



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

LETÍCIA JAMBEIRO BORGES

**EFEITO DA LUMINOSIDADE NA PRODUÇÃO
EXTRACELULAR DE PIGMENTOS POR
*PSEUDOFUSICOCCUM SP. E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
CITOTÓXICA***

Salvador, BA

2021

LETÍCIA JAMBEIRO BORGES

**EFEITO DA LUMINOSIDADE NA PRODUÇÃO
EXTRACELULAR DE PIGMENTOS POR
PSEUDOFUSICOCUM SP. E AVALIAÇÃO DA
*ATIVIDADE CITOTÓXICA***

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Andrés Umsza Guez
Coorientadora: Prof^a Dr^a Samira Abdallah Hanna

Salvador, BA

2021



TERMO DE APROVAÇÃO

LETÍCIA JAMBEIRO BORGES

EFEITO DA LUMINOSIDADE NA PRODUÇÃO EXTRACELLULAR DE PIGMENTOS POR PSEUDOFUSICOCCUFM SP. E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

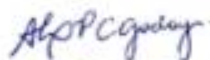
Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (nível Mestrado Acadêmico) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada em 16 de abril de 2021.

BANCA EXAMINADORA



Dr. Marcelo Andrés Umsza Guez
Universidade Federal da Bahia
Orientador



Dr.ª Ana Leonor Pardo Campos Godoy
Universidade Federal da Bahia



Dr.ª Samantha Serra Costa
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Borges, Letícia Jambeiro.

Efeito da luminosidade na produção extracelular de pigmentos por *Pseudofusicoccum* sp. e avaliação da atividade citotóxica / Letícia Jambeiro Borges. - 2021.
66 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Andrés Umsza Guez.

Coorientadora: Profa. Dra. Samira Abdallah Hanna.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Salvador, 2021.

1. Alimentos. 2. Corantes. 3. Pigmentos. 4. Substâncias corantes em alimentos. 5. Luz - Efeito fisiológico. I. Umsza Guez, Marcelo Andrés. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD - 664

CDU - 664

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por estarem sempre presentes na minha vida, dando todo suporte e carinho para que eu consiga alcançar meus objetivos. A minha irmã que me lembra que não sou só nesse mundo e tem o melhor colo de todos.

À minha família (meus jambinhos) que acredita no meu potencial e é a minha base de amor.

Aos meus amigos que compartilham comigo os momentos mais loucos e felizes e também sempre estão prontos para me ouvir quando acontecem os pequenos surtos existenciais. Em especial, Daniel, Carolzinha, Mari por se fazerem sempre presentes.

Ao pessoal do ES, principalmente a prof. Warley Borges, Amanda e Laysa por terem me acolhido e ensinado tanto na minha pequena estadia por lá.

À minha parceira de Laboratório, Bianca, por toda partilha de conhecimento, horas de experimentos e conversas no whatsapp sobre o mestrado e sobre a vida. E aos outros colegas de Laboratório que de alguma forma contribuíram.

Ao meu orientador Marcelo Andrés Umsza Guez por ter me aceitado como orientanda, por todos ensinamentos, oportunidades e por ter tanta paciência quando eu achava que daria tudo errado. E a minha coorientadora Samira Abdallah Hanna por estar sempre disposta a ajudar e orientar nesse processo.

À UFBA, aos docentes, a administração e aos servidores técnicos (em especial, Seu Mário, que sempre se disponibilizou a me ajudar quando necessário) que possibilitam que consigamos realizar nossas atividades da melhor maneira possível.

Ao universo e as forças que regem ele por permitirem que mesmo em meio ao caos essa etapa seja concluída.

Obrigada!

RESUMO

A demanda por produtos naturais seguros tem aumentado ao longo dos anos, o que acarretou no aumento do entusiasmo da indústria alimentícia para a produção de corantes naturais em substituição aos sintéticos, possibilitando suprir as exigências dos consumidores. Assim, o uso de microrganismos como fonte para obtenção de pigmentos passa a ser uma boa alternativa, sendo necessário o desenvolvimento de estudos que analisem as melhores condições para produção, com menores custos e maior rendimento. A luz é um fator ambiental crucial para regular o desenvolvimento e processos fisiológicos na maioria dos organismos. O objetivo deste projeto foi investigar o efeito de diferentes cores de luz (branca, azul, verde, vermelha, amarela e ausência de luz) na produção extracelular de pigmentos pelo fungo *Pseudofusicoccum* sp. isolado da planta *Manilkara* sp. em fermentação submersa e avaliar a atividade citotóxica do extrato de pigmentos em linhagens de células humanas. O fungo foi cultivado em Meio Ágar Sabouraud Dextrose em placas de Petri, incubadas em estufa à 28 °C por 7 dias. O crescimento do fungo *Pseudofusicoccum* sp. não foi estatisticamente afetado durante a incubação em diferentes condições de comprimento de ondas de luz. A produção de pigmentos aumentou de acordo com as diferentes luminosidades, branca<azul<verde<vermelha<ausência de luz<amarela. A produção extracelular de pigmentos foi favorecida sob a influência da luz amarela e ausência de luz (valor de absorbância máximo de 3.56 e 3.03 respectivamente) e o oposto foi observado com luz branca (valor de absorbância máximo de 0.06). O extrato de pigmento não apresentou atividade citotóxica contra as linhagens celulares testadas (HepG2, SCC4, BJ e MRC-5), mostrando potencial para ser utilizado na indústria alimentícia.

Palavras-chave: fungo endofítico, luz, citotoxicidade, colorante natural.

ABSTRACT

The demand for safe natural products has increased over the years, which accelerated the food industry's enthusiasm for the production of natural dyes in substitution to synthetics, making it possible to meet the demands of consumers. Therefore, the use of microorganisms as a source for obtaining pigments becomes a good alternative, requiring the development of studies that analyze the best conditions for production, with lower costs and greater yield. The light is a crucial environmental factor for regulating developmental and physiological processes in most organisms. The fungus was grown on Medium Sabouraud Dextrose Agar in Petri dishes, incubated in an oven at 28 °C for 7 days. The objective of this work was to evaluate the effect of luminosity - darkness and different color light (white, blue, green, red, yellow) - quality on biomass and extracellular pigment yield of *Pseudofusicoccum* sp. in submerged fermentation and to verify the in vitro cytotoxicity of the submerged extract in tumor and normal cell lines. The growth of *Pseudofusicoccum* sp. was statistically not affected by the incubation under different wavelengths of light. Pigment production has increased according to the color of light, white<blue<green<red<darkness<yellow. Extracellular pigment production resulted maximum in yellow light and total darkness (maximum absorbance value of 3.56 and 3.03 respectively) and the opposite was observed in unscreened white light (maximum absorbance value of 0.06). The pigment extract is not cytotoxic against cells lines tested (HepG2, SCC4, BJ and MRC-5), showing potential for use in food industry.

Keywords: endophytic fungi, light, cytotoxicity, natural dye.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I – Revisão de Literatura

Figura 1 – Estrutura, nome e classificação de alguns colorantes naturais.....21

Capítulo II – Effect of luminosity on extracellular pigment production by *Pseudofusicoccum* sp. and cytotoxic activity evaluation

Figura 2 – Principle used to conducted the experiment.....52

Figura 3 – Experimental setup to study the effect of different light source on growth, and extracellular pigment production for *Pseudofusicoccum* sp.....52

Figura 4 – Fungus cultivation in submerged fermentation55

Figura 5 – Effect of different colors of light on pigment production57

Figura 6 – Effect of light on growth58

LISTA DE QUADROS

Capítulo I – Revisão de Literatura

Quadro 1 – Corantes permitidos para uso no Brasil pela indústria alimentícia..17

Quadro 2 – Colorantes naturais produzidos por fungos e suas funções biológicas..... 25

Quadro 3 – Métodos mais comuns para avaliação citotóxica.....28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
Capítulo I	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. Colorantes	15
2.2. Legislação dos colorantes no Brasil.....	16
2.3. Colorante sintético	18
2.4. Colorante natural.....	19
2.5. Colorante de origem microbiológica.....	22
2.6. Colorantes de origem fúngica	23
2.7. Fungo Filamentoso <i>Pseudofusicoccum</i> sp.	25
2.8. Efeito da luz	266
2.9. Citotoxicidade	28
3. REFERÊNCIAS	30
4. OBJETIVOS	43
4.1. Objetivo Geral	43
4.2. Objetivos específicos	43
Capítulo II	44
5. ARTIGO CIENTÍFICO	45
5.1. ABSTRACT:	46
5.2. Introduction	47
5.3. Materials and Methods.....	50
5.3.1. Fungus cultivation	50
5.3.2. Submerged fermentation and pigment extract production.....	50
5.3.3. Effect of light	51
5.3.4. Biomass estimation	52
5.3.5. Cell culture.....	53
5.3.6. Cytotoxicity activity	53
5.3.7. Statistical analysis.....	54
5.4. RESULTS AND DISCUSSION	55
5.4.1. Effect of light in pigment yield.....	55
5.4.2. Effect of light on fungic growth	58
5.4.3. Cytotoxicity assay.....	59
5.5. Conclusion	61
5.6. References	62
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	66

1. INTRODUÇÃO

Colorantes derivados de microrganismos estão continuamente ganhando mercado na indústria, principalmente na de alimentos, por existir uma grande demanda por produtos naturais no mercado atual, devido a uma maior preocupação com a saúde e bem estar. A redução dos custos de produção de colorantes naturais de microrganismos é um dos objetivos da indústria, uma vez que colorantes sintéticos e os extraídos de plantas são geralmente produzidos mais economicamente (SUN et al., 2021).

Muitos aditivos são utilizados pela indústria para a fabricação de produtos, a fim de aumentar a vida útil destes ou para torná-los mais atrativos. A avaliação dos aditivos alimentares no âmbito mundial é baseada no controle das IDAs (Ingestão Diária Aceitável), desenvolvida pelo Comitê de Expertos em Aditivos Alimentares da Organização Mundial da Saúde (OMS)/Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) (FAO/WHO, 2016). Dentre eles, estão os colorantes que são inseridos para conferir cores (MARTINS et al., 2019). Eles podem ser classificados como colorantes naturais ou sintéticos (AMCHOVA et al., 2015).

Os colorantes naturais são considerados menos estáveis que os colorantes sintéticos frente ao calor, oxigênio, pH ou luz. Porém, isto não é verdade para todos os colorantes e condições, alguns corantes naturais in vivo são mais estáveis que os mesmos isolados (GMOSER, 2017). Além disso, a adição de alguns colorantes naturais, podem agregar valor nutricional ao alimento, como é o caso dos Betacarotenos, que enriquecem os alimentos com atividade provitamina A, fortalece o sistema imunológico e diminui a suscetibilidade de doenças degenerativas (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2010). Embora colorantes derivados de microrganismos sejam várias vezes mais caros, eles ainda podem competir com corantes sintéticos por serem naturais e mais seguros (VENIL et al., 2014).

Dentre os pigmentos de microrganismos, uma atenção especial tem sido direcionada aos fungos endofíticos, visto que são mais adequados para a produção de colorantes, pois podem ser cultivados a fim de produzir grandes quantidades de metabólitos e possuem capacidade de utilizar uma grande

variedade de fontes de carbono e nitrogênio como fonte para produção de seus metabólitos, e ainda são produtores potenciais de inúmeros tons de pigmentos (MAPARI et al., 2010).

A biossíntese de pigmentos é diretamente influenciada pelas condições de fermentação, como composição do meio e parâmetros de processo. Na maioria dos organismos, a luz, assim como a temperatura, é um sinal ambiental que influencia a regulação dos processos de desenvolvimento e fisiológicos em microrganismos (BABITHA et al., 2008).

As respostas a luz são mediadas por fotorreceptores capazes de iniciar a transmissão de sinais que podem causar modificações na expressão gênica que codificam enzimas responsáveis pelo crescimento micelial e produção de metabólitos secundários em fungos (ZHENG et al., 2009). Os efeitos da luz já foram investigados em várias espécies de fungos a nível morfológico (MIYAKE et al., 2005), nível molecular, (VELMURUGAN et al., 2010b) e estrutural (BAYRAM et al., 2008). No entanto, pouco se sabe sobre a influência das diferentes cores da luz em meio sintético no crescimento micelar e produção de pigmentos.

Uma das limitações comerciais associadas ao uso de pigmentos fúngicos é a atividade citotóxica de certos metabólitos produzidos (DUFOSSÉ, 2005). Por isso é importante realizar estudos que demonstrem o potencial de toxicidade, a natureza não micotoxigênica do fungo específico utilizado para obter o pigmento, e também a identificação de estrutura química dos metabólitos associados (Hernández et al., 2019). Alguns estudos de citotoxicidade já foram realizados com algumas espécies de fungos endofíticos onde a atividade citotóxica foi verificada contra algumas linhagens de células cancerígenas e sendo atóxico contra células humanas normais, o que possibilita o uso desses compostos na Indústria alimentícia e farmacêutica (SHARMA et al., 2018; XIN et al., 2019).

Assim, o objetivo deste trabalho é investigar o efeito de diferentes luminosidades na produção extracelular de pigmentos pelo fungo *Pseudofusicoccum* sp. isolado da planta *Manilkara* sp. em fermentação submersa e avaliar a atividade citotóxica do extrato de pigmentos em linhagens de células humanas.

O trabalho foi dividido em dois capítulos, no Capítulo I será abordada a revisão de Literatura que embasa o estudo e o Capítulo II é composto pelo Manuscrito a ser submetido em Revista Científica.

CAPÍTULO I

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. COLORANTES

A natureza é rica em cores, como notado em plantas, minerais, microalgas, etc., além disso, elas também podem ser observadas através de muitos microrganismos produtores de pigmentos (fungos, leveduras e bactérias) (DUFOSSE, 2019). As cores sempre fascinaram os humanos e desempenham um papel importante na aceitabilidade de produtos de diversos segmentos industriais, uma vez que os consumidores primeiro julgam a qualidade de um produto por sua cor (WROLSTAD e CULVE, 2012).

Dentre as classes de aditivos utilizados pelas indústrias estão os colorantes ou aditivos de cor, eles são especificamente definidos pela FDA (Food and Drug Administration) como "qualquer corante, pigmento ou substância que, quando adicionado ou aplicado a alimentos, medicamentos ou cosméticos, ou ao corpo humano, é capaz (sozinho ou por meio de reações com outras substâncias) de transmitir cor" (FDA, 2021).

Colorantes incluem os corantes e pigmentos, a diferença entre eles está relacionada a afinidade e a natureza da interação entre o substrato e o colorante (CHRISTIE, 2014).

Corantes são compostos coloridos que têm afinidade por um substrato ao qual são aplicados. Eles interagem com os substratos por meio de vários mecanismos dependendo das propriedades físicas e químicas de ambos. Os corantes são convencionalmente entendidos como referentes a moléculas orgânicas que são facilmente dissolvidas no meio de aplicação, e sua estrutura molecular contém um cromóforo que é responsável pela característica da cor desses compostos (GÜRSES et al., 2016).

Os pigmentos são compostos coloridos que normalmente precisam de um veículo para sua dispersão, eles não possuem afinidade para interagir com os substratos, portanto eles revestem a superfície do substrato através do aglutinante, eles tendem a ser altamente duráveis, termoestáveis, resistentes à solventes, a luz e a migração. Referem-se principalmente a sais e óxidos inorgânicos que geralmente são dispersos em forma de cristal ou em pó no meio aplicado (GÜRSES et al., 2016).

Os colorantes também podem ser classificados de acordo com sua origem (natural ou sintético) e solubilidade (solúvel ou insolúvel) (AMCHOVA et al., 2015). O mercado de colorantes alimentares gira em torno de 1,25 bilhões de dólares, dos quais 40% são de colorantes sintéticos, 28% de colorantes naturais, 20% para colorantes idênticos ao natural e 12% de caramelo. Os colorantes sintéticos têm crescimento anual de 2 a 5% enquanto os naturais têm crescimento anual de 5 a 10% (STRINGHETA, 2007). Pode-se afirmar que o potencial de exportação de colorantes de origem vegetal do Brasil é alto, haja vista que em 2006 houve uma exportação de 2,45 milhões de dólares (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2006).

2.2. LEGISLAÇÃO DOS COLORANTES NO BRASIL

As condições gerais de elaboração, apresentação, classificação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes usado na indústria alimentícia foi estabelecida na Resolução da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) Nº 44, DE 1977, na Legislação Brasileira. É importante que essa Resolução seja sempre atualizada já que muitos dos parâmetros usados para sua elaboração já não são mais válidos na atualidade. Segundo a legislação sanitária vigente, corante é a substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimento (e bebida) (ANVISA, 2021). E a classificação dos corantes se dá da seguinte forma:

- Corante orgânico natural, aquele obtido a partir de vegetal, ou eventualmente, de animal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado;
- Corante orgânico sintético - aquele obtido por síntese orgânica mediante o emprego de processo tecnológico adequado;
- Corante artificial - é o corante orgânico sintético não encontrado em produtos naturais;
- Corante orgânico sintético idêntico ao natural - é o corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural;

- Corante inorgânico - aquele obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados a seu emprego em alimento;
- Caramelo - o corante natural obtido pelo aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão;
- Caramelo (processo amônia) - é o corante orgânico sintético idêntico ao natural, obtido pelo processo amônia, cujo teor de 4-metil-imitazol não deve exceder a 200 mg/kg (duzentos miligramas por quilo), equivalentes a um produto cuja intensidade de cor seja de 20.000 (vinte mil) unidades EGB (European Brewery Convention) correspondente a 0,076 (setenta e seis milésimos) unidades de absorvância, determinada com solução a 0,1% (um décimo por cento) peso por volume, em célula de 1 (um) centímetro a 610 nm.

Atualmente, segundo o Informe Técnico nº. 68/2015 é permitido o uso de 21 corantes orgânicos naturais, 16 corantes artificiais, 4 corantes orgânicos sintéticos idênticos aos naturais e 7 corantes inorgânicos para uso alimentício no Brasil, eles estão listados no quadro 1 abaixo (ANVISA, 2021).

Quadro 1 – Corantes permitidos para uso no Brasil pela indústria alimentícia.

Classificação do corante	Nome do corante
Corantes orgânicos naturais	<ul style="list-style-type: none"> • Cúrcuma, Curcumina • Riboflavina; Riboflavina 5' fosfato de sódio • Carmim, cochonilha, ácido carmínico, sais de Na, K, NH₄ e Ca • Clorofila; Clorofilina; Clorofila cúprica • Clorofilina cúprica, sais de Na e K; Caramelo I – simples; Carvão vegetal • Carotenos: extratos naturais; Urucum, bixina, norbixina, annatto extrato e sais de Na e K • Páprica, capsorubina, capsantina • Licopeno; Beta-apo-8'- carotenal • Ester metílico ou etílico do ácido beta-apo-8' carotenóico • Luteína • Cantaxantina • Vermelho de beterraba, betanina • Antocianinas (defrutadas e hortaliças); Extrato de casca de uva

Corantes artificiais	<ul style="list-style-type: none"> • Tartrazina, laca de Al • Amarelo de quinoleína • Amarelo sunset, amarelo crepúsculo FCF, laca de Al; Azorrubina • Amaranto, bordeaux S, laca de Al • Ponceau 4R, laca de Al • Eritrosina, laca de Al; Vermelho 2G • Vermelho 40, vermelho allura AC, laca de Al • Azul patente V, laca de Al • Indigotina, carmim de índigo, laca de Al • Azul brilhante FCF, laca de Al • Verde rápido FCF, verde indelével, fast green FCF, laca de Al • Negro brilhante BN, negro PN • Marrom HT; Lito I rubina BK
Corantes orgânicos sintéticos idênticos aos naturais	<ul style="list-style-type: none"> • Betacaroteno • Caramelo II – processo sulfito cáustico • Caramelo III – processo amônia • Caramelo IV – processo sulfito-amônia
Corantes inorgânicos	<ul style="list-style-type: none"> • Dióxido de titânio • Óxido de ferro, preto • Óxido de ferro, vermelho • Óxido de ferro, amarelo • Alumínio; Prata; Ouro

Fonte: ANVISA, 2021.

2.3. COLORANTE SINTÉTICO

O primeiro colorante orgânico sintético, Malva (também conhecido como anilina púrpura ou fenamina), foi produzido em 1856, pelo químico inglês William H. Perkin (SOUSA et al. 2008; CAÑAMARES e LOMBARDI 2015). Desde então, com o desenvolvimento da alquimia e da química, vários compostos inorgânicos coloridos foram criados e usados extensivamente como colorantes (ZHANG et al. 2006). Com isso, os colorantes naturais foram rapidamente substituídos por colorantes sintetizados quimicamente no final do século XIX e continuou até o século XX, devido ao seu baixo custo, possibilidade de produção em larga escala, homogeneidade de composição, alta estabilidade, entre outros (BECHTOLD e MUSSAK, 2009).

A maioria dos colorantes artificiais apresenta alta estabilidade frente a luz, oxigênio, calor e pH, uniformidade na cor conferida, alto poder tintorial, isenção de contaminação microbiológica e custo de produção relativamente baixo (WROLSTAD e CULVER, 2012). Em contrapartida, o número de colorantes

artificiais permitidos é cada vez mais reduzido em razão de sua toxicidade relacionada a ingestão maior que a considerada segura, fato que vem aumentando gradativamente a procura por colorantes naturais (PAZMIÑO-DURÁN et al., 2001).

Os métodos de produção e aplicação de colorantes sintéticos possuem alguns desafios ambientais, como poluição de corpos d'água e problemas de saúde ocupacional para os trabalhadores da área de produção. Além disso, os corantes sintéticos dependem dos hidrocarbonetos, que é uma fonte não renovável de produtos químicos para o processo de síntese (NAMBELA et al., 2020).

O número de colorantes artificiais permitidos é cada vez mais reduzido em razão aos riscos à saúde, testes de toxicidade realizados por agências reguladoras, como a *Food and Drug Administration* (FDA), mostraram os efeitos tóxicos desses compostos na dose utilizada pelas indústrias para dar cor a diversas substâncias. Estudos mostram que eles podem causar efeitos toxicológicos adversos (MALIK et al., 2012), como reações alérgicas e intolerância (WANG et al. 2006) e efeito carcinogênico (PAN et al., 2012), e afetam o comportamento das crianças, sendo a hiperatividade o transtorno mais comum quando ingeridos em níveis acima do reconhecido como seguros (MASONE e CHANFORAN, 2015).

Como resultado aos riscos que podem existir envolvendo o uso dos colorantes sintéticos, por esses serem utilizados em muitos alimentos industrializados, podendo acarretar em valores maiores que os permitidos dos índices de Ingestão Diária Aceitável (IDA), a substituição dos mesmos por colorantes naturais passa a despertar o interesse do setor alimentício e dos consumidores, que estão cada vez mais dispostos a pagar mais por “ingredientes mais saudáveis” (TORRES et al., 2016).

2.4. COLORANTE NATURAL

Inicialmente, os colorantes naturais eram usados para colorir tecidos desde os tempos antigos até o século XIX. Os avanços na ciência no campo dos colorantes sintéticos e a rápida industrialização da produção têxtil resultaram na

substituição quase completa de colorantes naturais pelos sintéticos, na segunda metade do século XIX, devido à sua fácil disponibilidade na forma pronta para aplicar, processo de aplicação simples, consistência de tons e melhor propriedades de resistência. Mas, recentemente a consciência ambiental e a maior preocupação com a segurança humana reavivaram o interesse pelos colorantes naturais (SAXENA et al., 2014).

De maneira geral, os colorantes naturais apresentam boa biodegradabilidade, são altamente compatíveis com o meio ambiente devido às suas propriedades antibacteriana, antialérgica e anticancerígena, bem como a sua semelhança com tons naturais (SHAMS-NATERI, 2011; SAXENA et al., 2014). Além de sua aplicação em têxteis, os corantes naturais também são usados na coloração de alimentos, medicamentos, itens de artesanato e brinquedos e no processamento de couro, e muitas das plantas que produzem corantes são usadas como medicamentos em vários sistemas medicinais tradicionais (GÜRSES et al., 2016).

Segundo BOBBIO (1992), os colorantes naturais podem ser divididos em três grupos principais:

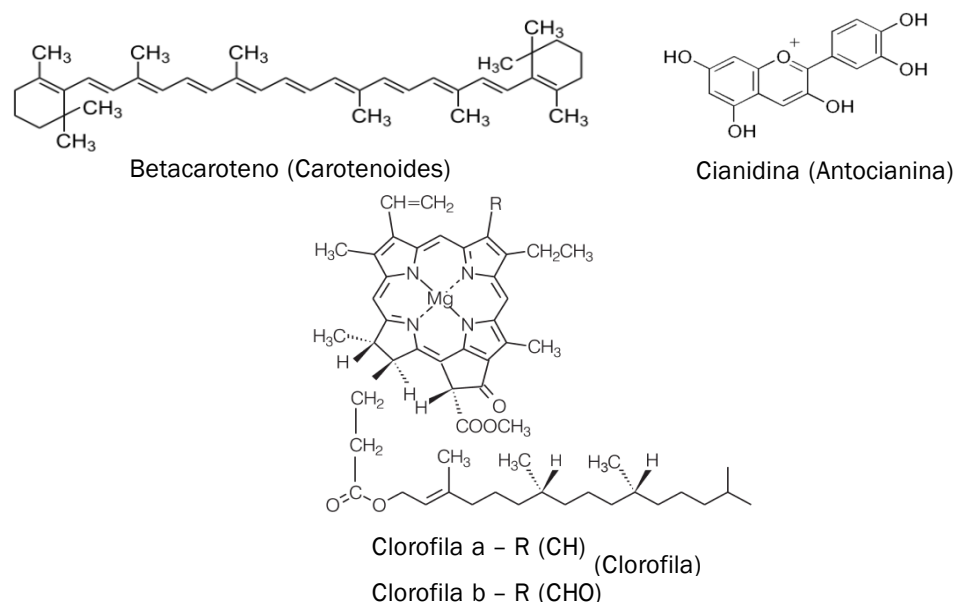
- Os compostos heterocíclicos com estrutura tetra-pirrólica, que compreendem as clorofilas presentes em vegetais, o heme e as bilinas encontradas em animais;
- Os compostos de estrutura isoprenoide, representados pelos carotenoides, encontrados em animais e principalmente em vegetais;
- Os compostos heterocíclicos contendo oxigênio como os flavonoides e antocianinas, que são encontrados exclusivamente em vegetais.

Além desses existem outros dois grupos de corantes presentes unicamente em vegetais: as betalainas que são compostos nitrogenados e os taninos, que agrupam diversos compostos de estruturas altamente variáveis (BOBBIO, 1992). Os principais colorantes naturais usados, como aditivos em alimentos, são oriundos de três categorias de pigmentos: carotenoides, clorofilas e flavonoides, os quais já foram citados por alguns autores como benéficos a diferentes funções do organismo humano (ROCHA; REED, 2014).

A estrutura molecular das clorofilas é constituída por quatro anéis pirrólicos, um átomo central de magnésio ligado a quatro átomos de nitrogênio e uma longa

cadeia lateral de isoprenoide, um álcool fitol esterificado. A clorofila a se caracteriza por apresentar um grupo metil ligado ao carbono 3 do anel 2, enquanto a clorofila b, este grupo metil é substituído por um grupo aldeído (VOLP et al., 2009). Os carotenoides são tetraterpenoides de 40 carbonos unidos por unidades opostas no centro da molécula (FRASER e BRAMLEY, 2004). Todos os diferentes tipos de carotenoides encontrados nos organismos fotossintéticos são moléculas lineares com múltiplas cadeias duplas conjugadas. A cadeia poliênica pode ter de 3 a 15 duplas ligações conjugadas e o comprimento do cromóforo determina o espectro de absorção e a cor da molécula (FRASER & BRAMLEY, 2004). A estrutura química básica das antocianinas é baseada em uma estrutura policíclica de quinze carbonos, derivada do cátion flavílico (LOPES et al., 2007). Na Figura 1 podemos observar as estruturas químicas de alguns desses colorantes naturais.

Figura 1 – Estrutura, nome e classificação de alguns colorantes naturais.



Fonte: ResearchGate.net, 2021.

Os colorantes naturais podem ser obtidos a partir de uma variedade de insetos (DEVEOGLU et al., 2011; SANTOS et al., 2015), plantas (BOO et al., 2012; SHANG et al., 2018), e microrganismos (ASKER et al., 2018; VELMURUGAN; et al., 2010; YANG, et al., 2018). Alguns exemplos de colorantes naturais muito utilizados na área industrial são a curcumina, urucum,

índigo e cochonilha (COSENTINO et al., 2016; GUPTA, 2019; JORDEVA et al., 2020). A comercialização bem-sucedida de pigmentos naturais, como betacaroteno, luteína e astaxantina derivados de algas (fontes não convencionais) (JASWIR et al., 2011) ou extraídos de plantas com flores (fontes convencionais), tanto como colorantes alimentares quanto suplementos nutricionais é decorrente da busca por produtos cada vez mais naturais e seguros (ZHOU et al., 2015).

Os pigmentos de origem natural são amplamente usados na alimentação animal para melhorar o perfil nutricional e como colorante para melhorar a aparência. Por exemplo, a cor da pele das aves, da carne de salmão e do tom das gemas é amplamente determinada pela dieta do animal. Alguns pigmentos possuem potencial antioxidante e propriedades antitumorais (YOO et al., 2016), podendo agregar funcionalidade aos produtos (TORRES et al., 2016). Por exemplo, o grupo do pigmento carotenoide tem atividade antioxidante e provitamina A (SAINÉ, et al., 2015).

A principal desvantagem desses corantes ou pigmentos naturais está relacionada aos seus fatores de rendimento de extração (alguns gramas de pigmento por kg de matéria-prima seca) (MAPARI et al, 2005). Além disso, ao serem extraídos apresentam pouca estabilidade, degradando-se facilmente ao entrar em contato com a luz ou variação de temperatura, o que ocasiona a perda das características funcionais e alteração da cor natural, elevando o custo de obtenção desses, consideravelmente quando comparado aos sintéticos (WROLSTAD e CULVER, 2012).

2.5. COLORANTE DE ORIGEM MICROBIOLÓGICA

O uso de microrganismos como fonte para produção de colorantes naturais surge como uma alternativa interessante, já que têm vantagens em relação a versatilidade e produtividade quando comparada a outras fontes naturais de pigmentos na produção em escala industrial de pigmentos e colorantes naturais (VELMURUGAN, et al., 2010a). Entre as moléculas produzidas por microrganismos estão os carotenóides (*Blakeslea trispora*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Mucor circinelloides*, *Neurospora crassa*), melaninas

(*Saccharomyces neoformans*), flavinas (*Ashbya gossypii*, *Monascus* sp.), fenazinas (*Pseudomonas aeruginosa*), quinonas (*Aspergillus* sp., *Eurotium* sp., *Fusarium* sp., *Dreschlera* sp., *Penicillium* sp.), e monascinas (*Monascus* sp.) (DUFOSSÉ, 2004; 2019; PLONKA e GRABACKA, 2006).

A redução dos custos de produção de colorantes naturais de microrganismos é um dos objetivos da indústria, uma vez que colorantes sintéticos e os extraídos de plantas são geralmente produzidos mais economicamente (DUFOSSÉ, 2016). Embora colorantes produzidos por microrganismos sejam várias vezes mais caros - produção microbiana de Betacaroteno custa aproximadamente 1000 US\$/kg enquanto os sintéticos chegam a 500 US\$/kg - eles ainda podem competir com colorantes sintéticos por serem naturais e seguros (VENIL et al., 2014).

Para derrotar essa restrição, sugere-se explorar a potencialidade de outras fontes biológicas, como fungos, bactérias e culturas de células, uma vez que as técnicas de seleção, mutação ou engenharia genética adequadas podem melhorar significativamente os rendimentos de produção de pigmentos em relação aos organismos selvagens (MAPARI, et al., 2005). Os pigmentos produzidos por microrganismos podem ser obtidos por fermentação submersa, que é uma produção inerentemente mais rápida e produtiva em comparação com qualquer outro processo químico e seus filamentos gênicos são relativamente grandes e facilmente manipulados, o que se torna uma vantagem frente aos colorantes artificiais e inorgânicos (DUFOSSÉ, 2016; MAPARI, et al., 2005). Além disso, alguns colorantes microbianos podem ser produzidos a partir da utilização de resíduos agroindustriais como substrato, o que torna o processo mais favorável em termos financeiro e ambiental (TULI et al., 2015).

2.6. COLORANTES DE ORIGEM FÚNGICA

Dentre os pigmentos de microrganismos, existe um grande interesse voltado aos fungos como potenciais produtores de pigmentos. Uma atenção especial tem sido direcionada a fungos endofíticos, visto que são mais adequados para a produção de colorantes, pois podem ser cultivados a fim de produzir grandes quantidades de metabólitos e possuem capacidade de utilizar

uma grande variedade de fontes de carbono e nitrogênio como fonte para produção de seus metabólitos, e ainda são produtores potenciais de inúmeros tons de pigmentos (EL-HAWARY et al., 2016; DUFOSSE et al., 2014; MAPARI et al., 2010).

Eles colonizam tecidos vegetais saudáveis, tanto inter como intracelularmente, sem causar quaisquer sintomas aparentes de doenças, e podem ser isolados de muitas variedades de plantas e são capazes de produzir pigmentos, dentre eles o pigmento vermelho (GONÇALVES, 2013). Além disso, eles possuem uma ampla diversidade de adaptações microbianas em ambientes especiais e incomuns, tornando-os uma grande fonte de estudo e pesquisa de novas drogas para usos médicos, industriais e agrícolas (DUFOSSÉ, 2016).

Os fungos endofíticos são os mais utilizados para a produção de colorantes (GONÇALVES et al., 2019), conhecidos por produzir uma gama extraordinária de pigmentos que incluem várias classes químicas, como carotenóides, melaninas, azafilonas, flavinas, fenazinas, quinonas e, mais especificamente, monascinas, violaceína e índigo (DUFOSSÉ, 2006).

Muitas funções já foram propostas para explicar porque ocorre a produção de pigmentos por microrganismos, como proteção contra radiação ultravioleta (ROMERO-MARTINEZ et al., 2000), oxidantes (LIU et al., 2005), condições extremas de calor e frio (PAOLO et al., 2006), compostos antimicrobianos produzidos por outros microrganismos (VAN DUIN et al., 2002), entre outras. Entretanto, ainda não há uma explicação concreta do porquê alguns microrganismos pigmentam, entretanto, Liu e Nizet (2009) postularam que a maioria dos pigmentos evoluiu inicialmente como um mecanismo para combater as espécies reativas de oxigênio (ERO) ambientais, mas, com o tempo, esses compostos foram adaptados para servir funções divergentes. Uma maior compreensão desses compostos dirá mais quanto a sua toxicidade e a sua aplicação multifuncional.

Alguns fungos produtores de pigmentos já estudados para uso na produção de colorantes alimentares potenciais são: *Aspergillus*, *Eurotium* e *Fusarium oxysporum* (pigmentos amarelos e vermelhos) (TORRES et al., 2016); *Monascus* (pigmentos policetídeos) (FENG et al., 2012); *Fusarium fujikuroi* (pigmentos vermelhos) (WIEMANN et al., 2009) e laranja (AVALOS e CERDÀ-OLMEDO,

1987); *Talaromyces* (por exemplo, *T. purpurogenus* e *T. atro-roseus* produzindo pigmentos vermelhos) e cepas de *Penicillium*, como *P. citrinum*, *P. islandicum*, *P. aculeatum* e *P. pinophilum* (pigmentos mitorubrina, monascorubrina, monascorubramina) (MAPARI, et al., 2010); *Neurospora intermedia* (carotenoides amarelos e laranjas) (Gmoser et al., 2017). No Quadro 2 abaixo estão listados alguns exemplos de pigmentos produzidos por fungos, suas respectivas cores e suas funções de acordo com suas atividades biológicas.

Quadro 2 – Colorantes naturais produzidos por fungos e funções biológicas.

Molécula	Cor	Fungo	Função biológica	Referência
Antraquinona	Vermelho; Amarelo	<i>Fusarium oxysporum</i>	Agente anticâncer	Zheng et al., 2017
Asperversina	Amarelo; Laranja; Vermelho	<i>Aspergillus versicolor</i>	Agente antifúngico	Miao et al., 2012
<i>Benzoquinona</i>	Vermelho; Roxo	<i>Fusarium</i> sp. JN158	Agente anticâncer	Nagia and El-Moham, 2007
<i>Pigmento vermelho</i>	Vermelho	<i>Talaromyces verruculosus</i>	Agente antimicrobial	Chadni et al., 2017
<i>Antraquinona</i>	Vermelho	<i>Stemphylium lycopersici</i>	Antioxidante	Li et al., 2017
Naftoquinona	Vermelho alaranjado	<i>Gibberella moniliformis</i>	Agente antimicrobial, antiparasitário	Sarang et al., 2017
Hidroantraquinonas	Amarelo	<i>Nigrospora</i> sp. YE3033	Agente antiviral (H1N1)	Zheng et al., 2017

Fonte: Autoria própria, 2021.

2.7. FUNGO FILAMENTOSO *PSEUDOFUSICOCIMUM* SP.

Fungos endofíticos do gênero *Pseudofusicoccum*, podem ser encontrados em todo o território terrestre, nas comunidades naturais e antrópicas, colonizando plantas no Ártico, Antártica, solos geotérmicos, desertos, oceanos, florestas tropicais, mangues e florestas costeiras (JALGAONWALAN, MOHAITE, MAHAJAN, 2011), incluindo plantas da espécie *Manilkara Salzmannii*, localizada na Restinga de Salvador, Bahia. O Gênero *Pseudofusicoccum* foi introduzido por Crous et al. (2006) que o descreveram como intimamente relacionado com *Fusicoccum* e *Neofusicoccum* morfologicamente, mas diferia filogeneticamente de ambos os gêneros. Ele pertence à família Botryosphaeriaceae, Domínio

Eukarya, Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Dothideomycetes e Ordem Botryosphaeriales (SCHOCH et al., 2006).

A família Botryosphaeriaceae tem como características taxonômicas: a largura, o comprimento, a septação, a espessura da parede e coloração de conídios, paráfises e células conidiogênicas, o formato de picnídios - quando identificados com base ao estágio assexuado - e o formato e dimensões de ascos e ascósporos - quando identificados com base no estágio sexuado (SLIPPERS et al., 2017). Esse gênero foi descrito originalmente pela espécie *P. stromaticum*, e hoje possui oito espécies descritas (*P. violaceum*, *P. adansoniae*, *P. kimberleyense*, *P. stromaticum*, *P. olivaceum*, *P. ardesiacum* e *P. artocarpi*; *P. africanum*) que se distinguem principalmente pelas dimensões de seus conídios e pela produção de pigmentos em cultura (SLIPPERS et al., 2013).

No Brasil, espécies de *P. stromaticum* e *P. adansoniae* foram relatadas como endofíticas em espécies arbóreas da Caatinga cearense, porém mostrando-se patogênico quando inoculadas em frutos de manga e plantas de umbu-cajá (*Spondia* sp.) (GONÇALVES et al., 2016), sendo essas espécies anteriormente já relatadas como associadas a cancras e a morte descendente em plantas de mangueira (MARQUES et al., 2011). Estudos com espécies do gênero *Manilkara* indicaram a presença de várias atividades biológicas, como a antimicrobiana (DE BRUM VIEIRA et al., 2016), inseticida (FERNANDES et al., 2014) e antioxidante (PARIKH e PATEL, 2016) que indica o grande potencial biológico de gênero.

2.8. EFEITO DA LUZ

As condições de fermentação, como composição do meio e parâmetros de processo, têm influência direta na produção de pigmentos e desenvolvimento da maioria dos organismos (estresse oxidativo, luz, pH, fontes de nitrogênio e carbono, temperatura, cofatores, surfactantes, oxigênio, intermediários de ácido tricarbóxico) (GMOSER et al., 2017).

A luz, assim como a temperatura, é um sinal ambiental diretamente relacionado com a regulação dos processos de desenvolvimento e fisiológicos, essa regulação é mediada por fotorreceptores em fungos (BABITHA et al., 2008;

VELMURUGAN et al., 2010; ZHENG et al., 2009). Os fungos possuem sistemas de fotorresposta onde receptores fotossensoriais específicos respondem a diferentes comprimentos de onda de luz (GLUKHOVA et al., 2014), sendo que os principais são aqueles fotorreceptores que contêm os cromóforos flavina, retinal e tetrapirrol (FISCHER et al., 2016).

Os efeitos da luz foram investigados em modelos de espécies de fungos como em *Coprinus* (um basidiomiceto), observando-se alterações morfológicas, ou *Phycomyces* (um zigomiceto) (Miyake et al., 2005), a nível molecular, *Neurospora crassa* (um ascomiceto) (Velmurugan et al., 2010b) e suas estruturas produtivas em *A. nidulans* (Bayram et al., 2008). No entanto, pouco se sabe sobre a influência das diferentes cores da luz em meio sintético no seu crescimento e produção de pigmentos.

O fungo *Neurospora crassa* é o mais bem compreendido com base nas funções dos genes de *white collar* (*wc-1* e *wc-2*) no sensor de luz. O complexo *wc-1/wc-2* é um dos mecanismos de entrada de luz envolvidos nesses processos e foi bem documentado por Yager (1998). O gene *wc-1* é um fotorreceptor que responde à luz azul e atua como um fator de transcrição para a frequência e outros genes regulados pela luz em conjunto com *wc-2*, este complexo é modulado pela proteína VIVID (VVD) (HE et al., 2002; RODRIGUEZ-ROMERO et al., 2010).

Alguns metabólitos secundários importantes são regulados pela luz azul. Ela inibe a produção de micotoxinas em *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Alternaria alternata* (fungos fitopatogênicos) (HAGGBLOM et al., 1996; LAUTER, 1979). O pigmento e do *Paecilomyces farinosus* pode se formar em ausência de luz, embora difiram na morfologia e distribuição estudada daquelas formadas na luz (VELMURUGAN et al., 2009). Os efeitos da luz também foram estudados em *Monascus purpureus* e *Emericella nidulans* para a produção de pigmento vermelho solúvel e *Penicillium purpurogenum* foi estudado para a produção de pigmento amarelo (BABITHA et al., 2008). Entretanto ainda faltam estudos sobre o efeito da luz na atividade enzimática ou em qualquer aspecto do metabolismo de fungos, incluindo a produção de pigmentos.

2.9. CITOTOXICIDADE

Uma das limitações comerciais associadas ao uso de pigmentos fúngicos é a natureza tóxica de certos metabólitos fúngicos (DUFOSSÉ et al., 2005). O sucesso de qualquer classe de pigmento produzido por fermentação depende de sua aceitabilidade pelos consumidores, da aprovação regulamentar e do investimento de capital necessário para levar o produto ao mercado, autenticação de qualidade GRAS (Geralmente Reconhecidos como Seguros) pela FDA para a espécie a ser explorada tanto na indústria alimentícia quanto na farmacêutica (DUFOSSÉ et al., 2014; RAO et al., 2017).

A avaliação da toxicidade dos colorantes naturais produzidos por fungos é um dos requisitos para a liberação do uso como colorantes alimentares pelas autoridades regulamentares (DUFOSSÉ et al., 2014). O termo citotoxicidade é comumente usado para se referir ao potencial de um composto para induzir variações no comportamento celular e processos essenciais que subsequentemente desencadeiam a morte celular ou causam uma grande diminuição na sobrevivência celular (NILES e RISS, 2015).

As células são capazes de apresentar respostas específicas em decorrência da exposição a diversos produtos químicos ou estresses físicos, existe um número considerável de ensaios de citotoxicidade in vitro disponíveis (DAMIANI et al., 2019). Atualmente, os pontos principais comuns utilizados para avaliar a citotoxicidade incluem permeabilidade da membrana, conteúdo de metabólitos celulares, funções mitocondriais, funções lisossomais e morte celular (MAHTO et al., 2010). Os métodos mais comuns para avaliar a citotoxicidade estão listados no quadro abaixo (Quadro 3).

Quadro 3 – Métodos mais comuns para avaliação citotóxica.

Parâmetro mensurado	Biomarcador	Método de detecção
Função lisossomal	Vermelho Neutro	Absorbância
	Fosfatase Ácida	Fluorescência
Liberação e conteúdo intracelular	LDH	Absorbância
	Protease	Fluorescência
Condensação de cromatina	DAPI	Fluorescência
Conteúdo metabólico	ATP	Luminescência
Funções mitocondriais	MTT	Absorbância
	XTT	Absorbância

	Alamar Blue	Fluorescência/Absorbância
Apoptose	Caspase 3/7	Fluorescência
	Fragmentação de DNA	Fluorescência

Fonte: Adaptado de Niles et al., 2009.

Os metabólitos secundários produzidos por fungos podem exibir atividades biológicas extensivas, como a citotoxicidade (LI et al., 2014), atividade antiviral (CHEN et al., 1993), antibacteriana (NARUSE et al., 1993) entre outras. As espécies mais promissoras são as que não são micotoxogênicas e não patogênicas aos humanos (GMOSER, et al., 2017).

Estudos elucidaram que várias espécies de fungos endofíticos como *Penicillium* são capazes de produzir metabólitos tóxicos conhecidos como rubratoxina, luteosquirina, islanditoxina, rugulosina, cicloclorotina, eritrosquirina, emodina, ácido espiculispórico e rugulovasina A e B (FRISVAD E THRANE, 2004; MAPARI, et al., 2010) e *Eurotium* spp. e *F. oxysporum* também produzem micotoxinas (CARO et al., 2012). Xiao et al. (2018) mostraram que compostos isolados do fungo endofítico *Aspergillus* sp. são citotóxicos contra a linhagem de células humanas cancerígenas A549. O fungo endofítico *Aspergillus tamarii*, isolados das raízes de *Ficus carica* formou metabólitos secundários com potencial atividade citotóxica contra a linhagem de células humanas cancerígenas, como MCF-7 e A549 (SHARMA et al., 2018). Em um estudo conduzido por Rustamova et al. (2020), as cepas e *Aspergillus* sp. XJA6 e *A. terreus* XJA8 mostraram atividade de citotoxicidade contra as seguintes linhagens de células de câncer humano: Hela (câncer cervical), HT-29 (câncer de cólon).

Assim, torna-se necessário a avaliação de cada espécie de fungo individualmente para possível aplicação de seus compostos como colorante natural, já que se faz necessária a aprovação dos mesmos pelos órgãos reguladores (ANVISA, no Brasil) e para isso eles precisam ser considerados seguros, obedecendo aos valores máximos de IDA (Ingestão Diária Aceitável), que é uma estimativa estipulada pelo Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) da quantidade de aditivos, expresso com base no peso corpóreo, que poderá ser ingerido diariamente, por um período indeterminado, sem causar riscos à saúde (DUFOSSÉ et al., 2014; RAO et al., 2017).

3. REFERÊNCIAS

ABIALA, M. A.; OGUNJOBI, A.A.; ODEBODE, A.C.; AYODELE, M. A. Microbial Control of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet a Notable Pathogen of Bananas and Plantains. **Nature and Science**, v.8, p. 299-305, 2010.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução CNNPA 44. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/RESOLUCAO_CNNPA_44_1977.pdf>. Acesso em: 01 de março de 2021.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Informe técnico n° 68. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Informe+T%C3%A9cnico+n%C2%BA+68%2C+de+3+de+setembro+de+2015>. Acesso em: 01 de março de 2021.

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

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

AVALOS, J.; CERDÀ-OLMEDO, E. Carotenoid mutants of *Gibberella fujikuroi*. **Current genetics**, v. 11, n. 6, p. 505-511, 1987.

BABITHA, S.; CARVAHLO, J. C.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Effect of light on growth, pigment production and culture morphology of *Monascus purpureus* in solid-state fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 2671-2675, 2008.

BAYRAM, Ö.; KRAPPMANN, S.; SEILER, S.; VOGT, N.; BRAUS, G. H. *Neurospora crassa* ve-1 affects asexual conidiation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 2, p. 127-138, 2008.

BECHTOLD, T.; MUSSAK, R. (Ed.). Handbook of natural colorants. **John Wiley & Sons**, 2009.

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

BOONAY, P.; BHANDARI, B.; HOWES, T. Applications of thermal mechanical compression tests in food powder analysis. **International Journal of Food Properties** 1, 127-134, 2006.

CAÑAMARES, M. V.; LOMBARDI, J. R. Raman, SERS, and DFT of mauve dye: adsorption on Ag nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 25, p. 14297-14303, 2015.

CARO, Y.; ANAMALE, L.; FOUILLAUD, M.; LAURENT, P.; PETIT, T.; DUFOSSÉ, L. Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview. **Natural Products and Bioprospecting**. v. 2, n. 5, p. 174-193, 2012.

CHADNI, Z.; RAHAMAN, M. H.; JERIN, I.; HOQUE, K. M. F.; REZA, M. A. Extraction and optimisation of red pigment production as secondary metabolites from *Talaromyces verruculosus* and its potential use in textile industries. **Mycology**, v. 8, n. 1, p. 48-57, 2017.

CHEN, T. S.; DOSS, G. A.; HSU, A.; HSU, A.; LINGHAM, R. B.; WHITE, R. F.; MONAGHAN, R. L. Microbial transformation of L-696, 474, a novel cytochalasin as an inhibitor of HIV-1 protease. **Journal of natural products**, v. 56, n. 5, p. 755-761, 1993.

CHRISTIE, R. **Colour chemistry**. Royal Society of Chemistry, 2014.

COSENTINO, H. M.; TAKINAMI, P. Y. I.; DEL MASTRO, N. L. Comparison of the ionizing radiation effects on cochineal, annatto and turmeric natural dyes. **Radiation Physics and Chemistry**, 124, 208–211, 2016.

DAMIANI, E.; SOLORIO, J. A.; DOYLE, A. P.; WALLACE, H. M. How reliable are in vitro IC50 values? Values vary with cytotoxicity assays in human glioblastoma cells. **Toxicology letters**, v. 302, p. 28-34, 2019.

DEVEOGLU, O.; KARADAG, R.; YURDUN, T. Qualitative hplc determination of main anthraquinone and lake pigment contents from *Dactylopius coccus* dye insect. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 1, p. 103–104, 2011.

DUFOSSÉ L; GALAUP P; YARON A; ARAD S; BLANC P; CHIDAMBARA M; RAV-ISHANKAR G. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 9, p. 389-406, 2005.

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

DUFOSSÉ, L. Current and Potential Natural Pigments From Microorganisms (Bacteria, Yeasts, Fungi, Microalgae). **Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color**, Woodhead Publishing, p. 337-354, 2016.

DUFOSSÉ, L. Microbial pigments from bacteria, yeasts, fungi, and microalgae for the food and feed industries. **Natural and artificial flavoring agents and food dyes**. Academic Press, p. 113-132, 2018.

DUFOSSÉ, L. Pigments, Microbial. **Encyclopedia of Microbiology (Fourth Editio)**. Elsevir Ltd, p. 579-594, 2019.

EL-HAWARY, S. S.; MOHAMMED, R.; ABOUZID, S. F.; BAKEER, W.; EBEL, R.; SAYED, A. M.; RATEB, M. E. Solamargine production by a fungal endophyte of *Solanum nigrum*. **Journal of applied Microbiology**, v. 120, n. 4, p. 900-911, 2016.

FDA, 2020. **Overview of food ingredients, additives & colors**. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/overview-food-ingredients-additives-colors>. (Acesso em 01 març. 2021).

FENG, Yanli; SHAO, Yanchun; CHEN, Fusheng. Monascus pigments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 6, p. 1421-1440, 2012.

FISCHER, R., AGUIRRE, J., HERRERA-ESTRELLA, A., CORROCHANO, L. M. The complexity of fungal vision. **Microbiol. Spectrum**, v. 4, p. 441-461, 2016.

Food and Agriculture Organization of the United Nations World Health Organization, 2016. Codex Alimentarius. General Standard for Food Additives, Codex Stan 192-1995. Disponível em: <http://www.fao.org/gsfaonline/docs/CXS_192e.pdf>. Acesso em: 01 de março 2021.

FRASER, Paul D.; BRAMLEY, Peter M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in lipid research**, v. 43, n. 3, p. 228-265, 2004.

FRISVAD, J. C.; Thrane, U. Mycotoxin production by common filamentous fungi. **Introduction to food-and airborne fungi**, n. Ed. 7, p. 321-331, 2004.

GLUKHOVA, L. B., SOKOLYANSKAYA, L. O., PLOTNIKOV, E. V., GERASIMCHUK, A. L., KARNACHUK, O. V., SOLIOZ, M., KARNACHUK, R. A. Increased mycelial biomass production by *Lentinula edodes* intermittently illuminated by green light emitting diodes. **Biotechnol. Lett.**, v. 36, p. 2283–2289, 2014.

GMOSEK, R.; Ferreira, J. A.; Lennartsson, P. R.; & Taherzadeh, M. J. Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. **Fungal biology and biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 1-25, 2017.

GONÇALVES, B. R. P., MACHADO, B. A. S., HANNA, S. A., & UMSZA-GUEZ, M. A. Prospective Study of Microbial Colorants under the Focus of Patent Documents. **Recent patents on biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 184-193, 2020.

GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, v. 55, n. 1915, p. 235–253, 2006.

GUPTA, V. K. Fundamentals of natural dyes and its application on textile substrates. **Chemistry and technology of natural and synthetic dyes and pigments**, 2019.

GÜRSES, A.; AÇIKYILDIZ, M.; GÜNEŞ, K.; GÜRSES, M. S. Classification of dye and pigments. **Dyes and Pigments**. Springer, Cham, p. 31-45, 2016.

HAGGBLOM, P.; UNESTAM, T. Blue light inhibits mycotoxin production and increases total lipids and pigmentation in *Alternaria alternate*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 38, p. 1074–1077, 1979.

HAMMAMI, C.; RENÉ, F. Determination of freeze-drying process variables for strawberries. **Journal of food engineering**, v. 32, n. 2, p. 133-154, 1997.

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

HE, Q., CHENG, P., YANG, Y., WANG, L., GARDNER, K. H., AND LIU, Y. White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. **Science**, v. 297, p. 840–843 2002.

HERNÁNDEZ, V. A.; MACHUCA, Á.; SAAVEDRA, I.; CHAVEZ, D.; ASTUYA, A.; BARRIGA, C. *Talaromyces australis* and *Penicillium murcianum* pigment production in optimized liquid cultures and evaluation of their cytotoxicity in textile applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 10, p. 1-9, 2019.

JORDEVA, S.; KERTAKOVA, M.; ZHEZHOVA, S.; GOLOMEOVA-LONGUROVA, S.; MOJSOV, K. Dyeing of textiles with natural dyes. **Tekstilna industrija**, v. 68, n. 4, p. 12-21, 2020.

KERR, J.R. Phenazine pigments: Antibiotics and virulence factors. **The Infectious Disease Review**, v. 2, p. 184–194, 2000.

LAUTER, F. Molecular genetics of fungal photobiology. **J. Genet.**, v. 75, p. 375–386, 1996.

LI, DONG-LIL; LI, XIAO-MING; WANG, BIN-GUI. Natural anthraquinone derivatives from a marine mangrove plant-derived endophytic fungus *Eurotium rubrum*: structural elucidation and DPPH radical scavenging activity. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 19, n. 7, p. 675-680, 2009.

LI, H.; XIAO, J.; GAO, Y. Q.; TANG, J. J.; ZHANG, A. L. Chaetoglobosins from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus in *Ginkgo biloba*, and their phytotoxic and cytotoxic activities. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 17, p. 3734-3741, 2014.

LIU, G. Y.; ESSEX, A.; BUCHANAN, J. T.; DATTA, V.; HOFFMAN, H. M.; BASTIAN, J. F.; NIZET, V. *Staphylococcus aureus* golden pigment impairs neutrophil killing and promotes virulence through its antioxidant activity. **The Journal of experimental medicine**, v. 202, n. 2, p. 209-215, 2005.

LOPES, T. J.; XAVIER, M. F.; QUADRI, M. G. N.; QUADRI, M. B. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **R. Bras. Agrobiologia**, Pelotas, v. 13, n. 3, p. 291-297, 2007.

MALIK, K.; TOKKAS, J.; GOYAL, S. Microbial pigments: a review. **Int J Microbial Res Technol**, v. 1, n. 4, p. 361-365, 2012.

MAPARI, S. A., NIELSEN, K. F., LARSEN, T. O., FRISVAD, J. C., MEYER, A. S., & THRANE, U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 231-238, 2005.

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

MARTINS, F. C.; SENTANIN, M. A.; DE SOUZA, D. Analytical methods in food additives determination: Compounds with functional applications. **Food chemistry**, v. 272, p. 732-750, 2019.

MASONE, D.; CHANFORAN, C. Study on the interaction of artificial and natural food colorants with human serum albumin: A computational point of view.

Computational biology and chemistry, v. 56, p. 152-158, 2015.

MAHTO, S. K.; CHANDRA, P.; RHEE, S. W. in vitro models, endpoints and assessment methods for the measurement of cytotoxicity. **Toxicology and environmental health sciences**, v. 2, n. 2, p. 87-93, 2010.

MIAO, F. P.; LI, X. D.; LIU, X. H.; CICHEWICZ, R. H.; JI, N. Y. Secondary metabolites from an algicolous *Aspergillus versicolor* strain. **Marine drugs**, v. 10, n. 1, p. 131-139, 2012.

MIYAKE, T.; MORI, A.; KII, T.; OKUNO, T.; USUI, Y.; SATO, F.; SAMMOTO, H.; WATANABE, A.; KARIYAMA, M. Light effects on cell development and secondary metabolism in *Monascus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 103-108, 2005.

MOUTINHO, I. L. D.; BERTGES, L. C.; ASSIS, R. V. C. Prolonged use of the food dye tartrazine (FD&C yellow n° 5) and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. **Brazilian journal of biology**, v. 67, n. 1, p. 141-145, 2007.

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

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.

NAMBELA, L.; HAULE, L. V.; MGANI, Q. A review on source, chemistry, green synthesis and application of textile colorants. **Journal of Cleaner Production**, v. 246, p. 119036, 2020.

NARUSE, N.; YAMAMOTO, H.; MURATA, S.; SAWADA, Y.; FUKAGAWA, Y.; OKI, T. Aspochalasin E, a new antibiotic isolated from a fungus. **The Journal of antibiotics**, v. 46, n. 4, p. 679-681, 1993.

NILES, A. L.; MORAVEC, R. A.; RISS, T. L. In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening. **Current chemical genomics**, v. 3, p. 33, 2009.

NILES, A.L.; RISS, T.L. Multiplexed viability, cytotoxicity, and caspase activity assays. **Methods Mol. Biol.**, v. 1219, p. 21-33, 2015.

PAN Y.; ZHU Z.; HUANG Z.; WANG H.; LIANG Y.; WANG K.; LEI Q.; LIANG M. Characterisation and free radical scavenging activities of novel red pigment from *Osmanthus fragrans*' seeds. **Food Chemistry**, v. 112, n. 4, p. 909-913, 2009.

PAOLO, W. F.; DADACHOVA, E.; MANDAL, P.; CASADEVALL, A.; SZANISZLO, P. J.; NOSANCHUK, J. D. Effects of disrupting the polyketide synthase gene WdPKS1 in *Wangiella* [*Exophiala*] *dermatitidis* on melanin production and resistance to killing by antifungal compounds, enzymatic degradation, and extremes in temperature. **BMC microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1-16, 2006.

PAZMIÑO-DURÁN, E. A.; GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E.; GLÓRIA, M. B. A. Anthocyanins from *Oxalis triangularis* as potential food colorants. **Food Chem.**, Londres, v. 75, n. 2, p. 211-216, 2001.

PETRINI, O.; STONE, J.; CARROLL, F. E. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.60, p.789-796, 1992.

PLONKA, P.; GRABACKA, M. Melanin synthesis in microorganisms: biotechnological and medical aspects. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, n. 3, 2006.

ROCHA, D. S.; REED, E. Pigmentos naturais em alimentos e sua importância para a saúde. **Estudos**, v. 41, n. 1, p. 76–85, 2014.

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

RODRIGUEZ-ROMERO, J.; HEDTKE, M.; KASTNER, C.; MÜLLER, S.; FISCHER, R. Fungi, hidden in soil or up in the air: Light makes a difference. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 64, p. 585–610, 2010.

ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and Functions of Melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 6, p. 3696-3703, 2000.

SAINI, RAMESH KUMAR; NILE, SHIVRAJ HARIRAM; PARK, SE WON. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Research International**, v. 76, p. 735-750, 2015.

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

SARANG, H.; RAJANI, P.; VASANTHAKUMARI, M. M.; KUMARA, P. M.; SIVA, R.; RAVIKANTH G.; SHAANKER, R. U. An endophytic fungus, *Gibberella moniliformis* from *Lawsonia inermis* L. produces lawsone, an orange-red pigment. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 110, n. 7, p. 853-862, 2017.

SAXENA, S.; RAJA, A. S. M. Natural dyes: sources, chemistry, application and sustainability issues. **Roadmap to sustainable textiles and clothing**. Springer, Singapore, p. 37-80, 2014.

SCHIOZER, A. L.; BARATA, L. E. S. Estabilidade de corantes e pigmentos de origem vegetal. **Revista Fitos**, 2013.

SCHOCH, Conrad L. et al. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. **Mycologia**, v. 98, n. 6, p. 1041-1052, 2006.

SHAMS-NATERI, A. Reusing wastewater of madder natural dye for wool dyeing. **Journal of Cleaner Production**, v. 19, n. 6-7, p. 775-781, 2011.

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

SHARMA, V.; SINGAMANENI, V.; SHARMA, N.; KUMAR, A.; ARORA, D.; KUSHWAHA, M.; BHUSHAN, S.; JAGLAN, S.; GUPTA, P. Valproic acid induces three novel cytotoxic secondary metabolites in *Diaporthe* sp., an endophytic fungus from *Datura innoxia* Mill. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 28, n. 12, p. 2217-2221, 2018.

SHISHIR, M. R. I.; CHEN, W. Trends of spray drying: a critical review on drying of fruit and vegetable juices. **Trends in Food Science & Technology**, v. 65, p. 49-67, 2017.

SINGH, B.; THAKUR, A.; CHADHA, B.S.; KAUR, S.; KAUR, A. Acetylcholinesterase inhibitory potential and insecticidal activity of an endophytic *Alternaria* sp. from *Ricinus communis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.168, p. 991–1002, 2012.

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

SLIPPERS, Bernard et al. Diversity in the *Botryosphaerales*: looking back, looking forward. **Fungal biology**, v. 121, n. 4, p. 307-321, 2017.

SOUSA M.M.; MELO M.J.; PAROLA A.J.; MORRIS P.J.; RZEPA H.S.; DE MELO J.S. A study in mauve: unveiling Perkin's dye in historic samples. **Chemistry–A European Journal**, v. 14, n. 28, p. 8507-8513, 2008.

SUN, Lichao; XIN, Fengjiao; ALPER, Hal S. Bio-synthesis of food additives and colorants-a growing trend in future food. **Biotechnology Advances**, p. 107694, 2021.

TORRES, F. A. E.; ZACCARIM, B. R.; DE LENCASTRE NOVAES, L. C.; JOZALA, A. F.; DOS SANTOS, C. A.; TEIXEIRA, M. F. S.; SANTOS-EBINUMA,

V. C. Natural colorants from filamentous fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2511-2521, 2016.

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

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3394-3400, 2002.

VELMURUGAN, P.; LEE, Y. H.; VENIL, C. K.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; CHAE, J.-C.; OH, B.-T. Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 346-350, 2010.

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

VENIL, C. K.; ARULDASS, C. A.; DUFOSSÉ, L.; ZAKARIA, Z. A.; AHMAD, W.A. Current perspective on bacterial pigments: Emerging sustainable compounds with coloring and 13 biological properties for the industry-an incisive evaluation. **RSC Advances**, v. 4, n. 74, p. 39523–39529, 2014.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos Naturais Bioativos. **Alim. Nutr.**, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

XIAO, W.-J.; CHEN, H.-Q.; WANG, H.; CAI, C.-H.; MEI, W.-L.; DAI, H.-F. New secondary metabolites from the endophytic fungus *Fusarium* sp. HP-2 isolated from “Qi-Nan” agarwood. **Fitoterapia**, v. 130, p. 180–183, 2018.

XIN, X. Q.; CHEN, Y.; ZHANG, H.; LI, Y.; YANG, M. H.; KONG, L. Y. Cytotoxic

seco-cytochalasins from an endophytic *Aspergillus* sp. harbored in *Pinellia ternata* tubers. **Fitoterapia**, v. 132, p. 53-59, 2019.

YAGER, L. N., LEE, H. O., NAGLE, D. L., AND ZIMMERMAN, J. E. Analysis of flu G mutations that affect light-dependent conidiation in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v. 149, p. 177–1786, 1998.

YANG, G.; LI, P.; MENG, L.; LIN, L.; QIU, Y.; DONG, F.; HE, L.; XV, K. Diversity and communities of culturable endophytic fungi from different tree peonies (geoh herbs and nongeoh herbs), and their biosynthetic potential analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 4758, 2018.

YOO, AH YOUNG; ALNAEELI, MAWADDA; PARK, JAE KWEON. Production control and characterization of antibacterial carotenoids from the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AY-01. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 4, p. 463-473, 2016.

WANG H.S.; PAN Y.M.; TANG X.J.; HUANG Z.Q. Isolation and characterization of melanin from *Osmanthus fragrans*' seeds. **LWT-Food Science and Technology**, v. 39, n. 5, p. 496-502, 2006.

WISSGOTT, U.; BORTLIK, K. Prospects for new natural food colorants. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, p.298-302, 1996.

WIEMANN, P.; WILLMANN, A.; STRAETEN, M.; KLEIGREWE, K.; BEYER, M.; HUMPF, H. U.; TUDZYNSKI, B. Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. **Molecular microbiology**, v. 72, n. 4, p. 931-946, 2009.

WROLSTAD, R. E.; CULVER, C. A. Alternatives to those artificial FD&C food colorants. **Annual review of food science and technology**, v. 3, p. 59-77, 2012.

ZHANG H.; ZHAN J.; SU K.; ZHANG Y. A kind of potential food additive produced by *Streptomyces coelicolor*: characteristics of blue pigment and identification of a novel compound, λ -actinorhodin. **Food Chemistry**, v. 95, n. 2, p. 186-192, 2006.

ZHENG, W.; ZHANG, M.; ZHAO, Y.; MIAO, K.; JIANG, H. NMR-based metabonomic analysis on effect of light on production of antioxidant phenolic compounds in submerged cultures of *Inonotus obliquus*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 19, p. 4481-4487, 2009.

ZHENG, L.; CAI, Y.; ZHOU, L.; HUANG, P.; REN, X.; ZUO, A.; LIAO, X. Benzoquinone from *Fusarium* pigment inhibits the proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 cells through the NF- κ B pathway via estrogen receptor signaling. **International journal of molecular medicine**, v. 39, n. 1, p. 39-46, 2017.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito de diferentes cores de luz na produção extracelular de pigmentos pelo fungo *Pseudofusicoccum* sp. isolado da planta *Manilkara* sp. em fermentação submersa e avaliar a atividade citotóxica do extrato de pigmentos em linhagens de células humanas.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o extrato fúngico por fermentação submersa;
- Avaliar o efeito de diferentes cores de luz (branca, vermelha, amarela, azul, verde e na ausência de luz) na produção de pigmentos;
- Avaliar o efeito de diferentes luminosidades no crescimento do fungo *Pseudofusicoccum* sp. *no meio de cultivo*;
- Avaliar a atividade citotóxica do extrato de pigmentos em células HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), SCC4 (carcinoma escamocelular oral humano), BJ (fibroblasto de prepúcio humano) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) obtidas da ATCC (American Type Culture Collection).

CAPÍTULO II

Effect of luminosity on extracellular pigment production by
Pseudofusicoccum sp. and cytotoxic activity evaluation

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo a ser submetido no periódico Journal of Food Sciences

(Fator de impacto: 2.478 – Qualis A3)

**Effect of luminosity on extracellular pigment production by
Pseudofusicoccum sp. and cytotoxic activity evaluation**

Letícia Jambeiro Borges, Bianca Vilas Boas Alves, Samira Abdallah

Hanna, Marcelo Andres Umsza-Guez*

Author Affiliation(s): Authors Borges, Hanna, Alves, Umsza-Guez are with Laboratory of Applied Microbiology of the Health Sciences Institute, Federal University of Bahia, Salvador, Brazil.

Contact information for Corresponding Author: Marcelo Andres Umsza Guez, PhD, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Avenida Reitor Miguel Calmon s/n, Salvador, Bahia State, Brazil, 40110-100. E-mail: marcelo.umsza@ufba.br

5.1. ABSTRACT:

Consumers are increasingly interested in safe natural products, which has accelerated the food industry's enthusiasm for obtaining natural pigments. Therefore, the use of microorganisms to produce pigments has increased. The light is a crucial environmental factor for regulating developmental and physiological processes in most organisms. The fungus was grown on Medium Sabouraud Dextrose Agar in Petri dishes, incubated in an oven at 28 °C for 7 days. The objective of this work was to evaluate the effect of luminosity (darkness and different color light) quality on biomass and extracellular pigment yield of *Pseudofusicoccum* sp. in submerged fermentation and to verify the in vitro cytotoxicity of the submerged extract in tumor and normal cell lines. The growth of *Pseudofusicoccum* sp. was statistically not affected by the incubation under different wavelengths of light. Pigment production has increased according to the color of light, white<blue<green<red<darkness<yellow. Extracellular pigment production resulted maximum in yellow light and total darkness (maximum absorbance value of 3.56 and 3.03 respectively) and the minimum was observed in unscreened white light (maximum absorbance value of 0.06). The pigment extract is not cytotoxic against cells lines tested, showing potential for use in food industry.

Keywords: endophytic fungi, light, cytotoxicity, natural dye.

5.2. INTRODUCTION

The colors are used by the food industry for a long time to make products more attractive to consumers and to cause a good first impression (Martins et al., 2019). The interesting in products that have a composition from natural sources has increased, as a result of the search for human safety and environmental conservation, requiring the development of new studies that makes possible the use of natural sources of colors to replace synthetic dyes (Dufossé, 2019; Velmurugan et al., 2010b).

Natural pigments can be selected from a variety of insects (Santos et al., 2015), plants (Asker et al., 2018), and microorganisms (Velmurugan et al., 2010a; Yang et al., 2018). Microorganisms have advantages of versatility and productivity than other natural sources of pigments in the industrial-scale production of natural pigments and dyes (Velmurugan, et al., 2010a). Pigments produced by microorganisms are obtained by fermentation which is an inherently faster and more productive production compared to any other chemical process and their gene filaments are relatively large and easily manipulated, making their use more advantageous than artificial and inorganic colors (DUFOSSE, 2016; MAPARI, et al., 2005).

Filamentous fungi are a good alternative source of pigments and they are the most used for the production of dyes (Gonçalves et al., 2019). These fungi are known to produce an extraordinary range of pigments that include several chemical classes such as carotenoids, melanins, azaphilones, flavins, phenazines, quinones, and more specifically, monascins, violacein, and indigo (Dufossé, 2006). *Monascus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Neurospora* and *Fusarium* are some species already studied to pigment production (Gmoser et al., 2017).

However, there are no studies about the production of pigments by *Pseudofusicoccum* sp.

One of the commercial limitations associated to the use of fungal pigments is the stability, when extracted, they can be easily degraded when in contact with light or temperature variation, which causes the loss of functional characteristics and alteration of the natural color and the toxic nature of certain fungal metabolites (Dufossé et al. 2005; Wrolstad & Culver, 2012). Its important to conduce studies that show the toxicity potencial, the non-mycotoxigenic nature of the specific fungus, used to obtain the pigment, and the possible chemical structure of the associated metabolites (Hernández et al., 2019). Some cytotoxicity studies have been carried out with endophytic fungi where cytotoxic activity has been verified against some cancer cell lines (Sharma et al., 2018; Xin et al., 2019).

Pigment biosynthesis is directly influenced by fermentation conditions, such as medium composition and process parameters. In most organisms light, like temperature, is a crucial environmental signal for regulating developmental and physiological processes (Babitha et al., 2008). The responses are mediated by light photoreceptors capable of initiating the signal transmission that can cause modifications in the gene expression encoding enzymes responsible for mycelial growth and secondary metabolite productions in fungi (Zheng et al., 2009). The effects of light have been investigated in the model fungal species as morphological in *Coprinus* (a basidiomycete) or *Phycomyces* (a zygomycete) (Miyake et al., 2005), molecular level, *Neurospora crassa* (an ascomycete) (Velmurugan et al., 2010b) and there productive structures in *A. nidulans*

(Bayram et al., 2008). However, little has been known about the influence of different color of light in synthetic medium on its growth and pigment production.

The purpose of this study was to investigate the effect of different color of light on growth and pigment production by *Pseudofusicoccum* sp. isolated from *Manilkara* sp. under submerged fermentation and to evaluate the in vitro cytotoxicity activity of the obtained pigment extract in human cell lines.

5.3. MATERIALS AND METHODS

5.3.1. Fungus cultivation

Pseudofusicoccum sp. was isolated from *Manilkara salzmannii* leaves located in Parque das Dunas in Salvador, Bahia, Brazil (12°56'59" S and 38°20'25" W). The fungal isolate was maintained at the Laboratory of Applied Microbiology and Bioprospecting - LAMAB, located at the Institute of Health Sciences - UFBA. The culture was preserved in Sabouraud Dextrose Agar (SDA) at $28 \pm 2^\circ\text{C}$, in Petri plates and sub-cultured once in every week, according to Petrini et al., (1993).

5.3.2. Submerged fermentation and pigment extract production

The strain was incubated for 7 days in PDA to be used as an inoculum for submerged fermentation. This was conducted according to Abiala, Ogunjobi, Odebode & Ayodele (2010) with some modifications. After the incubation in plates, 3 mycelial agar discs (5mm diameter) were transferred to 100 mL of sterile Sabouraud Dextrose Broth (SDB), pH 8,5 in Erlenmeyer Flasks. To study the effect of different wavelengths of light on the growth and pigment production, the experiment was setup based on the principle that a colored-glass paper allows only its particular color of light to pass through—it filters out the other colors of the spectrum (Figure 2). The flasks were covered in colored glass papers of blue (492–455 nm), green (577– 492 nm), yellow (597–577 nm) or red (780–622 nm) and placed at an illuminated light source inside the incubator installed with light (G-light, 18W) and kept at $28 \pm 2^\circ\text{C}$ for 21 days. To study the effect of keeping

under direct illumination, the flasks were directly kept under light source and for those to study the effect of keeping in total darkness, were covered with aluminum foil at $28 \pm 2^\circ\text{C}$ for 21 days (Figure 2). After the incubation, the submerged fermentation was filtered using common paper filter and then using $0.45 \mu\text{m}$ filter with vacuum pump. The pigment extract and the mycelium were stored in a flask covered with aluminum foil at 4°C for further analysis.

5.3.3. Effect of light

SDB sample was kept as the blank for pigment analysis so that any colored substances from the solid substrate were subtracted from the pigment produced by the fungus. The analysis of pigment was carried out in a spectrophotometer (Multiskan FC – Thermo Scientific). The samples of pigment extracts (produced with different colors light and absence of light) were read at 420, 520 and 620 nm (a wavelength which represents the absorption maxima for yellow, reddish brown and blue pigments, respectively (Figure 2 and 3), taking in to consideration the dilution factor of the sample (Chiu, S W. & Poon, Y. K., 1993). All analyzes were done in duplicate. Pigment yield was expressed as optical density units per gram dry fermented matter multiplied by its dilution factor (Johns, M. R. & Stuart, D. M., 1991) and the absorbance values are converted to color units.

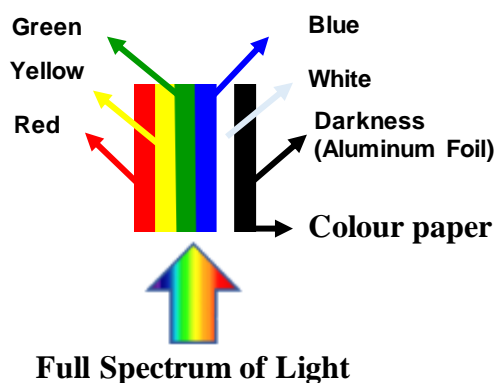


Figure 2. Principle used to conducted the experiment. The flasks were covered in colored glass papers of blue (492–455 nm), green (577– 492 nm), yellow (597–577 nm) or red (780–622 nm) and placed at an illuminated light source inside the incubator installed with light (G-light, 18W) and darkness.



Figure 3. Experimental setup to study the effect of different light source on growth, and extracellular pigment production for *Pseudofusicoccum* sp.

5.3.4. Biomass estimation

The fungal biomass obtained during filtration of the submerged fermentation was washed twice with deionized water followed by drying at 105 °C for 12–15 h

and weighed to yield the biomass. This was conducted according to Velmurugan et al. (2010b).

5.3.5. Cell culture

To the cytotoxicity assay cells HepG2 (human hepatocellular carcinoma), SCC4 (oral human squamous carcinoma), BJ (human foreskin fibroblast) and MRC-5 (human lung fibroblast) obtained from American Type Culture Collection (ATCC) were used. The cells were grown in cell culture bottles (75 cm³, volume of 250 mL), the media used were RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum. The cells were kept in incubators with an atmosphere of 5% CO² at 37 °C. Cell growth was monitored daily using an inversion microscope. The medium was changed whenever the cell growth reached the confluence necessary for nutrient renewal. For the maintenance of adhered cells trypsin (0.25%) was used for the cells to detach themselves from the walls of the bottles. Cell cultures were negative for microplasma, as assessed by Hoechst placement (Mycoplasma Stain Kit, Cat. MYC1, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA).

5.3.6. Cytotoxicity activity

To evaluate the cytotoxicity of the submerged extract, the alamar blue test was performed after 72 hours of exposure with the test substances. Alamar blue, identified as resazurin (O'BRIEN et al., 2000), is a fluorescent/colorimetric indicator with redox properties. As with tetrazolium salts, alamar blue is reduced in proliferating cells. The oxidized form is blue (non-fluorescent/non-viable cell) and a reduced form is pink (fluorescent/viable cell). The reduction in alamar blue reflects cell proliferation. This was used to generate cell growth and/ or viability

in the monitoring of lymphocyte proliferation (AHMED et al., 1994) and currently several applications.

Initially, the samples were diluted in pure sterile DMSO at a concentration of 10mg / mL (for extracts) or 5mg / mL (for pure compounds). The samples were tested in concentrations that ranged from 0.19-50 µg/mL. The cells were plated in 96-well plates (100 µL / well of a 0.7×10^5 cells/mL solution). After 24 hours of incubation, test substances dissolved in DMSO were added to each well and incubated for 72 hours. Doxorubicin was used as a positive control. The lower left control the same amount of DMSO. Four hours (twenty-four hours for PBMC) before the end of the incubation period, 20 µL of the stock solution (0.312 mg/mL) of alamar blue was perfected for each well. Absorbances were measured at wavelengths of 570 nm (reduced) and 595 nm (oxidized) using a plate reader (AHMED et al., 1994). The percentage of inhibition was obtained and the percentage of inhibition x log of the concentration was recorded and its IC₅₀ was determined using non-linear regression using the program Prisma version 5.0 (GraphPad Software). The analyzes were carried out at Fiocruz- Bahia.

5.3.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test, which is a non-parametric test. The significance limit for the statistical analysis resulted in a 95% confidence interval. In addition, multiple comparisons were made to identify whether there was a statistical difference over time in each treatment.

5.4. RESULTS AND DISCUSSION

5.4.1. Effect of light in pigment yield

Filamentous fungi can sense light and use it as a signal to physiological and morphological responses, light plays a key role as a regulator for growth, pigment production, metabolites, asexual and sexual reproduction (Babitha et al., 2008; Rodriguez-Romero et al., 2010). There is still no concrete explanation of why some microorganisms pigment, however, Liu and Nizet (2009) postulated that most pigments evolved initially as a mechanism to combat environmental reactive oxygen species (ROS), but, over time, these compounds have been adapted to serve divergent functions.

The visual difference in Fungus cultivation in submerged fermentation from different luminosities can be seen in the Figure 4.



Figure 4. Fungus cultivation in submerged fermentation. Cultivation in submerged fermentation (SDB) after 21 days of incubation in an oven at 28 ± 2 °C C with different colors of light (green, red, yellow, blue, absence of light and white, respectively from left to right).

The absorption spectra of the pigments from different color light and darkness indicated that pigment composition largely changes depending on the light and its conditions. Incubation in yellow light and total darkness resulted in increased pigments production in the observed spectra (yellow, reddish brown and blue), followed by red, green and blue, the lowest production was white light (Figure 5).

In the analysis of the 420 nm spectrum, maximum absorbance for yellow pigments, a higher production of pigments was observed with yellow light (absorbance value of 1.66) and the lowest production was with unscreened white light (absorbance value of 0.23) (Figure 5a). The same was observed in the 520 nm spectrum (maximum absorbance for reddish brown), where the higher production of pigments was observed with yellow light (absorbance value of 3.56) and the lowest production was with white light (absorbance value of 0.34) (Figure 5b). And in the 620 nm spectrum too, the higher value absorbance was 0.46 (yellow light) and the lowest was 0.06 (white light) (Figure 5c). These results may be associated with a specific receptor for yellow light (Zheng et al., 2009) that causes a greater production of pigments by the fungus, further studies are needed to confirm this. There was observed low production of pigment in the spectrum of maximum absorbance to blue pigment (620 nm) in all conditions when compared with the production observed in 420 nm and 520 nm spectrum (0.46, 1.66 and 3.56 were the maximum absorbance value respectively) (Figure 5).

In a similar study by Velmurugan et al., (2010a), incubation in total darkness resulted in increased pigments too, and it was followed by red, blue, unscreened white light, green and yellow in extracellular pigment yield in all the isolates. The

results are in agreement with Miyake et al., (2005), who reported the variations in the concentration of secondary metabolites (aminobutyric acid, red pigments, monacolin K and citrinin) according to the wavelengths of light. In this study, light intensity was not evaluated, and this factor can be an important variable for future analysis.

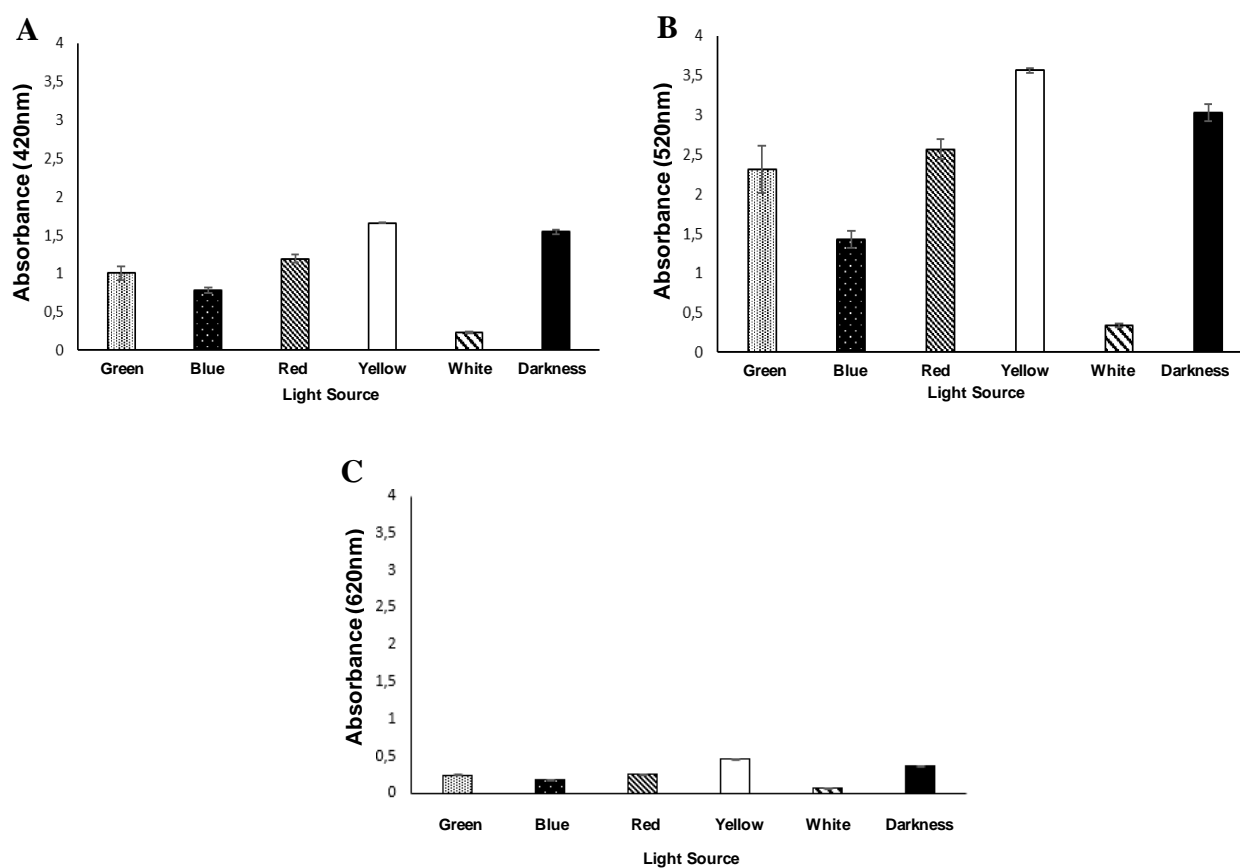


Figure 5. Effect of different colors of light on pigment production. The samples were submitted to different colors clear (yellow, blue, red, green, white and darkness) and analyzed by spectrophotometry (Multiskan FC – Thermo Scientific), wavelength: 420 nm, 520 nm and 620 nm. The error bars represent a 95% confidence limit for the measurements.

5.4.2. Effect of light on fungic growth

The effects of different wavelength of light on the biomass production were assessed by recording the weight of the dry biomass after 21 days of incubation. In submerged culture, there were not many variations in the mycelial biomass weight after 21 days of incubation. The biomass recovered from total darkness showed lower results (2,12 g/100mL) and the higher was from the yellow light (2,85 g/100mL), a difference of 25,5%. (Figure 6).

These results do not corroborate with those found by Palacio-Barrera et al., 2019 in which biomass concentration in blue and green light was also higher. Zheng et al. (2009), studied the influence of light in submerged cultures of *Inonotus obliquus*, the results were that occurred greatest increase of mycelial biomass in red and blue light, which indicates that photoreceptors in *I. obliquus* are able to sense blue and red light and activates signal transduction pathways favorable to mycelial growth in submerged culture conditions. The results showed by Babitha et al. (2008), indicated that the direct illumination favored the growth but under total darkness, there was a reduction in the biomass in *Monascus pupureus* culture.

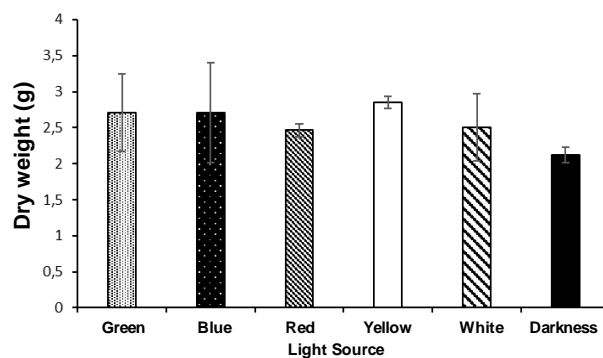


Figure 6. Effect of light on growth. Samples submitted to different lights (yellow, blue, red, green, white and darkness) containing mycelia were

filtered and the separated mycelia were washed twice with deionized water followed by drying at 105 °C for 12–15 h and weighed to yield the biomass. The error bars represent a 95% confidence limit for the measurements.

5.4.3. Cytotoxicity assay

Table 1 shows the IC₅₀ data obtained. According to cytotoxic drug screening program, extracts with IC₅₀ values <30 µg/mL and pure compounds with IC₅₀ <4 µg/mL are considered promising (SUFFNESS & PEZZUTO, 1990; BOIK, 2001). The submerged extract did not show cytotoxic activity at the tested concentrations after 72 hours of exposure with cancer cells lines, HepG2 (human hepatocellular carcinoma), SCC4 (human oral squamous cell carcinoma), and normal cells lines, MRC-5 (human lung fibroblast), and BJ (human foreskin fibroblast) with IC₅₀ > 50 µg/mL. These results are favorable for the potential use of pigments as dyes in the food industry.

In a study conducted by Rustamova et al. (2020), *Aspergillus* sp. XJA6 and *A. terreus* XJA8 strain, showed cytotoxicity activity against the following human cancer cell lines: Hela (cervical cancer), HT-29 (colon cancer) with IC₅₀ of 9.99 ± 0.8 µg/mL and 5.73 ± 0.6 µg/mL, respectively. The pigment compound from *F. chlamydosporum* against exhibited moderate levels of cytotoxicity in cancer cell lines but showed very less cytotoxicity in normal CHOK 1 cells (Soumya et al., 2018). The endophytic fungus *Aspergillus tamaritii* from the roots of *Ficus carica* produced secondary metabolites with potential cytotoxic activity against human cancer cells such as MCF-7 and A549 (Sharma et al., 2018). Compounds from the endophytic fungus *Aspergillus* sp. that were isolated by Xin et al. (2019) are cytotoxic against the A549 cell line.

Table 1 – IC₅₀ values for cytotoxic activity in tumor and non-tumor cell lines. The table shows the IC₅₀ values (mean inhibitory concentration) and the respective 95% confidence interval obtained from three independent experiments.

Samples	IC ₅₀ (µg/mL)			
	HepG2	SCC4	BJ	MRC-5
<i>Pseudofusicoccum</i> sp.	>50	>50	>50	>50
Doxorubicin	0,05	0,13	4,84	2,16
	0,03 - 0,11	0,10 - 0,18	2,94 - 0,86	0,75 - 6,17

HepG2 (human hepatocellular carcinoma), SCC4 (oral human squamous carcinoma), BJ (human foreskin fibroblast) and MRC-5 (human lung fibroblast) obtained from American Type Culture Collection (ATCC).

5.5. Conclusion

In this study, the growth of *Pseudofusicoccum* sp. was not affected by the incubation under different wavelengths of light. Thus, the production of pigments has changed according to the color of light. Incubation in yellow light and total darkness resulted in higher pigments yields, low blue pigment production was observed. The submerged extract did not show cytotoxic activity against the following human cancer cell lines (HepG2, SCC4) and human fibroblast cell lines (BJ and MRC-5). In this study we did not evaluate the effect of light intensity, further analysis is needed to see if this can interfere with pigment production and growth.

Acknowledgments

LJB was supported by the Bahia Research Support Foundation (FAPESB) and BVBA was supported by Coordination on High Education Personnel Improvement (CAPES) fellowships.

Author Contributions

All authors read and approved the final manuscript. LJB - study design, data collection, interpretation of the data, statistical analysis and preparation of this manuscript. BVBA - data collection and technical review. SAH and MAUG - study design, technical review.

Conflicts of Interest

There are no conflicts of interest to declare.

5.6. References

- Abiala, M. A., Ogunjobi, A. A., Odebode, A. C., & Ayodele, M. A. (2010). Microbial control of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet a notable pathogen of bananas and plantains. *Nature and Science*, 8(10), 299-305. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2965.0320>
- Ansar Ahmed, S., Gogal, R. M., & Walsh, J. E. (1994). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*, 170(2), 211–224. doi:10.1016/0022-1759(94)90396-4
- Asker, D., Awad, T. S., Beppu, T., & Ueda, K. (2018). Screening and profiling of natural ketocarotenoids from environmental aquatic bacterial isolates. *Food Chemistry*, 253, 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.066>
- Babitha, S., Carvahlo, J. C., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2008). Effect of light on growth, pigment production and culture morphology of *Monascus purpureus* in solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(11), 2671–2675. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9794-3>
- Dufossé, L. (2019). Pigments, microbial. *Encyclopedia of Microbiology*, June 2016, 579–594. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.13091-2>
- Gonçalves, B. R., Machado, B. A., Hanna, S. A., & Umsza-Guez, M. A. (2020). Prospective Study of Microbial Colorants under the Focus of Patent Documents. *Recent patents on biotechnology*, 14(3), 184-193. <https://doi.org/10.2174/1872208313666191002125035>
- Gmoser, R., Ferreira, J. A., Lennartsson, P. R., & Taherzadeh, M. J. (2017). Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. *Fungal Biology and Biotechnology*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40694-017-0033-2>

- Hernández, V. A., Machuca, Á., Saavedra, I., Chavez, D., Astuya, A., & Barriga, C. (2019). Talaromyces australis and Penicillium murcianum pigment production in optimized liquid cultures and evaluation of their cytotoxicity in textile applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(10), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2738-2>
- Jiao, Y., Li, Z., Loughran, P. A., Fan, E. K., Scott, M. J., Li, Y., Billiar, T. R., Wilson, M. A., Shi, X., & Fan, J. (2017). Frontline Science: Macrophage-derived exosomes promote neutrophil necroptosis following hemorrhagic shock. *Journal of Leukocyte Biology*, jlb.3HI0517-173R. <https://doi.org/10.1189/jlb.3HI0517-173R>
- Martins, F. C. O. L., Sentanin, M. A., & De Souza, D. (2019). Analytical methods in food additives determination: Compounds with functional applications. *Food Chemistry*, 272(April 2018), 732–750. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.060>
- Miyake, T., Mori, A., Kii, T., Okuno, T., Usui, Y., Sato, F., Sammoto, H., Watanabe, A., & Kariyama, M. (2005). Light effects on cell development and secondary metabolism in *Monascus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32(3), 103–108. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0209-2>
- Palacio-Barrera, A. M., Areiza, D., Zapata, P., Atehortúa, L., Correa, C., & Peñuela-Vásquez, M. (2019). Induction of pigment production through media composition, abiotic and biotic factors in two filamentous fungi. *Biotechnology Reports*, 21, 2019–2020. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00308>
- Petrini, O., Sieber, T. N., Toti, L., & Viret, O. (1993). Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*, 1(3), 185–196. <https://doi.org/10.1002/nt.2620010306>

- Rodriguez-Romero, J., Hedtke, M., Kastner, C., Müller, S., & Fischer, R. (2010). Fungi, Hidden in Soil or Up in the Air: Light makes a difference. *Annual Review of Microbiology*, *64*, 585–610. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134000>
- Rustamova, N., Gao, Y., Zhang, Y., & Yili, A. (2020). Biological activity of endophytic fungi from the roots of the medicinal plant *vernonia anthelmintica*. *Microorganisms*, *8*(4), 1–15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040586>
- Santos, R., Hallett, J., Oliveira, M. C., Sousa, M. M., Sarraguça, J., Simmonds, M. S. J., & Nesbitt, M. (2015). HPLC-DAD-MS analysis of colorant and resinous components of lac-dye: A comparison between *Kerria* and *Paratachardina* genera. *Dyes and Pigments*, *118*, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2015.02.024>
- Sharma, V., Singamaneni, V., Sharma, N., Kumar, A., Arora, D., Kushwaha, M., Bhushan, S., Jaglan, S., & Gupta, P. (2018). Valproic acid induces three novel cytotoxic secondary metabolites in *Diaporthe* sp., an endophytic fungus from *Datura innoxia* Mill. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *28*(12), 2217–2221. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.04.018>
- Soumya, K., Narasimha Murthy, K., Sreelatha, G. L., & Tirumale, S. (2018). Characterization of a red pigment from *Fusarium chlamyosporum* exhibiting selective cytotoxicity against human breast cancer MCF-7 cell lines. *Journal of Applied Microbiology*, *125*(1), 148–158. <https://doi.org/10.1111/jam.13756>
- Sun, L., Xin, F., & Alper, H. S. (2021). Bio-synthesis of food additives and colorants-a growing trend in future food. *Biotechnology Advances*, *47*(January), 107694. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107694>
- Velmurugan, P., Kamala-Kannan, S., Balachandar, V., Lakshmanaperumalsamy,

P., Chae, J. C., & Oh, B. T. (2010). Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. *Carbohydrate Polymers*, 79(2), 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.07.058>

Velmurugan, P., Lee, Y. H., Venil, C. K., Lakshmanaperumalsamy, P., Chae, J.-C., & Oh, B.-T. (2010). Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(4), 346–350. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.10.003>

Xin, X. Q., Chen, Y., Zhang, H., Li, Y., Yang, M. H., & Kong, L. Y. (2019). Cytotoxic seco-cytochalasins from an endophytic *Aspergillus* sp. harbored in *Pinellia ternata* tubers. *Fitoterapia*, 132(November 2018), 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2018.11.010>

Wrolstad, R. E., & Culver, C. A. (2012). Alternatives to those artificial FD&C food colorants. *Annual review of food science and technology*, 3, 59-77. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101118>

Yang, G., Li, P., Meng, L., Xv, K., Dong, F., Qiu, Y., He, L., & Lin, L. (2018). Diversity and communities of culturable endophytic fungi from different tree peonies (geoherbs and non-geoherbs), and their biosynthetic potential analysis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.006>

Zheng, W., Zhang, M., Zhao, Y., Miao, K., & Jiang, H. (2009). NMR-based metabonomic analysis on effect of light on production of antioxidant phenolic compounds in submerged cultures of *Inonotus obliquus*. *Bioresource Technology*, 100(19), 4481–4487. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.04.027>

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de pigmentos pelo fungo *Pseudofusicoccum* sp. mudou de acordo com as diferentes cores de luminosidade. A incubação em luz amarela e ausência de luz resultou em maiores rendimentos de pigmentos, foi observada baixa produção de pigmento azul, e o crescimento fúngico não foi afetado pelas diferentes condições. O extrato submerso não mostrou atividade citotóxica contra as seguintes linhas de células de câncer humano (HepG2, SCC4) e linhas de células de fibroblastos humanos (BJ e MRC-5), esse resultado é de suma importância já que um dos requisitos para a aprovação como aditivo alimentar está relacionado com a avaliação da toxicidade.

Neste estudo não avaliamos o efeito da intensidade da luz, assim como a estabilidade dos extratos nas diferentes condições, sendo necessária uma análise mais aprofundada para analisar se esses fatos podem interferir na produção e possível aplicação do fungo na indústria alimentícia.