



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

CAIO DE AZEVEDO LIMA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE
COLORANTES NATURAIS**

**SUMÉ-PB
2018**

CAIO DE AZEVEDO LIMA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE
COLORANTES NATURAIS**

Monografia apresentada ao curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Glauciane Danusa Coelho

**SUMÉ-PB
2018**

L732b Lima, Caio de Azevedo.

Bioprospecção de fungos com potencial para a produção de colorantes naturais. / Caio de Azevedo Lima. - Sumé - PB: [s.n], 2018.

63 f.

Orientadora: Professora Dra. Glauciane Danusa Coelho.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. Bioprospecção de fungos. 2. Metabólicos secundários. 3. Biocorantes. 4. Compostagem I. Título.

CDU: 579(043.1)

Elaboração da Ficha Catalográfica:

Johnny Rodrigues Barbosa
Bibliotecário-Documentalista
CRB-15/626

CAIO DE AZEVEDO LIMA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS COM POTENCIAL PARA A PRODUÇÃO DE
COLORANTES NATURAIS**

Monografia apresentada ao curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

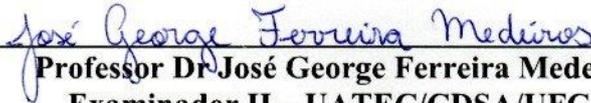
BANCA EXAMINADORA



**Professora Dra. Glauciane Danusa Coelho.
Orientadora – UAEB/CDSA/UFCG**



**Professor Dr. Jean César Farias de Queiroz
Examinador I – UAEB/CDSA/UFCG**



**Professor Dr. José George Ferreira Medeiros
Examinador II – UATEC/CDSA/UFCG**

SUMÉ – PB, _____ de _____

*A Deus força maior,
Aos espíritos benfeitores,
À minha Família: minha mãe Selma,
meu pai Celso,
dedico.*

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar,
Não seremos capazes de resolver os problemas
Causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo
(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

É difícil agradecer a todas as pessoas que de algum modo diretamente ou indiretamente fizeram parte deste ciclo, de muito aprendizado, medos, descobertas e superações. Por isso, aos que eu não lembrar de citar, sintam-se agradecidos também.

Primeiramente agradeço a Deus, causa primeira de todas as coisas, que me permitiu vivenciar essa experiência fabulosa. Gratidão senhor por tudo. Aos meus mentores espirituais e espíritos benfeitores pelas boas energias e influências positivas na minha vida.

Aos meus pais Selma e Celso por tudo que me proporcionaram. Vocês são os alicerces responsáveis por essa conquista e eu sempre serei imensamente grato a vocês. Infelizmente não há palavras para descrever o quanto sou feliz por tudo o que vocês fizeram e fazem por mim. Amo vocês da terra ao céu 100 vezes.

A minhas avós Nena Tunú e Quitéria, minhas tias Cristina, Regina, Simone e Cíntia, minhas primas Mariana e Livia pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

A minha orientadora Profa. Dra. Glauciane, minha segunda mãe, pelo seus conselhos, ajudas, ensinamentos e por sempre estar presente quando necessário, sempre serei grato por tudo que a senhora fez e faz por mim. Admiro como ser humano, profissional e pela pessoa maravilhosa que você é.

A querida Profa. Dra. Adriana Meira Vital, coordenadora do Programa de Ações Sustentáveis para o Cariri (PASCAR), por ter permitido a realização das coletas no tanque de compostagem. Obrigado também pelos conselhos, orientações e toda a sabedoria à mim concebida.

A querida Profa. Dra. Valéria de Carvalho Santos-Ebinuma, pelo conhecimento fornecido durante o estágio necessário para realização deste trabalho. Obrigado pelo acolhimento e carinho.

Aos professores do CDSA, em especial professor Franklin, Arianne, Bruno, Mérgia, Ana Verônica, Aldinete, Fabiana e Jean que me acompanharam durante a graduação, me ajudando a crescer como profissional e ser humano, muito grato por tudo.

Aos meus amigos “Anormais”, em especial meu querido Davi, Andreza, Kamila, Danielle, Tácia, Marco, Rainy e Dayse. Obrigado por todos os momentos que passamos juntos, por todo o amor, por toda paciência, companhia, risadas, farras e palhaçadas.

Aos meus amigos de Tuparetama, em especial Henrique e Érika, meus irmãos de coração, obrigado pelos momentos de desabafo, conselhos, carinho e sinceridade.

As minhas queridas de Sumé, Fernanda, Priscila, Thayse e Dany por terem me acolhido desde o início e me ajudarem em diversos momentos.

Aos meus amigos do “QG” Laura, Elder, Catarina, Darlyson, Canígia, Jéssica, Felipe e Mônica. Obrigado por todos os momentos, por toda a aprendizagem, amizade, sinceridade e companhia.

Aos companheiros do Laboratório de Microbiologia, Renato, Jaqueline e minhas queridas Iracema e Alice, obrigado por me ajudarem neste e em outros trabalhos.

Agradecimento especial a Beatriz, Danielle e Bruno pela ajuda nos experimentos no laboratório.

Aos professores Jean César Farias de Queiroz e José George Ferreira Medeiros por participar da banca examinadora e dividir comigo este momento tão importante e esperado.

RESUMO

A utilização de substâncias para realçar ou colorir produtos se faz presente na vida humana ao longo da história, porém, substâncias sintéticas como os colorantes artificiais tem causado diversos efeitos tóxicos na saúde humana e no meio ambiente. Uma alternativa promissora é a utilização de corantes naturais de origem microbiana que possuem propriedades farmacológicas, como atividade antimicrobiana, antioxidante, imunossupressora, antiviral, anticancerígena, redutora de colesterol. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo reativar os isolados fúngicos da coleção de cultura dos fungos obtidos de um processo de compostagem, identificar a produção de colorantes naturais por esses fungos em meio sólido e conservar os isolados fúngicos pelo método Castellani. Os fungos obtidos foram reativados e a produção de colorantes foi verificada em quatro meios de cultivo diferentes CGA (Caldo glicosado e ágar), BDA (Batata dextrose e ágar), CYA (Meio Czapeck) e YES (Extrato de levedura e sacarose). O meio de cultura utilizado interferiu na cor dos esporos, na tonalidade de corantes difusos e na intensidade de pigmento produzido. Diversos isolados fúngicos produziram corantes difusos nas cores amarelo, marrom e alguns na cor laranja. O isolado C1I3, identificado como sendo pertencente ao gênero *Penicillium*, produziu um intenso metabólito vermelho em meio BDA. Esse trabalho evidencia que a compostagem é uma fonte de microrganismos com potencial para produção de diferentes metabólitos, tais como os colorantes naturais e que o fungo C1I3 é um potencial produtor de colorantes para aplicação industrial.

PALAVRAS CHAVES: Metabólitos secundários. Biocorantes. Compostagem.

BIOPROSPECTION OF FUNGI WITH POTENTIAL FOR THE PRODUCTION OF NATURAL DYES

ABSTRACT

The use of substances to enhance or color products has been present in human life throughout history, however, synthetic substances such as artificial colors have caused various toxic effects on human health and the environment. A promising alternative is the use of natural dyes of microbial origin that have pharmacological properties, such as antimicrobial, antioxidant, immunosuppressive, antiviral, anticancer, cholesterol-lowering activity. The objective of this work was to reactivate the fungal isolates from the fungi culture collection obtained from a composting process, to identify the production of natural dyes by these fungi in a solid medium and to preserve the fungal isolates by the Castellani method. The obtained fungi were reactivated and the dye production was verified in four different culture media CGA (Glucose broth and agar), BDA (Dextrose and agar potato), CYA (Czapeck medium) and YES (yeast extract and sucrose). The culture medium used interfered with the color of the spores, the diffuse dye tonality and the pigment intensity produced. Several fungal isolates produced diffuse dyes in yellow, brown and some in orange. The C113 isolate, identified as belonging to the genus *Penicillium*, produced an intense red metabolite in BDA medium. This work shows that composting is a source of microorganisms with potential for production of different metabolites, such as natural dyes and that C113 fungus is a potential producer of dyes for industrial application.

KEYWORDS: Secondary metabolites. Biocolorants. Composting.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
3.1 CORANTES.....	12
3.1.1 Mercado dos corantes	12
3.1.2 Corantes artificiais.....	12
3.1.3 Corantes naturais	13
3.1.4 Corantes naturais microbianos.....	13
3.2 COMPOSTAGEM	16
3.2.1 Microrganismos na compostagem	16
3.3 DOMÍNIO EUCARYA: FUNGOS	17
3.3.1 Conservação de Colônias Microbianas	18
4 METODOLOGIA	20
4.1 TANQUE DE COMPOSTAGEM.....	20
4.2 REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS	20
4.3 SELEÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE COLORANTES EM MEIO SÓLIDO.....	21
4.3.1 Identificação da produção de colorantes naturais pelos isolados fúngicos	21
4.4 MEIOS DE CULTURA:	21
4.4.1 Meio BDA.....	21
4.4.2 Meio Caldo Glicosado e Ágar (CGA)	21
4.4.3 Meio Czapek (CYA).....	21
4.4.4 Meio YES.....	22
4.4.5 Modo de Preparo	22
4.5 MANUTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS ISOLADOS	22
4.6 IDENTIFICAÇÃO DO MELHOR PRODUTOR DE COLORANTE NATURAL	22
5 RESULTADOS.....	23
5.1 SELEÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS PRODUTORES DE COLORANTES NATURAIS ...	23
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, o ser humano tem utilizado produtos para realçar ou restaurar a aparência dos produtos, principalmente o setor industrial alimentício. Entretanto os corantes sintéticos utilizados nos alimentos são, em grande parte, derivados de petróleo e tem resultado em efeitos colaterais tóxicos prejudiciais à saúde e ao ambiente, o que tem estimulado a busca pela produção dos colorantes naturais. Os colorantes naturais, também conhecidos como biocolorantes, tem atraído crescente atenção, principalmente das indústrias farmacêutica e de alimentos, por apresentar características menos tóxicas e propriedades medicinais (DOWNHAM e COLLINS, 2000; SHARMA et al., 2011; CAROCHO et al., 2014; OPLATOWSKA-STACHOWIAK et al., 2015; AMCHOVA et al., 2015; MARTINS et al., 2016; BALAKRISHNAN et al. 2016; ZHANG, 2016).

Existem diversas fontes biológicas produtoras de colorantes naturais, dentre elas pode-se citar: insetos, vegetais e microrganismos. Os colorantes de origem microbiana, sobretudo os fúngicos, sobressaem-se pela facilidade de produtividade, além de apresentarem propriedades farmacológicas, como atividade antimicrobiana, antioxidante, imunossupressora, antiviral, anticancerígena, redutora de colesterol e aplicação na indústria de alimentos na fabricação de alimentos coloridos naturalmente (MOHARRAM et al., 2012; MONTEIRO, 2016; AKOGOU et al., 2017; GMOSER et al., 2017; CHEN et al., 2017; ADEEL et al., 2018; HUANG et al., 2018).

O fungo do gênero *Monascus* destaca-se por apresentar bons níveis de produção de colorantes. No entanto, a aplicação desse gênero é limitada, pois além de produzir colorantes também produz micotoxinas, de modo que alguns países proíbem o emprego do colorante produzido por esse microrganismo (KONGRUANG, 2011). Desta forma, outras linhagens tem sido alvo de estudos na produção de colorantes (BOONYAPRANAI et al., 2008; SANTOS-EBINUMA et al., 2013b; DUFOSSE et al., 2014; YILMAZ et al., 2014; ZACCARIM et al., 2018).

A busca por espécies fúngicas produtoras de colorantes naturais tem sido intensificada, nesse sentido fontes ricas em comunidades microbianas produtoras de biomoléculas apresentam-se como uma oportunidade para descoberta de novas linhagens com potencial de produção dos biocolorantes. Dentre essas fontes de microrganismos, a compostagem representa uma alternativa pois consiste em um processo biológico de degradação de matéria orgânica, rica em microrganismos tais como fungos. Espécies já identificadas em processos de

compostagem pertencem aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* (ANTONELLA et al., 2005; OLIVEIRA FILHO et al., 2018; WANG et al., 2018; HASHEMI et al., 2018).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi identificar a produção de colorantes naturais por fungos isolados de um processo de compostagem.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar a seleção dos isolados fúngicos em diferentes meios de cultivo sólido.

Reativar a coleção de cultura dos fungos isolados de um processo de compostagem e conservados pelo método Castellani

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CORANTES

A cor torna a vida humana mais fascinante, pois é um dos elementos básicos da natureza no mundo. Corantes de plantas, animais e minerais têm sido utilizados como fontes primárias para a coloração de substâncias desde a antiguidade. Os consumidores têm fascínio pelas cores e julgam inicialmente a qualidade de um produto pela cor que apresenta, principalmente nos alimentos. Isso porque a cor natural ajuda a treinar o cérebro a reconhecer alimentos aceitáveis e seguros. Outrossim, com o passar dos anos, o setor industrial, especialmente o alimentício, tem utilizado produtos para realçar ou restaurar a aparência dos produtos e garantir qualidade (GOLVEIA et al., 2007; MAGOULAS, 2009; SHINDY, 2016).

Os corantes podem ser definidos como compostos coloridos que mostram uma afinidade em relação ao substrato ao qual estão sendo aplicados e tem a finalidade de conferir cor a uma determinada substância ou produto. Podem ser classificados com base na estrutura, fonte, espectro, solubilidade e métodos de aplicação (GÜRSES et al., 2016; RATHER et al., 2018).

3.1.1 Mercado dos corantes

O mercado para aplicação de colorantes naturais produzidos por bioprocessos é difícil de ser estimado; apesar de existir preferência crescente por aditivos naturais em alimentos e cosméticos, no entanto, a via de produção natural pode ser, em alguns casos, 10 vezes mais cara que a via sintética (MAPARI et al., 2010). Em relação ao mercado de colorantes naturais, uma pesquisa realizada pela *Grand View Research, Inc.* estima o mercado de mundial de colorantes para 2025 de US\$ 37,49 bilhões. Especificamente para o mercado de alimentos, um artigo publicado pelo mesmo instituto, estima um mercado de US\$ 1,79 bilhão para 2016, com uma taxa composta de crescimento anual (CAGR, do inglês “*Compound Annual Growth rate*”) de 5,9% em relação ao período de 2018 a 2025. Nesse crescimento, o mercado dos colorantes naturais é o que mais crescerá segundo a mesma pesquisa (GRAND VIEW RESEARCH, 2018)

3.1.2 Corantes artificiais

Os corantes artificiais são amplamente utilizados, na indústria alimentícia possuem o intuito de restaurar e melhorar a cor do alimento que é perdida durante o processamento e armazenamento, bem como de minimizar variações de cor entre diferentes lotes, além de colorir alimentos incolores tornando-os mais atrativos para os consumidores (KOBYLEWSKI; JACOBSON, 2012).

No início da aplicação de corantes artificiais, não havia regulamentação quanto ao uso ou pureza dessas substâncias. No entanto, atualmente tem-se verificado efeitos colaterais

tóxicos prejudiciais causados pelos corantes artificiais, tais como: efeitos cancerígenos, mutagênicos, alergênicos, além de causar asma e hiperatividade. Arelado a isso, a maioria dos corantes artificiais são oriundos do refinamento do petróleo, que é um combustível não renovável e um dos maiores causadores da poluição mundial. Desta forma, a utilização de corantes artificiais resulta em diversos problemas na saúde e no meio ambiente (TANAKA, 1996; TANAKA, 2006; HAYDER et al., 2011; SHARMA et al., 2011; CAROCHO et al., 2014; AMCHOVA et al., 2015; MARTINS et al., 2016; BALAKRISHNAN et al. 2016; ZHANG, 2016).

3.1.3 Corantes naturais

Os colorantes naturais podem advir de diversas fontes biológicas produtoras, dentre elas pode-se citar: insetos (ADEEL et al., 2018), vegetais (AKOGOU et al., 2017) e microrganismos (GMOSEK et al., 2017; ZACCARIM et al., 2018). O uso desses colorantes de origem animal e vegetal é autorizado em alguns países, principalmente na Europa, para aplicação em alimentos (MAPARI et al., 2010). Apesar de haver um grande número de pigmentos naturais, apenas poucos são produzidos em quantidade suficiente para serem utilizados na indústria, porque são usualmente extraídos de plantas (LAURO, 1991; CHO et al., 2002b). De forma característica, prevalecem cinco colorantes naturais considerados de maior importância no mercado mundial: o urucum, a páprica, a cúrcuma, as antocianinas e o carmim de cochonilha (CONSTANT et al., 2002).

3.1.4 Corantes naturais microbianos

Os microrganismos são produtores de diversas moléculas, tais como carotenoides, melaninas, flavinas, quinonas monascinas, violaceinas, ficocianinas ou índigo. Porém, existem diversos passos a serem percorridos desde a produção dos colorantes *in vitro* até a chegada aos mercados. O colorante mais antigo que está em uso é o *angkak* ou koji vermelho, arroz transformado pelo fungo *Monascus*, usado na Ásia por séculos como colorante de alimentos para vinho de arroz e queijo de soja vermelho, produtos de carne e de peixes. A primeira história de sucesso na Europa na produção de pigmentos por microrganismos foi a utilização do fungo *Blakeslea* para a produção de β -caroteno (DUFOSSE et al., 2005).

Dentre os microrganismos, os fungos produzem enorme quantidade de metabólitos secundários que são importantes na indústria, inclusive na de colorantes. O fungo *Monascus purpureus* tem sido utilizado há anos na produção de pigmentos vermelhos (GHORAI et al., 2009). Muitos colorantes com características não carotenoides são produzidos por fungos, assim como quinonas, como antraquinonas e naftoquinonas, di-hidroxi-naftaleno melanina (um agregado complexo de policetídeos) e componentes flavina, como riboflavina. Os colorantes

vermelhos são metabólitos extracelulares da classe das antraquinonas e podem ser produzidos por uma variedade de *Penicillium oxalicum* (MAPARI et al., 2010).

O fungo do gênero *Monascus* destaca-se por apresentar bons níveis de produção de colorantes. No entanto, a aplicação desse gênero é limitada, pois além de produzir colorantes também produz micotoxinas o que torna o emprego proibido em alguns países (KONGRUANG; GROWT, 2011). Desta forma, outras linhagens tem sido alvo de estudos na produção de colorantes, tais como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Fusarium* e *Talaromyces*. A espécie *Talaromyces amestolkiae* tem despertado interesse pelo potencial de produção de colorantes amarelos, laranjas e vermelhos (BOONYAPRANAI et al., 2008; DUFOSSE et al., 2014; YILMAZ et al., 2014; ZACCARIM et al., 2018).

Em contraste com as plantas e animais, os microrganismos são mais promissores para produção biotecnológica, pois podem ser cultivados usando técnicas de cultivo submerso ou semi-sólido; O desenvolvimento de espécies vegetais superiores é mais lento que o de microrganismos e algas; estes não apresentam problema de sazonalidade, tem crescimento pode ser relativamente rápido (JACOBSON; WASILESKI, 1994) e a manipulação de seus genes é mais simples (VELMURUGAN et al., 2010b) (WISSGOTT; BORTLIK, 1996; SANTOS-EBINUMA et al., 2013a). A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de colorantes produzidos por microrganismos.

Os colorantes obtidos a partir de microrganismos têm ganhado atenção nas indústrias de alimentos na Europa e nos Estados Unidos devido à estabilidade e à possibilidade de aumento de escala (MAPARI et al., 2006). Segundo Cho et al (2002a) a produção a partir de microrganismos é vantajosa do ponto de visto econômico e prático. Ademais, os colorantes de origem microbiana, sobretudo os fúngicos, sobressaem-se pela facilidade de produtividade, pelas propriedades farmacológicas, como atividade antimicrobiana, antioxidante, imunossupressora, antiviral, anticancerígena, redutora de colesterol, além da aplicação na indústria alimentícia para a produção de alimentos coloridos naturalmente (MOHARRAM et al., 2012; MONTEIRO, 2016; AKOGOU et al., 2017; GMOSER et al., 2017; CHEN et al., 2017; ADEEL et al., 2018; HUANG et al., 2018).

Tabela 1 - Produção de colorantes naturais microbianos

Molécula	Cor	Microrganismo	Situação¹
Anthraquinona	Vermelhos	<i>Penicillium oxalicum</i>	PI
Astaxantina	Vermelhos- rosa	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> ² , <i>Phaffia rhodozyma</i>	ED
Astaxantina	Vermelhos-rosa	<i>Agrobacterium aurantiacum</i> ³	PP
Astaxantina	Vermelhos-rosa	<i>Paracoccus carotinifaciens</i> ³	PP
Cantaxantina	Vermelhos escuro	<i>Bradyrhizobium spp</i> ³	PP
Licopeno	Vermelhos	<i>Blakeslea trispora</i> ⁴	ED
Licopeno	Vermelhos	<i>Fusarium sporotrichioides</i> ⁴	PP
Melanina	Preto	<i>Saccharomyces neoformans</i> var. <i>nigricans</i> ²	PP
Monascorubramina	Vermelhos	<i>Monascus spp</i> ²	PI
Naphtoquinona	Vermelhos sangue	<i>Cordyceps unilateralis</i> ⁴	PP
Riboflavina	Amarelos	<i>Ashbya gossypi</i> ⁴	PI
Rubrolone	Vermelhos	<i>Streptomyces echinoruber</i> ³	ED
Rubropunctatina	Laranjas	<i>Monascus spp</i> ⁴	PI
Torularodina	Laranjas-vermelhos	<i>Rhodotorula spp</i> ²	ED
Zeaxantina	Amarelos	<i>Flavobacterium spp</i> ³	ED
Zeaxantina	Amarelos	<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i> ³	PP
β -caroteno	Amarelos-laranjas	<i>Blakeslea trispora</i> ⁴	PI
β -caroteno	Amarelos-laranjas	<i>Fusarium sporotrichioides</i> ⁴	PP
β -caroteno	Amarelos-laranjas	<i>Mucor circinelloides</i> ⁴	ED
β -caroteno	Amarelos-laranjas	<i>Neurospora crassa</i> ⁴	PP
β -caroteno	Amarelos-laranjas	<i>Phycomyces blakesleeanus</i> ⁴	PP
Desconhecido	Vermelhos	<i>Penicillium purpurogenum</i> ⁴	ED
Desconhecido	Vermelhos	<i>Paecilomyces sinclairii</i> ⁴	PP

Fonte: Dufossé (2006).

¹ Produção Industrial (PI), estágio de desenvolvimento (ED), projeto de pesquisa (PP);² Leveduras;³ Bactérias;⁴ Fungos.

3.2 COMPOSTAGEM

A compostagem pode ser definida como uma técnica aplicada na degradação e estabilização biológica de substratos orgânicos, sob condições de temperatura e aeração específicas, consistindo em um processo de oxidação biológica por meio do qual os microrganismos decompõem os compostos liberando dióxido de carbono e vapor de água (OLIVEIRA et al. 2008; GUIDONI et al 2013). Esse processo biológico ocorre por meio da ação de microrganismos que degradam as macromoléculas, por via enzimática, em monômeros que depois podem ser incorporados na biomassa microbiológica (KIEHL, 1985; KUBITZA; CAMPOS, 2006; INÁCIO, MILLER, 2009; OLIVEIRA FILHO et al, 2018).

Kiehl (1998) relata que durante o processo de compostagem é possível observar três fases: uma primeira inicial e rápida de fitotoxicidade ou de composto cru ou imaturo, seguida de uma segunda fase de semicura ou bioestabilização, para atingir finalmente a terceira fase, a humificação, acompanhada da mineralização de determinados componentes da matéria orgânica.

As fases da compostagem também podem ser classificadas de acordo com a temperatura em Mesofílica (temperaturas moderadas até 40°C), Termofílica (temperaturas superiores a 40°C), Resfriamento (queda da temperatura para valores da temperatura ambiente) e Maturação (produz um composto altamente estabilizado e humificado, livre de toxicidade) (TRAUTMANN; OLYNCIW, 2005; GOMES et al, 2007; BERNAL; ALBUQUERQUE; MORAL, 2009).

3.2.1 Microrganismos na compostagem

A matéria orgânica constitui o habitat de vários microrganismos, pois os mesmos utilizam minerais, compostos orgânicos, água e oxigênio para crescimento e realização das atividades metabólicas (FIALHO, 2007). No processo da compostagem existe uma predominância de microrganismos que variam de acordo com as características do composto, além disso, sabe-se que o vigor da atividade microbiana de decompositores nos processos de compostagem está relacionada ao teor de umidade, à disponibilidade de oxigênio, à temperatura, à relação C e N, ao pH e à presença de compostos tóxicos (KIEHL, 1985; KIEHL, 2004; OLIVEIRA FILHO et al, 2018).

Dentre os microrganismos que participam do processo de compostagem, os fungos destacam-se, pois são seres heterotróficos e são os principais agentes na degradação de produtos lignocelulósicos (SARANRAJ; STELLA, 2014). Sendo que a maioria das espécies já identificadas em processos de compostagem pertencem aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* (ANTONELLA; GIOVANNA; VALÉRIA, 2005; WANG et al., 2018; HASHEMI et al., 2018).

3.3 DOMÍNIO EUCARYA: FUNGOS

Os fungos consistem em um grupo de organismos, cujos membros são formados por células eucariontes, que não formam tecidos verdadeiros e tem a parede celular composta por quitina (TORTORA *et al.*, 2017). Esses seres são aeróbios e heterotróficos sendo que para o desenvolvimento, os fungos exigem uma fonte orgânica de carbono, enquanto a fonte de nitrogênio pode ser inorgânica ou orgânica. Ademais, estes microrganismos necessitam de outros macronutrientes (S, P, K e Mg) e micronutrientes (Fe, Mn, Mo, Ca, Zn e Co) (LACAZ *et al.*, 2002).

A classificação dos fungos ocorre de acordo com as características dos esporos sexuais, com os ciclos de vida e com as características morfológicas dos micélios vegetativos. Os mesmos estão classificados no Filo Chytridiomycota, Filo Zygomycota, Filo Ascomycota, Filo Basidiomycota e no grupo Deuteromycetes, que representa a forma conidial dos Ascomycota e Basidiomycota (TEIXEIRA *et al.*, 2011). O grupo Ascomycota engloba milhares de espécies de fungos, com representantes: leveduriformes, filamentosos e dimórficos. No caso dos fungos filamentosos, as hifas são septadas, enquanto as leveduras são unicelulares. Após um fungo filamentoso formar um esporo, este se separa da célula parental e germina, originando um novo fungo filamentoso. Os esporos assexuais são formados pelas hifas de um organismo, enquanto que os sexuais resultam da fusão de núcleos de tipos opostos de cruzamento de uma mesma espécie do fungo (TORTORA *et al.*, 2017).

A versatilidade metabólica dos fungos filamentosos possibilita a utilização desses em diversos processos industriais para a produção de ácidos orgânicos, polissacarídeos, enzimas, reguladores de crescimento de plantas, alcaloides, pigmentos, micotoxinas e antibióticos (EL-ENSHASY, 2007), conforme Tabela 2. Ainda, esses microrganismos estão presentes em todos os ambientes sendo importantes ecologicamente como decompositores, e economicamente no campo da medicina, da fitopatologia e da indústria (VECCHIA, 2007).

Tabela 2 – Moléculas de interesse industrial produzidas por fungos

Produto	Microrganismo
Antibióticos	
Penicilina G e V	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Cefalosporina C	<i>Cephalosporium acremonium</i>
Griseofulvina	<i>Penicillium patulum</i>
Penicilina N	<i>Emericellopsis sp.</i>
Pleuromutilina	<i>Pleurotus mutilus</i>
Ciclosporina A	<i>Tolepocladium inflatum</i>
Ciclosporin A and B	<i>Cylinrocarpum lucidum</i>
Enzimas	
Glucose oxidase, pectinase e fitase	<i>Aspergillus niger</i>
Xilanase e invertase	<i>Aspergillus awamori</i>
α -Amilase e glucoamilase	<i>Aspergillus oryzae</i>
Celulase e hemicelulase	<i>Trichoderma reesei</i>
Outros metabólitos	
Riboflavina	<i>Ashbya gossypii</i>
Ácido cítrico e glutâmico	<i>Aspergillus niger</i>
Ácido kojico e biotina	<i>Aspergillus oryzae</i>
Ácido itacônico	<i>Aspergillus terreus</i>
Pululana	<i>Aureobasidium pullulans</i>
Biotina	<i>Fusarium culmorum</i>
Alcaloides do Ergot	<i>Claviceps purpurea</i>
Ácido giberélico	<i>Giberella fujikuroi</i>
Ácido linoleico	<i>Martierella isabellina</i>
β -caroteno	<i>Phycomyces blakesleanus</i>
Proteínas heterólogas recombinantes	
Interleucina-6 humana	<i>Aspergillus niger</i>
Ativador de Plasminogênio tecidal	<i>Aspergillus niger</i>
Interleucina-6 humana	<i>Aspergillus nidulans</i>

Fonte: El-Enshasy (2007).

Vale ressaltar que as características biológicas dos fungos bem como as estratégias do ciclo de vida constituem, ferramentas promissoras para o desenvolvimento biotecnológico.

3.3.1 Conservação de Colônias Microbianas

A preservação de linhagens é de extrema importância para processos biotecnológicos industriais. O isolamento e melhoramento de um microrganismo são processos longos e caros, por isso é essencial preservar a característica obtida. Entretanto a escolha de uma técnica de preservação para determinado microrganismo depende das características do método, dos custos de manutenção, da importância do acervo, da disponibilidade de equipamentos, entre outros fatores (ABREU & TUTUNJI, 2004).

O alvo de qualquer método de manutenção é preservar a viabilidade e principalmente proporcionar estabilidade genética do microrganismo ao isolamento, pelo maior tempo

possível, evitando assim a formação excessiva de mutações que possam alterar as características destes. (GIRÃO et al., 2004).

Segundo, COSTA & FERREIRA (1991) os métodos de conservação podem ser divididos de acordo com tempo de preservação máximo em:

Métodos de curto prazo: repique contínuo, ou subcultivo;

Métodos de médio prazo: preservação em óleo mineral, preservação em água estéril, congelamento a -20°C , secagem em sílica-gel, solo ou papel-filtro;

Métodos de longo prazo: liofilização, congelamento a -80°C , criopreservação em nitrogênio líquido.

Não existe uma fórmula padrão e universal que determine a eficiência da estocagem e preservação de microrganismos em longo prazo levando-se em consideração que essa preservação deve garantir a viabilidade, a isenção de contaminações e a estabilidade genética das células microbianas. Contudo, a escolha do procedimento mais adequado à conservação de amostras deve ser norteadas pelas características do espécime em estudo, bem como pelas vantagens e desvantagens das técnicas disponíveis (QUINN et al., 2005).

4 METODOLOGIA

4.1 TANQUE DE COMPOSTAGEM

Os trinta e seis (36) fungos isolados representados na Tabela 3 utilizados nessa pesquisa foram coletados e isolados do tanque de compostagem demonstrado na Figura 1 localizado no viveiro de mudas, no Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido (UFCG-CDSA), conforme descrito por Delgado (2017) e Nunes (2017).

Tabela 3 - Número de isolados fúngicos obtidos em cada fase e coleta da compostagem

FASE DA COMPOSTAGEM	COLETA (nº)	ISOLADOS OBTIDOS
Mesofílica	01	04
	02	05
Termofílica	03	07
	04	06
Resfriamento e maturação	05	04
	06	05
	07	05

Fonte: Modificado de Delgado (2017) e Nunes (2017)

Figura 1- Visão geral do tanque de compostagem em que foram feitas as coletas (A).



Fonte: Dados da pesquisa.

4.2 REATIVAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

Os isolados fúngicos foram reativados em meio CGA (meio Caldo Glicosado e Ágar) cultivados por 7 dias, à 28°C, no escuro, em estufa BOD.

4.3 SELEÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE COLORANTES EM MEIO SÓLIDO

Os fungos foram inoculados em três pontos da Placa de Petri em meios de cultivo diferentes, CGA, BDA (meio Batata, Dextrose e Ágar), CYA (meio Czapeck) e YES (Meio Extrato de Levedura e Sacarose) por 7 dias, à 28°C, na ausência de luz, em estufa BOD.

4.3.1 Identificação da produção de colorantes naturais pelos isolados fúngicos

A produção de colorantes difusos no meio de cultura e de colorantes presentes no micélio e nos esporos foi identificada por meio de avaliação visual e foi registrado por fotografias das faces superior e inferior das placas de Petri.

4.4 MEIOS DE CULTURA:

4.4.1 Meio BDA

Tabela 4 - Composição do meio de cultivo BDA.

Composição	(g/L)
Batata	200,0g
Dextrose	20,0g
Ágar	20,0g
Água destilada	1,0L

Fonte: FAHIM, 1966

4.4.2 Meio Caldo Glicosado e Ágar (CGA)

Tabela 5 – Composição do meio de cultivo CGA

Composição	(g.L⁻¹)
Peptona de Carne	10,0
Extrato de Carne	3,0g
Glicose	20,0g
Ágar	20,0g
Água destilada	1,0L

Fonte: adaptado de LACAZ et al., 2002

4.4.3 Meio Czapek (CYA)

Tabela 6 – Composição do meio de cultivo Czapeck.

Composição	(g.L⁻¹)
Czapek concentrado ²	0,01L
K ₂ HPO ₄	1,0g
Extrato de Levedura	5,0g
Sacarose	30,0g
Ágar	20,0g
Água destilada	1,0L

Fonte: Pitt, 1985

² Composição: NaNO₃ (30g), KCl (5g), MgSO₄.7H₂O (5g), FeSO₄.7H₂O (0,1g), água destilada q.s.p 100 mL.

4.4.4 Meio YES

Tabela 7 - Composição do meio de cultivo YES.

Composição	(g/L)
Extrato de Levedura	20,0g
Sacarose	150,0g
Ágar	20,0g
Água destilada	1,0L

Fonte: SAMSON et al., 1995

4.4.5 Modo de Preparo

Meio BDA: As batatas foram cozidas em água destilada e filtradas. Ao caldo acrescentou-se o ágar, a dextrose e a água destilada até completar-se 1000 mL.

Para os demais meios, os componentes de cada meio de cultivo foram adicionados em água destilada com acréscimo do ágar e foram fundidos em micro-ondas.

Após o preparo, os meios de cultura foram esterilizados em autoclave durante 20 minutos, à 121°C, e 1 atm. Os meios foram vertidos em placas de Petri (20,0 mL/placa), previamente esterilizada e após solidificação foi introduzido o inóculo.

4.5 MANUTENÇÃO E CONSERVAÇÃO DOS ISOLADOS

Para maior tempo de conservação dos isolados fúngicos, estes foram conservados pelo método descrito por Castellani (1931), em que as colônias isoladas de fungos foram colocados em tubos cônicos de 1,5mL, contendo água destilada, previamente esterilizados. Posteriormente os frascos foram selados, identificados e mantidos em temperatura ambiente.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DO MELHOR PRODUTOR DE COLORANTE NATURAL

A identificação em nível de gênero do isolado fúngico C113 foi realizada utilizando-se microscópio ótico, com auxílio de lâmina pelo método da fita adesiva (ALFENAS, 2007).

5 RESULTADOS

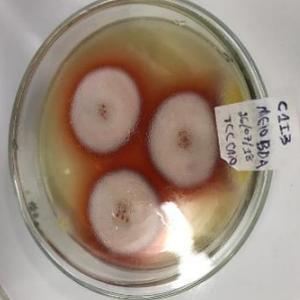
5.1 SELEÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS PRODUTORES DE COLORANTES NATURAIS

As características fenotípicas das estirpes foram estudadas em quatro meios de cultivo diferentes. Todos os meios de cultura testados deram suporte para o crescimento dos isolados fúngicos. Os resultados estão apresentados em sete (7) tabelas de acordo com o momento em que cada coleta fora realizada durante o processo de compostagem, nas quais é possível observar que ocorreram variações morfológicas macroscópicas entre os isolados e entre os diferentes meios de cultivo.

No Quadro 1, verifica-se que nos quatro isolados fúngicos apresentados coloração dos micélios varia entre tons de branco. Os isolados identificados como C1I1 e C1I4 apresentaram esporos com coloração verde e cinza, respectivamente, em meio BDA. O isolado fúngico C1I3 destacou-se por ser o único que apresentou produção de colorante natural difuso e/ou emergindo como gotículas na superfície da placa na cor vermelha.

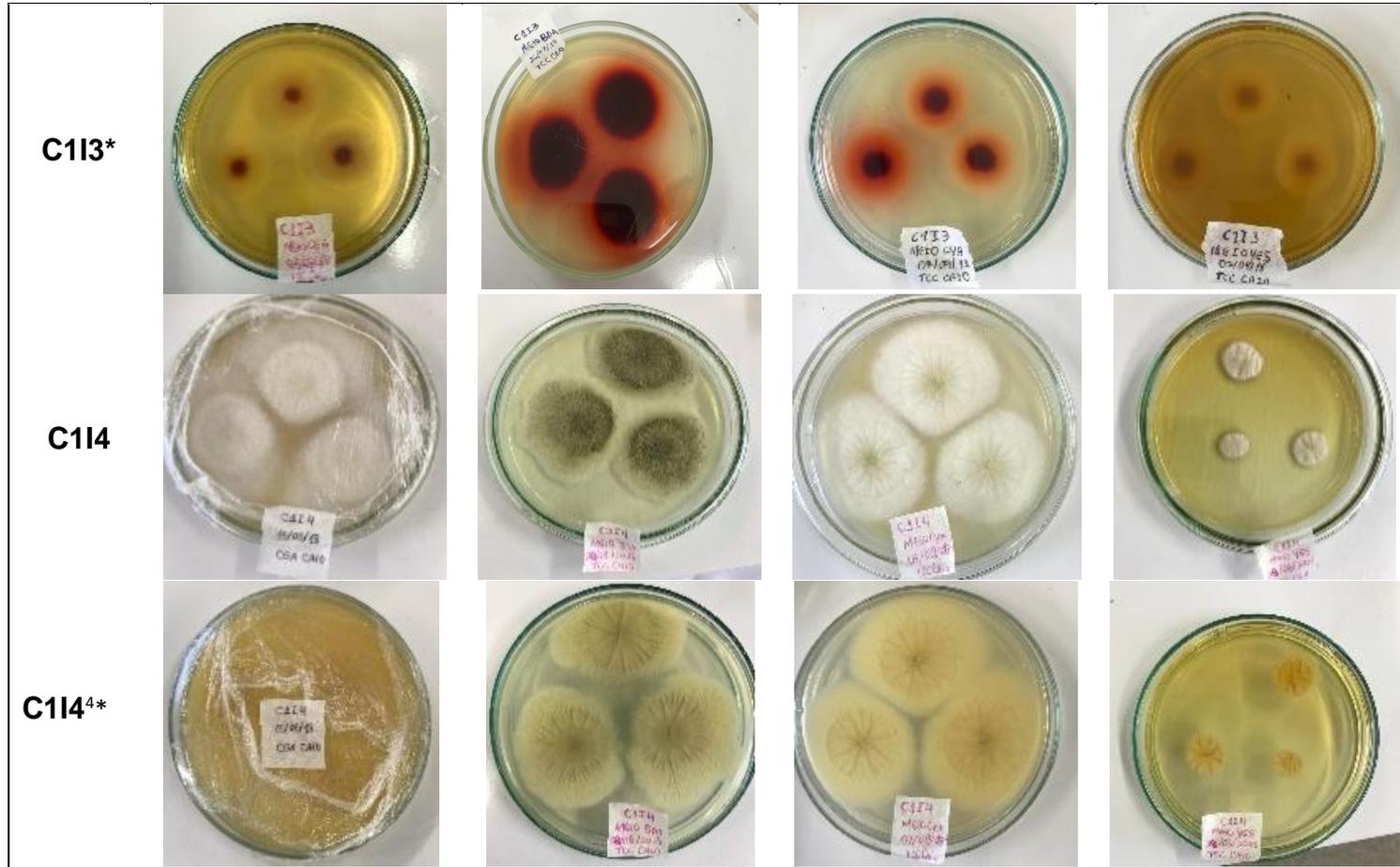
Nota-se ainda, que o tom do vermelho mudou de acordo com o meio de cultura. Durante o cultivo foi observado que com o tempo de cultivo o isolado mudou de cor, variando entre vermelho e marrom conforme o passar dos dias. O meio de cultivo em que o fungo apresentou tom mais intenso de pigmento vermelho solúvel foi o BDA. No entanto, nos demais meios avaliados (YES, CYA e CGA), apesar do fungo produzir o colorante vermelho, o crescimento bem como a produção de pigmento vermelho fora menos intensa.

Quadro 1 - Produção de colorantes naturais pelos isolados fúngicos obtidos a partir da Coleta n° 1

Fungo	Meio CGA	Meio BDA	Meio CYA	Meio YES
C111				
C111*3				
C113				

*3: verso da placa de Petri

(continuação)

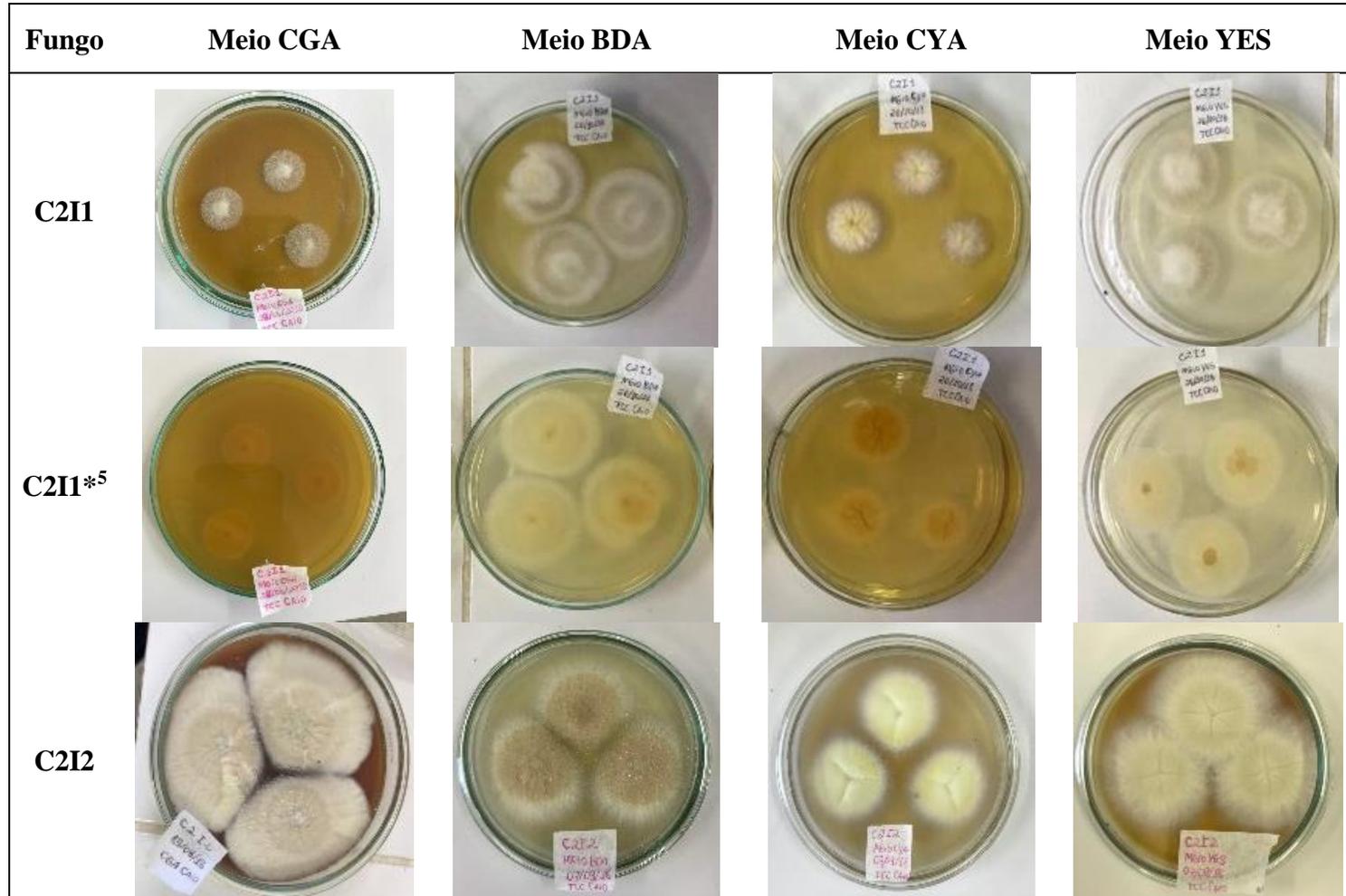


Fonte: Dados da Pesquisa

⁴ *: verso da placa de Petri

No Quadro 2 os isolados apresentam coloração branca e cinza dos micélios. O fungo C2I4 apresentou esporos de cor preta. Os isolados fúngicos C2I2 e C2I5 apresentaram formação de esporos marrons em meio BDA e produção de colorante difuso em tom de marrom alaranjado em meio CGA e em meio CYA, respectivamente. A estirpe C2I3 desenvolveu esporos cinza em meio CGA e BDA. No verso da placa contendo meio BDA observou-se o início de produção de colorante difuso em tom de marrom ou vermelho.

Quadro 2 - Produção de colorantes naturais pelos isolados fúngicos obtidos na Coleta n° 2.



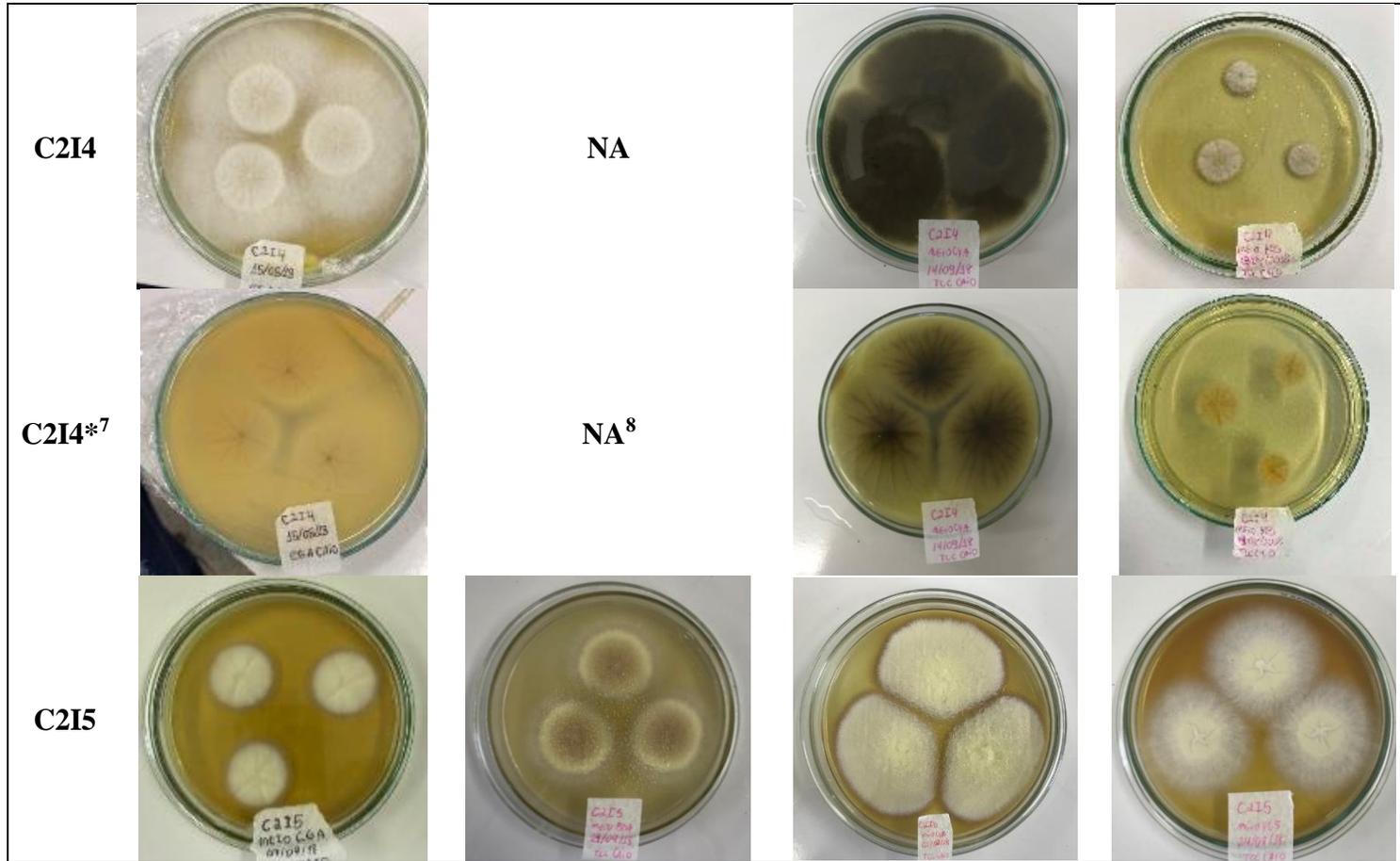
⁵ *: verso da placa de Petri

(continuação)



⁶*: verso da placa de Petri

(continuação)



⁷ *: verso da placa de Petri

⁸ NA: Não apresentado devido à intensa esporulação e/ou contaminação da colônia

(continuação)



Fonte: Dados da pesquisa

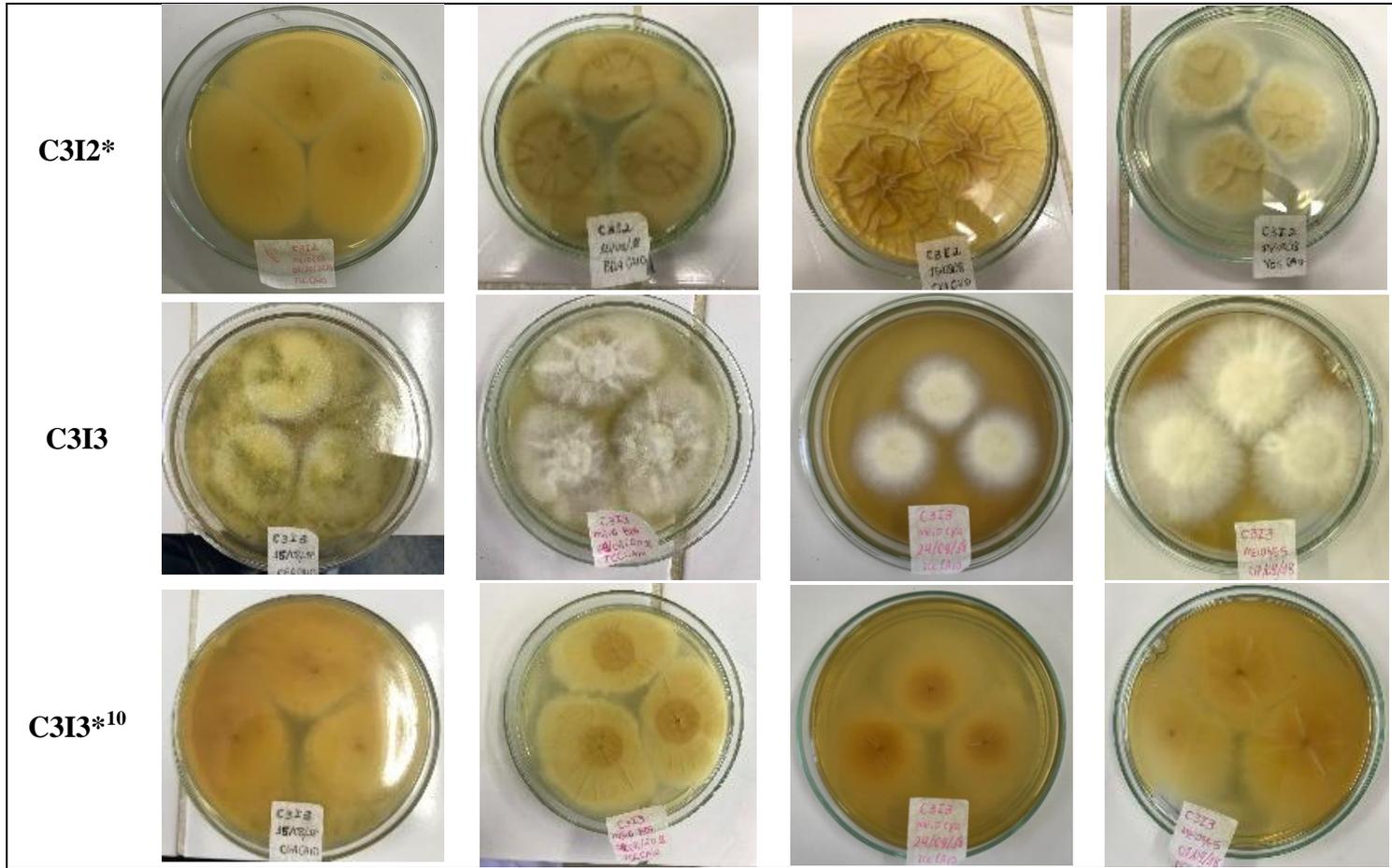
⁹ *: verso da placa de Petri

Os isolados fúngicos apresentados no Quadro 3 constam de micélio em tons de branco com produção de esporos amarelo (C3I1 - em meio BDA e C3I2 – meio CGA), verdes (C3I2 – meio BDA, C3I3 – meio CGA), pretos (C3I4 – em meios CGA, BDA e YES; C3I7 meio CGA), laranja (C3I6 – meio BDA) cinza (C3I5 meio CGA e BDA). Os isolados C3I5 apresentaram produção de colorantes difuso na cor marrom em todos os meios; C3I6 colorante difuso marrom (CGA) e laranja nos meios BDA e CYA.

Quadro 3 - Produção de colorantes naturais obtidos pelos isolados fúngicos da Coleta n° 3

Fungo	Meio CGA	Meio BDA	Meio CYA	Meio YES
C3I1				
C3I1*				
C3I2				

(continuação)



¹⁰ *:verso da placa de Petri

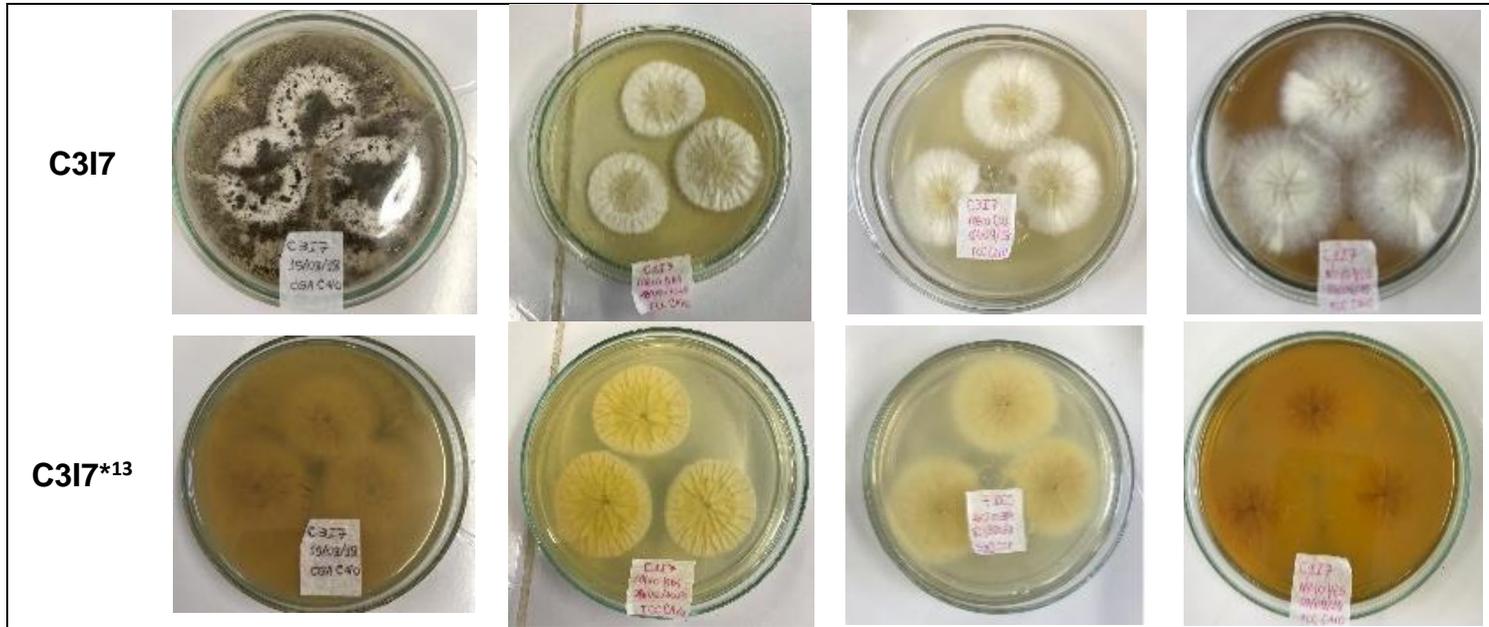


11 *:verso da placa de Petri



¹² *:verso da placa de Petri

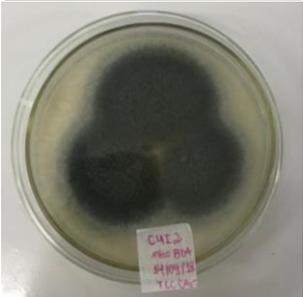
(continuação)



13 *:verso da placa de Petri

Os fungos apresentados no Quadro 4 tem hifas brancas com esporos verdes (C4I1), cinza azulado (C4I2) e marrom (C4I4). Os isolados C4I2 e C4I4 apresentaram produção de colorantes difusos na cor laranja escuro e marrom, respectivamente.

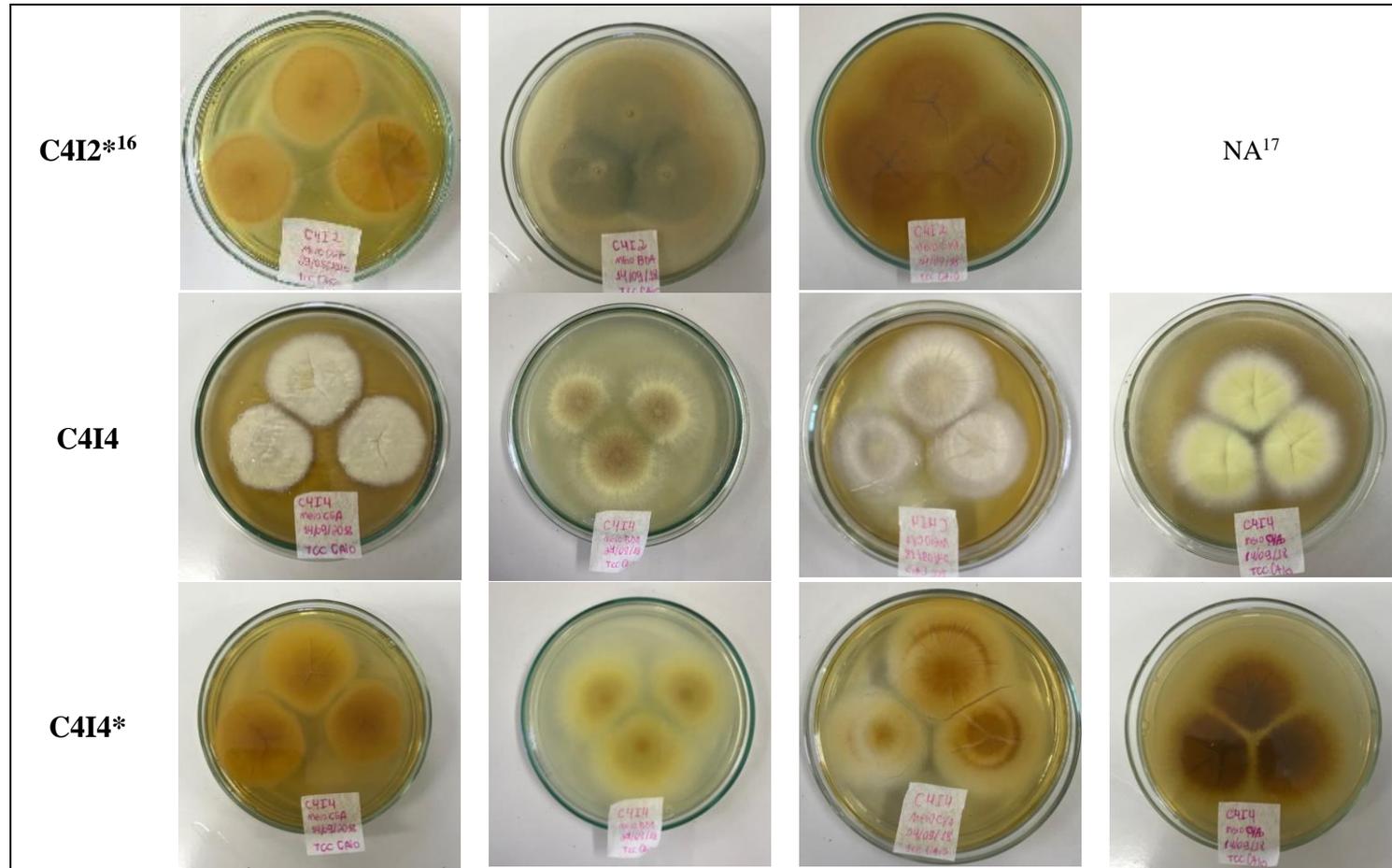
Quadro 4 - Produção de colorantes naturais obtidos pelos isolados fúngicos da Coleta n° 4

Fungo	Meio CGA	Meio BDA	Meio CYA	Meio YES
C4I1			NA	
C4I1* ¹⁴			NA	
C4I2				NA ¹⁵

¹⁴ *: verso da placa de Petri

¹⁵ NA: Não apresentado devido à intensa esporulação e/ou contaminação da colônia

(continuação)

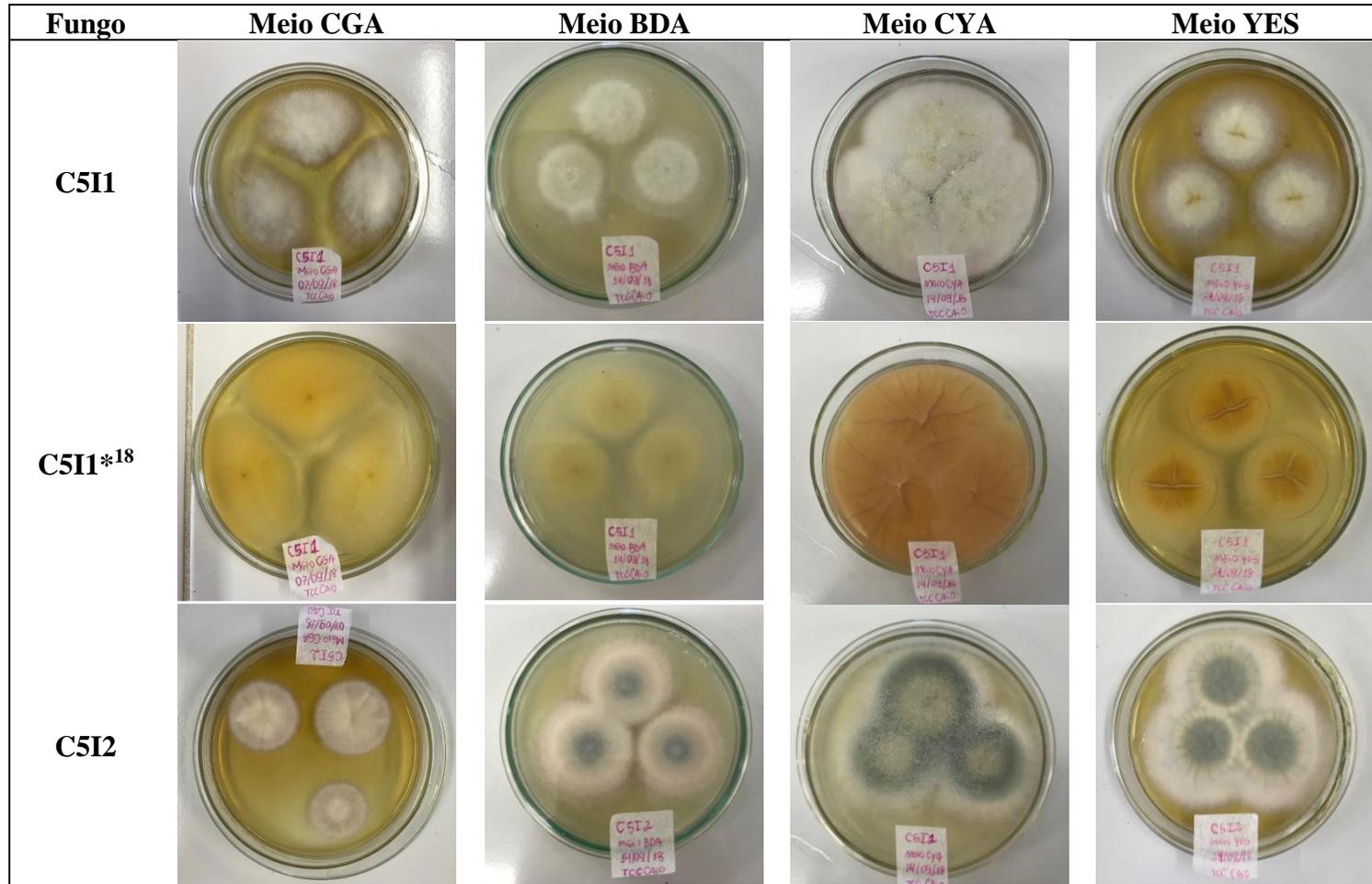


Fonte: Dados da Pesquisa

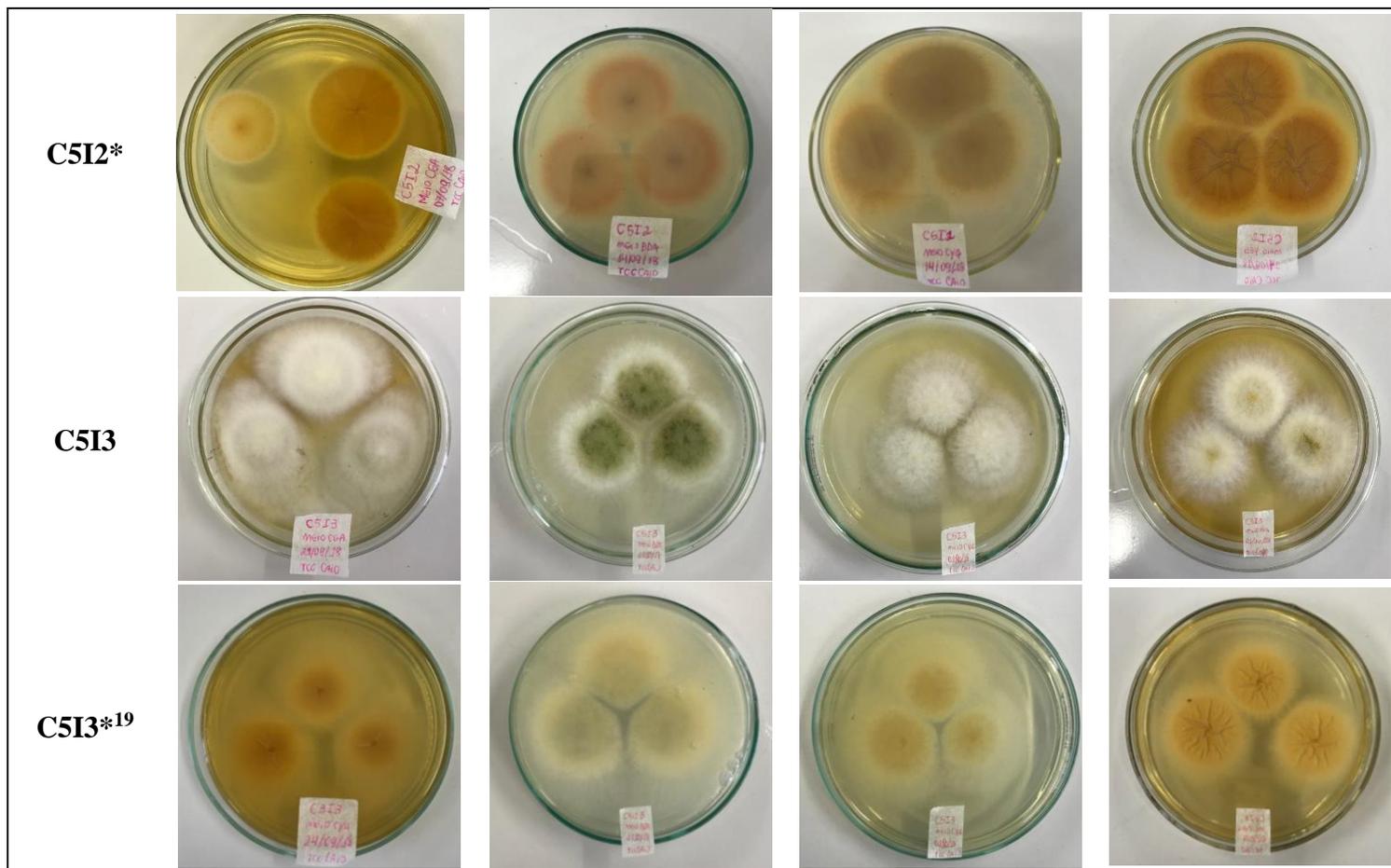
¹⁶ *: verso da placa de Petri¹⁷ NA: Não apresentado devido à intensa esporulação e/ou contaminação da colônia

No Quadro 5, todos os isolados apresentaram micélios brancos com a produção de esporos em tons de amarelo (C5I1 - meio CYA e YES), cinza azulado (C5I2 - meio BDA; CYA e YES), verde (C5I3 – meio BDA e YES), cinza escuro (C5I4 – meio YES) e preto (C5I4 – meio BDA). Os isolados apresentaram produção de colorantes difusos na cor marrom alaranjado foram os isolados C5I1 e C5I2.

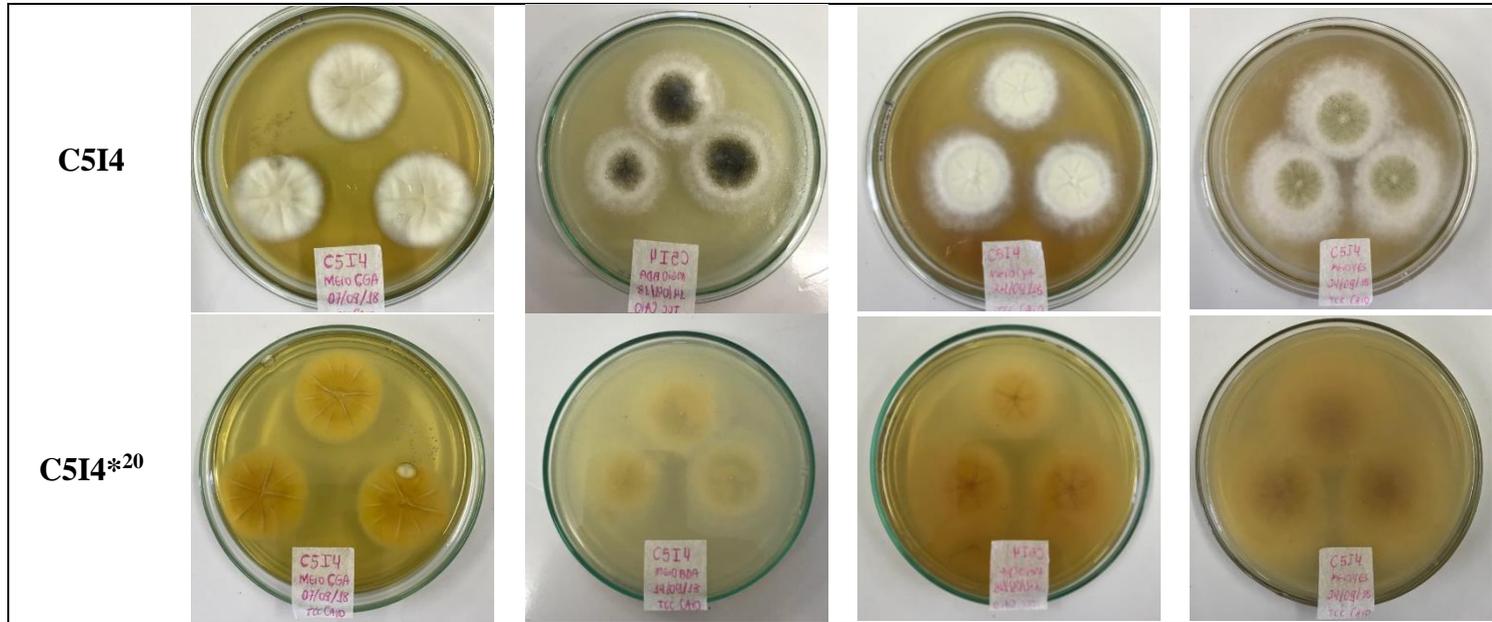
Quadro 5 - Produção de colorantes naturais obtidos pelos isolados fúngicos da Coleta n° 5



18 *: verso da placa de Petri



¹⁹ *: verso da placa de Petri



Fonte: Dados da pesquisa

²⁰ *: verso da placa de Petri

Os isolados apresentados no Quadro 6 tem o micélio em tons de branco, com produção de esporos em tons de preto (C6I1 – meio BDA), cinza azulado (C6I2 – todos os meios), verde (C6I3 e C6I4 – meio BDA) e amarelo (C6I3 – meio YES; C6I4 – meio CYA e YES). Com exceção do isolado C6I2 que apresentou produção de colorante difuso na cor laranja, os demais apresentaram produção de colorantes difusos em tons de amarelo escuro.

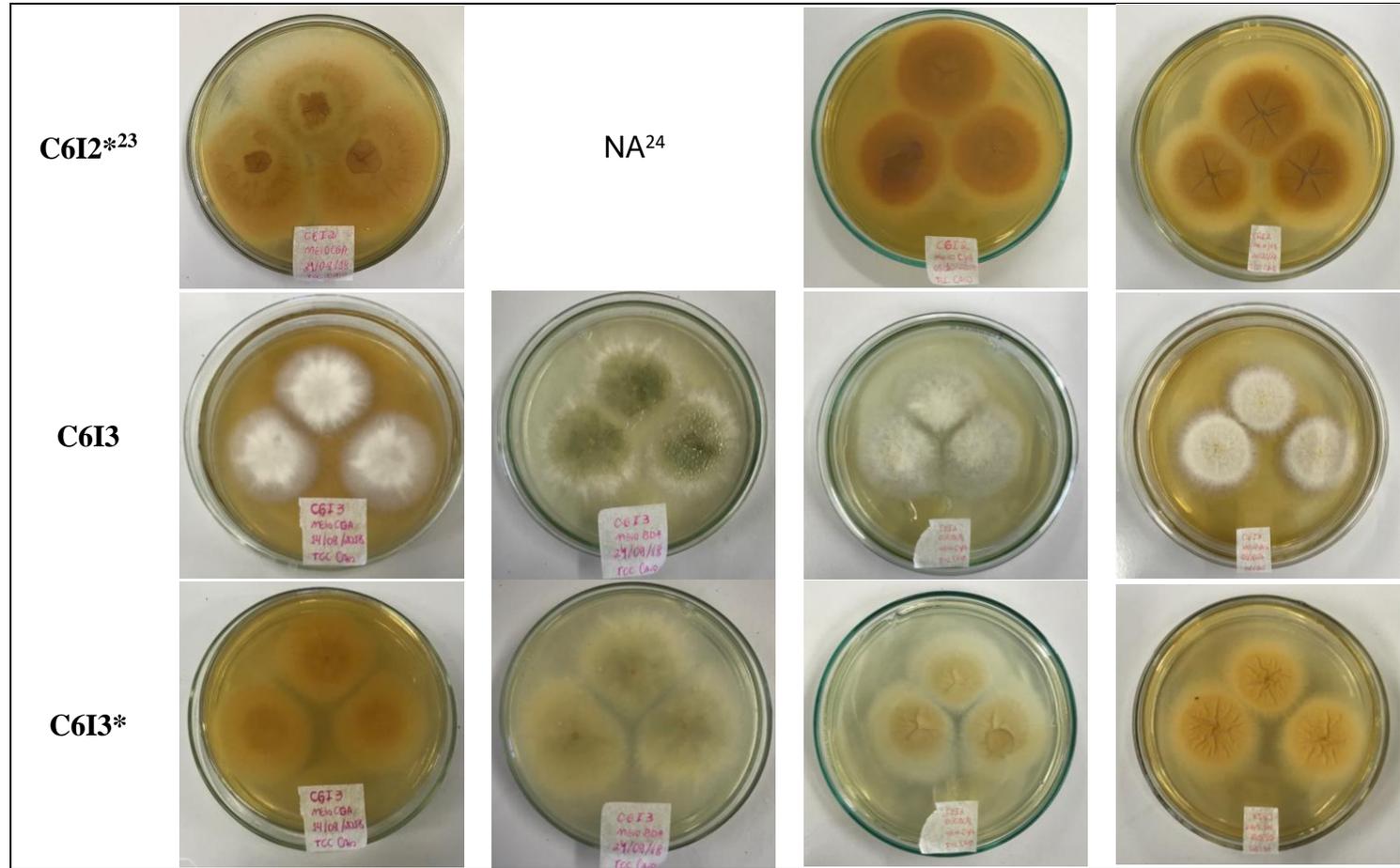
Quadro 6 - Produção de colorantes naturais obtidos pelos isolados fúngicos da Coleta n° 6

Fungo	Meio CGA	Meio BDA	Meio CYA	Meio YES
C6I1			NA	
C6I1* ²¹			NA ²²	
C6I2		NA		

²¹ *: verso da placa de Petri

²² NA: Não apresentado devido à intensa esporulação e/ou contaminação da colônia

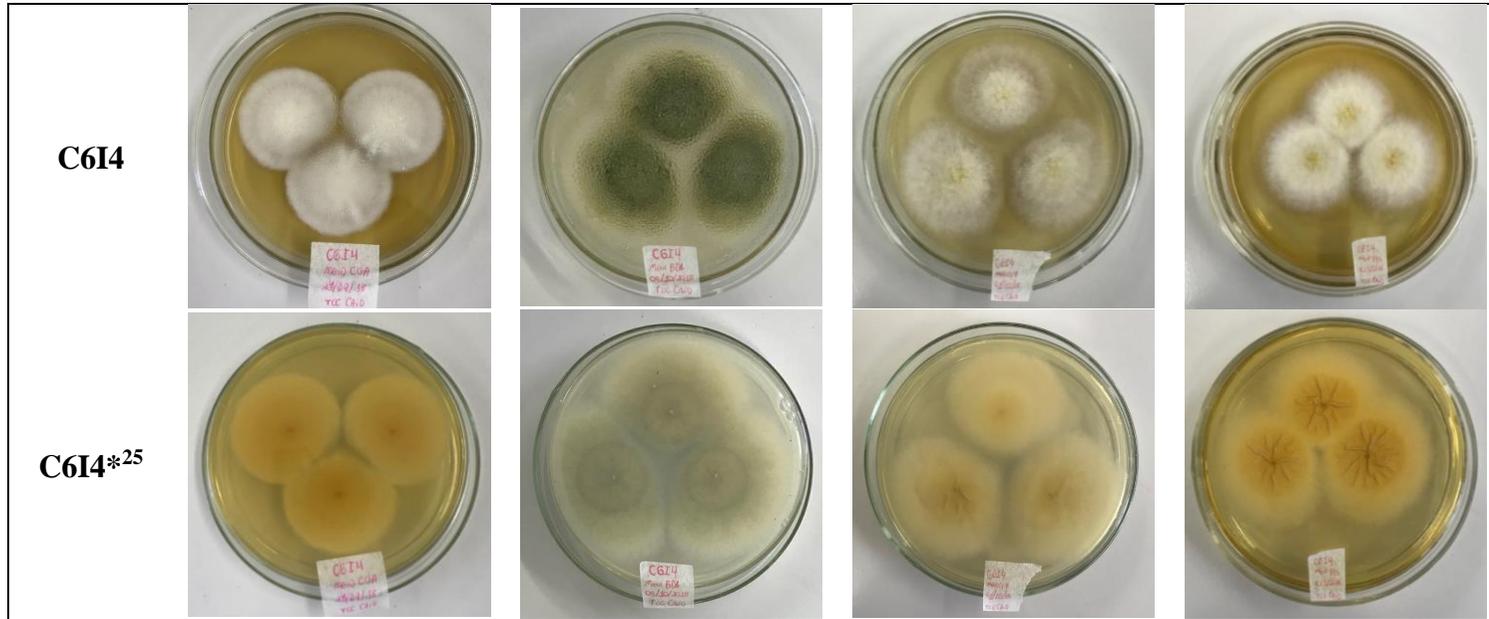
(continuação)



²³ *: verso da placa de Petri

²⁴ NA: Não apresentado devido à intensa esporulação e/ou contaminação da colônia

(continuação)

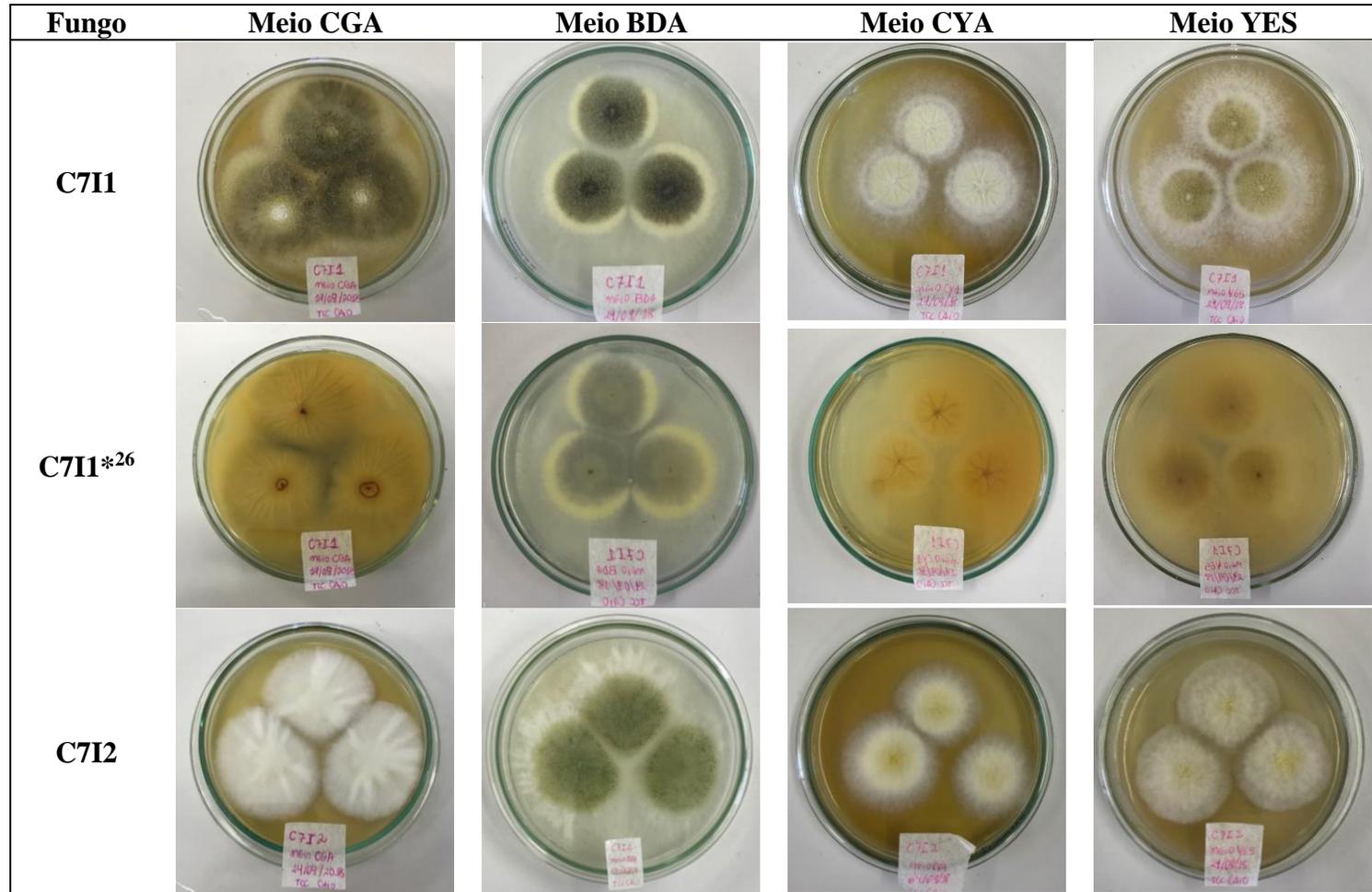


Fonte: Dados da Pesquisa

²⁵ *: verso da placa de Petri

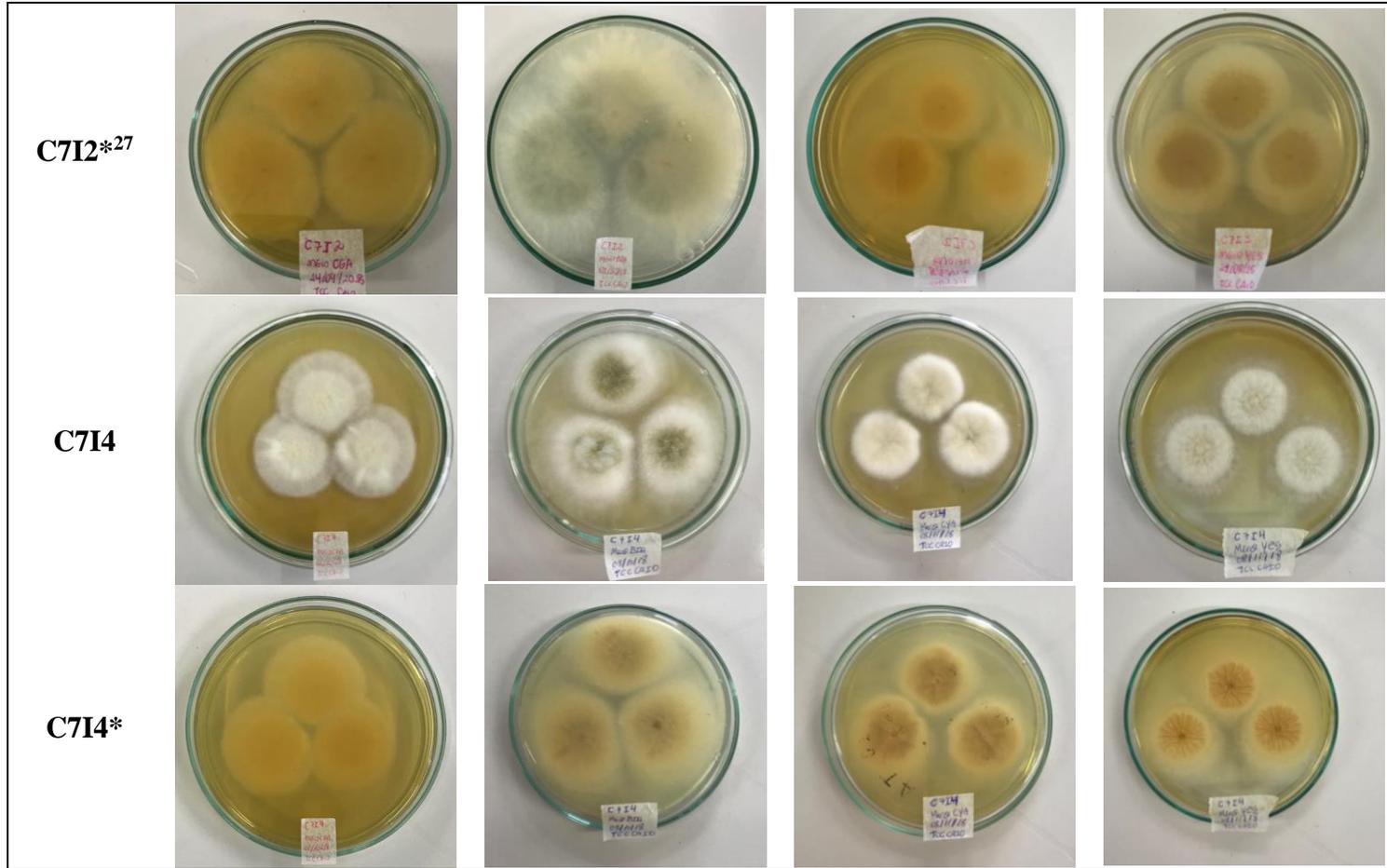
No Quadro 7, todos os isolados apresentaram micélios em tons de branco, com produção de esporos em tons de preto (C7I1 – meio CGA e BDA; C7I4 e C7I5 meio BDA), verde (C7I2 – meio BDA) e amarelo (C7I2 – meio CYA e YES). Todos os isolados apresentaram produção de colorantes difusos em tons de amarelo.

Quadro 7 - Produção de colorantes naturais obtidos pelos isolados fúngicos da Coleta nº 7



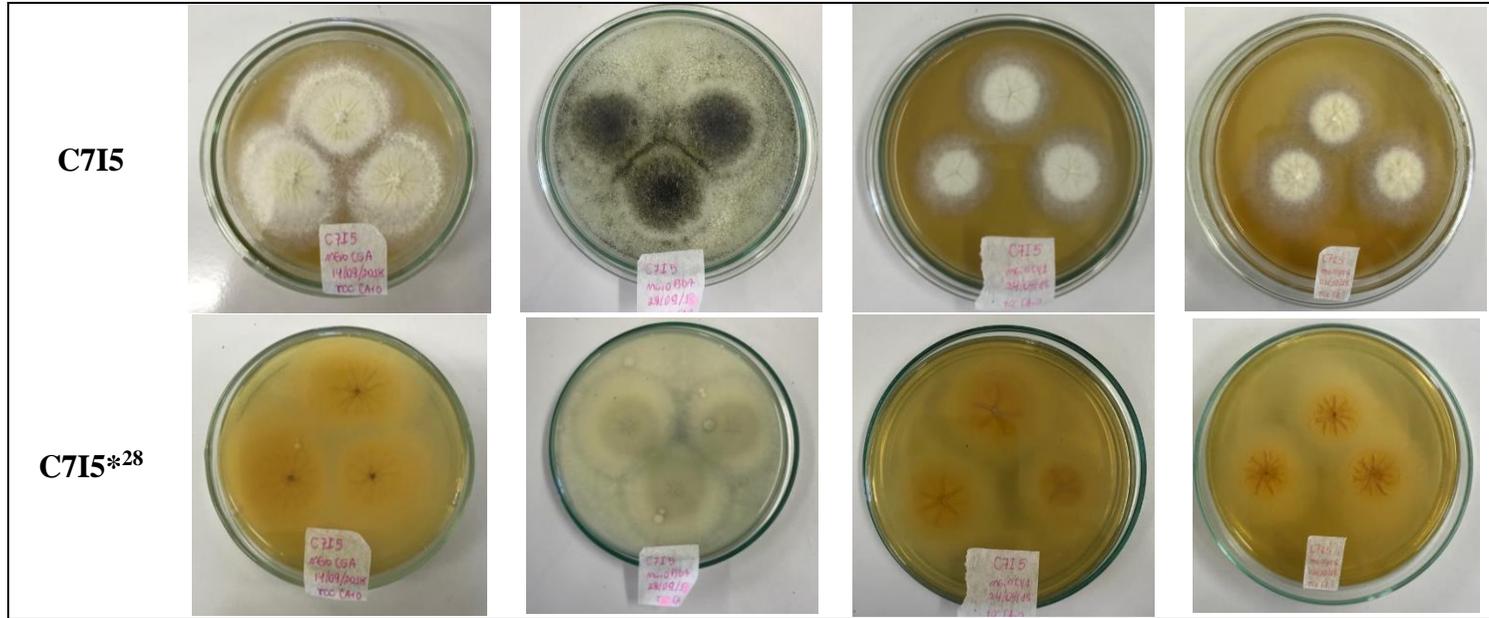
²⁶ *: verso da placa de Petri

(continuação)



27 *: verso da placa de Petri

(continuação)



Fonte: Dados da Pesquisa

28 *: verso da placa de Petri

A coloração dos micélios dos isolados fúngicos variaram entre o branco e o cinza. De acordo com os resultados observados, podemos afirmar que o tom de coloração do micélio pode variar de acordo com o meio de cultura utilizado. As colônias cobriram a área de placa em cerca de 120h e alguns isolados liberaram os metabólitos coloridos que difundiram-se no meio, com destaque para o isolado C1I3. A Figura 2 apresenta uma imagem aproximada de uma colônia de crescimento do isolado fúngico C1I3, em que observa-se a liberação de metabólitos na cor vermelha, como gotículas vermelhas no centro do halo de crescimento.

Figura 2 - Ampliação do centro da colônia do Isolado C1I3 em meio BDA



Fonte: Dados da pesquisa

Na Figura 3 está apresentada uma hifa ligada a gotículas de colorantes naturais.

Figura 3 - Microscopia óptica do isolado C1I3

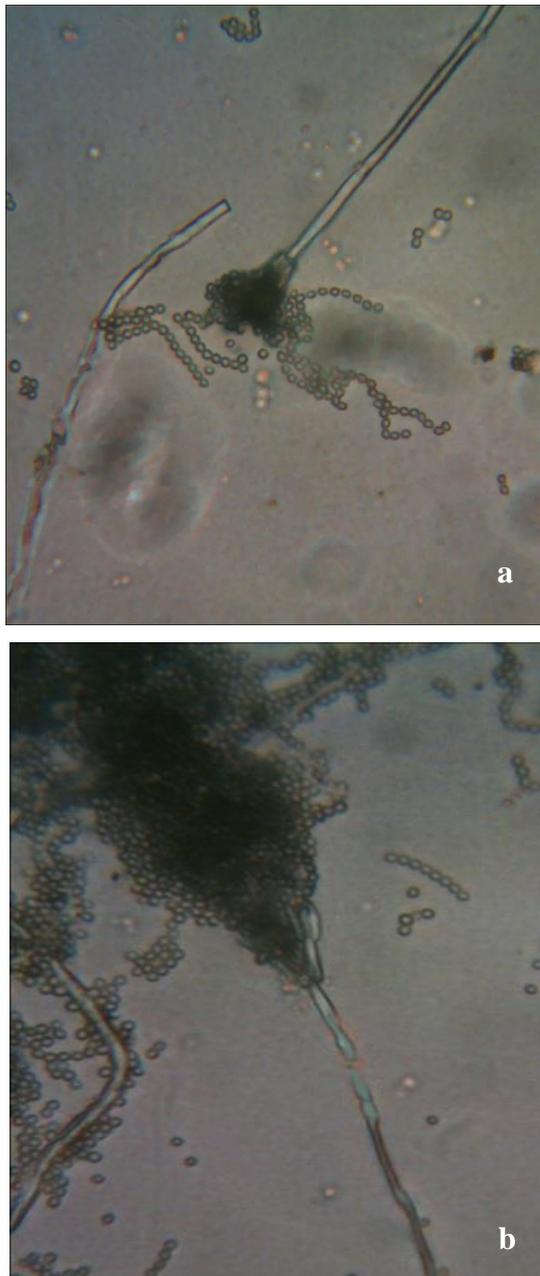


Fonte: Dados da pesquisa

5.2 IDENTIFICAÇÃO DO ISOLADO C113

Considerando que o isolado fúngico destacou-se na produção de corante natural vermelho, realizou-se a identificação em nível de gênero. Conforme a Figura 4 (a e b) é possível identificar que o isolado fúngico apresenta, hifas septadas hialinas. Os conídios são redondos, as filíades tem forma de "penicilli" ou escova e são típicas do gênero *Penicillium* (Wilmar, 2011).

Figura 4 - Microscopia óptica do isolado fúngico C113.



Fonte: Dados da pesquisa

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho corrobora com dados apresentados por Venkatachalam et al., (2018) e Frisvad et al., (2013). Os referidos autores verificaram que o meio de cultivo escolhido pode interferir na intensidade e no próprio tom do metabólito produzido.

A produção de colorantes naturais por diferentes espécies de *Penicillium* é bem estudada na literatura, tendo se observado que além do meio de cultura, o pH, a ausência de luminosidade e as fontes de carbono e nitrogênio são outros fatores relevantes na produção desses metabólitos. A variação de pH pode induzir a produção de corante natural amarelo ou vermelho (MÉNDEZ ET AL., 2011). Segundo Velmurugan et al. (2010) o corante natural de espécies de fungos filamentosos como o *Penicillium purpurogenum* foi afetada pela incidência de luz, sendo que a melhor produção de metabólito vermelho ocorreu na ausência de luz.

Em trabalho realizado por Gunasekaran e Poorniammal (2008) constata-se que diferentes fontes de carboidratos influenciaram a produção de corante natural vermelho por *Penicillium sp.*, sendo que a fonte que favoreceu a produção do referido colorante foi o amido solúvel.

7 CONCLUSÃO

O isolado fúngico C113, pertencente ao gênero *Penicillium sp.*, produziu um intenso metabólito vermelho em meio BDA e é um potencial produtor de colorantes para aplicação industrial.

O estudo reforça a ideia de que a compostagem é uma fonte rica em microrganismos com capacidade para a produção de colorantes naturais.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. M. V.; TUTUNJI, V. L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microorganismos do UniCEUB. *Universitas: Ciências da Saúde, Brasília*, v.02 n.2, p. 236-25, 2004
- ADEEL, S.; HUSSAAN, M.; REHMAN, F.; HABIB, N.; SALMAN, M.; NAZ, S.; AKHTAR, N. 2018. Microwave-assisted sustainable dyeing of wool fabric using cochineal-based carminic acid as natural colorant. *Journal of Natural Fibers*, 1–9. 2018. doi:10.1080/15440478.2018.1448317
- AKOGO, F. U.; KAYODÉ, A. P.; DEN BESTEN, H. M.; LINNEMANN, A. R. Extraction methods and food uses of a natural red colorant from dye sorghum. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(1), 361–368. 2017. doi:10.1002/jsfa.8479
- ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em Fitopatologia**. Viçosa. Ed. UFV. 382p. 2007.
- AMCHOVA, P.; KOTOLOVA, H.; RUDA-KUCEROVA, J. Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(3). 2015, 914e922. <http://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.026>
- ANASTASI, A.; VARESE, G. C.; MARCHISIO V. F. Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost, *Mycologia*, 97:1, 33-44. 2005.
- BALAKRISHNAN, V. K.; SHIRIN, S.; AMAN, A. M.; DE SOLLA, S. R.; MATHIEU-DENONCOURT, J., & LANGLOIS, V. S. Genotoxic and carcinogenic products arising from reductive transformations of the azo dye, Disperse Yellow 7. *Chemosphere*, 146(Supplement C), 206-215. 2016.
- BERNAL, M. P.; ALBURQUERQUE, J. A.; MORAL, R. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technology*, v.100, p.5444-5453, 2009.
- BOONYAPRANAI, K; TUNGPRADIT, R; LHIEOCHAIPHANT, S; PHUTRAKUL, S. Chiang Mai. *J Science*, v. 35, p. 457-466, 2008.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. Brasília: Editora MS. 2005, 1017p.
- CARO, L. Y.; ANAMALE, M.; FOUILLAU, P.; LAURENT, T.; PETIT, L.; DUFOSSÉ. Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: An overview. *Natural Products and Bioprospecting*, 2, pp.174-193, 2012.
- CAROCHO, M.; BARREIRO, M. F.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Adding molecules to food, pros and cons: a review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 377e399. 2014. <http://doi.org/10.1111/1541-4337.12065>.

CASTELLANI, A. A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water: further researches. **Journal of Tropical Medicine & Hygiene**, Mclean. v. 70, p. 181-184, 1931.

CHEN, W.; CHEN, R.; LIU, Q.; HE, Y.; HE, K.; DING, X.; CHEN, F. Orange, red, yellow: biosynthesis of azaphilone pigments in *Monascus* fungi. **Chemical Science**, 8(7), 4917–4925. 2017. doi:10.1039/c7sc00475c

CHO, Y.J.; HWANG, H.J.; KIM, S.W.; SONG, C.H.; YUN, J.W. Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor. **Journal of Biotechnology**, v.95, n.1, p.13-23, 2002b.

CHO, Y.J.; PARK, J.P.; HWANG, H.J.; KIM, S.W.; CHOI, J.W.; YUN, J.W. Production of red pigment by submerged culture of *Paecilomyces sinclairii*. **Letters in Applied Microbiology**, v.35, n.3, p.195-202, 2002a.

CONSTANT, P.B.L.; STRINGHETA, P.C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.20, p.203-220, 2002.

COSTA, C. P.; FERREIRA, M. C. Preservação de microrganismos: revisão. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v.22, n. 3, p. 263-268, 1991.

DELGADO, R. F. A. **Avaliação potencial de fungos obtidos durante processo de compostagem para produção de celulase (FPASE)**. Sumé – PB, 2017.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science and Technology** 35 : 5–22. 2000

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

DUFOSSE, L.; FOUILLAUD, M.; CARO, Y.; MAPARI, S. A. S., SUTTHIWONG, N. **Curr Opin Microbiol**, v. 26, 56-61, 2014.

DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P.; YARON, A.; ARAD, S.M.; BLANC, P.; MURTHY, K.N.C.; RAVISHANKAR, G.A. 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. (3rd. International Congress on Pigments in Food).

EL-ENSHASY, H.A. Filamentous fungal cultures – process characteristics, products, and applications. In: YANG, S.-T., eds. **Bioprocessing for value-added products from renewable resources: new technologies and applications**. Amsterdam: Elsevier, 2007. cap.9, p.225-261.

FAHIM, M.M. The effect of light and other factors on the sporulation of *Alternaria porri*. *Transactions of the British Mycological Society* 49:73-78. 1966

FRISVAD, J. C.; YILMAZ, N.; THRANE, U.; RASMUSSEN, K. B.; HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. *Talaromyces atroroseus*, a New Species Efficiently Producing Industrially Relevant Red Pigments. **PLoS ONE**, 8(12), e84102. 2013. doi:10.1371/journal.pone.0084102

GHORAI, S.; BANIK, S.P.; VERMA, D. CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. Fungal biotechnology in food and feed processing. **Food Research International**, v.42, n.5/6, p.577-587, 2009.

GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Rio de Janeiro, v.37, n.3, p. 229-233, mai/jun. 2004.

GMOSER, R.; FERREIRA, J. A.; LENNARTSSON, P. R.; TAHERZADEH, M. J. Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. **Fungal Biology and Biotechnology**, 2017. 4(1). doi:10.1186/s40694-017-0033-2

GOLVEIA, L.; NOBRE, B. P.; MARCELO, F. M.; MREJEN, S.; CARDOSO, M. T.; PALAVRA, A. F.; MENDES, R. L.; Functional food oil coloured by pigments extracted from microalgae with supercritical CO₂. **Food Chemistry**, v. 101, n. 2, p. 717- 723, 2007.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Quim. Nova**. V. 30: 136-145, 2007.

GUIDONI, L.L.C.; BITTENCOURT, G.; MARQUES, R.V.; CORRÊA, L.B.; CORRÊA, E.K. Compostagem domiciliar: implantação e avaliação do processo. **Tecno-Lógica**, v.17, n.1, p.44-51, 2013.

GUNASEKARAN, S; POORNIAMMAL, R. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp. under submerged cultivation. **African Journal of Biotechnology**, 7(12), 2008. 1894–1898. doi:10.5897/ajb2008.000-5037

GÜRSES A.; AÇIKYILDIZ M.; GÜNEŞ K.; GÜRSES M.S. Classification of Dye and Pigments. In: *Dyes and Pigments*. **Springer Briefs in Molecular Science**. Springer, Cham. 2016.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v. 67, p 597- 607. 1975.

HASHEMI, H., ABBASI, F., SAMAEI, M. R., & KHODADADI, H. Determination of Fungi Species Variety in Thermal Phases of Compost Production and Related Operational Parameters. **Journal of Environmental Engineering**, 144(8). 2018.

HAYDER H.; MUELLER U.; BARTHOLOMAEUS A. Review of intolerance Reactions to food and food additives. **Int Food Risk Anal J**. 2011;1(2):23-32.

HUANG, Z.-R.; ZHOU, W.-B.; YANG, X.-L.; TONG, A.-J.; HONG, J.-L.; GUO, W.-L.; LIU, B. The regulation mechanisms of soluble starch and glycerol for production of azaphilone pigments in *Monascus purpureus* FAFU618 as revealed by comparative proteomic and transcriptional analyses. **Food Research International**, 106, 626–635. 2018. doi:10.1016/j.foodres.2018.01.037

INÁCIO, C. T.; MILLER, P. R. M. **Compostagem: ciência e prática para a gestão de resíduos orgânicos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2009.

JACOBSON G.; WASILESKI J. **Production of food colorants by fermentation. Bioprocess production of flavor, fragrance and color ingredients**, (ed. Alan Gabelman), pp. 205–237. 1994. New York: John Wiley and Sons.

KIEHL, E. J. **Manual de Compostagem: maturação e qualidade do composto**. Piracicaba, 1998.

KIEHL, E.J. **Fertilizantes orgânicos**. São Paulo, Ceres, 1985.

KIEHL, Edmar José. **Fertilizantes Orgânicos**. Piracicaba: **Editora Agronômica Ceres Ltda.**, 1985, 492p.

KOBYLEWSKI S.; JACOBSON M, F. Toxicology of food dyes. **Int J Occup Environ Med**. 2012;(18) 3:220-246.

KONGRUANG, S. Growth kinetics of biopigment production by Thai isolated *Monascus purpureus* in a stirred tank bioreactor **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 38, p. 93-99, 2011.

KUBITZA, F.; CAMPOS, J. L. **O aproveitamento dos subprodutos do processamento de pescado. Panorama da Aquicultura, Rio de Janeiro**, v. 16, n. 94, p. 23-29, 2006.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARINS, J.E.C.; HEINS-VACARRI, E.M.; MELLO, N.K. **Tratado de micologia médica Lacaz**. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.

LAURO, G.J. A primer on natural colors. **Cereal Foods World**, v.36, p.949-953, 1991.

LIMA, C.A.; VITAL, A. F. M.; LINS, S.A. ; DELGADO, R. ; NUNES, J. ; COELHO, G. D. **Isolamento de fungos com potencial celulolítico (FPase) durante a fase termofílica de um processo de compostagem**. In: Encontro de biotecnologia do nordeste, 2017, Natal. Encontro de biotecnologia do nordeste, 2017.

MAGOULAS, C. **How color affects food choices**. Las Vegas: University Of Nevada; 2009 Jul. Parte 1, Introduction; p. 5.

MAPARI, S.A.S.; MEYER, A.S.; THRANE, U. Colorimetric characterization for comparative analysis of fungal pigments and natural food colorants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, n.19, p.7027-7035, 2006.

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

MARTINS, N.; RORIZ, C. L.; MORALES, P.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. **Trends in Food Science & Technology**, 52, 1–15. 2016. doi: 10.1016/j.tifs.2016.03.009

MÉNDEZ, A.; PÉREZ, C.; MONTAÑÉZ, J. C.; MARTÍNEZ, G.; AGUILAR, C. N. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. **Journal of Zhejiang University**. 2011

MILLER, F.C. Composting as a process based on the control of ecologically selective factors. In Meeting, F. B. **Soil Microb. Ecol.**, v.18. p 515 – 543, 1992.

MINTEL AND LEATHERHEAD Food Research Leatherhead, **Food Research**, Leatherhead. 2013.

MOHARRAM A, M.; MOSTAFA E, M.; ISMAIL M, A: Chemical profile of *Monascus ruber* strains. **Food Technology and Biotechnology** 2012; 50(4) 490-499

MONTEIRO, A. B. P. **Produção de pigmento vermelho pelo fungo *Monascus ruber* por fermentação em estado sólido e sua aplicação na elaboração de pães**. 2016. 75 f. Goiânia, 2016.

NUNES, J. S. **Avaliação do potencial de produção de enzimas amilolíticas por fungos isolados da compostagem – uma enzima de interesse biológico**. Sumé – PB, 2018

OLIVEIRA FILHO, J.; CAMARA, C.; SOUSA, T.; CRUZ; EGEA, M.; FALCÃO, H.; SILVA, E. Caracterização microbiológica do processo de compostagem de resíduos orgânicos em pequena escala. *Colloquium Agrariae*. ISSN: 1809-8215, América do Norte, 1322 01 2018.

OPLATOWSKA-STACHOWIAK, M.; ELLIOTT, C. T. Food colors: Existing and emerging food safety concerns. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 57(3), 524–548. 2015. doi:10.1080/10408398.2014.889652

PELCZAR, M, J.; CHAN, E, C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996. p.116-126.

PEREIRA NETO, J.T. 1994. Tratamento, reciclagem e impacto ambiental de dejetos agrícolas. In: **Conferência sobre Agricultura e Meio Ambiente**, 1, 1992, Viçosa. Anais. UFV-NEPEMA. Viçosa. p. 61-74.

PITT, J. A laboratory guide to common *Penicillium* species. North Ryde: CSIRO Food Research Laboratory, 1985. 182p.

QUINN, P.J. et al. *Microbiologia e Doenças Infecciosas*. Porto Alegre, Artmed, p.512, 2005.

RATHER, L. J., JAMEEL, S., GANIE, S. A., & BHAT, K. A. Lichen Derived Natural Colorants: History, Extraction, and Applications. **Handbook of Renewable Materials for Coloration and Finishing**, 103–114. 2018.

SAMSON, R. A.; EVANS, H. C.; LAGTÉ, J. P. Atlas of Entomopathogenic fungi. New York, Heidelberg: Springer-Verlag, Berlin, 1988. p.1-187.

SANTOS-EBINUMA, V. C.; TEIXEIRA, MARIA FRANCISCA SIMAS; PESSOA-JR, ADALBERTO. Submerged Culture Conditions for the Production of Alternative Natural Colorants by a New Isolated *Penicillium purpurogenum* DPUA 1275. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 23, p. 802-810, 2013b

SANTOS-EBINUMA, V, C.; ROBERTO, I, C.; SIMAS T, M, F.; PESSOA, A. Improving of red colorants production by a new *Penicillium purpurogenum* strain in submerged culture and the effect of different parameters in their stability. **Biotechnology Progress**., v. 29, p. 778-785,

SARANRAJ, P.; D. STELLA, Impact of sugar mill effluent to the environment: **A Review**. **World Applied Science Journal**, 30(3): 299-316. 2014.

SHARMA, V.; MCKONE, H. T.; MARKOW, P. G. A Global Perspective on the History, Use, and Identification of Synthetic Food Dyes. **Journal of Chemical Education**, 88(1), 24-28. 2011.

SHINDY H. A. Basics in Colors, Dyes and Pigments Chemistry: A Review. **Chemistry International** 2(1) 29-36. 2016.

TANAKA T. Reproductive and neurobehavioral effects of Sunset Yellow FCF administered to mice in the diet. **Toxicol Ind Health**. 1996; 12(1):69-79.

TANAKA T. Reproductive and neurobehavioural toxicity study of Ponceau 4R administered to mice in the diet. **Food Chem Toxicol**. 2006; 44(10):1651-1658

TEIXEIRA, M, F, S.; AMORIM, T.; PALHETA, R, A.; ATAYDE, H, M. **Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada (aplicações biotecnológicas)**. Manaus: EDUA, 2011. 224p.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**.12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH **Corantes Market – Global Industry** Analysis, Size, Share, Growth, Trends, and Forecast 2017-2025. Acessado em 29 de agosto de 2018. <<https://www.transparencymarketresearch.com/colorants-market.html>>

TRAUTMANN, N.; OLYNCIW, E. Compost Microorganisms. In: Cornell **Composting, Science & Engineering**, 2005.

VECCHIA, A, D.; CASTILHOS-FORTES, R. Contaminação fúngica em granola comercial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.2, p.324-327, 2007.

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.346-50, 2010.

VENKATACHALAM, M.; MAGALON, H.; DUFOSSÉ, L.; & FOUILLAUD, M. Production of pigments from the tropical marine-derived fungi *Talaromyces albobiverticillius*: New

resources for natural red-colored metabolites. **Journal of Food Composition and Analysis**, 70, 35–48. 2018. doi:10.1016/j.jfca.2018.03.007

WANG, K.; YIN, X.; MAO, H.; CHU, C.; & TIAN, Y. Changes in structure and function of fungal community in cow manure composting. **Bioresource Technology**, 255, 123–130. 2018.

WILMAR C, L. Taxonomia de fungos anamórficos – I. Hefomicetos. **Micologia avançada**. 3^a ed. Passo Fundo: Editora: Revisão anual de patologia e plantas; 2011.

WISSGOTT, U.; BORTLIK, K.I. Prospects for new natural food colorants. **Trends in Food Science & Technology**, v.7, n.9, p.298-302, 1996.

YILMAZ, N.; VISAGIE, C.M.; HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. **Studies in Mycology**, v.78, 175–341, 2014.

ZACCARIM, B. R., DE OLIVEIRA, F., PASSARINI, M. R., DUARTE, A. W., SETTE, L. D., JOZALA, A. F., TEIXEIRA, M. F. AND DE CARVALHO SANTOS-EBINUMA, V. Sequencing and phylogenetic analyses of *Talaromyces amestolkiae* from amazon: A producer of natural colorants. **Biotechnol Prog**. 2018. doi:10.1002/btpr.2684

ZHANG, Y. Master's Thesis (Master of Fine Arts). **College of Arts and Letters**, University of Notre Dame. 2016