



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E
CIÊNCIA DE ALIMENTOS



Área de Concentração: Ciência de Alimentos

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE VIDEIRAS (*Vitis*
Vinífera) COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS**

Autora: Luciana Amaral de Faria Silva

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Silmara Almeida de Carvalho

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Julho de 2019

LUCIANA AMARAL DE FARIA SILVA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE VIDEIRAS (*Vitis*
Vinífera) COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS**

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Silmara Almeida de Carvalho
Co-orientador: Prof. Dr. Leandro Santos Soares

ITAPETINGA
BAHIA – BRASIL
Julho de 2019

634.8
S581b Silva, Luciana Amaral de Faria.
Bioprospecção de fungos endofíticos isolados de videiras (*Vitis vinífera*) com potencial para produção de pigmentos. / Luciana Amaral de Faria Silva. – Itapetinga-BA: UESB, 2019.
135f.

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação da Prof^a. D. Sc. Silmara Almeida de Carvalho e coorientação do Prof. D. Sc. Leandro Santos Soares.

1. Videiras - Fungos filamentosos isolados - Pigmentos. 2. Pigmentos naturais. 3. Fungos endofíticos - *Arcopilus aureus*. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - Programa de Pós-Graduação de Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos, *Campus* de Itapetinga. II. Carvalho, Silmara Almeida de. III. Soares, Leandro Santos. IV. Título.

CDD(21): 634.8

Catálogo na Fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB 535-5ª Região
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para desdobramentos por Assunto:

1. Videiras - Fungos filamentosos isolados - Pigmentos
2. Pigmentos naturais
3. Fungos endofíticos - *Arcopilus aureus*



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos
Ciência de Alimentos

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE VIDEIRAS (*Vitis Vinifera*) COM POTECIAL PARA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS.

Autor (a): LUCIANA AMARAL DE FARIA SILVA

Orientador (a): Prof.^a Dr.^a Silmara Almeida de Carvalho

Coorientador (a): Prof. Dr. Leandro Soares Santos

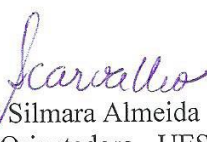
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **DOUTORA EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Leandro Soares Santos
UESB


Prof.^a Dr.^a Renata Cristina Ferreira Bonomo
UESB


Prof.^a Dr.^a Alexilda Oliveira de Souza
UESB


Prof.^a Dr.^a Priscilla Macedo Lima Andrade
Membro Externo - IFBA/PORTO SEGURO


Prof.^a Dr.^a Silmara Almeida de Carvalho
Orientadora - UESB
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 25 de julho de 2019.

A dedicatória da dissertação foi à Paulinha.

A da tese será a ela e à Sarinha.

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos meus anjos da guarda por me guiarem e ouvirem minhas preces pelos 107.000Km de estrada, por 4 anos.

Ao meu pai e à minha mãe por me oferecerem a oportunidade de estudo que foi a chave para minha realização profissional e, conseqüentemente, para minha autonomia e independência.

Ao Pedro por muitas vezes abrir mão de suas obrigações para que eu pudesse cumprir as minhas.

Às minhas filhas, agradeço por me fazerem sentir tão amada, e me desculpo por tantas horas de ausência.

À Elizânea, Brenda e Nalva por cuidarem das minha filhas enquanto estive fora.

À professora Silmara e ao professor Leandro pela orientação e co-orientação indispensáveis para a realização do meu trabalho.

Aos meus colegas do LPNBio, em especial à Mari e ao Daniel.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia pela concessão da bolsa de ajuda de custo UESB/SAEB.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Micro-organismos endofíticos	18
2.2 Fungos filamentosos endofíticos	19
2.3 Isolamento de fungos endofíticos de videiras	20
2.4 Diversidade de fungos endofíticos de videiras	21
2.5 Potencial biotecnológico de fungos endofíticos de videiras	26
2.6 <i>Arcopilus aureus (Chaetomium aureum)</i>	27
2.7 Pigmentos	27
2.8 Corante/pigmento na indústria de alimentos	29
2.9 Pigmentos naturais produzidos por micro-organismos	30
2.10 Pigmentos produzidos por fungos – Classificação	32
2.11 Pigmentos policetídeos produzidos por fungos	33
2.11.1 Pigmentos do tipo azafilonas	35
2.11.2 Pigmentos do tipo quinonas	38
2.12 Cochlioquinonas	40
2.13 Riboflavina produzida por fungos	44
2.14 Fontes de carbono e nitrogênio e pH inicial e a influência sobre a produção de pigmentos policetídeos	47
2.15 Luminosidade e a influência sobre a produção de pigmentos policetídeos	51
2.16 Otimização da produção de pigmentos policetídeos	52
2.17 Produção paralela de pigmentos e micotoxinas	53
2.18 Elucidação das estruturas moleculares de pigmentos	54
2.19 Estabilidade de pigmentos microbianos	56
3 OBJETIVOS	57
3.1 Objetivo geral	57
3.2 Objetivos específicos	57
CAPÍTULO 1	58
ARTIGO 1	59
Resumo	60
1. Introdução	61
2. Materiais e métodos	62
2.1 Coleta de amostras: origem dos fungos endofíticos	62
2.2 Isolamento e purificação dos fungos endofíticos	63
2.3 Seleção da melhor cepa produtora de pigmento	63
2.4 Identificação genética	64
2.5 Produção e caracterização parcial do pigmento amarelo referência	64
2.5.1 Caracterização por espectroscopia Uv-vis	64
2.5.2 Caracterização por FT-IR	64
2.5.3 Caracterização por HPLC	65
2.5.4 Separação e identificação por UHPLC-DAD-ESI-QTOF-MS	65
2.6 Quantificação de Riboflavina por HPLC	65
2.7 Separação e identificação por UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS	65

2.8 Purificação parcial do pigmento amarelo referência.....	66
2.9 Avaliação da estabilidade do pigmento amarelo referência.....	66
3. Resultados e discussão.....	67
3.1 Fungos endofíticos isolados de videiras.....	67
3.2 Seleção e identificação da cepa produtora de pigmento.....	67
3.3 Caracterização parcial do pigmento amarelo referência.....	68
3.4 Separação e caracterização por UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS.....	70
3.5 Purificação parcial do pigmento amarelo referência.....	71
3.6 Estabilidade do pigmento amarelo referência.....	73
4. Conclusões.....	77
Referências.....	77
CAPÍTULO 2.....	83
ARTIGO 2.....	84
Resumo.....	85
1 Introdução.....	86
2 Materiais e métodos.....	87
2.1 Micro-organismo e preparação do inóculo.....	87
2.2 Cultivo submerso estacionário.....	87
2.3 Influência da fonte de carbono e fonte de nitrogênio sobre a produção de pigmentos.....	87
2.4 Influência do pH inicial sobre a produção de pigmentos.....	88
2.5 Perfil cromatográfico da solução do pigmento amarelo referência.....	88
2.6 Perfil cromatográfico dos pigmentos produzidos a partir das melhores fontes de carbono e nitrogênio.....	88
2.7 Produção de pigmento a partir da melhor fonte de carbono, nitrogênio e pH inicial.....	89
2.8 Análise por HPLC.....	89
2.9 DCCR para 2 variáveis independentes sobre a produção de pigmento.....	89
2.10 Análise estatística.....	90
3 Resultados e discussão.....	90
3.1 Produção do pigmento amarelo referência.....	90
3.2 Influência das fontes de carbono e nitrogênio e pH inicial.....	90
3.3 Perfis cromatográficos.....	96
3.4 Produção de pigmento a partir da lactose, peptona de caseína e pH inicial 5.....	98
3.5 DCCR para 2 variáveis independentes sobre a produção de pigmento.....	99
4 Conclusões.....	102
Referências.....	102
4 CONCLUSÕES.....	107
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	107
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108
ANEXO 1 - Fotos relacionadas ao isolamento e seleção de fungos filamentosos endofíticos produtores de pigmentos.....	125
ANEXO 2 - Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) para o experimento de avaliação da estabilidade do pigmento de <i>A. aureus</i> (Artigo 1) – Temperatura e pH.....	128
ANEXO 3 - Médias, desvio-padrão, ANOVA e Teste de Tukey para a produção de	

pigmento (Artigo 2).....	130
ANEXO 4 - ARTIGO 3	133

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relações entre vias biossintéticas do metabolismo primário e secundário. Síntese de pigmentos policetídeos ocorrem pela via dos policetídeos (1). Quinonas também podem ser sintetizadas pela via do chiquimato (2).....	34
Figura 2. Síntese de azafilonas e hidroxiantraquinona pela via acetato-mevalonato em fungos - ciclização de cadeia β policetídeo.....	35
Figura 3. Estruturas químicas dos pigmentos produzidos por <i>Monascus</i> sp.: Monascina e Ankaflavina (Amarelos), Rubropunctatina e Monascorrubrina (laranjas), Rubropunctamina e Monascorubramina (Vermelhos).....	36
Figura 4. Pigmentos análogos ao de <i>Monascus</i> (MLP): (a) produzido por <i>Penicillium</i> sp. (b) produzido por <i>Talaromyces</i> sp.....	37
Figura 5. Estrutura química do pigmento esclerotiorina (a) produzida por <i>P. sclerotiotum</i> e (b) esclerotioramina.....	38
Figura 6. Estrutura química da antraquinona.....	39
Figura 7. Estrutura do Natural Red™, uma antraquinona.	39
Figura 8. Estruturas de hidroxiantraquinonas.....	39
Figura 9. Estruturas moleculares de naftoquinonas. Estrutura do pigmento vermelho Bicaverina de espécies de <i>Fusarium</i> (a). Estrutura do pigmento roxo Viopurpurina de espécies de <i>Aspergillus</i> (b).....	40
Figura 10. Estrutura molecular da riboflavina, FMN e FAD.....	44
Figura 11. Rota metabólica para a síntese de riboflavina por <i>A. gossypii</i>	46
ARTIGO 1	
Figura 1. Cepas produtoras de pigmentos em PDA isoladas de videiras (<i>V. vinifera</i>) e pigmentos produzidos e extraídos com solventes de diferentes polaridades (hexano, acetato de etila e butanol).....	68
Figura 2. Árvore de distância filogenética a partir do gene 18S rRNA. Construída com o auxílio do software MEGA 7.0 pelo método de Neighbor-Joining com parâmetro Jukes-Cantor e Bootstrap de 1000 réplicas. UESB-16 = Cepa 43.....	68
Figura 3. Cromatograma da solução do pigmento amarelo referência (300mg/mL) obtido por HPLC (450nm) com coluna C18 de 15cm (item 2.5.3). Pigmento produzido a partir do cultivo em meio Czapeck (sacarose, nitrato de sódio e pH 5) por <i>A. aureus</i>	69
Figura 4. Espectro FT-IR do resíduo sólido da fração acetato de etila do pigmento amarelo referência produzido por <i>A. aureus</i>	70
Figura 5. Detecção de riboflavina por cromatografia com detector de fluorescência. Excitação:	

emissão (470-530). Comparação entre os tempos de retenção da riboflavina padrão e da riboflavina produzida por <i>A. aureus</i> (a) Cromatograma da solução padrão de riboflavina. (b) Cromatograma da solução do pigmento amarelo de referência (300mg/mL).....	71
Figura 6. Cromatograma da solução do pigmento amarelo referência (300mg/mL) obtido por HPLC (450nm) (item 2.5.3), com coluna C18 de 25cm. Pigmento produzido a partir do cultivo em meio Czapeck (sacarose, nitrato de sódio e pH 5) por <i>A. aureus</i>	71
Figura 7. ESI-MS no modo positivo mostrando os principais fragmentos gerados pelo componente majoritário do pigmento amarelo referência (cochlioquinol II), o íon molecular $[M+H]^+$ m/z 550.23 e a estrutura da molécula de cochlioquinol II.....	72
Figura 8. Aspectos das resinas hidrofílicas e de troca iônica e dos sobrenadantes das etapas 1, 2 e 3 do processo de purificação parcial do pigmento amarelo referência produzido por <i>A. aureus</i>	74
Figura 9. Cromatogramas dos sobrenadantes da etapa 2 (em metanol) obtidos por HPLC (450nm). Pigmento produzido a partir do cultivo do meio controle (sacarose, nitrato de sódio e pH 5) por <i>A. aureus</i>	75
ARTIGO 2	
Figura 1. Aspectos dos extratos brutos, da fração acetato de etila, e média do pH final após cultivo de <i>A. aureus</i> a partir de: diferentes fontes de (a) carbono, (b) nitrogênio e (c) diferentes valores de pH inicial. Figuras em destaque correspondem ao extrato bruto, fração acetato de etila, e média do pH final após cultivo de <i>A. aureus</i> no meio controle (pigmento amarelo referência).....	91
Figura 2. Varredura da fração acetato de etila do pigmento de <i>A. aureus</i> (a) Espectros de absorção do pigmento obtido a partir do cultivo em meio controle: sacarose, nitrato de sódio e pH inicial 5 (pigmento amarelo referência). (b) Espectros de absorção dos pigmentos produzidos em diferentes fontes de carbono com nitrato de sódio. (c) Espectros de absorção dos pigmentos produzidos em diferentes fontes de nitrogênio com sacarose.....	93
Figura 3. Cromatogramas obtidos por HPLC (450nm). (i) Pigmento produzido por <i>A. aureus</i> , a partir da fermentação do meio Czapeck (nitrato de sódio, sacarose e pH 5): (a) solução do pigmento amarelo referência. (ii) Pigmentos produzidos a partir da fermentação por <i>A. aureus</i> do meio Czapeck modificado: (b) PX – solução de pigmento xilose, (c) PL – solução de pigmento lactose, (d) PPC – solução de pigmento peptona de caseína, (e) PEM solução de pigmento extrato de malte, (f) PEL – solução de pigmento extrato de levedura.....	97
Figura 4. Produção de pigmento por <i>A. aureus</i> a partir das melhores fontes de carbono e nitrogênio. (a) Efeito da melhor fonte de carbono (lactose), da melhor fonte de nitrogênio	

(peptona de caseína) e da associação lactose, peptona de caseína e pH inicial 5, sobre a produção de pigmento (leitura da fração acetato de etila) (b) Espectro de absorção da fração acetato de etila do pigmento produzido a partir da associação lactose, peptona de caseína e pH inicial 5 (c) Cromatograma da solução de pigmento (300µg/mL) (450nm) produzido a partir da associação lactose, peptona de caseína e pH inicial 5..... 99

Figura 5. Gráfico de superfície de resposta e diagrama de contorno (a) Superfície de resposta demonstrando o efeito da concentração de sacarose e peptona de caseína sobre a produção de pigmento (b) Diagramas de contorno para produção de pigmento..... 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Trabalhos relacionados ao isolamento de fungos filamentosos endofíticos de Videiras e de seus ecossistemas. Dados sobre a localização do vinhedo, amostras usadas para isolamento, número de cepas isoladas, gêneros e espécies isoladas.....	24
Tabela 2. Radiação absorvida e cor complementar transmitida das cores da região visível do espectro (400-780nm).....	29
Tabela 3. Pigmentos naturais de alimentos e suas fontes.....	30
Tabela 4. Produção de pigmentos por micro-organismos.....	32
Tabela 5. Relação de cochlioquinonas e derivados isolados, caracterizados e identificados.....	42
ARTIGO 2	
Tabela 1. Valores experimentais utilizados no DCCR para as duas variáveis independentes....	89
Tabela 2. Efeitos de diferentes fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção de pigmento amarelo por <i>A. aureus</i> em cultivo submerso estático, por 15 dias a 30°C.....	94
Tabela 3. Variáveis com seus níveis codificados e concentrações usados no DCCR e a resposta produção de pigmento (U_{450}).....	100
Tabela 4. Coeficientes de regressão da resposta produção de pigmento (U_{450}) (Y).....	100

RESUMO GERAL

Fungos filamentosos estão entre as fontes não convencionais de pigmentos naturais e podem ser isolados de diferentes fontes como as plantas, nos quais se enquadram os fungos endofíticos. O objetivo desse trabalho foi isolar fungos filamentosos endofíticos de videiras (*Vitis vinifera*) em três vinhedos, no município de Diamantina, Minas Gerais, visando a obtenção de pigmentos com potencial aplicação na indústria de alimentos. Para isso, fungos endofíticos foram isolados a partir de folhas, cascas de caule, xilemas e raízes de videiras. Uma cepa foi selecionada para produção de pigmento, que foi caracterizado por espectroscopia UV-Vis, FT-IR e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Cromatografia líquida de ultra performance com detector com arranjo de diodos (UPLC/PDA) acoplada à espectroscopia de massa do tipo quadrupolo tempo de voo com ionização por eletrospray (ESI/QTOF/MS) foi utilizada como técnica para separar e identificar componentes do pigmento. A estabilidade do pigmento foi testada quanto à variação de pH e temperatura. Experimentos de purificação não convencionais foram realizados. A cepa selecionada também foi avaliada quanto à produção de pigmento em diferentes condições de cultivo. As concentrações das melhores fontes de carbono e nitrogênio foram estudadas em Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), para otimizar a produção de pigmento. Como resultado, 48 cepas de fungos endofíticos foram isolados e 15 apresentaram-se como produtoras de pigmentos. Pela primeira vez, a cepa identificada como *Arcopilus aureus* foi selecionada como fonte potencial para produção de pigmento amarelo com características importantes para futura aplicação industrial. A partir da caracterização e da análise em UPLC/PDA/ESI/QTOF/MS foi possível verificar que o pigmento amarelo possui os componentes cochliquinol II, como composto majoritário, e riboflavina. A purificação parcial do pigmento foi possível empregando um método alternativo, com resinas de troca iônica e hidrofílica, associado à separação por HPLC. Modelos quadráticos explicaram o comportamento do pigmento frente às variações de temperatura e pH. O pigmento estudado manteve-se relativamente estável frente à variação de temperatura e apresentou aumento na intensidade da cor com a redução do pH. Algumas fontes de carbono e nitrogênio testadas favoreceram a produção de pigmentos diferentes do pigmento amarelo referência. *A. aureus* foi capaz de produzi-lo apenas a partir das fontes de carbono, sacarose, xilose, lactose, e das fontes de nitrogênio, nitrato de sódio, peptona de caseína e extrato de malte. Nesse trabalho, a associação sacarose e peptona de caseína, em pH 5, foi a combinação responsável pela maior produção de pigmento amarelo por *A. aureus*. Foi possível obter um modelo polinomial de segunda ordem, a partir dos resultados alcançados com o experimento DCCR, que demonstrou a dependência entre a concentração dos componentes do meio (sacarose e peptona de caseína) sobre a produção de pigmento. O aumento da concentração de peptona de caseína proporcionou o aumento da produção. Entretanto, as faixas extremas de concentração de

sacarose avaliadas reduziram produção de pigmento amarelo. Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que o endofítico *A. aureus* apresentou-se como fonte potencial de pigmento amarelo natural não convencional.

Palavras-chave: *Arcopilus aureus*. Caracterização. Purificação parcial. Estabilidade. Planejamento Experimental. Cochlioquinol II. Riboflavina.

ABSTRACT

Filamentous fungi are among the non-conventional sources of natural pigments and can be isolated from different environmental sources such as plants, in which are the endophytic filamentous fungi. The objective of this work was to isolate endophytic filamentous fungi from grapevines (*Vitis vinifera*) in three vineyards, in the city of Diamantina, Minas Gerais, to obtain pigments with potential application in the food industry. For this, endophytic fungi were isolated from leaves, stem bark, xylem and roots. One strain was selected for pigment production which was characterized by UV-Vis spectroscopy, FT-IR and high performance liquid chromatography (HPLC). Ultra performance liquid chromatography with diode array detector (UPLC/PAD) coupled to quadrupole time of flight mass spectroscopy with electrospray ionization (ESI/QTOF/MS) was used as a technique to separate and identify pigment components. The stability of the pigment was tested for pH and temperature variation. Non-conventional purification experiments were performed. The selected strain was also evaluated for pigment production under different culture conditions. The concentrations of the best carbon and nitrogen sources were studied in Central Composite Rotational Design (CCRD) to optimize pigment production. As a result, 48 endophytic fungal strains were isolated and 15 were pigment producing. For the first time, the strain identified as *Arcopilus aureus* was selected as a potential source for yellow pigment production with important characteristics for future industrial application. From the characterization and analysis in UPLC/PDA/ESI/QTOF/MS it was possible to obtain evidence that the yellow pigment has the major component cochliquinol II and riboflavin. Partial purification of the pigment was possible using an alternative method, with ionic and hydrophilic exchange resins, associated with HPLC separation. Quadratic models explain the behavior of the pigment in face of variations in temperature and pH. The studied pigment remained relatively stable in the face of temperature variation and showed a color intensity increase with a pH reduction. Some carbon and nitrogen sources tested favor the production of pigments other than the reference yellow pigment. *A. aureus* was able to produce it only from sources of carbon, sucrose, xylose, lactose, and sources of nitrogen, sodium nitrate, casein peptone and malt extract. In this work, the association sucrose and peptone of casein at pH 5 was the combination responsible for the greater production of yellow pigment by *A. aureus*. From the results obtained with the CCRD experiment, it was possible to obtain a second-order polynomial model. CCDR demonstrated the dependence between the concentration of the components of the medium (sucrose and casein peptone) on pigment production. The increase in casein peptone concentration increased production. However, the extreme sucrose concentration ranges evaluated reduced yellow pigment production. From the results obtained, it can be concluded that the endophytic *A. aureus* presented as potential source of non-conventional natural yellow pigment.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Pigmentos são componentes importantes para a indústria alimentícia capazes de tornar os alimentos mais atraentes, aumentando a aceitabilidade pelo consumidor (HILARES et al., 2018). Dependendo do processamento e das condições de armazenamento, a cor do alimento pode ser perdida ou alterada, sendo frequentemente necessária a adição de pigmentos (sintéticos ou naturais) no intuito de manter a cor característica (AHMAD & PANDA, 2014; CELESTINO et al., 2014; DUFOSSÉ et al., 2014; LOPES et al., 2013). Estima-se que U\$ 27,5 bilhões em pigmentos alimentícios foram comercializados no ano de 2018, e os pigmentos naturais representaram 31% desse total (LV et al., 2017).

Muitos pigmentos sintéticos têm recebido críticas acerca de seus potenciais mutagênicos e carcinogênicos, levando à restrição do uso de alguns deles ao longo dos anos, além de poderem estar relacionados a desordens alérgicas, de déficit de atenção e hiperatividade em crianças (ARNOLD et al., 2012). Paralelamente, tem ocorrido um aumento da preocupação dos consumidores quanto à segurança dos pigmentos alimentícios sintéticos, aliado à ideia dos benefícios à saúde que os pigmentos de fontes naturais podem trazer (AHMAD & PANDA, 2014; CARO et al., 2012; RODRIGUEZ-AMAYA, 2016).

Portanto, existe um nicho no mercado alimentício, no qual os consumidores estão dispostos a pagar mais caro por pigmentos naturais com características de um “ingrediente natural saudável”. Esse fato pode ser ilustrado pelo sucesso de marketing de pigmentos naturais não convencionais derivados de microalgas, como b-caroteno, luteína e astaxantina, e convencionais derivados de plantas (DUFOSSÉ, 2017).

Dentre as fontes não convencionais de pigmentos naturais, estão os fungos filamentosos que são reconhecidos por produzirem inúmeras classes de pigmentos, tais como carotenoides, azafilonas, antraquinonas, melanina e flavinas (DUFOSSÉ, 2014). A produção de pigmentos naturais por fungos filamentosos é uma opção atrativa devido ao seu crescimento relativamente rápido, ao alto rendimento em pigmentos usando condições de cultivo otimizadas e à possibilidade de usar substratos baratos, como os resíduos agroindustriais (DUFOSSÉ, 2006; MAPARI et al., 2005). Além disso, o cultivo de fungos filamentosos não depende de condições climáticas e seus pigmentos são mais estáveis às variações de pH e temperatura, quando comparados aos pigmentos naturais de plantas (NIGAM & LUKE, 2016).

Esses micro-organismos podem ser isolados de diferentes fontes ambientais como solo, água, animais ou plantas, e pesquisas recentes têm demonstrado a possibilidade de descobrir cepas produtoras de pigmentos de fontes inexploradas (LAURENCE et al., 2014; REEBA et al., 2015). Diante da crescente necessidade de pigmentos de origem natural, o estudo de fungos filamentosos

endofíticos pode possibilitar o conhecimento de novas moléculas de pigmentos ou de pigmentos já conhecidos, porém produzidos por novas espécies.

Fungos endofíticos são micro-organismos que colonizam os tecidos internos das plantas, sem causar algum dano imediato ao seu hospedeiro. Nas interações simbióticas endofítico/planta, os micro-organismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir vantagens à planta como a diminuição do ataque herbívoro e de insetos, controle de outros micro-organismos e aumento da tolerância às condições de estresse (BUDHIRAJA et al., 2013; SOUZA & SANTOS, 2017).

As videiras estão entre uma das espécies de plantas mais importantes, entre aquelas produtoras de frutas, devido às uvas que são a base da fabricação de vinhos (CUEVA et al., 2011). A presença de fungos filamentosos endofíticos em videiras pode ser influenciada por diferentes fatores, tais como o período de colheita, variedades de uva, área geográfica, condições climáticas e as práticas vitícolas aplicadas (SERRA et al., 2006). A exploração da diversidade microbiana a partir de videiras e do ecossistema de vinhedos tem sido realizada ao longo dos anos (SETATI et al., 2012). Entretanto, os fungos endofíticos de videiras são um grupo de micro-organismos muito pouco explorados, especialmente quando se trata de sua aplicação biotecnológica (RODRIGUEZ et al., 2016). Alguns estudos abordaram efetivamente o potencial biotecnológico dos fungos endofíticos de videiras, buscando por endofíticos capazes de inibirem o crescimento de bactérias causadoras de doenças transmitidas por alimentos (CUEVA et al., 2011) e pela ação do endofítico *B. bassiana* contra a infestação por insetos, como a cochonilha (*Planococcus ficus*) e a cigarrinha da uva (*Empoasca vitis*) (RONDOT & REINEKE, 2018). Entretanto, na literatura pesquisada, estudos sobre a produção de pigmentos por fungos endofíticos isolados de videiras não foram reportados até o momento.

De um modo geral, na área de Ciência de Alimentos, as principais pesquisas relacionadas a pigmentos naturais microbianos abordam: a composição e a influência de fatores sobre a produção, a busca por novas fontes produtoras potenciais, os efeitos do processamento sobre o pigmento, o aumento da estabilidade e da biodisponibilidade, e os benefícios à saúde (RODRIGUEZ-AMAYA, 2016 e 2018). Enquanto que a produção comercial para a indústria alimentícia tem se voltado para as técnicas de fermentação, modificações químicas, produção a partir de resíduos agroindustriais e modificação genética (GOMES & TAKAHASHI, 2016; LOPES et al., 2013; ORAK et al., 2018). Além disso, o aumento da produção em larga escala de pigmento paralelamente à redução de custos também tem recebido atenção, sendo aplicados delineamentos estatísticos, técnicas de otimização, e análises por superfície de resposta (NIGAM & LUKE, 2016). Entretanto, a utilização do pigmento microbiano em processos industriais requer, antes de mais nada, sua caracterização química e biológica. Para isso, empregam-se ferramentas como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massas (MS), entre outras. Essas técnicas

associadas ao conhecimento prévio da taxonomia do micro-organismo podem permitir a elucidação das estruturas dos pigmentos, bem como de eventuais metabólitos tóxicos, ajudando assim na seleção do micro-organismo (MAPARI et al., 2009). Portanto, fica claro que há um longo caminho entre a descoberta de um fungo filamentoso produtor de pigmento e a aplicação efetiva em alimentos.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi isolar fungos filamentosos endofíticos de videiras (*Vitis vinífera*) em três vinhedos, no município de Diamantina (mesorregião do Jequitinhonha, de Minas Gerais), visando a obtenção de pigmentos com potencial aplicação na indústria de alimentos.

A tese foi organizada em dois capítulos. No primeiro capítulo, está apresentado o artigo com o título “Pigmentos naturais bioativos de cor amarela produzidos pelo fungo endofítico *Arcopilus aureus* isolado de videira (*Vitis vinífera*)”. Algumas fotos obtidas durante o isolamento de fungos endofíticos estão apresentadas no Anexo 1, uma vez que não foram inseridas no artigo, mas que são importantes para ilustrar essa tese. No segundo capítulo, está o artigo intitulado “Condição do cultivo submerso para produção de pigmento natural alternativo pelo fungo endofítico *Arcopilus aureus*”. O terceiro artigo intitulado “Fungos endofíticos isolados de videiras: fontes potenciais para exploração biotecnológica” foi anexado ao trabalho (Anexo 4).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Micro-organismos endofíticos

Há muito tempo, sabe-se sobre interações entre micro-organismos e plantas, embora acreditava-se que tais interações levassem a lesões nos tecidos vegetais. Entretanto, nos últimos anos, tem sido verificada e estudada a presença de micro-organismos no interior de tecidos sadios de vegetais (BUDHIRAJA et al., 2013; CAMPOS, 2009; CUEVA et al., 2011; EMBRAPA, 2005; FERREIRA et al., 2015; ROMANO, 2015; TOGUEO et al., 2017).

Os micro-organismos endofíticos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX. Entretanto, apenas em 1886 foi delineada a distinção entre eles e os patógenos de plantas. A partir daí várias definições foram colocadas por diferentes autores, e muitos deles consideravam os endofíticos como “assintomáticos”, ou seja, não produziam efeitos benéficos ou prejudiciais aos hospedeiros. Por esse motivo, os endofíticos permaneceram relativamente distantes do interesse de pesquisadores até a década de 70, quando começaram a despertar a atenção novamente por demonstrarem propriedades de interesse: conferir proteção contra insetos e pragas, outros micro-organismos patogênicos e contra herbívoros (AZEREDO, 1998; CAMPOS, 2009; TOGUEO et al., 2017).

Segundo Petrini (1991), endofíticos são micro-organismos que colonizam os tecidos de plantas durante, pelo menos, uma parte de seu ciclo de vida sem causar sintomas visíveis de doença,

e podem ser encontrados no tecido da planta hospedeira em diferentes órgãos, tais como folhas, raízes, caules, cascas, flores, frutas e sementes (TOGHUEO et al. 2017). Diante dessa definição, os endofíticos se distinguem dos micro-organismos fitopatógenos e dos epifíticos, pois os fitopatógenos são causadores de doenças nas plantas, enquanto que os epifíticos vivem na superfície dos órgão e tecidos vegetais (AZEREDO, 1998; CAMPOS, 2009; EMBRAPA, 2005). Essas distinções têm finalidade apenas didática, pois pode haver sobreposição entre esses grupos, de forma que um micro-organismo endofítico pode se tornar um potencial fitopatógeno, dependendo do estado fisiológico da planta e das condições ambientais (AZEREDO, 1998).

Os endofíticos podem ser encontrados tanto nas partes aéreas das plantas, quanto nas raízes. De um modo geral, aberturas naturais e feridas são formas de penetração dos endofíticos nas plantas. As raízes são a principal porta de entrada, uma vez que o surgimento de raízes secundárias laterais gera “feridas”, que servem de entrada para micro-organismos, além de que o próprio crescimento da raiz (penetração no solo) gera abrasões. Estômatos e hidatódios, que são aberturas naturais, aberturas causadas por insetos e por fungos patogênicos são também porta de entrada de micro-organismos. A colheita, que pode causar feridas e a entrada ativa de micro-organismos através da produção de enzimas também estão relacionadas com a penetração de endofíticos. Há ainda aqueles transmitidos por sementes e por propagação vegetativa, passando de uma planta para a outra através das estruturas utilizadas. Após a penetração na planta, os micro-organismos endofíticos se movimentam atingindo diferentes órgãos e tecidos (AZEREDO, 1998; EMBRAPA, 2005).

Ainda não são muito bem compreendidas as interações endofítico/planta, mas sabe-se que os endofíticos podem produzir toxinas, antibióticos e outros fármacos, fatores de crescimento e muitos produtos de potencial interesse biotecnológico, além de exercerem outras funções para a sobrevivência do hospedeiro (AZEREDO, 1998; CAMPOS, 2009). Essa interação simbiótica, pode conferir vantagens à planta como a diminuição do ataque herbívoro e de insetos, controle de outros micro-organismos (SINGH et al. 2011) e aumento da tolerância às condições de estresse, como salinidade e toxicidade por metal pesado (KHAN et al. 2014),

2.2 Fungos filamentosos endofíticos

Tem-se conhecimento de que os fungos filamentosos endofíticos existem em praticamente todas as plantas. De acordo com as estimativas feitas por Strobel & Daisy (2003), a partir das 300 mil espécies de plantas que existem na terra, pode-se chegar a um milhão de espécies de fungos, considerando apenas os endofíticos. Com isso, ficam aumentadas as chances de encontrar novos micro-organismos endofíticos e, conseqüentemente, fontes de diversidade genética e de produtos naturais (STROBEL & DAISY, 2003).

Nos últimos anos, fungos endofíticos têm sido alvo de diversos estudos. As discussões mais comuns envolvem a simbiose entre planta hospedeira e fungo endofítico (FERREIRA et al., 2015), seguida pela variedade de fungos endofíticos associados às plantas de clima tropical e temperado (FERNANDES et al., 2015; SANTOS et al., 2016), e pelos benefícios desses micro-organismos às plantas hospedeiras (SOUZA & SANTOS et al., 2017). Atenção ainda maior tem sido dada aos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos, buscando por moléculas com potencial para serem empregadas nas áreas farmacêutica, médica, industrial, ambiental e na agricultura (BUDHIRAJA et al., 2013; KUSARI et al., 2012; RODRIGUEZ et al., 2016).

Fungos endofíticos isolados de uma grande variedade de plantas também têm sido estudados, incluindo plantas medicinais (BUDHIRAJA et al., 2013; FERREIRA et al., 2015) e de interesse comercial, tais como da soja (FERNANDES et al., 2015), cacau (HANADA et al., 2010), feijão (GONZAGA et al., 2014), café (FERNANDES et al., 2009) e uvas (CUEVA et al., 2011; PANCHER et al. 2012; VARANDA et al., 2016).

2.3 Isolamento de fungos endofíticos de videiras

É importante estabelecer um protocolo específico para o isolamento de fungos endofíticos de videiras, pois o isolamento representa o passo mais crucial para a obtenção de culturas puras (Zheng *et al.* 2006).

Inicialmente, as partes coletadas da planta são armazenadas em sacos de papel e transportadas para o local de análise. Se houver necessidade, o material coletado pode ser mantido a 4°C até o momento das análises (STROBEL & DAYSI, 2003).

A esterilização da superfície dos órgãos vegetais de videiras é uma etapa crítica para garantir o isolamento de endofíticos e evitar a contaminação por epifíticos. Uma pré-lavagem das amostras com água esterilizada é importante para reduzir o número da microflora epifítica (CUEVA *et al.* 2011). Hipoclorito de sódio e etanol são usados, frequentemente, como desinfetantes das superfícies. Esterilização com a sequência “etanol - hipoclorito de sódio – etanol - água esterilizada” é amplamente empregada no isolamento a partir de videiras (HALLEEN et al., 2003; CUEVA et al., 2011; PANCHER et al., 2012; VARANDA et al., 2016). Surfactante, como Tween 80 tem sido usado para imersão das amostras e para aumentar a eficácia da esterilização da superfície (RONDOT & REINEKE, 2018). Em geral, os procedimentos de esterilização da superfície devem ser melhorados e definidos em estudos preliminares. Em especial, a definição do tempo de esterilização deve ser realizada, uma vez que a sensibilidade dos micro-organismos epifíticos varia com o órgão e a idade da planta (QIN et al., 2011). A esterilização de amostras de raízes deve ser precedida por pré-lavagem vigorosa com água esterilizada. Em seguida, as raízes devem sofrer imersão em tampão fosfato, para

equilibrar a pressão osmótica e evitar a difusão passiva de agentes esterilizantes nas raízes (AZEVEDO, 1998).

Após a etapa de esterilização, é necessária a transferência dos fragmentos da planta para meios adequados. Crescimento microbiano em laboratório depende da composição do meio e das condições de cultivo. No caso de isolamento de fungos endofíticos de videiras, os fragmentos podem ser distribuídos em placas de Petri contendo meios clássicos, como ágar Sabouraud, ágar batata dextrose (PDA) (HALLEEN et al., 2003; VARANDA et al., 2016) e ágar extrato de malte (AEM) (PANCHER et al., 2012). Esses meios devem ser sempre adicionados de antibacterianos para evitar o crescimento de bactérias (ARAÚJO et al., 2002). Outros meios sólidos também têm sido adaptados para o crescimento desses micro-organismos. Meio sólido contendo extratos de malte e de levedura (CUEVA et al., 2011) e meio sólido com peptona de soja e glicose (RONDOT & REINEKE, 2018), já foram aplicados com sucesso para o crescimento de fungos endofíticos de videiras. A adição de extrato da própria planta ao meio sólido pode ser positiva no crescimento das colônias endofíticas porque proporciona ao meio, características do microambiente da planta (QIN et al., 2011). Porém, essa possibilidade ainda não foi empregada para isolamento de fungos endofíticos de videiras.

Após a etapa de transferência dos fragmentos das plantas, as placas contendo o material vegetal devem ser incubadas. A temperatura geralmente usada para crescimento dos endofíticos de videiras permanece em torno de 25 e 30°C, e o tempo de incubação varia de 7 a 15 dias. A partir do crescimento, os fungos endofíticos com características morfológicas diferentes são isolados até obtenção de cultura pura, e identificados por análise molecular (KIA et al., 2019). Para a determinação filogenética, tem sido empregadas técnicas de sequenciamento genético, tais como 18S rDNA, *internal transcribed spacer* (ITS) e combinação de subunidades ribossomais (YANG et al., 2018). Uma vez isolados, os fungos são colocados em manutenção.

2.4 Diversidade de fungos endofíticos de videiras

A Tabela 1 reúne diferentes trabalhos sobre isolamento de fungos endofíticos de videiras e de seus ecossistemas que estão apresentados de forma resumida. A partir de videiras, um grande número de espécies fúngicas endofíticas já foi isolado. Isso demonstra a importância dessas plantas também como fontes de fungos endofíticos. As videiras estão entre as plantas produtoras de frutas mais importante economicamente (CUEVA et al., 2011). Na verdade, são uma *commodity* global, devido às uvas que são a base da fabricação de vinhos (LEONINI et al., 2018). A presença de fungos endofíticos em videiras pode ser influenciada por diferentes fatores, tais como o período de colheita, cultivar, área geográfica, condições climáticas e as práticas vitícolas aplicadas (SERRA et al., 2006). Os gêneros frequentemente encontrados como endofíticos de videiras são *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Trichoderma* e *Penicillium*.

A partir dos dados da Tabela 1, nota-se que a maioria dos trabalhos tem abordado três vertentes: (i) a diversidade de fungos isolados de ecossistemas de videiras, incluindo os endofíticos; (ii) a influência de diferentes manejos de vinhedos sobre a diversidade; (iii) e a influência do tipo de cultivar sobre a diversidade. A exploração da diversidade de fungos endofíticos tem sido uma das estratégias utilizadas há alguns anos e ainda continua fornecendo descobertas interessantes (RODRIGUEZ et al., 2016). Por exemplo, Halleen e colaboradores (2003) avaliaram a diversidade de fungos endofíticos já estabelecidos em material de videira mãe aparentemente saudável, antes de ser propagado como porta-enxerto, para o plantio em viveiros. Em seguida, esses autores reexaminaram os fungos encontrados como endofíticos ou patógenos latentes nas plantas aparentemente saudáveis já cultivadas em viveiros comerciais (estacas). Foi observado que alguns fungos endofíticos são propagados do porta-enxerto para a estaca (p.e. *Trichoderma* spp. e *Alternaria* spp.). Enquanto que outros se estabelecem diretamente na estaca, sem que ocorra a propagação pelo porta-enxerto. Os gêneros e espécies de fungos endofíticos das estacas de videiras com a maior frequência de isolamento estão apresentados na Tabela 1. Dentre os fungos endofíticos isolados, alguns gêneros e espécies eram reconhecidamente patogênicos. Fungos dos gênero *Cylindrocarpon* spp., *Phaeoacremonium* spp. e *Phaeomoniella chlamydospora* são causadores das doenças do Pé preto e da doença de Petri em videiras. Dessa forma, os autores puderam demonstrar também que, no momento do isolamento, esses fungos se encontravam como patógenos latentes, uma vez que as estacas amostradas eram saudáveis.

Manejos sustentáveis (orgânico ou biológico) dos vinhedos aumentam a quantidade e a diversidade de fungos endofíticos, além de reduzir os custos envolvidos. Esse fato foi confirmado em trabalhos que estão apresentados na Tabela 1 (PANCHER et al., 2012; RADIC et al., 2014; VARANDA et al., 2016). Nesses trabalhos, os autores determinaram a abundância e diversidade de fungos endofíticos em videiras, ao comparar manejo orgânico e manejo convencional. A diferença na quantidade e diversidade de fungos endofíticos que existem em ambos os manejos pode ser explicada pelos fungicidas normalmente usados. Os fungicidas são aplicados para prevenir doenças como a excoriose, a podridão negra, doença de Petri, mildio e Botrytis, que são comuns em videiras. Para isso, no manejo convencional costuma-se aplicar fosetil-alumínio, folpete, cimoxanil, espiroxamina, ciflufenamida, tebuconazol, oxiclreto de cobre e miclobutanil (GRAMAJE et al., 2009; BERESWILL et al., 2012; GONZÁLEZ-DOMINGUÉZ et al., 2019). Enquanto que as substâncias fungicidas utilizadas no cultivo orgânico geralmente são hidróxido de cobre, enxofre e extratos de *Equisetum arvense* e *Saponaria officinalis* (VARANDA et al., 2016). Os fungicidas do manejo convencional interferem negativamente na composição das comunidades fúngicas em videiras, incluindo a comunidade endofítica. E os fertilizantes usados no manejo orgânicos podem ser fontes

de micro-organismos, que podem penetrar na planta, tornando-se endofíticos (PANCHER et al., 2012).

A influência do cultivar sobre a quantidade e a diversidade de fungos endofíticos em videiras geralmente é menor que a causada pelo tipo de manejo. Essa observação já foi relatada para outras espécies de plantas (MANTER et al., 2010) e também para videiras. No trabalho de Pancher e colaboradores (2012), influência das cultivares Merlot e Chardonnay sobre a comunidade endofítica não foi estatisticamente significativa. O mesmo ocorreu entre as cultivares Syrah, Cabernet Sauvignon e Aragonez, no trabalho de Varanda e colaboradores (2016).

Tabela 1. Trabalhos relacionados ao isolamento de fungos filamentosos endofíticos de videiras e de seus ecossistemas. Dados sobre localização do vinhedo, amostras usadas para isolamento, número de cepas isoladas, gêneros e espécies isoladas.

Localização dos vinhedos	Amostras para isolamento	Total de cepas isoladas	Gêneros e espécies isolados	Referência
Viveiros comerciais na área de Wellington, na Província do Cabo Ocidental/ África do Sul	Raízes, porta-enxerto, união de enxertia e copa, pedaços de tecido. Combinações: Richter 99/Pinotage, 101-14Mgt./Pinotage, Ramsey/Sultana and 143BMgt./Sultana.	6212*	<i>Cylindrocarpon</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>Acremonium</i> spp., <i>Phoma</i> spp., <i>Alternaria</i> spp., <i>Phialophora</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Clonostachys</i> spp., <i>Acremonium</i> spp., <i>Phaeoconiella chlamydospora</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Botryosphaeria</i> spp., <i>Pestalotiopsis</i> sp., <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Ulocladium</i> sp., <i>Cytosphaera</i> sp., <i>Tetraetracoccosporium</i> sp., <i>Phomopsis viticola</i> , <i>Paecilomyces</i> sp., <i>Epicoccum</i> sp.	Halleen <i>et al.</i> (2003)
Quatro regiões em Madri, Guadalajara, Ciudad Real/ Espanha	Casca de caule, brotos de folhas, fragmentos de xilemas (<i>Vitis vinifera</i>) e amostras de solo	290 / 182**	Atividade positiva: <i>Camarosporium</i> spp., <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Exophiala</i> spp., <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus ustus</i> , <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Myrothecium</i> spp., <i>Paecilomyces marquandii</i>	Cueva <i>et al.</i> (2011)
Sete regiões em Trentino/Itália	Hastes da parte lateral sem as folhas (<i>V. vinifera</i>). Cv***Merlot e Chardonnay	377 / 252****	<i>Absidia glauca</i> 1B3C, <i>Alternaria</i> sp. 2.1.Ca, <i>Alternaria</i> sp. AL2, <i>Aspergillus niger</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>B. cinerea</i> 9.4.Md, <i>Cladosporium oxysporum</i> , <i>Cladosporium</i> sp. 10.4.Mb, <i>Cladosporium</i> sp. 4.2.Mb, <i>Epicoccum nigrum</i> 2.1.Cb., <i>Fusarium graminearum</i> PH1, <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium</i> sp. 53F, <i>Mortierella vertici lata</i> F2(VR), <i>Mucor hiemalis</i> 1B2C, <i>Neurospora crassa</i> OR74A, <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>P. chrysogenum</i> 54-1255, <i>Penicillium restrictum</i> VR31, <i>Penicillium spinulosum</i> VR14, <i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15,	Pancher <i>et al.</i> (2012)

Localização dos vinhedos	Amostras usadas para isolamento	Número de cepas isoladas	Gêneros e espécies	Referência
			<i>Pithomyces chartarum</i> 9.2.Mb, <i>Podospora anserina</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> 2948, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980, <i>Trichoderma aggressivum</i> , <i>Trichoderma atroviride</i> MT8, <i>Trichoderma reesei</i> QMA, <i>Trichoderma virens</i> , <i>Umbelopsis ramanniana</i> F13, <i>Zygorhynchus moelleri</i> F11(VR), <i>Aureobasidium pullulans</i> 4.3.Cc, <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Hansenula polymorpha</i> , <i>Pichia stipitis</i>	
Quatro regiões da costa adriática/ Croácia	Raízes. Cv. Plavac mali em porta-enxerto <i>Vitis berlandieri</i> × <i>Vitis rupestris</i>	-	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Pestalopsis</i> sp., <i>Chaetomium</i> sp., <i>Seiridium</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Glomus</i> sp.	Radic <i>et al.</i> (2014)
Região de Alentejo/ Portugal	Folhas (<i>V. vinifera</i>). Cv. Syrah, Cabernet Sauvignon, Aragonez	240	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria porri</i> , <i>Alternaria solani</i> , <i>Alternaria tenuissima</i> , <i>Alternaria</i> sp., <i>Athelia</i> sp., <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Diplodia seriata</i> , <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Epicoccum</i> sp., <i>Gloeotinia</i> sp., <i>Nigrospora oryzae</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>Penicillium</i> sp.	Varanda <i>et al.</i> (2016)
Região de Rheingau/ Alemanha	Folhas (<i>V. vinifera</i>). Cv. Riesling	Não se aplica	<i>Bauveria bassiana</i> (capaz de reduzir a infestação de plantas maduras por cigarrinha da uva e de plantas jovens em estufa, por cochonilha)	Rondot e Reineke (2018)
Seis regiões localizadas na Índia conhecidas como Pune, Nasik, Bangalore, Shimla e Alambagh.	Hastes e folhas (<i>V. vinifera</i>) Cv. Merlot, Wild, Pinot Noir, Shiraz, Muscat	53	<i>Penicillium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Alternaria</i> sp., <i>Lasiodiplodia</i> sp., <i>Botryosphaeria</i> sp., <i>Nigrospora</i> sp., <i>Pestalotiopsis</i> sp., e <i>Ascothium aureus</i> .	Dwivedi e Saxena (2018)

* Total de cepas após 0, 3, 6 e 9 meses de idade das videiras

** Total de cepas isoladas / atividade antibacteriana positiva

*** Cultivar (cv.)

**** Total de cepas isoladas / espécies identificadas (fungos filamentosos)

2.5 Potencial biotecnológico de fungos endofíticos de videiras

Diante do exposto, nota-se que o potencial biotecnológico de fungos endofíticos de videiras tem sido pouco explorado. Ao contrário do que ocorre com fungos endofíticos isolados de outras plantas que têm um impressionante potencial biotecnológico (LIU et al., 2019), e cujo número de estudos de *screening* por metabólitos secundários tem crescido (LI et al., 2018). Dentre os trabalhos apresentados na Tabela 1, apenas três avaliaram efetivamente o potencial biotecnológico dos fungos endofíticos de videiras (CUEVA et al., 2011; DWIBEDI & SAXENA, 2018; RONDOT & REINEKE, 2018).

Cueva e colaboradores (2011) avaliaram a ação antimicrobiana de extratos de fermentação de fungos isolados de ecossistemas de videiras, incluindo os endofíticos, contra quatro bactérias patogênicas de origem alimentar e duas probióticas (*Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus planartum* e *Lactobacillus brevis*). Como resultado, 71 fungos produziram extratos ativos contra pelo menos um micro-organismo patogênico, mas não contra bactérias probióticas. A bactéria *S. aureus* (gram-positiva) foi mais suscetível aos extratos do que bactérias gram-negativas. Foram identificados 13 metabólitos considerados de amplo espectro antimicrobiano. Dessa forma, ficou demonstrado que os metabólitos antimicrobianos produzidos por fungos isolados de videiras podem limitar a colonização e deterioração de produtos alimentícios por patógenos de origem alimentar. E ainda, com efeito mínimo sobre as bactérias probióticas.

Rondot e Reineke (2018) pesquisaram a atuação do fungo endofítico *B. bassiana* contra a infestação por insetos, como a cochonilha (*Planococcus ficus*) e a cigarrinha da uva (*Empoasca vitis*). Nesse trabalho, os autores estabeleceram o fungo *B. bassiana* como endofítico nas plantas das videiras. Após a inoculação em plantas jovens em estufas, *B. bassiana* sobreviveu no interior de tecidos foliares com sete semanas de idade por, pelo menos, 21 dias. Após a inoculação em plantas maduras, esse micro-organismo foi detectado como endofítico por até cinco semanas, com redução significativa da infestação com *E. vitis*. *Bauveria bassiana* endofítica reduziu a taxa de infestação e o crescimento de *P. ficus*.

Dwibedi e Saxena (2018) avaliaram a capacidade de produção de resveratrol por fungos endofíticos de videiras. Resveratrol é um flavonóide polifenólico relacionado a efeitos positivos sobre a redução da progressão de doenças neurológicas, tais como Alzheimer e doença de Parkinson. Também tem sido relacionado ao tratamento de condições isquêmicas e problemas cardiovasculares. Foram isoladas 53 cepas e 29 apresentaram testes positivos para a presença de compostos fenólicos em seus extratos. E *Arcopilus aureus* foi identificado como o maior e mais promissor produtor de resveratrol.

Estudos acerca do potencial biotecnológicos de endofíticos de videiras estão apenas no começo e representam uma ampla área a ser estudada. Nesse sentido, mais foco deve ser dado sobre aplicações biotecnológicas desses micro-organismos nas áreas farmacêutica, alimentícia e na agricultura, especialmente no biocontrole (SEBASTIANES et al., 2013) .

2.6 *Arcopilus aureus* (*Chaetomium aureum*)

Arcopilus aureus (Chaetomiaceae) é uma classificação recente do fungo conhecido na literatura como *Chaetomium aureum* (WANG et al., 2016). Por esse motivo, também foram pesquisados na literatura trabalhos que tratassem de fungos do gênero *Chaetomium* ou da espécie *Chaetomium aureum*. Apenas um trabalho recente tratando de *A. aureus* isolado de videira foi encontrado (DWIBEDI & SAXENA, 2018). *Arcopilus aureus* é conhecido por sua capacidade de degradar celulose e colonizar diferentes substratos, como o solo e o ar (WANG et al., 2016). São também encontrados como fungos endofíticos com habilidade para produzir um amplo espectro de compostos bioativos (KABBAJ et al., 2014; SURYANARAYANAN et al., 2009). Dentre esses compostos estão o chaetorcinol e a esclerotiorina que apresentam atividade antibacteriana (CHIDANANDA et al., 2006) e antifúngica (LIN et al., 2012), e o resveratrol que é capaz de retardar a progressão de doenças mentais (DWIBEDI & SAXENA, 2018). Outros compostos bioativos produzidos por outras espécies de *Chaetomium* também já foram relatados, entre eles as citoglobosinas, que apresentam atividade citotóxica (CUI et al., 2010), chaetocochinas com atividade anti-câncer (LI et al., 2006), e chaetomanona com ligeira atividade antimicobacteriana (KANOKMEDHAKUL et al., 2002). Geralmente, *A. aureus* não causa complicações à saúde humana e não é produtor de aflatoxina (RANK et al., 2011), apesar de outra espécie do gênero *Chaetomium* (*Chaetomium globosum*) estar relacionada a infecções oportunistas (WANG et al., 2016). Vale ressaltar que, na literatura pesquisada, não há estudos avaliando objetivamente a produção de pigmentos por *A. aureus*, mas apenas relato da atividade biológica da esclerotiorina (CHIDANANDA et al., 2006; KABBAJ et al., 2014; LIN et al., 2012), que já foi isolada dessa espécie. É sabido que a esclerotiorina é um pigmento amarelo-laranja, frequentemente isolada de *Penicillium sclerotiorum* (CELESTINO et al., 2014, GOMES & TAKAHASHI, 2017), mas que também pode ser produzida por outros fungos (GIRIDHARAN et al., 2012).

2.7 Pigmentos

Frequentemente, os termos pigmento e corante são usados como sinônimos, entretanto, o termo pigmento deve-se referir àqueles que são insolúveis em um determinado meio, enquanto que os corantes, aos solúveis no mesmo meio. Por exemplo, os carotenóides são classificados como corantes quando solubilizados em óleo, e como pigmentos quando solubilizados em água (MAPARI

et al., 2010). Os termos pigmento e corante serão empregados, ao longo do texto, genericamente, ou seja, referindo-se às substâncias químicas que conferem cor a outros materiais sobre os quais se fixam (SOUZA, 2015).

A cor de um pigmento está associada à absorção ou reflexão da luz em comprimento de onda determinado. 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 780nm, também conhecida como faixa espectral visível. O pigmento é colorido porque absorve luz visível. Desse modo, a luz que emerge desse pigmento só vai ter os comprimentos de onda que não absorveu. A retina vê, então, mais fortemente as cores que deixaram de ser absorvidas. Portanto, o pigmento absorve certa parte do espectro e a cor complementar é refletida. Por exemplo, um pigmento que é amarelo aos olhos humanos tem como cor mais fortemente absorvida o azul, ou seja, o pigmento apresenta máxima absorção em λ próximo a 400nm. Um pigmento azul tem como cor complementar o amarelo, que é a cor mais fortemente absorvida (SKOOG et al., 2005; SOUZA, 2015). A Tabela 2 demonstra as cores transmitidas correspondentes aos comprimentos de ondas individuais do espectro visível.

Cada pigmento, por sua estrutura molecular, absorve um padrão de cores específico. O número de ligações insaturadas (duplas conjugadas) e a liberdade de seus elétrons são fatores que influenciam a porção do espectro que é absorvida pela molécula do pigmento. 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 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 (RODRIGUEZ-AMAYA, 2018).

Tabela 2. Radiação absorvida e cor complementar transmitida das cores da região visível do espectro (400-780nm).

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)

2.8 Corante/pigmento na indústria de alimentos

Na indústria de alimentos, a cor é um parâmetro de qualidade sensorial que determina a aceitação, ou não, de um produto pelos consumidores pelo fato de trazer uma perspectiva saudável ao alimento. Entretanto, a cor pode ser perdida ou alterada durante as estações do ano, o processamento e armazenamento dos alimentos. Assim, muitas vezes a “adição de cor” é algo comercialmente vantajoso, no intuito de manter a cor esperada ou preferida pelo consumidor, conferir identidade ao alimento, proteger vitaminas dos danos causados pela luz e por propósitos decorativos, aumentando a aceitabilidade do produto (COSTA & VENDRUSCOLO, 2017; SOUZA, 2015). Dentre os pigmentos usados pela indústria alimentícia estão os artificiais e os naturais. De acordo com a legislação brasileira, corante compõe a lista de aditivos alimentares (BRASIL, 1977) e é definido como “a substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimento (e bebida)”. Os corantes/pigmentos naturais são obtidos a partir de vegetais e de animais, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado (BRASIL, 1997). Dentre os pigmentos naturais existem aqueles obtidos a partir de fontes consideradas convencionais, representados pelo pigmento extraído de plantas (Tabela 3), e aqueles obtidos de fontes não-convencionais, como os obtidos a partir de algas (DUFOSSÉ, 2017).

A utilização de pigmentos de fontes naturais tem crescido não somente na indústria alimentícia, mas também nas indústrias farmacêuticas e têxteis devido, de um modo geral, à menor toxicidade ao ambiente e ao ser humano (AHMAD & PANDA, 2014; CELESTINO et al., 2014; DUFOSSÉ et al., 2009; DUFOSSÉ et al., 2014; LOPES et al., 2013;). Muitos corantes artificiais têm

recebido críticas acerca de seus potenciais mutagênicos e carcinogênicos, levando à restrição do uso de alguns ao longo dos anos, principalmente os de uso alimentício, pelas agências reguladoras. Ocorre ainda um aumento da preocupação dos consumidores quanto à segurança dos corantes alimentícios artificiais, aliado à ideia dos benefícios à saúde que estes podem trazer, levando ao aumento do consumo de produtos contendo corantes/pigmentos de fontes naturais (AHMAD & PANDA, 2014; CARO et al., 2012; RODRIGUEZ-AMAYA, 2016). Os pigmentos naturais representam um nicho de mercado importante, em que os consumidores estão dispostos a pagar mais caro em busca de uma alimentação mais saudável (DUFOSSÉ et al., 2014).

Paralelamente à crescente necessidade de novos pigmentos, tem crescido o número de pesquisas envolvendo a obtenção de pigmentos de fontes naturais, uma vez que podem apresentar potencial para serem empregados na indústria de alimentos e dentre os pigmentos naturais estão aqueles produzidos por micro-organismos (CELESTINO et al., 2014; RODRIGUEZ-AMAYA, 2016; RODRIGUEZ-AMAYA, 2018; ROMANO, 2015; SOUZA, 2015).

Tabela 3. Pigmentos naturais de alimentos e suas fontes

Pigmentos	Fontes	Faixa de coloração	Observações
Antocianinas	Cerejas	Rosa/vermelho a	Cor depende do pH.
	Cascas de uvas vermelhas	Roxo/azul, dependendo	Sensível ao calor e
	Repolho roxo	do pH	sujeito a oxidação
Betanina (Betalaína)	Beterraba	Rosa a vermelho	Sensível ao calor e luz
Caramelo	Carboidratos de alimentos (Sacarose)	Marrom	
Carotenóides			
Beta-caroteno	Óleo de palma	Amarelo a laranja	Atividade de pró-vitamina A
Bixina ou norbixina	Sementes de urucum	Laranja a vermelho	Boa estabilidade ao pH
Capsantina/capsorubina	Páprica	Laranja avermelhado	Moderadamente solúveis em óleo
Licopeno	Tomate	Vermelho alaranjado	Facilmente oxidáveis
Luteína	Xantofila	Amarelo dourado	Faixa de coloração limitada
Cantaxantina	Camarão e flamingos	Rosa alaranjado	
Clorofila	Vegetais verdes	Verde	Sujeito à fotooxidação
Clorofilina	Vegetais verdes	Verde azulado	
Curcumina	Cúrcuma	Amarelo a laranja	

Fonte: SOUZA (2015)

2.9 Pigmentos naturais produzidos por micro-organismos

O emprego de produtos obtidos a partir de fermentação, na indústria alimentícia, tem crescido ano após ano. Exemplos desse crescimento são a utilização de goma xantana como espessante, de glutamato monossódico e hidrolisado de leveduras como realçadores de sabor, de diacetil e gama-

decalactona como compostos aromatizantes, de ácido láctico e ácido cítrico como acidulantes, de vitaminas e aminoácidos essenciais. Pigmentos produzidos por micro-organismos por meio de fermentação recebem o nome de pigmentos microbianos e também têm sido usados na indústria alimentícia como corantes naturais (AKILANDESWARI & PRADEEP, 2016; DUFOSSÉ et al., 2009; DUFOSSÉ, 2017).

A produção de pigmentos por micro-organismos é mais vantajosa, visto que não depende de condições climáticas (sazonalidade); micro-organismos crescem em substratos baratos, como por exemplo os resíduos agro-industriais; os pigmentos apresentam cores em diferentes tons; a produção pode ser otimizada visando ao aumento do rendimento; e os pigmentos microbianos são mais estáveis e solúveis que os extraídos de plantas ou animais (CELESTINO et al., 2014; HILARES et al., 2018; LOPES et al., 2013; SINGH et al., 2015; SOUZA et al., 2015). Além disso, micro-organismos podem crescer em diferentes sistemas de cultura, tais como a cultura submersa e a cultura em estado sólido, e ainda podem ser modificados geneticamente a fim de promover aumento na produtividade e na qualidade dos pigmentos produzidos (AKILANDESWARI & PRADEEP, 2016).

A efetiva utilização de qualquer pigmento microbiano através do processo fermentativo depende de sua aceitabilidade pelos consumidores, aprovação pelo sistema de regulação, e do financiamento para garantir a evolução de sua produção de nível laboratorial para escala industrial e para despesas com ações de marketing. Há alguns anos havia dúvidas quanto ao sucesso da utilização de pigmentos microbianos em alimentos, devido aos longos e caros estudos em relação à toxicidade requeridos pelas agências reguladoras, ao custo de processamento (cultivo ou produção biotecnológica) e à própria aceitação pelos consumidores. Entretanto, hoje já há evidências de que isso é possível e alguns deles vêm sendo usados pela indústria alimentícia (DUFOSSÉ et al., 2017; GOMES & TAKAHASHI, 2016; HILARES et al., 2018; RODRIGUEZ-AMAYA, 2018). Exemplos dessa utilização são os pigmentos de *Monascus*, Arpink redTM de *Penicillium oxalicum*, riboflavina de *Ashbya gossypii*, e licopeno e b-caroteno de *Blakeslea trispora*. Outros pigmentos têm sido estudados e estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. 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 Mucor</i>	PP
β -caroteno	Amarelo-laranja	<i>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: SOUZA (2015)

Para ser considerado um bom produtor de pigmentos, o micro-organismo deve apresentar: capacidade de utilizar diversas fontes de carbono e nitrogênio; apresentar bom rendimento em pigmentos; não ser patogênico; não produzir toxinas nas condições de produção; e os pigmentos devem ser facilmente separados da massa celular. Entre as moléculas de pigmentos, podem ser citadas os carotenoides, azafilonas, riboflavinas, antraquinonas, hidroxiantraquinonas, naftoquinonas, violaceínas e ficocianinas (DUFOSSE et al., 2014; DUFOSSE, 2017).

2.10 Pigmentos produzidos por fungos - Classificação

Os pigmentos fúngicos podem ser classificados como carotenoides, policetídeos, melaninas, flavinas, etc. Esses pigmentos são produzidos durante o metabolismo secundário dos fungos, com exceção das flavinas produzidas durante o metabolismo primário. Os policetídeos são a classe mais representativa desses pigmentos (Dufossé et al., 2014). Pigmentos policetideos têm estruturas complexas e incluem as azafilonas, e os derivados da quinona, como as antraquinonas, hidroxiantraquinonas e naftoquinonas (Mapari et al., 2010). Além disso, podem atuar como unidades formadoras de outros metabólitos secundários pigmentados, como as cochlioquinonas. As flavinas

correspondem à riboflavina e seus derivados, como a flavina mononucleotídeo (FMN) e a flavina dinucleotídeo (FMD).

2.11 Pigmentos policetídeos produzidos por fungos

Os pigmentos policetídicos estão distribuídos na natureza tanto em plantas, insetos e líquens, quanto em micro-organismos, sendo encontrado em abundância nos fungos filamentosos (SOPANDI et al., 2012; DUFOSSÉ et al., 2014). Pigmentos policetídeos produzidos por fungos são, em sua maioria, azafilonas e derivados da quinona, e muitos têm sido relacionados com potencial poder de pigmentação, além de apresentarem uma vasta gama de cores (KANG et al., 2013; LOPES et al., 2013; AKILANDESWARI & PRADEEP, 2016).

Os principais gêneros envolvidos na produção de pigmentos policetídeos são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Monascus*. E vários são os estudos com diferentes espécies produtoras como *Penicillium sclerotiorum* (CELESTINO et al., 2014; GOMES & TAKAHASHI, 2016); *P. chrysogenum*, *Fusarium graminearum*, *P. vasconiae* (LOPES et al., 2013); *P. purpurogenum* (MÉNDEZ et al., 2011); *Isaria farinosa*, *Emericella nidulans*, *Fusarium verticillioides* (VELMURUGAN et al., 2010a,b); *Epicoccum nigrum* (MAPARI et al., 2008); *Fusarium oxysporum* (Nagia & EL-Mohamedy 2007); *Monascus ruber* (KANG et al., 2014; COSTA & VENDRUSCOLO, 2017; HILARES et al., 2018), *Talaromyces albobiverticillius* (VENKATACHALAM et al., 2018a,b).

O metabolismo da célula fúngica pode ser dividido em metabolismo primário e secundário (Figura 1). O primário produz metabólitos que são essenciais para o crescimento e reprodução dos fungos, tais como aminoácidos, açúcares, nucleotídeos, ácidos graxos e vitaminas. Enquanto que o secundário origina metabólitos derivados de componentes do metabolismo primário. Metabólitos secundários muitas vezes não trazem benefícios ao fungo, como micotoxinas ou antibióticos, porém são de extrema importância para a sociedade (BRAKHAGE & SCHROECKH, 2011; KREIS et al., 2017). Os pigmentos policetídeos fúngicos também são produzidos através das rotas envolvidas no metabolismo secundário (AKILANDESWARI & PRADEEP, 2016).

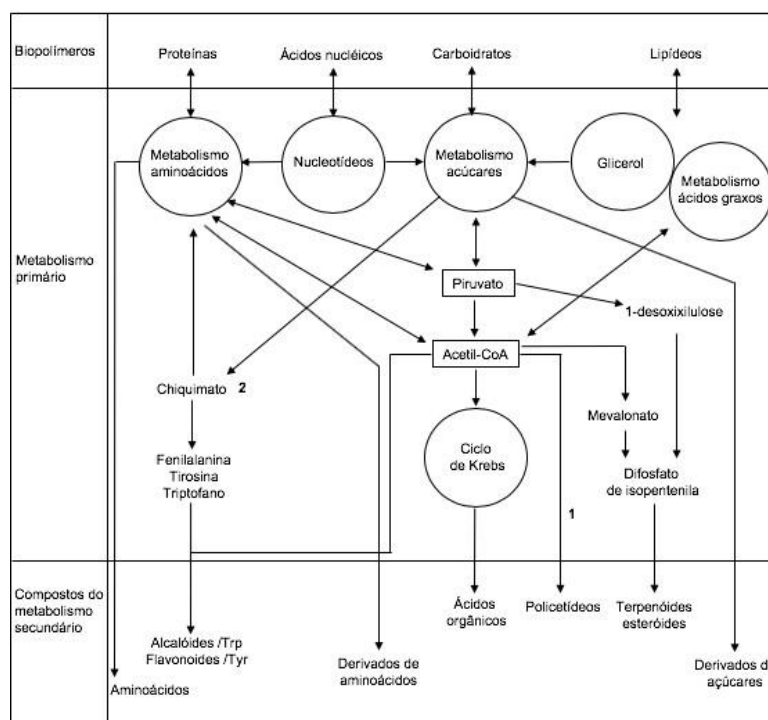


Figura 1: Relações entre vias biossintéticas do metabolismo primário e secundário. Síntese de pigmentos policetídeos ocorrem pela via dos policetídeos (1). Quinonas também podem ser sintetizadas pela via do chiquimato (2).

Fonte: Adaptado de AKILANDESWARI & PRADEEP (2016) e KREIS et al. (2017)

O termo policetídeo surgiu aproximadamente ao mesmo tempo em que o termo dos metabólitos secundários, em 1907 e foram identificados como contendo múltiplos grupos cetônicos (BENTLEY & BENNETT, 1999). Envolvem uma grande classe de metabólitos secundários e apresentam uma ampla variedade de estruturas e funções. São sintetizados nas células fúngicas, pela via acetato-mevalonato (GESSLER et al., 2013) (Figura 2), por um complexo multienzimático denominado policetídeo sintases (polyketide synthase – PKS). Essas enzimas garantem a ciclização e a regioseletividade da cadeia β do policetídeo para formar diversas estruturas aromáticas (YANG et al., 2015b). Dentre essas enzimas estão a ceto-sintase (KS), aciltransferase (AT), proteína carregadora de grupo acil (ACP), ceto-redutase (KR) e desidratase (DH) que originam diferentes classes de policetídeos. Durante a biossíntese, dependendo da atuação das enzimas PKS, os policetídeos podem ser: compostos aromáticos polihidroxilados, como grande parte dos pigmentos fúngicos; compostos alifáticos pouco oxigenados; ou policetídeos parcialmente reduzidos, como a lovastatina; e alifáticos altamente reduzidos, como os ácidos graxos (PASTRE et al., 2007; STUDDT et al., 2012).

As estruturas moleculares correspondentes aos pigmentos fúngicos, na maioria das vezes, se assemelham à rota biossintética que as deu origem (KREIS et al., 2017). A síntese dos policetídeos da classe das azafilonas se assemelha com a síntese dos ácidos graxos (MAPARI et al., 2010; CHEN

et al., 2015) (Figura 1). Entretanto, as duas vias metabólicas divergiram numa fase inicial durante a evolução. Em fungos, os pigmentos do tipo quinonas são produzidos, primeiramente, pela via acetato-mevalonato (Figura 2), assim como as azafilonas (GESSLER et al., 2013). Entretanto, existe também relatos da produção de pigmentos tipo quinonas por fungos através da rota do chiquimato (AKILANDESWARI & PRADEEP, 2016).

Existem diferentes ramificações de cadeia dos precursores que podem dar origem aos compostos cíclicos. Além disso, policetídeos de estruturas variadas também podem ser formados por diferentes ácidos carboxílicos iniciadores, sob a forma dos seus ésteres de CoA (STUDT et al., 2012). A diversidade química e estrutural dos policetídeos, incluindo pigmentos, se deve às variações nos domínios tipo I das PKSs. Além disso, algumas PKSs apresentam ACPs em série (MAPARI et al., 2010).

Existem algumas hipóteses que tentam explicar a produção de pigmentos policetídeos, que seriam sintetizados como produtos intermediários. Uma dessas hipóteses é que esses pigmentos podem ser sintetizados e armazenados quando grande quantidade de precursores de metabólitos primários são formados (acetato, piruvato, aminoácidos, etc) na célula. A síntese e o armazenamento são uma maneira de os fungos reduzirem a quantidade de precursores, uma vez que os pigmentos podem sofrer uma conversão rápida em um produto não utilizado pela célula, como uma micotoxina, por exemplo (SHIERS et al., 2005).

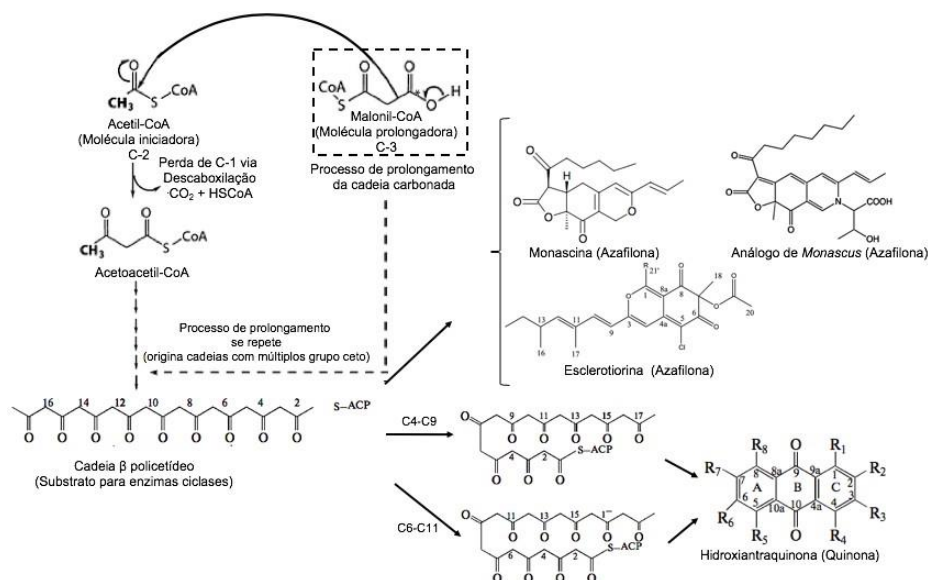


Figura 2. Síntese de azafilonas e hidroxiantraquinona pela via acetato-mevalonato em fungos – ciclização de cadeia β policetídeo.

Fonte: Adaptado de GESSLER et al. (2013) e KREIS et al. (2017)

2.11.1 Pigmentos do tipo azafilonas

Através das azafilonas, os fungos efetivamente trazem uma nova classe de pigmentos naturais

às indústrias alimentícias, uma vez que as azafilonas não estão presentes em plantas (DUFOSSÉ, 2018). As azafilonas são pigmentos com estruturas de pirona - quinona contendo um núcleo bicíclico altamente oxigenado e um centro quaternário quiral (OSMANOVA et al., 2010).

A síntese das azafilonas (Figura 2) começa pela ligação de uma unidade acila (acetil-CoA) à KS, conhecida como iniciadora, enquanto a AT transfere outras moléculas acilas prolongadoras (malonil-CoA) ao grupo prostético do ACP. A KS continua com as condensações descarboxilativas entre as moléculas acilas para gerar a β -ceto-acil-ACP. Dessa forma, a repetição desse processo origina cadeias com múltiplos grupos ceto dentro da sua estrutura (compostos policarbonílicos) (SHIERS et al., 2005; MAPARI et al., 2010; YANG et al., 2015b). Os compostos policarbonílicos resultantes servem como substratos para várias enzimas ciclases que produzem compostos aromáticos típicos de pigmentos policetídeos (STUDT et al., 2012).

Azafilonas clássicas são produzidas por *Monascus sp.* Fungos pertencentes a esse gênero podem produzir pigmentos amarelos, laranjas e vermelhos (CHEN et al., 2015). Monascorubrina e rubropunctatina, ambas pigmentos laranjas (Figura 3) sofrem oxidação e gera, respectivamente, os pigmentos amarelos ankaflavina e monascina. Os pigmentos vermelhos monascorubramina e rubropunctamina são produzidos através da reação dos pigmentos laranjas com compostos contendo grupos NH_3 e NH_2 (DUFOSSÉ et al., 2005). O pigmento vermelho combina-se facilmente com aminoácidos ou proteínas e por isso, mais de 50 estruturas já foram identificadas (DUFOSSÉ, 2018; VENDRUSCOLO et al., 2013).

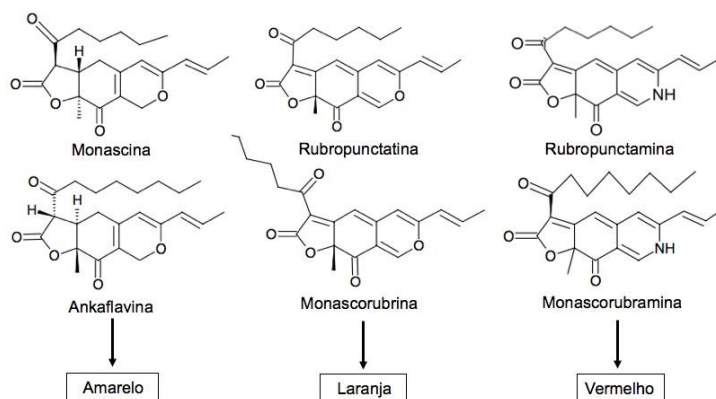


Figura 3. Estruturas químicas dos pigmentos produzidos por *Monascus sp.*: Monascina e Ankaflavina (Amarelos), Rubropunctatina e Monascorubrina (laranjas), Rubropunctamina e Monascorubramina (Vermelhos).

Fonte: Adaptado de MAPARI et al. (2005) e CAMPOY et al. (2006)

O pigmento de *Monascus* tem sido usado há mais de 200 anos nos países orientais, mais especificamente no sudeste da China, Japão e sudoeste asiático (COSTA & VENDRUSCOLO, 2017).

Esses pigmentos são usados na forma de extratos ou, tradicionalmente, na forma de um pó à base de arroz fermentado com esse micro-organismo, que assume a cor vermelha (DUFOSSÉ et al., 2014). O uso de pigmentos de *Monascus* como corante não é aprovado na União Européia e nos Estados Unidos, devido ao risco de contaminação com citrinina que é um metabólito nefrotóxico e hepatotóxico (YANG et al., 2015a). Mas nos próximos anos será possível a produção de pigmentos de *Monascus* livres de citrinina, através de modificações genéticas (YANG et al., 2015b). Além disso, estudos têm demonstrado a capacidade de alguns fungos filamentosos produzirem pigmentos análogos aos pigmentos produzidos por *Monascus* (MLP - Monascus-like pigments), sem a produção paralela de citrinina (Figura 4) (ARAI et al., 2013; VENKATACHALAM et al., 2018b).

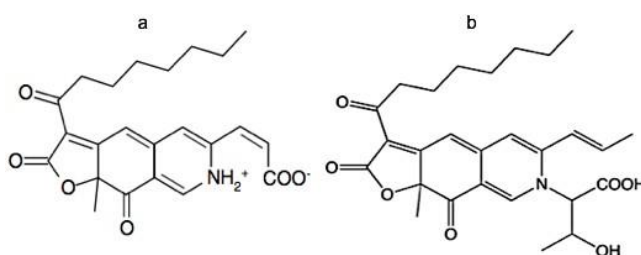


Figura 4. Pigmentos análogos ao de *Monascus* (MLP): (a) produzido por *Penicillium sp.* (b) produzido por *Talaromyces sp.*

Fonte: DUFOSSÉ (2018)

A esclerotiorina (Figura 5) também faz parte das azafilonas e pode ser produzida por fungos filamentosos, como pigmento com forte coloração amarelo/laranja (GOMES & TAKAHASHI, 2016). Esclerotiorina foi isolada de *Penicillium sclerotiorum* e identificada pela primeira vez em 1940 (CURTIN & REILLY, 1940). Desde então, tem sido alvo de diversos estudos que tratam sobre sua produção (CELESTINO et al., 2014; XIN et al., 2019; ZHENG et al., 2019) até sobre sua atividade biológica (MULHOLLAND et al., 2012). A molécula de esclerotiorina pode ser quimicamente convertida na molécula correspondente esclerotioramina (cor vermelha), por meio da substituição do oxigênio do anel pirano por uma amina primária (Figura 5) (ZHENG et al., 2019). Recentemente, foi possível a biotransformação da esclerotiorina em esclerotioramina por *Bauveria bassiana* (GOMES & TAKAHASHI, 2016). Dessa forma, a esclerotioramina passou a ser vista como um pigmento potencial para substituir o pigmento vermelho de *Monascus*. Apesar da esclerotiorina ser produzida tradicionalmente por *P. sclerotiorum*, outros fungos já foram identificados como capazes de produzirem-na também (GIRIDHARAN et al., 2012), inclusive *A. aureus* (KABBAJ et al., 2015).

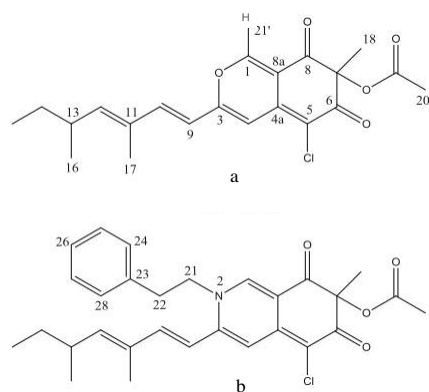


Figura 5. Estrutura química do pigmento esclerotiorina (a) produzida por *P. sclerotiotum* e esclerotioramina (b).

Fonte: GOMES E TAKAHASHI (2016) com adaptações.

2.11.2 Pigmentos do tipo quinonas

A família das quinonas consiste em muitas centenas de compostos que possuem a natureza e a posição de grupos substituintes diferentes, e como pigmentos, é representada pelas antraquinonas, hidroxiantraquinonas, hidroxiquinonas e naftoquinonas (DUFOSSE, 2014).

Pela via acetato-mevalonato, a reação de condensação entre moléculas de acetil-CoA e malonil-CoA libera uma carboxila, formando uma cadeia β policetídeo que é precursora de várias quinonas (Figura 2). Enzimas do tipo metiltransferases e redutases também fazem parte das PKS (GESSLER et al., 2013). A regioseletividade da ciclização do primeiro anel e o tamanho do produto final, podem originar cinco grupos principais de policetídeos não redutores. Grupo I, II e III são formados pela ciclização entre C2 e C7 e originam produtos monocíclicos, bicíclicos e policíclicos, respectivamente; grupo IV é formado pela ciclização entre C4 e C9 e origina compostos policíclicos; por fim, o grupo V é formado pela ciclização entre C6 e C11 e também origina compostos policíclicos (JAVIDPOUR et al., 2011; LI et al., 2011).

Dentre as quinonas, as antraquinonas (Figura 6) são muito importantes enquanto pigmentos vermelhos e fungos dos gêneros e espécies *Aspergillus sp.*, *Eurotium sp.*, *Fusarium sp.*, *Dreschlera sp.*, *Microsporium sp.*, *Penicillium sp.*, *Emericella purpurea*, *Curvularia lunata*, *Mycosphaerella rubella* são capazes de produzi-las. As antraquinonas apresentam atividades biológicas e ampla variedade de estruturas (RATEB et al., 2011; DUFOSSE, 2018). A síntese de antraquinonas pode ocorrer pelo envolvimento do grupo IV e V, tal como relatado por alguns autores (LI et al., 2011), enquanto que a variedade de estruturas se deve à introdução ou remoção de grupos laterais, que ocorre depois das etapas de biossíntese (GESSLER et al., 2013).

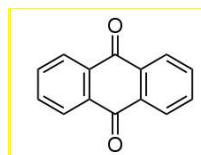


Figura 6. Estrutura química da antraquinona.

No ano de 2004, durante a conferência denominada “Pigmentos em Alimentos”, a antraquinona policética Arpink Red™, da Ascolor, foi descrita pela primeira vez como um corante alimentício. Esse corante era produzido pelo fungo filamentososo *Penicillium oxalicum* e obteve uma aprovação temporária de dois anos pela União Europeia para ser comercializado na República Checa, entre os anos de 2004 e 2006. Atualmente o pigmento passou a receber o nome de Natural Red™ (Figura 7) (DUFOSSE et al., 2014; MAPARI et al., 2010).

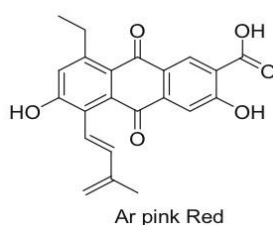
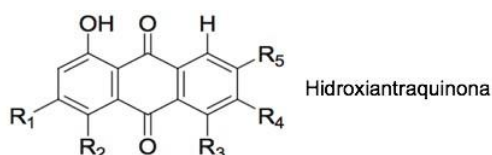


Figura 7. Estrutura do Natural Red™, uma antraquinona.

Fonte: AKILANDESWARI & PRADEEP (2016).

A hidroxiantraquinona é um derivado da antraquinona devido à substituição de um átomo de hidrogênio por um grupo hidroxila (Figura 8) (AKILANDESWARI & PRADEEP 2016).



Nome	R1	R2	R3	R4	R5	Cor
Catenarina	OH	H	OH	CH3	H	Vermelho
Crisofanol	H	H	H	CH3	H	Vermelho
Cinodontina	H	OH	OH	H	CH3	Bronze
Helmintosporina	H	OH	H	CH3	H	Marrom
Tritisporina	OH	H	OH	CH2OH	H	Vermelho-marrom
Erythroglaucina	OCH3	H	OH	CH3	H	Vermelho

Figura 8. Estruturas de hidroxiantraquinonas

Fonte: Adaptado de DUFOSSE (2014); AKILANDESWARI & PRADEEP (2016) e DUFOSSE (2017) .

Pigmentos policetídeos do tipo hidroxiantraquinonas usados em alimentos são todos oriundos de plantas ou insetos, como o caso do carmim de Cochonilha. Isso se deve ao fato de que as

hidroxiantraquinonas, obtidas a partir de processo fermentativo com muitas espécies de fungos filamentosos, são paralelamente produzidas com micotoxinas. De fato, as espécies *Aspergillus glaucus*, *A. cristatus* e *A. repens* são conhecidas por produzirem pigmentos amarelos e vermelhos compostos por hidroxiantraquinonas, tais como a emodina (amarelo) e rubrocristina (vermelho), embora também ocorra co-produção paralela de diversas micotoxinas, tais como ácido secalônico, oxalina, citrinina, cicloclorotina, entre outras, que se apresentam pigmentadas e com a estrutura de uma naftoquinona. As estruturas de hidroxiantraquinonas relativas aos pigmentos amarelos e vermelhos produzidos por esses fungos apresentam substituições em ambos os anéis das micotoxinas produzidas, indicando que ambos, pigmentos amarelo e vermelho e micotoxinas, sejam produzidas pelas mesmas rotas policéticas. Também foi relatada a co-produção dos pigmentos fisciona (amarelo) e eritroglaucina (vermelho), que apresentam estrutura de uma hidroxiantraquinona, e da micotoxina equinulina a partir da fermentação pelas espécies *Eurotium amstelodami*, *E. chevalieri* e *E. herbariorum* (GESSLER et al., 2013). Dessa forma, segundo Dufossé e colaboradores (2014), a utilização desses fungos para produção de pigmentos de hidroxiantraquinonas para alimentos não é recomendada, uma vez que essas cepas não são seguras. Entretanto, recentemente, o mesmo autor ressalta que as hidroxiantraquinonas de fungos são potenciais pigmentos para a indústria alimentícia, sendo necessários estudos que busquem cepas não tóxicas ao ser humano (DUFOSSÉ, 2018).

A hidroxiquinona é um derivado da antraquinona devido à substituição de um átomo de hidrogênio por um grupo hidroxila (AKILANDESWARI & PRADEEP, 2016). A naftoquinona também é muito importante como pigmento, e pode apresentar cores variando de amarelo até violeta, se estar relacionada a estruturas de micotoxinas (Figura 9). A naftoquinona é produzida principalmente pelo gênero *Fusarium* (MAPARI et al., 2010; STUDDT et al., 2012).

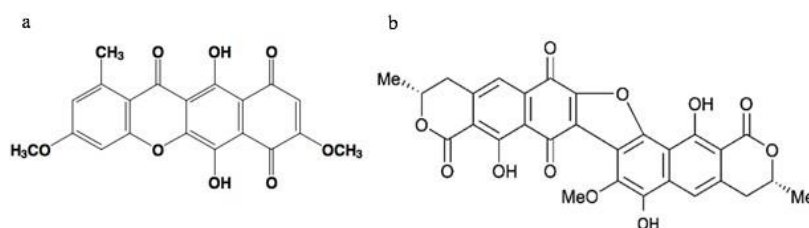


Figura 9. Estruturas moleculares de naftoquinonas. Estrutura do pigmento vermelho Bicaverina de espécies de *Fusarium* (a). Estrutura do pigmento roxo Viopurpurina de espécies de *Aspergillus* (b).

Fonte: MAPARI et al., 2010 e STUDDT et al. (2012)

2.12 Cochlioquinonas

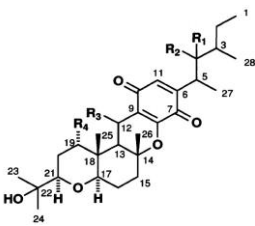
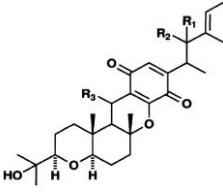
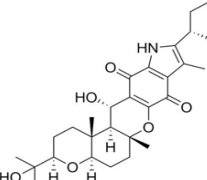
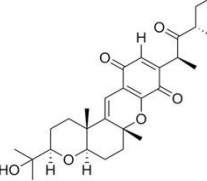
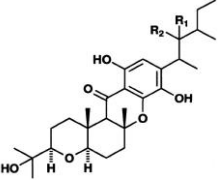
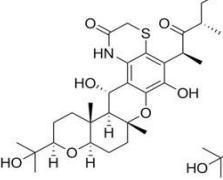
A família das cochlioquinonas engloba metabólitos secundários coloridos que têm sido muito estudados quanto às suas atividades biológicas e diversidades estruturais (HOSOKAWA et al., 2010)

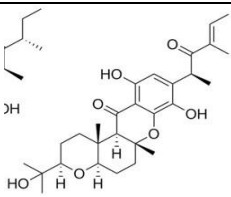
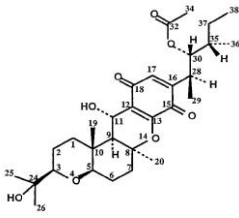
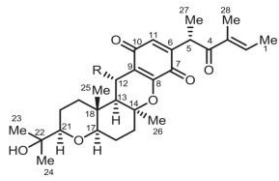
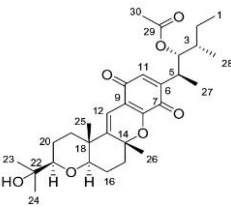
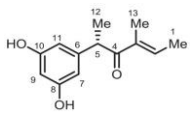
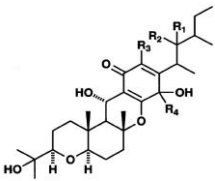
(Tabela 5). As cochlioquinonas possuem atividade anti-angiogênica (JUNG et al., 2013), atividade antagonista sobre o receptor humano de quimiocinas CCR5, um alvo crucial para a terapia anti-HIV-1 (YOGANATHAN et al., 2004), atividade citotóxica potentes *in vitro* contra linhagens de células tumorais (WANG et al., 2016), e atividade antimicrobiana (KOYAMA et al., 2005). Pouco se sabe sobre o mecanismo para essas propriedades, mas é consenso que esses compostos possuem potencial biológico e farmacêutico (PHUWAPRAISIRISAN et al., 2007). Dessa forma, as cochlioquinonas são conhecidas como pigmentos bioativos.

Os fungos produtores de cochlioquinonas mais estudados pertencem ao gênero *Bipolaris*, que inclui várias espécies fitopatógenas distribuídas mundialmente (KHIRALLA et al., 2018). Essas espécies geralmente estão associadas a manchas nas folhas, podridão da raiz, podridão do pé e outros sintomas e atacam principalmente culturas de alto valor da família Poaceae, incluindo arroz, milho, trigo e sorgo (MANAMGODA et al., 2014). Nas plantas, as espécies de *Bipolaris* produzem as cochlioquinonas e as ophiobolinas que são fitotoxinas chave para o desenvolvimento dessas doenças (PHUWAPRAISIRISAN et al., 2007). As cochlioquinonas também já foram isoladas de outras espécies fúngicas, tais como *Stachybotrys bsbyi* (FUJIOKA et al., 1996) e *Cochiobolus miyabeanus* (CARRUTHERS et al., 1971).

Na literatura pesquisada, há poucos trabalhos que tentam explicar a biossíntese das cochlioquinonas. Há apenas sugestões de que as cochlioquinonas poderiam ser formadas através da introdução de uma unidade farnesil em um precursor aromático, cujos grupos metil secundários (C-27 e C-28) derivariam do aminoácido metionina (CANONICA et al., 1976). Canonica e colaboradores (1976) propuseram um derivado 2-acetil-3,5-di-hidroxifenil 1-alkilado como precursor biossintético. Entretanto, de acordo com Arayama e colaboradores (2015), as cochlioquinonas pertencem biossinteticamente a um meroterpenoide composto por componentes sesquiterpênicos e policetídeos. O precocochliquinol D seria um primeiro exemplo de precursor biossintético plausível do segmento policetídeo nesta via biossintética para a família da cochlioquinona. O precocochliquinol D acoplaria diretamente à unidade farnesil-OPP para dar origem a um intermediário, e uma série de ciclizações ocorreriam para formar um produto único.

Tabela 5 - Relação de cochlioquinonas e derivados isolados, caracterizados e identificados.

Cochlioquinonas	Cor	m/z	Estrutura	Espécie produtora	Referência
Cochlioquinona A	Sólido amarelo	532,674 [M ⁺]	 <p>Cochlioquinona A: R1=R4=H, R2=OC²⁹(O)C³⁰H₃, R3=OH Cochlioquinona B: R1R2=O, R3=R4=H Cochlioquinona C: R1R2=O, R3=OH, R4=H Cochlioquinona E: R1R2=O, R3=H, R4=OH</p>	<i>Bipolaris</i>	Lim et al.
Cochlioquinona B	Sólido amarelo	472,622 [M ⁺]		<i>cynodontis</i>	(1998)
Cochlioquinona C	Sólido amarelo	488 [M ⁺]			
Cochlioquinona E	Sólido amarelo	488 [M ⁺]			
Cochlioquinona D	Sólido amarelo	470,606 [M ⁺]		 <p>Cochlioquinona D: R1R2=O, R3=H</p>	<i>Bipolaris</i>
				<i>cynodontis</i>	(1998)
Cochlioquinona G	Óleo vermelho	486,2878 [M+H] ⁺		<i>Bipolaris</i>	Wang et al.
				<i>sorokiniana</i>	(2016)
Cochlioquinona H	Óleo vermelho	471,2573 [M+H] ⁺		<i>Bipolaris</i>	Wang et al.
				<i>sorokiniana</i>	(2016)
Isocochlioquinona A	Óleo amarelo	532,665 [M ⁺]	 <p>Isocochlioquinona A: R1=H, R2=OC²⁹(O)C³⁰H₃ Isocochlioquinona C: R1R2=O</p>	<i>Bipolaris</i>	Lim et al.
Isocochlioquinona C	Óleo amarelo	488,621 [M ⁺]		<i>cynodontis</i>	(1998)
Isocochlioquinona D	Óleo amarelo	560,2681 [M-H] ⁻		<i>Bipolaris</i>	Wang et al.
				<i>sorokiniana</i>	(2016)

Coclioquinonas	Cor	m/z	Estrutura	Espécie produtora	Referência
Isococlioquinona E	Óleo amarelo	485,2543 [M-H] ⁻		<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Wang et al. (2016)
Epi-coclioquinona A	-	532,674		<i>Stachybotrys bsbyi</i>	Fujioka et al. (1996)
Epi-coclioquinona D	Sólido amarelo/laranja	471,2762 [M+H] ⁺	 Epi-cochlioquinona D: R=H	<i>Helminthosporium velutinum</i>	Arayama et al. (2015)
Anidrococlioquinona A	Sólido vermelho	537,2826 [M+Na] ⁺		<i>Bipolaris orizae</i>	Phuwapraisirisan et al. (2007)
Pre-coclioquinol D	-	243,0995 [M+Na] ⁺		<i>Helminthosporium velutinum</i>	Arayama et al. (2015)
Coclioquinol	Sólido amarelo	546 [M] ⁺		<i>Bipolaris cynodontis</i>	Lim et al. (1998)
Coclioquinol II	Sólido amarelo	548 [M] ⁺			
Coclioquinol III	Sólido amarelo	560 [M] ⁺			
			Cochlioquinol: R1R2=O, R3=H, R4=C ²⁹ H2C ³⁰ (O)C ³¹ H3		
			Cochlioquinol II: R1=H, R2=OH, R3=H, R4=CH2COCH3		
			Cochlioquinol III: R1=H, R2=OH, R3=CH2COCH3, R4=OC ³² H3		

2.13 Riboflavina produzida por fungos

Riboflavina ou vitamina B2 é uma vitamina essencial (KATO & PARK, 2012) e possui duas formas ativas de coenzimas: a Flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e a Flavina mononucleotídeo (FMN) (Figura 10). Muitas enzimas que catalisam reações de oxido-redução requerem FAD e FMN como grupos prostéticos (ZAND et al., 2012). Dessa forma, a riboflavina é fundamental em organismos aeróbios, uma vez que FAD e FMN são coenzimas que participam da cadeia transportadora de elétrons (POWERS, 2003). Riboflavina, FAD, FMN e formas minoritárias da riboflavina fazem parte do grupo das flavinas. Apenas a riboflavina, FAD e FMN apresentam atividade vitamínica. Entre as formas minoritárias de riboflavina estão a 10-hidroxiethylflavina e a lumiflavina (GREGORY III, 2010) e que não têm atividade vitamínica. Muitas outras flavinas se encontram ligadas a diversas enzimas que atuam na catálise de reações relacionadas ao reparo do DNA (SOUZA et al., 2005). A riboflavina também faz parte de uma flavoproteína chamada criptocromo que atua como fotorreceptor responsável pela manutenção do relógio circadiano (BANERJEE & BATSCHAUER, 2005). Essa vitamina pode ser encontrada no leite, ovos e vegetais e seu consumo deve ser diário, uma vez que sua deficiência está associada a lesões da pele e na córnea (REVUELTA et al., 2016). A riboflavina proveniente da dieta encontra-se na forma das coenzimas FAD e FMN ligadas a proteínas. A acidez estomacal propicia a liberação das coenzimas que sofrerão a ação das pirofosfatases e fosfatases, presentes no intestino delgado, levando à liberação da riboflavina. Uma vez liberada, a riboflavina pode ser absorvida por transporte ativo ou facilitado (SOUZA et al., 2005).

A riboflavina é um composto amarelo fluorescente, hidrossolúvel, e instável à luz UV. O sistema de anéis isoaloxazina é responsável por suas propriedades fotoquímicas. O espectro de absorção da riboflavina em sua forma oxidada (flavoquinona) tem três máximos: no UVB (267nm), no UVA (345nm) e na região visível (442nm). A riboflavina apresenta também um espectro de fluorescência com máximo em 532nm (SILVA, 2013a).

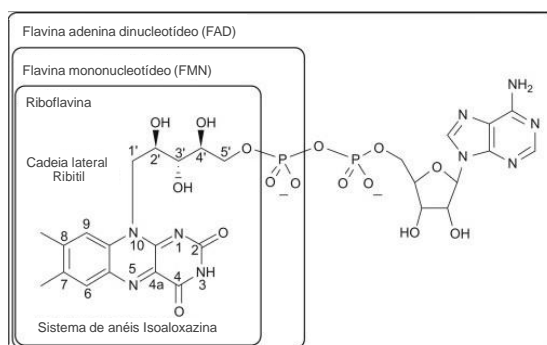


Figura 10. Estrutura molecular da riboflavina, FMN e FAD.

Fonte: MAZZOTTA et al. (2014)

Em 1879, a riboflavina foi mencionada pela primeira vez como um composto amarelo fluorescente do soro de leite e que recebeu o nome de lactocromo (NORTHROP-CLEWES & THURNHAM, 2012). Entretanto, apenas em 1933, ela teve sua função nutricional revelada, foi isolada e purificada a partir de clara de ovo, da urina, do fígado e mais tarde, do soro de leite (EGGERSDORFER et al., 2012; REVUELTA et al., 2016). Foi descoberto que sua estrutura era composta por um anel isoaloxazina metilado com uma cadeia ribitol (Figura 10). A partir daí, recebeu o nome oficial de “riboflavina” (*Flavus* = amarelo e *ribo* = cadeia lateral ribitol) (SCHWECHHEIMER et al., 2016). Por mais de cinquenta anos, a riboflavina foi produzida exclusivamente por síntese química com poucas alterações, começando pela D-glicose ou D-ribose (KURT et al., 1996).

Além da síntese química, a riboflavina pode ser produzida por plantas e micro-organismos durante o metabolismo primário. No final da década de 1980, dados sobre micro-organismos que poderiam sintetizar riboflavina começaram a surgir na literatura (REVUELTA et al., 2016). Em 1990, após vários anos de produção de riboflavina por síntese química (4000 toneladas/ano), a empresa multinacional BASF iniciou a produção de vitamina B2 em escala industrial pelo processo de fermentação por *Ashbya gossypii*. Os pesquisadores da empresa conseguiram aumentar a produtividade desse micro-organismo em 20% (ALTHÖEFER et al., 1999). Durante 6 anos, os processos químicos e biotecnológicos foram explorados simultaneamente. E ficou provado que a fermentação era economicamente vantajosa. Com isso, a síntese química de riboflavina foi abandonada (REVUELTA et al., 2016).

Com o passar dos anos, a produção microbiana de riboflavina tornou-se um dos assuntos mais importantes na biotecnologia (SCHWECHHEIMER et al., 2016). Atualmente, a produção de riboflavina é exclusivamente realizada por micro-organismos e cerca de 9000 toneladas são produzidas por ano (SCHWECHHEIMER et al., 2016). Setenta por cento de sua produção é usada como aditivo para alimentos e 30%, como insumo farmacêutico (SAHM et al., 2013). Nesses casos, a riboflavina é empregada como suplemento nutricional, bem como um pigmento natural amarelo em iogurtes e bebidas. (SCHWECHHEIMER et al., 2016). Os pigmentos produzidos por micro-organismos do tipo flavinas compreendem derivados da riboflavina, incluindo FAD e FMN. A produção por fermentação é viável economicamente e ecologicamente e os processos dominantes envolvem a bactéria gram + *Bacillus subtilis* e o hemiascomiceto *Ashbya gossypii*. Esses dois micro-organismos possuem dois precursores importantes na biossíntese de riboflavina, que são a ribulose 5-fosfato (derivada da via pentose fosfato - PP) e a guanosina trifosfato (GTP) (originada a partir da biossíntese das purinas) (BACHER et al., 2000). Além desses dois micro-organismos, muito outros são capazes de sintetizar riboflavina com alta produtividade, tais como *Candida famata*, *Clostridium acetobutylicum*, *Lactobacillus fermentum* e *Aspergillus terreus* (NAFADY et al., 2015;

SCHWECHHEIMER et al., 2016).

A partir dos precursores ribulose 5-fosfato e GTP, a riboflavina de *Ashbya gossypii* é sintetizada em sete etapas enzimáticas (Figura 11). A ciclo-hidrolase de GTP catalisa a clivagem de GTP com a liberação de formato (passo codificado por RIB1). A primeira reação é seguida por uma redução no fungo, realizada pela DARPP redutase (produto gênico de RIB7), e uma desaminação subsequente pela DARPP deaminase (produto gênico RIB2). A fosfatase que cliva ArPP (5-amino-6-ribitilamino-2,4 (1H, 3H)- pirimidinadiona 5'-fosfato) em ArP (5-amino-6-ribitilamino-2,4 (1H, 3H)-pirimidinadiona) é a única enzima desconhecida da via biossintética da riboflavina. A 5-fosfato de ribulose é convertida em DHBP (4-fosfato de 3,4-di-hidroxi-2-butanona) pela DHBP sintase (produto gênico de RIB3). Neste ponto, os dois ramos diferentes da via da riboflavina se fundem em um. A condensação de DHBP e ArP produz uma molécula de DMRL (6,7-dimetil-8-ribitilumazina) e é catalisada pela lumazina sintase (produto gênico de RIB4). Na etapa final da via biossintética da riboflavina, a enzima riboflavina sintase converte duas DRL em uma riboflavina e uma ARP, que é reutilizada na etapa anterior (FISCHER & BACHER, 2005).

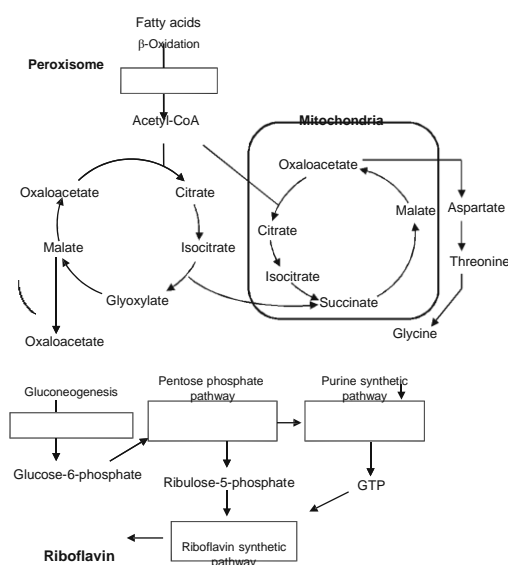


Figura 11. Rota metabólica para a síntese de riboflavina por *A. gossypii*.

Fonte: KATO & PARK (2012)

Alta produtividade de riboflavina tem sido alcançada por meio do emprego de cepas de *A. gossypii* e *B. subtilis* mutantes, a partir de métodos de mutagênese clássica, que foca na síntese terminal da riboflavina. Mais recentemente, o interesse de pesquisa sobre alta produtividade mudou para o suprimento de precursores por modernas estratégias de engenharia metabólica (REVUELTA et al., 2016). Pesquisas envolvendo engenharia metabólica promoveram a superexpressão de enzimas, aumentando o fluxo de carbono através da via PP: glicose desidrogenase (ZHU et al., 2006), glicose-6-fosfato desidrogenase (DUAN et al., 2010), ribose 5- fosfato isomerase e fosforibosilpirofosfato (PRPP) sintetase (SHI et al., 2009a). Outras pesquisas promoveram também a co-superexpressão de

genes do *pur operon*, que codificam enzimas que catalisam reações usando co-substratos como glutamina ou glicina, o que favorece a produção de riboflavina (SHI et al., 2009b). Além disso, a interrupção de repressores dos genes do *pur operon* aumentou a produção de riboflavina (SHI et al., 2014). *A. gossypii* tende a acumular riboflavina em vacúolos, o que é um problema, principalmente para processos industriais (KIND et al., 2011). Para amenizar esse problema, a subunidade vacuolar foi destruída, levando a um aumento da riboflavina secretada (FÖRSTER et al., 1999).

Ashbya gossypii é capaz causar uma superprodução de riboflavina quando óleo é utilizado como fonte de carbono. O óleo é clivado em ácidos graxos e glicerol por uma lipase extracelular. Os ácidos graxos são transportados para a célula e oxidados em acetil-CoA através da via de β -oxidação, localizada no peroxissoma. O acetil-CoA é posteriormente metabolizado via ciclo do glioxilato, gliconeogênese e via PP (SCHWECHHEIMER et al., 2016). Dessa forma, a via glioxílica desempenha um papel crucial no metabolismo de *Ashbya gossypii*. Alguns pesquisadores promoveram a superexpressão da malato sintase, aumentando a produtividade da riboflavina em cerca de 1,7 vezes (SUGIMOTO et al., 2009). Recentemente, a alteração da via da pirimidina resultou em um aumento no suprimento de precursores para a biossíntese de purinas e, portanto, na produção de riboflavina (SILVA et al., 2015). Glicose também tem sido descrita como uma fonte de carbono alternativa e de um modo geral, é o substrato mais usado pelos pesquisadores (LEDESMA- AMARO et al., 2015; SILVA et al., 2015). Suplementação com glicina também é comum para a produção de riboflavina. Na verdade, uma molécula de glicina é incorporada ao anel pirimidina que é uma subunidade do anel isoaloxazina (SCWECHHEIMER et al., 2018).

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

2.14 Fontes de carbono e nitrogênio e pH inicial e a influência sobre a produção de pigmentos policetídeos

A biossíntese de pigmentos policetídeos é complexa. E talvez por isso, ainda existam poucos

estudos sobre a regulação em níveis molecular e genético (YANG et al., 2015a). Sabe-se que os genes necessários para a biossíntese de um metabólito secundário em fungos, incluindo policetídeos, estão agrupados (clustered), e que muitos deles são silenciosos sob condições laboratoriais padrão (BRAKHAGE & SCHROECKH, 2011; YANG et al., 2015a). Dessa forma, muitos produtos podem não ser encontrados, sendo que apenas em algumas condições fisiológicas, esses genes são ativados (MAPARI et al., 2010). Por essa razão, é de grande importância o estudo do efeito das condições de cultura, principalmente, da relação carbono-nitrogênio, pH e luminosidade (ARULDASS et al., 2018; SAGARAM et al., 2006; PALACIO-BARRERA et al., 2019).

Muitos trabalhos tentando desenvolver ou melhorar processos fermentativos com vistas à produção de pigmentos por fungos têm sido realizados com modificações das condições de cultivo (SINGH et al., 2015; AHMAD & PANDA, 2014; CELESTINO et al., 2014; COSTA & VENDRUSCOLO, 2017; GUNASEKARAN & POORNIAMMAL, 2008; ORAK et al., 2018; SANTOS-ENINUMA, 2013). Um mesmo fungo pode produzir pigmentos de cores diferentes devido à sua estrutura molecular que pode sofrer reações químicas, dependendo das condições do meio de cultivo, principalmente da razão carbono:nitrogênio (C/N) e do pH inicial (SHI et al., 2015).

Nitrogênio é um dos mais importantes elementos que pode ser incorporado à célula fúngica, tanto em sua forma orgânica (ureia, aminoácidos, peptonas), quanto inorgânica (amônia, nitrato), para que ocorra a síntese de proteínas, vitaminas e ácidos nucleicos (ARAI et al., 2013; PALACIO-BARRERA et al., 2019). Fontes orgânicas de nitrogênio favorecem mais a produção de pigmentos que as fontes inorgânicas (PRADEEP et al., 2013), talvez pelo fato de apresentarem em sua composição outros elementos além do nitrogênio, que também favorecem o crescimento dos fungos. Entretanto, alguns autores relatam que a fonte orgânica de nitrogênio, glutamato monossódico, está relacionada à diminuição da produção de pigmentos extracelulares (ZHANG et al., 2013; CELESTINO et al., 2014; PALACIO-BARRERA et al., 2019), embora essa mesma fonte já tenha sido identificada como a que proporcionou a maior produção por *Monascus purpureus* e *Monascus pilosus* (MURKHERJEE & SINGH, 2011; PISAVERA & KUJUMDZIEVA, 2010).

A influência positiva da peptona como fonte orgânica de nitrogênio sobre a produção de pigmentos já foi detectada (GUNASEKARAN & POORNIAMMAL, 2008; SANTOS-EBINUMA et al., 2013; CELESTINO et al., 2014). Peptona é obtida como um hidrolisado de proteínas preparado a partir de materiais proteicos de animais e de plantas. Além de peptídeos e aminoácidos, fornece também carbono e enxofre, o que favorece o crescimento dos fungos (TASKIN et al., 2016; PRADEEP et al., 2013), e a produção de pigmentos durante seu metabolismo (QUERESHI et al., 2010; ORAK et al., 2018).

Extrato de malte e extrato de levedura são fontes de aminoácidos, coenzimas, vitaminas e fatores de crescimento e que também têm sido usados como fontes orgânicas de nitrogênio

(PRADEEP et al., 2013; CELESTINO et al., 2014).

Em relação às fontes inorgânicas, amônia e nitrato podem ser transportados para a célula e convertidos em aminoácidos por assimilação, envolvendo duas enzimas principais: glutamato desidrogenase e glutamina sintetase (ARAI et al., 2013). Entretanto, há evidências que demonstram a baixa capacidade dessas fontes em aumentar a produção de pigmentos, quando comparadas às fontes orgânicas (CELESTINO et al., 2014; QUERESHI et al., 2010). A redução intensa sobre a produção de pigmentos a partir de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, por exemplo, pode estar relacionada à produção de NH_4^+ que é considerado composto tóxico às células, e ao aumento da produção de compostos de caráter ácido que são capazes de acidificar o meio (SANTOS-EBINUMA et al., 2013).

Os fungos são organismos heterotróficos e requerem uma fonte de carbono exógeno. Alguns deles usam compostos complexos de carbono, enquanto outros são mais seletivos (SANTOS-EBINUMA et al., 2013). Com isso, diferentes compostos podem ser usados como fonte de carbono, desde monossacarídeos (glicose, frutose, ramnose, xilose) e dissacarídeos (sacarose, maltose e lactose), até carboidratos complexos. A relação entre o consumo de fontes de carbono e a produção de pigmentos parece ser dependente da cepa empregada, ou seja, alguns carboidratos são mais facilmente assimiláveis por algumas cepas que por outras (PISAREVA & KUJUMDZIEVA, 2010; SANTOS-EBINUMA et al., 2013).

Glicose é um monossacarídeo que favorece o crescimento do fungo, mas pode interferir sobre a biossíntese de muitos metabólitos secundários (SOPANDI et al., 2012). Alguns autores relataram a diminuição da produção de pigmentos fúngicos devido ao fenômeno de repressão catabólica quando glicose ou frutose foram usadas como fonte de carbono (DHAKE & PATI, 2005; CELESTINO et al., 2014; SANTOS-EBINUMA et al., 2013; SOPANDI et al., 2012). Esse fenômeno ocorre quando a presença de duas ou mais fontes de carbono facilmente assimiláveis pelo fungo, como a glicose, pode reduzir ou até mesmo suprimir a produção do metabólito de interesse (CELESTINO et al., 2014). Além disso, já foi demonstrado que alta concentração de glicose no meio pode proporcionar uma produção significativa de etanol que limita a acumulação de pigmentos durante o período final da fermentação (WANG et al., 2017).

Diferentes fontes de carbono e nitrogênio foram avaliadas por Santos-Ebinuma et al. (2013) em relação à produção de pigmentos amarelo, laranja e vermelho por *Penicillium purpurogenum*. Glicose e extrato de levedura foram as fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, mais convenientes para a produção de pigmentos.

As características e a produtividade de pigmentos por alta densidade de células de *Monascus anka* foram avaliadas pela primeira vez, em quatro meios de cultura com composições distintas (CHEN et al., 2015). Os autores alcançaram o peso máximo de biomassa seca empregando meio de

cultura contendo fontes de carbono, nitrogênio e elementos traço, embora, nessas condições, tenham obtido um decréscimo de 14,6% do total de pigmentos e os pigmentos amarelos foram dominantes. Nesse caso, ficou demonstrado também que a presença de elementos traço (Zn, Fe, Mn), proporcionou o aumento da síntese de pigmento.

Celestino e colaboradores (2014) estudaram a síntese de esclerotiorina por *Penicillium sclerotiorum* 2 AV2 e verificaram a influência das fontes de nitrogênio e carbono. Sua produção foi em média três vezes maior no meio preparado com ramnose quando comparado ao 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). Entretanto, quando os autores associaram a melhor fonte de carbono (ramnose) com a melhor fonte de nitrogênio (peptona nitrogenada), houve uma redução na produção de pigmentos, fato que deixou claro a necessidade de novos estudos acerca da otimização da composição do meio de cultura.

Recentemente, estudos abordando a influência de material lignocelulósico como fonte de carbono tem ganhado interesse. A utilização de bagaço de cana hidrolisado possibilitou a produção de pigmento vermelho de *Monascus* de alta estabilidade térmica. Esse resultado pode proporcionar aumento do valor agregado desse material tornando-o ainda mais interessante às biorefinarias que trabalham com etanol de segunda geração (HILARES et al., 2018). Espigas de milho hidrolisadas também já foram usadas como fonte de carbono de natureza lignocelulósica para produção de pigmento por *Penicillium resticulosum* (SOPANDI et al., 2012).

O interesse pela utilização de resíduos agroindustriais como fontes de nutrientes, com vistas à produção de pigmento, também tem crescido. A produção de pigmentos pelos fungos *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium vasconiae* *Fusarium graminearum*, *Monascus purpureu* foi testada em resíduos de uva, casca de arroz, proteína da soja, proteína de queijo, farinha de peixe e farinha de penas. Pigmento amarelo foi predominante e cepas de *P. chrysogenum* foram as maiores produtoras (LOPES et al., 2013). Peptona de penas de galinha foi aplicada como substrato para produção de pigmentos de *Monascus* por fermentação submersa (ORAK et al., 2018), assim como peptona de peixe e peptona de protease. Os autores verificaram que as três peptonas induziram de forma similar a produção de pigmento amarelo, que por sua vez foi maior que a produção de pigmentos vermelho e laranja. Entretanto, a produção de pigmentos vermelho e laranja em peptona de pena de galinha e peptona de peixe foi maior que em peptona de protease. Farinha de algodão desengordurada também foi usada como fonte de nitrogênio, para produção do pigmento bicaverina, uma naftoquinona, por um mutante de *Fusarium fujikuroi* (LALE & GADRE, 2016). A farinha de algodão desengordurada combinada com glicose proporcionou uma produção de 6,3g/L de bicaverina, que foi maior do que a relatada em estudos anteriores, tanto por fermentação submersa, quanto por semi-sólida.

O pH inicial é capaz de influenciar a produção de pigmentos. Metabolicamente, o pH do meio de cultivo pode afetar o transporte de certos nutrientes através das células dos micro-organismos, como as fontes de carbono e nitrogênio (SINGH et al.; 2015) e também atividade de enzimas que estão envolvidas na produção de pigmentos (MÉNDEZ et al., 2011). Além disso, alguns pigmentos podem sofrer reações químicas dependendo do pH do meio e da razão carbono:nitrogênio (C/N). De um modo geral, pH baixo favorece a produção de pigmentos amarelo e laranja para alguns fungos, enquanto pH relativamente alto aumenta a produção de pigmento vermelho (CHEN et al., 2015). Tal fato foi observado por KANG et al. (2013) que acompanharam a produção de pigmentos por *Monascus anka*. Foi usado glutamato monossódico como única fonte de nitrogênio e em diferentes valores iniciais de pH (2,5; 3,5; 6). Os resultados revelaram que o pH inicial do meio baixo (3,5) aumentou a utilização de glutamato monossódico e a saída de pigmentos vermelhos extracelulares hidrossolúveis para o meio fermentado.

2.15 Luminosidade e a influência sobre a produção de pigmentos policetídeos

Outro fator muito importante para o desenvolvimento dos fungos é a incidência de luz, que regula muitas rotas metabólicas (CHEN et al., 2016). Alguns efeitos relacionados à incidência de luz são a hiperpolarização da membrana celular, aumento do nível intracelular de ATP, mudanças na taxa de consumo de oxigênio, quebra de glicogênio (BÜHLER et al., 2015), e supressão da liberação de esporos (CORROCHANO, 2007). De um modo geral, nota-se que a incidência de luz pode diminuir a produção de pigmentos por fungos filamentosos, o que indica que possuem fotorreceptores que influenciam nas respostas fisiológicas (BÜHLER et al., 2015).

A incubação no escuro dos fungos *Monascus purpureus*, *Isaria farinosa*, *Emericella nidulans*, *Fusarium verticillioides* e *Penicillium purpurogenum*, seguida pela incubação sob luz vermelha, azul e branca proporcionou boa produção de biomassa e pigmentos extra e intracelulares (VELMURUNGAN et al., 2010b).

A maior produção de pigmento vermelho de *Monascus ruber* foi obtida da fermentação do bagaço hidrolisado de cana-de-acúcar, na ausência de luz. Enquanto que a maior produção do mesmo pigmento vermelho, em meio base contendo glicose, ocorreu sob incidência de luz laranja, seguida de luz branca (HILARES et al., 2018). Em outro estudo, também com *M. ruber*, a exposição direta à luz inibiu o crescimento e a produção de pigmento vermelho (BÜHLER et al., 2015). Neste trabalho, observou-se que a intensidade da luz também é um fator importante que deve ser considerado para a compreensão do metabolismo do fungo. No cultivo de *M. ruber*, a inibição do crescimento e produção de pigmento foi observada em placas de Petri e em frascos blaffed expostos à iluminação direta. O crescimento e a produção de pigmentos foram maiores em placas de Petri e em frascos expostos à luz vermelha e na ausência de luz. A taxa de crescimento radial do fungo em placas no escuro foi de 1,50

mm/dia e em placas expostas a iluminação direta foi de 0,59 mm/dia. A produção máxima de pigmentos vermelhos (8,32UA) e a biomassa (8,82g/L) foram obtidas em frascos cobertos com filme vermelho e 7,17UA de pigmentos vermelho, e 7,40g/L de biomassa foi obtida em frascos incubados na escuridão. Sob condições de 1248 lux de luminância, a produção máxima de pigmentos foi de 4,48UA, com produção de 6,94g/L de biomassa, indicando que o fungo possui fotorreceptores que influenciam nas respostas fisiológicas.

No estudo de Palacio-Barrera e colaboradores (2019), a exposição constante à luz azul reduziu a produção de seis tipos de pigmentos do fungo do gênero *Monascus*, quando comparada à ausência de luz (PALACIO-BARRERA et al., 2019). Além disso, a variação da intensidade e do tempo de exposição à luz azul também foi avaliada e proporcionou diferentes efeitos sobre os pigmentos produzidos. Por exemplo, a exposição a 100 lux de luz azul por 30min/dia e a 100 lux, duas vezes ao dia, por 15min, proporcionou aumento de 4 pigmentos (rubropunctatamina, monascorubramina, monascina e ankaflavina), em comparação à ausência de luz.

2.16 Otimização da produção de pigmentos policetídeos

Conhecendo a influência que o meio de cultura tem sobre a produção de pigmentos, trabalhos têm buscado estratégias para aumentar a produção com a otimização do processo, para aplicação industrial. A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) tem sido usada para esse propósito.

Alguns autores avaliaram as condições ótimas de cultivo de *Monascus purpureus*, para aumentar a produção de pigmentos policetídeos. Ahmad e Panda (2014) otimizaram a produção de pigmentos vermelhos por *M. purpureus* através de fermentação semi-sólida, empregando arroz como substrato. As variáveis foram selecionadas, usando delineamento experimental Plackett-Burman e, em seguida, empregadas na otimização por Delineamento Composto Central Rotacional. A produção máxima foi de 12mg de pigmento/g de arroz base, a partir das variáveis glicose 74,59g/L, peptona 5,54g/L, NH₄Cl 6,57g/L, MnSO₄.H₂O 0,58g/L e extrato de malte 14,46g/L, e os valores ótimos foram determinados por MSR. A otimização da produção de pigmento pela mesma espécie foi realizada (PRAJAPATI et al., 2014) através do delineamento Plackett-Burman, em que as variáveis glicose, triptona e pH foram altamente significativas. Os valores ótimos para essas variáveis foram encontrados através da MSR e a máxima produção foi alcançada com glicose (28g/L), triptona (1g/L) e pH 8,0. Zhou e colaboradores (2009) otimizaram por MSR a produção de pigmento amarelo por um mutante de *Monascus anka*, logo após a seleção de variáveis por delineamento Plackett-Burman. A produção máxima ocorreu com 10,3g/L de peptona, 11,9g/L de NH₄NO₃ e 4,7g/L de KH₂PO₄, no meio.

Apesar da importância da MSR como ferramenta de otimização, as Redes Neurais Artificiais

(RNA) têm surgido como opção interessante para fins de otimizar a produção de pigmentos. Ainda são poucos os trabalhos que envolvem essa ferramenta e a produção de pigmentos por fungos. Singh e colaboradores (2015) investigaram a aplicação de RNA para produção de pigmento vermelho de *Monascus purpureus* em fermentação submersa. Os parâmetros tempo de incubação, pH da água de arroz e concentração de NH_4NO_3 foram usados como neurônios de entrada, enquanto o teor de pigmento/biomassa foi usado como neurônio de saída. O teor/biomassa máximo foi obtido em substrato com valor de pH 4,0, sem nenhuma fonte de nitrogênio e após 12 dias de incubação. A partir desse trabalho, o modelo obtido de RNA pode prever os efeitos dos parâmetros avaliados sobre o teor de pigmento vermelho.

2.17 Produção paralela de pigmentos e micotoxinas

A produção de citrinina por *Monascus*, paralelamente à produção de pigmentos, despertou o interesse por estudos buscando encontrar alternativas na tentativa de minimizar e até anular a produção dessas micotoxinas durante a produção de pigmentos por outros fungos filamentosos. Essas alternativas tentam modificar as condições de cultura, desenvolver cepas incapazes de sintetizar citrinina e a bioprospecção de outros gêneros, além de *Monascus*, que também sejam capazes de sintetizar pigmentos, sem a co-produção (DUFOSSÉ et al., 2014).

Em relação às modificações das condições de cultivo, foi verificado que a fonte de nitrogênio está diretamente relacionada ao pH final, que por sua vez, regula a biossíntese de citrinina por *Monascus anka* (KANG et al., 2014). Portanto, fonte de nitrogênio deve ser bem selecionada para controle do pH final e, conseqüentemente, da citrinina produzida. Chen e colaboradores (2015) avaliaram as características e a produtividade de pigmentos por alta densidade de células de *Monascus anka* em quatro meios de cultura com composições distintas. Paralelamente, a produção de citrinina também foi avaliada e não encontraram relação entre o teor dessa micotoxina, que foi considerado extremamente baixo, com a composição do meio de cultura que continha fonte de carbono (glicose), nitrogênio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e fósforo.

Muita atenção tem sido dada à capacidade de algumas espécies de fungos produzirem pigmentos policetídeos sem a produção paralela de micotoxina. Em geral, essas espécies produzem pigmentos análogos aos pigmentos produzidos por *Monascus* (MLP - Monascus-like pigments), sendo, portanto, azafilonas. As espécies mais estudadas nesse sentido pertencem ao gênero *Talaromyces* sp.

Yilmaz e colaboradores (2012) identificaram 3 espécies relacionadas à espécie *Talaromyces purpurogenum*, reconhecida como produtora de pigmento análogo ao pigmento de *Monascus* (MLP), porém capaz de produzir quatro tipos diferentes de micotoxinas: rubratoxina, luteosquirina, ácido espiculisporico e rugulovasina. As espécies identificadas como *T. amestolkiae*, *T. stollii* e *T. ruber*,

apesar de estarem relacionadas com a produção de pigmentos MPL, não produzem nenhuma das micotoxinas típicas de *T. purpurogenum* ou citrinina, entretanto a presença de outras micotoxinas ainda precisa ser investigada.

Cepas de *Talaromyces albobiverticillius* foram recentemente isoladas de ambiente marinho ao redor da Reunion Island, no Oceano Índico (VENKATACHALAM et al., 2018a). Foi demonstrado que essas cepas têm a capacidade de produzir 12 compostos extra e intracelulares que exibem tonalidades laranja e vermelho, sob fermentação submersa em PDA. Dois desses compostos foram produzidos em maior quantidade, sendo o composto 4 de cor vermelha e o composto 8 de cor laranja. Em um trabalho seguinte, Venkatachalam e colaboradores (2018b) extraíram os pigmentos intra e extracelulares por extração a frio ou por ação de solventes, que foram analisados por HPLC-PDA-ESI/MS. Dentre os 12 compostos, 4 foram identificados como MLP. E pela primeira vez, foi identificado o pigmento produzido por *Talaromyces albobiverticillius* chamado N-GABA-PP-V (6 - [(Z) -2-Carboxinil] -N-GABA-PP-V) que possui a configuração cis entre C10-C11.

Uma cepa de *Penicillium purpurogenum* foi relacionada à produção do pigmento PP-V [(10Z)-12- carboxyl-monascorubramine], análogo ao de *Monascus*, com a presença de nitrato de amônio no meio de cultura (ARAI et al., 2013). Os autores descobriram que os genes para as enzimas glutamina sintetase e de glutamato desidrogenase foram expressos durante a produção de PP-V. E que glutamina e glutamato produzidos por essas enzimas suportam a biossíntese de PP-V. Entretanto, a biossíntese de PP-V foi muito mais eficiente com glutamina. Dessa forma, foi concluído que a síntese de glutamina, pela glutamina sintetase, na presença de amônio foi importante para a produção de PP-V.

Segundo Dufossé e colaboradores (2014), um trabalho sobre fermentação submersa, para a produção de pigmentos por espécie (*Talaromyces* sp.) não produtora de micotoxina já foi submetido ao processo de patenteamento. Nesse trabalho, os autores alcançaram um aumento significativo na produção de pigmentos, porém com um número reduzido de constituintes, sendo o constituinte em maior abundância, um derivado da monascorubramina. Obter pigmentos com um número reduzido de constituintes é interessante uma vez que facilita o processo de caracterização.

Outra espécie capaz de produzir pigmento policetídeo livre de micotoxina é *Epicoccum nigrum*. Mapari e colaboradores (2008) avaliaram a produção de pigmentos por quatro cepas não patogênicas da espécie *Epicoccum nigrum*, em quatro meios de cultura diferentes. Os pigmentos demonstraram maior estabilidade à luz que os pigmentos de *Monascus* tradicionalmente usados.

2.18 Elucidação das estruturas moleculares de pigmentos

A elucidação das estruturas moleculares correspondentes aos pigmentos produzidos por fungos filamentosos através de processos fermentativos é realizada após processos de separação. Os

processos de separação geralmente envolvidos são a separação líquido-líquido, a separação em coluna e a separação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (High performance liquid chromatography - HPLC). Os solventes e as fases móveis empregados são determinados de acordo com a natureza do pigmento produzido e de acordo com as particularidades de cada experimento. Uma vez isolado o pigmento, sua estrutura molecular pode ser elucidada. Essa elucidação ocorre através de métodos espectrofotométricos, tais como a espectroscopia de infravermelho (IR), a ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (MS) (LOPES et al., 2013; MUCKHERJEE & SINGH, 2011; VELMURUGAN et al., 2010b). Todas essas metodologias são empregadas na desreplicação de moléculas, que consiste em identificar e diferenciar compostos ou classe de compostos 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).

A partir do isolamento do pigmento produzido pelo fungo filamentosso *Penicillium sclerotiorum* 2AV2, Celestino e colaboradores (2014), realizaram sua caracterização estrutural por RMN, e concluíram se tratar do pigmento esclerotiorina.

Por meio de espectrometria de massas (TOF-MS e TOF-MS/MS), Lopes e colaboradores (2013) identificaram pigmentos e micotoxinas já descritos na literatura, nos extratos de quatro linhagens de fungos filamentosos (dois isolados de *Penicillium chrysogenum*, um de *Fusarium graminearum* e um 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 espectrometria UV-vis, espectrometria infravermelho, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e análises por RMN.

Em estudo recente, Venkatachalam e colaboradores (2018b) conseguiram isolar e identificar estruturas de pigmentos análogos ao pigmento de *Monascus*, produzidos por *Talaromyces albobiverticillius* em cultivo submerso, realizando a separação dos compostos por HPLC/MS. Foram detectados 12 compostos, sendo 10 pigmentados e 4 deles análogos ao pigmento de *Monascus*.

Sendo assim, o emprego de métodos espectrofotométricos, isolados ou não, possibilitam a caracterização química dos componentes coloridos correspondentes aos pigmentos, ajudando na seleção de fungos filamentosos com potencial para produção de pigmentos para serem empregados na indústria de alimentos (MAPARI et al., 2005).

2.19 Estabilidade de pigmentos microbianos

Degradação de cor é comum para pigmentos naturais e como forma de compensar essa perda, costuma-se aumentar a quantidade de pigmento utilizado (VENDRUSCOLO et al., 2013; HILARES et al., 2018). O estudo acerca da estabilidade de pigmentos naturais é importante porque a manutenção da cor é um pré-requisito para uma aplicação bem-sucedida (VENDRUSCOLO et al., 2013). Mas sabe-se que esses pigmentos são compostos insaturados e propensos à desintegração pela luz, calor e oxigênio, além de poderem mudar a cor dependendo do pH do meio (MAPARI et al., 2009). A degradação de pigmento e, conseqüentemente, de sua cor, pode ocorrer por vários tipos de reações como isomerização, oxidação, ataque nucleofílico, abertura de anéis, polimerização, desidrogenação, hidrólise e descarboxilação (RODRIGUEZ-AMAYA, 2018). De um modo geral, pigmentos microbianos são mais estáveis à variação de temperatura e pH que os pigmentos naturais (HILARES et al., 2018). Essa característica é importante, visto que o tratamento térmico é um dos principais métodos de preservação de alimentos (VENDRUSCOLO et al., 2013). Portanto, há uma grande área a ser estudada com a finalidade de descobrir pigmentos naturais mais estáveis, ampliando as aplicações industriais (MAPARI et al., 2009).

Degradação térmica de pigmentos vermelho e amarelo produzidos por *Monascus* já foi observada (COSTA et al., 2005; VENDRUSCOLO et al., 2013). Entretanto, Gunasekaran e Poorniammal (2008) verificaram alta estabilidade do pigmento vermelho de *Penicillium* sp, mesmo após processo de esterilização (121°C for 20min).

Não há um consenso sobre a estabilidade à variação de pH, demonstrando que, provavelmente, ela está relacionada à estrutura molecular do pigmento avaliado. A mudança de cor deve-se a reações que ocorrem entre as moléculas do pigmento e do meio. A estabilidade de pigmentos muitas vezes depende do aminoácido ou da proteína associados às suas estruturas (CARVALHO et al., 2005). Por exemplo, Vendruscolo e colaboradores (2013) verificaram que a estabilidade do pigmento laranja de *M. ruber* aumentou à medida que o pH diminui de 5,5 a 4,08, mas diminuiu quando pH passou de 4,08 para 6,91. Ou e colaboradores (2009) demonstraram a estabilidade do pigmento monacolina K produzida por *Monascus* sp. na faixa de pH entre 3 e 9, porém notaram a degradação com o aumento do pH de 9 a 11. E Carvalho e colaboradores (2005) verificaram que o pigmento vermelho de uma cepa de *Monascus* era instável em pH menor que 6.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Isolar fungos filamentosos endofíticos de videiras (*Vitis vinífera*) em três vinhedos, no município de Diamantina (mesorregião do Jequitinhonha, de Minas Gerais), visando a obtenção de pigmentos com potencial aplicação na indústria de alimentos.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar fungos filamentosos endofíticos de videiras (*Vitis vinífera*);
- isolar fungos filamentosos endofíticos com potencial para produção de pigmentos – seleção primária;
- selecionar uma das linhagens isoladas para ser identificada e empregada para produção de pigmento – seleção secundária;
- caracterizar o pigmento por espectroscopia UV-Vis, FT-IR e cromatografia HPLC;
- separar por cromatografia UPLC e identificar o componente majoritário do pigmento por espectroscopia de massas (MS);
- purificar parcialmente o pigmento por método alternativo;
- avaliar a estabilidade do pigmento à temperatura e ao pH;
- estudar o efeito das fontes de carbono, nitrogênio e pH inicial sobre a produção do pigmento;
- melhorar a produção do pigmento através de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

CAPÍTULO 1

ARTIGO 1

Pigmentos naturais bioativos de cor amarela produzidos pelo fungo endofítico *Arcopilus aureus*
isolado de videira (*Vitis vinífera*)

Revista: Bioresource Technology

Fator de impacto: 6,669

Qualis Capes: A1

Pigmentos naturais bioativos de cor amarela produzidos pelo fungo endofítico *Arcopilus aureus* isolado de videira (*Vitis vinífera*)

Luciana Amaral de Faria Silva^a, Mariana Ferreira Alves^b, Daniel Florêncio Filho^c, Jacqueline Aparecida Takahashi^d, Leandro Soares Santos^e, Silmara Almeida de Carvalho^{f*}

^{a,b} Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. Rodovia BR 415, Km 03, s/n, 45700-000, Itapetinga, Bahia, Brasil.

^c Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. Rua José Moreira Sobrinho, s/n, 45206-190, Jequié, Bahia, Brasil.

^d Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. Av. Antônio Carlos, 6627, 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

^e Departamento de Tecnologia Rural e Animal, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. Rodovia BR 415, Km 03, S/N, 45700-000, Itapetinga, Bahia, Brasil.

^f Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. Rodovia BR 415, Km 03, S/N, 45700-000, Itapetinga, Bahia, Brasil.

*Corresponding author: Tel.: +55 77 32611720. Email address: scarvalho@uesb.edu.br
Rodovia BR 415, Km 03, S/N, 45700-000, Itapetinga, Bahia, Brasil. Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais, UESB.

Resumo

Novas cepas fúngicas são consideradas uma solução promissora como fontes de pigmentos naturais microbianos utilizados em substituição aos corantes artificiais. Muitos pigmentos naturais microbianos também apresentam potencial biológico e farmacêutico, e são conhecidos como pigmentos bioativos. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial de produção de pigmentos naturais por fungos endofíticos isolados de videiras. Pela primeira vez, a cepa identificada como *Arcopilus aureus* foi selecionada como fonte potencial para produção de pigmento amarelo. Foi detectado que o pigmento amarelo possui os componentes cochliquinol II, como composto majoritário, e riboflavina. Ambos os componentes são considerados pigmentos bioativos. O pigmento foi caracterizado, parcialmente purificado e testado quanto à sua estabilidade. A purificação parcial do pigmento foi possível empregando um método alternativo, com resinas de troca iônica e hidrofílica, associado à separação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A estabilidade do pigmento frente às variações de temperatura e pH foi expressa por modelos quadráticos. Foi verificado que o pigmento estudado manteve-se relativamente estável frente à variação de temperatura e apresentou aumento na intensidade da absorção e da cor com a redução do pH. A produção de riboflavina ou cochliquinol II por *A. aureus* não foi reportada até o momento na literatura pesquisada. Portanto, trata-se de uma nova fonte de moléculas cujas famílias apresentam um futuro potencial não só como pigmentos, mas também como moléculas bioativas.

A partir dos modelos, foi verificado que o pigmento estudado manteve-se relativamente estável frente à variação de temperatura e apresentou aumento na intensidade da absorção e da cor com a redução do pH.

Palavras-chave: *Arcopilus aureus*. Cochliquinona. Riboflavina. Caracterização. Purificação parcial. Estabilidade.

1. Introdução

Há um crescente interesse pela utilização de recursos não tóxicos em diversos ramos industriais, dentre eles, os pigmentos naturais. Pigmentos naturais são renováveis e biodegradáveis, podendo ser utilizados em cosméticos, medicamentos, tingimento de tecidos e, principalmente, como ingredientes de alimentos (Shahid et al., 2013). São considerados como uma potencial “*Green Chemistry*” para substituição dos corantes artificiais (Aruldass et al., 2018). Além disso, representam um nicho de mercado importante, em que os consumidores estão dispostos a pagar mais caro em busca de uma alimentação mais saudável (Sopandi et al., 2012; Dufossé et al., 2014). Esse fato pode ser ilustrado pelo sucesso de marketing de pigmentos naturais não convencionais derivados de microalgas, como b-caroteno, luteína e astaxantina, e convencionais derivados de plantas (Dufossé, 2018; Palácio-Barrera et al., 2019).

Pigmentos produzidos por micro-organismos também são classificados como naturais. E nessa tendência, as principais pesquisas relacionadas a pigmentos naturais microbianos têm abordado a busca por novas cepas fúngicas, não tóxicas, capazes de produzir metabólitos coloridos com potencial para aplicação industrial (Nigam e Luke, 2016). Os pigmentos fúngicos podem ser classificados como carotenoides, policetídeos, melaninas, flavinas, etc. Eles são produzidos durante o metabolismo secundário dos fungos, com exceção das flavinas (p.e. riboflavina) produzidas durante o metabolismo primário. Os policetídeos são a classe mais representativa (Dufossé et al., 2014). Pigmentos policetídeos têm estruturas complexas e incluem as azafilonas, as antraquinonas, hidroxiantraquinonas e naftoquinonas (Mapari et al., 2010). Além disso, podem atuar como unidades formadoras de outros metabólitos secundários, como as cochlioquinonas. De acordo com Arayama e colaboradores (2015), as cochlioquinonas pertencem biossinteticamente a um meroterpenoide formado por compostos sesquiterpênicos e policetídeos. A família das cochlioquinonas engloba metabólitos secundários coloridos que têm sido muito estudados quanto às suas atividades biológicas e diversidades estruturais (Hosokawa et al., 2010). As cochlioquinonas possuem atividade anti-angiogênica (Jung et al., 2013), atividade antagonista sobre o receptor humano de quimiocinas CCR5, um alvo crucial para a terapia anti-HIV-1 (Yoganathan et al., 2004), atividade citotóxica potentes *in vitro* contra linhagens de células tumorais (Wang et al., 2016), e atividade antimicrobiana (Koyama et al., 2005). É consenso que esses metabólitos possuem potencial biológico e farmacêutico, sendo conhecidos como pigmentos bioativos (Phuwapraisirisan et al., 2007).

Devido à grande variedade, os fungos endofíticos podem ser fontes potenciais para seleção de fungos não tóxicos produtores de pigmentos. Fungos endofíticos colonizam os tecidos de plantas durante, pelo menos, uma parte de seu ciclo de vida sem causar sintomas visíveis de doença (Petrini, 1991). Podem ser encontrados no tecido da planta hospedeira em diferentes órgãos, tais como folhas, raízes, caules, cascas, flores, frutas e sementes (Toghueo et al., 2017). Fungos endofíticos têm sido

isolados de plantas de interesse medicinal (Ferreira et al., 2015) e comercial (Fernandes et al., 2015; Gonzaga et al., 2014), devido à capacidade de produzir moléculas com atribuições biotecnológicas, incluindo pigmentos (Rodriguez et al., 2016). Diversas espécies de fungos endofíticos têm sido isoladas de videiras que também são plantas importantes economicamente devido às uvas que são a base da fabricação de vinhos (Cueva et al., 2010). Entretanto, na literatura pesquisada, não há trabalhos que abordem a produção de pigmentos por esses fungos endofíticos.

Arcopilus aureus (Chaetomiaceae) é uma espécie fúngica que também já foi isolada de videira (Dwibedi e Saxena, 2018;) e que tem sido avaliada quanto a sua capacidade de produzir um amplo espectro de compostos bioativos (Kabbaj et al., 2015; Lin et al., 2012; Suryanarayanan et al., 2009). Geralmente, essa espécie não causa complicações à saúde humana e não é produtora de aflatoxina (Rank et al., 2011). Na literatura pesquisada, não há estudos com objetivo de avaliar a produção de pigmentos por *A. aureus*. Na verdade, existe apenas relatos sobre a atividade biológica da esclerotiorina que já foi isolada desse micro-organismo (Chidananda et al., 2006; Lin et al., 2012), mas que também é produzida por outras espécies como um pigmento natural (Xin et al., 2018). Dessa forma, *A. aureus* pode ser uma alternativa não tóxica à produção de pigmentos naturais.

Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial da produção de pigmentos naturais por fungos filamentosos endofíticos isolados de videiras, ou seja (i) isolar e identificar a melhor cepa fúngica endofítica capaz de produzir pigmento, (ii) caracterizar o pigmento por espectroscopia UV-Vis e FT-IR, (iii) separar e identificar o pigmento por cromatografia líquida de ultra performance – detector de diodos – espectroscopia de massa com ionização por eletrospray e analisador quadrupolo tempo de voo (UPLC-PDA-ESI-QTOF/MS); (iv) purificar parcialmente o pigmento produzido; (v) avaliar sua estabilidade em relação à temperatura e pH.

2. Materiais e métodos

2.1 Coleta de amostras: origem dos fungos endofíticos

Os tecidos e órgãos das videiras (*Vitis vinífera* L.) da variedade Syrah foram coletados em três vinhedos localizados no município de Diamantina, mesorregião do Jequitinhonha do estado de Minas Gerais, Brasil, que fica a 1.288 metros de altitude e apresenta clima subtropical úmido, segundo a classificação climática de Köppen-Geiger (Köppen e Geiger, 1928): Vinhedo 1 - Fazenda Campo Alegre (latitude 18.31° sul e longitude 43.69° oeste), Vinhedo 2 - Fazenda da Toca (latitude 18.21° sul e longitude 43.64° oeste), Vinhedo 3 - Sítio Santa Helena (latitude 18.24° e longitude 43.57° oeste). A coleta das amostras ocorreu a partir de 3 diferentes videiras, em cada um dos três vinhedos. De cada uma das videiras foram retiradas amostras de caule e raiz. A desinfecção do material vegetal foi realizada de acordo com Cueva et al. (2011). Antes da desinfecção, as raízes foram imersas em solução tampão fosfato pH 7,0, estéril, por 10 minutos, para equilibrar a pressão osmótica e evitar a

difusão passiva de agentes esterilizantes nas raízes.

2.2 Isolamento e purificação dos fungos endofíticos

Fragmentos individuais de casca de caule, xilema, folhas e raízes foram transferidos assepticamente para placas de Petri contendo ágar batata e dextrose (ABD) com 0,2% de extrato de levedura, acrescido de oxitetraciclina (1mg/mL), para inibir o crescimento bacteriano no decorrer do processo de isolamento dos fungos endofíticos. Dezesesseis placas foram preparadas por planta (4 para fragmentos de casca de caule, 4 para fragmentos de xilema, 4 para fragmentos de folhas e 4 para fragmentos de raízes), totalizando 144 placas (9 videiras). Em cada placa foram inoculados 40 fragmentos de caule, ou xilema, ou folhas, ou raízes, e em seguida, foram incubadas a 30°C, por 7 dias. A partir do sétimo dia de incubação, foi observada a formação de hifas. Pequenos fragmentos de hifas, visualmente diferentes, foram transferidos para placas de Petri contendo PDA e incubados nas mesmas condições, até a obtenção de colônias isoladas. As colônias isoladas foram preservadas em sílica estéril, compondo a Coleção de Cultura de Fungos Endofíticos do Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

2.3 Seleção da melhor cepa produtora de pigmento

As cepas capazes de pigmentar o meio PDA ou que se apresentaram como colônias coloridas foram selecionadas como as cepas produtoras de pigmento (15 cepas). Em seguida, todas elas foram submetidas à fermentação. Inicialmente, as cepas fúngicas foram transferidas para tubos *slant* com PDA e incubadas por 7 dias a 30°C. Volume de 10mL de suspensão de esporos ($3,4 \times 10^7$ esporos/mL) de cada cepa foi inoculada em frasco Erlenmeyer (250mL), contendo 50mL de meio Czapeck (3,0 g/L NaNO_3 , 1 g/L K_2HPO_4 , 0,5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g/L KCl , 0,01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 30,0 g/L sacarose e pH inicial 5,0). Os frascos foram incubados a temperatura de 30°C durante 15 dias, ao abrigo da luz e em condição estática. Após o período de cultivo, os extratos brutos foram separados da biomassa por filtração.

Os extratos brutos pigmentados de cinco cepas (cepas 23, 30, 31, 43 e 49) (50mL) foram submetidos a extrações sucessivas com solventes de diferentes polaridades: hexano (30mL), acetato de etila (30mL) e butanol (30mL). A escolha da melhor cepa e do melhor solvente capaz de extrair o pigmento (acetato de etila) foi baseada na fração que apresentou, visualmente, cor mais intensa e que correspondeu ao solvente mais volátil.

2.4 Identificação genética

A cepa 43, selecionada como a melhor produtora de pigmento, foi submetida à identificação de espécie pelo Serviço de Coleção de Culturas da Fundação André Tosello, Campinas, São Paulo, Brasil. A extração de DNA ocorreu utilizando kit comercial ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™ (Zymo Research), segundo informações do fabricante. A amplificação do DNA alvo, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), se deu por meio dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) ITS1 (5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCG G -3') e ITS4 (5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3') (White et al., 1990). Após corrida eletroforética em gel de TBE-agarose 1.5%(p/v), o produto foi purificado, quantificado, alíquotado e acrescido dos respectivos oligonucleotídeos para sequenciamento, em plataforma ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies). A sequência consenso foi gerada (BioEdit) a partir das sequências obtidas pelos primers citados. A classificação taxonômica das amostras se baseou na comparação entre a sequência consenso e as depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) via MEGABLAST. A sequência única foi alinhada com as similares disponíveis no banco de dados e foi construída uma árvore de distância filogenética com auxílio do programa MEGA7. A cepa foi identificada como *Arcopilus aureus*.

2.5 Produção e caracterização do pigmento amarelo referência

Um novo processo de cultivo com *A. aureus* foi conduzido em 4L de meio Czapeck e nas mesmas condições do item 2.3. Após o período de cultivo, o extrato bruto foi submetido a extrações com alíquotas de 100mL de acetato de etila, até completar o volume de 2L. O pigmento extraído foi nomeado como “pigmento amarelo referência”. Em seguida, a fração acetato de etila foi concentrada em rotaevaporador (Fisatom^â, São Paulo, Brasil), formando o resíduo sólido.

2.5.1 Caracterização por espectroscopia Uv-vis

Para caracterização por espectroscopia Uv-vis, a fração acetato de etila do pigmento amarelo referência foi lida em espectrofotômetro de varredura (250-700nm) (Biochrom^ô Libra 552) para conhecer o espectro de absorção do pigmento amarelo referência e determinar o $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção (450nm).

2.5.2 Caracterização por FT-IR

Para caracterização por FT-IR, o resíduo sólido do pigmento amarelo referência foi submetido à análise de grupos funcionais, usando infravermelho médio Cary 630 FTIR (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), equipado com célula de reflectância total atenuada (ATR) e detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS). A amostra foi avaliada na região espectral com comprimento

de onda de 4000cm^{-1} a 650cm^{-1} . O espectro obtido foi submetido a análise para a presença de possíveis grupos funcionais baseados nos comprimentos de onda.

2.5.3 Caracterização por HPLC

A partir do resíduo sólido, uma solução $300\mu\text{g/mL}$ foi preparada em acetonitrila:isopropanol 80:20 (solução do pigmento amarelo referência) para obtenção do cromatograma do pigmento amarelo referência por HPLC. A análise cromatográfica ocorreu em um cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japan), equipado com sistema quaternário de bombas, desgaseificador, válvula de injeção com alça de amostragem de $20\mu\text{L}$, forno de coluna e detector de arranjo de diodos, usando coluna de fase reversa C18 (CLC-ODS, $4,6\times 150\text{mm}$). Os eluentes acetonitrila e água acidificada (0,05% ácido fórmico) e o gradiente foram os mesmos descritos por Gomes e Takahashi (2016). O detector UV foi mantido em 280nm e 450nm, e o fluxo de 1mL/min .

2.6 Quantificação de Riboflavina por HPLC

A quantificação de riboflavina no pigmento amarelo referência seguiu a metodologia USP 29 (2000), com adaptações. Foi usado o equipamento Varian 9010/9070 com detector de fluorescência e coluna C18 Agilent (nº 7, 250mm). Os eluentes KH_2PO_4 (0,04 mol/L) e metanol foram mantidos na proporção 55:45 e o fluxo em 1mL/min . Os comprimentos de onda de excitação/emissão foram mantidos em 470/530. O padrão de riboflavina utilizado foi da Sigma-Aldrich.

2.7 Separação e identificação por UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS

A solução do pigmento amarelo referência (item 2.5.3) foi analisada por UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. Essas análises foram realizadas para melhorar a separação e resolução dos picos e identificar o componente majoritário que compõe o pigmento amarelo referência. As análises foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu Proeminence LC-20AD (Shimadzu, Milan, Italy) equipado com uma controladora CBM-20A, bombas LC-20AD, um autoinjeter SIL-20AC, um forno CTO-20^a, e um detector de arranjo de díodos SPD-20A. Para as análises MS, um espectrômetro de massas foi usado (MAXIS 3G – Bruker Daltonics), equipado com interface ESI, modos de ionização positivo e negativo e analisador Q-TOF. A separação por HPLC foi realizada em coluna de fase reversa C18 Phenomenex ($4.3 \times 250 \text{ mm}$ - $5\mu\text{m}$ particle size). Os eluentes acetonitrila e água acidificada (0,05% ácido fórmico) e o gradiente foram os mesmos descritos por Gomes e Takahashi (2016). O detector UV foi mantido em 450nm, o fluxo de 1mL/min e a temperatura do forno em 30°C . O MS foi definido da seguinte forma: Scan, tanto ESI positivo (+) como negativo (-); Nebulizador: 2Bar; Dry gas: 8L/min ; End plate offset: 500V; Capillary:4500V; Faixa de m/z: 100-600; Temperatura: 200°C .

2.8 Purificação parcial do pigmento amarelo referência

Foi realizado um experimento em 3 etapas, alterando entre resinas de troca iônica e hidrofílicas, para purificação parcial do pigmento. Todas as etapas ocorreram em duplicata. Na etapa 1, foram pesados 50mg de resina de troca iônica (Streamline™ QXL) em microtubo e, em seguida, foram adicionados 600μL da solução do pigmento referência 300μg/mL. O microtubo foi submetido a agitação por 2 horas. O sobrenadante foi removido e adicionado em um novo microtubo com 50mg de resina hidrofílica (sílica gel 60 0.063-0.200mm Merck[®]) que também foi submetido a agitação por 2 horas. O sobrenadante foi removido, filtrado (Biofil™ 0.22μm PES) e armazenado. A resina hidrofílica não foi descartada, sendo utilizada na etapa 2. Na etapa 2, foram adicionados 600μL de metanol grau HPLC ao microtubo contendo a resina hidrofílica da etapa 1, que foi agitado por 2 horas. O sobrenadante foi removido, filtrado (Biofil™ 0.22μm PES) e armazenado. A resina hidrofílica não foi descartada, sendo utilizado na etapa 3. Na etapa 3, foram adicionados 600μL de água grau HPLC ao microtubo contendo a resina hidrofílica da etapa 2, que foi agitado por 2 horas. O sobrenadante foi removido, filtrado (Biofil™ 0.22μm PES) e armazenado. Os sobrenadantes parcialmente purificados armazenados foram analisados por HPLC, nas mesmas condições descritas no item 2.5.3, com o detector mantido em 280nm e 450nm.

2.9 Avaliação da estabilidade do pigmento amarelo referência

Um novo processo de cultivo foi conduzido nas mesmas condições do item 2.3. O extrato bruto contendo o pigmento foi submetido à leitura em espectrofotômetro (Biochrom[®] Libra 552) em λ_{450} , para medir sua absorvância, antes de submetê-lo aos testes de estabilidade. Durante os testes, todos os tubos permaneceram protegidos da luz. Para avaliar a influência da temperatura, tubos de ensaio, contendo 10mL do extrato bruto, foram colocados em banho termostaticado a 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C e 100°C, por 10 minutos, após equilíbrio térmico ter sido alcançado. A temperatura foi monitorada com um termômetro no centro das amostras. Em seguida, os tubos foram resfriados e os extratos brutos, submetidos à leitura de absorvância (λ_{450}) em espectrofotômetro. Para avaliar a influência do pH sobre estabilidade do pigmento, um volume de 10mL de extrato bruto foi adicionado em tubos de ensaios contendo volume igual de solução tampão citrato 0,1M, fosfato (0,2M) ou tris-HCl (0,2M) nos valores de pH 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12. Cada teste ocorreu por 24 horas, em temperatura ambiente. Em seguida, as absorvâncias dos extratos foram obtidas em espectrofotômetro (λ_{450}) (Biochrom[®] Libra 552), considerando a diluição sofrida. Os experimentos de estabilidade foram conduzidos em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com três repetições. As análises foram realizadas em triplicata. Os dados das análises foram submetidos à análise de regressão, ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

3 Resultados e discussão

3.1 Fungos endofíticos isolados de videiras

Foram obtidos 48 isolados de fungos endofíticos de videiras, macroscopicamente diferentes, de três diferentes vinhedos, ou seja, uma média de 16 cepas isoladas por vinhedo. Dentre as cepas isoladas, 15 foram selecionadas como potenciais produtoras de pigmentos. A diferença entre o número de colônias de endofíticos isoladas do presente trabalho com o encontrado por outros autores pode ser explicada por diferentes fatores, tais como o período de colheita, variedades de uva, área geográfica, condições climáticas e as práticas vitícolas aplicadas, além do número de plantas amostradas (Serra et al., 2006). De fato, Cueva et al. (2011) isolaram 182 colônias, embora esses autores tenham contabilizado também as colônias isoladas do solo dos dois vinhedos estudados. Portanto, não foi possível saber a quantidade referente apenas aos endofíticos isolados de videiras. Além disso, não deixaram claro qual variedade de uva era produzida e nem quantas plantas foram usadas para extração do material vegetal. Por sua vez, Pancher et al. (2012) isolaram 377 colônias de fungos endofíticos. Eles partiram de 28 vinhedos em sete regiões diferentes no norte da Itália, duas variedades de uvas e também dois tipos diferentes de manejo das plantas. Portanto, o resultado alcançado foi maior do que o de Pancher et al. (2012), que obtiveram uma média de 13,5 cepas isoladas por vinhedo.

3.2 Seleção e identificação da cepa produtora de pigmento

As 15 cepas identificadas como potenciais produtoras de pigmentos foram submetidas ao processo de cultivo em meio Czapeck. Como resultado, cinco cepas (cepas 23, 30, 31, 43 e 49) foram capazes de pigmentar o extrato bruto. As frações hexânica, acetato de etila e butanólica estão apresentadas na Fig. 1. Foram coletadas frações de cores variando entre amarelo e rosa. A cepa 23 coloriu intensamente a fração butanol, enquanto a cepa 43 coloriu intensamente a fração acetato de etila. A cepa 43 foi selecionada como sendo a produtora do pigmento a ser investigado. E acetato de etila foi selecionado como o solvente para o processo de extração do pigmento. A escolha do acetato de etila ocorreu por esse ser o solvente mais volátil entre os estudados e, portanto, mais fácil de ser removido. Acetato de etila é reconhecido como o melhor solvente para extração dos compostos majoritários de pigmentos. A presença do pigmento amarelo na fração acetato de etila indica que o pigmento é ligeiramente polar, sendo arrastado por solventes polares (Venkatachalam et al., 2018). Acetato de etila também já foi selecionado como melhor solvente extrator de pigmento de *Talaromyces albobiverticillius* e *Penicillium sclerotiorum*, que possuem grupos carbonila e hidroxila que favorecem a extração (Venkatachalam et al., 2018; Celestino et al., 2014).

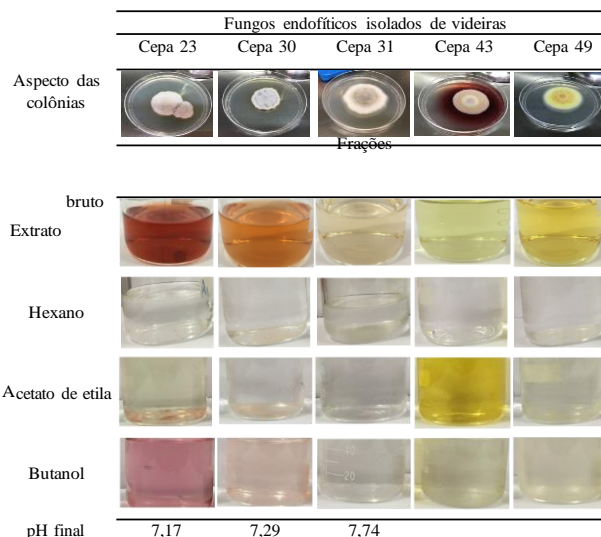


Figura 1. Cepas produtoras de pigmentos em PDA isoladas de videiras (*V. vinifera*) e pigmentos produzidos e extraídos com solventes de diferentes polaridades (hexano, acetato de etila e butanol).

A cepa 43 foi identificada como sendo pertencente à espécie *Arcopilus aureus* e foi isolada da raiz de uma planta do vinhedo 2. Uma árvore de distância filogenética foi construída com as sequências dos micro-organismos que mais se aproximaram da sequência alvo de uma espécie diferente, utilizada como *outgroup* (Fig. 2).

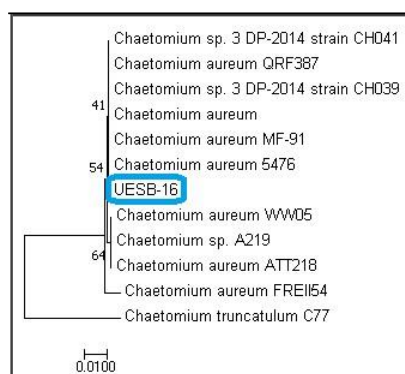


Figura 2. Árvore de distância filogenética a partir do gene 18S rRNA. Construída com o auxílio do software MEGA 7.0 pelo método de Neighbor-Joining com parâmetro Jukes-Cantor e Bootstrap de 1000 réplicas. UESB-16 = Cepa 43

3.3 Caracterização do pigmento amarelo referência

A fração acetato de etila do pigmento amarelo referência apresentou três picos de absorção em 280nm, 350nm e 450nm. Absorção máxima foi verificada em 450nm (λ_{max}) e se encontra dentro da faixa de leitura da cor amarela.

Uma massa de 87mg do pigmento amarelo referência foi obtida e a solução 300 μ g/mL foi analisada em HPLC. O cromatograma está representado na Fig. 3. A metodologia aplicada permitiu

a observação de 2 picos (Região A) com absorção máxima em torno de 450nm, o que corrobora com o λ_{\max} da fração acetato de etila do pigmento referência amarelo. Além disso, os dois picos da Região A apresentaram a maior intensidade de sinal. Portanto, os picos correspondentes às estruturas moleculares que compõem o pigmento amarelo de *A. aureus* encontram-se entre 7.8 e 8.4min de eluição. A maioria dos pigmentos naturais produzidos por fungos é formada por uma mistura de componentes (Torres et al., 2016).

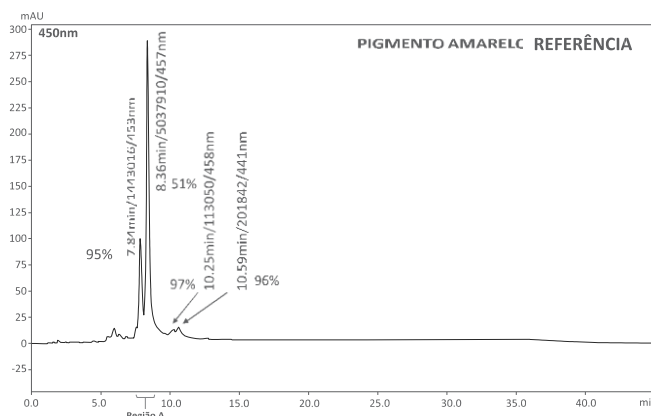


Figura 3. Cromatograma da solução do pigmento amarelo referência (300µg/mL) obtido por HPLC (450nm) com coluna C18 de 15cm (item 2.5.3). Pigmento produzido a partir do cultivo em meio Czapeck (sacarose, nitrato de sódio e pH 5) por *A. aureus*.

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) do resíduo sólido foi realizada para identificação de grupos funcionais presentes nos compostos formadores do pigmento amarelo referência (Fig. 4). As bandas mais intensas ocorreram em torno de 1603, 1559, 1448, 1186, 1025, 966 cm^{-1} . A banda centrada próxima a 3400 cm^{-1} sugere estiramentos simétricos e assimétricos de grupos O-H (Lian et al., 2015). A largura da banda é característica de sistemas contendo ligação de hidrogênio. As bandas em 2914 e 2849 cm^{-1} são características de estiramentos da ligação C-H em grupos -CH₂ e -CH₃ de alifáticos (Lacellier et al., 2014). Enquanto a banda em 1448 cm^{-1} também sugere a presença de grupos -CH₃ a partir de sua deformação angular assimétrica. Banda forte em 1602.7 cm^{-1} provavelmente pode ser atribuída à deformação axial de carbonilas C=O de cetonas que estão tipicamente presentes em pigmentos produzidos por fungos. As bandas em 1559, 919 e 862 cm^{-1} sugerem a vibração por deformação axial C=C de aromáticos. Essas três bandas também podem indicar a presença de amina terciária em anel aromático. E ainda, a presença da banda intensa em 1559 cm^{-1} também pode estar relacionada à vibração por deformação angular entre N-H presente em amida secundária. Enquanto que as bandas intensas em 1264, 1185 e 1025 cm^{-1} sugerem a deformação axial de grupos C-O que podem estar presentes em éter ou éster (Lacellier et al., 2014).

Os grupos funcionais identificados são comuns também em pigmentos do tipo policetídeos e/ou flavinas.

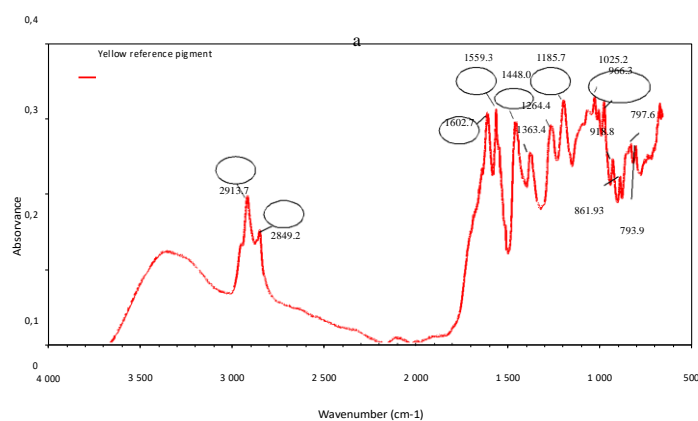


Figura 4. Espectro FT-IR do resíduo sólido da fração acetato de etila do pigmento amarelo referência produzido por *A. aureus*.

Após a análise do resíduo sólido, a biblioteca de dados não reconheceu nenhuma estrutura definitiva para o pigmento analisado, uma vez que ele não estava purificado. Entretanto, foi fornecida a informação de que o espectro obtido se assemelhava ao espectro da riboflavina ou vitamina B2, que também apresenta cor amarela e é usada como suplemento nutricional e pigmento natural. Com esse resultado, um novo experimento foi realizado para confirmar se *A. aureus* foi capaz de produzir riboflavina durante o processo de cultivo.

3.4 Quantificação de riboflavina

Através da quantificação por HPLC (Fig. 5) foi encontrada uma concentração de 0,213mg/Kg de riboflavina no pigmento amarelo referência. Portanto, o endofítico *A. aureus* é capaz de produzir riboflavina que, nesse caso, faz parte da composição do pigmento amarelo referência. A riboflavina pertence à classe das flavinas. É um composto amarelo fluorescente, hidrossolúvel, e instável à luz UV. O sistema de anéis isoaloxazina é responsável por suas propriedades fotoquímicas (Fig.5). O espectro de absorção da riboflavina tem três máximos: no UVB (267nm), no UVA (345nm) e na região visível (442nm) (Monte-Filho et al., 2019; Silva, 2013). Esses picos de absorção são próximos dos picos observados para o pigmento amarelo referência. Portanto, provavelmente, a riboflavina pode ter influenciado o perfil de absorção UV/Vis do pigmento analisado. A indicação da presença de grupos amina terciária e amida secundária pelo espectro FT-IR está de acordo com a estrutura da molécula de riboflavina (Fig. 5). Por outro lado, a forte indicação da presença de éster ou éter pelo espectro FT-IR demonstra que outro componente do pigmento amarelo referência pode possuir esses grupos em suas estruturas, uma vez que não estão presentes em riboflavina (Fig. 5) (Gomes e Takahashi, 2016; Schwechheimer et al., 2016). A produção de riboflavina por *A. aureus* é interessante devido ao fato desse pigmento ser produzido exclusivamente em escala industrial por via fermentativa, tornando-se um dos assuntos mais importantes na biotecnologia (Schwechheimer et al.,

2016). Apesar da produção de riboflavina ter sido baixa, há a possibilidade de melhoramento do meio de cultivo e das condições de fermentação para aumentar essa produção. Essa ideia vai ao encontro da crescente demanda por melhoramento de processos de produção (Schwechheimer et al., 2018). Exemplo disso é o estudo com o hemiascomiceto *Ashbya gossypii*, usando óleo como fonte de carbono que aumentou expressivamente a produção de riboflavina em 45% (Schwechheimer et al., 2018). E também o estudo com *Aspergillus terreus*, usando amido de milho como fonte de carbono que aumentou mais de 5 vezes a produção de riboflavina (Nafady et al., 2015).

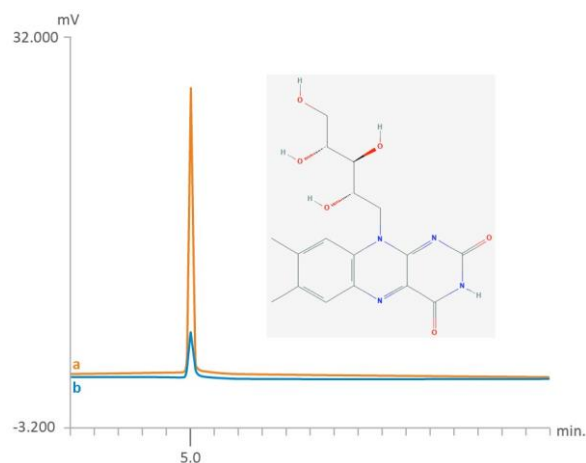


Figura 5. Estrutura química e detecção de riboflavina por cromatografia com detector de fluorescência. Excitação:emissão (470-530). Comparação entre os tempos de retenção da riboflavina padrão e da riboflavina produzida por *A. aureus* (a) Cromatograma da solução padrão de riboflavina (0,178ppm). (b) Cromatograma da solução do pigmento amarelo referência (300 μ g/mL).

3.5 Separação e identificação por UPLC-DAD-ESI-QTOF-MS

Por meio do cromatograma (Fig. 6) nota-se que houve melhor separação entre os componentes do pigmento amarelo referência quando a cromatografia UPLC foi utilizada. O componente majoritário pode ser visualizado no tempo de retenção de 12 min.

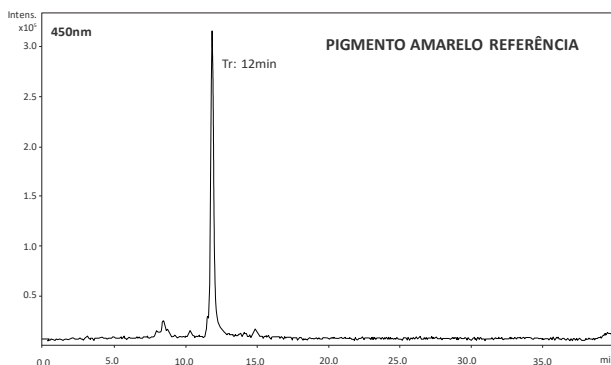


Figura 6. Cromatograma da solução do pigmento amarelo referência (300 μ g/mL) obtido por UPLC (450nm) (item 2.5.3), com coluna C18 de 25cm. Pigmento produzido a partir do cultivo em meio Czapeck (sacarose, nitrato de sódio e pH 5) por *A. aureus*.

Esse componente exibiu íon molecular $[M+H]^+$ com m/z 550,23 (Fig. 7), no modo positivo e íon molecular $[M-H]^-$ com m/z 548,22 no modo negativo, indicando que o componente tem massa molar de 548,22g/mol. Os resultados de ESI-QTOF-MS, de FT-IR e de varredura em espectrofotômetro, em comparação com a literatura, indicam que o composto majoritário do pigmento amarelo referência corresponde à estrutura do cochlioquinol II (Lim et al., 1998), que faz parte da família das cochlioquinonas. Três hidroxilas da molécula de cochlioquinol II, incluindo a do anel pirano, são responsáveis pela perda de água (m/z 18), originando os picos 532.21, 514.20 e 496.20. Cochlioquinol II é um sólido amarelo obtido inicialmente do fungo fitopatogênico *Bipolaris cynodontis* isolado de grama Bermuda, com núcleo comum contendo a estrutura 4-hidroxi-2,5-ciclohexadienona (Lim et al., 1998). Nessa estrutura, está presente a função éter que foi identificada pelo FT-IR. Portanto os sinais referentes a essa função estão relacionados ao cochlioquinol II. Por outro lado, nota-se que não há grupos de amidas primárias ou secundárias na estrutura de cochlioquinol II. Dessa forma, os sinais no espectro FT-IR relacionados a essas funções referem-se à riboflavina.

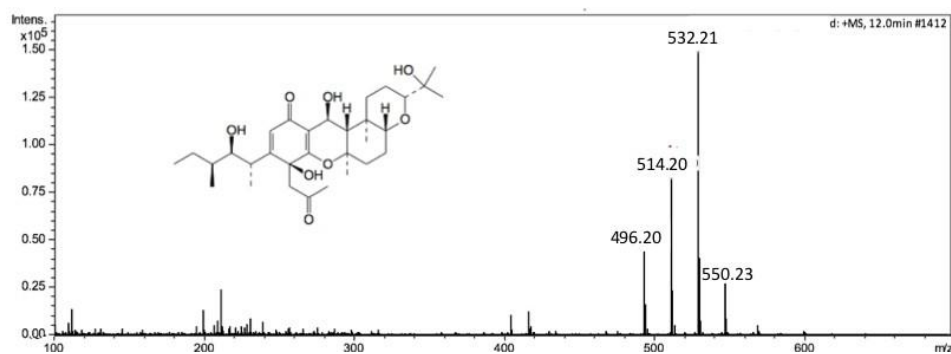


Figura 7. ESI-MS no modo positivo mostrando os principais fragmentos gerados pelo componente majoritário do pigmento amarelo referência (cochlioquinol II), o íon molecular $[M+H]^+$ m/z 550.23 e a estrutura da molécula de cochlioquinol II (Lim et al., 1998).

Os componentes da família das cochlioquinonas, incluindo o cochlioquinol II, em geral, são obtidos de fungos fitopatogênicos isolados de plantas (Arayama et al., 2015; Khiralla et al., 2018). Naturalmente, esses micro-organismos produzem os metabólitos derivados pigmentados da cochlioquinona como fitotoxinas para poderem se instalar como fitopatogênicos, causando doenças graves às plantas (Phuwapraisirisan et al., 2007; Wang et al., 2016). *A. aureus* foi isolado de videiras saudáveis. Portanto, no momento do isolamento, não se encontrava na condição de fitopatogêneo, mas sim na condição de fungo endofítico. As condições do meio e do processo de cultivo utilizadas nesse trabalho criaram condições adequadas para que *A. aureus* pudesse produzir o metabólito cochlioquinol II, como um pigmento natural.

A produção de riboflavina ou cochlioquinol II por *A. aureus* não foi reportada até o momento na literatura pesquisada. Portanto, trata-se de uma nova fonte de moléculas cujas famílias apresentam um futuro potencial não só como pigmentos, mas também como moléculas bioativas.

3.6 Purificação parcial do pigmento amarelo referência

Os resultados da purificação parcial do pigmento amarelo de *A. aureus*, usando resinas de troca iônica e hidrofílicas, estão apresentados na Fig. 8. Esse experimento foi realizado em pequena escala, com pouco volume da solução do pigmento referência, em batelada e associado a análise por HPLC, para tentar conseguir a separação do pigmento com pouco volume de amostra, de solvente e de resina, ao contrário do que comumente ocorre para o isolamento de pigmentos microbianos por cromatografia em coluna convencional (Gomes e Takahashi, 2016; Wang et al., 2018). Esse novo processo de purificação usado pode facilitar a separação de alguns tipos de pigmentos produzidos por fungos filamentosos, uma vez que a separação convencional em coluna cromatográfica pode levar à coeluição, tornando difícil a identificação dos pigmentos através do espectro de absorção das frações eluídas (Wang et al., 2018).

Pode-se perceber a coloração amarela da solução do pigmento referência de *A. aureus*, e que a resina de troca iônica adsorveu pouco esse pigmento na etapa 1. A resina de troca iônica é um trocador de cátions e foi utilizado no experimento devido à sua capacidade de capturar biomoléculas diretamente de matérias-primas brutas, proporcionando uma purificação inicial, antes de submeter a solução do pigmento referência diretamente à adsorção em resina hidrofílica. Por sua vez, a resina hidrofílica adsorveu o pigmento presente na solução inicial, e isso pode ser demonstrado pela cor amarela assumida e pela ausência de cor do sobrenadante da etapa 1. Na etapa 2, pode-se perceber que o metanol adicionado à resina hidrofílica colorida da etapa 1 foi capaz de arrastar o pigmento que estava adsorvido, uma vez que a intensidade da cor amarela da resina diminuiu e que o sobrenadante da etapa 2 assumiu uma coloração amarela. E na etapa 3, nota-se que a resina hidrofílica oriunda da etapa 2 fica praticamente sem cor, ao se adicionar água, sendo que esse solvente ainda foi capaz de arrastar o restante de pigmento que ainda estava adsorvido na resina, tornando-se ligeiramente amarelo (sobrenadante da etapa 3).

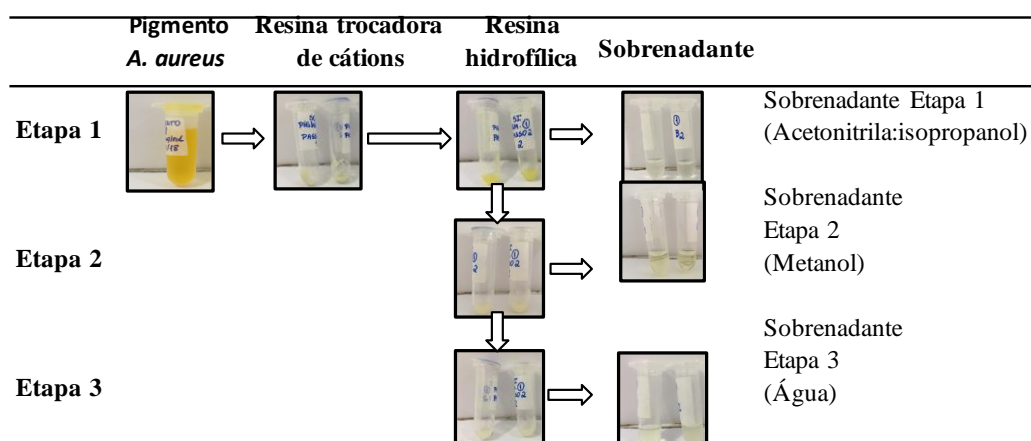


Figura 8. Aspectos das resinas de troca iônica e hidrofílicas e dos sobrenadantes das etapas 1, 2 e 3 do processo de purificação parcial do pigmento amarelo referência produzido por *A. aureus*.

Não foi realizada a análise cromatográfica dos sobrenadantes 1, uma vez que não apresentaram cor, indicando que o pigmento amarelo não seria encontrado.

A partir dos cromatogramas gerados em 280nm, foram identificados 67 picos para a solução do pigmento referência, sendo que os sobrenadantes da etapa 2 apresentaram 27 picos cada um. Esse resultado revela que o experimento aplicado foi capaz de purificar parcialmente o pigmento amarelo referência, reduzindo o número de compostos que não eram pigmentos em aproximadamente 60 por cento. A seleção do comprimento de onda em 280nm foi realizada para que os compostos que estivessem presentes na solução do pigmento referência e nos sobrenadantes da etapa 2 pudessem ser detectados e contabilizados para fins de comparação. Muitas moléculas possuem absorção nesse comprimento de onda, portanto o número de picos encontrados corresponde aos compostos do pigmento e aos compostos não pigmentos. Nessa etapa, se fosse mantida a leitura dos picos em 450nm, poderia ocorrer a falsa interpretação de que o experimento de purificação parcial não seria necessário, uma vez que picos referentes aos compostos não pigmentos não apresentavam absorção máxima em 450nm.

A Fig. 9 traz os cromatogramas das duas repetições dos sobrenadantes da etapa 2 gerados em 450nm, que é o comprimento de onda de absorção máxima do pigmento amarelo referência, e foi possível observar a similaridade entre eles. De fato, os cromatogramas obtido mostram a presença de picos na região A, tal como ocorre para o pigmento amarelo referência, comprovando a presença do pigmento em metanol (sobrenadante 2). A pequena diferença entre os tempos de retenção observados (7.56 e 8.23min) pode ser devida ao solvente do sobrenadante 2, que foi metanol, enquanto que o pigmento referência havia sido solubilizado em acetonitrila:isopropanol. As áreas dos dois picos característicos da região A após o processo de purificação apresentaram uma redução de 76 e 71%, respectivamente, em comparação ao pigmento referência. As menores áreas encontradas para o

sobrenadante da etapa 2 pode ser devido ao fato de uma parcela do pigmento ter ficado ainda adsorvida na resina hidrofílica. E, portanto, o volume adicionado de metanol pode não ter sido suficiente para arrastar todo o pigmento. Apesar da redução da área dos picos, eles ainda continuam apresentando absorção máxima em torno de 450nm. Nota-se ainda que os sobrenadantes da etapa 2 apresentaram melhor separação entre os picos, ganhando em pureza para os picos em 8.23 (71%) e 10.08 min (99%) e perdendo em pureza para o pico localizado em 7.56 min (83%). Esse experimento permitiu a observação de um pico único isolado em 10.08 min (99% de pureza) e que também apresentou absorção máxima em torno de 450nm. A separação desse pico pode ter contribuído para aumentar a pureza do pico em 8.23min. Pela cor fracamente amarela do sobrenadante 3, não foi realizada análise por HPLC para esse sobrenadante.

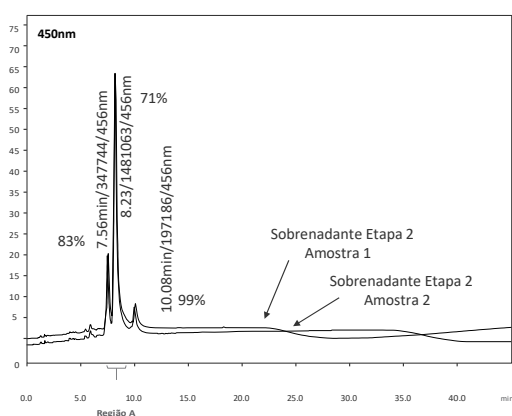


Figura 9. Cromatogramas dos sobrenadantes da etapa 2 (em metanol) obtidos por HPLC (450nm). Pigmento produzido a partir do cultivo do meio Czapeck (sacarose, nitrato de sódio e pH 5) por *A. aureus*.

Os resultados demonstram que houve melhora na purificação e separação dos picos com a nova metodologia de purificação aplicada. Ficou demonstrado que é possível a purificação de pigmentos em escala reduzida, usando pequena quantidade de amostra e solvente, em menor tempo, e sem perda significativa.

3.7 Estabilidade do pigmento amarelo referência

Na faixa de temperatura avaliada, a absorvância da solução do pigmento amarelo variou entre $0,783 \pm 0,103$ e $0,891 \pm 0,120$. Um modelo quadrático foi obtido ($y = 7.10^{-5}x^2 - 0,0078x + 1,0234$) com coeficiente de regressão ($R^2 = 0,96$) e parâmetros significativos ($p \leq 0,05$). A partir da equação, o ponto de estabilidade mínima correspondeu à temperatura de $55,7^\circ\text{C}$. Entre $55,7$ e 100°C houve um aumento sobre a absorvância. Isso talvez possa ser explicado pelo efeito hipercrômico que corresponde ao aumento da intensidade de absorção no $I_{\text{máx}}$, devido ao rompimento de pontes de hidrogênio que

ocorre à medida que a temperatura se eleva. A presença de hidroxilas em ambas as moléculas de cochlioquinol II e riboflavina indica que pontes de hidrogênio podem ser formadas na solução do pigmento e, conseqüentemente, podem estar sujeitas ao efeito hipercrômico. Com o resfriamento da solução, as pontes de hidrogênio podem ser reestruturadas e a cor original pode ser recuperada. Portanto, a estabilidade do pigmento amarelo de *A. aureus* frente à variação da temperatura pode ser considerada. Estabilidade em alta temperatura para pigmento vermelho de *Penicillium* sp. também foi observada, após processo de esterilização (121°C por 20min.) (Gunasekaran e Poorniammal, 2008). Essa estabilidade confirma a observação de que, de um modo geral, pigmentos microbianos são mais estáveis que outros pigmentos naturais em relação à variação de temperatura (Hilares et al., 2018). E isso é importante, uma vez que o tratamento térmico é um dos principais métodos para preservação de alimentos (Vendruscolo et al., 2013).

Na faixa de pH estudada, a absorção da solução do pigmento amarelo de *A. aureus* variou entre $0,604 \pm 0,056$ e $1,691 \pm 0,118$. A relação entre pH do meio e absorvância da solução do pigmento pode ser expressa pelo modelo linear ($y = -0,0828x + 1,5159$), com coeficiente de regressão ($R^2=0,60$) e parâmetros significativos ($p \leq 0,05$). De acordo com a equação, a cor original da solução do pigmento é mantida em pH 8,4, quando apresenta a mesma absorvância do extrato bruto controle (0,822). Também a partir da equação, a absorvância diminui à medida que aumenta o pH. Uma mudança da cor da solução (fracamente amarela para amarelo intenso e vermelho) ocorreu à medida que o pH diminuiu. Paralelamente à mudança de cor, ocorreu também o aumento da absorvância. Essa mudança de cor talvez possa ser explicada pelas diferentes espécies químicas, com estado de oxidação variados, que as moléculas de cochlioquinol II (componente majoritário) podem assumir a depender do pH. Considerando sua estrutura, as moléculas de cochlioquinol atingem sua redução completa, que coincide com a maior intensidade de cor amarela característica desse pigmento, à medida que ocorre a redução do pH. Por outro lado, o aumento do pH leva as moléculas de cochlioquinol a se apresentarem como espécies químicas oxidadas, o que pode contribuir para a diminuição da intensidade da cor amarela. Outro fator que talvez possa explicar a mudança de cor da solução do pigmento com a redução do pH é o efeito batocrômico. O efeito batocrômico provoca o deslocamento da banda de absorção para a energia mais baixa ou para banda de absorção do vermelho, fazendo com que a solução assumira a coloração vermelha. A presença de átomos como oxigênio perto de ligação dupla entre carbonos, tal como ocorre nas moléculas de cochlioquinol II, pode induzir o efeito batocrômico.

Esse estudo apresentou a vantagem da abordagem da influência de uma ampla faixa de pH sobre a estabilidade do pigmento avaliado, e não apenas em faixas estreitas de pH, como ocorre em alguns trabalhos dessa natureza. Por exemplo, Vendruscolo et al. (2013) verificaram que a

estabilidade do pigmento policetídeo laranja de *M. ruber* aumentou à medida que o pH diminuiu de 5,5 a 4,08, mas diminuiu quando pH passou de 4,08 para 6,91. Ou et al. (2009) demonstraram a estabilidade do pigmento monacolina K produzida por *Monascus* na faixa de pH entre 3 e 9, porém notaram a degradação com o aumento do pH de 9 a 11. E Carvalho et al. (2005) verificaram que o pigmento vermelho de uma cepa de *Monascus* era instável em pH menor que 6. Percebe-se que não há um consenso sobre a estabilidade à variação de pH, demonstrando que, provavelmente, ela está relacionada à estrutura molecular do pigmento avaliado. O comportamento do pigmento amarelo produzido por *A. aureus* diante de fatores como pH e temperatura dá indícios de que pode ser aplicado em alimentos que, por exemplo, precisam ou não ser termicamente processados. Entretanto, sua aplicação em alimentos ácidos deve ser avaliada, uma vez que a cor é modificada a depender do valor de pH.

4. Conclusões

Quarenta e oito cepas de fungos endofíticos foram isoladas de videiras (*Vitis vinifera*). Desse total, 15 cepas foram selecionadas como potenciais produtoras de pigmentos. Em sequência, a cepa identificada como *Arcopilus aureus* foi selecionada como fonte potencial para produção de pigmento amarelo com características importantes para futura aplicação industrial. O pigmento amarelo possui em sua composição, cochliquinol II, como composto majoritário, e riboflavina. Portanto, o endofítico *A. aureus* pode ser considerado uma nova fonte de moléculas cujas famílias apresentam um futuro potencial não só como pigmentos, mas também como moléculas bioativas. A estabilidade do pigmento frente às variações de temperatura e pH foi expressa por modelos quadráticos. A partir dos modelos, foi verificado que o pigmento estudado manteve-se relativamente estável frente à variação de temperatura e apresentou aumento na intensidade da absorção e da cor com a redução do pH.

Referências

1. Arayama, M., Nehira, T., Maeda, H., Tanaka, K., Miyagawa, H., Ueno, T., Hosokawa, S., Hashimoto, M., 2015. Isolation, ECD assisted structural analyses, biosynthetic discussions, and biological activities of epi-cochliquinones D and its derivative. *Tetrahedron* 71, 4788-4794.
2. Aruldass, C.A., Dufossé, L., Ahmad, W.A., 2018. Current perspective of yellowish orange pigments from microorganisms - a review. *J. Clean. Prod.* 180, 168-182. Doi:10.1016/j.jclepro.2018.01.093
3. Carvalho, J.C., Oishi, B.O., Pandey, A., Soccol, C.R., 2005. Biopigments from *Monascus*: Strains Selection, Citrinin Production and Color Stability. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48, 885-894.

4. Celestino, J.R., Carvalho, L.E., Lima, M.P., Lima, A.M., Ogusku, M.M., Souza, J.V.B., 2014. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. *Process Biochem.* 49, 569–575. Doi: 10.1016/j.procbio.2014.01.018
5. Chidananda, C., Rao, L.J., Sattur, A.P., 2006. Sclerotiorin, from *Penicillium frequentans*, a potent inhibitor of aldose reductase. *Biotechnol. Lett.* 28,1633–1636. Doi: 10.1007/s10529-006-9133-4.
6. Cueva, C., Moreno-Arribas, M.V., Bartolome, B., Salazar, O., Vicente, M.F., Bills, G.F. 2011. Antibiosis of vineyard ecosystem fungi against food-borne microorganisms. *Res. Microbiol.* 162,1043-1051. Doi: 10.1016/j.resmic.2011.09.002
7. Dufossé, L. 2018, Red colourants from filamentous fungi: Are they ready for the food industry? *J. Food Comps. Anal.* 59,156-161. Doi: 10.1016/j.jfca.2017.11.002
8. Dufossé, L., Fouillaud, M., Caro, Y., Mapari, S.A.A, Sutthiwong, N., 2014. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. *Curr Opin. Biotechnol.* 26,56–61. Doi: 10.1016/j.copbio.2013.09.00
9. Fernandes, E.G., Pereira, O.L., Silva, C.C., Bento, C.B.P., Queiroz, M.V. 2015. Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. *Microbiol. Res.* 181,84–92. Doi: 10.1016/j.micres.2015.05.010
10. Ferreira, M.C., Vieira, M.L.A., Zani, C.Z., Alves, T.M.A., Sales Junior, P.A., Murta, S.M.F. et al. 2015. Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 59,36-44. Doi: 10.1016/j.bse.2014.12.017
11. Gomes, D.C., Takahashi, J.A. 2016. Sequential fungal fermentation-biotransformation process to produce a red pigment from sclerotiorin. *Food Chem.* 210,355–361. Doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.057
12. Gonzaga, L.L., Costa, L.E., Santos, T.T., Araújo, E.F., Queiroz, M.V. 2014. Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. *J. Appl. Microbiol.* 118,485–496. Doi: 10.1111/jam.12696
13. Gunasekaran, S., Poorniammal, R. 2008. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp. under submerged cultivation. *Afr. J. Biotechnol.* 7,1894-1898.
14. Hilares, R.T., de Souza, R.A., Marcelino, P.F., da Silva, S.S., Dragone, G., Mussato, S.I., Santos, J.C., 2018. Sugarcane bagasse hydrolysate as a potential feedstock for red pigment production by *Monascus ruber*. *Food Chem.* 245, 786-791. Doi: 10.1016/j.foodchem.2017.11.111
15. Hosokawa, S.; Matsushita, K.; Tokimatsu, S.; Toriumi, T.; Suzuki, Y.; Tatsuta, K., 2010. The first total synthesis and structural determination of epi-cochlioquinone A. *Tetrahedron Lett.* 51, 5532–5536.
16. Kabbaj, F.Z., Lu, S., Faouzi, M.E.A., Meddah, B., Proksch, P., Cherrah, Y. et al., 2015. Bioactive Metabolites from *Chaetomium aureum*: Structure Elucidation and Inhibition of the Hsp90

- Machine Chaperoning Activity. *Bioorg. Med. Chem.* 23, 126-131. Doi: 10.1016/j.bmc.2014.11.021
17. Khiralla, A., Spina, R., Saliba, S., Laurain-Mattar, D., 2018. Diversity of natural products of the genera *Curvularia* and *Bipolaris*. *Fungal Biol. Rev.* In press. Doi:10.1016/j.fbr.2018.09.002
 18. Köppen, W., Geiger, R., 1928. *Klimate der Erde*. Gotha: Verlag Justus Perthes. Wall-map 150cmx200cm.
 19. Koyama, N., Nagahiro, T., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Tomoda, H., Omura, S., 2005. Stemphones, Novel Potentiators of Imipenem Activity against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Produced by *Aspergillus* sp. FKI-2136. *J Antibiot.* 58(11), 695–703.
 20. Lecellier, A., Mounier, J., Gaydou, V., Castrec, L., Barbier, G., Ablain, W., Manfait, M., Toubas, D., Sockalingum, G.D., 2014. Differentiation and identification of filamentous fungi by high-throughput FTIR spectroscopic analysis of mycelia. *Int. J. Food Microbiol.* 168-169, 32–41. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.011
 21. Lian, X., Liu, L., Dong, S., Wu, H. 2015. Two new monascus red pigments produced by Shandong Zhonghui Food Company in China. *Eur. Food Res. Technol.* 240,719–724. Doi:10.1007/s00217-014-2376-8
 22. Lim, C., Miyagawa, H., Akamatsu, M., Nakagawa, Y., Ueno, T., 1998. Structures and biological activities of phytotoxins produced by the plant pathogenic fungus *Bipolaris cynodontis* cynA. *J Pest Sci* 23(3), 281-288.
 23. Lin, L., Mulholland, N., Huang, S.W., Beattie, D., Gu, Y.C., Clough, J. et al., 2012. Design, synthesis and fungicidal activity of novel sclerotiorin derivatives. *Chem. Biol. Drug Des.* 80,682-692. Doi: 10.1111/cbdd.12005
 24. Liu, L., Zhao, J., Huang, Y., Xin, Q., Wang, Z., 2018. Diversifying of chemical structure of native *Monascus* pigments. *Front Microbiol* 9,1-13. Doi: 10.3389/fmicb.2018.03143
 25. Lucas, E.M.F., Machado, Y., Ferreira, A.A., Dolabella, L.M.P., Takahashi, J.A. 2010. Improved Production of Pharmacologically-active Sclerotiorin by *Penicillium sclerotiorum*. *Trop. J. Pharm. Res.* 9, 365-371. Doi: 104314/tjpr.v9i4.6
 26. Mapari, S.A.S., Thrane, U., Meyer, A.S., 2010. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? *Trends Biotechnol.* 28:300-307. Doi: 10.1016/j.tibtech.2010.03.004
 27. Monte-Filho, S.S., Andrade, S.I.E., Lima, M.B., Araujo, M.C.U., 2019. Synthesis of highly fluorescent carbon dots from lemon and onion juices for determination of riboflavin in multivitamin/mineral supplements, *J. Pharm. Anal.* In press. Doi:10.1016/j.jpha.2019.02.003
 28. Nafady, A.N., Bagy, M.M.K., Abd-Alla, M.H., Morsy, F.M., Mahmoud, G.A., 2015. Improvement of medium components for high riboflavin production by *Aspergillus terreus* using response surface methodology. *Rend. Lincei* 26. Doi: 10.1007/s12210-015-0449-7

29. NCBI. National Center of Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>.
30. Nigam, P.S., Luke, J.S., 2016. Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties. *Curr. Opin. Food Sci.* 7,93–100. Doi: 10.1016/j.cofs.2016.02.004
31. Ou, H.P., Wang, C.C.R., Lai, L.S., 2009. Thermal degradation kinetics analysis of monacolin K in *Monascus*-fermented products. *LWT* 42, 292–296.
32. Palacio-Barrera, A.M., Areiza, D., Zapata, P., Atehortúa, L., Correa, C., Peñuela-Vásquez, P., 2019. Induction of pigment production through media composition, abiotic and biotic factors in two filamentous fungi. *Biotechnol. Rep.* In Press. Doi:10.1016/j.btre.2019.e00308
33. Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P.E., Longa, C.M.O., Yousaf, L., Pertot, I., Campisano, A., 2012. Fungal Endophytic Communities in Grapevines (*Vitis vinifera* L.) respond to Crop Management. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4308–4317. Doi: 10.1128/AEM.07655-11
34. Petrini, O., 1991. Fungal endophytes of tree leaves, in: Andrews, J.H., Hirano, .S.S., (Eds.), *Microbial ecology of leaves*. Springer-Verlag: New York, pp. 179-197.
35. Phuwapraisirisan, P.; Sawang, K.; Siripong, P.; Tip-Pyang, S., 2007. Anhydrocochlioquinone A, a new antitumor compound from *Bipolaris oryzae*., 2007. *Tetrahedron Lett.* 48, 5193–5195.
36. Rank, C., Nielsen, K.F., Larsen, T.O., Varga, J., Samson, R.A., Frisvad, J.C., 2011. Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biol.* 115, 406-420. Doi: 10.1016/j.funbio.2011.02.013
37. Rodriguez, P., Gonzalez, D., Giordano, S.R., 2016. Endophytic microorganisms: a source of potentially useful biocatalysts. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 133, 569-581. Doi: 10.1016/j.molcatb.2017.02.013
38. Rondot, Y., Reineke, A., 2018. Endophytic *Beauveria bassiana* in grapevine *Vitis vinifera* (L.) reduces infestation with piercing-sucking insects. *Biol. Control* 116, 82-89. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2016.10.006
39. Schwechheimer, S.K., Park, E.Y., Revuelta, J.L., Becker, J., Wittmann, C., 2016. Biotechnology of riboflavin. *App. Microbiol. Biotechnol.* 100(5), 2117-2119. Doi: 10.1007/s00253-015-7256-z
40. Schwechheimer, S.K., Becker, J., Peyriga, L., Portais, J., Sauer, D., Müller, R, Hoff, B., Haefner, S., Schröder, H., Zelder, O., Wittmann, C., 2018. Improved riboflavin production with *Ashyba gossypii* from vegetable oil based on ¹³C metabolic network analysis with combined labeling analysis by GC/MS, LC/MS, 1D, and 2D NMR. *Metab. Eng.* In press. Doi:10.1016/j.ymben.2018.04.005
41. Serra, R., Mendonça, C., Venâncio, A., 2006. Fungi and ochratoxin A detected in healthy grapes for wine production. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 42-47. Doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01805.x

42. Shahid, M., Islam, S., Mohammad., 2013. Recent advancements in natural dye applications: a review. *J. Clean. Prod.* 53, 310-331. Doi: 10.1016/j.jclepro.2013.03.031
43. Silva, A.V. Novos derivados da riboflavina e novos complexos de Rutênio (II) poliazaaromáticos com potencial uso em tratamento e diagnóstico de leishmaniose. 2013. 244f. Tese. (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo. Instituto de Química, São Paulo, 2013.
44. Sopandi., T., Wardah, A., Surtiningsih, T., Suwandi, A., Smith, J.J., 2012. Utilization and optimization of a waste stream cellulose culture medium for pigment production by *Penicillium spp.* *J. Appl. Microbiol.* 114, 733-745. Doi:10.1111/jam.12110
45. Suryanarayanan, T.S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M.B., Sasse, F., Jansen, R., Murali, T.S., 2009. Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biol. Rev.* 23, 9-19. Doi: 10.1016/j.fbr.2009.07.00
46. The United States Pharmacopeia. The National Formulary: Meeting at Washington, D.C., March 9-12, 1995. Official from January 1, 2000, 2569 páginas.
47. Toghueo, R.M.K., Zabalgoceazcoa, I., Aldana, B.R.V., Boyom, F.F., 2017. Enzymatic activity of endophytic fungi from the medicinal plants *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* and *Cananga odorata*. *S. Afr. J. Bot.* 109, 146–153. Doi: 10.1016/j.sajb.2016.12.021
48. Torres, F.A.E., Zaccarim, B.R., Novaes, L.C.L., Jozala, A.F., dos Santos, C.A., Teixeira, M.F.S., Santos-Ebinuma, V.C., 2016. Natural colorants from filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 100, 2511-2521. Doi 10.1007/s00253-015-7274-x
49. United States Pharmacopeia. 24.ed. Rockville U.S.: Pharmacopeial Convention; 2000. Disponível em: http://ftp.uspbpep.com/v29240/usp29nf24s0_m73500.html Acesso em 2 de junho de 2019.
50. Varanda, C.M.R., Oliveira, M., Materatski, P., Landum, M., Clara, M.I.E., Félix, M.R., 2016. Fungal endophytic communities associated to the phyllosphere of grapevine cultivars under different types of management. *Fungal Biol.* 20,1525-1536. Doi: 10.1016/j.funbio.2016.08.002
51. Vendruscolo, F., Müller, B.L., Moritz, D.E., De Oliveira, D., Schmidell, W., Ninow, J.L., 2013. Thermal stability of natural pigments produced by *Monascus ruber* in submerged fermentation. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2, 278–284. Doi: 10.1016/j.bcab.2013.03.008
52. Venkatachalam, M., Zelena, M., Cacciola, F., Ceslova, L., Girard-Valenciennes, E., Clerc, P., et al., 2018. Partial characterization of the pigments produced by the marine-derived fungus *Talaromyces albobiverticillius* 30548. Towards a new fungal red colorant for the food industry. *J. Food. Compost. Anal.* 67, 38–47. Doi: 10.1016/j.jfca.2017.12.036
53. Wang, X.W., Houbraken, J., Groenewald, J.Z., Meijer, M., Andersen, B., Nielsen, K.F., Crous, P.W., Samson, R.A., 2016. Diversity and taxonomy of *Chaetomium* and chaetomium-like fungi from indoor environments. *Stud. Mycol.* 88,145-224. Doi: 10.1016/j.simyco.2016.11.005.

54. Wang, E., Dong, C., Park, R.F. and Roberts, T.H., 2018. Carotenoid pigments in rust fungi: Extraction, separation, quantification and characterization. *Fungal Biol. Rev.* 32, 1-15. Doi: 10.1016/j.fbr.2018.02.002
55. Wang, M., Sun, Z., Chen, Y., Liu, H., Li, H., Tan, G., Li, S., Guo, X., Zhang, W., 2016. Cytotoxic cochlioquinone derivatives from the endophytic fungus *Bipolaris sorokiniana* derived from *Pogostemon cablin*. *Fitoterapia*.
56. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. p.315-322.
57. Xin, Q., Pan, T., Zhang, W., and Wang, Z. 2019. Submerged culture of marine-derived *Penicillium sclerotiorum* FS50 to produce sclerotiorin. *Proc. Biochem.* 79, 28-31. Doi:10.1016/j.procbio.2018.12.009
58. Yoganathan, K., Rossant, C., Glover, R.P., Cao, S., Vittal, J.J., NG, S., Huang, W., Buss, A.D., Butler, M.S., 2004. Inhibition of the human chemokine receptor CCR5 by variecolin and variecolol and isolation of four New variecolin analogues, emericolins A-D, from *Emericella aurantiobrunnea*. *J. Nat. Prod.* 67, 1681-1684.
59. Zhong, S., Zhang, X., Wang, Z., 2015. Preparation and characterization of yellow *Monascus* pigments. *Sep. Purif. Technol.* 150, 139–144. Doi: 10.1016/j.seppur.2015.06.040

CAPÍTULO 2

ARTIGO 2

Condição do cultivo submerso para produção de pigmento amarelo pelo fungo endofítico *Arcopilus aureus*

Revista: Biocatalysis and Agricultural Biotechnology

Fator de impacto: 2,26

Qualis Capes: A2

Condição do cultivo submerso para produção de pigmento amarelo pelo fungo endofítico *Arcopilus aureus*

Submerged culture conditions for the production of alternative natural pigment by endophytic fungus *Arcopilus aureus*

Luciana Amaral de Faria Silva^a, Daniel Florêncio Filho^b, Leandro Santos Soares^c, Silmara Almeida de Carvalho^d

^a Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. Rodovia BR 415, Km 03, s/n, 45700-000, Itapetinga, Bahia, Brazil.

^b Pós-graduação em Química, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. Rua José Moreira Sobrinho, s/n, 45206-190, Jequié, Bahia, Brazil.

^c Departamento de Tecnologia Rural e Animal, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. Rodovia BR 415, Km 03, S/N, 45700-000, Itapetinga, Bahia, Brazil.

^d Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB. Rodovia BR 415, Km 03, S/N, 45700-000, Itapetinga, Bahia, Brazil.

*Corresponding author: Tel.: +55 77 32611720. Email address: scarvalho@uesb.edu.br Rodovia BR 415, Km 03, S/N, 45700-000, Itapetinga, Bahia, Brazil. Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais, UESB.

Conflito de interesse: Não há.

Contribuições: Luciana Amaral de Faria Silva participou da pesquisa e da preparação do artigo. Daniel Florêncio Filho participou da pesquisa. Leandro Soares Santos e Silmara Almeida de Carvalho participaram da preparação do artigo. Todos os autores aprovaram o artigo final.

Resumo

É crescente o interesse por pigmentos naturais não convencionais como os pigmentos produzidos por fungos. Entretanto, trabalhos avaliando fungos endofíticos isolados de videiras como produtores de pigmentos naturais são escassos. Nesse contexto, foi avaliado o potencial de produção de pigmento amarelo pelo endofítico *Arcopilus aureus* isolado de videira sob a influência de diferentes fontes de carbono, nitrogênio, pH inicial, e em condições melhoradas de cultivo. *A. aureus* foi capaz de utilizar sacarose, xilose e lactose, como fontes de carbono. E também, nitrato de sódio, peptona de caseína e extrato de malte, como fontes de nitrogênio, para produzir o mesmo pigmento amarelo. Entretanto, a associação entre as melhores fontes de carbono (lactose) e nitrogênio (peptona de caseína) provocou uma mudança qualitativa e um pigmento diferente do original foi produzido. Uma nova associação foi feita entre sacarose e peptona de caseína. Essa associação aumentou efetivamente a produção do pigmento amarelo. Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) foi realizado para avaliar os efeitos das variáveis concentração de sacarose e concentração de peptona de caseína sobre a resposta produção de pigmento. A porcentagem de variância explicada pelo modelo ($R^2 = 99\%$) foi satisfatória. A produção máxima de pigmento ($4,129U_{450}$) foi obtida com 20,0g/L de sacarose e 7,8g/L de peptona de caseína, em pH inicial 5. Isso significou um aumento de 53 vezes sobre a produção de pigmento amarelo referência. Por fim, *A. aureus* apresentou-se como um potencial fungo endofítico para produção de pigmento amarelo natural não convencional.

Palavras-chave: Pigmento não convencional, *Arcopilus* sp., uvas, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, otimização.

1 Introdução

A utilização de pigmentos de fontes naturais tem crescido na indústria alimentícia devido à preferência dos consumidores por alimentos com ingredientes naturais saudáveis (Hilares et al., 2018). Esse fato pode ser confirmado através do sucesso de marketing e venda de pigmentos naturais convencionais derivados de plantas e não convencionais obtidos de microalgas, como b-caroteno, luteína e astaxantina (Dufossé, 2018; LV et al., 2017). Além disso, pigmentos naturais são renováveis e biodegradáveis o que os torna uma potencial “*Green Chemistry*” para substituir os corantes artificiais (Aruldass et al. 2018).

Além das microalgas, os fungos filamentosos também estão entre as fontes não convencionais de produção de pigmentos naturais. Esses micro-organismos são conhecidos por produzirem diferentes classes de pigmentos como carotenoides e policetídeos. Pigmentos policetídeos são, em sua maioria, azafilonas, derivados da quinona, melanina e flavina (Dufossé, 2014).

A produção de pigmentos naturais por fungos filamentosos é uma opção atrativa. Isso se deve ao crescimento relativamente rápido em espaços pequenos, e ao alto rendimento em pigmentos ao usar condições de cultivo melhoradas (Dufossé, 2005). Além disso, pigmentos fúngicos apresentam cores em diferentes tons e são mais estáveis às variações de pH e temperatura que os pigmentos naturais de plantas (Nigam e Luke, 2016).

De um modo geral, as principais pesquisas relacionadas a pigmentos naturais microbianos têm seguido duas tendências. A primeira trata-se da busca por novas espécies não tóxicas produtoras de pigmentos potenciais. Enquanto a segunda relaciona-se ao aumento da produção de pigmentos sob a influência de diferentes fatores (Rodriguez-Amaya, 2016 e 2018). Diversos estudos têm demonstrado que a produção e as características dos pigmentos fúngicos podem ser reguladas pelas condições de cultura e pela composição do meio (Chen et al., 2015; Hilares et al., 2018; Pradeep et al., 2013; Santos-Ebinuma et al., 2013; Zhang et al., 2013). Além disso, a produção de pigmento em larga escala juntamente com a redução de custos também tem recebido atenção. Para isso, têm sido aplicados delineamentos estatísticos, técnicas de otimização, e análises por superfície de resposta (Dursun e Dalgiç, 2016; Prajapati et al., 2014; Varmira et al., 2016).

Diante disso, estudo com fungos filamentosos endofíticos isolados de videiras pode ir ao encontro dessas tendências devido à grande variedade de espécies que têm sido isoladas dessa planta (Panther et al., 2012; Varanda et al., 2016). *Arcopilus aureus* (Chaetomiaceae) é uma das espécies de fungos endofíticos já isoladas de videiras (Dwibedi e Saxena, 2018), que apresenta capacidade de degradar celulose e colonizar o ar e o solo (Wang et al., 2016). *A. aureus* também já foi encontrado como fungo endofítico capaz de produzir um amplo espectro de compostos bioativos (Dwibedi e Saxena, 2018; Kabbaj et al., 2015; Lin et al., 2012; Suryanarayanan et al., 2009). Entretanto, na literatura pesquisada, não foram encontrados estudos com objetivo de avaliar a influência do meio de

cultivo sobre a produção de pigmentos por *A. aureus*. Além disso, essa espécie não foi relacionada à produção de aflatoxina e não causa complicações à saúde humana (Rank et al., 2011).

Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial de produção de pigmento amarelo extracelular pelo fungo endofítico *Arcopilus aureus* isolado de videira (*Vitis vinífera*), isto é: (i) estudar a influência de diferentes fontes de carbono, nitrogênio e pH inicial sobre a produção de pigmento e (ii) obter condições melhoradas de cultivo por meio de um planejamento experimental.

2 Materiais e métodos

2.1 Micro-organismo e preparação do inóculo

O fungo filamentoso *Arcopilus aureus* foi isolado de raiz de videira (*Vitis vinífera*) e compõe a Coleção de Cultura de Fungos Endofíticos Isolados de Videiras, do Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (LPNBio). A cepa do micro-organismo encontrava-se preservada em sílica estéril e foi usada para inoculação em tubos *slant* com ágar batata dextrose (PDA). Os tubos foram incubados por 7 dias a 30°C. Em seguida, foi preparada uma suspensão de esporos ($3,4 \times 10^7$ esporos/mL) para ser utilizada nos cultivos submersos estacionários.

2.2 Cultivo submerso estacionário

Cultivo submerso estacionário foi realizado para produção do pigmento amarelo referência por *A. aureus*. Volume de 10mL de suspensão de esporos foi inoculado em frasco Erlenmeyer (250mL), contendo 50mL de meio Czapeck (meio controle) (3,0g/L NaNO₃, 1,0g/L K₂HPO₄, 0,5g/L MgSO₄.7H₂O, 0,5g/L KCl, 0,01g/L FeSO₄.7H₂O, 30,0g/L sacarose e pH inicial 5). O frasco foi incubado à temperatura de 30°C durante 15 dias, ao abrigo da luz e em condição estática. O cultivo foi realizado em triplicata. Após o período de cultivo, o extrato bruto contendo o pigmento (50mL) foi separado da biomassa por filtração e submetido à extração com 30mL de acetato de etila. A fração acetato de etila foi submetida à varredura em espectrofotômetro, entre 350 e 700nm para obter o espectro de absorção do pigmento produzido no meio controle (pigmento amarelo referência). Em seguida, foi determinado o $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção (450nm). O $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção foi usado para determinar a produção do pigmento através da medida da absorvância da fração acetato de etila em 450nm (Color Value U₄₅₀), de acordo com LV et al. (2017). Todas as etapas apresentadas foram realizadas em triplicata.

2.3 Influência da fonte de carbono e fonte de nitrogênio sobre a produção de pigmentos

Foram conduzidos 2 experimentos paralelamente. O primeiro abordou o efeito da fonte de

carbono, em que o meio Czapeck foi preparado com modificação da fonte de carbono por: glicose, frutose, lactose, ramnose, xilose e amido. O segundo experimento abordou o efeito da fonte de nitrogênio, em que o meio Czapeck foi preparado com modificação da fonte de nitrogênio por: peptona bacteriológica (~12% de nitrogênio total), peptona de caseína (~13% de nitrogênio total), extrato de levedura (~10% de nitrogênio total), extrato de malte (~1% de nitrogênio total), glutamato monossódico e sulfato de amônio. Os experimentos foram realizados em triplicata e nas mesmas condições descritas para o cultivo submerso estacionário. Após o período de cultivo, o extrato bruto (50mL) foi separado da biomassa por filtração. Para extração do pigmento, acetato de etila (30mL) foi adicionado ao extrato bruto. As frações acetato de etila foram lidas em espectrofotômetro de varredura, entre 350 e 700nm para obtenção dos espectros de absorção. A produção de pigmento foi determinada através da medida da absorvância da fração acetato de etila (U_{450}).

2.4 Influência do pH inicial sobre a produção de pigmentos

O meio Czapeck foi preparado ajustando o pH inicial em 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10, com soluções de HCl e NaOH. Os experimentos foram realizados em triplicata e nas mesmas condições descritas para o cultivo submerso estacionário. Após o período de cultivo, o extrato bruto (50mL) foi separado da biomassa por filtração. A extração do pigmento foi realizada com a adição de acetato de etila (30mL).

2.5 Perfil cromatográfico da solução do pigmento amarelo referência

Um novo processo de cultivo foi conduzido em 4L de meio Czapeck e nas mesmas condições do cultivo submerso estacionário. Após o período de cultivo, o extrato bruto foi submetido a extrações com alíquotas de 100mL de acetato de etila até completar o volume de 2L. A fração acetato de etila foi concentrada em rotaevaporador. Uma solução 300 μ g/mL foi preparada em acetonitrila:isopropanol 80:20, a partir do resíduo sólido obtido (solução do pigmento amarelo referência). Essa solução foi usada para determinar o perfil cromatográfico do pigmento amarelo referência por HPLC.

2.6 Perfil cromatográfico dos pigmentos produzidos a partir das melhores fontes de carbono e nitrogênio

Uma repetição da fração acetato de etila obtida a partir das fontes xilose, lactose, peptona de caseína, extrato de malte e extrato de levedura foi concentrada em rotaevaporador. Os resíduos sólidos foram solubilizados em 10mL de acetonitrila:isopropanol (80:20) para determinar os perfis cromatográficos por HPLC.

2.7 Produção de pigmento a partir da melhor fonte de carbono, nitrogênio e pH inicial

O processo de cultivo foi conduzido a partir da modificação do meio Czapeck. A fonte de carbono foi substituída por lactose e a fonte de nitrogênio, por peptona de caseína. O pH inicial foi mantido em 5. O experimento ocorreu nas mesmas condições do cultivo submerso estacionário e em triplicata. Após o período de cultivo, foi adicionado acetato de etila (30mL) ao extrato bruto (50mL). O espectro de absorção e a produção de pigmento (U_{450}) foram determinados na fração acetato de etila. Em seguida, a fração acetato de etila de uma repetição foi concentrada em rotaevaporador. O resíduo sólido foi usado para preparar uma solução 300 μ g/mL em acetonitrila:isopropanol 80:20. A solução foi usada para determinar o perfil cromatográfico por HPLC.

2.8 Análise por HPLC

Para as análises cromatográficas foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu (Kyoto^o, Japan), equipado com sistema quaternário de bombas, desgaseificador, válvula de injeção com alça de amostragem de 20 μ L, forno de coluna e detector UV/Vis de arranjo de díodos. A coluna era de fase reversa C18 (CLC-ODS, 4.6x150mm). Os eluentes (acetonitrila e água acidificada com ácido fórmico) e o gradiente usados foram os mesmos descritos por Gomes e Takahashi (2016). O fluxo foi mantido a 1mL/min e o comprimento de onda selecionado foi 450nm.

2.9 DCCR para 2 variáveis independentes sobre a produção de pigmento

A partir dos efeitos observados com o fatorial fracionado, foi realizado um DCCR que incluiu quatro pontos axiais e três repetições do ponto central. Os resultados do DCCR foram usados para tentar ajustar uma equação polinomial de segunda ordem de acordo com os efeitos de cada variável de entrada e suas interações. As variáveis avaliadas foram a concentração de sacarose (C_{Sacarose} , X_1) e a concentração de peptona de caseína ($C_{\text{Pep. caseína}}$, X_2) (Tabela 2). A influência das variáveis foi avaliada em função da resposta definida como produção de pigmento (U_{450}). Os ensaios ocorreram nas mesmas condições descritas na etapa de cultivo submerso estacionário. Os valores dos pontos centrais foram definidos previamente a partir do planejamento fatorial fracionado. O planejamento indicou que o aumento da $C_{\text{Pep. caseína}}$ e a diminuição da C_{Sacarose} apresentavam efeito positivo sobre a produção de pigmento. O ensaio que proporcionou a maior produção de pigmentos foi realizado novamente em triplicata para confirmar e comparar o resultado.

Tabela 1. Valores experimentais utilizados no DCCR para as duas variáveis independentes.

Variável	Variáveis codificadas	-1,41	-1	0	1	1,41	Varição
C_{Sacarose} (g/L)	X_1	5,9	10	20	30	34,1	10
$C_{\text{Pep. caseína}}$ (g/L)	X_2	2,2	3	5	7	7,8	2

2.10 Análise estatística

Os experimentos de seleção da melhor fonte de carbono, nitrogênio, pH inicial e a confirmação do melhor ensaio do DCCR foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média e desvio padrão. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) foram detectadas por ANOVA e com teste de Tukey, por meio do software Statistica[®] 10.0. O mesmo software foi usado para o DCCR, para determinar a análise de regressão, e para construção do gráfico dos dados obtidos. A falta de ajuste foi avaliada por ANOVA. A significância estatística da equação do modelo foi determinada pelo teste de Fisher. A proporção de variância explicada pelo modelo polinomial foi dada pelo valor de R quadrado (R^2). O nível de significância foi estabelecido em 0,1.

3 Resultados e discussão

3.1 Produção do pigmento amarelo referência

Por meio da varredura em espectrofotômetro, o comprimento de onda máximo (λ_{\max}) da fração acetato de etila do pigmento amarelo referência foi verificado em 450nm e se encontra dentro da faixa de leitura da cor amarela.

3.2 Influência das fontes de carbono e nitrogênio e pH inicial

A capacidade de *A. aureus* assimilar uma vasta gama de fontes de carbono, nitrogênio e pH foi avaliada (Fig. 1). Observa-se nitidamente que esse fungo é produtor de pigmentos de tons entre amarelo e vermelho, apesar de apenas o tom amarelo fazer parte do objetivo desse estudo. A habilidade de produzir mais de um pigmento evidencia o potencial desse fungo como produtor de pigmentos naturais.

		Fonte de carbono						
		Amido	Sacarose	Frutose	Glicose	Lactose	Xilose	Ramose
Extrato bruto								
Média pH final		5,9	6,0	6,2	6,0	5,9	6,1	5,8
Fração acetato de etila								

		Fonte de nitrogênio						
		Nitrato de sódio	Peptona de caseína	Peptona bacteriológica	Extrato de levedura	Extrato de malte	Glutamato mono ssódico	Sulfato de amônio
Extrato bruto								
Média pH final		6,0	4,5	3,5	3,5	4,4	6,7	3,1
Fração acetato de etila								

		pH inicial						
		4	5	6	7	8	9	10
Extrato bruto								
Média pH final		6,3	6,0	8,2	6,9	7,0	6,8	7,4
Fração acetato de etila								

Fig. 1. Aspectos dos extratos brutos, da fração acetato de etila, e média do pH final após cultivo de *A. aureus* a partir de: diferentes fontes de (a) carbono, (b) nitrogênio e (c) diferentes valores de pH inicial. Figuras em destaque correspondem ao extrato bruto, fração acetato de etila, e média do pH final após cultivo de *A. aureus* no meio controle (pigmento amarelo referência).

Os extratos brutos das fontes de carbono apresentaram cor amarela, com exceção da ramnose. Enquanto as frações acetato de etila apresentaram cor amarela similar à fração do pigmento amarelo referência (Fig. 1a). Os extratos brutos das fontes orgânicas de nitrogênio apresentaram cor vermelha intensa, com exceção do glutamato monossódico (Fig. 1b). Entretanto, o fracionamento com acetato de etila permitiu o arraste e a concentração de pigmento com cores entre amarelo e laranja. Isso pode ser confirmado através das varreduras das frações acetato de etila (Fig. 2). A partir delas não foram observados picos de absorção em faixa de comprimento de onda que caracteriza a cor vermelha (~500-600nm). As frações acetato de etila de peptona de caseína e extrato de malte apresentaram cor amarela semelhante à do meio controle. A produção de pigmento de cor amarela foi influenciada pelas fontes de carbono e nitrogênio. Entretanto, pigmentos de outras cores foram influenciados somente pela fonte de nitrogênio. A literatura sugere que as fontes de nitrogênio regulam a expressão de genes de interesse. Essa regulação ativa importantes vias metabólicas relacionadas à síntese de pigmentos (Chatterjee et al., 2009). Além disso, o nitrogênio facilita o crescimento das células dos microorganismos. E isso se deve à grande abundância desse elemento nas membranas celulares e nos ácidos nucleicos (Chen et al., 2015).

Percebe-se no extrato bruto da Fig. 1c, que valores de pH iniciais maiores que 5 favoreceram a produção de pigmentos com cores próximas ao vermelho. Enquanto pH inicial 4 e 5 favoreceram a produção de pigmento amarelo. Esse resultado pode ser explicado porque alguns pigmentos podem sofrer reações químicas que dependem do pH do meio e da razão carbono:nitrogênio (C/N). De um modo geral, pH baixo favorece a produção de pigmentos amarelo e laranja para alguns fungos. Enquanto pH relativamente alto aumenta a produção de pigmento vermelho (Chen et al., 2015). Acetato de etila não foi capaz de extrair o pigmento produzido por *A. aureus* em pH inicial 4. Esse resultado pode indicar que o pigmento produzido em pH 4 é diferente do pigmento amarelo referência e apresenta em sua composição componentes pouco hidrofílicos. O pH do meio pode afetar o transporte de nutrientes através das células dos micro-organismos, como as fontes de carbono e nitrogênio (Singh et al., 2015) e também a atividade de enzimas que estão envolvidas na produção de pigmentos (Méndez et al., 2011). Portanto, em relação ao pH inicial, a única fração acetato de etila pigmentada de amarelo foi relacionada ao pH 5, que é o mesmo do meio controle.

Os valores encontrados de pH final (Fig. 1a e Fig. 1b) demonstraram que houve variação do pH durante o cultivo. Todas as fontes de carbono aumentaram o pH final. Ao contrário das fontes de nitrogênio que proporcionaram redução do pH final, com exceção do nitrato de sódio e glutamato monossódico. Mesmo assim, as fontes de nitrogênio proporcionaram a maior variação entre pH inicial e final, tal como já observado por outros autores (Shi et al., 2015). Também há relato na literatura de que a redução do pH final pode ser devido à presença de compostos ácidos e de ácidos orgânicos. Compostos ácidos e ácidos orgânicos podem ser produzidos pelo próprio fungo, como os ácidos acético, cítrico, málico e succínico (Orak et al., 2018).

A Fig. 2 traz os espectros de absorção das frações acetato de etila obtidas a partir do cultivo em meio controle (Fig. 2a) e a partir de diferentes fontes de carbono (Fig. 2b) e nitrogênio (Fig. 2c). Os espectros foram construídos antes de iniciar a determinação da produção do pigmento (U_{450}).

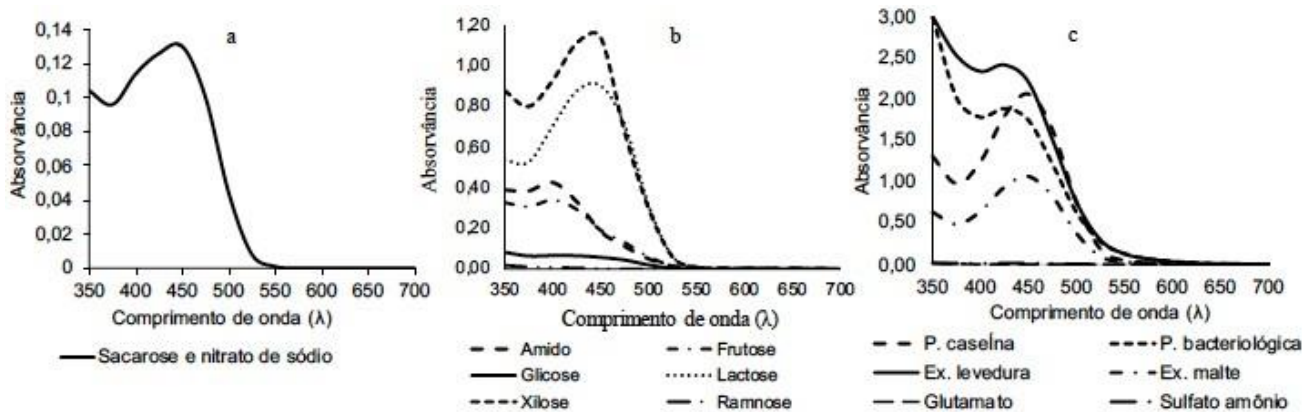


Fig. 2. Varredura da fração acetato de etila do pigmento de *A. aureus*. (a) Espectros de absorção do pigmento obtido a partir do cultivo em meio controle: sacarose, nitrato de sódio e pH inicial 5 (pigmento amarelo referência). (b) Espectros de absorção dos pigmentos produzidos em diferentes fontes de carbono com nitrato de sódio. (c) Espectros de absorção dos pigmentos produzidos em diferentes fontes de nitrogênio com sacarose.

Os espectros de absorção referentes à ramnose, glutamato monossódico e sulfato de amônio confirmaram a ausência de cor observada nas frações acetato de etila nas Figs. 1a e b. As frações de acetato de etila de todas as outras fontes apresentaram absorção em 450nm. Porém, o $\lambda_{\text{máx}}$ referentes às frações das fontes amido, frutose, glicose, extrato de levedura e peptona bacteriológica não ocorreu em 450nm. Ou seja, os espectros dessas frações não corresponderam ao espectro encontrado para o pigmento amarelo referência (Fig 2a). Os espectros que realmente se assemelharam ao do pigmento amarelo referência foram obtidos a partir das fontes xilose, lactose, peptona de caseína e extrato de malte. Portanto, apenas a produção de pigmento (U_{450}) a partir dessas quatro fontes pode realmente ser comparada à do pigmento amarelo referência (Tabela 4).

Se não houvesse análise dos espectros de absorção, a interpretação sobre a produção de pigmento poderia ser equivocada, tal como já foi relatado por outros autores (Wang et al., 2018). Muitos trabalhos têm abordado a capacidade de produção de pigmentos por fungos em meios modificados (Ahrmad e Panda 2014; Celestino et al., 2014; Costa e Vendruscolo, 2017; Orak et al., 2018; Palacio-Barrera et al. 2019). Em geral, essa abordagem também é realizada por método espectrofotométrico. Entretanto, é comum não construir os espectros de absorção para cada fonte analisada. Na verdade, a produção do pigmento é geralmente acompanhada em função da absorvância em comprimento de onda fixo característico, encontrado na literatura. Portanto, não há a garantia que o mesmo pigmento tenha sido produzido.

Os espectros de absorção das frações acetato de etila obtidas a partir de diferentes valores de pH inicial não foram construídos. Essa decisão foi baseada no fato de que apenas o pH inicial 5 foi capaz de proporcionar a produção de pigmento amarelo referência por *A. aureus* (Fig. 1c). Esse valor

de pH inicial foi o mesmo fixado no meio Czapeck (sacarose, nitrato de sódio e pH inicial 5). Com isso, a produção de pigmento amarelo referência (U₄₅₀) em pH inicial 5 pode ser considerada igual às das fontes sacarose e nitrato de sódio apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Efeitos de diferentes fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção de pigmento amarelo por *A. aureus* em cultivo submerso estático, por 15 dias a 30°C.

Fonte de carbono* (30g/L)	Pigmento (U ₄₅₀)	Fonte de nitrogênio** (3g/L)	Pigmento (U ₄₅₀)
Xilose	0,676±0,002 ^a	Peptona de caseína	1,238±0,007 ^a
Lactose	0,542±0,006 ^b	Extrato de malte	0,639±0,007 ^b
Sacarose	0,077±0,004 ^c	Nitrato de sódio	0,077±0,004 ^c

Produção de pigmento (U) medida a 450nm (média±desvio padrão, n=3). Letras diferentes foram significativamente diferentes (ANOVA, Tukey's test; p<0.05). *Nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. **Sacarose como fonte de carbono.

A produção a partir de xilose como fonte de carbono foi cerca de oito vezes maior (p<0,05) que a produção com sacarose (fonte de carbono do meio controle). Esse fato pode indicar que a espécie estudada assimila melhor a xilose em seu metabolismo. A xilose é utilizada no metabolismo primário dos fungos através da via pentose fosfato. Essa via é muito importante para a produção de energia e precursores para a biossíntese de nucleotídeos e aminoácidos (Battaglia et al., 2014). Além disso, a maior assimilação de xilose talvez possa ser explicada pela adaptação que a cepa estudada apresentava no local de onde foi isolada (raiz de videira). Na raiz da videira, *A. aureus* provavelmente utilizava xilose como fonte de carbono. Nesse caso, a xilose seria obtida a partir da degradação de celulose da videira, por ação de enzimas (Marques et al., 2018). Esse aumento obtido com xilose sobre a produção de pigmento é interessante quanto à possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais. Na presença de resíduos ricos em celulose, *A. aureus* seria capaz de degradar esse polissacarídeo e, conseqüentemente, liberar xilose, que seria consumida como fonte de carbono, para produzir pigmento. Dessa forma, o processo de produção do pigmento se tornaria mais barato, além de contribuir para reduzir a geração de resíduos. O aumento sobre a produção de pigmentos por *Penicillium sclerotiorum* na presença de xilose pura também já foi observado por outros autores (Celestino et al., 2014).

Era esperado que glicose e frutose também pudessem aumentar a produção de pigmento amarelo referência como ocorreu na presença de xilose, pelo fato de serem monossacarídeos, portanto, mais fáceis de serem utilizados pelo micro-organismo. A adição de glicose e frutose favoreceu a produção de pigmento diferente do pigmento amarelo referência de *A. aureus* como pode ser observado no perfil do espectro de absorção.

O uso de lactose no meio de cultivo proporcionou um aumento sete vezes maior ($p \leq 0,05$) que o alcançado com sacarose. Esse incremento obtido é interessante também pela possibilidade de utilização de resíduos ricos em lactose. Contrariando os resultados observados, Gunasekaran e Poorniammal (2008) obtiveram produção de pigmento vermelho por *Penicillium* sp. duas vezes menor. Essa redução ocorreu ao substituir a sacarose por lactose ao meio de cultivo. Vale ressaltar que os autores observaram o aumento sobre a produção de pigmento através da leitura da absorvância em comprimento de onda fixo.

A ramnose não proporcionou a pigmentação do extrato bruto por *A. aureus*. Mas esse monossacarídeo já foi verificado como sendo a melhor fonte de carbono para aumentar a produção de pigmento por *P. sclerotiorum* (Celestino et al., 2014). De um modo geral, a relação entre o consumo de fontes de carbono e a produção de pigmentos parece ser dependente da cepa empregada. Ou seja, alguns carboidratos são mais facilmente assimiláveis por algumas cepas que por outras (Pisareva et al., 2010). Independente de qual foi a melhor fonte de carbono para produção de pigmento, pode-se observar que *A. aureus* foi capaz de assimilar e se adaptar a uma vasta gama de fontes de carbono.

Apesar de *A. aureus* ter alcançado a maior produção de pigmento amarelo referência ao consumir xilose, apenas lactose foi selecionada como a melhor fonte de carbono. Essa seleção ocorreu porque a lactose foi economicamente viável, nas condições aplicadas nesse estudo. Além disso, também proporcionou aumento significativo sobre a produção de pigmentos.

A peptona de caseína aumentou cerca de dezesseis vezes ($p \leq 0,05$) a produção de pigmento, em comparação com o nitrato de sódio (fonte de nitrogênio do meio controle). Comumente as peptonas são obtidas como hidrolisados de proteínas preparados a partir de materiais proteicos de animais e de plantas. Além de peptídeos e aminoácidos, peptonas podem fornecer também carbono, nitrogênio e enxofre, o que favorece o crescimento dos fungos (Pradeep et al., 2013), e conseqüentemente a produção de pigmentos durante seu metabolismo (Quereshi et al., 2010; Orak et al.; 2018). As peptonas não são necessariamente equivalentes na composição final. Na verdade, essa composição depende da matéria-prima usada e do grau de hidrólise aplicado. Esse fato pode ser observado a partir da peptona bacteriológica (obtida da hidrólise de tecidos animais), que não proporcionou a produção de pigmento amarelo referência, tal como a peptona de caseína (obtida da hidrólise das proteínas do leite). A influência positiva da peptona de caseína sobre a produção de pigmentos também já foi detectada por outros autores (Gunasekaran e Poorniammal, 2008; Santos- Ebinuma et al., 2013; Celestino et al., 2014).

Em geral, fontes orgânicas de nitrogênio favorecem mais a produção de pigmentos que as fontes inorgânicas (Pradeep et al., 2013). Fontes orgânicas apresentam em sua composição

aminoácidos, coenzimas, vitaminas e fatores de crescimento, que também favorecem o crescimento dos fungos e produção de pigmentos. Isso pode ser notado com os resultados alcançados não apenas com a peptona de caseína, mas também com extrato de malte. Na presença de extrato de malte, a produção de pigmento foi 8,3 vezes maior que na presença de nitrato de sódio. O extrato de malte também possui o dissacarídeo maltose em sua composição. Esse dissacarídeo também pode ser consumido pelo micro-organismo durante seu crescimento, o que pode favorecer a produção de pigmento. E a produção de pigmento na presença de extrato de malte foi 1,9 vezes menor em comparação à peptona de caseína. Isso poderia ser explicado pela menor proporção de nitrogênio orgânico naturalmente presente no extrato de malte. Glutamato monossódico é um aminoácido com estrutura simples. Portanto, era esperado que essa fonte orgânica de nitrogênio fosse facilmente assimilada e que aumentasse a produção de pigmento (Pisareva e Kujumdzieva, 2010). Entretanto, *A. aureus* não produziu pigmento extracelular a partir de glutamato. Alguns autores já observaram resultados semelhantes e concluíram que glutamato monossódico está relacionado ao aumento da produção de pigmento intracelular em fungos. Ao passo que essa mesma fonte pode reduzir a produção de pigmentos extracelulares (Zhang et al., 2013; Palacio-Barrera et al., 2019).

A redução intensa da produção de pigmentos a partir de sulfato de amônio também já foi relatada. Essa redução, pode estar relacionada à produção de NH_4^+ que é considerado composto tóxico às células. E também ao aumento da produção de compostos de caráter ácido capazes de acidificar o meio (Santos-Ebinuma et al., 2013). Acidificação do meio foi observada no extrato bruto correspondente ao sulfato de amônio, em que o pH final médio atingiu o valor 3,1 (Fig. 1b). Diante do observado, peptona de caseína foi selecionada como a melhor fonte de nitrogênio para produção de pigmento por *A. aureus*.

Se compararmos a produção do pigmento amarelo por *A. aureus*, entre as melhores fontes de carbono, nitrogênio e pH inicial, a fonte de nitrogênio proporciona a maior produção: o cultivo com peptona de caseína atingiu uma produção 2 vezes maior que lactose com nitrato de sódio (pH inicial 5) e 16 vezes maior que sacarose com nitrato de sódio (pH inicial 5).

3.3 Perfis cromatográficos

O cromatograma da solução do pigmento referência (Fig. 3a) permitiu a visualização de 2 picos com absorção máxima em torno de 450nm: o primeiro em 7.8min e o segundo em 8.4min (Região A). Esse resultado corrobora com o observado na Fig. 2, cujo espectro também apresentou $\lambda_{\text{máx}}$ em 450nm. Os dois picos da Região A apresentaram a maior intensidade de sinal. Portanto, os picos correspondentes às estruturas moleculares que compõem o pigmento amarelo de *A. aureus* encontram-se entre 7.8 e 8.4min.

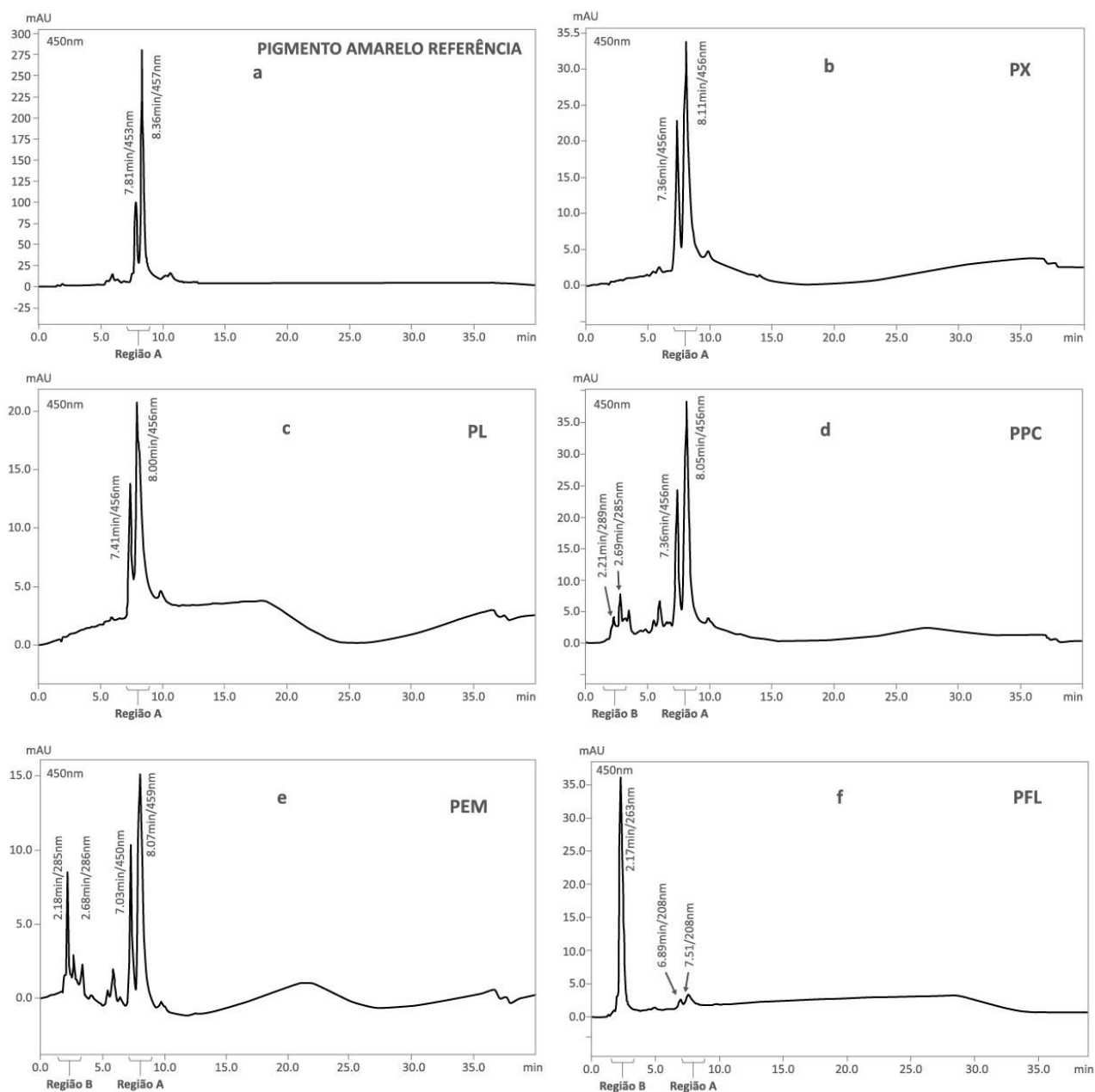


Fig. 3. Cromatogramas obtidos por HPLC (450nm). (i) Pigmento produzido por *A. aureus*, a partir da fermentação em meio controle (nitrato de sódio, sacarose e pH 5): (a) solução do pigmento amarelo referência. (ii) Pigmentos produzidos a partir da fermentação por *A. aureus* do meio Czapeck modificado: (b) PX – solução de pigmento xilose, (c) PL – solução de pigmento lactose, (d) PPC – solução de pigmento peptona de caseína, (e) PEM – solução de pigmento extrato de malte, (f) PEL – solução de pigmento extrato de levedura.

Os cromatogramas das soluções de pigmentos formados a partir de xilose (PX) (Fig. 3b), lactose (PL) (Fig. 3c), peptona de caseína (PPC) (Fig. 3d), extrato de malte (PEM) (Fig. 3e) e extrato de levedura (PEL) (Fig. 3f) foram obtidos. A escolha dessas soluções para análise cromatográfica baseou-se nos espectros de absorção e na maior produção de pigmento (U_{450}). Por sua vez, a seleção

de PEL para análise cromatográfica foi realizada para verificar se seu perfil cromatográfico seria diferente do pigmento amarelo referência, assim como foi observado para o seu espectro de absorção.

O comportamento comum entre o perfil cromatográfico de PX e PL confirmam os resultados verificados na Fig. 2b. Nesse caso, as frações obtidas a partir de xilose e lactose também apresentaram similaridade entre os espectros de absorção. Tanto nos perfis cromatográficos, quanto nos espectros de absorção, o $I_{\text{máx}}$ foi próximo de 450nm. PPC e PEM comportaram-se da mesma forma. Ou seja, os perfis cromatográficos também se assimilaram aos espectros de absorção, além de apresentarem $I_{\text{máx}}$ de absorção próximo a 450nm para os picos da Região A. Picos em torno de 2min (Região B) nos perfis cromatográficos de PPC, PEM e PEL não ocorrem com PX, PL e nem com a solução do pigmento amarelo referência. Portanto, a presença desses picos na Região B pode estar relacionada à natureza das fontes de nitrogênio, uma vez que só apareceram quando fontes orgânicas foram empregadas. Fontes orgânicas de nitrogênio contêm aminoácidos e peptídeos que podem ter absorção máxima em 280nm, tal como observado na Região B.

Apenas o perfil cromatográfico de PEL não apresentou os picos característicos da solução do pigmento amarelo referência (Região A). Além disso, o pico de maior intensidade obtido ocorreu em 2.17min., apresentando $I_{\text{máx}}$ de absorção na região do ultravioleta. Na verdade, a análise cromatográfica de PEL foi realizada para confirmar que *A. aureus* é capaz de utilizar outras fontes para produzir pigmentos que não têm relação com o pigmento amarelo referência. Como já exposto, a fração obtida com extrato de levedura apresentou espectro de absorção diferente e seu $I_{\text{máx}}$ não foi em 450nm (Fig. 2c).

3.4 Produção de pigmento a partir da lactose, peptona de caseína e pH inicial 5

Os resultados obtidos a partir da nova fermentação submersa estática preparada com lactose, peptona de caseína e pH 5 estão apresentados na Fig. 4. Essa associação apresentou um espectro de absorção com $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção diferente de 450nm (Fig. 4a). Ou seja, o pigmento formado não tem o mesmo espectro de absorção que o pigmento amarelo referência. A associação entre lactose e peptona de caseína também pode ter ocasionado algum tipo de repressão sobre a produção do pigmento de interesse. As peptonas são fontes orgânicas que fornecem além de nitrogênio, outras moléculas que podem atuar como fontes de carbono.

O perfil cromatográfico da solução de pigmento formado a partir da associação lactose e peptona de caseína foi obtido (PLPC) (Fig. 4b). Picos na Região B podem ser observados, tal como para PPC, PEM e PEL. E também picos em torno da Região A, mas que não coincidem com o pigmento amarelo referência por apresentarem absorção máxima em 207nm. Além disso, a proporção entre os picos das Regiões A e B para PLPC é diferente da observada entre PPC e PEM. A partir

dessa análise, ficou mais uma vez demonstrada que a associação entre as melhores fontes individuais de carbono e nitrogênio (lactose e peptona de caseína) não produz o mesmo pigmento amarelo referência de *A. aureus*. Na verdade, a maior produção ocorreu com sacarose e peptona de caseína. Todos os experimentos desse trabalho serviram para aprofundar a discussão sobre as condições nutricionais necessárias para a produção de pigmento amarelo por *A. aureus*. E ainda, para nortear a seleção de substratos em busca de melhorar a produtividade.

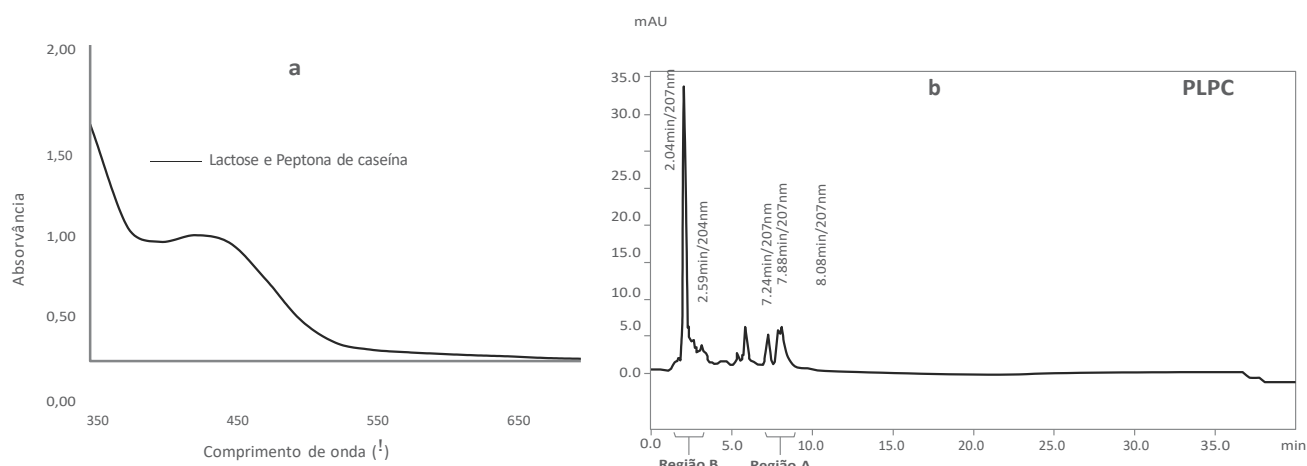


Fig. 4. Produção de pigmento por *A. aureus* a partir das melhores fontes de carbono e nitrogênio. (a) Efeito da melhor fonte de carbono (lactose), da melhor fonte de nitrogênio (peptona de caseína) e da associação lactose, peptona de caseína e pH inicial 5, sobre a produção de pigmento (leitura da fração acetato de etila) (b) Espectro de absorção da fração acetato de etila do pigmento produzido a partir da associação lactose, peptona de caseína e pH inicial 5 (c) Cromatograma da solução de pigmento (300µg/mL) (450nm) produzido a partir da associação lactose, peptona de caseína e pH inicial 5.

3.5 DCCR para 2 variáveis independentes sobre a produção de pigmento

Um DCCR foi realizado e a produção de pigmento para cada ensaio está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Variáveis com seus níveis codificados e concentrações usados no DCCR e a resposta produção de pigmento (U₄₅₀).

Ensaio	Sacarose (g/L)	Pep. Caseína (g/L)	Pigmento (U ₄₅₀)
	X ₁	X ₂	Y ₁
1	10	3	0,1902
2	30	3	1,9801
3	10	7	0,0102
4	30	7	2,5037
5	5,9	5	0,0048
6	34,1	5	0,4013
7	20	2,2	1,0032
8	20	7,8	4,1298
9	20	5	1,1268
10	20	5	1,2522
11	20	5	1,2402

Em relação ao erro puro, F_{cal} não foi significativo (p=0,1285) (F_{cal}(6,936) < F_{tab}(9,552)). Portanto, não houve falta de ajuste e o modelo se adequou bem aos resultados. Além disso, a porcentagem de variância explicada pelo modelo (R² = 99%) foi satisfatória para representar a relação entre a resposta e as variáveis estudadas. Os resultados obtidos a partir do DCCR foram usados para calcular os coeficientes de regressão (Tabela 4). A equação 1 apresentou-se como uma equação polinomial de segundo grau e demonstrou a dependência entre a concentração dos componentes do meio (X₁: sacarose e X₂: peptona de caseína) para a produção de pigmento (Y). Todos os termos foram significativos (p < 0,1) para o modelo. A partir da análise de variância (F_{cal} = 433,647), o termo que mais influencia positivamente a produção de pigmento é o termo linear da concentração de peptona de caseína (p < 0,1).

Tabela 4. Coeficientes de regressão da resposta produção de pigmento (U₄₅₀) (Y)

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro padrão	t(5)	p	Estimativa por intervalo (90%)	
					Limite inferior	Limite superior
X ₁ (L)	0,113	0,052	2,16	0,0828	0,008	0,218
X ₁ (Q)	-0,555	0,062	-8,92	0,0003	-0,680	-0,429
X ₂ (L)	1,088	0,052	20,82	0,0000	0,983	1,193
X ₂ (Q)	0,626	0,062	10,08	0,0002	0,501	0,752
X ₁ X ₂	0,176	0,074	2,38	0,0631	0,027	0,325

L; Q: Termos linear e quadrático

$$Y_1 = 1,206 + 0,113X_1 + 1,088X_2 - 0,555X_1^2 + 0,626X_2^2 + 0,176X_1X_2 \text{ (Equação 1)}$$

A superfície de resposta descrita pela equação do modelo está apresentada na Fig. 5a e pelo diagrama de contorno na Fig. 5b. Dentro das faixas estudadas, a máxima produção de pigmento (4,1298U₄₅₀) foi obtida no ensaio 8, com 20,0g/L de sacarose e 7,8g/L de peptona de caseína. Nessa região, em que a produção de pigmento foi maximizada, os desvios foram baixos (3,18%). No ensaio 8, a produção foi 3,3 vezes maior ($p \leq 0,05$) que a alcançada com a associação sacarose (30g/L) e peptona de caseína (3g/L) (Item 3.4) antes de iniciar o DCCR. A produção de pigmento amarelo referência aumentou 53 vezes ($p \leq 0,05$) desde o início da produção em meio Czapeck (sacarose, nitrato de sódio e pH inicial 5) (Tabela 2), até o melhoramento da produção (sacarose e peptona de caseína) (ensaio 8). Portanto, a produção de pigmento por *A. aureus* sofreu influência positiva do estudo das fontes de carbono, nitrogênio, pH inicial e do estudo de melhoramento da produção.

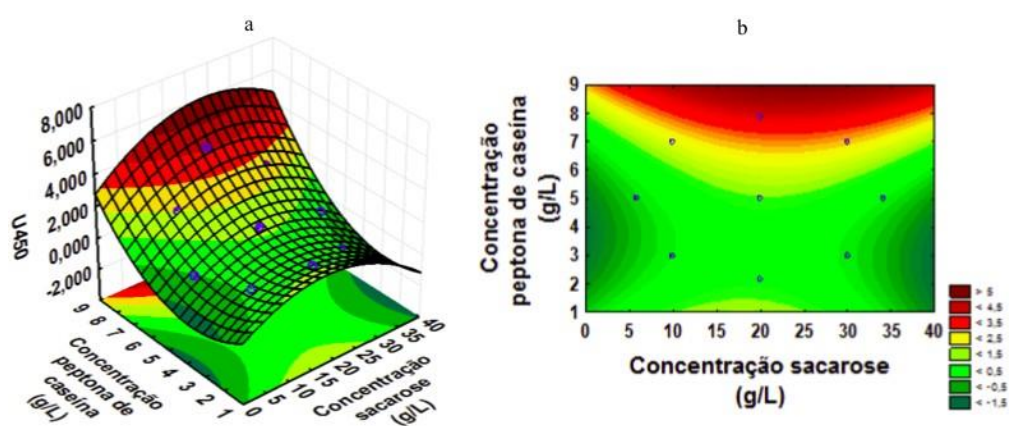


Fig. 5. Gráfico de superfície de resposta e diagrama de contorno (a) Superfície de resposta demonstrando o efeito da concentração de sacarose e peptona de caseína sobre a produção de pigmento. (b) Diagramas de contorno para produção de pigmento em função da concentração de sacarose e peptona de caseína no meio de cultivo.

A superfície de resposta apresentou-se com formato de sela. A partir dela foi verificado que o aumento da concentração de peptona de caseína proporcionou o aumento da produção de pigmento. O mesmo não ocorreu com a sacarose, em que valores mais altos e mais baixos de concentração avaliados reduziram a produção de pigmento. Mesmo com o bom resultado obtido com o ensaio 8, ainda é possível planejar um novo DCCR para alcançar a produção máxima de pigmento amarelo referência. Para isso, é necessário deslocar o ponto central da concentração de peptona de caseína para valor maior que 7g/L, manter o ponto central da concentração de sacarose em 20g/L e reduzir sua variação.

Financiamento: Esse trabalho não recebeu nenhum financiamento de agências públicas, comerciais ou setores não profissionais.

4 Conclusões

O estudo da composição do meio de cultivo e do melhoramento da produção influenciaram positivamente a produção de pigmento amarelo referência pelo endofítico *A. aureus*. A composição foi responsável por influenciar qualitativamente e quantitativamente o pigmento produzido. Algumas das fontes de carbono e nitrogênio testadas favoreceram a produção de pigmentos diferentes do pigmento amarelo referência. Nesse trabalho, *A. aureus* foi capaz de produzir pigmento amarelo referência apenas a partir das fontes de carbono, sacarose, xilose, lactose, e das fontes de nitrogênio, nitrato de sódio, peptona de caseína, extrato de malte. A associação sacarose e peptona de caseína, em pH 5, foi a responsável pela maior produção de pigmento amarelo referência. Por meio de um DCCR, ficou demonstrada a dependência entre a concentração dos componentes do meio (sacarose e peptona de caseína) sobre a produção do pigmento. O aumento da concentração de peptona de caseína proporcionou o aumento da produção de pigmento amarelo referência. Entretanto, as faixas extremas de concentração de sacarose avaliadas reduziram essa produção. Por fim, o endofítico *A. aureus* apresentou-se como fonte potencial de pigmento amarelo natural não convencional.

Referências

1. Ahrmad, M., Panda, B.P., 2014. Optimization of red pigment production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under solid-state fermentation using response surface methodology. *Songklanakari J. Sci. Technol.* 36, 439-444.
2. Aruldass, C.A., Dufossé, L., Ahmad, W.A., 2018. Current perspective of yellowish-orange pigments from microorganisms- a review. *J. Clean. Prod.* 180, 168-182. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.093>
3. Battaglia, E., Zhou, M., de Vries, R.P., 2014. The transcriptional activators AraR and XlnR from *Aspergillus niger* regulate expression of pentose catabolic and pentose phosphate pathway genes. *Res. Microbiol.* 165, 531-540. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.013>
4. Borzani, W., Schimidell, W., Lima, U.A., Aquarone, E. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Blucher, 2001, vol. 1. 593 p.
5. Celestino, J.R., Carvalho, L.E., Lima, M.P., Lima, A.M., Ogusku, M.M., Souza, J.V.B., 2014. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. *Process Biochem.* 49, 569–575. <https://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.01.018>
6. Chen, G., Shi, K., Song, D., Quan, L., Wu, Z., 2015. The pigment characteristics and productivity shifting in high cell density culture of *Monascus anka* mycelia. *BMC Biotech.* 15, 1-9. <https://dx.doi.org/10.1186/s12896-015-0183-3>

7. Chatterjee, S., Gupta, D., Roy, P., Chatterjee, N.C., Saha, P., Dutta, S., 2011. Study of a lead tolerant yeast strain BUSCY1 (MTCC9315). *Afr. J. Microbiol. Res.* 5, 5362-5372. <https://dx.doi.org/10.5897/AJMR11.853>
8. Costa, J.P.V., Vendruscolo, F., 2017. Production of red pigments by *Monascus ruber* CCT 3802 using lactose as a substrate. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 11, 50–55. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.05.010>
9. Dufossé, L., 2018. Red colourants from filamentous fungi: Are they ready for the food industry? *J. Food Compost. Anal.* 59, 156-161. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.11.002>
10. Dufossé, L., Fouillaud, M., Caro, Y., Mapari, S.A.A., Sutthiwong, N., 2014. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. *Curr. Opin. Biotechnol.* 26, 56–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.007>
11. Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S.M., Blanc, P., Murthy, K.N.C., Ravishankar, G.A., 2005. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends Food Sci. Technol.* 16, 389–406. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2005.02.006>
12. Dursun, D., Dalgıç, A.C., 2016. Optimization of astaxanthin pigment bioprocessing by four different yeast species using wheat wastes. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 7, 1-6. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.04.006>
13. Dwibedi, V., Saxena, S. 2018. *Arcopilus aureus*, a Resveratrol-Producing Endophyte from *Vitis vinifera*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 186, 476-495. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2755-x>
14. Gomes, D.C., Takahashi, J.A., 2016. Sequential fungal fermentation-biotransformation process to produce a red pigment from sclerotiorin. *Food Chem.* 210, 355–361. <https://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.057>
15. Gunasekaran, S., Poorniammal, R., 2008. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp. under submerged cultivation. *Afr. J. Biotechnol.* 7, 1894-1898. <https://dx.doi.org/10.5897/AJB2008.000-5037>
16. Hilares, R.T., de Souza, R.A., Marcelino, P.F., da Silva, S.S., Dragone, G., Mussato, S.I., Santos, J.C., 2018. Sugarcane bagasse hydrolysate as a potential feedstock for red pigment production by *Monascus ruber*. *Food Chem.* 245, 786-791. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.111>
17. Kabbaj, F.Z., Lu, S., Faouzi, M.E.A., Meddah, B., Proksch, P., Cherrah, Y., Altenbach, H., Aly, A.H., Chadli, A., Debbab, A., 2015. Bioactive Metabolites from *Chaetomium aureum*: Structure Elucidation and Inhibition of the Hsp90 Machine Chaperoning Activity. *Bioorgan. Med. Chem.* 23, 126-131. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.11.021>

18. Lv, J., Zhang, B., Liu, X., Zhang, C., Chen, L., Xu, G., Cheung, p.c.k, 2017. Enhanced production of natural yellow pigments from *Monascus purpureus* by liquid culture: The relationship between fermentation conditions and mycelial morphology. *J. Biosci. Bioeng.* 124, 452-458. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.05.00>
19. Marques, N.P., Pereira, J.C., Gomes, E., da Silva, R., Araújo, A.R., Ferreira, H., Rodrigues, A., Dussán, K.J., Bocchini, D.A., 2018. Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. *Ind. Crops Prod.* 122, 66–75. <https://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.022>
20. Matsushika, A., Goshima, T., Fujii, T., Inoue, H., Sawayama, S., Yano, S., 2012. Characterization of non-oxidative transaldolase and transketolase enzymes in the pentose phosphate pathway with regard to xylose utilization by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 51, 16–25. <https://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.03.008>
21. Nigam, P.S., Luke, J.S., 2016. Food Additives: Production of Microbial Pigments and their Antioxidant Properties. *Curr. Opin. Food Sci.* 7, 93-100. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.004>
22. Orak, T., Caglar, O., Ortucu, S., Ozkan, H., Taskin, M., 2018. Chicken feather peptone: A new alternative nitrogen source for pigment production by *Monascus purpureus*. *J. Biotechnol.* 271, 56-62. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.02.010>
23. Palacio-Barrera, A.M., Areiza, D., Zapata, P., Atehortúa, L., Correa, C., Peñuela-Vásquez, M., 2018. Induction of pigment production through media composition, abiotic and biotic factors in two filamentous fungi. *Biotechnol. Rep.* 20. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00308>
24. Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P.E. Longa, C.M.O, Yousaf, L., Pertot, I., Campisano, 2012. A. Fungal Endophytic Communities in Grapevines (*Vitis vinifera* L.). *App. Environ. Microbiol.* 78, 4308–4317. <https://doi.org/10.1128/AEM.07655-11>
25. Pisareva, E.I., Kujumdzieva, A.V., 2010. Influence of Carbon and Nitrogen Sources on Growth and Pigment Production by *Monascus Pilosus* C₁ Strain. *Biotechnol. Biotechnol Equip.* 24, 501-506. <https://doi.org/10.1080/13102818.2010.10817890>
26. Pradeep F.S., Begam M.S., Palaniswamy M., Pradeep B.V., 2013. Influence of culture medium on growth and pigment production by *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 isolated from paddy field soil. *World App. Sci. J.* 22, 70-77. <https://doi.org/10.5829/idosi.wasj.2013.22.01.7265>
27. Prajapati, V.S., Soni, N., Trivedi, U.B., Patel, K.C., 2014. An enhancement of red pigment production by submerged culture of *Monascus purpureus* MTCC 410 employing statistical

- methodology. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 3, 140-145.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2013.08.008>
28. Quereshi S., Pandey A.K., Singh J., 2010. Optimization of fermentation conditions for the red pigment production from *Phoma herbarum* (FGCC#54) under submerged cultivation. *J. Phytol.* 9, 1–8.
29. Rank, C., Nielsen, K.F., Larsen, T.O, Varga, J., Samson, R.A., Frisvad, J.C., 2011. Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biol.* 115, 406-420.
<https://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.02.013>
30. Rodriguez-Amaya, D.B., 2016. Natural food pigments and colorants. *Curr. Opin. Food Sci.* 7, 20–26. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.08.004>
31. Rodriguez-Amaya, D.B., 2018. Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Res. Int.* In press. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.028>
32. Rodrigues, M.I., Iemma, A.F., 2005. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 1a. Ed. Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 326p.
33. Santos-Ebinuma, V.C., Teixeira, M.F.S., Pessoa Jr., A., 2013. Submerged Culture Conditions for the Production of Alternative Natural Colorants by a New Isolated *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 802-810. <https://dx.doi.org/10.4014/jmb.1211.11057>
34. Singh, N., Goel, G., Singh, N., Pathak, B.K., Kaushik, D., 2015. Modeling the red pigment production by *Monascus purpureus* MTCC 369 by Artificial Neural Network using rice water based medium. *Food Biosci.* 11, 17–22. <https://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2015.04.001>
35. Shi, K., Song, D., Chen, G., Pistozzi, M., Wu, Z., Quan, L., 2015. Controlling composition and color characteristics of *Monascus* pigments by Ph and nitrogen sources in submerged fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* 120, 145-154. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.01.001>
36. Suryanarayanan, T.S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M.B., Sasse, F., Jansen, R., Murali, T.S., 2009. Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biol. Rev.* 23, 9-19.
<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.07.001>
37. Torres, F.A.E., Zaccarim, B.R., Novaes, L.C.L., Jozala, A.F., dos Santos, C.A., Teixeira, M.F.S., Santos-Ebinuma, V.C., 2016. Natural colorants from filamentous fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 2511–252. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7274-x>
38. Varanda, C.M.R., Oliveira, M., Materatski, P., Landum, M., Clara, M.I.E., Félix, M.R., 2016. Fungal endophytic communities associated to the phyllosphere of grapevine cultivars under different types of management. *Fungal Biol.*, 120, 1525-1536.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.08.002>

39. Varmira, K., Habibi, A., Moradi, S., Bahramian, E., 2016. Statistical optimization of airlift photobioreactor for high concentration crossmark production of torularhodin pigment. *Biocatal. Agricul. Biotechnol.* 8,1997-203. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2016.09.013>
40. Wang, E., Dong, C., Park, R.F., Roberts, T.H., 2018. Carotenoid pigments in rust fungi: Extraction, separation, quantification and characterization. *Fungal Biol. Rev.* 32, 166-180. <https://doi.org/10.1016/J.FBR.2018.02.002>
41. Wang, X.W., Houbraken, J., Groenewald, J.Z., Meijer, M., Andersen, B., Nielsen, K.F., Crous, P.W., Samson, R.A., 2016. Diversity and taxonomy of *Chaetomium* and chaetomium-like fungi from indoor environments. *Stud. Mycol.* 88, 145-224. <https://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2016.11.005>
42. Zhang, X., Wang, J., Chen, M., Wang, C., 2013. Effect of nitrogen sources on production and photostability of *Monascus* pigments in liquid fermentation. *IERI Procedia.* 5, 344 – 350. <https://doi:10.1016/j.ieri.2013.11.114>

CONCLUSÕES

Com os resultados desse trabalho, pode-se considerar que fungos filamentosos endofíticos isolados de videiras (*Vitis vinifera*) são produtores de pigmentos naturais em potencial. Por meio da seleção primária, 48 cepas fúngicas foram isoladas. A partir da seleção secundária, pela primeira vez, a cepa identificada como *Arcopilus aureus* foi selecionada como fonte potencial para produção de pigmento amarelo com características importantes para futura aplicação industrial. A caracterização, separação e análise em UPLC-PDA-ESI-QTOF/MS possibilitaram a observação de que o pigmento amarelo possui os componentes cochliquinol II, como composto majoritário, e riboflavina. A purificação parcial do pigmento foi possível empregando um método alternativo, com resinas de troca iônica e hidrofílica, associado à separação por HPLC. Modelos quadráticos explicaram o comportamento do pigmento frente às variações de temperatura e pH. O pigmento estudado manteve-se relativamente estável frente à variação de temperatura e apresentou aumento na intensidade da cor com a redução do pH. Algumas das fontes de carbono e nitrogênio testadas favoreceram a produção de pigmentos diferentes do pigmento amarelo referência. Nesse trabalho, *A. aureus* foi capaz de produzi-lo apenas a partir das fontes de carbono, sacarose, xilose, lactose, e das fontes de nitrogênio, nitrato de sódio, peptona de caseína, extrato de malte. Portanto, ficou demonstrada a necessidade de se estudar a natureza do meio de cultivo, que pode ser responsável por influenciar qualitativamente e quantitativamente o pigmento produzido. Nesse trabalho, a associação sacarose e peptona de caseína, em pH 5, foi a combinação responsável pela maior produção de pigmento amarelo por *A. aureus*. Através do planejamento experimental, foi verificado efeito positivo da concentração de peptona de caseína, sobre a produção do pigmento amarelo. Em sequência, por um DCCR, ficou demonstrada a dependência entre a concentração dos componentes do meio (sacarose e peptona de caseína) sobre a produção do pigmento. O aumento da concentração de peptona de caseína proporcionou o aumento da produção de pigmento amarelo. Entretanto, as faixas extremas de concentração de sacarose avaliadas reduziram essa produção.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, a demanda por novas fontes produtoras de pigmentos naturais tem trazido à tona a necessidade de novos estudos para sanar essa demanda. A princípio, esse trabalho vai de encontro a essa realidade, e abre uma série de possibilidades para trabalhos futuros com a espécie *Arcopilus aureus* produtora de pigmento isolada. Tal como pode ser observado, o objetivo principal seria isolar endofíticos produtores de pigmentos com “potencial” de aplicação na indústria de alimentos. Esse potencial tem sido demonstrado, mas para que essa aplicação de fato ocorra, são necessários diversos estudos adicionais abordando, principalmente questões toxicológicas. A partir do momento em que

estudos toxicológicos demonstrarem a possibilidade de uso, o pigmento de *A. aureus* pode ter sua aplicação testada em diferentes alimentos e em diferentes condições. Além disso, uma nova abordagem pode ser feita no sentido de avaliar a produção de pigmento vermelho, e também de estudar as atividades farmacológicas e antioxidantes dos pigmentos produzidos por *A. aureus*. E ainda, como trabalho futuro, pode ser realizado um planejamento que avalie a influência simultânea dos diferentes fatores sobre a estabilidade do pigmento amarelo de *A. aureus*.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, M.; PANDA, B.P. Optimization of red pigment production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under solid-state fermentation using response surface methodology. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v.36(4), p.439-444, 2014.
- ALTHÖEFER, H.; REVUELTA, J.L.; SEULBERGER, H.; ZELDER, O. Genetic method for producing riboflavin. Patent WO1999061623 A2, 1999.
- AKILANDESWARI, P.; PRADEEP, B.V. Exploration of industrially important pigments from soil fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**. v.100, p.1631–1643, 2016.
- ALBUQUERQUE, C.D. **Estudo da cinética de produção de carotenoides de *Sporobolomyces ruberrimus* e de técnicas de extração de pigmentos**. 2015. 177f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2015.
- ARAI, T.; KOGANEI, K.; UMEMURA, S.; KOJIMA, R.; KATO, J.; KASUMI, T.; OGIHARA, J. Importance of the ammonia assimilation by *Penicillium purpurogenum* in amino derivative *Monascus* pigment, PP-V, production. **AMB Express**, v.3(19), p.1-7, 2013.
- ARAYAMA, M.; NEHIRA, T.; MAEDA, H.; TANAKA, K.; MIYAGAWA, H.; UENO, T.; HOSOKAWA, S.; HASHIMOTO, M. Isolation, ECD assisted structural analyses, biosynthetic discussions, and biological activities of epi-cochlioquinones D and its derivative. **Tetrahedron**, v.71, p.4788-4794, 2015.
- ARNOLD, L.E.; LOFTHOUSE, N.; HURT, E. Artificial food colors and attention-deficit/hyperactivity symptoms: conclusions to dye for. **Neurotherapeutics**, v.9, p.599–609, 2012.
- ARULDASS, C.A.; DUFOSSE, L.; AHMAD, W.A. Current perspective of yellowish-orange pigments from microorganisms- a review. **Journal of Cleaner Production**, V.180, p. 168-182, 2018.
- AZEVEDO, J.L. Microorganismos endofíticos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia microbiana**. Jaguariuna: Embrapa-CNPMA, 1998. cap. 4, p.117-137.
- BACON, C. W., JF., (2000) **Microbial endophytes**. Marcel Dekker, New York.

- BACHER, A.; EBERHARDT, S.; FISCHER, M.; KIS, K.; RICHTER, G. Biosynthesis of vitamin B2 (riboflavin). **Annual Review of Nutrition**, v.20, p.153–167, 2000.
- BANERJEE, R.; BATSCHAUER, A. Plant blue-light receptors. **Planta**, v. 220(3), p.498–502, 2005.
- BENTLEY, R.; BENNETT, J.W. Constructing polyketides: from collie to combinatorial biosynthesis. *Annual Review of Microbiology*, v.53, p.411-446, 1999.
- BERESWILL, R.; GOLLA, B.; STRELOKE, M.; SCHULZ, R. Entry and toxicity of organic pesticides and copper in vineyard streams: Erosion rills jeopardise the efficiency of riparian buffer strips. **Agricultural Ecosystems and Environmental**, v.146, p.81–92, 2012.
- BRASIL. CNNPA. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução no 44 de 1977. Considera corante a substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimento (e bebida). Publicado no Diário Oficial da União em 01 de fevereiro de 1978.
- BRASIL. SVS/MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária Federal. Portaria no 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego. Publicado no Diário Oficial da União; em 28 de outubro de 1997.
- BRAKHAGE, A.A.; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genetic and Biology**, v.48, p.15–22, 2011.
- BUDHIRAJA, A.; NEPALI, K.; SAPRA, S.; GUPTA, S.; KUMAR, S.; DHAR, K.L. Bioactive metabolites from an endophytic fungus of *Aspergillus* species isolated from seeds of *Gloriosa superba* Linn. **Medicinal Chemistry Research**, v.22, p.323–329, 2013.
- BÜHLER, R.M.M.; MÜLLER, B.L.; MORITZ, D.E.; VENDRUSCOLO, F.; DE OLIVEIRA, D.; NINOW, J.L. Influence of Light Intensity on Growth and Pigment Production by *Monascus ruber* in Submerged Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.176, p.1277-1289, 2015.
- CAMPOS, F.F. **Isolamento e identificação de substâncias bioativas produzidas por fungos endofíticos associados a *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae)**. 2009. 172 f. Tese. (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.
- CAMPOY, S., RUMBERO, A., MARTÍN, J.F. et al. Characterization of an hyperpigmenting mutant of *Monascus purpureus* IB1: identification of two novel pigment chemical structures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p.488-496, 2006.
- CANONICA L., CASINOVI C. G., FIECCHI A., GALEFFI C., BET- TOLO G. B. M., SCALA A. AND TORRACCA A. M. V. The structure of cochlioquinones. **Gazzeta Chimica Italiana**, v.106, p.147-166, 1976.

- CARO, Y.; ANAMALE, L.; FOUILLAUD, M.; LAURENT, P.; PETIT, T.; DUFOSSE, L. Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview. **Natural Product and Bioprospecting**, v.2, p.174–193, 2012.
- CARVALHO, J.C.; OISHI, B.O.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Biopigments from *Monascus*: strains selection, citrinin production and color stability. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p.885–894, 2005.
- CARRUTHERS, J.R.; CERRINI, S.; FEDELI, W.; CASINOVI, C.G.; GALEFFI, C.; VACCARO, A.M.T.; SCALA, A. Structures of cochlioquinones A and B, new metabolites of *Cochliobolus miyabeanus*: chemical and X-ray crystallographic determination. **Journal of the Chemical Society D**, p.164-166, 1971.
- CELESTINO, J.R. DE CARVALHO, L.E.; LIMA, M.P.; LIMA, A.M.; OGUSKU, M.M.; DE SOUZA, J.V.B. Bioprospecting of Amazon soil fungi with the potential for pigment production. **Process Biochemistry**, v.49, p.569–575, 2014.
- CHEN, M.; CHEN, M.R.M.; JOHNS, M.R. Effect of pH and nitrogen source on pigment production by *Monascus purpureus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.40, p.132-138, 1993.
- CHEN, G.; SHI, K.; SONG, D.; QUAN, L.; WU, Z. The pigment characteristics and productivity shifting in high cell density culture of *Monascus anka* mycelia. **MC Biotechnology**, v.15(72), p.1-9, 2015.
- CHEN, DI.; XUE, C.; CHEN, M.; WU, S.; LI, Z.; WANG, C. Effects of blue light on pigment biosynthesis of *Monascus*. **Journal of Microbiology**, v.54(4), p.2-7, 2016.
- CHIDANANDA, C.; RAO, L.J.; SATTUR, A. P. Sclerotiorin, from *Penicillium frequentans*, a potent inhibitor of aldose reductase. **Biotechnology Letters**, v.28, p.1633–1636, 2006.
- CORROCHANO, L.M. Fungal photoreceptors: sensory molecules for fungal development and behaviour. **Photochemical & Photobiological Science**, v.6, p.725–736, 2007.
- COSTA, J.P.V.; VENDRUSCOLO, F. Production of red pigments by *Monascus ruber* CCT 3802 using lactose as a substrate. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 11, p.50–55, 2017.
- CUEVA, C; MORENO-ARRIBAS, M.V.; BARTOLOME, B.; SALAZAR, O; VICENTE, M.F.; BILLS, G.F. Antibiosis of vineyard ecosystem fungi against food-borne microorganisms. **Research in Microbiology**, v.162, p.1043-1051, 2011.
- CUI, C. M.; LI, X. M.; LI, C. S.; PROKSCH, P.; WANG, B. G. Cytoglobosins A–G, Cytochalasans from a Marine-Derived Endophytic Fungus, *Chaetomium globosum* QEN-14. **Journal of Natural Products**, v.73, p.729-733, 2012.
- CURTIN, T.P.; REILLY, J. Sclerotiorine, a chlorinated metabolic product of *Penicillium Sclerotiorum*, van Beyma. **Nature**, 3697, p.335-335, 1940.

- DHAKE, A.B.; PATI, M.B. Production of β -glucosidase by *Penicillium purpurogenum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.170-176, 2005.
- DE OLIVEIRA, C. A.; ALVES, V. M. C., GOMES, E. A., LANNA, U. G. P., AS, N. M. H.; MARRIEL, I. E. **Otimização da metodologia de extração e amplificação do DNA de fungos do solo**. 2005. Circular Técnica (69) (INFOTECA-E). Sete Lagoas Embrapa Milho e Sorgo, 2005. p. 1-6. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 1 ed. Disponível em: www.infoteca.cnptia.embrapa.br/doc/489283. Acesso em: 3 dez. 2015.
- DUAN, Y.X.; CHEN, T.; CHEN, X.; ZHAO, X.M. Overexpression of glucose- 6-phosphate dehydrogenase enhances riboflavin production in *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.85(6), p.1907–1914, 2010.
- 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**, v.16, p.389–406, 2005.
- DUFOSSÉ, L.; FOUILLAUD, M.; CARO, Y.; MAPARI, S.A.A; SUTTHIWONG, N. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v.26, p.56–61, 2014.
- DUFOSSÉ, L. Red colourants from filamentous fungi: Are they ready for the food industry? **Journal of Food Composition and Analysis**. In press, 2017.
- DWIBEDI, V., SAXENA, S. *Arcopilus aureus*, a Resveratrol-Producing Endophyte from *Vitis vinifera*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.186, p.476-495, 2018
Doi.org/10.1007/s12010-018-2755-x
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa Meio Ambiente. Projeto diversidade de microrganismos endofíticos e seu potencial biotecnológico. **Jornal do endofítico**, [2005?]. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/endofiticos/resumo.html>. Acesso em: 1 de dezembro de 2015.
- EGGERSDORFER, M.; LAUDERT, D.; LÉTINOIS, U.; MCCLYMONT, T.; MEDLOCK, J.; NETSCHER, T.; BONRATH, W. One hundred years of vitamins—a success story of the natural sciences. **Angewandte Chemie International Edition**, v.51(52), p.12960–12990, 2012.
- FUJIOKA, T.; YAO, K.; HAMANO, K.; HOSOYA, T.; KAGASAKI, T.; FURUKAWA, Y.; HARUYAMA, H.; SATO, S.; KOGA, T.; TSUJITA, Y. Epi-cochlioquinone A, a novel acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitor produced by *Stachybotrys bisbyi*. **Journal of Antibiotics**, v.49, p.409–413, 1996.
- GREGORY III, J.F. Vitaminas In: **Química de alimentos de Fennema**. Ed.: DAMODARAN, S. PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R 4ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. pp.378-381.

- FERNANDES, M. R. V. **Obtenção, padronização e avaliação biológica de extratos secos a partir da espécie *Psidium guajava* L. pelo processo *spray drying***. 2013. 237 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2013.
- FERNANDES, M.R.V.; SILVA, T.A.C.; PFENNING, L.H.; COSTA-NETO, C.M.; HEINRICH, T.A.; ALENCAR, S.M.; LIMA, M.A.; IKEGAKI, M. Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.45, p.677-685, 2009.
- FERNANDES, E.G.; PEREIRA, O.L.; SILVA, C.C.; BENTO, C.B.P.; QUEIROZ, M.V. Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. **Microbiological Research**, v.181, p.84–92, 2015.
- FERREIRA, M.C.; VIEIRA, M.L.A.; ZANI, C.Z.; ALVES, T.M.A.; SALES JUNIOR, P.A.; MURTA, S.M.F.; ROMANHA, A.J.; GIL, L.H.V.G.; CARVALHO, A.G.O.; ZILLI, J.E.; VITAL, M.J.S.; ROSA, C.A.; ROSA, L.H. Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 59, p. 36-44, 2015.
- FISCHER, M.; BACHER, A. Biosynthesis of flavocoenzymes. **Natural Products Reports**, v.22(3); p.324–350, 2005.
- FÖRSTER, C.; SANTOS, M.A.; RUFFERT, S.; KRÄMER, R.; REVUELTA, J.L. Physiological consequence of disruption of the VMA1 gene in the riboflavin overproducer *Ashbya gossypii*. **Journal of Biological Chemistry**, v.274(14), p.9442–9448, 1999.
- GEWEELY, N. S. Investigation of the optimum condition and antimicrobial activities of pigments from four potent pigment-producing fungal species. **Journal of Life Sciences**, v. 5(9), p.697-671, 2011.
- GESSLER, N.N.; EGOROVA, A.S.; BELOZERSKAYA, T.A. Fungal Anthraquinones. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.49(2), p.85-99, 2013.
- GIRIDHARAN, P.; VEREKAR, S.A.; KHANNA, A.; MISHRA, P.D.; DESHMUKH, S.K. Anticancer activity of sclerotiorin, isolated from an endophytic fungus *Cephalotheca faveolata* Yaguchi, Nishim and Udagawa. **Indian Journal Experimental Biology**, v.50, p.464–468, 2012.
- GOMES, D.C.; TAKAHASHI, J.A. Sequential fungal fermentation-biotransformation process to produce a red pigment from sclerotiorin. **Food Chemistry**, v.210, p.355–361, 2016.
- GONÇALVES, R.C.R. **Estudo da estrutura e da atividade biológica do pigmento melanina produzido pelo fungo *Aspergillus nidulans***. 2008. 152f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

- GONZÁLEZ, A.M.; PRESA, M.; LATORRE, M.G.; LURÁ, M.C. Detección de metabolitos fúngicos con actividad tóxica mediante bioensayo sobre *Artemia salina*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.24(1), p.59-61, 2007.
- GONZÁLEZ-DOMINGUÉZ, E.; FEDELE, G.; LANGUASCO, L.; ROSSI, V. Interactions among fungicides applied at different timings for the control of *Botrytis* bunch rot in grapevine **Crop Protection**, v.120; p.30–33, 2019.
- GRAMAJE; D., AROCA, A.; RAPOSO, R.; GARCÍA-JIMÉNEZ; ARMENGOL, J. Evaluation of fungicides to control Petri disease pathogens in the grapevine propagation process. **Crop Protection**, v.28, p.1091–1097, 2009.
- GUIMARÃES, I.C.O.; PEREIRA, J.; CORNÉLIO, V.M.O.; BATISTA, L.R.; EVANGELISTA, R.M.; FERREIRA, E.B. Comparação de metodologias para detecção de fungos em arroz irradiado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69(2), p.194-200, 2010.
- GUNASEKARAN, S; POORNIAMMAL, R. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp. under submerged cultivation. **African Journal of Biotechnology**, v.7, p.1894-1898, 2008.
- HALLEEN, F.; CROUS, P.W.; PETRINI, O. Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. **Australasian Plant Pathology**, v.32, p.47–52, 2003.
- HANADA, R.E.; POMELLA, A.W.V.; COSTA, H.S.; BEZERRA, J.L.; LOGUERCIO, L.L.; PEREIRA, J.O. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. **Fungal Biology**, v.114, p.901–910, 2010.
- HILARES, R.T.; DE SOUZA, R.A.; MARCELINO, P.F.; DA SILVA, S.S.; DRAGONE, G.; MUSSATTO, S.I.; SANTOS, J.C. Sugarcane bagasse hydrolysate as a potential feedstock for red pigment production by *Monascus ruber*. **Food Chemistry**, 2017.
- HOSOKAWA, S.; MATSUSHITA, K.; TOKIMATSU, S.; TORIUMI, T.; SUZUKI, Y.; TATSUTA, K. The first total synthesis and structural determination of epi-cochlioquinone A. **Tetrahedron Letters**, v.51, p.5532–5536, 2010.
- JAVIDPOUR, P.; KORMAN, T.P.; SHKYA, G.; TSAI, S. C. Structural and biochemical analyses of regio- and stereospecificities observed in a type II polyketide ketoreductase. **Biochemistry**, v.50, p.4638–4649, 2011.
- JOMOVA, K.; VALCO, M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.70, p.102-110, 2013.

- JUNG, H.J.; LEE, H.B.; LIM, C.; KIM, C.; KWON, H.J. Cochlioquinone A1, a New Anti- Angiogenic Agent from *Bipolaris zeicola*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.11, p.4743–4747, 2013.
- KABBAJ, F.Z.; LU, S.; FAOUZI, M.E.A.; MEDDAH, B.; PROKSCH, P.; CHERRAH, Y.; ALTENBACH, H.; ALY, A.H.; CHADLI, A.; DEBBAB, A. Bioactive Metabolites from *Chaetomium aureum*: Structure Elucidation and Inhibition of the Hsp90 Machine Chaperoning Activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.23, p.126-131, 2015.
- KANG, B.; ZHANG, X.; WU, Z.; QI, H.; WANG, Z. Effect of pH and nonionic surfactant on profile of intracellular and extracellular *Monascus* pigments. **Process Biochemistry**, v. 48, p.759–767, 2013.
- KANG, B.; ZHANG, X.; WU, Z.; WANG, Z.; PARK, S. Production of citrinin-free *Monascus* pigments by submerged culture at low pH. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 55, p.50–57, 2014.
- KANOKMEDHAKUL, S.; KANOKMEDHAKUL, K.; PHONKERD, N.; SOYTONG, K.; KONGSAEREE, P.; SUKSAMRARN, A. Antimycobacterial anthraquinone-chromanone compound and diketopiperazine alkaloid from the fungus *Chaetomium globosum* KMITL-N0802. **Planta Medica**, v.68, p.834–836, 2002.
- KATO, T.; PARK, E.Y. Riboflavin production by *Ashbya gossypii*. **Biotechnology Letters**, v.34, p.611–618, 2012. Doi: 10.1007/s10529-011-0833-z
- KHAN, A.L.; WAQAS, M.; HUSSAIN, J.; AL-HARRASI, A.; LEE, I.J. Fungal endophyte *Penicillium janthinellum* LK5 can reduce cadmium toxicity in *Solanum lycopersicum* (Sitiens and Rhe). **Biology and Fertility of Soils**, v.50, p.75–85, 2014.
- KIA, S.H.; PALLESCH, S.; PIEPENBRING, M.; MACIA-VICENTE, J.G. Root endophytic fungi show low levels of interspecific competition in planta. **Fungal Ecology**, v.39, p.184-191, 2019.
- KIND, S.; KREYE, S.; WITTMANN, C. Metabolic engineering of cellular transport for overproduction of the platform chemical 1,5- diaminopentane in *Corynebacterium glutamicum*. **Metabolic Engineering**, v.13(5), p.617–627, 2011.
- KHIRALLA, A.; SPINA, R.; SALIBA, S.; LAURAIN-MATTAR, D. Diversity of natural products of the genera *Curvularia* and *Bipolaris*. **Fungal Biology Reviews**, 2018. Doi:10.1016/j.fbr.2018.09.002
- KOYAMA, N.; NAGAIRO, T.; YAMAGUCHI, Y.; MASUMA, R.; TOMODA, H.; OMURA, S. Stemphones, Novel Potentiators of Imipenem Activity against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Produced by *Aspergillus* sp. FKI-2136. **Journal of Antibiotics**, v.58(11), p.695–703, 2005.

- KREIS, W., MUNKERT, J., DE PÁDUA, R.M. Biossíntese de metabólitos primários e secundários. In: **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento** (Portuguese Edition) ed. Simões, C.M.O, Schenkel, E.P., Mello, J.C.P., Mentz, L.A. and Petrovick, P.R. Kindle edition. Artmed editora, 2017, pp. 5705-6124.
- KURTH, R.; PAUST, W.; HAENLEIN, W. Vitamins, Chapter 7. In: **Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry**. VCH, Wein- heim, A27, 1996. pp.521–530.
- KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. **Chemistry & Biology**, v. 19, p.792-796, 2012.
- LALE, G.J.; GADRE, R.V. Production of bikaverin by a *Fusarium fujikuroi* mutant in submerged cultures. **AMB Express**, v.6(34), p.1-11, 2016.
- LEDESMA-AMARO, R.; SERRANO-AMATRIAIN, C.; JIMENEZ, A.; REVUELTA, J.L. Metabolic engineering of riboflavin production in *Ashbya gossypii* through pathway optimization. **Microbial Cell Factory**, v.14(1), p.163, 2015.
- LEONINI, L.; MORIONDO, M.; FILA, G.; COSTAFREDA-AUMEDES, S.; FERRISE, R.; BINDI, M. Late spring frost impacts on future grapevine distribution in Europe. **Field Crops Research**, v.222, p.197-208, 2018.
- LI, G.Y.; LI, B.G.; YANG, T.; YAN, J.F.; LIU, G.Y.; ZHANG, G.L. Chaetocochins A–C, Epipolythiodioxopiperazines from *Chaetomium cochliodes*. **Journal of Natural Products**, v.69, p.1374–1376, 2006.
- LIAN, X.; LIU, L.; DONG, S.; WU, H. Two new monascus red pigments produced by Shandong Zhonghui Food Company in China. **European Food Research Technology**, v. 240, p.719–724, 2015.
- LIM, C.; MIYAGAWA, H.; AKAMATSU, M.; NAKAGAWA, Y.; UENO, T. Structures and biological activities of phytotoxins produced by the plant pathogenic fungus *Bipolaris cynodontis* cynA. **Journal of Pesticide Science**, v.23(3), 281-288; 1998.
- LIN, L.; MULHOLLAND, N.; HUANG, S.W.; BEATTIE, D.; GU, Y.C.; CLOUGH, J.; WU, Q.Y.; YANG, G.F. Design, synthesis and fungicidal activity of novel sclerotiorin derivatives. **Chemical Biology and Drug Design**, v.80, p.682-692, 2012.
- LOPES, F.C.; TICHOTA, D.M.; PEREIRA, J.Q.; SEGALIN, J.; RIOS, A.O.; BRANDELLI, A. Pigment production by filamentous fungi on agro-industrial byproducts: an eco-friendly alternative. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.171 (3), p.616-625, 2013.
- LUCAS, E.M.F.; MACHADO, Y.; FERREIRA, A.A.; DOLABELLA, L.M.P.; TAKAHASHI, J.A. Improved Production of Pharmacologically-active Sclerotiorin by *Penicillium sclerotiorum*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.9, p.365-371, 2010.

- MAIA, T.F. *Aspergillus* da seção *Nigri* de interesse biotecnológico isolados de solo e serrapilheira. 2014. 94 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia) – Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, 2014.
- MANAMGODA, D.S.; ROSSMAN, A.Y.; CASTLEBURY, L.A.; CROUS, P.W.; MADRID, H.; CHUKEATIROTE, E.; HYDE, K.D. The genus *Bipolaris*. **Studies in Mycology**, v.79, p.221–288, 2014.
- MANTER, D.K.; DELGADO, J.A.; HOLM, D.G.; STONG, R.A. Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. **Microbial Ecology**, v.60, p.157–166, 2010.
- MAPARI, S.A.S.; NIELSEN¹, K.F.; LARSEN¹, T.O.; FRISVAD¹, J.C.; MEYER, A.S.; THRANE, U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p.231–238, 2005.
- MAPARI, S.A.S.; MEYER, A.S. Evaluation of *Epicoccum nigrum* for growth, morphology and production of natural colorants in liquid media^{SEP} and on a solid rice medium. **Biotechnology Letters**, v.30, p:2183–2190, 2008.
- MAPARI, A.S.A.; THRANE, U.; MEYER, A.S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? **Trends in Biotechnology**, v.28, p.300–307, 2010.
- MAZZOTTA, C.; CARAGIULI, S.; CAPOROSSI, A. Riboflavin and the Cornea and Implications for Cataracts. In: **Handbook of nutrition, diet and the eye**. PREEDY, V.R. ed. Academic press. 2014. Pp.123-130
- MÉNDEZ, A; PÉREZ, C; MONTAÑÉZ, J.C.; MARTÍNEZ, G.; AGUILAR, C.N. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. **Biomed and Biotechnology**, v. 12, p.961–968, 2011.
- MUKHERJEE, G.; SINGH, S.K. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v.46, p.188–192, 2011.
- L. LIN, N. MULHOLLAND, Q.-Y. WU, D. BEATTIE, S.-W. HUANG, D. IRWIN, J. CLOUGH, Y.-C. GU, G.-F. YANG. Synthesis and antifungal activity of novel sclerotiorin analogues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.4480-4491, 2012.
- NAFADY, A.N.; BAGY, M.M.K.; ABD-ALLA, M.H.; MORSY, F.M.; MAHMOUD, G.A. Improvement of medium components for high riboflavin production by *Aspergillus terreus* using response surface methodology. **Rendiconti Lincei**, v.26, 2015. Doi: 10.1007/s12210-015-0449-7
- NAGIA, F. A.; EL-MOHAMEDY, R.S.R. Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from *Fusarium oxysporum*. **Dyes and Pigments**, v. 75, n. 3, p. 550-555, 2007.

- NCBI. National Center of Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>.
- NIESSEN, W.M.A. Progress in liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. **Journal of Chromatography A**, n. 1000, p. 413-436, 2003.
- NORTHROP-CLEWES, C.A.; THURNHAM, D.I. The discovery and characterization of riboflavin. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v.61(3), p.224–230, 2012.
- ORAK, T.; CAGLAR, O.; ORTUCU, S.; OZKAN, H.; TASKIN, M. Chicken feather peptone: A new alternative nitrogen source for pigment production by *Monascus purpureus*. **Journal of Biotechnology**. In press, 2018.
- OSMANOVA, N.; SCHULTZE, W.; AYOUB, N. Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. **Phytochemistry Reviews**, v.9(2), p.315–342, 2010.
- OU, H.P.; WANG, C.C.R.; LAI, LS. Thermal degradation kinetics analysis of monacolin K in *Monascus*-fermented products. **LWT**, v.42, p.292–296, 2009.
- PALACIO-BARRERA, A.M.; AREIZA, D.; ZAPATA, P.; ATEHORTUÁ, L.; CORREA, C.; PEÑUELA-VÁSQUEZ, P. Induction of pigment production through media composition, abiotic and biotic factors in two filamentous fungi. **Biotechnology Reports**. In Press, 2019.
- PANCHER, M.; CEOL, M.; CORNEO, P.E.; LONGA, C.M.O; YOUSAF, L.; PERTOT, I.; CAMPISANO, A. Fungal Endophytic Communities in Grapevines (*Vitis vinifera* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 4308–4317, 2012.
- PANDEY, N.; JAIN, R.; PANDEY, A.; TAMTA, S. Optimisation and characterisation of the orange pigment produced by a cold adapted strain of *Penicillium* sp. (GBPI_P155) isolated from mountain ecosystem. **Mycology**, p. 1-12, 2018.
- PAPAIOANNOU, E.H.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Agro-food wastes utilization by *Blakeslea trispora* for carotenoids production. **Acta Biochimica Polonica**, v. 59(1), p.151-153, 2012.
- PASTRE, R.; MARINHO, A.M.R.; RODRIGUES-FILHO, E.; SOUZA, A.Q.L.; PEREIRA, J.O. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*. **Química Nova**, v. 30(8), p.1867-1871, 2007.
- PATEL, R.N. Microbial / enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p.804-826, 2002.
- POWERS, J. H.; **American Journal of Nutrition**, v.77, p.1352, 2003
- PERUMAL, K., STALIN, V.; CHANDRASEKARENTHIRAN, S.; SUMATHI, E.; SARAVANAKUMAR, A. Extraction and characterization of pigment from *Sclerotinia* sp. and its use in dyeing cotton. **Textile Research Journal**, v. 79, p.1178-1187, 2009.

- PHUWAPRAISIRISAN, P.; SAWANG, K.; SIRIPONG, P.; TIP-PYANG, S. Anhydrocochlioquinone A, a new antitumor compound from *Bipolaris oryzae*. **Tetrahedron Letters**, v.48, p.5193–5195, 2007.
- PISAREVA, E.I.; KUJUMDZIEVA, A.V. Influence of Carbon and Nitrogen Sources on Growth and Pigment Production by *Monascus Pilosus* C₁ Strain. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.24(1), p.501-506, 2010.
- PIZARRO, A.V.L.; PARK, E.Y. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. **Process Biochemistry**, v. 38, p.1077-1082, 2003.
- PRADEEP, F.S.; BEGAM, M.S.; PALANISWAMY, M.; PRADEEP, B.V. Influence of culture medium on growth and pigment production by *Fusarium moniliforme* KUMBF1201 isolated from paddy field soil. **World Applied Sciences Journal**, v.22, p.70–77, 2013.
- PRAJAPATI, V.S.; SONI, N.; TRIVEDI, U.B.; PATEL, K.C. An enhancement of red pigment production by submerged culture of *Monascus purpureus* MTCC 410 employing statistical methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.3, p.140-145, 2014.
- QIN, S.; XING, K.; JIANG, J.H.; XU, L.H.; LI, W.J. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.89, p.457–473, 2011.
- QUERESHI, S.; PANDEY, A.K.; SINGH, J. Optimization of fermentation conditions for the red pigment production from *Phoma herbarum* (FGCC#54) under submerged cultivation. **Journal of Phytology**, v.9, p.1–8, 2010.
- RADIC, T.; LIKAR, M.; HANCEVIC, K.; BOGDANOVIC, I.; PASKOVIC, I. Occurrence of root endophytic fungi in organic versus conventional vineyards on the Croatian coast. **Agricultural Ecosystems and Environment**, v.192, p.115-121, 2014.
- RANK, C.; NIELSEN, K.F.; LARSEN, T.O.; VARGA, J.; SAMSON, R.A.; FRISVAD, J.C. Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. **Fungal Biology**, v. 115, p.406-420, 2011.
- REVUELTA, J.L.; LEDESMA-AMARO, R.; LOZANO-MARTINEZ, P.; DÍAZ-FERNÁNDEZ, D.; BUEY, R.M.; JIMÉNEZ, A. Bioproduction of riboflavin: a bright yellow history. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.44(4-5), p. , 2016.
- ROCHA, F.I.G. **Avaliação da cor e da atividade antioxidante da polpa e extrato de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) em pó**. 2009. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2009.
- RODRIGUES, P.; SANTOS, C.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. Species identification of *Aspergillus* section Flavi isolates from Portuguese almonds using phenotypic, including MALDI-TOF ICMS, and molecular approaches. **Journal of Applied Microbiology**, v.111, p.877–892, 2011.

- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Natural food pigments and colorants. **Current Opinion in Food Science**, v.7, p.20–26, 2016.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. **Food Research Internacional**, In press, 2018.
- RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 1a. Ed. Campinas, SP: Casa do Pão Editora, 326p. 2005.
- ROJAS, J.D. **Prospecção de genes biossintéticos de policetídeos a partir de fungos isolados de cana-de-açúcar**. 2010. 80f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade de São Paulo/Instituto Butantã. São Paulo, 2010.
- ROMANO, L.H. **Bioprospecção de microrganismos endofíticos isolados de *Tabebuia* spp. e *Hymenaea courbaril* e identificação da produção de metabólitos de interesse biotecnológico**. 2015. 136f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2015.
- RONDOT, Y.; REINEKE, A. Endophytic *Beauveria bassiana* in grapevine *Vitis vinifera* (L.) reduces infestation with piercing-sucking insects. **Biological Control**, v.116, p.82-89, 2018.
- SAGARAM, U.S.; KOLOMIETS, M.; SHIM, W. Regulation of fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticilloides* - maize system. **Plant Pathology Journal**, v.22, p.203–210, 2006.
- SAHM, H.; ANTRANIKIAN, G.; STAHMANN, K-P.; TAKORS, R. Riboflavin (vitamin B2). In: SAHM, H.; ANTRANIKIAN, G.; STAHMANN, K-P.; TAKORS, R. (eds) **Industrielle Mikrobiologie**. Springer-Verlag, Berlin- Heidelberg, 2013. pp. 132–140.
- SANTOS-EBINUMA VC, ROBERTO IC, FRANSISCA M, TEIXEIRA S, PESSOA A Jr: Improving of red colorants production by a new *Penicillium purpurogenum* strain in submerged culture and the effect of different parameters in their stability. **Journal of Microbiology and Biothecnology**, v.23(6), p.802–810, 2013.
- SCHWECHHEIMER, S.K.; PARK, E.Y.; REVUELTA, J.L.; BECKER, J.; WITTMANN, C. Biotechnology of riboflavin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 100(5), p.2117-2119, 2016. Doi: 10.1007/s00253-015-7256-z
- SCHWECHHEIMER, S.K.; BECKER, J.; PEYRIGA, L.; PORTAIS, J.; SAUER, D.; MÜLLER, R.; HOFF, B.; HAEFNER, S.; SCHRÖDER, H.; ZELDER, O.; WITTMANN, C. Improved riboflavin production with *Ashyba gossypii* from vegetable oil based on ¹³C metabolic network analysis with combined labeling analysis by GC/MS, LC/MS, 1D, and 2D NMR. **Metabolic Engineering**, In press. Doi:10.1016/j.ymben.2018.04.005
- SERRA, R.; MENDONÇA, C.; VENÂNCIO, A. Fungi and ochratoxin A detected in healthy grapes for wine production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 42-47, 2006.

- SETATI, M.E.; JACOBSON, D.; ANDONG, U.; BAUER, F. The Vineyard Yeast Microbiome, a Mixed Model Microbial Map. **Plos One**, v.7(12), p.1-11, 2012.
- SHI, K.; SONG, D.; CHEN, G.; PISTOLOZZI, M.; WU, Z.; QUAN, L. Controlling composition and color characteristics of *Monascus* pigments by Ph and nitrogen sources in submerged fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.120, p.145-154, 2015.
- SHI, S.B.; CHEN, T.; ZHANG, Z.G.; CHEN, X.; ZHAO, X.M. Transcriptome analysis guided metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for riboflavin production. **Metabolic Engineering**, v.11(4-5), p.243-252, 2009a.
- SHI, S.B.; SHEN, Z.; CHEN, X.; CHEN, T.; ZHAO, X.M. Increased production of riboflavin by metabolic engineering of the purine pathway in *Bacillus subtilis*. **Biochemical Engineering Journal**, v.46(1), p.28-33, 2009b.
- SHI, T.; WANG, Y.C.; WANG, Z.W.; WANG, G.L.; LIU, D.Y.; FU, J.; CHEN, T.; ZHAO, X.M. Deregulation of purine pathway in *Bacillus subtilis* and its use in riboflavin biosynthesis. **Microbial Cell Factors**, v.13, 2014.
- SHIER, W.T.; LAO, Y.; STEELE, T.W.J.; ABBAS, H.K. Yellow pigments used in rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains are anthraquinones associated with the aflatoxin biosynthetic pathway. **Bioorganic Chemistry**, v.33, p.426-438, 2005.
- SILVA, A.V. **Novos derivados da riboflavina e novos complexos de Rutênio (II) poliazaaromáticos com potencial uso em tratamento e diagnóstico de leishmaniose**. 2013. 244f. Tese. (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo. Instituto de Química, São Paulo, 2013a.
- SILVA, D. M. et al. Identification of fungi of the genus *Aspergillus* section Nigri using polyphasic taxonomy. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 761-773, 2011.
- SILVA, M.D. **Fungos filamentosos e micotoxinas em uvas, sucos, mostos e vinhos das regiões sudeste e nordeste do Brasil**. 2013. 185f. Tese. (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2013.
- SILVA, R.; AGUIAR, T.Q.; DOMINGUES, L. Blockage of the pyrimidine biosynthetic pathway affects riboflavin production in *Ashbya gossypii*. **Journal of Biotechnology**, v.193, p.37-40, 2015.
- SIMÕES, M. F.; SANTOS, C.; LIMA, N. Structural diversity of *Aspergillus* section Nigri spores. **Microscopy Microanalysis**, v. 19, p. 1-8, 2013.
- SINGH, L.P.; GILL, S.S.; TETUJE, N. Unravelling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. **Plant Signaling & Behavior** v.6, p.175-191, 2011.

- SINGH, N.; GOEL, G.; SINGH, N.; PATHAK, B.K.; KAUSHIK, D. Modeling the red pigment production by *Monascus purpureus* MTCC 369 by Artificial Neural Network using rice water based medium. **Food Bioscience**, v.11, p.17–22, 2015.
- SKOOG, D.A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2005. 1124p.
- SOPANDI, T.; WARDAH, A.; SURTININGSIH, T.; SUWANDI, A.; SMITH, J.J. Utilization and optimization of a waste stream cellulose culture medium for pigment production by *Penicillium spp.* **Journal of Applied Microbiology**, v.114, p.733-745, 2012.
- SOUZA, A.C.S.; FERREIRA, C.V.; JUCÁ, M.B.; AOYAMA, H.; CAVAGIS, A.D.M.; PEPPELENBOSCH, M.P. Riboflavina: uma vitamina multifuncional. **Quimica Nova**, v.28(5), p.887-891, 2005
- SOUZA, P.N.C. **Bioprospecção de fungos filamentosos isolados de cavernas brasileiras produtores de pigmento**. 2015. 88f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2015.
- SOUZA, B.S.; SANTOS, T.T. Endophytic fungi in economically important plants: ecological aspects, diversity and potential biotechnological applications. **Biotechnology and Biodiversity**, v.4, p.113-126, 2017.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Review.**, v.67(4), p.491-502, 2003.
- STUDT, L.; WIEMANN, P.; KLEIGREWE, K.; HUMPF, H.; TUDZYNSKI, B. Biosynthesis of Fusarubins Accounts for Pigmentation of *Fusarium fujikuroi* Perithecia. **Applied Environmental Microbiology**, v.78(12), p.4468–4480, 2012.
- SUGIMOTO, T.; KANAMASA, S.; KATO, T.; PARK, E.Y. Importance of malate synthase in the glyoxylate cycle of *Ashbya gossypii* for the efficient production of riboflavin. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.83(3), p.529–539, 2009.
- SURYANARAYANAN, T.S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M.B.; SASSE, F.; JANSEN, R.; MURALI, T.S. Fungal endophytes and bioprospecting. **Fungal Biology Reviews**, v.23, p.9-19, 2009.
- TASKIN, M.; UNVER, Y.; FIRAT, A.; ORTUCU, S.; YILDIZ, M. Sheep wool protein hydro- lysate: a new peptone source for microorganisms. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v.91, p.1675–1680, 2016.
- TEIXEIRA, M.F.S.; MARTINS, M.S.; DA SILVA, J.C.; KIRSCH, L.S.; FERNANDES, O.C.C.; CARNEIRO, A.L.B; DE CONTI, R.; DURÁN, N. Amazonian biodiversity: pigments from *Aspergillus* and *Penicillium*-characterizations, antibacterial activities and their toxicities. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 6, p. 300- 311, 2012.

- TOGHUEO, R.M.K.; ZABALGOGEAZCOA, I.; ALDANA, B.R.V.; BOYOM, F.F. Enzymatic activity of endophytic fungi from the medicinal plants *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* and *Cananga odorata*. **South African Journal of Botany**, v.109, p.146–153, 2017.
- VARANDA, C.M.R.; OLIVEIRA, M.; MATERATSKI, P.; LANDUM, M.; CLARA, M.I.E.; FÉLIX, M.R. Fungal endophytic communities associated to the phyllosphere of grapevine cultivars under different types of management. **Fungal Biology**, v. 120(12), p.1525-1536, 2016.
- VARGAS, G.D.L.P.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; BENETI, S.C.; FREIRE, D.M.G.; LUCCIO, M.D. Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. **Journal Chemistry of Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 47-54, 2008.
- 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**, v. 109(4), p. 346-350, 2010a.
- VELMURUGAN, P.; KAMALA-KANNAN, S.; BALACHANDAR, V.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; CHAE, J.; OH, B. Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, p. 262-268, 2010b.
- VENDRUSCOLO, F.; MÜLLER, B.L.; MORITZ, D.E.; DE OLIVEIRA, D.; SCHMIDELL, W.; NINOW, J.L. Thermal stability of natural pigments produced by *Monascus ruber* in submerged fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p.278–284, 2013.
- VENDRUSCOLO, F.; PITOL, L.O.; CARCIOFI, B.A.M.; MORITZ, D.E.; LAURINDO, J.B.; SCHMIDELL, W.; NINOW, J.L. Construction and application a vane system in a rotational rheometer for determination of the rheological properties of *Monascus ruber* CCT 3802. **Journal of biorheology**, v.24, p.29-35, 2010.
- ^aVENKATACHALAM, M.; MAGALON, H.; DUFOSSÉ, L.; FOUILLAUD, M. Production of pigments from the tropical marine-derived fungi *Talaromyces albobiverticillius*: New resources for natural red-colored metabolites. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.70, p.35-48, 2018.
- ^bVENKATACHALAM, M.; ZELENÁ, M.; CACCIOLA, F.; CESLOVA, L.; GIRARD-VALENCIENNES, E.; CLERC, P.; DUGO, P.; MONDELLO, L.; FOUILLAUD, M.; ROTONDO, A.; GIUFFRIDA, D.; DUFOSSÉ, L. Partial characterization of the pigments produced by the marine-derived fungus *Talaromyces albobiverticillius* 30548. Towards a new fungal red colorant for the food industry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.67, 38–47, 2018.
- XIN, Q.; TAO, P.; WEI-MIN, Z.; ZHILONG, W. Submerged culture of marine-derived *Penicillium sclerotiorum* FS50 to produce sclerotiorin. **Process Biochemistry**, v.79, p.28-31, 2019.

- YANG, J.; CHEN, Q.; WANG, W.; HU, J.; HU, C. Effect of oxygen supply on *Monascus* pigments and citrinin production in submerged fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, p.564-569, 2015a.
- YANG, Y.; LIU, B.; DU, X.; LI, P.; LIANG, B.; CHENG, X.; DU, L.; HUANG, D.; WANG, L.; WANG, S. Complete genome sequence and transcriptomics analyses reveal pigment biosynthesis and regulatory mechanisms in an industrial strain, *Monascus purpureus* YY- 1. **Scientific Reports**, v.5, p.2-9, 2015b.
- YANG, G.; LI, P.; MENG, L.; XV, K.; DONG, F.; QIU, Y.; HE, L.; LIN, L. Diversity and communities of culturable endophytic fungi from different tree peonies (geoh herbs and non-geoh herbs), and their biosynthetic potential analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.49, p.47–58, 2018.
- YILMAZ, N.; HOUBRAKEN, J.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; VISAGIE, C.M.; SAMSON, R.A. Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species. **Persoonia**, v.29, p.39–54, 2012.
- YOGANATHAN, K.; ROSSANT, C.; GLOVER, R.P.; CAO, S.; VITTAL, J.J.; NG, S.; HUANG, W.; BUSS, A.D.; BUTLER, M.S. Inhibition of the human chemokine receptor CCR5 by variecolin and variecolol and isolation of four New variecolin analogues, emericolins A-D, from *Emericella aurantiobrunnea*. **Journal of Natural Products**, v.67, p.1681-1684, 2004.
- WANG, E.; DONG, C.; PARK, R.F.; ROBERTS, T.H. Carotenoid pigments in rust fungi: Extraction, separation, quantification and characterization. **Fungal Biology Reviews**, In press,1-15, 2017.
- WANG, X.W.; HOUBRAKEN, J.; GROENEWALD, J.Z.; MEIJER, M.; ANDERSEN, B.; NIELSEN, K.F.; CROUS, P.W.; SAMSON, R.A. Diversity and taxonomy of *Chaetomium* and chaetomium-like fungi from indoor environments. **Studies in Mycology**, v.88, p.145-224, 2016.
- WANG, M.; SUN, Z.; CHEN, Y.; LIU, H.; LI, H.; TAN, G.; LI, S.; GUO, X.; ZHANG, W. Cytotoxic cochlioquinone derivatives from the endophytic fungus *Bipolaris sorokiniana* derived from *Pogostemon cablin*. **Fitoterapia**, 2016.
- WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. p.315-322. 1990.
- YILMAZ, N.; HOUBRAKEN, J.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; VISAGIE, C.M.; SAMSON, R.A. Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species. **Persoonia**, v.29, p.39-54, 2012

- ZAND, N.; CHOWDHRY, B.Z.; PULLEN, F.S.; SNOWDEN, M.J.; TETTEH, J. Simultaneous determination of riboflavin and pyridoxine by UHPLC/LC–MS in UK commercial infant meal food products. **Food Chemistry**, v.135, p.2743–2749, 2012.
- ZANETTE, G.F. **Pigmentos Naturais Produzidos por Fungos Filamentosos Isolados de *Theobroma grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum. (cupuaçu)**. 2013. 129f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2013.
- ZHANG, X.; WANG, J.; CHEN, M.; WANG, C. Effect of nitrogen sources on production and photostability of *Monascus* pigments in liquid fermentation. **IERI Procedia**, v.2., p.344–350, 2013.
- ZHENG, Y.; QIAO, X.; MIAO, C.; LIU, K.; CHEN, Y.; XU, L.; ZHAO, L. Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. **Annals Microbiology**, v.66, p.529-542, 2016.
- ZHENG, J.; ZHANG, X.; XIN, Q.; PAN, T.; WANG, Z. Efficient accumulation of sclerotiorin via overcoming low pH caused by overflow carbon metabolism during cell suspension culture of *Penicillium sclerotiorum*. **Process Biochemistry**, 2019. In press.
- ZHOU, B.; WANG, J.; PU, Y.; ZHU, M.; LIU, S.; LIANG, S. Optimization of culture medium for yellow pigments production with *Monascus anka* mutant using response surface methodology. **Eur Food Res Technol**, v.228(6), p.895-901, 2009.
- ZHU, Y.; CHEN, X.; CHEN, T.; SHI, S.; ZHAO, X. Over-expression of glucose dehydrogenase improves cell growth and riboflavin production in *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v. 28(20), p.1667–1672, 2006.

ANEXO 1 – Fotos relacionadas ao isolamento e seleção de fungos filamentosos endofíticos produtores de pigmentos



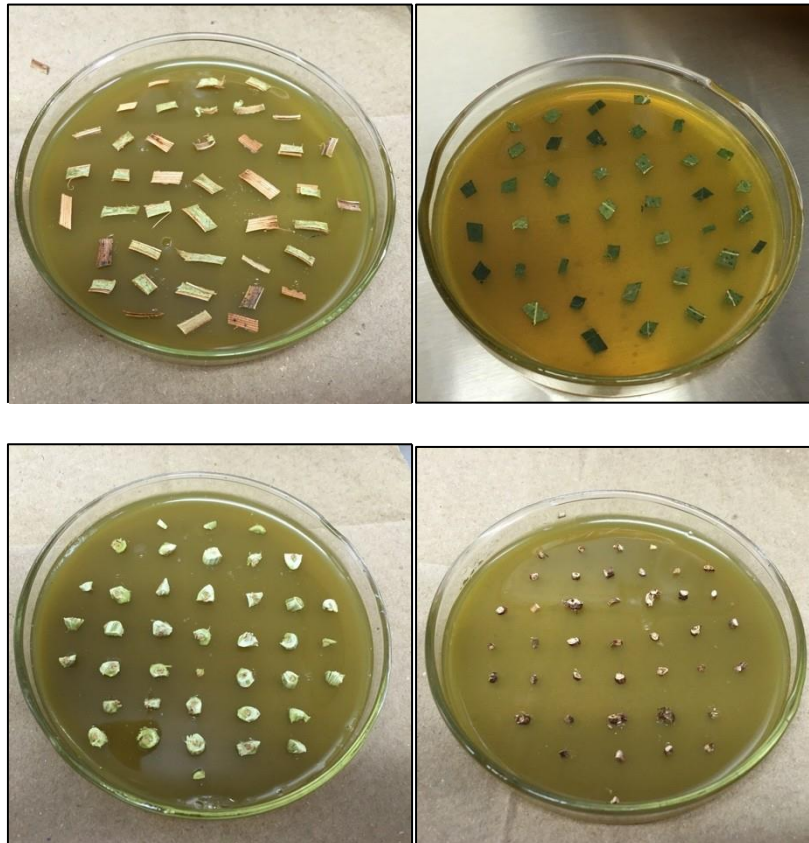
Vinhedos localizados no município de Diamantina/MG, de onde os fungos filamentosos endofíticos foram isolados (Sítios 1, 2 e 3)



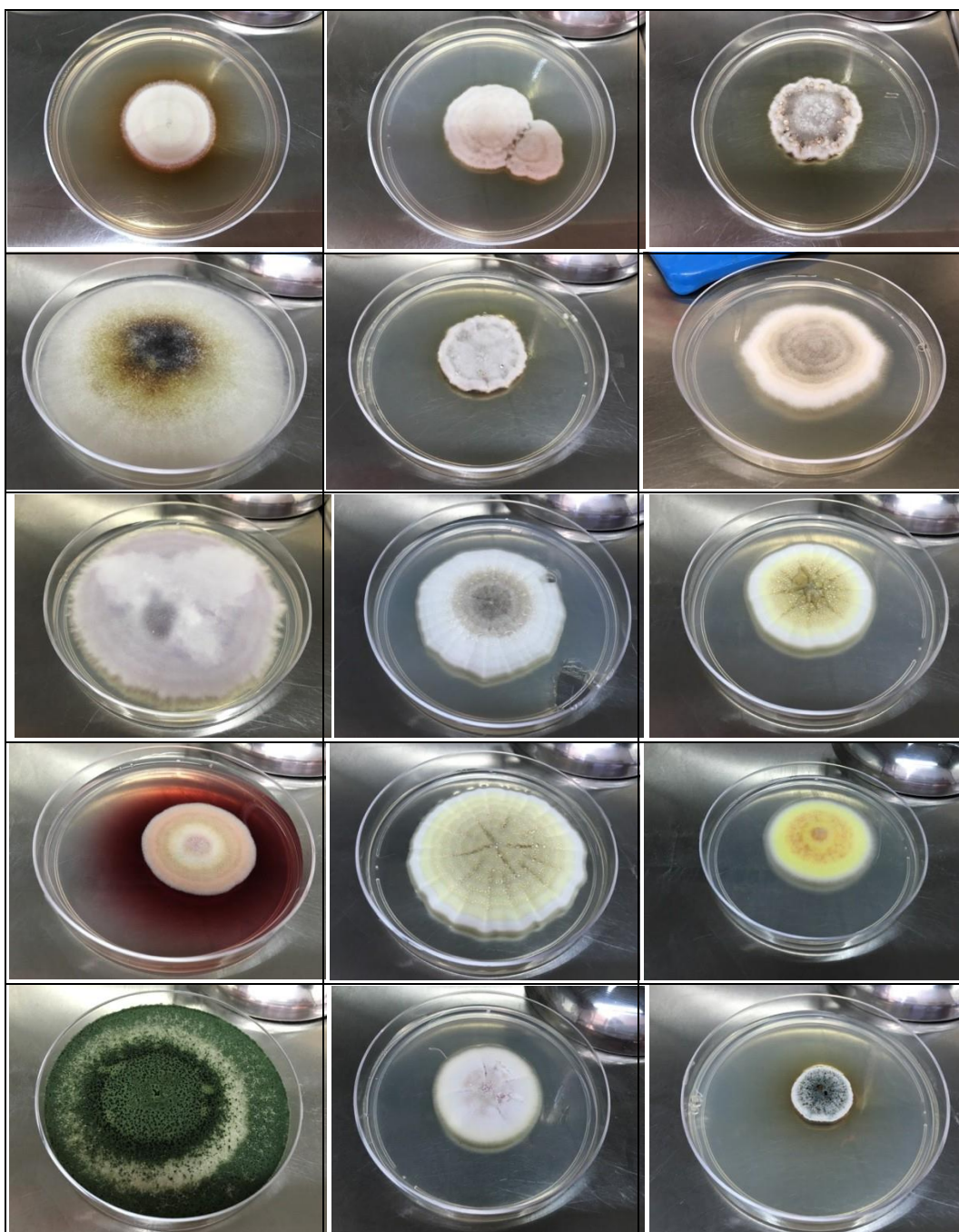
Detalhe da exposição da raiz de uma videira para coleta de amostra



Uvas da variedade Sirah de um dos vinhedos



Isolamento de fungos filamentosos endofíticos de casca do caule (em cima e à esquerda), da folha (em cima e à direita), do xilema (em baixo e à esquerda) e da raiz (em baixo e à direita)



Cepas produtoras de pigmentos selecionadas na etapa de seleção primária (cepas 9, 23, 28, 29, 30, 31, 34, 35, 38, 43, 45, 49, 50, 52 e 53)

ANEXO 2 – Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) para o experimento de avaliação da estabilidade do pigmento de *A. aureus* (Artigo 1) – Temperatura e pH

VARIAÇÃO TEMPERATURA:

Temperatura X	Abs ₄₅₀ Y	U ₄₅₀	Desvio padrão
50	0,795	0,795	0,107
60	0,783	0,783	0,103
70	0,798	0,798	0,105
80	0,824	0,824	0,106
90	0,862	0,862	0,102
100	0,891	0,891	0,120

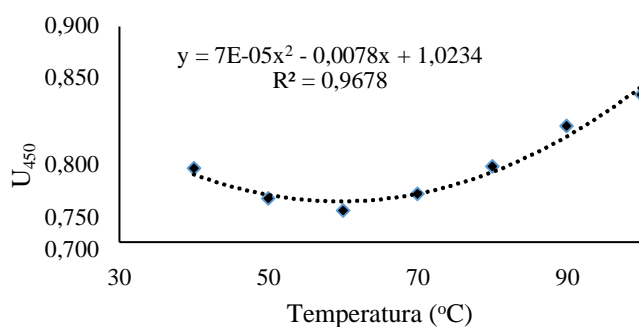
SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,98377
Quadrado de R	0,96779
Quadrado de R ajustado	0,95169
Erro-padrão	0,00854
Observações	7

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F tab</i>
Regressão	2	0,00876	0,00438	60,10132	0,00104	6,94400
Residual	4	0,00029	0,00007			
Total	6	0,00905				

	<i>Coeficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>inferior</i>	<i>superior</i>
Interceptar	1,02341	0,04352	23,51401	0,00002	0,90257	1,14425
Variável X 1	-0,00778	0,00131	-5,92104	0,00408	-0,01143	-0,00413
Variável X 2	0,00007	0,00001	7,00919	0,00218	0,00004	0,00009



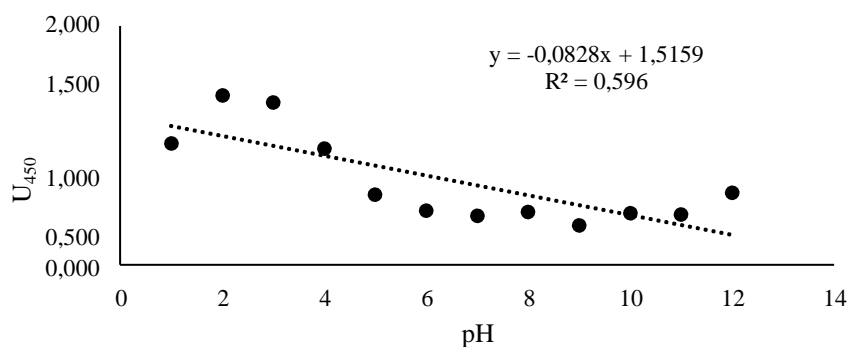
VARIAÇÃO PH:

pH X	Abs ₄₅₀	U ₄₅₀ Y	Desvio padrão
1	0,645	1,291	0,076
2	0,845	1,691	0,118
3	0,817	1,633	0,104
4	0,624	1,248	0,138
5	0,430	0,860	0,114
6	0,363	0,726	0,085
7	0,341	0,683	0,105
8	0,357	0,714	0,097
9	0,302	0,604	0,056
10	0,353	0,706	0,081
11	0,347	0,694	0,068
12	0,440	0,879	0,324

SUMÁRIO DOS RESULTADOS

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,7720
Quadrado de R	0,5960
Quadrado de R ajustado	0,5556
Erro-padrão	0,2579
Observações	12

ANOVA						
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>F tab</i>
Regressão	1	0,981	0,981	14,753	0,003	4,965
Residual	10	0,665	0,067			
Total	11	1,646				
		<i>Erro-</i>			<i>95%</i>	<i>95%</i>
	<i>Coefficientes</i>	<i>padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>inferior</i>	<i>superior</i>
Interceptar	1,51586	0,15872	9,55059	0,00000	1,16221	1,86951
Variável X 1	-0,08283	0,02157	-3,84091	0,00326	-0,13088	-0,03478



ANEXO 3 – Médias, desvio-padrão, ANOVA e Teste de Tukey para a produção de pigmento
(Artigo 2)

FONTE DE CARBONO:

Valores médios da concentração do pigmento de *A. aureus* produzido em diferentes fontes de carbono

Fonte carbono	Média (U ₄₅₀) ± desvio-padrão
Xilose	0,676±0,015
Lactose	0,542±0,006
Sacarose	0,077±0,003
Ramnose	0,002±0,001

ANOVA

Fator de Variação	Graus de Liberdade (GL)	Soma Quadrática (SQ)	Quadrados Médios (QM)	Fcalc.	p	F 5%
Tratamento	3	0,0000	0,3363	4962,916187	0,0000	4,066
Resíduo	8	1,0096	0,0001			
Total	11	1,0096				

Teste de Tukey

Tratamento	Média	T4	T3	T2	T1	Discrimin.
T4 Xilose	0,676	a
T3 Lactose	0,542	0,134	b
T2 Sacarose	0,077	0,599	0,465	c
T1 Ramnose	0,002	0,674	0,540	0,075	...	d

DMS (Diferença Mínima Significativa) = 0,0232

FONTE DE NITROGÊNIO:

Valores médios da concentração do pigmento de *A. aureus* produzido em diferentes fontes de nitrogênio

Fonte nitrogênio	Média (U ₄₅₀) ± desvio-padrão
Peptona de caseína	1,238±0,007
Extrato de malte	0,639±0,007
Nitrato de sódio	0,077±0,004
Sulfato de amônio	0,010±0,001
Glutamato monossódico	0,000±0,000

ANOVA

Fator de Variação	Graus de Liberdade (GL)	Soma Quadrática (SQ)	Quadrados Médios (QM)	Fcalc.	p	F 5%
Tratamento	4	2,4769	0,6192	33436,179	0,0000	4,65
Resíduo	10	0,0002	0,0000			
Total	14	2,4771				

Teste de Tukey

Tratamento	Média	T5	T4	T3	T2	T1	Discrimin.
T5 Peptona de caseína	1,238	a
T4 Extrato de malte	0,639	0,599	b
T3 Nitrato de sódio	0,077	1,162	0,562	c
T2 Sulfato de amonio	0,010	1,229	0,629	0,067	d
T1 Glutamato monossodico	0,000	1,238	0,639	0,076	0,009	...	d

DMS (Diferença Mínima Significativa) = 0,0116

MELHORES FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO:

Valores médios da concentração do pigmento de *A. aureus* produzido com as melhores fontes de carbono e nitrogênio

Fonte carbono e nitrogênio	Média (U ₄₅₀) ± desvio-padrão
Lactose com nitrato de sódio	0,542±0,006
Sacarose com peptona de caseína	1,238±0,007
Lactose com peptona de caseína	0,447±0,008

ANOVA

Fator de Variação	Graus de Liberdade (GL)	Soma Quadrática (SQ)	Quadrados Médios (QM)	Fcalc.	p	F 5%
Tratamento	2	1,1200	0,5600	10331,711	0,0000	5,143
Resíduo	6	0,0003	0,0001			
Total	8	1,1203				

Teste de Tukey

Tratamento	Média	T3	T2	T1	Discrimin.
T3 Peptona de caseína com sacarose	1,238	a
T2 Nitrato de sódio com lactose	0,542	0,696	b
T1 Peptona de caseína com lactose	0,447	0,791	0,095	...	c

DMS (Diferença Mínima Significativa) = 0,018

DCCR – REPETIÇÃO ENSAIO 8:

Valores médios da concentração do pigmento de *A. aureus* produzido de acordo com o item 3.2 e 3.4 (Artigo 2)

Fonte de carbono e nitrogênio	Média (U ₄₅₀) ± desvio-padrão
Sacarose e nitrato de sódio	0,0768±0,0036
Sacarose e peptona de caseína (30g/L e 3g/L)	1,2384±0,0072
Sacarose e peptona de caseína (Ensaio 8 - DCCR)	4,1298±0,0116

ANOVA

Fator de Variação	Graus de Liberdade	Soma Quadrática (SQ)	Quadrados Médios (QM)	Fcalc.	p	F 5%
Tratamento	2	26,1366	13,0683	196513,390	0,0000	5,143
Resíduo	6	0,0004	0,0001			
Total	8	26,1370				

Tratamento	Média	T3	T2	T1	Discrimin.
T3 Sacarose e pep. de caseína (Ensaio 8-DCCR)	4,1298	a
T2 Sacarose e pep. de caseína (30g/L e 3g/L)	1,2384	2,891	b
T1 Sacarose e nitrato de sódio	0,0768	4,053	1,162	...	c

DMS (Diferença Mínima Significativa) = 0,0204

Fungos endofíticos isolados de videiras: fontes potenciais para exploração biotecnológica

Luciana Amaral de Faria Silva, Leandro Soares Santos, Silmara Almeida de Carvalho

Laboratório de Produtos Naturais e Biotecnologia, Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, Bahia, Brasil.

Fungos endofíticos de videiras

Autor correspondente: Silmara Almeida de Carvalho, Departamento de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Rod. BR415, Km 03, s/n, 45700-000, Itapetinga, Bahia, Brasil. Email: scarvalho@uesb.edu.br

Contribuições: Luciana Amaral de Faria Silva participou da pesquisa e preparação do artigo. Leandro Soares Santos e Silmara Almeida de Carvalho participaram na preparação do artigo, todos os autores aprovaram o artigo final.

Resumo

Essa revisão de literatura foi elaborada para fornecer um panorama acerca das pesquisas recentes e das perspectivas futuras sobre fungos endofíticos isolados de videiras. Devido à importância econômica dessa planta hospedeira e desse grupo de micro-organismos, essa revisão também pode despertar o interesse de pesquisadores com afinidade ao tema. A maioria dos trabalhos publicados ainda têm se voltado para a diversidade de fungos endofíticos isolados de videiras. Enquanto há poucos trabalhos que efetivamente avaliam o potencial biotecnológico desses micro-organismos. Portanto, existe uma grande área, relacionada a esse potencial biotecnológico, que pode ser investigada, tal como tem ocorrido com outros endofíticos isolados de diferentes espécies de plantas. Por fim, as videiras, que são uma *commodity* global, também podem ser consideradas fontes importantes de fungos endofíticos com perspectivas promissoras de aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: Endofíticos. Videira. Vinhedo. Potencial biotecnológico. Isolamento. Uvas.

1 Introdução

A exploração da diversidade microbiana a partir de videiras e do ecossistema de vinhedos tem sido realizada ao longo dos anos (Setati *et al.* 2012). Entretanto, os fungos endofíticos de videiras são um grupo de micro-organismos muito pouco explorados, apesar de apresentarem enorme potencial para aplicação biotecnológica (Rodríguez *et al.* 2016).

Micro-organismos endofíticos têm sido isolados de inúmeras espécies de plantas (Wang e Dai 2011). Em especial, fungos endofíticos são reconhecidos como fontes importantes de produtos naturais bioativos para a área farmacêutica e para a agricultura (Bezerra *et al.* 2012; Sebastianes *et al.* 2012; Prabukumar *et al.* 2017a). A produção de moléculas bioativas pode estar relacionada às respostas adaptativas necessárias para os endofíticos sobreviverem e colonizarem as plantas hospedeiras no ambiente selvagem (Freitas *et al.* 2015)

Fungos endofíticos são capazes de colonizar os tecidos internos das plantas, sem causar algum dano imediato ao seu hospedeiro (Seetharaman *et al.* 2018). Nas interações simbióticas endofítico/planta, os endofíticos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários. Esses metabólitos podem favorecer a sobrevivência da planta, por exemplo, através da diminuição do ataque herbívoro (Souza e Santos 2017).

Essa revisão é baseada nos relatos sobre fungos filamentosos endofíticos isolados de videiras, devido à importância econômica dessa planta hospedeira e desse grupo de micro-organismos. As videiras estão entre as plantas mais importantes economicamente, entre aquelas produtoras de frutas, devido às uvas que são a base da fabricação de vinhos (Rondot e Reineke 2018). Além disso, não há na literatura pesquisada, trabalhos de revisão com temas envolvendo fungos endofíticos de videiras.

2 Micro-organismos endofíticos

Há muito tempo, as interações entre micro-organismos e plantas são conhecidas. Inicialmente, acreditava-se que essas interações levavam necessariamente a lesões nos tecidos vegetais. Entretanto, nos últimos anos, tem sido verificada e estudada a presença de micro-organismos no interior de tecidos saudáveis de vegetais (Yang *et al.* 2018).

Os micro-organismos endofíticos foram mencionados pela primeira vez no início do século XIX. Entretanto, apenas em 1886 foi delineada a distinção entre eles e os patógenos de plantas (Bezerra *et al.* 2017). A partir daí várias definições foram colocadas por diferentes autores. Muitos deles consideravam os endofíticos como “assintomáticos”, ou seja, não produziam efeitos benéficos ou prejudiciais aos hospedeiros (Azevedo 1998). Por esse motivo, os endofíticos permaneceram relativamente distantes do interesse de pesquisadores até a década de 70. A partir daí, esses micro-organismos começaram a despertar a atenção novamente por demonstrarem propriedades de interesse.

Essas propriedades estavam relacionadas à capacidade de conferir proteção à planta contra insetos, pragas, micro-organismos patogênicos e contra herbívoros (Hardoim *et al.* 2015).

Endofíticos são micro-organismos que colonizam os tecidos de plantas durante, pelo menos, uma parte de seu ciclo de vida sem causar sintomas visíveis de doença (Rodriguez *et al.* 2009). E podem ser encontrados no tecido da planta hospedeira em diferentes órgãos, tais como folhas, raízes, caules, cascas, flores, frutas e sementes (Kusari *et al.* 2012). E também nos espaços intra ou extracelulares (Zheng *et al.* 2016). Diante dessa definição, os endofíticos se distinguem dos micro-organismos fitopatógenos e dos epifíticos. Os fitopatógenos são causadores de doenças nas plantas, enquanto que os epifíticos vivem na superfície dos órgão e tecidos vegetais (Botella e Diez 2011). Essas distinções têm finalidade apenas didática, pois pode haver sobreposição entre esses grupos. Dessa forma, um micro-organismo endofítico pode se tornar um potencial fitopatógeno, dependendo do estado fisiológico da planta e das condições ambientais (Lorenzini *et al.* 2018).

Os endofíticos podem ser encontrados tanto nas partes aéreas das plantas, quanto nas raízes (Sebastianes *et al.* 2013). De um modo geral, aberturas naturais e feridas são formas de penetração dos endofíticos nas plantas. As raízes são a principal porta de entrada, uma vez que o surgimento de raízes secundárias laterais gera “feridas”, que servem de entrada para micro-organismos. E ainda, o próprio crescimento da raiz gera abrasões. Aberturas naturais (estômatos e hidatódios) e aberturas causadas por insetos ou por fungos patogênicos são também porta de entrada de micro-organismos (Fernandes *et al.* 2015). A colheita pode causar feridas e a entrada ativa de micro-organismos através da produção de enzimas. Por isso, também está relacionada com a penetração de endofíticos. Há ainda aqueles transmitidos por sementes e por propagação vegetativa (Halleen *et al.* 2003). Os endofíticos passam de uma planta para a outra através das estruturas utilizadas. Após a penetração na planta, os micro-organismos endofíticos se movimentam atingindo diferentes órgãos e tecidos (Azevedo 1998).

Ainda não são muito bem compreendidas as interações endofítico/planta, mas sabe-se que esses micro-organismos podem produzir toxinas, enzimas (Toghueo *et al.* 2017) e antibióticos (Farhat *et al.* 2019) para a sobrevivência da planta hospedeira. Essa interação simbiótica, pode conferir vantagens à planta como: a diminuição do ataque herbívoro e de insetos; controle de outros micro-organismos (Singh *et al.* 2011); e aumento da tolerância às condições de estresse, como salinidade e toxicidade por metal pesado (Lahrman *et al.* 2013; Khan *et al.* 2014).

3 Fungos filamentosos endofíticos

Teoricamente, fungos endofíticos podem ser isolados de qualquer planta (Rodriguez *et al.* 2009). Com isso, ficam aumentadas as chances de encontrar novos fungos endofíticos e, conseqüentemente, fontes de diversidade genética e de compostos bioativos (Strobel e Daisy 2003).

Nos últimos anos, fungos endofíticos têm sido alvo de diversos estudos. As discussões mais comuns envolvem a simbiose entre planta hospedeira e fungo endofítico (Ferreira *et al.* 2015). Em seguida, as discussões sobre a variedade de fungos endofíticos associados às plantas de clima tropical e temperado (Sebastianes *et al.* 2013), e sobre os benefícios desses micro-organismos às plantas hospedeiras (Souza e Santos 2017). Atenção ainda maior tem sido dada aos metabólitos secundários produzidos por fungos endofíticos. Através desses metabólitos, os pesquisadores buscam por moléculas com potencial para serem empregadas nas áreas farmacêutica, médica, alimentícia, ambiental e na agricultura (Dezam *et al.* 2017). Entre essas moléculas, destacam-se os alcaloides, esteroides, quinonas, iso-cumarinas, lignanas, fenóis e lactonas (Li *et al.* 2018).

Fungos endofíticos já foram isolados de uma grande variedade de plantas, incluindo plantas medicinais ou tóxicas (Xiang *et al.* 2015), e plantas de interesse comercial, tais como soja (Fernandes *et al.* 2015), cacau (Hanada *et al.* 2010), feijão (Gonzaga *et al.* 2014), café (Fernandes *et al.* 2009) e tomate (Klieber e Reineke 2016).

4 Isolamento de fungos endofíticos de videiras

É importante estabelecer um protocolo específico para o isolamento de fungos endofíticos de videiras, pois o isolamento representa o passo mais crucial para a obtenção de culturas puras (Zheng *et al.* 2006).

Inicialmente, as partes coletadas da planta são armazenadas em sacos de papel e transportadas para o local de análise. Se houver necessidade, o material coletado pode ser mantido a 4°C até o momento das análises (Strobel e Daysi 2003).

A esterilização da superfície dos órgãos vegetais de videiras é uma etapa crítica para garantir o isolamento de endofíticos e evitar a contaminação por epifíticos. Uma pré-lavagem das amostras com água esterilizada é importante para reduzir o número da microflora epifítica (Cueva *et al.* 2011). Hipoclorito de sódio e etanol são usados frequentemente como desinfetantes das superfícies. Esterilização com a sequência “etanol - hipoclorito de sódio – etanol - água esterilizada” é amplamente empregada no isolamento a partir de videiras (Cueva *et al.* 2011; Pancher *et al.* 2012; Varanda *et al.* 2016; Dwibedi e Saxena 2018). Surfactante, como Tween 80 tem sido usado para imersão das amostras e para aumentar a eficácia da esterilização da superfície (Rondot e Reineke 2018). Em geral, os procedimentos de esterilização da superfície devem ser melhorados e definidos em estudos preliminares. Em especial, a definição do tempo de esterilização deve ser realizada, uma vez que a sensibilidade dos micro-organismos epifíticos varia com o órgão e a idade da planta (Qin *et al.* 2011). A esterilização de amostras de raízes deve ser precedida por pré-lavagem vigorosa com água esterilizada. Em seguida, as raízes devem sofrer imersão em tampão fosfato, para equilibrar a pressão osmótica e evitar a difusão passiva de agentes esterilizantes nas raízes (Azevedo 1998).

Após a etapa de esterilização, é necessária a transferência dos fragmentos da planta para meios adequados. Crescimento microbiano em laboratório depende da composição do meio e das condições de cultivo. No caso de isolamento de fungos endofíticos de videiras, os fragmentos podem ser distribuídos em placas de Petri contendo meios clássicos, como ágar Sabouraud, ágar batata dextrose (PDA) (Halleen *et al.* 2003; Varanda *et al.* 2016; Dwibedi e Saxena 2018) e ágar extrato de malte (AEM) (Pancher *et al.* 2012). Esses meios devem ser sempre adicionados de antimicrobianos para evitar o crescimento de bactérias (Araújo *et al.* 2002). Outros meios sólidos também têm sido adaptados para o crescimento desses micro-organismos. Meio sólido contendo extratos de malte e de levedura (Cueva *et al.* 2011) e meio sólido com peptona de soja e glicose (Rondot e Reineke 2018), já foram aplicados com sucesso para o crescimento de fungos endofíticos de videiras. A adição de extrato da própria planta ao meio sólido pode ser positiva no crescimento das colônias endofíticas porque proporciona ao meio, características do microambiente da planta (Qin *et al.* 2011). Porém, essa possibilidade ainda não foi empregada para isolamento de fungos endofíticos de videiras.

Após a etapa de transferência dos fragmentos das plantas, as placas contendo o material vegetal devem ser incubadas. A temperatura geralmente usada para crescimento dos endofíticos de videiras permanece em torno de 25 e 30°C, e o tempo de incubação varia de 7 a 15 dias. A partir do crescimento, os fungos endofíticos com características morfológicas diferentes são isolados até obtenção de cultura pura, e identificados por análise molecular (Kia *et al.* 2019). Para a determinação filogenética, tem sido empregadas técnicas de sequenciamento genético, tais como 18S rDNA, *internal transcribed spacer* (ITS) e combinação de subunidades ribossomais (Yang *et al.* 2018). Uma vez isolados, os fungos são colocados em manutenção.

5 Diversidade de fungos endofíticos de videiras

A Tabela 1 reúne diferentes trabalhos sobre isolamento de fungos endofíticos de videiras e de seus ecossistemas que estão apresentados de forma resumida. A partir de videiras, um grande número de espécies fúngicas endofíticas já foi isolado. Isso demonstra a importância dessas plantas também como fontes de fungos endofíticos. As videiras estão entre as plantas produtoras de frutas mais importante economicamente (Cueva *et al.* 2011). Na verdade, são uma *commodity* global, devido às uvas que são a base da fabricação de vinhos (Leonini *et al.* 2018). A presença de fungos endofíticos em videiras pode ser influenciada por diferentes fatores, tais como o período de colheita, cultivar, área geográfica, condições climáticas e as práticas vitícolas aplicadas (Serra *et al.* 2006). Os gêneros frequentemente encontrados como endofíticos de videiras são *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Trichoderma* e *Penicillium*.

A partir dos dados da Tabela1, nota-se que a maioria dos trabalhos tem abordado três vertentes: (i) a diversidade de fungos isolados de ecossistemas de videiras, incluindo os endofíticos;

(ii) a influência de diferentes manejos de vinhedos sobre a diversidade; (iii) e a influência do tipo de cultivar sobre a diversidade.

Tabela 1 – Trabalhos relacionados ao isolamento de fungos filamentosos endofíticos de videiras e de seus ecossistemas. Dados sobre localização do vinhedo, amostras usadas para isolamento, número de cepas isoladas, gêneros e espécies isoladas.

Localização dos vinhedos	Amostras para isolamento	Total de cepas isoladas	Gêneros e espécies isolados	Referência
Viveiros comerciais na área de Wellington, na Província do Cabo Ocidental/ África do Sul	Raízes, porta-enxerto, união de enxertia e copa, pedaços de tecido. Combinações: Richter 99/Pinotage, 101-14Mgt./Pinotage, Ramsey/Sultana and 143BMgt./Sultana.	6212*	<i>Cylindrocarpon</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>Acremonium</i> spp., <i>Phoma</i> spp., <i>Alternaria</i> spp., <i>Phialophora</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Clonostachys</i> spp., <i>Acremonium</i> spp., <i>Phaeomoniella chlamydospora</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Botryosphaeria</i> spp., <i>Pestalotiopsis</i> sp., <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Ulocladium</i> sp., <i>Cytosphaera</i> sp., <i>Tetraetracoccosporium</i> sp., <i>Phomopsis viticola</i> , <i>Paecilomyces</i> sp., <i>Epicoccum</i> sp.	Halleen <i>et al.</i> (2003)
Quatro regiões em Madri, Guadalajara, Ciudad Real/ Espanha	Casca de caule, brotos de folhas, fragmentos de xilemas (<i>Vitis vinifera</i>) e amostras de solo	290 / 182**	Atividade positiva: <i>Camarosporium</i> spp., <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Exophiala</i> spp., <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus ustus</i> , <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Fusarium</i> spp., <i>Myrothecium</i> spp., <i>Paecilomyces marquandii</i>	Cueva <i>et al.</i> (2011)
Sete regiões em Trentino/Itália	Hastes da parte lateral sem as folhas (<i>V. vinifera</i>). Cv.***Merlot e Chardonnay	377 / 252****	<i>Absidia glauca</i> 1B3C, <i>Alternaria</i> sp. 2.1.Ca, <i>Alternaria</i> sp. AL2, <i>Aspergillus niger</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>B. cinerea</i> 9.4.Md, <i>Cladosporium oxysporum</i> , <i>Cladosporium</i> sp. 10.4.Mb, <i>Cladosporium</i> sp. 4.2.Mb, <i>Epicoccum nigrum</i> 2.1.Cb., <i>Fusarium graminearum</i> PH1, <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium</i> sp. 53F, <i>Mortierella vertici lata</i> F2(VR), <i>Mucor hiemalis</i> 1B2C, <i>Neurospora crassa</i> OR74A, <i>Penicillium chrysogenum</i> , <i>P. chrysogenum</i> 54-1255, <i>Penicillium restrictum</i> VR31, <i>Penicillium spinulosum</i> VR14, <i>Phaeosphaeria nodorum</i> SN15, <i>Pithomyces chartarum</i> 9.2.Mb, <i>Podospora anserina</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> 2948, <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980, <i>Trichoderma aggressivum</i> , <i>Trichoderma atroviride</i> MT8, <i>Trichoderma reesei</i> QMA, <i>Trichoderma virens</i> , <i>Umbelopsis ramanniana</i> F13,	Pancher <i>et al.</i> (2012)

Zygorhyncus moelleri, *Umbelopsis ramanniana* F13, *Zygorhyncus moelleri* F11(VR), *Aureobasidium pullulans* 4.3.Cc, *Debaryomyces hansenii*, *Hansenula polymorpha*, *Pichia stipitis*

Localização dos vinhedos	Amostras usadas para isolamento	Número de cepas isoladas	Gêneros e espécies	Referência
Quatro regiões da costa adriática/ Croácia	Raízes. Cv. Plavac mali em porta-enxerto <i>Vitis berlandieri</i> × <i>Vitis rupestris</i>	-	<i>Fusarium</i> sp., <i>Penicillium</i> sp., <i>Cladosporium</i> sp., <i>Aureobasidium pullulans</i> , <i>Pestalopsis</i> sp., <i>Chaetomium</i> sp., <i>Seiridium</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp., <i>Glomus</i> sp.	Radic <i>et al.</i> (2014)
Região de Alentejo/ Portugal	Folhas (<i>V. vinifera</i>). Cv. Syrah, Cabernet Sauvignon, Aragonéz	240	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria porri</i> , <i>Alternaria solani</i> , <i>Alternaria tenuissima</i> , <i>Alternaria</i> sp., <i>Athelia</i> sp., <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Cladosporium</i> sp., <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Diplodia seriata</i> , <i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Epicoccum</i> sp., <i>Gloeotinia</i> sp., <i>Nigrospora oryzae</i> , <i>Penicillium brevicompactum</i> , <i>Penicillium</i> sp.	Varanda <i>et al.</i> (2016)
Região de Rheingau/ Alemanha	Folhas (<i>V. vinifera</i>). Cv. Riesling	Não se aplica	<i>Bauveria bassiana</i> (capaz de reduzir a infestação de plantas maduras por cigarrinha da uva e de plantas jovens em estufa, por cochonilha)	Rondot e Reineke (2018)
Seis regiões localizadas na Índia conhecidas como Pune, Nasik, Bangalore, Shimla e Alambagh	Hastes e folhas (<i>V. vinifera</i>) Cv. Merlot, Wild, Pinot Noir, Shiraz, Muscat	53	<i>Penicillium</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Alternaria</i> sp., <i>Lasiodiplodia</i> sp., <i>Botryosphaeria</i> sp., <i>Nigrospora</i> sp., <i>Pestalotiopsis</i> sp., e <i>Arcopilus aureus</i> .	Dwivedi e Saxena (2018)

* Total de cepas após 0, 3, 6 e 9 meses de idade das videiras

** Total de cepas isoladas / atividade antibacteriana positiva

*** Cultivar (Cv.)

**** Total de cepas isoladas / espécies identificadas (fungos filamentosos)

A exploração da diversidade de fungos endofíticos tem sido uma das estratégias utilizadas há alguns anos e ainda continua fornecendo descobertas interessantes (Rodríguez *et al.* 2016). Por exemplo, Halleen *et al.* (2003) avaliaram a diversidade de fungos endofíticos já estabelecidos em material de videira mãe aparentemente saudável, antes de ser propagado como porta-enxerto, para o plantio em viveiros. Em seguida, esses autores reexaminaram os fungos encontrados como endofíticos ou patógenos latentes nas plantas aparentemente saudáveis já cultivadas em viveiros comerciais (estacas). Foi observado que alguns fungos endofíticos são propagados do porta-enxerto para a estaca (p.e. *Trichoderma* spp. E *Alternaria* spp.). Enquanto que outros se estabelecem diretamente na estaca, sem que ocorra a propagação pelo porta-enxerto. Os gêneros e espécies de fungos endofíticos das estacas de videiras com a maior frequência de isolamento estão apresentados na Tabela 1. Dentre os fungos endofíticos isolados, alguns gêneros e espécies eram reconhecidamente patogênicos. Fungos dos gênero *Cylindrocarpon* spp., *Phaeoacremonium* spp. e *Phaeomoniella chlamydospora* são causadores das doenças do Pé preto e da doença de Petri em videiras. Dessa forma, os autores puderam demonstrar também que, no momento do isolamento, esses se fungos encontravam como patógenos latentes, uma vez que as estacas amostradas eram saudáveis.

Manejos sustentáveis (orgânico ou biológico) dos vinhedos aumentam a quantidade e a diversidade de fungos endofíticos, além de reduzir os custos envolvidos. Esse fato foi confirmado em trabalhos que estão apresentados na Tabela 1 (Pancher *et al.* 2012; Radic *et al.* 2014; Varanda *et al.* 2016). Nesses trabalhos, os autores determinaram a abundância e diversidade de fungos endofíticos em videiras, ao comparar manejo orgânico e manejo convencional. A diferença na quantidade e diversidade de fungos endofíticos que existem em ambos os manejos pode ser explicada pelos fungicidas normalmente usados. Os fungicidas são aplicados para prevenir doenças como a excoriose, a podridão negra, doença de Petri, mildio e Botrytis, que são comuns em videiras. Para isso, no manejo convencional costuma-se aplicar fosetil-alumínio, folpete, cimoxanil, espiroxamina, ciflufenamida, tebuconazol, oxicloreto de cobre e miclobutanil (Gramaje *et al.* 2009; Bereswill *et al.* 2012; González-Domínguez *et al.* 2009). Enquanto que as substâncias fungicidas utilizadas no cultivo orgânico geralmente são hidróxido de cobre, enxofre e extratos de *Equisetum arvense* e *Saponaria officinalis* (Varanda *et al.* 2016). Os fungicidas do manejo convencional interferem negativamente na composição das comunidades fúngicas em videiras, incluindo a comunidade endofítica. E os fertilizantes usados no manejo orgânicos podem ser fontes de micro-organismos, que podem penetrar na planta, tornando-se endofíticos (Pancher *et al.* 2012).

A influência do cultivar sobre a quantidade e a diversidade de fungos endofíticos em videiras geralmente é menor que a causada pelo tipo de manejo. Essa observação já foi relatada para outras espécies de plantas (Manter *et al.* 2010) e também para videiras. No trabalho de Pancher *et al.* (2012), influência das cultivares Merlot e Chardonnay sobre a comunidade endofítica não foi estatisticamente

significativa. O mesmo ocorreu entre as cultivares Syrah, Cabernet Sauvignon e Aragonez (Varanda *et al.* 2016).

6 Potencial biotecnológico de fungos endofíticos de videiras

Diante do exposto, nota-se que o potencial biotecnológico de fungos endofíticos de videiras tem sido pouco explorado. Ao contrário do que ocorre com fungos endofíticos isolados de outras plantas que têm um impressionante potencial biotecnológico (Liu *et al.* 2019), e cujo número de estudos de *screening* por metabólitos secundários tem crescido (Li *et al.* 2018). Dentre os trabalhos apresentados na Tabela 1, apenas três avaliaram efetivamente o potencial biotecnológico dos fungos endofíticos de videiras (Cueva *et al.* 2011; Rondot e Reineke 2018; Dwibedi e Saxena 2018). Cueva *et al.* (2011) avaliaram a ação antimicrobiana de extratos de fermentação de fungos isolados de ecossistemas de videiras, incluindo os endofíticos, contra quatro bactérias patogênicas de origem alimentar e duas probióticas (*Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus brevis*). Como resultado, 71 fungos produziram extratos ativos contra pelo menos um micro-organismo patogênico, mas não contra bactérias probióticas. A bactéria *S. aureus* (gram-positiva) foi mais suscetível aos extratos do que bactérias gram-negativas. Foram identificados 13 metabólitos considerados de amplo espectro antimicrobiano. Dessa forma, ficou demonstrado que os metabólitos antimicrobianos produzidos por fungos isolados de videiras podem limitar a colonização e deterioração de produtos alimentícios por patógenos de origem alimentar. E ainda, com efeito mínimo sobre as bactérias probióticas. Rondot e Reineke (2018) pesquisaram a atuação do fungo endofítico *B. bassiana* contra a infestação por insetos, como a cochonilha (*Planococcus ficus*) e a cigarrinha da uva (*Empoasca vitis*). Nesse trabalho, os autores estabeleceram o fungo *B. bassiana* como endofítico nas plantas das videiras. Após a inoculação em plantas jovens em estufas, *B. bassiana* sobreviveu no interior de tecidos foliares com sete semanas de idade por, pelo menos, 21 dias. Após a inoculação em plantas maduras, esse micro-organismo foi detectado como endofítico por até cinco semanas, com redução significativa da infestação com *E. vitis*. *Bauveria bassiana* endofítica reduziu a taxa de infestação e o crescimento de *P. ficus*. Dwibedi e Saxena (2018) avaliaram a capacidade de produção de resveratrol por fungos endofíticos de videiras. Resveratrol é um flavonóide polifenólico relacionado a efeitos positivos sobre a redução da progressão de doenças neurológicas, tais como Alzheimer e doença de Parkinson. Também tem sido relacionado ao tratamento de condições isquêmicas e problemas cardiovasculares. Foram isoladas 53 cepas e 29 apresentaram testes positivos para a presença de compostos fenólicos em seus extratos. E *Arcopilus aureus* foi identificado como o maior e mais promissor produtor de resveratrol.

Estudos acerca do potencial biotecnológicos de endofíticos de videiras estão apenas no começo e representam uma ampla área a ser estudada. Nesse sentido, mais foco deve ser dado sobre aplicações biotecnológicas desses micro-organismos em áreas farmacêutica, alimentícia e na agricultura, especialmente no biocontrole (Sebastianes *et al.* 2013). Uma perspectiva pode ser traçada para pesquisas futuras envolvendo especificamente os fungos endofíticos de videiras. Essa perspectiva deve seguir a tendência de diversos trabalhos sobre aplicação biotecnológica de endofíticos isolados de diversas espécies de plantas.

Dessa forma, pesquisas futuras com endofíticos isolados de videira podem abranger a triagem por metabólitos secundários bioativos para descoberta e síntese de novas drogas (Andrade *et al.* 2018). Para isso, os estudos por metabólitos secundários poderão ser direcionados àqueles com atividades antifúngica, antitumoral (Prabukumar *et al.* 2017b), antimicrobiana (Manganyi *et al.* 2018), antiviral (Liu *et al.* 2019), tripanocidal (Ferreira *et al.* 2015), e anti mosquitos vetores (Seetharaman *et al.* 2018). Fungos endofíticos de videiras poderão ser estudados quanto à capacidade de produzirem ácidos orgânicos (Dezam *et al.* 2017) e enzimas (Suryanarayanan *et al.* 2009). Poderão também ser avaliados como agentes de controle biológico contra patógenos transmitidos pelo solo (Zhang *et al.* 2014) e como agentes promotores de crescimento vegetal (Khan *et al.* 2012). Esses micro-organismos poderão ser estudados quanto à capacidade de biorremediação / biodegradação (Bibi *et al.* 2018), à capacidade de biotransformação / biossíntese (Gomes e Takahashi 2016), e à capacidade de ciclagem de nutrientes (Nair e Padmavathy 2014).

Finalmente, fungos endofíticos de videiras poderão ser avaliados quanto ao potencial para aumentar o rendimento de substâncias ativas por linhagens conhecidas. Esse aumento de rendimento poderá ser alcançado explorando a engenharia genética e a regulação metabólica (Knief 2014). A partir daí, pode ser possível a aplicação desses micro-organismos para produção em escala industrial (Wang e Dai, 2011).

7 Conclusões

A partir dessa revisão, nota-se que é grande a diversidade de gêneros e espécies de fungos filamentosos endofíticos isolados de videiras. E pouco se conhece a respeito do potencial biotecnológico desses micro-organismos, e o estudo acerca desse tema está apenas no começo. Portanto, existe um campo relacionado a esse potencial biotecnológico que pode ser investigado, tal como tem ocorrido com endofíticos isolados de diferentes espécies de plantas. No futuro, pode ser possível explorar e utilizar os fungos endofíticos isolados de videiras para diferentes aplicações, desde a triagem de compostos bioativos até o biocontrole e biorremediação. Por fim, ficou demonstrado que as videiras, além de serem uma *commodity* global, também podem ser consideradas fontes importantes de fungos endofíticos.

Conflito de interesse: Nenhum conflito de interesse a declarar.

Referências

- Andrade, H.F., Araújo, L.C.A., Santos, B.S., Paiva, P.M.G., Napoleão, T.H., Correia, M.T.S., Oliveiraa, M.B.M. *et al.* (2018) *Braz J Microbiol* **49**, 59–63. Doi: 10.1016/j.bjm.2018.06.001
- Araújo, W.L., Lima, A.O.S., Azevedo, J.L., Marcon, J., Sobral, J.K. and Lacava, P.T. (2002) *Manual: isolamento de microrganismos endofíticos*. Piracicaba: CALQ.
- Azevedo, J.L. (1998) *Microrganismos endofíticos*. In Ecologia microbiana ed. Melo, I.S. and Azevedo, J.L. pp.117-137. Jaguariuna: Embrapa-CNPMAcap.
- Bereswill, R., Golla, B., Strelake, M. and Schulz, R. (2012) Entry and toxicity of organic pesticides and copper in vineyard streams: Erosion rills jeopardise the efficiency of riparian buffer strips. *Agric Ecosyst Environ* **146**, 81–92. Doi: 10.1016/j.agee.2011.10.010
- Bezerra, J.D.P., Azevedo, J.L. and Souza-Motta, C.M. (2017) *Why study endophytic fungal community associated with cacti species?* In Diversity and benefits of microorganisms from the tropics ed. Azevedo, J.L. and Quecine, M.C. pp. 21-35. New York: Springer
- Bezerra, J.D.P., Santos, M.G.S., Svedese, V.M., Lima, D.M.M., Fernandes, M.J.S., Paiva, L.M. and Souza-Motta, C.M. (2012) Richness of endophytic fungi from *Opuntia ficus-indica* mill (Cactaceae) and preliminary screening for enzyme production. *World J Microbiol Biotechnol* **28**, 1989-1995. Doi:10.1007/s11274-011-1001-2.
- Bibi, S., Hussain, A., Hamayun, M., Rahman, H., Iqbal, A., Shah, M., Irshad, M., Qasim, O., and Islam, B. (2018) Bioremediation of hexavalent chromium by endophytic fungi; safe and improved production of *Lactuca sativa* L. *Chemosphere* **211**, 653-663. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.07.197.
- Botella, L., Diez, J.J. (2011). Phylogenetic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*. *Fungal Divers* **47**, 9-18. Doi: 10.1007/s13225-010-0061-1
- Budhiraja, A., Nepali, K., Sapra, S., Gupta, S., Kumar, S. and Dhar, K.L. (2013) Bioactive metabolites from an endophytic fungus of *Aspergillus* species isolated from seeds of *Gloriosa superba* Linn. *Med Chem Res* **22**, 323–329. Doi: 10.1007/s00044-012-0032-z
- Chiotta, M.L., Ponsone, M.L., Combina, M., Torres, A.M. and Chulze, S.N. (2009) *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from different wine-grape growing regions in Argentina. *Intl J Food Microbiol* **136**,137–141. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.08.013
- Cueva, C., Moreno-Arribas, M.V., Bartolome, B., Salazar, O., Vicente, M.F. and Bills, G.F. (2011) Antibiosis of vineyard ecosystem fungi against food-borne microorganisms. *Res Microbiol* **162**, 1043-1051. Doi: 10.1016/j.resmic.2011.09.002

- Dezam, A.P.G., Vasconcellos, V.M., Lacava, P.T. and Farinas C.S. (2017) Microbial production of organic acids by endophytic fungi. *Biocatal Agric Biotechnol* **11**. Doi: 10.1016/j.bcab.2017.08.001
- Dwibedi, V., Saxena, S. (2018) *Arcopilus aureus*, a Resveratrol-Producing Endophyte from *Vitis vinifera*. *Appl Biochem Biotechnol* **186**, 476-495. Doi.org/10.1007/s12010-018-2755-x
- Farhat, H., Urooj, F., Tariq, A., Sultana, V., Ansari, M., Ahmad, V.U. and Ehteshamul-Haque, S. (2019) Evaluation of antimicrobial potential of endophytic fungi associated with healthy plants and characterization of compounds produced by endophytic *Cephalosporium* and *Fusarium solani*. *Biocatal Agric Biotechnol*. In press. Doi: 10.1016/j.bcab.2019.101043
- Fernandes, E.G., Pereira, O.L., Silva, C.C., Bento, C.B.P., Queiroz, M.V. (2015) Diversity of endophytic fungi in *Glycine max*. *Microbiol Resh* **181**, 84–92. Doi: 10.1016/j.micres.2015.05.010
- Fernandes, M.R.V., Silva, T.A.C., Pfenning, L.H., Costa-Neto, C.M., Heinrich, T.A.; Alencar, S.M., Lima, M.A. and Ikegaki, M. (2009) Biological activities of the fermentation extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* isolated from *Coffea arabica* L. *Braz J Pharm Sci* **45**, 677-685. Doi: 10.1590/S1984-82502009000400010
- Ferreira, M.C., Vieira, M.L.A., Zani, C.Z., Alves, T.M.A., Sales Junior, P.A., Murta, S.M.F., Romanha, A.J., Gil, L.H.V.G., Carvalho, A.G.O., Zilli, J.E., Vital, M.J.S., Rosa, C.A. and Rosa, L.H. (2015) Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). *Biochem Syst Ecol* **59**, 36-44. Doi: 10.1016/j.bse.2014.12.017
- Gomes, D.C. and Takahashi, J.A. (2016) Sequential fungal fermentation-biotransformation process to produce a red pigment from sclerotiorin. *Food Chem* **210**, 355–361. Doi: 10.1016/j.foodchem.2016.04.057
- Gonzaga, L.L., Costa, L.E., Santos, T.T., Araújo, E.F. and Queiroz, M.V. (2014) Endophytic fungi from the genus *Colletotrichum* are abundant in the *Phaseolus vulgaris* and have high genetic diversity. *J Appl Microbiol* **118**, 485–496. Doi: 10.1111/jam.12696
- González-Dominguéz, E., Fedele, G., Languasco, L. and Rossi, V. (2019) Interactions among fungicides applied at different timings for the control of Botrytis bunch rot in grapevine *Crop Prot* **120**, 30–33. Doi: 10.1016/j.cropro.2019.02.009
- Gramaje, D., Aroca, A., Raposo, R., García-Jiménez, and Armengol, J. (2009) Evaluation of fungicides to control Petri disease pathogens in the grapevine propagation process. *Cro Prot* **28**, 1091–1097. Doi: 10.1016/j.cropro.2009.05.010
- Halleen, F., Crous, P.W. and Petrini, O. (2003) Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. *Australas Plant Pathol* **32**, 47–52. Doi: 10.1071/AP02062

- Hanada, R.E., Pomella, A.W.V., Costa, H.S., Bezerra, J.L., Loguercio, L.L. and Pereira, J.O. (2010) Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuaçu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *Fungal Biol* **114**, 91–910. Doi: 10.1016/j.funbio.2010.08.006
- Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S., Berg, G., Pirttilä A.M., Compant, S., Campisano, A., Döring, M. and Sessitsch, A. (2015) The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**, 293–320. Doi:10.1128/MMBR.00050-14.
- Khan, A.L., Hamayun, M., Kang, S.M., Kim, Y.H., Jung, H.Y., Lee, J.H. and Lee, I.J. (2012) Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. *BMC Microbiol* **12**, 3. Doi: 10.1186/1471-2180-12-3
- Khan, A.L., Waqas, M., Hussain, J., AL-Harrasi, A. and Lee, I.J. (2014) Fungal endophyte *Penicillium janthinellum* LK5 can reduce cadmium toxicity in *Solanum lycopersicum* (Sitiens and Rhe). *Biol Fertil Soils* **50**, 75–85. Doi: 10.1007/s00374-013-0833-3
- Kia, S.H., Pallesch, S., Piepenbring, M. and Macia-Vicente, J.G. (2019) Root endophytic fungi show low levels of interspecific competition in planta. *Fungal Ecol* **39**, 184-191. Doi: 10.1016/j.funeco.2019.02.009
- Knief C. (2014) Analysis of plant microbe interactions in the era of next generation sequencing technologies. *Front Plant Sci* **5**, 1-23 Doi .org/10.3389/fpls.2014.00216.
- Klieber, J. and Reineke, A. (2016) The entomopathogen *Beauveria bassiana* has epiphytic and endophytic activity against the tomato leaf miner *Tuta absoluta*. *J Appl Entomol* **140**, 580-589. Doi: 10.1111/jen.12287
- Kusari, S., Hertweck, C. and Spiteller, M. (2012) Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. *Chem Biol* **19**, 792-796. Doi: 10.1016/j.chembiol.2012.06.004
- Lahrmann, U., Ding, Y., Banhara, A., Rath, M., Hajirezaei, M.R., Dohlemann S., von Wirén, N., Parniske, M. and Zuccaro, A. (2013) Host-related metabolic cues affect colonization strategies of a root endophyte. *Proc Nat Acad Sci* **110**, 13965-13970. Doi: 10.1073/pnas.1301653110
- Leonini, L., Moriondo, M., Fila, G., Costafreda-Aumedes, S., Ferrise, R. and Bindi, M. (2018) Late spring frost impacts on future grapevine distribution in Europe. *Field Crops Res* **222**, 197-208. Doi: 10.1016/j.fcr.2017.11.018
- Li, H.Y., Li, D.W., He, C.M., Zhou, Z.P., Mei, T. and Xu, H.M. (2012) Diversity and heavy metal tolerance of endophytic fungi from six dominant plant species in a Pb–Zn mine wasteland in China. *Fungal Ecol* **5**, 309–315. Doi: 10.5846/stxb201105260705

- Li, S., Zhang, X., Wang, X. and Zhao, C. (2018) Novel natural compounds from endophytic fungi with anticancer activity. *Eur J Med Chem* **156**, 316-343. Doi: 10.1016/j.ejmech.2018.07.015
- Liu, S., Jiang, J., Huang, R., Wang, Y., Jiang, B., Zheng, K. and Wu, S. (2019) A new antiviral 14-nordrimane sesquiterpenoid from an endophytic fungus *Phoma* sp. *Phytochem Lett* **29**, 75–78. Doi: 10.1016/j.phytol.2018.11.005
- Lorenzini, M., Simonato, B., Favati, F., Bernardi, P., Sbarbati, A. and Zapparoli, G. (2018) Filamentous fungi associated with natural infection of noble rot on withered grapes. *Int J Food Microbiol* **272**, 83–86. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.004
- Manganyi, M.C., Regnier, T., Kumar, A., Bezuidenhout, C.C. and Ateba, C.N. (2018) Biodiversity and antibacterial screening of endophytic fungi isolated from *Pelargonium sidoides*. *S Afri J Bot* **116**, 192–199. Doi: 10.1016/j.sajb.2018.03.016
- Manter, D.K., Delgado, J.A., Holm, D.G. and Stong, R.A. (2010) Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. *Microb Ecol* **60**, 157–166. Doi: 10.1007/s00248-010-9658-x
- Nair, D.N. and Padmavathy, S. (2014) Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *Sci World J* **2014**, 2-11. Doi:10. 1155/2014/250693
- Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P.E., Longa, C.M.O., Yousaf, L. Pertot, I. and Campisano, A. (2012) Fungal Endophytic Communities in Grapevines (*Vitis vinifera* L.). *Appl Environl Microbiol* **78**, p. 4308–4317. Doi: 10.1128/AEM.07655-11
- Prabukumar, S., Sathishkumar, G., Rajkuberan, C., Gobinath, C., Asad, S., Mohamed, S., Hod hod, M.S., Fuad, A. and Sivaramakrishnan, S. (2017a) Isolation of limonoid compound (Hamisonine) from endophytic fungi *Penicillium oxalicum* LA-1 (KX622790) of *Limonia acidissima* L. for its larvicidal efficacy against LF vector, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Environ Sci Pollut Res.* **24**, 21272–21282. Doi: 10.1007/s11356-017-9770-2
- Prabukumar, S., Sathishkumar, G., Rajkuberan, C., Gobinath, C., Murugan, K. and Sivaramakrishnan, S. (2017b) Isolation and characterization of anticancer flavone chrysin (5, 7- dihydroxy flavone)-producing endophytic fungi from *Passiflora incarnata* L. leaves. *Ann Microbiol* **67**, 321–331. Doi: 10.1007/s13213-017-1263-5
- Qin, S., Xing, K., Jiang, J.H., Xu, L.H., and Li, W.J. (2011) Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**,457–473. Doi:10.1007/s00253-010-2923-6
- Radic , T., Likar, M., Hancevic , K., Bogdanovic , I. and Paskovic , I. (2014) Occurrence of root endophytic fungi in organic versus conventional vineyards on the Croatian coast. *Agricu Ecosyst Environt* **192**, 115-121. Doi:10.1016/j.agee.2014.04.008

- Rodriguez, P., Gonzalez, D. and Giordano, S.R. (2016) Endophytic microorganisms: a source of potentially useful biocatalysts. *J Mol Catal B Enzymc* **133**, 569-581. Doi: 10.1016/j.molcatb.2017.02.013
- Rodriguez, R.J., White Jr., J.F., Arnold, A.E. and Redman, R.S. (2009) Fungal endophytes, diversity and functional roles. *New Phytol* 182:314–330. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x.
- Rondot, Y. and Reineke, A. (2018) Endophytic *Beauveria bassiana* in grapevine *Vitis vinifera* (L.) reduces infestation with piercing-sucking insects. *Biol Control* **116**, 82-89. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2016.10.006
- Sebastianes, F.L.D., RomaO-Dumaresq, A.S., Lacava, P.T., Harakava, R., Azevedo, J.L., de Melo, I.S. and Pizzirani-Kleiner, A.A. (2013). Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangrove forests. *Curr Genet* **59**, 153- 166. Doi: 10.1007/s00294-013-0396-8
- Sebastianes, F.L.S., Cabedo, N., El Aouad, N., Valente, A.M.M.P., Lacava, P.T., Azevedo, J.L., Pizzirani-Kleiner, A.A. and Cortes, D. (2012) 3-hydroxypropionic acid as an antibacterial agent from endophytic fungi *Diaporthe phaseolorum*. *Curr Microbiol* **65**, 622–632. Doi: 10.1007/s00284-012-0206-4
- Seetharaman, P.K., Chandrasekaran, R., Gnanasekar, S., Ghandrakasan, G., Gupta, M., Babu, D. and Sivaperumal, S. (2018) Antimicrobial and larvicidal activity of eco-friendly silver nanoparticles synthesized from endophytic fungi *Phomopsis liquidambaris*. *BiocatalAgricul Biotechnol*. In press. Doi:10.1016/j.bcab.2018.07.006
- Serra, R., Mendonça, C. and Venâncio, A. (2006) Fungi and ochratoxin A detected in healthy grapes for wine production. *Lett Appl Microbiol* **42**, 42–47. Doi: 10.1111/j.1472-765X.2005.01805.x
- Setati, M.E., Jacobson, D., Andong, U. and Bauer, F. (2012) The Vineyard Yeast Microbiome, a Mixed Model Microbial Map. *Plos One* **7**(12), 1-11. Doi:10.1371/journal.pone.0052609
- Singh, S.K., Strobel, G.A., Knighton, W.B., Geary, B., Sears, J. and Ezra, D. (2011) An Endophytic *Phomopsis* sp. Possessing Bioactivity and Fuel Potential with its Volatile Organic Compounds. *Microb Ecol* **61**, 729-7 Doi: 10.1007/s00248-011-9818-7
- Souza, B.S. and Santos, T.T. (2017) Endophytic fungi in economically important plants: ecological aspects, diversity and potential biotechnological applications. *Biotechnol Biodivers* **4**, 113-126. Doi: 10.18067/jbfs.v4i2.121
- Strobel, G. and Daisy, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**(4), p.491-502, 2003.
- Suryanarayanan, T.S., Thirunavukkarasu, N., Govindarajulu, M.B. and Gopalan, V. (2012) Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts. *Fungal Divers* **54**, 19–30. Doi: 10.1007/s13225-012-0168-7

- Toghueo, R.M.K., Zabalgoceazcoa, I., Vázquez de Aldana, B.R. and Boyom, F. (2017) Enzymatic activity of endophytic fungi from the medicinal plants *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* and *Cananga odorata*. *S Afr J Bot* **109**, 146–153. Doi: 10.1016/j.sajb.2016.12.021
- Varanda, C.M.R., Oliveira, M., Materatski, P., Landum, M., Clara, M.I.E. and Felix, M.R.R. (2016) Fungal endophytic communities associated to the phyllosphere of grapevine cultivars under different types of management. *Fungal biol* **120**, 1525-1536. Doi: 10.1016/j.funbio.2016.08.002. Doi:10.1128/AEM.07655-11
- Wang, Y. and Dai, C. (2011) Endophytes: a potential resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. *Ann Microbiol* **61**, 207–215. Doi: 10.1007/s13213-010-0120-6
- Xiang, L., Gong, S., Yang, L., Hao, J., Xue, M., Zeng, F., Zhang, X., Shi, W., Wang, H. and Yu, D. (2015) Biocontrol potential of endophytic fungi in medicinal plants from Wuhan Botanical Garden in China. *Biol Control* **94**, 47-55 Doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.12.002
- Yang, G., Li, P., Meng, L., Xv, K., Dong, F., Qiu, Y., He, L. and Lin, L. (2018) Diversity and communities of culturable endophytic fungi from different tree peonies (geoh herbs and non-geoh herbs), and their biosynthetic potential analysis. *Braz J Microbiol* **49**, 47–58. Doi: 10.1016/j.bjm.2018.06.006
- Zhang, H.W., Song, Y.C. and Tan, R.X. (2006) Biology and chemistry of endophytes. *Nat Prod Rep* **23**, 753–771. Doi: 10.1039/b609472b
- Zhang, Q.H., Zhang, J., Yang, L., Zhang, L., Jiang, D.H., Chen, W.D. and Li, G.Q. (2014) Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. *Biol Control* **72**, 98–108. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2014.02.018
- Zheng, Y., Qiao, X., Miao, C., Liu, K., Chen, Y., Xu, L. and Zhao, L. (2016) Diversity, distribution and biotechnological potential of endophytic fungi. *Ann Microbiol* **66**, 529-542. Doi: 10.1007/s13213-015-1153