, Apr. 2005.

MAPARI, S. A. S. et al. Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale. **Microbial Cell Factories**, London, v. 8, n. 24, p. 1-15, Apr. 2009.

MAPARI, S. A. S.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Evaluation of *Epicoccum nigrum* for growth, morphology and production of natural colorants in liquid media and on a solid rice medium. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 30, n. 12, p. 2183-2190, Dec. 2008.

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

MENDÉZ, A. et al. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. **Journal of Zhejiang University-Science**, Hangzhou, v. 12, n. 12, p. 961-968, 2008.

MUKHERJEE, G.; SINGH, S. K. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 46, n. 1, p. 188-192, Jan. 2011.

NAGAOKA, T. et al. Antifungal activity of oosporein from an antagonistic fungus against *Phytophthora infestans*. **Zeitschrift für Naturforsch**, Leipzig, v. 59, n. 3/4, p. 302-304, 2004.

NAGIA, F. A.; EL-MOHAMEDY, R. S. R. Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from *Fusarium oxysporum*. **Dyes and Pigments**, London, v. 75, n. 3, p. 550-555, 2007.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION.
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

PEČIULYTĖ, D.; KAČERGIUS, A. *Lecanicillium aphanocladii*: a new species to the mycoflora of Lithuania and a new pathogen of tree leaves mining insects. **Botanica Lithuanica**, Beijing, v. 18, n. 2, p. 133-146, 2012.

PEGRAM, R.; WYATT, R. D.; SMITH, T. L. Oosporein toxicosis in the turkey poult. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 26, p. 47-59, 1981.

PETTA, T. et al. Bioassay-guided isolation of a low molecular weight PHB from *Burkholderia* sp. with Phytotoxic Activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 170, n. 7, p. 1689-1701, Aug. 2013.

PRADEEP, F. S. et al. Influence of culture media on growth and pigment production by *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 isolated from paddy field soil. **World Applied Sciences Journal**, Dubai, v. 22, n. 1, p. 70-77, 2013.

PRADEEP, F. S.; PRADEEP, B. V. Optimization of pigment and biomass production from *Fusarium moniliforme* under submerged fermentation conditions. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Madhya Pradesh, v. 5, n. 3, p. 526-535, 2013.

PREMALATHA, B. et al. Production and characterization of naphthoquinone pigment from *Fusarium moniliforme* MTCC6985. **World Journal of Pharmaceutical Research**, Houston, v. 1, p. 1126-1142, 2012.

QUERESHI, S.; PANDEY, A. K.; SINGH, J. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Phoma herbarum* (FGCC#54) under submerged cultivation. **Journal of Phytology**, Humnabad, v. 2, n. 9, p. 1-8, 2010.

RAHMAN, A.; CHOUDHARY, M. I.; THOMSEN, W. J. **Bioassay techniques for drug development**. Hardwood: Academic, 2001. 113 p.

RONQUIST, F. et al. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, Washington, v. 61, n. 3, p. 539-542, Feb. 2012.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Bethesda, v. 30, p. 507-512, 1974.

SHARMA, D. et al. Pigment extraction from fungus for textile dyeing. **Indian Journal of Fibre & Textile Research**, New Delhi, v. 37, n. 1, p. 68-73, Mar. 2012.

SHU, Y. Z. et al. Orevactaene, a novel binding inhibitor of HIV-1 rev protein to rev response element (RRE) from *Epicoccum nigrum* WC47880. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, New York, v. 7, n. 17, p. 2295-2298, Sept. 1997.

SHWAB, E. K.; KELLER, N. P. Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. **Mycological Research**, Cambridge, v. 122, n. 2, p. 225-230, Feb. 2008.

SOPTICĂ, F.; BAHRIM, G. Influence of light upon flavonoid yields in *Epicoccum nigrum* solid state fermentation. **Roumanian Biotechnological Letters**, Bucarest, v. 10, n. 5, p. 2387-2394, 2005.

TAMURA, K. et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, May 2011.

TEIXEIRA, M. F. S. et al. Amazonian biodiversity: pigments from *Aspergillus* and *Penicillium*-characterizations, antibacterial activities and their toxicities. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, Guntur, v. 6, n. 3, p. 300-311, 2012.

TERRY, B. J. et al. Inhibition of herpes-simplex virus type-1 DNA-polymerase by the natural product oosporein. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 45, p. 286-288, 1992.

VELMURUGAN, P. et al. Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 109, n. 4, p. 346-350, 2010.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: _____. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic, 1990. p. 315-322.

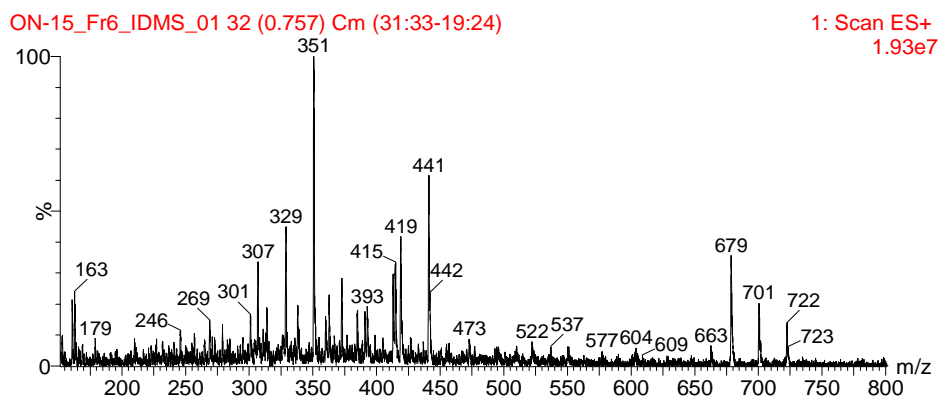
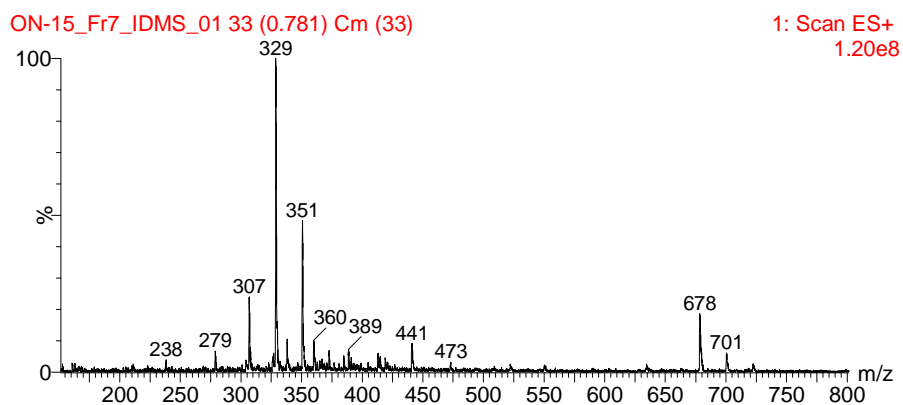
ZARE, R.; GAMS, W. A revision of *Verticillium* section Prostrata: IV., the genera *Lecanicillium* and *Simplicillium* gen. nov. **Nova Hedwigia**, Berlin, v. 73, n. 1/2, p. 1-50, Aug. 2001.

ZARE, R.; MOHAMMADI, A. H. *Lecanicillium aphanocladii*, a new species to the mycoflora of Iran and a new potential biological control agent against aphids transmitting viruses. **Rostaniha**, Tehran, v. 7, n. 1, p. 107-109, 2006.

APÊNDICES

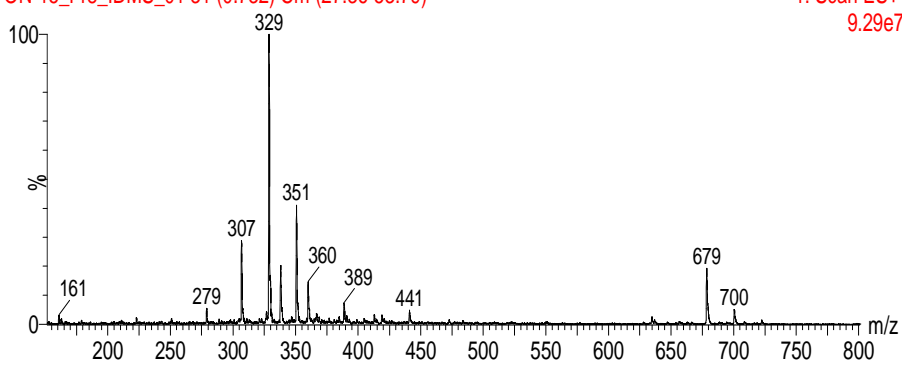
APÊNDICE A – Espectros de massas das frações 6, 7, 8 e 9 do isolado *L. aphanocladii* (ONI5), obtidas pelo fracionamento em coluna Sephadex

- Íons de m/z 307 ($M+H^+$) e 329 ($M+Na^+$) correspondem ao composto oosporeina

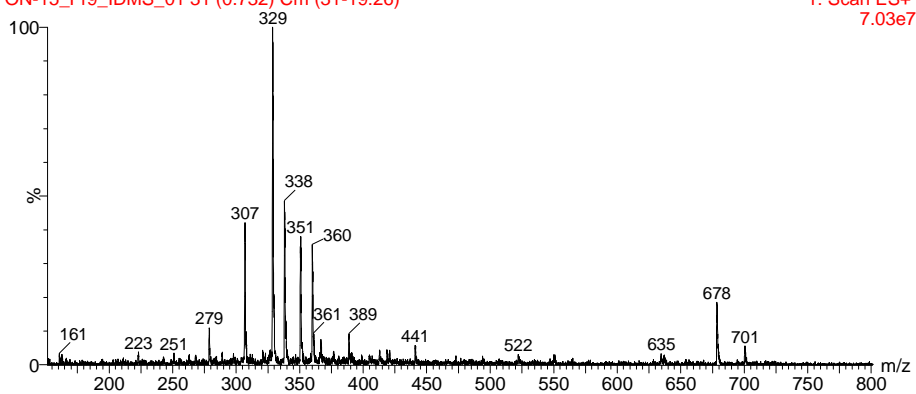
Fração 6**Fração 7**

Fração 8

ON-15_Fr8_IDMS_01 31 (0.732) Cm (27:36-53:79)

1: Scan ES+
9.29e7**Fração 9**

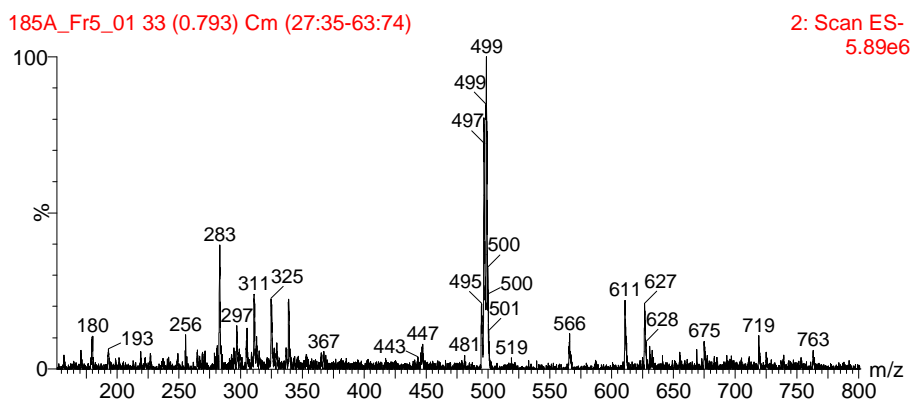
ON-15_Fr9_IDMS_01 31 (0.732) Cm (31-19:26)

1: Scan ES+
7.03e7

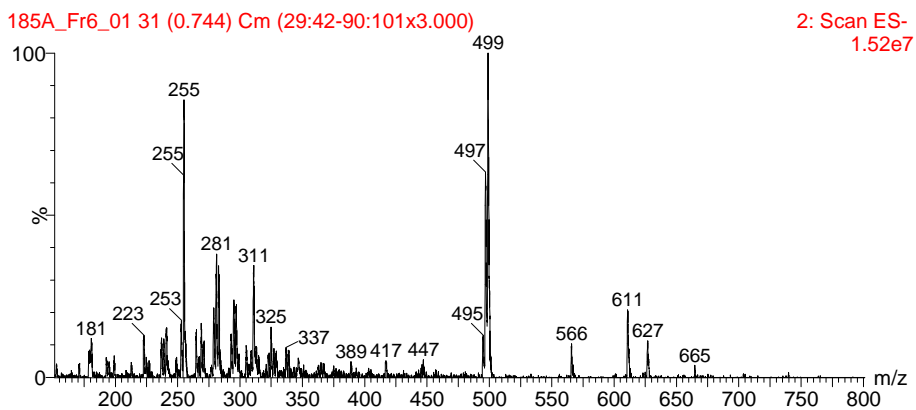
APÊNDICE B – Espectros de massas das frações 5, 6 e 7 do isolado *E. nigrum* (185A), obtidas pelo fracionamento em coluna Sephadex

- Íon de m/z 611 (M-H⁺) corresponde ao composto orevactaeno

Fração 5

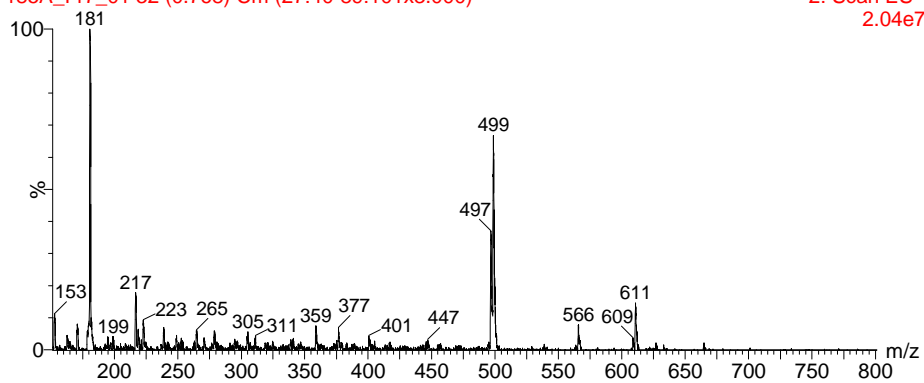


Fração 6



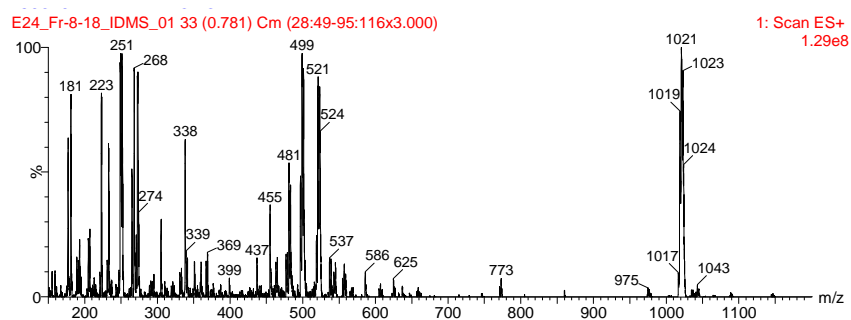
Fração 7

185A_Fr7_01 32 (0.768) Cm (27:40-89:101x3.000)

2: Scan ES-
2.04e7

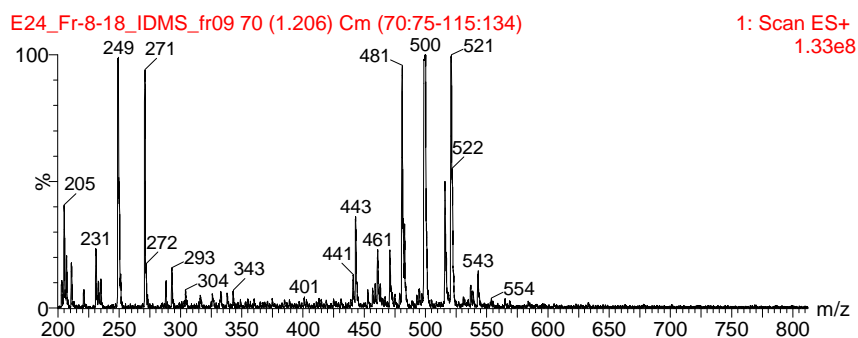
APÊNDICE C - Espectro de massas das frações 8-18, combinadas, do isolado *P. flavigenum* (E.2.4) obtida pelo fracionamento em coluna de Sílica gel

- Íons de m/z 499 ($M+H^+$) e 521 ($M+Na^+$) correspondem ao composto dihydrotrichodimerol

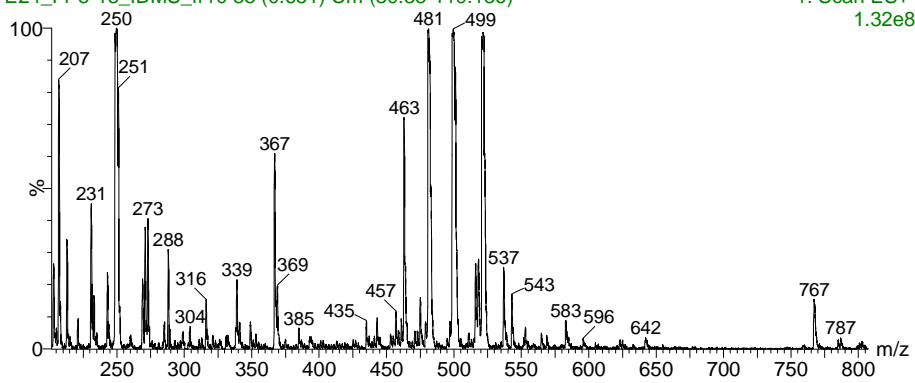


Espectro de massas da frações 9 e 10 do isolado *P. flavigenum* (E.2.4) obtida pelo fracionamento das frações 8-18 (combinadas) por HPLC

- Íons de m/z 499 ($M+H^+$) e 521 ($M+Na^+$) correspondem ao composto dihydrotrichodimerol

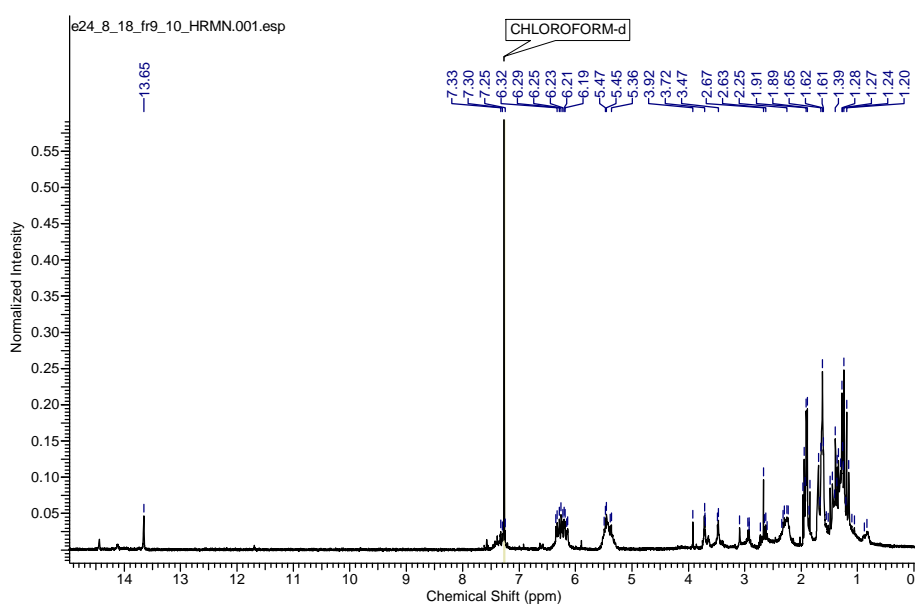


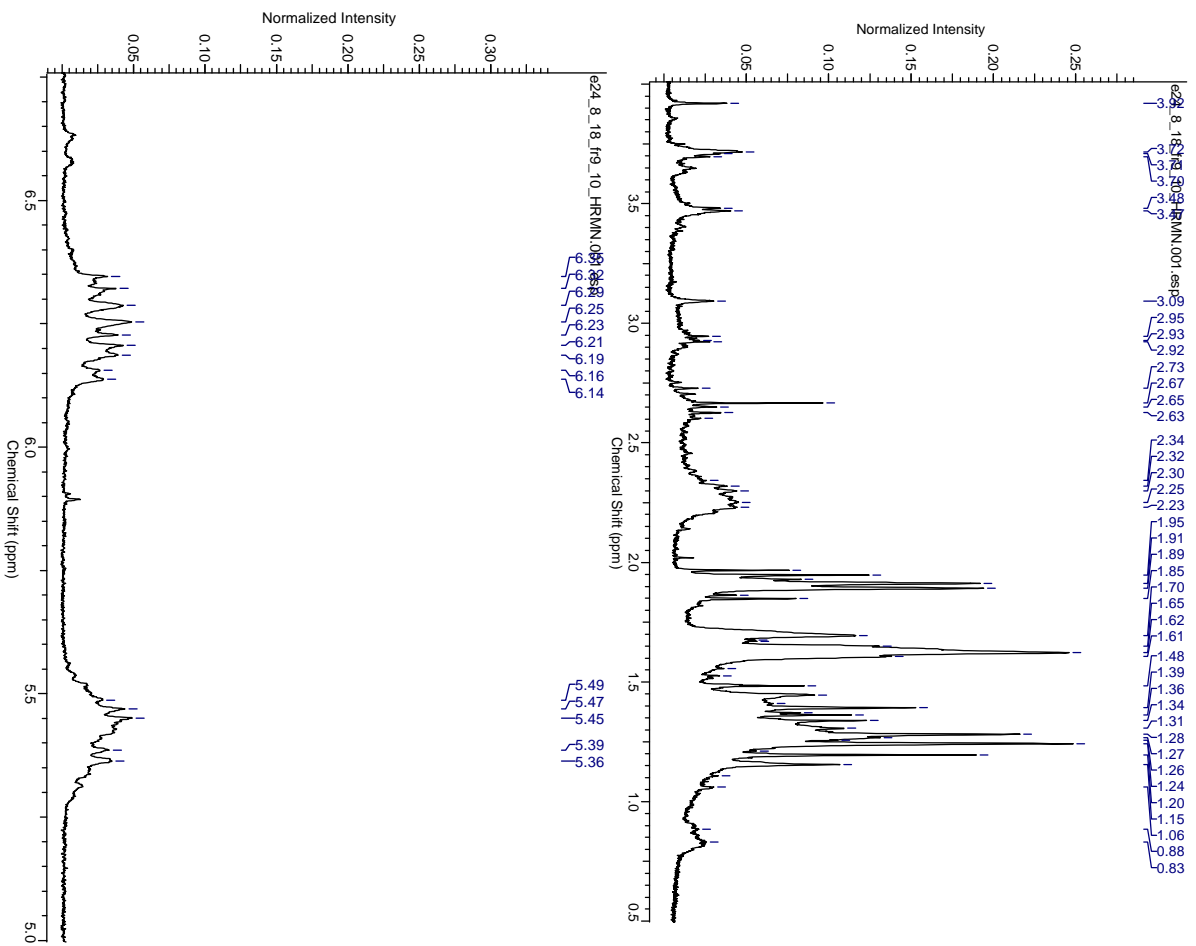
E24_Fr-8-18_IDMS_fr10 38 (0.651) Cm (30:38-119:136)

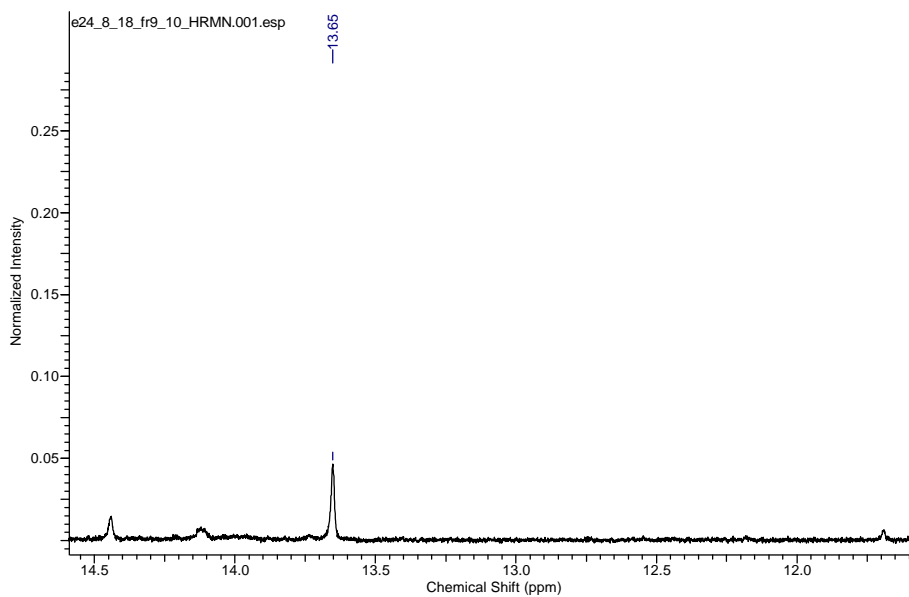
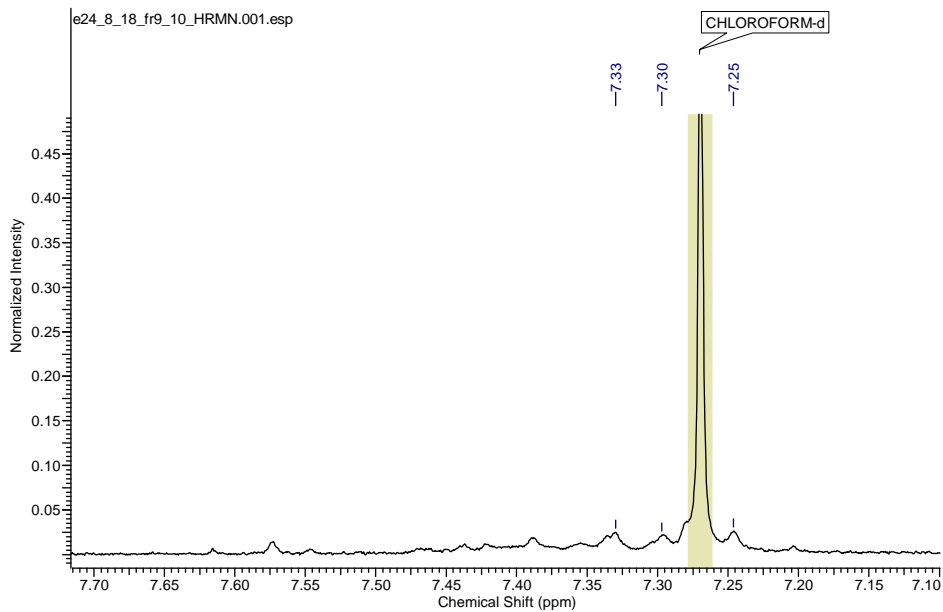
1: Scan ES+
1.32e8

APÊNDICE D - Espectro do ^1H RMN das frações 9 e 10 combinadas, do isolado *P. flavigenum* (E.2.4)

Os sinais com deslocamento químico de δ 5.49 (m), 6.14 (d), 6.21 (m), 6.29 (m) and 7.33 (dd) confirmam a estrutura do dihydrotrichodimerol.







ARTIGO 2

SPRAY DRYING OF PIGMENTS PRODUCED BY FILAMENTOUS FUNGI ISOLATED FROM BRAZILIAN CAVES

ABSTRACT

Spray drying is an encapsulation technique widely used in manufacturing of food, pharmaceuticals, cosmetics and pigments, as well as an alternative to avoid chemical and biological degradation of such products, turning them into particulate material. The aim of this study was to evaluate the influence of three adjuvants (maltodextrin, modified starch and gum arabic) in spray drying of pigments produced by filamentous fungi in submerged fermentation. The three evaluated adjuvants in the drying process resulted in fine powders with low moisture content and water activity. In addition, all adjuvants assured high color retention (> 70 %) during the drying process, besides the product recovery was >50%. Thus, these results indicate that the pigments produced by filamentous fungi can be spray-dried to facilitate their storage and marketing.

Keywords: Spray dryer, pigments, filamentous fungi, paper dyes.

INTRODUCTION

There is growing interest in replacing the synthetic dyes by dyes from natural sources, since these substances can cause toxic effects to health or the environment, possess mutagenic and carcinogenic potential and cause allergies (LOPES et al., 2013). The food, textile and paper industries have shown interest in using natural pigments, due to the high quality of the dyeing obtained with these pigments and because of the environmental concerns (FRINHANI; OLIVEIRA, 2006; GUPTA et al., 2013).

An alternative for the production of natural colorants is the biotechnological exploration of microorganisms, because their pigments have a predictable and controllable yield, and can be produced continuously. Among microorganisms, filamentous fungi have been considered as promising sources of dyes of commercial importance, because their pigments exhibit a wide range of color and are more soluble in water (MAPARI et al., 2005).

However, one of the disadvantages of using natural pigments is their lower stability. Thus, aiming to increase the stability of these colorants during storage and to facilitate their transport, processing and marketing, drying studies of natural colorants have been performed (ERSUS; YURDAGEL, 2007; GOULA; ADAMOPOULOS, 2005; OBÓN et al., 2009; QUECK; CHOK; SWEDLUND, 2007). One of the technologies used is the technique of spray drying, which is a method for drying the extracts, which transforms fluid material in dry particulate through the atomization of the fluid in a current of air of elevated temperature (VEGA; ROOS, 2006). This encapsulation technique is capable of producing fine powders and is widely used in food manufacturing, pharmaceuticals, cosmetics and colorants, since it decreases the water content and activity of these products, avoiding the risk of chemical or biological degradation (KANDANSAMY; SOMASUNDARAM, 2012).

Microencapsulation using spray drying is an economical method for the preservation of natural colorants by entrapping the colorant within a wall material or adjuvant (ERSUS; YURDAGEL, 2007). The adjuvant is designed to protect the core material against factors that may cause its deterioration, increasing its stability. Microencapsulation efficiency depends, among other factors, on the choice of adjuvant. The adjuvants commonly used for microencapsulation by spray drying are the carbohydrates (maltodextrins, modified starches, cellulose), proteins (whey protein, gelatine), and gums (arabic gums) (KANDANSAMY; SOMASUNDARAM, 2012). Thus, the objective of this study was to investigate the feasibility of spray drying of pigments produced by filamentous fungi using three adjuvants (maltodextrin, modified starch and arabic gum) and to evaluate the characteristics of the produced powder, including the residual humidity, water activity, color and product recovery.

MATERIAL AND METHODS

Culture conditions and recovery of colored medium

Three yellow pigment-producing fungi isolated of Brazilian caves and belonging to the Coleção Micológica de Lavras (CML) of the Phytopathology Department, Federal University of Lavras, Brazil, identified as *Aspergillus keveii* (CF292), *Penicillium flavigenum* (E.2.4) and *Epicoccum nigrum* (185A) were inoculated on Potato Dextrose Agar (PDA) medium (potatoes (200 g/L), glucose (20 g/L) and agar (20 g/L)) and were incubated at 25 °C for 7 days. After this period, 10 mycelial plugs of approx. 9 mm diameter from the culture grown on PDA were inoculated in 2000 mL Erlenmeyer flasks with a volume of 1000 mL of PD (Potato Dextrose) medium (potatoes (200 g/L) and glucose (20 g/L)). The incubation was carried out at 30 °C in the dark on a rotary shaker at

150 rpm for 7 days. Later, the media were filtered on Whatman paper No. 1 using vacuum pump and the filtrate was mixed with adjuvants for spray drying.

Microencapsulation by spray drying of pigments from filamentous fungi

For the drying of pigments from filamentous fungi, three adjuvants were evaluated: Maltodextrin (MOR REX 1910 Corn Products Brazil); modified starch (capsul - Corn Products Brazil) and Arabic gum (Filbregum B - Nexira Brazil). These adjuvants were mixed to the filtrated culture media at a ratio of 5% (w/v) and were kept under magnetic agitation for 2h for adjuvant incorporation. After this period, the drying formulations (filtrated culture media + adjuvant) were analyzed by a UV-Vis HP 8453 spectrophotometer operating with HP Chem-Station software, in order to quantify the color of each formulation before the drying process. Each drying formulation was scanned at 380–780 nm to find the wavelength of maximum absorption of each pigment.

For the drying process, we used a mini spray dryer SD-05 (manufactured by Lab-Plant, UK) consisting of a two-fluid type atomizing nozzle with internal mixing with a sprinkler nozzle diameter of 1mm and drying chamber of 500 mm in height and 215 mm in diameter. The drying parameters were: inlet temperature of the drying air (T_{ge}) 100 ° C, atomizing air pressure (P_{atm}) 2 kgf/cm², drying airflow rate (W_g) 60 m³/h, atomizing air flow (W_{ATM}) of 15 L/min and feed rate (W_{susp}) of 4 g/min.

Analysis of the spray-dried powder

After the drying process, the characteristics of the colored powder produced were evaluated, such as moisture content, water activity, color and product recovery as described below:

Moisture Content(%)

Moisture content was determined by the direct method, based on the quantitative reaction of water with volumetric solution known as Karl Fischer reagent using Titrino plus 870 Methrom equipment (FERNANDES, 2013). Approximately 100 mg of sample were used for each determination. Measurements were performed in triplicate and the results expressed as means.

Water activity (a_w)

Measurement of water activity (a_w) of the powders was determined in triplicate in Aqua Lab 4 VTE (Decagon, Devices) equipment at a temperature of 25 ° C, using the dew point sensor. It considered 0 for water free materials and 1 for water in liquid form.

Product recovery

The recovery of the dried powder was calculated by mass balance according to equation 1:

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Amount of recovered powder after drying}}{\text{Amount of dry matter fed into the system}} \times 100 \text{ (01)}$$

Color of the extract

Before and after drying, the colored filtrate and the produced powder, respectively, were analyzed by spectrophotometer to determine if there was a color loss due to the drying process. After drying, 5% (w/v) of each powder was dissolved in water and the analysis of the pigments in the powder was performed by measuring the absorbance by UV-Vis HP 8453 spectrophotometer operating with HP Chem-Station software at wavelength of maximum absorption of each pigment. Color change was represented in terms of pigment retention percentage

(%PR), which was defined as the ratio between the absorbance of the pigment before and after the drying process, as follows:

$$PR (\%) = \frac{\text{Absorbance after drying}}{\text{Absorbance before drying}} \times 100 \quad (02)$$

RESULTS AND DISCUSSION

Microencapsulation by spray drying of pigments from filamentous fungi

The pigments produced by filamentous fungi were dried using three adjuvants (maltodextrin, arabic gum and modified starch). After the drying process, we evaluated which adjuvants provide powders with the best characteristics in terms of moisture content (%), water activity, product recovery (%) and retention of pigments contained in these filtrates (%). The microencapsulation was performed in order to provide the pigments produced by filamentous fungi in powder form to be stored, marketed and used in a practical and effective manner, as has been done with natural pigments from other sources (OBÓN et al., 2009; QUECK; CHOK; SWEDLUND, 2007). The choice of adjuvant in the drying process has been the focus of many studies of microencapsulation of dyes, since it protects the core material from the various factors that may cause its deterioration, e.g. oxygen, light, moisture and enhances the stability of encapsulated colorants (KANDANSAMY; SOMASUNDARAM, 2012).

Spray drying of the filtrates resulted in fine powders with yellow color (Figure 1) and with moisture percentage less than 9.41% (Table 1). This is a very important feature, since powders with high moisture content can be favorable to the development of microorganisms (VEGA; ROSS, 2006). The addition of maltodextrin to extracts of *E. nigrum* 185A and *P. flavigenum* E.2.4

produced powders with the lowest moisture content (6.8% and 5.75%, respectively). However, for the powder of the *A. Keveii* CF292 isolate, the percentage of moisture was similar when maltodextrin (7.68%) and modified starch (7.57%) were used as adjuvants. The drying process should work with operating conditions and drying adjuvants that provide powder with lower moisture content. When the material is stored in non-airtight conditions, acceptable humidity values are between 6 and 7%, within which physical changes are rarely observed (LIST; SCHMIDT, 1989). Thus, except for the powder of the fungus *A. Keveii* (CF292) using arabic gum as adjuvant, which showed a moisture content at 9.41%, the other powders produced showed low moisture percentage, which could ensure the stability of the products for a longer shelf life.

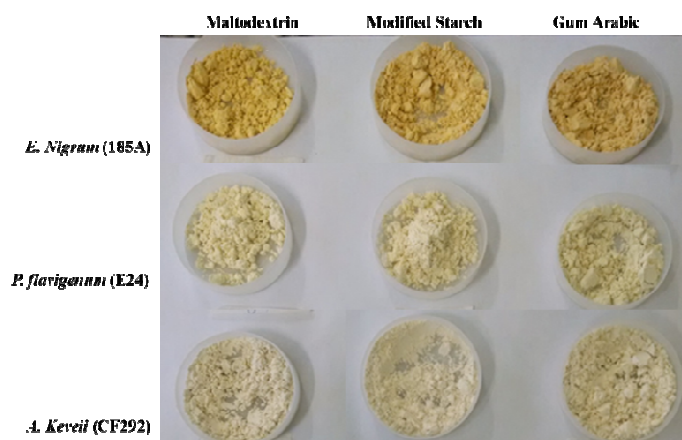


Figure 1 Powders obtained by spray drying process of the colored filtrate from filamentous fungi using three adjuvants

Another important feature of the powders obtained by spray drying is the water activity (a_w). The a_w value is different from moisture content, since it measures the availability of free water in the materials. In other words, it

corresponds to the water available for biochemical reactions, whereas the moisture content represents the water composition in a material. Thus, this is an important index for the spray drying process because it can greatly affect the shelf life of the produced powder (QUECK; CHOK; SWEDLUND, 2007). The three adjuvants tested in this study produced powders with water activity in the range of 0.269-0.317 (Table 1). This means that the produced powders are microbiologically stable, considering that values below 0.5, the growth of microorganisms is not common (BOBBIO; BOBBIO, 2001). Furthermore, the amount of free water available for biochemical reactions is reduced, and thus the shelf life of the powders will be longer (GOULA; ADAMOPOULOS, 2005).

Table 1 Characteristics of the dye powder produced by spray drying with different adjuvants

Strains	Adjuvants	Moisture (%)	Water activity (aw)	Recovery (%)	PR (%)
<i>E. nigrum</i> (185A)	Maltodextrin	6.8	0.296	53.76	70.23
	Modified starch	7.32	0.269	55.29	100
	Arabic gum	7.91	0.283	50.47	82.83
<i>A. Keveii</i> (CF292)	Maltodextrin	7.68	0.312	62.4	86.1
	Modified starch	7.57	0.286	59.5	86.21
	Arabic gum	9.41	0.317	56.3	100
<i>P. flavigenum</i> (E.2.4)	Maltodextrin	5.75	0.313	56.8	84.24
	Modified starch	6.19	0.280	59.8	89.98
	Arabic gum	6.11	0.238	53.5	87.93

We also evaluated the influence of adjuvant in the pigment retention and product recovery after the drying process. To evaluate the color retention, the absorbance of the filtrate was measured before and after the drying in the

wavelength of maximum absorption of the pigments produced by each strain (400 nm for *P. flavigenum* E24 and *A. keveii* CF292 and 430 nm for *E. nigrum* 185A). The change in color was represented in terms of pigment retention percentage (%PR) (Table 1).

The drying process of the *E. nigrum* (185A) filtrate with modified starch resulted in 100% color retention. Moreover, with this adjuvant the product recovery was higher (55.29%). For the filtrate of *A. Keveii* CF292, the use of gum arabic as drying adjuvant also kept 100% of the color, however the product recovery was higher with modified starch (62.4%). The color retention and recovery of the product of *P. flavigenum* (E.2.4) filtrate was similar for all the adjuvants tested, however it was slightly higher for the sample prepared with modified starch (89.98%, and 59.8%, respectively) (Table 1).

The results showed that all adjuvants used in this study can be used for drying of pigments produced by the filamentous fungi since they provided powders with low moisture content and water activity, which will ensure the stability of the product during storage. Additionally, these adjuvants ensured a product recovery higher than 50% and high pigment retention (> 70 %). Maltodextrins, modified starch and arabic gums are widely used in the spray drying process and have been reported as ensuring good quality powders (ERSUS; YURDAGEL, 2006; KANDANSAMY; SOMASUNDARAM, 2012; KRISHNAN; KSHIRSAGAR; SINGHAL, 2005; QUECK; CHOK; SWEDLUND, 2007).

CONCLUSIONS

This work demonstrated that pigments obtained by submerged fermentation of the filamentous fungi *E. nigrum* (185A), *P. flavigenum* (E.2.4) and *A. keveii* (CF292) can be dried by the spray drying technique. The addition of the three wall materials (maltodextrin, modified starch and gum arabic)

resulted in fine powders with low moisture content and water activity. Furthermore, all adjuvants studied assured high color retention and product recovery during the drying process. Thus, this study demonstrates the possibility of microencapsulation of the pigments produced by filamentous fungi by spray drying technique in order to facilitate storage and marketing of these dyes.

ACKNOWLEDGEMENTS: We acknowledge the financial support of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 151p.

ERSUS, S.; YURDAGEL, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 80, n. 3, p. 805-812, June 2007.

FERNANDES, M. R. V. **Obtenção, padronização e avaliação biológica de extratos secos a partir da espécie *Psidium guajava* L. pelo processo *spray drying***. 237 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

FRINHANI, E. M. D.; OLIVEIRA, R. C. The applicability of natural colorants in papermaking. **Tappi Journal**, Atlanta, v. 5, n. 7, p. 3-7, 2006.

GOULA, A. M.; ADAMOPOULOS, K. G. Stability of lycopene during spray drying of tomato pulp. **LWT - Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 38, n. 5, p. 479-487, Aug. 2005.

GUPTA, C. et al. Pigment production from *Trichoderma* spp. for dyeing of silk and wool. **International Journal of Science and Nature**, London, v. 4, n. 2, p. 351-355, 2013.

KANDANSAMY, K.; SOMASUNDARAM, P. D. Microencapsulation of colors by spray drying: a review. **International Journal of Food Engineering**, New York, v. 8, n. 2, p. 1-15, May 2012.

KRISHNAN, S.; KSHIRSAGAR, A.C.; SINGHAL, R.S. The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 62, n. 2, p. 309-315, May 2005.

LIST, P. H.; SCHMIDT, P.C. **Phytopharmaceutical technology**. Boca Raton: CRC, 1989. 374 p.

LOPES, F. C. et al. Pigment production by filamentous fungi on agro-industrial byproducts: an eco-friendly alternative. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, New York, v. 171, p. 616-625, July 2013.

MAPARI, S. A. S. et al. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 16, n. 2, p. 231-238, Apr. 2005.

OBÓN, J. M. et al. Production of a red–purple food colorant from *Opuntia stricta* fruits by spray drying and its application in food model systems. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 90, n. 4, p. 471-479, Feb. 2009.

QUECK, S. Y.; CHOK, N. K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. **Chemical Engineering and Processing**, Lausanne, v. 46, n. 5, p. 386-392, May 2007.

VEGA, C.; ROOS, Y. H. Spray-dried dairy and dairy-like emulsions compositional considerations. **American Dairy Science Association**, Champaign, v. 89, n. 2, p. 383-401, Feb. 2006.