



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CAROLINE KIE ISHIMOTO

ESTUDO EXPLORATÓRIO DA PRODUÇÃO DE CORANTES
MICROBIANOS AZULADOS PARA POSSÍVEIS APLICAÇÕES
EM ALIMENTOS

EXPLORATORY STUDY OF THE PRODUCTION OF
MICROBIAL BLUISH COLORANTS FOR POSSIBLE FOOD
APPLICATIONS

CAMPINAS

2021

CAROLINE KIE ISHIMOTO

ESTUDO EXPLORATÓRIO DA PRODUÇÃO DE CORANTES MICROBIANOS
AZULADOS PARA POSSÍVEIS APLICAÇÕES EM ALIMENTOS

EXPLORATORY STUDY OF THE PRODUCTION OF MICROBIAL BLUISH
COLORANTS FOR POSSIBLE FOOD APPLICATIONS

Dissertação apresentada à
Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para a obtenção
do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Dissertation presented to the
Faculty of Food Engineering of University of
Campinas in partial fulfillment of the
requirements for the degree of Master in
Food Science.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA CAROLINE
KIE ISHIMOTO, ORIENTADA PELO
PROF. DR. JULIANO LEMOS BICAS

CAMPINAS

2021

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

Is3e Ishimoto, Caroline Kie, 1987-
Estudo exploratório da produção de corantes microbianos azulados para possíveis aplicações em alimentos / Caroline Kie Ishimoto. – Campinas, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Juliano Lemos Bicas.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Corantes naturais. 2. Pigmentos microbianos. 3. Bicaverina. 4. Violaceína. 5. Biotecnologia. I. Bicas, Juliano Lemos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Exploratory study of the production of microbial bluish colorants for possible food applications

Palavras-chave em inglês:

Natural colorants
Microbial pigments
Bikaverin
Violacein
Biotechnology

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Juliano Lemos Bicas [Orientador]
Valeria Maia Merzel
Bruno Nicolau Paulino

Data de defesa: 06-05-2021

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-1811-5805>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8853150110393247>

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas

(Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP)

Titular: Prof^a Dr^a Valeria Maia Merzel

(Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da
UNICAMP)

Titular: Prof. Dr. Bruno Nicolau Paulino

(Universidade Federal do Amazonas - UFAM)

Ata da defesa com as respectivas
assinaturas dos membros encontra-se no
SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação e na
Secretaria do Programa da Unidade.

“Take a look around, colour is everywhere.”

Paul F. Gordon & Peter Gregor

AGRADECIMENTOS

Existem inúmeras pessoas que, sem as quais, mais uma etapa da minha vida não seria concluída, e a quem devo imensamente.

Agradeço aos meus pais que sempre foram a fonte de encorajamento e inspiração ao longo da minha vida, além de fornecer amor e apoio incondicional para ajudar a despertar em mim a determinação e força.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Juliano Lemos Bicas por ter me recebido como orientanda, pelo apoio, ensinamentos, discussões, paciência, atenção e compreensão durante estes anos de mestrado.

Agradeço aos meus colegas de laboratório que ainda estão ou já se foram, em especial a Marcela e a Mayra, que me auxiliaram inicialmente e transmitiram conhecimento para dar continuidade à área de pesquisa de pigmentos. A Raquel, Thaís, Lloisy, Rafael, Tiago, Michel, Aline, Luís, Líbia, Marina, Roberta e Andrea, companheiros de laboratório e de festinhas.

À técnica Angélica pelo apoio, ensinamentos e paciência. Ao Nadir pelo apoio e companheirismo no laboratório. À Bianca, do Laboratório de Apoio Central, pelo apoio, companheirismo, atenção e carinho.

Agradeço a UNICAMP e a todos os professores da Faculdade de Ciência de Alimentos (FEA) dos quais tive a oportunidade de obter os ensinamentos que contribuíram muito para o meu crescimento intelectual e pessoal.

À Prof^a Taícia Fill e seu aluno João, do Instituto de Química; Prof^a Juliana Pallone e técnico Eduardo do Laboratório de Análise de Alimentos – FEA; e Prof^a Dr^a Valéria Merzel do CPQBA/UNICAMP pelo apoio, atenção, análises, ensinamentos, paciência e carinho.

Ao Laboratório de Biotecnologia em Alimentos, Laboratório de Bioaromas, Laboratório de Bioquímica de Alimentos, e Laboratório de Engenharia Metabólica e de Bioprocessos pelo apoio.

Por fim, agradeço imensamente todos os meus amigos de vida pelo ombro amigo e carinho, e a todos, que de alguma forma direta ou indireta, mesmo que breve, me ajudaram e me apoiaram.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 – e com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

RESUMO

Os corantes naturais vêm ganhando notoriedade pela tendência mundial de consumo de produtos mais sustentáveis e saudáveis, além da possibilidade de possuir propriedades biológicas benéficas atribuídas a alguns desses pigmentos. Por serem raros na natureza, as opções de pigmentos azuis naturais são escassas. Logo, estudos de desenvolvimento de novos corantes azuis desta cor, especialmente os de origem microbiana, têm sido fundamentais para auxiliar na ampliação das opções disponíveis de pigmentos para aplicação industrial. Diante disso, este trabalho investigou diferentes condições de obtenção de corantes azulados a partir de fermentação submersa microbiana. Um dos processos estudados foi a transformação da biomassa de *Fusarium oxysporum* do vermelho para azul sob algumas condições (por exemplo, autoclavagem), algo já relatado, mas cujo mecanismo de alteração de cor ainda não é conhecido. O extrato acetotético da biomassa vermelha, cujo componente majoritário foi o pigmento vermelho bicaverina, demonstrou capacidade antioxidante de $235,49 \pm 7,03$, $282,64 \pm 7,04$ e $564,84 \pm 132,32$ $\mu\text{mol TE/mg}$ nos ensaios de TEAC, ORAC hidrofílico e ORAC lipofílico, respectivamente. Nos ensaios focados na alteração de cor da biomassa de vermelho para azul, a adição de papéis de secagem de mãos (com altos teores de Ca, Mg e Zn) ou água de torneira para diluir a biomassa, seguido do processo de autoclavagem, resultou na referida mudança de cor. Ensaios com íons metálicos isolados demonstraram uma formação de pigmentos de coloração variada da biomassa, incluindo o azul (Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+}), roxo (Cu^{2+}) e preto (Fe^{2+} , Co^{2+}), supostamente devido a um deslocamento batocrômico, como ocorre em outros pigmentos (por exemplo, as antocianinas). Estudos anteriores demonstraram que dentre todos os aminoácidos, a adição de arginina e histidina também favorecia a transformação de cor vermelho-azul da biomassa. No entanto, quando adicionada ao extrato rico em bicaverina, a adição de arginina resultou em uma formação de cor azulada muito sutil, e as análises de UHPLC-MS/MS não foram conclusivas na tentativa de identificar possíveis adutos arginina-bicaverina. Embora seja conhecido que a alteração de cor da bicaverina de vermelho para azul ocorra em condições alcalinas, não houve alcalinização do produto quando este passou à coloração azulada nos exemplos citados acima. O *Janthinobacterium* sp. foi outro microrganismo estudado neste trabalho. Esta bactéria púrpura Gram-negativa, identificada por métodos moleculares e confirmada como

produtora do pigmento roxo violaceína neste estudo, foi isolada de arroz e utilizada para a avaliação do efeito da combinação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção do referido pigmento, resultando no teste de dezenas de meios. Os ensaios demonstraram o papel crítico do tipo da fonte de nitrogênio para favorecer a produção de violaceína, com destaque para o extrato de levedura. Ao final, houve sete meios para os quais não houve diferença significativa na produção do pigmento, mas a maior produção ($Ab_{575nm} 10,18 \pm 1,49$) foi obtida após 120h de fermentação a 25°C/200rpm em meio contendo 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de frutose. Os pigmentos azulados obtidos neste trabalho, sejam eles formados a partir da conversão de da biomassa de *F. oxysporum* ou obtidos do extrato alcoólico da cultura de *Janthinobacterium* sp., representam potenciais alternativas para contribuir para o aumento do leque de opções de corantes naturais azulados disponíveis para a aplicação na indústria de alimentos e cosméticos, embora mais estudos sejam necessários para confirmar esta possibilidade.

Palavras-chaves: corantes naturais, pigmentos microbianos, bicaverina, violaceína, biotecnologia.

ABSTRACT

Natural colorants have gained notoriety due to the global trend toward consuming more sustainable and healthier products, in addition to the possibility that some of these pigments have been attributed beneficial biological properties. Since they are rarely found in nature, options for natural blue pigments are scarce. Therefore, studies on the development of new blue pigments of this color, especially those of microbial origin, are essential to expand the available options of pigments for industrial applications. Therefore, in this work, different conditions for the obtention of bluish pigments from microbial submerged fermentation were studied. One of the processes investigated was the conversion of *Fusarium oxysporum* biomass from red to blue under certain conditions (e.g. autoclaving), a previously reported transformation, but whose color change mechanism is not yet known. The acetoethyl extract of red biomass, whose main component was the red pigment bicaferin, showed an antioxidant capacity of 235.49 ± 7.03 , 282.64 ± 7.04 and 564.84 ± 132.32 $\mu\text{mol TE/mg}$ in the TEAC, hydrophilic ORAC and lipophilic ORAC assays, respectively. In assays focused on the change in biomass color from red to blue, the addition of paper towels (with high Ca, Mg and Zn contents) or tap water to dilute the biomass, followed by autoclaving, resulted in the mentioned color change. Evaluations with isolated metal ions showed formation of pigments of different colors in the biomass, including blue (Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+}), purple (Cu^{2+}), and black (Fe^{2+} , Co^{2+}), presumably due to a bathochromic shift as occurs with other pigments (e.g. anthocyanins). Previous studies have shown that among all amino acids, the addition of arginine and histidine also favored the red-blue color conversion of biomass. However, the addition of arginine to the bicaferin-rich extract resulted in a very subtle bluish color formation, and the UHPLC-MS/MS analyzes were inconclusive in attempting to identify possible arginine-bicaferin adducts. Although it is known that the color change of bicaferin from red to blue occurs under alkaline conditions, there was no alkalization of the product when it changed to a bluish color in the above examples. *Janthinobacterium* sp. was another microorganism studied in this work. This Gram-negative purple bacterium, identified by molecular methods and confirmed in this study as a producer of the purple pigment violacein, was isolated from rice and used to evaluate the effect of combining different carbon and nitrogen sources in the production of said pigment, resulting in the evaluation of dozens of culture media. The evaluations showed the critical role of the

type of nitrogen source in favoring the production of violacein, with emphasis on the yeast extract. Ultimately, there were seven media for which there was no significant difference in pigment production, but the highest production ($Abs_{575nm} 10.18 \pm 1.49$) was obtained after 120h fermentation at 25°C/200rpm in a medium containing 5 g/L yeast extract and 10 g/L fructose. The bluish pigments obtained in this work, whether formed from the transformation of *F. oxysporum* biomass or obtained from the alcoholic extract of the *Janthinobacterium* sp. culture, represent potential alternatives to help expand the range of bluish natural colorants for use in the food and cosmetic industries, although further studies are required to confirm this possibility.

Keywords: natural colorants, microbial pigments, bikaverin, violacein, biotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espectro eletromagnético de radiação visível caracterizado por frequências (ν) e comprimentos de onda (λ) específicos para cada cor.	24
Figura 2. Estrutura molecular do betacaroteno.	25
Figura 3. Cromógeno, cromóforo e auxocromo da molécula de 4-hidroxiazobenzeno.	26
Figura 4. Esquema da via de biossíntese da bicaverina em <i>F. fujikuroi</i>	53
Figura 5. Esquema da via de biossíntese da violaceína em <i>Chromobacterium violaceum</i> . VioA: triptofano 2-monoxigenase dependente de flavina adenina dinucleotídeo (FAD); VioB: policetídeo sintase; VioC e VioD: monooxigenases dependentes de FAD; VioE: prodeoxiviolacein sintase.	57
Figura 6. Esquema dos principais procedimentos realizados para a avaliação das condições de produção de corantes azulados a partir dos corantes vermelhos em bicaverina produzidos por <i>Fusarium oxysporum</i> CCT7620. BVU: Biomassa vermelha úmida. BVC: Biomassa vermelha centrifugada. EVB: Extrato vermelho bruto concentrado em acetato de etila. EV: Extrato vermelho. BAU: Biomassa azul úmida. BA: Biomassa azul. EA: Extrato azul.	62
Figura 7. Esquema dos principais procedimentos realizados para o isolamento e identificação bacteriana e do pigmento, avaliação de meios líquidos para crescimento celular e produção de pigmento.	63
Figura 8. Avaliação da adição de diferentes materiais celulósicos na BVU, formação de BAU e as respectivas medidas de pH.	80
Figura 9. Avaliação da adição de diferentes soluções alcalinas ou metálicas na BVU e os respectivos pH medidos após tratamento térmico (1).	85
Figura 10. Avaliação da adição de diferentes soluções alcalinas ou metálicas na BVU e os respectivos pH medidos após tratamento térmico (2).	87
Figura 11. Avaliação da adição de diferentes soluções alcalinas ou metálicas na BVU e os respectivos pH medidos após tratamento térmico (3).	88
Figura 12. Avaliação da adição de diferentes tipos de água na BVU e as respectivas medidas de pH.	92
Figura 13. Imagens de BVC, BA e extrato de BA em DMSO.	93
Figura 14. Reações do EV com arginina e as respectivas medidas de pH.	94

Figura 15. Extrações dos pigmentos formados após reação com arginina em diferentes solventes.....	96
Figura 16. Reações de EVB com diferentes sais e os respectivos extratos obtidos por extração em DMSO.	97
Figura 17. Cromatogramas das amostras de EA obtidos por extração com DCM das reações de EV com arginina em água deionizada ou Tween 80 1%.....	98
Figura 18. Espectros de fragmentação MS dos picos de bicaverina nos cromatogramas no tempo de retenção aproximado entre 7,78 a 7,80 min das amostras obtidas por extração com DCM.	99
Figura 19. Cromatogramas das amostras de EA obtidos por extração com DMSO das reações de EV com arginina em água deionizada ou Tween 80 1%. ...	100
Figura 20. Espectros de fragmentação MS dos picos de bicaverina nos cromatogramas no tempo de retenção aproximado entre 7,86 a 7,87 min das amostras obtidas por extração com DMSO.	101
Figura 21. Curva padrão do Trolox para cálculo da capacidade antioxidante de sequestro do radical ABTS com a equação e coeficiente de correlação linear (R^2).	104
Figura 22. Curva padrão de Trolox para capacidade antioxidante determinado por ORAC hidrofílico e lipofílico e suas equações e coeficientes lineares (R^2).	105
Figura 23. Árvore filogenética da bactéria púrpura isolada.	107
Figura 24. Mapa de crescimento celular de <i>Janthinobacterium</i> sp. nos diferentes meios e tempos de fermentação.....	110
Figura 25. Mapa de produção de violaceína por <i>Janthinobacterium</i> sp. nos diferentes meios e tempos de fermentação.....	111
Figura 26. Cinética de crescimento celular e produção de violaceína por <i>Janthinobacterium</i> sp. nos meios contendo extrato de levedura.....	113
Figura 27. Cinética de crescimento celular e produção de violaceína por <i>Janthinobacterium</i> sp. nos meios contendo apenas 3 g/L de extrato de levedura como fonte de nitrogênio.....	115
Figura 28. Cinética de crescimento celular e produção de violaceína por <i>Janthinobacterium</i> sp. nos meios contendo apenas 5 g/L de extrato de levedura como fonte de nitrogênio.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de cor absorvida e observada.	27
Tabela 2. Corantes artificiais permitidos para o uso em alimentos no Brasil.	32
Tabela 3. Corantes naturais permitidos para o uso em alimentos no Brasil.	36
Tabela 4. Pigmentos microbianos utilizados como corantes naturais para alimentos.	46
Tabela 5. Códigos e composição dos meios testados para crescimento celular e produção de violaceína.	73
Tabela 6. Quantificação dos elementos analisados nos papéis.	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAOH	2,2'-azobis (2'-metilpropionamidine) dihidrocloreto
AAPH	[2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) dihidrocloruro]
ABTS	2,21-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC	Area Under Curve; Área sob a curva
BA	Biomassa azul
BAU	Biomassa azul úmida
BVC	Biomassa vermelha centrifugada
BVU	Biomassa vermelha úmida
CAC	Codex Alimentarius Commission; Comissão do Codex Alimentarius
CI	Color Index Number; Índice Internacional de Corante
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic Acid; Ácido Desoxirribonucleico
DNAr	Ribosomal Deoxyribonucleic Acid; Ácido Desoxirribonucleico Ribossomal
dNTP	Deoxynucleotide triphosphates; Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EA	Extrato azul
EFSA	European Food Safety Authority; Autoridade Europeia para a Segurança de Alimentos
EU	European Union; União Europeia
EUA	Estados Unidos da América
EV	Extrato vermelho concentrado
EVB	Extrato vermelho bruto concentrado em acetato de etila
FAAS	Flame Atomic Absorption Spectrometry; Espectrometria de absorção atômica com chama
FDA	Food and Drug Administration; Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos
IPA	Ácido indol-3-pirúvico
IR	Infra-red; Infravermelho
NB	Nutrient Broth; Caldo Nutriente

OECD	Organisation of Economic Co-operation and Development; Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económicos
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity; Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio
PA	Papel toalha Alveflor
PB	Papel toalha Biopel
PCR	Polymerase Chain Reaction; Reação em Cadeia da Polimerase
PKS	Polyketide Synthase; Policetídeo Sintase
PY	Peptone Yeast Extract Broth; Caldo Peptona Extrato de Levedura
PY-S	Peptone Yeast Extract Broth with Sucrose; Caldo Peptona Extrato de Levedura com Sacarose
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA	Ribonucleic Acid; Ácido Ribonucleico
RNAr	Ribosomal Ribonucleic Acid: Ácido Ribonucleico Ribossomal
TE	Trolox
TEAC	Trolox equivalent antioxidante capacity; Capacidade Antioxidante Equivalente a Trolox
UE	União Européia
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UHPLC-MS/MS	Ultrahigh-pressure Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometer; Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas em Tandem
UV	Ultraviolet; ultravioleta
WHO	World Health Organization; Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
3.1 A cor e os corantes	24
3.2 Corantes artificiais.....	30
3.3 Corantes naturais	35
3.4 Corantes naturais azuis.....	40
3.5 Metabolismo secundário microbiano e produção de pigmentos.....	43
3.6 <i>Fusarium</i> spp. e produção de pigmentos	50
3.6.1 <i>Fusarium oxysporum</i> e o pigmento bicaverina.....	51
3.7 <i>Janthinobacterium</i> spp. e o pigmento violaceína.....	55
4 MATERIAL E MÉTODOS	60
4.1 Avaliação das condições de produção das biomassas e extratos azulados por fermentação de <i>F. oxysporum</i> CCT7620	63
4.1.1 Manutenção do <i>F. oxysporum</i> CCT7620 e obtenção do inóculo	63
4.1.2 Fermentação em meio líquido e obtenção da biomassa vermelha (BVU e BVC)	64
4.1.3 Avaliação dos materiais ricos em celulose para obtenção de BAU	64
4.1.4 Avaliação da adição de compostos alcalinos e metálicos para obtenção de BAU	65
4.1.5 Avaliação da adição de diferentes tipos de água na formação de BAU.....	66
4.1.6 Obtenção de BA por conversão direta da BVC.....	67
4.1.7 Obtenção do EVB e EV	67
4.1.8 Obtenção de EA a partir da adição de compostos alcalinos, metálicos e arginina nos corantes vermelhos	67
4.2 Isolamento, identificação de bactéria púrpura e avaliação de diferentes meios de crescimento celular e produção de violaceína	69

4.2.1 Isolamento e identificação de bactéria púrpura.....	69
4.2.2 Manutenção do isolado e preparo do inóculo	71
4.2.3 Avaliação de diferentes meios para o crescimento celular e produção de violaceína pela bactéria púrpura	72
4.3 Ensaios analíticos	74
4.3.1 Análise quantitativa de elementos químicos selecionados por FAAS dos papéis PA e PB	74
4.3.2 Análise UHPLC-MS/MS do EA obtido por reação com arginina	75
4.3.3 Avaliação da capacidade antioxidante do EV	75
4.3.3.1 TEAC.....	76
4.3.3.2 ORAC	77
4.3.4 Identificação por UHPLC-MS/MS do pigmento produzido pela bactéria púrpura	78
4.4 Análise estatística	78
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
5.1 Avaliação das condições de produção das biomassas e extratos azulados por fermentação de <i>F. oxysporum</i> CCT7620	79
5.1.1 Avaliação dos materiais ricos em celulose para obtenção de BAU	79
5.1.2 Análise da composição de minerais dos papéis toalha por FAAS	82
5.1.3 Avaliação da adição de compostos alcalinos e metálicos para obtenção de BAU	84
5.1.4 Avaliação dos diferentes tipos de água na formação de BAU	91
5.1.5 Obtenção do EA.....	92
5.1.6 Análise UHPLC-MS/MS de EA obtido por reação com arginina	97
5.1.7 Avaliação da capacidade antioxidante do EV	103
5.1.7.1 TEAC.....	103
5.1.7.2 ORAC	104
5.2 Isolamento, identificação de bactéria púrpura e avaliação de diferentes meios de crescimento celular e produção de violaceína	106
5.2.1 Isolamento, identificação de bactéria púrpura.....	106
5.2.2 Avaliação de diferentes meios para o crescimento celular e de produção de violaceína pela bactéria púrpura	107

6 CONCLUSÃO	121
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
8 ANEXO	151

1 INTRODUÇÃO

A cor é um atributo importante que guia desde a diferenciação de espécies, mecanismos de defesa, seleção sexual até os comportamentos alimentares dos organismos (TYLER; SOLOMON, 2019).

A prática de colorir iniciou-se desde as civilizações antigas, assim como o hábito de retirar substâncias da natureza para colorir alimentos a fim de melhorar a sua aparência (BURROWS, 2009; SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019).

Na indústria de alimentos, os corantes artificiais são frequentemente utilizados para conferir, restaurar e manter a coloração desejável em alimentos processados (HISANO, 2016; TULI *et al.*, 2015). No entanto, o uso de alguns corantes vem sendo restringido ou até banido devido às evidências de problemas toxicológicos (PALACIO-BARRERA *et al.*, 2019; TULI *et al.*, 2015). Adicionalmente, as sínteses desses corantes ainda envolvem precursores de origem fóssil de alta toxicidade e não biodegradabilidade, oferecendo perigo tanto para a saúde do consumidor quanto para o trabalhador, bem como ao meio ambiente (NIGAM; LUKE, 2016).

Dessa forma, mudanças para um estilo de vida mais ambientalmente amigável, e a maior adaptação e aceitação do consumidor, vem provocando o aumento rápido na demanda por corantes naturais que, conseqüentemente, despertam e impulsionam o interesse no desenvolvimento e descoberta de novas cores pela comunidade científica e o encorajamento da utilização pela indústria de alimentos (NIGAM; LUKE, 2016; SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019; TULI *et al.*, 2015).

Dentre os corantes naturais que podem ser encontrados na natureza e que são bastante utilizados como aditivos alimentícios estão os corantes obtidos de fontes vegetais. Porém, a maioria dos corantes de origem vegetal, frequentemente possui limitações de estabilidade (RODRIGUEZ-AMAYA, 2016), além de altos custos de obtenção (SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019), e limitações relacionadas à disponibilidade, quantidade e sazonalidade do material vegetal fonte dos pigmentos (NIGAM; LUKE, 2016).

As plantas podem apresentar várias classes de pigmentos (carotenóides, clorofilas, betalaínas), mas as antocianinas são fontes da maioria das cores de tons azulados e púrpuras para as indústrias de alimentos e bebidas. No entanto, a aplicação das antocianinas sofre com instabilidades de cor em matrizes com acidez

inadequada, limitando o espectro de produtos em que podem ser aplicadas (NEWSOME; CULVER; BREEMEN, 2014).

Outros pigmentos azuis provenientes a partir do tratamento vegetal em condições específicas como o guaiazuleno (extração de óleo essencial), aprovado para o uso em cosméticos pela FDA (The Food and Drug Administration) (FDA, 2020), e indigoidina (fermentação), utilizado no tingimento de tecidos, também sofrem com as limitações relacionadas à estabilidade que dificultam a aplicação em alimentos (NEWSOME; CULVER; BREEMEN, 2014; REZA; TREJO; VERA-ÁVILA, 2002). Enquanto os pigmentos derivados de iridóis de *Genipa americana* e *Gardenia jasminoides*, apesar de possuírem certa estabilidade à luz e pH, o uso é limitado ou impedido por questões toxicológicas (NEWSOME; CULVER; BREEMEN, 2014; SANTOS, M. C. Dos; BICAS, 2021).

Contudo, a produção de pigmentos azuis do tipo ficocianina por cianobactéria *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) permitiu a produção comercial de extrato e a aprovação pela FDA para utilização como aditivo de cor em alimentos como confeitos, sorvetes, bebidas e gelatinas (FDA, 2017). Apesar do extrato de spirulina ainda possuir limitada estabilidade (CHOI, W. Y.; LEE, 2018; FAIETA *et al.*, 2020), a produção comercial e aprovação do uso na indústria de alimentos mostra o grande potencial dos pigmentos azuis de origem microbiana.

Ademais, o mercado de sucesso de outros pigmentos microbianos não azuis como os carotenóides (β -caroteno, luteína e astaxantina) de algas (DUFOSSÉ, 2018a), e de pigmentos provenientes do reino Fungi como os pigmentos de *Monascus* spp. e Natural Red (Arpink Red) de *Penicillium oxalicum* já utilizados pela indústria de alimentos corroboram ainda mais para o potencial dos corantes obtidos a partir de microrganismos (SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019).

Por serem produzidos para auxiliar na sobrevivência microbiana em condições adversas, possuírem diferentes origens e naturezas químicas, os pigmentos microbianos tendem a ser mais estáveis e de obtenção mais competitiva que os de origem vegetal (ARAB *et al.*, 2019; SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019; VENIL *et al.*, 2015). Além de frequentemente apresentarem propriedades biológicas de interesse como atividade anticâncer, antimicrobiana, antioxidativa, antiobesidade, anti-inflamatória, entre muitos outros (ANANTHARAMAN *et al.*, 2014; SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019; SHAHID-UL-ISLAM; RATHER; MOHAMMAD, 2016), os

pigmentos microbianos chamam também a atenção para aplicação em formulações cosméticas e farmacológicas (GUPTA *et al.*, 2019; PIMENTEL *et al.*, 2017).

Apesar dessas vantagens, os pigmentos microbianos ainda são pouco estáveis e competitivos economicamente em comparação com os corantes sintéticos (OVERY *et al.*, 2019; SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019). Poucos deles são autorizados para utilização como corantes de alimentos, os quais levaram décadas para o desenvolvimento e ainda continuam passando por entraves regulatórios que afetam a ampla utilização, evidenciando a complexidade e a importância dos estudos nesta área (DUFOSSÉ, 2018b).

O crescimento da aplicação industrial de pigmentos provenientes de fungos filamentosos como *Monascus* spp., *Neurospora* spp. e *Fusarium* spp., vem mostrando o grande potencial destes compostos como agentes corantes. Dentre esses fungos, as linhagens de *Fusarium oxysporum* produzem pigmentos variando nas cores amarelo, laranja, vermelho e púrpura, sendo a bica-verina o pigmento vermelho produzido majoritariamente (LEBEAU *et al.*, 2019). Ademais, sabe-se que a biomassa de *Fusarium oxysporum* pode ter sua coloração modificada para azul apenas com um tratamento térmico (SANTOS, M. C. Dos; BICAS, 2021; SILVA, W. S. Da; BICAS, 2013).

Já com relação aos pigmentos bacterianos azulados, pode-se destacar a violaceína, que apresenta cor púrpura-azul e é produzida por bactérias tais como *Chromobacterium violaceum*, *Collimonas* sp., *Duganella* sp., *Janthinobacterium lividum*, *Microbulbifer* sp., *Pseudomonas* sp. Esta molécula tem sido bastante estudada por possuir uma variedade de propriedades biológicas (atividades antimicrobianas, anticancerígenas, anti-leishmania, antioxidante, imunomodulatória) (RAO; XIAO; LI, 2017) e boa capacidade de conferir propriedades antimicrobianas em tecidos tingidos (KANELLI *et al.*, 2018; NEWSOME; CULVER; BREEMEN, 2014). No entanto, a produção comercial de violaceína ainda possui baixo rendimento e o uso em alimentos ainda não está aprovado por falta de avaliações de segurança (SIGURDSON; TANG; GIUSTI, 2017; ZHOU *et al.*, 2018).

Diante deste cenário, o presente estudo visou a obtenção de pigmentos naturais microbianos azulados com possíveis aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica, dando continuidade aos trabalhos iniciados pelo grupo de pesquisa

sobre produção de pigmentos azulados a partir de *F. oxysporum*, bem como iniciar a avaliação a produção de violaceína por *Janthinobacterium* sp. isolado de arroz.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de corantes azulados a partir de fermentação submersa microbiana.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar as condições envolvidas na transformação de cor (vermelho para azul) da biomassa e extrato rico em bicaverina de *Fusarium oxysporum* CCT7620 obtidos por fermentação submersa em meio líquido à base de arroz;
2. Elucidar a possível estrutura molecular do pigmento responsável pela cor azul produzido pela reação entre o extrato vermelho rico em bicaverina e arginina;
3. Avaliar a capacidade antioxidante do extrato vermelho de *Fusarium*;
4. Identificar a bactéria e o pigmento púrpura produzido por uma colônia arroxeada isolada de arroz;
5. Avaliar diferentes meios líquidos para o crescimento celular e produção de pigmento pela bactéria púrpura isolada.

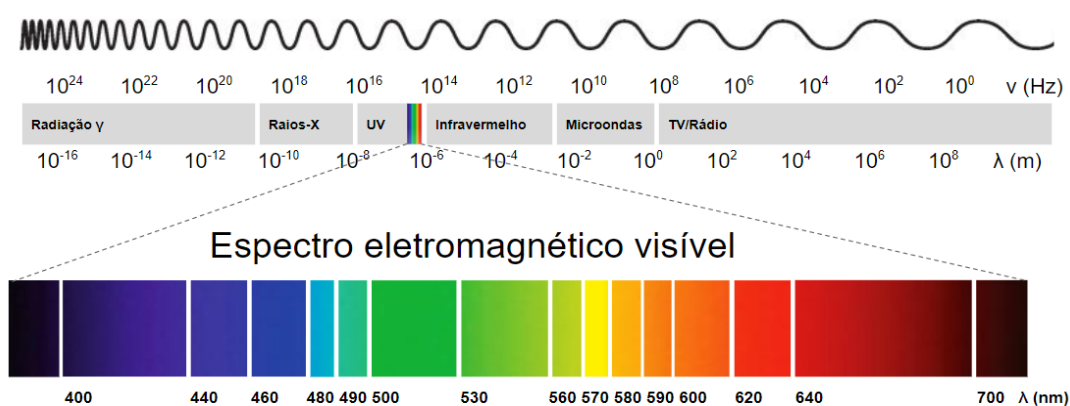
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A cor e os corantes

A luz, descrita como uma radiação eletromagnética transmissora de informação do ambiente para o observador por meio do estímulo da visão (SCHLANGEN, 2015), nos permite a discriminação entre diferentes características tridimensionais, de transparência e diferenças de cor dos objetos pelas leis da óptica geométrica que lidam com a absorção, reflexão, refração e transmissão da luz (LOE, 2017).

Apenas objetos luminosos ou iluminados por uma fonte de luz podem ser vistos, e a habilidade de discriminar as variações no comprimento de onda da luz (λ) pelo complexo sistema olho-cérebro permite a visão das cores (TYLER; SOLOMON, 2019). Nos humanos, essa habilidade envolve a interação de diferentes fotorreceptores presentes na retina, que captam as variações no espectro eletromagnético entre 380 a 780 nm (Figura 1), e o processamento nos milhões de neurônios que resulta na projeção e percepção do multicolorido universo exterior (SLINEY, 2016).

Figura 1. Espectro eletromagnético de radiação visível caracterizado por frequências (ν) e comprimentos de onda (λ) específicos para cada cor.



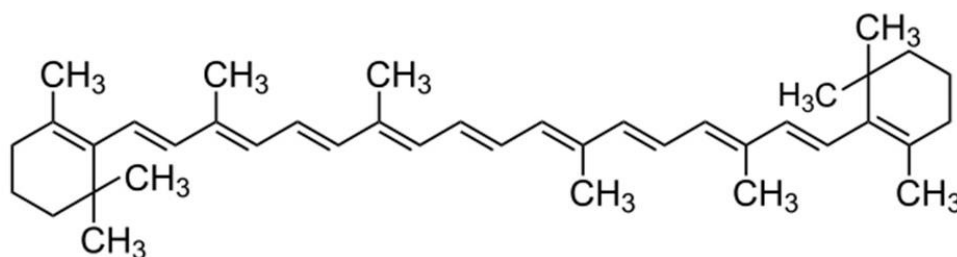
Fonte. Adaptado de Oleari (2016).

Essa faixa do espectro eletromagnético corresponde ao espectro do visível, no qual cada cor corresponde a uma porção específica dentro da faixa do espectro que varia entre o violeta, de comprimento de onda mais baixo, e o vermelho, de comprimento de onda mais alto (SLINEY, 2016).

A cor observada nos materiais e compostos coloridos é resultado das propriedades eletrônicas de absorção de luz das moléculas, sendo os grupos covalentes insaturados, como C=C, C≡C, C=O, C≡N, N≡N, entre outros, responsáveis pela absorção. Conhecidos como cromóforos, esses grupos podem ou não resultar em cor dependendo da faixa do espectro em que a luz é absorvida. Grupos covalentes saturados como NH₂, OH, SH, halogênios, entre outros, chamados de auxocromos, quando ligados aos cromóforos, alteram o comprimento de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) e a intensidade máxima ($\epsilon_{\text{máx}}$) de absorção, que ainda podem aumentar mais de valores por meio da extensão da cadeia de ligações simples e duplas alternadas (conjugação) e ressonância de elétrons, como ocorre no benzeno e fenóis (GÜRSES *et al.*, 2016).

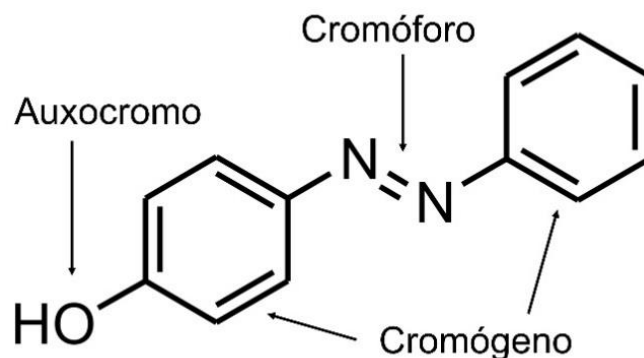
Consequentemente, quanto maior é o sistema conjugado, maiores são os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ e $\epsilon_{\text{máx}}$, e se um composto tiver conjugações suficientes para absorção de luz no espectro do visível este se torna colorido. Como exemplo, o β -caroteno que possui 11 ligações carbono-carbono conjugadas (Figura 2), absorve luz na região do visível, com valores de $\lambda_{\text{máx}}$ 450 nm e $\epsilon_{\text{máx}}$ $14 \cdot 10^4$ e, assim, apresenta coloração alaranjada (GÜRSES *et al.*, 2016).

Figura 2. Estrutura molecular do betacaroteno.



Considera-se que os corantes orgânicos são formados por três principais componentes em sua estrutura: o cromógeno, que é um composto químico capaz originar cor; o cromóforo, que é um grupo químico responsável pela produção de cor nos compostos (cromógeno); e o auxocromo, que é um grupo substituinte encontrado no cromógeno que influencia na sua cor (GÜRSES *et al.*, 2016). Assim como é ilustrado na Figura 3.

Figura 3. Cromógeno, cromóforo e auxocromo da molécula de 4-hidroxiazobenzeno.



Dessa forma, os corantes possuem cor devido à absorção de luz no espectro do visível, por possuírem ao menos um cromóforo e um sistema de conjugação (ligações alternadas de ligações simples de duplas) e exibirem ressonância de elétrons, e quando uma dessas características é perdida da estrutura molecular, a cor é perdida (GÜRSES *et al.*, 2016).

Devido à absorção de luz no espectro visível pelos compostos coloridos em um determinado comprimento de onda, a cor que observamos é, portanto, a luz no comprimento de onda não absorvido pela molécula, ou as chamadas cores complementares, como é mostrada na Tabela 1.

Tabela 1. Relação de cor absorvida e observada.

Comprimento de onda absorvido	Cor absorvida	Cor observada
400 – 435	Violeta	Amarelo-Verde
435 – 480	Azul	Amarelo
480 – 490	Verde-Azul	Laranja
490 – 500	Azul-Verde	Vermelho
500 – 560	Verde	Púrpura
560 – 580	Amarelo-Verde	Violeta
580 – 595	Amarelo	Azul
595 – 605	Laranja	Verde-Azul
605 – 700	Vermelho	Azul-Verde

Fonte: adaptado de Gürses et al. (2016).

A cor exerceu e vêm exercendo um papel importante na evolução, sobrevivência e sucesso dos organismos vivos, guiando desde a diferenciação de espécies, defesa, seleção sexual e os comportamentos alimentares (TYLER; SOLOMON, 2019). No ambiente natural, a busca de alimentos e o aprendizado na discriminação de cores das frutas e folhagens é crítico, já que a cor dos alimentos é uma propriedade intrínseca e uma sinalização da qualidade e quantidade de nutrientes que dado alimento pode oferecer (DRESP-LANGLEY; REEVES, 2018).

A exploração desses sinais permitiu e permite a economia do tempo para procura de alimentos e o aumento na taxa de ganho energético por refeição, garantindo um forrageamento de sucesso e a evolução conjunta tanto das espécies consumidoras assim como das espécies que servem como alimento, como as plantas produtoras de flores e sementes que dependem de outras espécies para a polinização e dispersão (DRESP-LANGLEY; REEVES, 2018).

Dessa forma, instintivamente as cores chamam a atenção dos humanos, e alimentos com cores desejáveis remetem e geram, além do estímulo visual, sensações sensoriais mais prazerosas, indicando sensação de maior frescor e qualidade nutricional global do produto, assim afetando a nossa vontade de comê-lo (FORONI; PERGOLA; RUMIATI, 2016; GREWAL *et al.*, 2018). O sabor é a característica sensorial mais importante quando se está apreciando um determinado alimento. No entanto, muitos estudos da área de ciência sensorial, ciência de alimentos e comercialização de alimentos têm mostrado, há muitos anos, que a cor influencia nas expectativas não só de sabor, mas também no aroma e textura, e ainda nas experiências sentidas após a degustação (SPENCE, 2019b).

A tentativa sem sucesso de introdução da bebida de cola incolor sem cafeína pela Pepsi em 1992, que teve uma edição limitada recentemente (2016-2017) (PEPSICO, 2016), e a inusitada produção de ketchups coloridos da Heinz que variou desde o verde até o rosa com o efêmero sucesso do ketchup azul entre os anos 2000 a 2006 (SPENCE, 2019a), evidencia a forte conexão entre a cor e os outros atributos sensoriais, e a dificuldade que o consumidor tem em não conseguir dissociar a cor com o sabor. Dessa forma, os fabricantes de alimentos dependem e aproveitam desses tipos de associações para auxiliar na venda de seus produtos, podendo mudar a percepção do gosto dos alimentos pelos seus consumidores através da manipulação das cores (SPENCE, 2019b).

Além desses efeitos visuais, fisiológicos e psicológicos, as vivências culturais também influenciam na percepção e escolha de um alimento (EMERY; WEBSTER, 2019), seja uma carne, fruta, vegetal ou alimento processado entre as várias opções disponíveis dispostas em uma prateleira ou mostruário, por exemplo (DRESP-LANGLEY; REEVES, 2018; SCHLANGEN, 2015).

A prática de colorir vem desde as civilizações antigas com relatos desde a Idade do Bronze na Europa, existência de registros escritos do uso de corantes naturais na China datados em 2600 a.C., e o encontro de pigmentos em tecidos utilizados para a mumificação de reis egípcios (SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019; YUSUF; SHABBIR; MOHAMMAD, 2017). Já o hábito de retirar substâncias da natureza e colorir os alimentos para melhorar a sua aparência foi praticado pelas civilizações egípcia e romana antigas que adicionavam extratos naturais aos vinhos e muitas outras substâncias de origem animal, vegetal ou mineral já utilizadas na

alimentação como especiarias e condimentos (GREWAL *et al.*, 2018; SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019), além de registros escritos do século VIII no Japão, que mostram o uso de soja e feijão azuki para colorir bolos e outros alimentos processados (YUSUF; SHABBIR; MOHAMMAD, 2017).

O fascínio pelas cores e a capacidade da cor de influenciar o comportamento humano levou ao desenvolvimento de diversos pigmentos, desde aqueles extraídos de fontes naturais como plantas e animais até o desenvolvimento de corantes sintéticos no século XIX mais estáveis, intensos, de baixo custo e de grande variedade de tonalidades, o que acarretou na substituição dos corantes naturais (STINCO *et al.*, 2019; TULI *et al.*, 2015).

Na indústria de alimentos, produtos como manteiga, iogurtes e bebidas baseadas em frutas possuem uma certa quantidade de cor proveniente do conteúdo intrínseco da matéria prima, que ainda variam de acordo com a estação do ano em que são obtidas, tendo frequentemente uma coloração mais acentuada no verão (HISANO, 2016). Mas, frequentemente não são acentuados o suficiente, ou não são suficientemente estáveis para suportarem as condições de processamento (STICH, 2016), precisando-se lançar mão de aditivos de cor para a restauração, manutenção e fornecimento da coloração padrão, para que o alimento se pareça mais próximo do natural ideal (HISANO, 2016). Ademais, muitos produtos alimentícios processados modernos como refrigerantes e doces, são intrinsecamente sem cor, e a cor é basicamente adicionada para promover uma aparência que se espera relacionada ao sabor do produto final (STICH, 2016).

As mudanças de cor pelas indústrias normalmente seguem as mudanças de preferências, exigências e interesses dos consumidores, seja para manter uma aparência visual consistente durante o tempo de armazenamento ou até mesmo para chamar a atenção dos consumidores e possibilitar novas experiências gastronômicas, como a produção de ketchup coloridos, arrojada gastronomia molecular (SPENCE, 2019a) e o desenvolvimento de alimentos que mimetizam um determinado alimento mas são feitos de ingredientes totalmente diferentes, como está acontecendo com os hambúrgueres veganos, tais como o Beyond Burger (Beyond Meat, El Segundo, EUA) e o Impossible Burger (Impossible Food Inc., Califórnia, EUA).

De acordo com a Resolução CNNPA nº 44, de 1977 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 1977), os corantes alimentícios são aditivos definidos

como uma substância ou mistura de substâncias que confere, intensifica ou restaura a cor de um alimento. Existem quatro categorias de corantes permitidos pela legislação para o uso em alimentos: o corante natural, no qual engloba pigmentos ou corantes inócuos extraídos de fonte vegetal ou animal; o corante caramelo, obtido a partir do aquecimento acima ao ponto de fusão dos açúcares e adicional tratamento necessário para a tecnologia; o corante inorgânico, o qual é obtido por processos adequados de elaboração e purificação de fontes minerais; e o corante artificial, o qual é uma substância de composição química definida que é obtida por um processo de síntese (ANVISA, 1977).

Em 2017, o mercado global de corantes naturais movimentou cerca de US\$1,18 bilhões e estima-se que haverá um crescimento significativo podendo chegar a US\$1,62 bilhões em 2023 (SILVA, T. R. e. *et al.*, 2021). Sendo majoritariamente consumido pela indústria de alimentos e bebidas, o mercado apresenta expectativa de crescimento em resposta às tendências e exigências do consumidor (VENIL; DUFOSSÉ; RENUKA DEVI, 2020). Neste contexto, a utilização de corantes possui um papel importante na área de produção e processamento de alimentos, contribuindo para os vários atributos como frescor, valor nutricional, segurança e aparência desejável, os quais impactam diretamente no seu valor de mercado, tornando-se um tópico essencial nas diversas áreas relacionadas à tecnologia aplicada aos alimentos (SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019; VENIL; DUFOSSÉ; RENUKA DEVI, 2020).

3.2 Corantes artificiais

Os corantes artificiais pertencem à classe de aditivos sem valor nutritivo, sendo introduzidos nos produtos apenas para conferir cor e tornar o alimento mais atraente (PRADO; GODOY, 2003). São produzidos a partir de moléculas orgânicas derivadas do petróleo e minerais que resultam na formação de moléculas nas diversas tonalidades de cor com efeito de coloração duradouro, altamente estável e de custo reduzido (TULI *et al.*, 2015). A primeira síntese química de corantes ocorreu em 1856 após a tentativa sem sucesso de obtenção da quinina, que resultou na produção de anilina e mauveína (PERKIN, 1856).

Originalmente muitos produtos alimentícios não possuem cor ou cor adequada por perda nos processos de produção, exigindo a necessidade de conferir ou restaurar a coloração. Dessa forma, por razões econômicas e de estabilidade dos corantes artificiais, estes são utilizados de forma frequente principalmente em

alimentos como balas, confeitos, gelatinas, sucos em pó, refrigerantes, sorvetes, sopas entre outros (PINHEIRO; ABRANTES, 2015). No entanto, apesar das suas vantagens técnicas e econômicas, o uso dos corantes sintéticos vem sendo limitado e muitos deles proibidos devido aos problemas toxicológicos, de alergenicidade e carcinogenicidade, além de evidências de outros efeitos deletérios como genotoxicidade e neurotoxicidade (TULI *et al.*, 2015).

Ademais, a produção destes corantes é feita a partir de precursores que possuem muitos efeitos carcinogênicos, os quais oferecem perigo tanto para os trabalhadores quanto para o meio ambiente, devido à toxicidade e não biodegradabilidade (NIGAM; LUKE, 2016). Outros estudos relacionam o alto consumo desses aditivos ao desenvolvimento de problemas gastrointestinais, respiratórios e dermatológicos (AMCHOVA; KOTOLOVA; RUDA-KUCEROVA, 2015; BERZAS *et al.*, 1999; KAPADIA *et al.*, 1998), mais especificamente, o potencial efeito tóxico *in vitro* em linfócitos humanos dos corantes sintéticos amaranço, eritrosina e tartrazina (MPOUNTOUKAS *et al.*, 2010), além de evidências associando a hipersensibilidade, hiperatividade infantil, distúrbios físicos e mentais com intolerância aos aditivos alimentícios (MCCANN *et al.*, 2007).

Dessa forma, o uso de corantes artificiais se torna objeto frequente de debates pelas entidades regulatórias de segurança, e conseqüentemente levando ao estabelecimento de legislações para a determinação de especificações, critérios e controle do seu uso (PALACIO-BARRERA *et al.*, 2019).

Agências reguladoras, como a FDA (The Food and Drug Administration) nos EUA e a EFSA (European Food Safety Authority) na Europa, e muitas outras autoridades nacionais no mundo têm restringido o uso de corantes artificiais nos alimentos, confeitos e bebidas devido às confirmadas ou suspeitas associações com efeitos deletérios à saúde (MARTELLI *et al.*, 2014). No entanto, não existe uma concordância entre os países sobre o uso dos corantes, havendo algumas divergências em relação ao amaranço, azorrubina, ponceau 4R, marrom HT, negro brilhante BN, litolubina BK e azul patente, os quais a utilização não é permitida nos EUA, o verde rápido que é proibido na Europa, enquanto que todos os citados ainda são permitidos pela legislação brasileira (Tabela 2) (ANVISA, 2015; PINHEIRO; ABRANTES, 2015).

Tabela 2. Corantes artificiais permitidos para o uso em alimentos no Brasil.

(continua)

Corante	Cor	Número CI	Referência UE	Denominação em Inglês
Azo				
Amaranto, bordeaux S, laca de alumínio	Vermelho	16185	E123	Amaranth, D&C Red 2, Acid red 27, Trisodium salt, Amaranth Aluminum Lake
Ponceau 4R, laca de alumínio	Vermelho	16255	E124	Ponceau 4R, Ponceau 4R Aluminum Lake
Vermelho 40, vermelho allura AC, laca de alumínio	Vermelho	16035	E129	FD&C RED #40, FD&C RED #40 Aluminum Lake
Azorrubina	Vermelho	14720	E122	Carmoisine
Tartrazina, laca de alumínio	Amarelo	19140	E102	FD&C Yellow #5, FD&C Yellow #5 Aluminum Lake
Amarelo crepúsculo FCF, amarelo sunset, laca de alumínio	Amarelo	15985	E110	FD&C yellow #6, FD&C Yellow #6 Aluminum Lake
Marrom HT	Marrom	-	E155	Brown HT, Chocolate Brown, Food Brown 3, C.I. 20285
Negro brilhante BN, negro PN	Preto	28440	E151	Brilliant Black BN, Brilliant Black PN, Food Black 1

Tabela 2. Corantes artificiais permitidos para o uso em alimentos no Brasil.

(continua)

Corante	Cor	Número CI	Referência UE	Denominação em Inglês
Azo				
Vermelho 2G	Vermelho	18050	E128	Red 2G, Acid Red 1, Food Red 10
Litol rubina BK	Vermelho	15850	E180	Lithol Rubine BK, Pigment Rubine, Carmine 6B, Brilliant Carmine 6B
Triarilmetano				
Azul patente V, laca de alumínio	Azul	42051	E131	Patent Blue V, Acid Blue 3, Food Blue 5, Patent Blue V Aluminum Lake
Verde rápido FCF, verde indelével, fast green FCF, laca de alumínio	Verde	42053	E143	Fast Green FCF, Food Green 3, FD&C Green No. 3, Fast Green FCF Aluminum Lake
Azul brilhante FCF, laca de alumínio	Azul	42090	E133	FD&C Blue #1, FD&C Blue #1 Aluminum Lake
Indigóide				
Azul de indigotina, carmim de índigo, laca de alumínio	Azul	73015	E132	FD&C Blue #2, FD&C Blue #2 Aluminum Lake

Tabela 2. Corantes artificiais permitidos para o uso em alimentos no Brasil.

(conclusão)

Corante	Cor	Número CI	Referência UE	Denominação em Inglês
Quinolina				
Amarelo quinolina	Amarelo	47005	E104	D&C Yellow #10, Quinoline Yellow
Xanteno				
Eritrosina, laca de alumínio	Vermelho	45430	E127	FD&C Red #3, Erythrosine, FD&C Red #3 Aluminum Lake

CI: Color Index. Fonte: adaptado de ANVISA (2015) e Gurses et al. (2016).

No Brasil, o uso de aditivos alimentícios é regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através do Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, alterado pelo Decreto nº 691, de 1962 e posteriormente pelo Decreto nº 55.871 de 26 de março de 1965 (ANVISA, 2019). Pelo Informe Técnico nº 68 de 3 de setembro de 2015 da legislação brasileira, é permitida a utilização em alimentos dezesseis corantes artificiais que estão distribuídos em cinco classificações: corantes azo (amaranto, ponceau 4R, vermelho 40, azorrubina, tartrazina, amarelo crepúsculo, marrom HT, negro brilhante BN, vermelho 2G, litol rubina BK), triarilmetano (azul patente V, verde rápido, azul brilhante), indigóide (azul de indigotina), quinolina (amarelo quinolina), e xanteno (eritrosina) (Tabela 2) (ANVISA, 2015; PRADO; GODOY, 2003, 2007).

Reavaliações foram realizadas a fim de examinar a faixa de segurança do consumo, o que levou na diminuição da quantidade de ingestão diária aceitável (IDA) de corantes como amarelo quinolina, amarelo crepúsculo FCF e ponceau 4R, indicando o aumento das restrições a respeito dos corantes permitidos para o uso em alimentos (PALACIO-BARRERA *et al.*, 2019).

Assim como os efeitos adversos dos corantes sintéticos, a maior adaptação, aceitação e demanda dos corantes naturais pelos consumidores, adicionado à recente

tendência da conscientização pública na adoção de estilo de vida mais ambientalmente amigável e que garanta também a segurança humana, os consumidores vêm desenvolvendo interesse nos corantes naturais. Provenientes de fontes minerais, vegetais, animais e microbianas, estes corantes estão sendo considerados alternativas mais seguras em detrimento da aplicação dos corantes sintéticos, despertando e impulsionando o interesse no desenvolvimento e descoberta de novas cores naturais pela comunidade científica e o encorajamento da utilização destes pela indústria como aditivo (NIGAM; LUKE, 2016; SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019; TULI *et al.*, 2015).

3.3 Corantes naturais

Os corantes naturais são definidos como uma substância obtida a partir da extração de fontes vegetais, animais, minerais ou microbianas, e portanto, não possuidoras de produtos de origem fóssil (RODRIGUEZ-AMAYA, 2016).

As principais classes de pigmentos naturais que são abundantes na natureza e são utilizadas como aditivos em alimentos, são as clorofilas, carotenóides, betalaínas e antocianinas (NGAMWONGLUMLERT; DEVAHASTIN; CHIEWCHAN, 2017; RODRIGUEZ-AMAYA, 2019), sendo a obtenção tradicional desses pigmentos a partir da extração de fontes vegetais como grama e alfafa (clorofilas) (VIERA; PÉREZ-GÁLVEZ; ROCA, 2019), cenoura e tomate (carotenóides) (BARREIRO; BARREDO, 2018), beterraba (betalaínas) (POLTURAK; AHARONI, 2018), e casca de uvas (antocianinas) (RODRIGUEZ-AMAYA, 2019).

Não somente a partir de plantas, insetos pertencentes ao grupo *Dactylopius* têm sido utilizados há muito tempo, desde as civilizações Asteca e Maia para obtenção do corante carmim, o qual possui como principal componente o pigmento vermelho ácido carmínico (FRANDSEN *et al.*, 2018). Bastante utilizado em confeitos, produtos cárneos e preparações de base de frutas (sucos, doces de morango) (DUFOSSÉ, 2018b; FRANDSEN *et al.*, 2018), bebidas, cosméticos e medicamentos, este corante possui contaminantes proteicos provenientes dos insetos que conferem alergenicidade tanto por ingestão, contato e até por inalação em pessoas suscetíveis às reações alérgicas a esses antígenos (GIER; VERHOECKX, 2018; TAKEO *et al.*, 2018).

No Brasil, assim como os corantes artificiais, os corantes naturais são de competência da ANVISA seguindo a legislação aplicada para os aditivos alimentícios,

na qual são listados 21 corantes naturais permitidos para o uso em alimentos (Tabela 3) (ANVISA, 2019).

Tabela 3. Corantes naturais permitidos para o uso em alimentos no Brasil.

(continua)

Corante	Cor	Número CI	Referência UE	Denominação em Inglês
Vegetal				
Cúrcuma, curcumina	Amarelo	75300	E100	Turmeric oleoresin, CI Natural Yellow 3
Riboflavina	Amarelo	-	E101(i)	Riboflavin
Riboflavina 5' fosfato de sódio	Amarelo	-	E101(ii)	Riboflavin-5'-phosphate sodium
Clorofila	Verde	75810	E140(i)	Chlorophyll
Clorofilina	Verde	75815	E140(ii)	Chlorophyllins, CI Natural Green 5
Clorofila cúprica	Verde	75810	E141(i)	Copper complexes of chlorophylls, CI Natural Green 3, Copper chlorophyll, Copper phaeophytin
Clorofilina cúprica, sais de Na e K	Verde	75815	E141(ii)	Copper complexes of chlorophyllins, Sodium copper chlorophyllin, Potassium copper chlorophyllin, CI Natural Green 5
Caramelo I - simples	Marrom	-	E150a	Plain caramel, Caustic caramel

Tabela 3. Corantes naturais permitidos para o uso em alimentos no Brasil.

(continua)

Corante	Cor	Número CI	Referência UE	Denominação em Inglês
Vegetal				
Carvão vegetal	Preto	77266	E153	Vegetable carbon, Vegetable black
Carotenos: extratos naturais	Laranja	75130	E160a(ii)	Plant carotenoids, CI Food Orange 5
Urucum, bixina, norbixina, annatto extrato de sais Na e K	Laranja	75120	E160b	Annatto, CI Natural Orange 4
Páprica, capsorubina, capsantina	Vermelho	-	E160c	Paprika extract, Capsanthin, Capsorubin
Licopeno	Vermelho	75125	E160d(ii)	Lycopene, Natural Yellow 27
Beta-apo-8'-carotenal	Laranja	40820	E160e	Beta-apo-8'-carotenal (C30), CI Food Orange 6
Ester metílico ou etílico do ácido beta-apo-8' carotenóico	Laranja	40825	E160f	Food Orange 7, Ethyl ester of beta-apo-8'-carotenoic acid
Luteína	Amarelo	-	E161b	Lutein, Mixed Carotenoids, Xanthophylls

Tabela 3. Corantes naturais permitidos para o uso em alimentos no Brasil.

(conclusão)

Corante	Cor	Número CI	Referência UE	Denominação em Inglês
Vegetal				
Cantaxantina	Laranja	40850	E161g	Canthaxanthin, CI Food Orange 8
Vermelho de beterraba, betanina	Vermelho	-	E162	Beet powder, Beetroot red
Antocianinas (de frutas e hortaliças)	Violeta	-	E163(i)	Anthocyanins
Extrato de casca de uva	Púrpura vermelho	-	E163(ii)	Grape skin extract
Animal				
Carmim, cochonilha, ácido carmínico, sais de Na, K, NH ₄ e Ca	Vermelho	75470	E120	Carmine, Carminic acid, Cochineal, CI Natural Red 4
Microbiano				
Licopeno	Vermelho	75125	E160d(iii)	Lycopene, Natural Yellow 27

CI: Color Index. Fonte: adaptado de ANVISA (2015) e EU Commission (2012).

Apesar de considerarmos intuitivamente que há uma diferença clara entre os termos corante artificial e natural, não há um consenso ou definição oficial entre as

agências reguladoras mundiais, cada uma estabelecendo as definições, aprovações e os limites adequados de interesse. Tomando como comparação as legislações dos EUA e UE para uso de corantes naturais, por exemplo, o extrato de spirulina tem a sua utilização permitida à produtos específicos como gomas de mascar e em alguns doces, enquanto que o extrato de açafrão amarelo como corante alimentício não é aprovado nos EUA mas, aprovado para uso em alimentos na UE (LEHTO *et al.*, 2017).

Ademais, a demanda por maiores informações e clareza sobre as especificações para a classificação de um corante natural pelos consumidores levanta questões como, se aqueles corantes extraídos de fontes naturais que passam por um processo químico adicional para a fabricação final (clorofila cúprica, clorofilina cúprica) podem ser considerados como naturais (SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019; VIERA; PÉREZ-GÁLVEZ; ROCA, 2019).

Apesar de serem considerados alternativas mais seguras e sustentáveis em relação aos corantes sintéticos, os corantes naturais principalmente de origem vegetal, frequentemente possuem limitações por serem mais sensíveis ao calor, luz, oxigênio e às condições físico-químicas da matriz em que está presente (LEMOS *et al.*, 2016), além de possuir custo alto de obtenção associados com os métodos de extração, disponibilidade e uso de grandes quantidades de matéria prima e estarem sujeitas à sazonalidade (BECK; REDMAN, 1940; NIGAM; LUKE, 2016) e possibilidade de arrastar compostos indesejáveis de aroma e sabor próprios da matéria prima utilizada (SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019).

O mercado de sucesso de carotenóides (β -caroteno, luteína e astaxantina) de algas (DUFOSSÉ, 2018a), e de pigmentos provenientes do reino Fungi como os pigmentos *Monascus* e Natural Red (Arpink Red) de *Penicillium oxalicum* já utilizados na indústria de alimentos (SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019) vêm mostrando um método alternativo muito importante para a produção de corantes. Dessa forma, pesquisas extensivas estão sendo realizadas a fim de permitir a substituição dos corantes sintéticos por corantes naturais, concentrando esforços para a redução do custo de produção de melhoramentos da estabilidade físico-química destes compostos (DUFOSSÉ, 2018a).

Além de conferir cor, os corantes naturais possuem outras aplicações importantes para a indústria de alimentos por frequentemente possuírem propriedades biológicas de interesse que auxiliam na manutenção ou melhoramento da segurança,

frescor, valor nutricional além de melhorar o sabor, textura e aparência dos alimentos (MA *et al.*, 2019; RODRIGUEZ-AMAYA, 2016; STOLL *et al.*, 2019).

Estes corantes possuem funcionalidades que beneficiam a saúde como, atividade anticâncer, antimicrobiana, antioxidativa, antiobesidade, antiinflamatória e como potencial agente para terapias neurológicas, entre outros (ANANTHARAMAN *et al.*, 2014; SHAHID-UL-ISLAM; RATHER; MOHAMMAD, 2016; VENIL; DUFOSSÉ; RENUKA DEVI, 2020). Dessa forma, os esforços científicos têm sido direcionados para a substituição dos corantes artificiais pelos corantes naturais, explorando a diversa existência de pigmentos sintetizados pelas plantas e principalmente microrganismos, tornando-se uma área chave para o desenvolvimento e descoberta de novos corantes naturais (NIGAM; LUKE, 2016; SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019), incluindo suas aplicações fora da área de alimentos, por exemplo, na indústria farmacêutica.

3.4 Corantes naturais azuis

A variedade de azuis que observamos na natureza não são sempre provenientes dos pigmentos. Muitos animais como borboletas e aves não são azuis devido a produção de pigmentos, mas devido à presença de nanoestruturas nas escamas ou penas que cancelam todas as outras cores da luz, refletindo a luz azul (DOUCET *et al.*, 2006; VIDAL, 2011). Os pigmentos azuis, apesar de poderem ser encontrados em diferentes organismos, desde animais, plantas e microrganismos, estes são significativamente raros na natureza (NEWSOME; CULVER; BREEMEN, 2014).

São compostos que absorvem luz vermelha e comumente possuem ligações duplas conjugadas, sistemas de anéis aromáticos, heteroátomos e cargas inônicas. Os complexos com metais de transição e os compostos organometálicos são frequentemente mais brilhantes devido ao favorecimento da transição da energia eletrônica para o desenvolvimento de cor. Ademais as ligações adicionais com heteroátomos, tais como grupos -NH₂, -OH, =O, -Cl, entre outros, podem favorecer a transição da energia eletrônica para a produção do deslocamento para comprimento de onda maiores, chamado de deslocamento batocrômico, de absorção e desenvolvimento de coloração azulada (NEWSOME; CULVER; BREEMEN, 2014).

Associações intramoleculares ou intermoleculares entre pigmentos e/ou outros compostos incolores como compostos orgânicos incolores ou íons metálicos

podem também gerar mudança ou incremento na intensidade da cor (BOULTON, 2001). Esse fenômeno é chamado de copigmentação, e pode ser observado em antocianinas, que é uma classe de pigmentos que muitas vezes não são azuis, e sim vermelhos por serem moléculas que naturalmente absorvem luz azul, mas que desenvolvem a cor azulada quando estão ligados à grupamentos químicos capazes de deslocar a absorção para o comprimento de onda do vermelho (ESCOTT *et al.*, 2018). Semelhantemente, os carotenóides, que são originalmente avermelhados, quando complexados com iodo, ou interagidos com cadeias laterais de aminoácidos, ou carregados positivamente, resultam em carotenoproteínas azuis (NEWSOME; CULVER; BREEMEN, 2014).

As plantas podem apresentar várias classes de pigmentos (carotenóides, clorofilas, betalaínas), mas as antocianinas são fontes da maioria das cores de tons azulados e púrpuras para as indústrias de alimentos e bebidas. Porém, a aplicação é limitada devido a problemas de estabilidade da molécula e manutenção da cor em meios que não sejam levemente ácidos ou neutros (pH 5-7) (NEWSOME; CULVER; BREEMEN, 2014).

De forma semelhante, os pigmentos pertencentes ao grupo dos azulenos como o chamazuleno e guaiazuleno, que são formados durante o processo de produção de óleos essenciais de plantas como *Matricaria chamomilla* e *Artemisia absinthium* (BATIHA *et al.*, 2020), tendem a ser lipossolúveis e de baixa estabilidade (REZA; TREJO; VERA-ÁVILA, 2002). Ademais, o chamazuleno ainda apresenta difícil processo de purificação (ABDELHAMEED *et al.*, 2017), sendo o uso direto do óleo essencial limitado devido ao aroma e odor herbáceos característicos que podem interferir negativamente nas características organolépticas dos alimentos (YANGILAR; YILDIZ, 2018), enquanto que o guaiazuleno, está disponível comercialmente e é aprovado para o uso em cosméticos (FDA, 2020).

Outros pigmentos azulados derivados de plantas, como indigotina e seus derivados de *Indigosfera tinctoria* ou *Isatis tinctoria*, também possuem sensibilidade à luz e alterações pH que são atributos chave para aplicação em alimentos e bebidas. Enquanto os pigmentos derivados de iridóis de *Genipa americana* e *Gardenia jasminoides*, apesar de possuírem certa estabilidade à luz e pH, o uso é limitado (NEWSOME; CULVER; BREEMEN, 2014), sendo alguns destes não aprovados nos EUA ou UE por questões toxicológicas (SANTOS, M. C. Dos; BICAS, 2021).

Contudo, a produção de pigmentos do tipo ficocianina azuis por cianobactéria *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) permitiu a produção comercial de extrato e a aprovação pela FDA para utilização como aditivo de cor em alimentos como confeitos, sorvetes, bebidas e gelatinas (FDA, 2017), sendo o principal pigmento azulado encontrado no extrato de spirulina, a ficocianina, podendo ser encontrada também certa quantidade de aloficocianina, que também contribui para a coloração azulada do extrato (WHO, 2019).

Apesar do extrato de spirulina ainda possuir limitada aplicação devido às questões de estabilidade como baixa estabilidade à luz, temperatura e matrizes ácidas (CHOI, W. Y.; LEE, 2018; FAIETA *et al.*, 2020), a produção comercial e aprovação do uso na indústria de alimentos mostra o grande potencial dos pigmentos azuis de origem microbiana.

As opções de pigmentos naturais ainda são escassas e ainda enfrentam regulamentações complexas para garantir a aplicação especificada e o consumo seguro. Existem uma variada gama de pigmentos azulados microbianos descobertos e em desenvolvimento que estão apresentados em revisões como de Newsome *et al.* (2014) e Santos, M. C. dos e Bicas (2021), que enfrentam várias dificuldades como a obtenção da aprovação regulatória e o desenvolvimento de corantes naturais estáveis.

A aprovação regulatória é um dos mais importantes entraves, por ser um processo laborioso e moroso que envolvem a obtenção de informações químicas, biológicas e toxicológicas detalhadas que são estipulados pela autoridade regulamentadora, podendo variar de acordo com o país em que a aprovação é requerida (KRAMER *et al.*, 2019; WROLSTAD; CULVER, 2012). Dentre essas avaliações, a toxicológica é a mais crítica, envolvendo avaliações como toxicocinética, genotoxicidade, toxicidade subcrônica/crônica e carcinogenicidade (KRAMER *et al.*, 2019), e a obtenção desses dados é um dos parâmetros críticos que definem a viabilidade inicial do desenvolvimento do corante que seja seguro para aplicação em alimentos ou cosméticos.

Ademais, os novos corantes também devem apresentar a tonalidade desejada, estabilidade, aplicabilidade e custo competitivo (NEWSOME; CULVER; BREEMEN, 2014), mostrando assim a necessidade de intensificação dos estudos nesta área a fim de produzir alternativas naturais que sejam seguras, melhores e competitivas aos corantes sintéticos.

3.5 Metabolismo secundário microbiano e produção de pigmentos

O metabolismo secundário e a vasta coleção de produtos sintetizados, os metabólitos secundários, por grupos específicos de organismos pertencentes aos diversos reinos da vida, desde bactérias e fungos até plantas e animais possuem diversas funcionalidades relacionados à sobrevivência como o crescimento, desenvolvimento, comunicação, defesa, reprodução e dispersão (FRANZONI *et al.*, 2019; PIEL, 2010). O metabolismo secundário exerce um papel importante na produção de compostos espécie-específicos que possibilitam a tolerância, manutenção e homeostase do organismo em condições bióticas e abióticas desfavoráveis, e atuam nas interações inter e intraespecíficas conferindo benefícios para a sobrevivência, competitividade e coevolução entre as diferentes espécies (PIEL, 2010).

Ainda que a maioria dos organismos vivos possuam a capacidade de produzir metabólitos secundários, os fungos filamentosos e as bactérias encontram uma posição de destaque. Estes microrganismos produzem uma variedade de metabólitos secundários que incluem desde toxinas, carotenóides, compostos fenólicos, vitaminas e ácidos orgânicos, muitos dos quais possuem propriedades úteis para a humanidade, como princípios ativos para indústria farmacêutica (antibióticos, fotoprotetores) (VAISHNAV; DEMAINE, 2011) e cosmética (tonalizantes, biobatons, biodelineadores, biomáscaras para cílios) (RAMESH *et al.*, 2019; SATHASIVAM; KI, 2018), aditivos para a indústria alimentícia humana e animal (corantes, aromas, vitaminas, conservantes, antioxidantes) (KALLSCHEUER *et al.*, 2019; RAMESH *et al.*, 2019; SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019), e compostos bioativos para a indústria agrícola (fertilizantes, defensivos, hormônios de crescimento) (MISHRA; ARORA, 2018; RAMESH *et al.*, 2019) entre outros (bioindicadores) (RAO; XIAO; LI, 2017; SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019).

As perspectivas econômicas e de aplicação desses compostos de diferentes origens e naturezas químicas, que apresentam propriedades farmacológicas distintas, têm sido descritas em várias revisões (KALLSCHEUER *et al.*, 2019; SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019; VAISHNAV; DEMAINE, 2011), e uma coleção de estudos vêm sendo publicada nos últimos anos, como estudos relacionados à identificação dos agrupamentos de genes responsáveis pela biossíntese desses compostos assim como o estabelecimento dos vários mecanismos

de ativação e regulação envolvidos, tais como os parâmetros físicos (pH, temperatura, umidade, aeração), químicos (proporção de nutrientes disponíveis) e o estágio no ciclo de vida do microrganismo. No entanto, o entendimento mais amplo para o aumento da síntese dos metabólitos secundários de interesse ainda é limitado (MARTÍN *et al.*, 2019; SINGH *et al.*, 2019).

Os microrganismos produzem uma variedade de pigmentos, que incluem desde os pigmentos fluorescentes aos pigmentos não fluorescentes, podendo observar mais de 260 dos principais pigmentos produzidos pelas diferentes espécies numa revisão publicada recentemente (RAMESH *et al.*, 2019), sendo os carotenóides, antraquinonas, pigmentos monascus e riboflavina os principais pigmentos produzidos para a indústria de alimentos (NIGAM; LUKE, 2016; SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019).

Dentre os carotenóides, a produção comercial de β -caroteno é principalmente realizada por *Blakeslea trispora*, *Mucocircinelloides* e *Phycomyces blakesleeanus*, com aplicação em óleos vegetais, bebidas à base de laranja, margarina entre outros, enquanto o licopeno é produzido comercialmente pela inibição da formação de β -caroteno em *Blakeslea trispora* (HERNÁNDEZ-ALMANZA *et al.*, 2016; SAINI; PABBI; SHUKLA, 2018). Já o Natural Red (antraquinonas), produzido por *Penicillium oxalicum*, é recomendado pela Comissão do Codex Alimentarius (CAC) e utilizado em vários produtos alimentícios como produtos cárneos, bebidas e confeitos (DUFOSSÉ, 2016).

A riboflavina é produzida comercialmente por *Ashbya gossypii*, *Candida famata* e *Bacillus subtilis*, e utilizada como aditivo alimentício em cereais, macarrão, molhos, queijos processados, produtos lácteos, bebidas de frutas, entre outros (NIGAM; LUKE, 2016; SOLYMOSI *et al.*, 2015). Ao passo que, os pigmentos monascus, têm como as principais espécies produtoras *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. ruber* e *M. frigidanus*, dos quais os pigmentos são utilizados como aditivos alimentícios em vinhos tintos, salsichas, carnes, entre outros (CARO *et al.*, 2017; NIGAM; LUKE, 2016).

Apesar do uso dos pigmentos monascus não serem permitidos na Europa e nos EUA devido ao risco de contaminação com a micotoxina citrinina que pode ser produzida concomitantemente, mesmo já existindo atualmente linhagens não produtoras desta toxina, estes pigmentos têm sido legalmente e tradicionalmente

utilizados como corantes alimentícios nos países asiáticos por milhares de anos (DUFOSSÉ, 2018b).

A possível produção concomitante de algumas toxinas nos leva a acreditar que pigmentos provenientes de plantas pareçam mais seguras, no entanto, nem sempre estas fontes também vão nos fornecer produtos livres de toxinas. Dependendo da fonte vegetal utilizada, como por exemplo a obtenção de antocianinas de bagaço de uva, contaminações consideráveis de micotoxinas como a ocratoxina A produzidos principalmente por *Aspergillus* spp. podem ser encontradas (DUFOSSÉ, 2018b).

Dessa forma, a escolha de uma linhagem não patogênica, investigação e controle da via metabólica de biossíntese e seleção da composição do meio de cultivo são cruciais para o controle da produção de toxinas e garantir a produção de pigmentos microbianos seguros de aplicabilidade em alimentos (DUFOSSÉ, 2018b; RAO; XIAO; LI, 2017).

Na Tabela 4 estão listados os pigmentos microbianos que estão sendo utilizados atualmente como corantes naturais em alimentos e suas respectivas espécies produtoras pertencentes aos grupos das microalgas, bactérias, cianobactérias e fungos (SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019).

Tabela 4. Pigmentos microbianos utilizados como corantes naturais para alimentos.
(Continua)

Pigmento	Cor	Microorganismo	Bioatividade
Microalga			
Astaxantina	Rosa-vermelho	<i>Haematococcus pluvialis</i>	Antioxidante, fotoprotetor, anticancerígeno, anti-inflamatório
β -caroteno	Laranja	<i>Dunaliella salina</i>	Anticancerígeno, antioxidante
Luteína	Amarelo	<i>Chlorella</i> sp.	Antioxidante
Cianobactéria			
Ficocianina	Azul	<i>Arthrospira</i> sp. (<i>Spirulina</i> sp.)	Antioxidante, antitumoral, imunoregulador
Bactéria			
Astaxantina	Rosa-vermelho	<i>Agrobacterium aurantium</i>	Antioxidante, anticancerígeno, anti-inflamatório
Prodigiosina	Vermelho	<i>Serratia marcescens</i> , <i>Pseudoalteromonas rubra</i>	Anticancerígeno, imunossupressor
Piocianina	Azul, verde	<i>Pseudomonas</i> spp.	Antibacteriano, antifúngico, antioxidante (SALEEM <i>et al.</i> , 2021)

Tabela 4. Pigmentos microbianos utilizados como corantes naturais para alimentos.
(Conclusão)

Pigmento	Cor	Microrganismo	Bioatividade
Fungos			
Ancaflavina	Amarelo	<i>Monascus</i> sp.	Antitumoral, anti-inflamatório
Antraquinonas	Vermelho (Natural Red / Arpink red)	<i>Penicillium oxalicum</i>	Antifúngico, virucida
β-caroteno	Amarelo-laranja	<i>Blakeslea trispora</i> , <i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>Mucor circinelloides</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Phyconyces</i> , <i>Blakesleeanus</i>	Anticancerígeno, antioxidante
Monascorubramina	Vermelho	<i>Monascus</i> spp.	Antioxidante, Anticancerígeno
Riboflavina	Amarelo	<i>Ashbya gossypii</i>	Anticancerígeno, antioxidante
Rubropunctatina	Laranja	<i>Monascus</i> spp.	Anticancerígeno

Fonte: adaptado de Sen et al. (2019).

No artigo de revisão do qual foram obtidas as informações da Tabela 4, há também informações sobre outras espécies de leveduras e arqueias que estão em desenvolvimento, enquanto que a revisão de Venil et al. (2020) particulariza o potencial de outras bactérias, ambos examinando e discutindo a importância, as

vantagens, aplicabilidade, segurança, o cenário do mercado, as novas tecnologias e métodos, e os desafios ainda existentes para o desenvolvimento de pigmentos microbianos aplicáveis em alimentos.

Muitas pesquisas têm sido realizadas para avaliação da bioatividade destes pigmentos microbianos já que, além de conferir cor, estes compostos possuem variadas funcionalidades farmacológicas interessantes que beneficiam e promovem a saúde e o bem-estar humano incluindo atividade antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena, imunoreguladora, anti-inflamatória, antiparasítica, entre outras (Tabela 4).

Sabe-se que os fungos são produtores importantes de pigmentos e vêm sendo investigados há algum tempo como fonte disponível de corantes quimicamente diferentes tais como carotenóides, melaninas, flavinas, fenazinas, quinonas, e as violaceínas (COPETTI, 2019). Os fungos possuem um papel chave na produção microbiana de pigmentos de grau alimentício devido ao diverso espectro de tons de cor e perfis químicos, cultivo menos complexo, em condições amenas e facilidade na ampliação de escala (DUFOSSÉ *et al.*, 2014).

De forma geral, a utilização dos microrganismos em processos fermentativos para produção de pigmentos possuem várias vantagens e possibilidades de uma produção de custo reduzido, alta produtividade, extração facilitada, utilização de matérias primas de baixo custo e/ou de resíduos agroindustriais (RODRIGUES, T. A. *et al.*, 2019), de fácil escalabilidade, não sofre com variação sazonal e permite a utilização de técnicas estatísticas de otimização do processo fermentativo e de extração (NIGAM; LUKE, 2016), melhoramento genético da linhagem, engenharia genética para expressão heteróloga e engenharia metabólica para a potencialização da biossíntese dos pigmentos naturais (SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019).

Os pigmentos microbianos tendem a ser mais estáveis que os pigmentos naturais de origem vegetal, por serem sintetizados em resposta às condições desfavoráveis para o crescimento como, escassez ou excesso de nutrientes (HUANG, T. *et al.*, 2017; STUDDT; TUDZYNSKI, 2014), radiação luminosa (PALACIO-BARRERA *et al.*, 2019), temperatura (ALEM *et al.*, 2020), estresse oxidativo (NANOU; ROUKAS, 2011), entre outros, a fim de auxiliar na homeostase, tolerância e sobrevivência destes microrganismos nesses ambientes (PIEL, 2010).

No entanto, os pigmentos microbianos ainda são pouco estáveis em comparação aos corantes sintéticos e sofrem sérios efeitos dos fatores ambientais do processamento e armazenamento como luz, pH, temperatura (MORALES-OYERVIDES *et al.*, 2015), oxigênio, atividade de água, radiação ultravioleta, tempo, e também da matriz alimentícia em que está inserido, o que acaba limitando a ampla aplicação destes pigmentos (SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019).

Os pigmentos microbianos possuem estruturas e naturezas químicas diversas de acordo com as suas origens e funções, que refletem nas condições ótimas específicas de estabilidade e solubilidade de cada pigmento. Deste modo, nos pigmentos *monascus*, por exemplo, por ser uma mistura de pigmentos vermelho, laranja e amarelo, a proporção desses pigmentos na composição é um fator que afeta os parâmetros de estabilidade, já que cada um possui um perfil de estabilidade diferente (SRIANTA *et al.*, 2014) tal como, o pigmento laranja, que possui uma degradação maior em pH alcalino enquanto que o vermelho possui uma degradação reduzida em pH alcalinos (VENDRUSCOLO *et al.*, 2013).

Neste contexto, tecnologias como microencapsulamento (ARAB *et al.*, 2019; VENIL *et al.*, 2015), nanoemulsões e nanoformulações estão sendo desenvolvidas e utilizadas a fim de melhorar a estabilidade e a solubilidade dos pigmentos naturais e sua faixa de aplicabilidade (SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019). Apesar disso, a crescente demanda e a necessidade do desenvolvimento de métodos que auxiliam no melhoramento da estabilidade dos pigmentos naturais, a descoberta e a disponibilidade de novas moléculas naturais auxiliam no desenvolvimento de tecnologias de produção e formulação de corantes naturais mais competitivos (SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019).

Assim, nos últimos anos está ocorrendo um crescimento no interesse e na procura de fontes únicas de obtenção e exploração de novas linhagens microbianas que possuam perspectivas de produção de pigmentos e produtos naturais bioativos. Além das fontes tradicionais de isolamento de linhagens produtoras de pigmentos como solo e plantas (PEYRAT *et al.*, 2019), o ambiente marinho vem chamando a atenção dos pesquisadores como fonte de fungos para a descoberta de novos produtos naturais (OVERY *et al.*, 2019). Um exemplo particular é a obtenção de linhagens de *Talaromyces* spp. isolados de ambientes marinhos que vêm chamando a atenção como bons produtores de compostos coloridos solúveis em água, de

tonalidades do laranja ao vermelho (AGUILAR *et al.*, 2018; VENKATACHALAM *et al.*, 2018).

Apesar da identificação de novas linhagens e novos pigmentos microbianos com grande potencial de uso, tanto de bactérias (ASKER, 2018; VENIL; DUFOSSÉ; DEVI, 2020), cianobactérias (DEJSUNGKRANONT; CHISTI; SIRISANSANEEYAKUL, 2017; SAINI; PABBI; SHUKLA, 2018), microalgas (RAHMAN *et al.*, 2017), leveduras (ASKER, 2018) e fungos, muito poucos pigmentos microbianos podem ser utilizados como corantes de alimentos, os quais levaram décadas para o desenvolvimento e ainda continuam passando por entraves regulatórios que afetam a disseminação do uso (DUFOSSÉ, 2018b).

Dessa forma, percebe-se a complexidade e importância dos estudos nesta área a fim de obter pigmentos naturais microbianos mais competitivos em relação aos pigmentos sintéticos, auxiliando na ampliação da variedade de tonalidades de cores disponíveis para aplicação em alimentos juntamente com a promoção da saúde e garantia da segurança dos alimentos.

3.6 *Fusarium* spp. e produção de pigmentos

A demonstração e o crescimento abrangente da aplicação industrial de pigmentos policetídeos (azafilonas, hidroxiantraquinonas e naftoquinonas) de fungos filamentosos ascomicetos como *Monascus* spp., *Neurospora* spp. e *Fusarium* spp., em alimentos, cosmética, têxtil, couro, papel, ração animal e no delineamento de produtos farmacêuticos, mostra o grande potencial destes compostos como agentes corantes. Isso se deve à diversidade estrutural e funcional dos pigmentos pertencentes à essa família que vêm oferecendo uma alternativa interessante para obtenção de novos pigmentos naturais, de cores diferentes e mais vívidos (LEBEAU *et al.*, 2019).

Fusarium spp., incluem um número de espécies de fungos filamentosos patogênicos de plantas amplamente distribuídas no ecossistema que infectam várias cultivares economicamente importantes como cereais (trigo, aveia, arroz, milho), frutas (melão, banana), tubérculos (batata) e algodão causando redução na produtividade e contaminação por micotoxinas (EARLY, 2009; MICHELSE; REP, 2009). Produzem um diverso espectro de metabólitos secundários, desde micotoxinas como moniliformina, fusarina C, fumonisinas, ácido fusárico, eniatinas e beauviricina, até metabólitos de interesse econômico, como hormônios (giberelina) e pigmentos

(neurosporaxantina, bicaverina, fusarubina) (AVALOS *et al.*, 2017; STUDDT; TUDZYNSKI, 2014).

Devido à isso, algumas espécies pertencentes ao gênero *Fusarium* são modelos de pesquisa de processos biológicos bem estudados e conhecidos, como o *Fusarium fujikuroi* no estudo de promotores de crescimento de plantas (giberelina) e regulação da biossíntese de pigmentos, *Fusarium oxysporum* em estudos de patogenicidade em plantas e *Fusarium aquaeductuum*, assim como as outras duas espécies citadas, em estudos de carotegênese, sendo o principal carotenóide produzido a neurosporaxantina (AVALOS *et al.*, 2017; RUGER-HERREROS *et al.*, 2019).

Este grupo de microrganismos produz uma diversidade de metabólitos coloridos policetídicos, que leva ao reconhecimento como uma fonte promissora de pigmentos naturais (LEBEAU *et al.*, 2019). Os pigmentos vermelhos de naftoquinona como a aurofusarina, bicaverina, bostricoidina, javanicina, e novarubina são descritos como os produzidos em maior abundância, seguido pelos pigmentos hidroxiantraquinóicos, crisofanol, catenarina, eritroglaucina e tritisporina (CARO *et al.*, 2017). Outros pigmentos de coloração púrpura também foram identificados entre essas espécies como 8-O-metil anidrofusarrubina e purpurfusarina, além da confirmação recente da ocorrência de dois novos pigmentos de naftoquinonas púrpura solúveis em água (LEBEAU *et al.*, 2019).

3.6.1 *Fusarium oxysporum* e o pigmento bicaverina

Dentre as espécies de *Fusarium*, o *F. oxysporum* possui uma versatilidade de morfologia das colônias, variando entre isolados que não produzem nenhum pigmento aos que produzem pigmentos desde o púrpura pálido ao magenta escuro, sendo os pigmentos descritos na literatura de origem policetídica produzidas pela espécie: 2,7-dimetoxi-6-(acetoxietil)juglone (amarelo), bicaverina (vermelho), bostricoidina (vermelho), nectriafurona (amarelo), norjavanicina (vermelho), O-metil-6-hidroxinorjavanicina (amarelo), O-methilanidrofusarubina (laranja-vermelho), O-metilfusarubina (vermelho), O-metiljavanicina (vermelho) (MEDENTSEV; AKIMENKO, 1998), e dois novos pigmentos púrpura ainda não identificados, sendo o pigmento bicaverina (6,11-dihidroxi-3,8-dimetoxi-1-metil-benzo-xanteína-7,10,12-triona) o pigmento policetídeo majoritário produzido (LEBEAU *et al.*, 2019).

O papel da bicaverina na patogenicidade em plantas ainda não está claramente definido, no entanto, há sugestões de que a biossíntese desse composto pode possuir um papel na inibição de outros microrganismos saprofíticos auxiliando no processo de competição e virulência (BELL *et al.*, 2003; PALACIO-BARRERA *et al.*, 2019; SPRAKER *et al.*, 2018).

A produção do pigmento bicaverina é conservado nas espécies do complexo *Fusarium fujikuroi* (CFF), no qual englobam as espécies *F. fujikuroi*, *F. mangiferae*, *F. verticillioides*, *F. circinatum*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum* e *F. agapanthi* (EDWARDS *et al.*, 2016; MOUSSA *et al.*, 2017; STUDT; TUDZYNSKI, 2014). No entanto, a síntese de bicaverina pode ser encontrada em algumas espécies de *Botrytis*, sugerindo-se que o grupo de genes de biossíntese pode ter sido adquirido pelas linhagens ancestrais através de transferência horizontal de espécies de *Fusarium* (WIEMANN *et al.*, 2013).

A bicaverina é um pigmento que se acumula durante o cultivo no micélio em resposta às condições adversas de crescimento como escassez de nitrogênio, excesso de fonte de carbono, pH ácido, e sensibilidade à iluminação e aeração, que após autólise, é liberado como partículas insolúveis no meio (MEDENTSEV; ARINBASAROVA; AKIMENKO, 2005; PALACIO-BARRERA *et al.*, 2019; STUDT; TUDZYNSKI, 2014). Juntamente com a bicaverina, o precursor norbicaverina também pode ser encontrado no meio, porém em pequenas quantidades. Ademais, a síntese e acúmulo de bicaverina não está necessariamente relacionada com o crescimento celular, tendo relatos de produção maior em cultivos com menor quantidade de biomassa (PALACIO-BARRERA *et al.*, 2019).

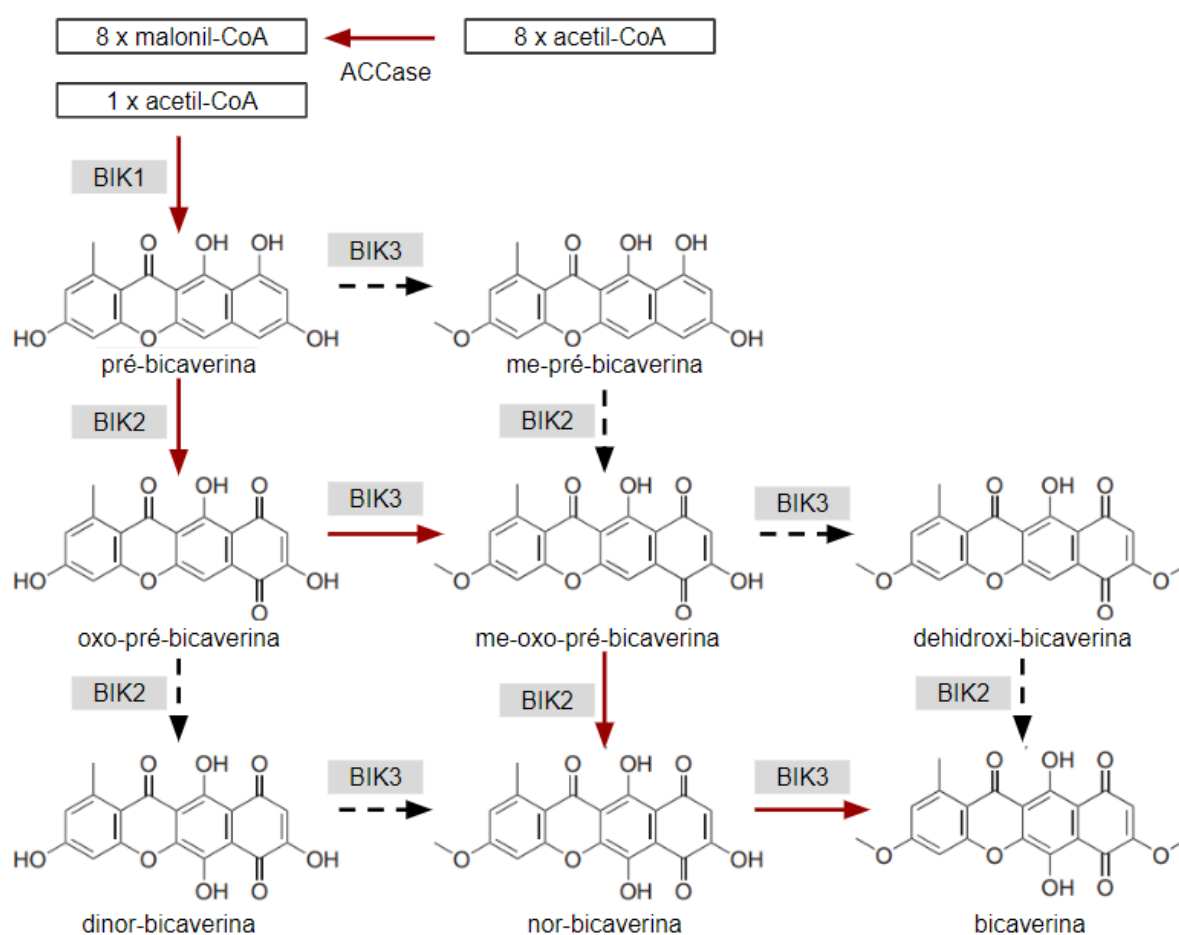
A bicaverina foi primeiramente isolada em 1949 a partir de *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* e *F. oxysporum* f. sp. *lycopersini* e nomeada de licopersina (KREITMAN; NORD, 1949). A renomeação para bicaverina ocorreu após alguns anos pelo isolamento de um composto semelhante à licopersina de *F. fujikuroi* (BALAN *et al.*, 1970) que foi elucidado estruturalmente por cristalografia de raio-X, espectroscopia de UV e IR, ressonância magnética nuclear e síntese química (CORNFORTH *et al.*, 1971; DE BOER *et al.*, 1971; KJÆR *et al.*, 1971).

A origem policetídica da bicaverina foi elucidada através de marcação isotópica do ácido acético (C13) que indicou a formação do esqueleto inteiro da molécula a partir de nove unidades de acetil-CoA (MCINNIS *et al.*, 1976) realizada

pelo tipo I de poliketídeo sintase (PKS), mais especificamente a PKS4 (LINNEMANNSTÖNS *et al.*, 2002), renomeada posteriormente para BIK1 (WIEMANN *et al.*, 2009).

A biossíntese de bicaverina envolve um grupo de genes composto por 6 genes, dentre os quais o bik1, o bik2 e bik3 são necessários para a codificação das respectivas enzimas responsáveis para a formação do precursor norbicaverina e bicaverina (Figura 4), enquanto que o bik4 e bik 5 funcionam como reguladores positivos, e o bik6 está mais envolvido no transporte da bicaverina para fora da célula (WIEMANN *et al.*, 2009).

Figura 4. Esquema da via de biossíntese da bicaverina em *F. fujikuroi*.



Setas de linhas contínuas (vermelhas) indicam a rota preferencial, enquanto que as setas descontinúas (pretas) indicam as outras rotas possíveis de síntese de bicaverina.

Fonte: adaptado de Arndt (2015).

A maior parte dos estudos realizados com linhagens de *F. oxysporum* tem essencialmente focado nas propriedades biológicas de seus principais metabólitos secundários incolores, como o ácido fusárico e beauvericina. No entanto, na literatura pode-se observar que a bicaverina é um policetídeo de grande interesse biotecnológico devido às suas habilidades em afetar variados processos biológicos que resultam em propriedades interessantes. Dentre essas propriedades interessantes encontramos: atividade antiprotozoária (*Leishmania braziliensis*) (BALAN *et al.*, 1970), antifúngica (*Aspergillus niger*) (CORNFORTH *et al.*, 1971), antibacteriana (*Ralstonia solanacearum* e linhagens patogênicas antibiótico resistentes) (DESHMUKH; MATHEW; PUROHIT, 2014; SPRAKER *et al.*, 2018), anti-oomítica (*Phytophthora infestans*) (KIM *et al.*, 2007; SON *et al.*, 2008), nematocida (*Bursaphelenchus xylophilus*) (KUNDU *et al.*, 2016; KWON *et al.*, 2007), antioxidante em linhagem celulares neuronais (NIRMALADEVI *et al.*, 2014), até atividade inibitória em linhagens celulares tumorais de mamíferos, dentre as quais, diferentes células tumorais humanas (FUSKA; PROKSA; FUSKOVA, 1975; HAIDAR *et al.*, 2019; ZHAN *et al.*, 2007).

Em relação ao quesito estabilidade e aplicação como potencial corante, estudos referentes a esses temas dos pigmentos produzidos por *F. oxysporum* são escassos. Porém, há relatos de que a bicaverina possui propriedades indicadoras devido à mudança de cor, do vermelho em soluções ácidas para azul-violeta em soluções alcalinas (CHELKOWSKI; ZAJKOWSKI; VISCONTI, 1992), além de possuir indicação de possuir um nível de estabilidade térmica semelhante ao carmim (extrato de cochonilha) que suporta uma exposição a 90°C por longos períodos de tempo (6 h) sem que ocorra mudança considerável de cor em soluções aquosas (FERNÁNDEZ-LÓPEZ *et al.*, 2013; PALACIO-BARRERA *et al.*, 2019), ainda de apresentar melhor estabilidade luminosa em condições específicas de pH (PALACIO-BARRERA *et al.*, 2019).

Apesar das evidências da importância da bicaverina em aplicações biológicas, estratégias de síntese química para a produção dessa molécula ainda não são bem desenvolvidas e exploradas (KJÆR *et al.*, 1971; PELAGEEV; BORISOVA; ANUFRIEV, 2018), sendo a obtenção comercial realizada principalmente por isolados pertencentes ao gênero *Fusarium* como o *F. subglutinans* (Bikaverin Sigma-Aldrich, Alemanha).

À vista disso, percebe-se a complexidade e a importância dos estudos nesta área a fim de obter pigmentos naturais microbianos mais competitivos em relação aos pigmentos sintéticos. Dessa forma, este projeto dará continuidade aos estudos realizados de otimização de produção e purificação do pigmento bicaverina obtido por fermentação submersa da linhagem de *F. oxysporum*, das biomassas vermelha e azul, sabendo-se que o pigmento bicaverina é o componente majoritário do extrato e que os estudos de toxicidade aguda, o qual seguindo a metodologia OECD 423 de 2001 resultaram em não toxicidade na concentração máxima administrada (MENDONÇA, 2019; SANTOS, M. C. Dos, 2020).

3.7 *Janthinobacterium* spp. e o pigmento violaceína

As espécies pertencentes ao gênero *Janthinobacterium* são bactérias Gram-negativas, móveis que têm sido isoladas de vários habitats, que incluem desde ambientes antárticos (MOJIB; ANDERSEN; BEJ, 2011) e aquáticos (LYAKHOVCHENKO *et al.*, 2021), plantas (KANG *et al.*, 2007), insetos (ZHANG *et al.*, 2011) e anfíbios (BRUCKER *et al.*, 2008). Este gênero engloba espécies como o *Janthinobacterium lividum* (O'SULLIVAN *et al.*, 1990), *J. svalbardensis* (AVGUŠTIN *et al.*, 2013), *J. agaricidamnosum* (GRAUPNER *et al.*, 2012), *J. violaceinigrum*, *J. aquaticum*, e *J. rivuli* (LU *et al.*, 2020). São bactérias ainda pouco estudadas mas que são capazes de produzir metabólitos secundários como jantocinas A, B e C (O'SULLIVAN *et al.*, 1990), jagaricina (GRAUPNER *et al.*, 2012), violaceína (PANTANELLA *et al.*, 2006) e outros pigmentos não identificados (AVGUŠTIN *et al.*, 2013).

As jantocinas são lactonas decapeptídicas macrocíclicas que demonstraram atividade antibacteriana semelhante ou superior que a vancomicina, contra várias bactérias Gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina e enterococo resistente à vancomicina (O'SULLIVAN *et al.*, 1990).

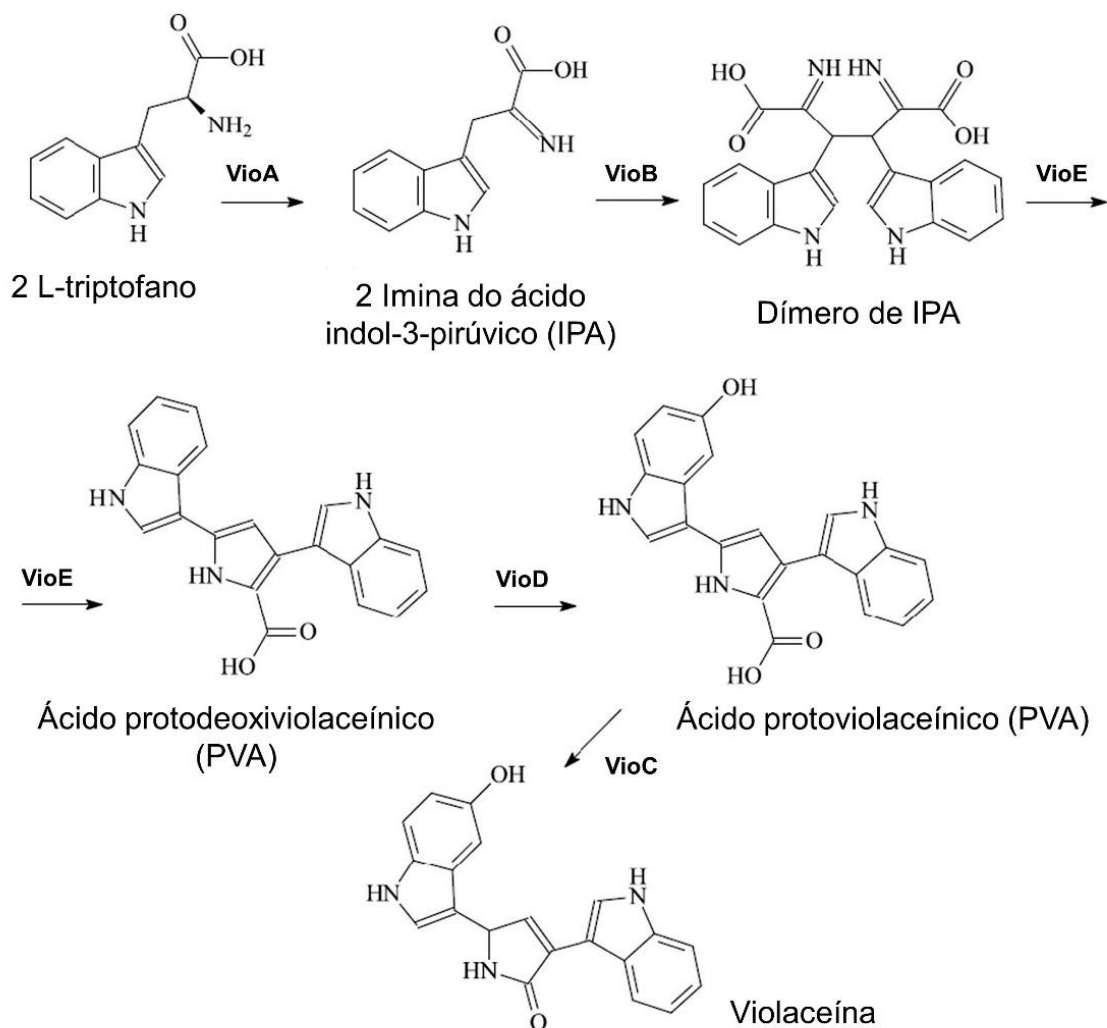
A jagaricina é um lipopeptídeo cíclico isolado de *J. agaricidamnosum* causador da podridão mole (soft rot) em cogumelos, que demonstrou forte atividade antimicrobiana contra fungos patogênicos humanos como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *A. terreus* (GRAUPNER *et al.*, 2012).

A violaceína (3-(1,2-dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilidene)-1,3-dihidro-2H-indol-2-one) é um pigmento alcalóide indol púrpura-azul derivado do aminoácido triptofano biossintetizado não só por *Janthinobacterium*, mas

por diversas linhagens bacterianas pertencentes aos gêneros *Chromobacterium*, *Collimonas*, *Duganella*, *Microbulbifer*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, entre outros, isolados a partir de habitats diversos como solos, águas marinhas até habitats glaciais (KANELLI *et al.*, 2018).

A violaceína é um metabólito secundário que, em *Chromobacterium*, é biossintetizado em uma via que envolve cinco enzimas e a transformação de dois resíduos de L-triptofano (Figura 5). A primeira enzima, chamada de VioA, inicia a biossíntese catalisando a reação de oxidação do triptofano para formação da imina de ácido indol-3-pirúvico (IPA), que logo é dimerizado pela VioB. O dímero de IPA é convertido em ácido prodeoxiviolaceínico por VioE, passando para VioD capaz de hidroxilar na posição 5 do anel indol e produzir a proviolaceína. Finalmente, a proviolaceína é oxidada na posição 2 do outro anel indol pela VioC resultando na produção da violaceína (DURÁN, N. *et al.*, 2016).

Figura 5. Esquema da via de biossíntese da violaceína em *Chromobacterium violaceum*. VioA: triptofano 2-monooxigenase dependente de flavina adenina dinucleotídeo (FAD); VioB: poliketídeo sintase; VioC e VioD: monooxigenases dependentes de FAD; VioE: prodeoxiviolaceína sintase.



Em espécies selvagens, durante a biossíntese de violaceína podem ser formados também subprodutos como a oxiviolaceína e a deoxiviolaceína. Comparada à violaceína, a oxiviolaceína possui um átomo de oxigênio a mais na posição 20 do anel indol, enquanto que a deoxiviolaceína possui um átomo de oxigênio a menos na posição 6 do anel indol (WANG, H. *et al.*, 2012). Estes subprodutos, apesar de serem produzidos em baixas quantidades, a deoxiviolaceína pode normalmente compor até 10% do pigmento produzido pela biossíntese de violaceína (WANG, H. *et al.*, 2012).

A violaceína é um pigmento de boa capacidade tintorial e estabilidade, frequentemente associado à produção de biofilme e mecanismos de quorum sensing (NEWSOME; CULVER; BREEMEN, 2014), sendo o *Chromobacterium violaceum* a espécie produtora mais estudada e conhecida (CHOI, S. Y. *et al.*, 2015; KANELLI *et al.*, 2018) e o *Janthinobacterium lividum* utilizado para a obtenção comercial (Violacein Sigma-Aldrich, Alemanha), já que o *J. lividum* é classificado no nível de biossegurança mais baixo (NB-1), enquanto que o *C. violaceum* possui um risco moderado (NB-2).

As espécies produtoras selvagens ainda são consideradas de baixa produção, levando ao desenvolvimento de estudos com produção heteróloga. Produção de violaceína heteróloga em *Citrobacter freundii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli* têm sido realizados, conseguindo-se uma produção superior com linhagem recombinante de *E. coli* com 4,45 g/L de violaceína (YANG *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2018).

A violaceína possui um amplo espectro de propriedades biológicas, tais como ação antimicrobiana, com destaque para as linhagens patogênicas resistentes a antibióticos (*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina), atividades antiparasitárias, antivirais, antitumorais, antioxidantes, antiulcerogênica, imunomodulatória, antinociceptiva, além de apresentar boa capacidade de conferir propriedades antimicrobianas em tecidos tingidos com este pigmento (CAUZ *et al.*, 2019; CHOI, S. Y. *et al.*, 2015; KANELLI *et al.*, 2018).

O mecanismo de ação bactericida da violaceína envolve a alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática, principalmente de bactérias Gram-positivas (*Streptococcus*, *Enterococcus* e *Listeria*), e também de linhagens resistentes aos antibióticos. Como o mecanismo é pouco específico, a violaceína apresenta atividade contra os diferentes tipos de patógenos (bactérias, fungos, protozoários, vírus) e células tumorais, levantando questionamentos sobre sua segurança toxicológica. No entanto, apesar da falta de estudos de toxicidade *in vivo* da violaceína, Cauz *et al.* (2019) sugerem que esta não deve ser uma molécula muito tóxica e, caso venha a apresentar toxicidade muito elevada, ela ainda poderia ser utilizada na forma modificada (mais seletiva) para fins terapêuticos. Há também estudos de toxicidade de 35 dias em camundongos que demonstram boa tolerância em doses diárias de até 1000 µg/kg i.p. sem causar hematotoxicidade, ou toxicidade renal e hepática (BROMBERG *et al.*, 2010).

Dessa forma, a violaceína apresenta potencial uso comercial, com oportunidades para aplicações em fármacos e cosméticos, tecidos, materiais médicos e alimentos (DURÁN, M. *et al.*, 2012). No entanto, apesar de bastante estudada, a produção comercial de violaceína ainda possui baixa produtividade e o seu uso em alimentos ainda necessita de avaliações de segurança e aprovação regulatória (SIGURDSON; TANG; GIUSTI, 2017; ZHOU *et al.*, 2018).

Diante do exposto, percebe-se a complexidade e importância dos estudos nesta área a fim de obter pigmentos naturais microbianos mais competitivos em relação aos pigmentos sintéticos. Deste modo, este projeto, além de dar continuidade aos estudos realizados de obtenção de corantes vermelho e azul a partir de *F. oxysporum*, iniciou estudos de produção de violaceína por *Janthinobacterium* sp., com foco na produção de corantes azulados para possível aplicação em formulações alimentícias e cosméticas. Esperando-se, assim, ampliar o painel de corantes naturais disponíveis para uso comercial bem como contribuir com a promoção da saúde e garantia de um produto mais seguro e ambientalmente mais amigável.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi composto por duas grandes partes, uma para cada microrganismo estudado: 1) avaliação das condições de produção de corantes azulados a partir dos corantes vermelhos ricos em pigmento bicaverina produzidos por *Fusarium oxysporum* CCT7620 (Figura 6); e 2) isolamento e identificação de bactéria púrpura e do pigmento produzido, e avaliação de diferentes meios líquidos para crescimento celular e produção de pigmento (Figura 7).

Na parte de avaliação das condições de obtenção de corantes azulados de *Fusarium* foram realizados os seguintes procedimentos, que serão detalhadamente descritos nas seções seguintes (em 4.1 e 4.3):

- Manutenção do *F. oxysporum* CCT7620 e obtenção do inóculo;
- Fermentação em meio líquido e obtenção da biomassa vermelha úmida (BVU) e biomassa vermelha centrifugada (BVC);
- Avaliação dos materiais ricos em celulose para obtenção de biomassa azul úmida (BAU);
- Avaliação da adição de compostos alcalinos e metálicos para obtenção de BAU;
- Avaliação da adição de diferentes tipos de água na formação de BAU;
- Obtenção de biomassa azul (BA) por conversão direta da BVC;
- Obtenção do extrato vermelho bruto em acetato de etila (EVB) e extrato vermelho concentrado (EV);
- Obtenção de extratos azuis (EA) a partir da adição de compostos alcalinos, metálicos e arginina nos corantes vermelhos;
- Análise quantitativa de elementos químicos selecionados por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) dos papéis Alveflor (PA) e Biopel (PB);
- Análise de cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada a espectrômetro de massas em tandem (UHPLC-MS/MS) do EA obtido por reação com arginina;
- Avaliação da capacidade antioxidante do extrato vermelho (EV).

Na parte de isolamento e identificação de bactéria púrpura e do pigmento produzido, e avaliação de diferentes meios líquidos para crescimento celular e

produção de pigmento, foram realizados os seguintes procedimentos, que serão detalhadamente descritos nas seções seguintes (em 4.2 e 4.3):

- Isolamento e identificação de bactéria púrpura;
- Identificação por UHPLC-MS/MS do pigmento produzido pela bactéria púrpura;
- Manutenção do isolado e preparo do inóculo;
- Avaliação de diferentes meios para o crescimento celular e produção de violaceína pela bactéria púrpura.

Figura 6. Esquema dos principais procedimentos realizados para a avaliação das condições de produção de corantes azulados a partir dos corantes vermelhos em bicaverina produzidos por *Fusarium oxysporum* CCT7620. BVU: Biomassa vermelha úmida. BVC: Biomassa vermelha centrifugada. EVB: Extrato vermelho bruto concentrado em acetato de etila. EV: Extrato vermelho. BAU: Biomassa azul úmida. BA: Biomassa azul. EA: Extrato azul.

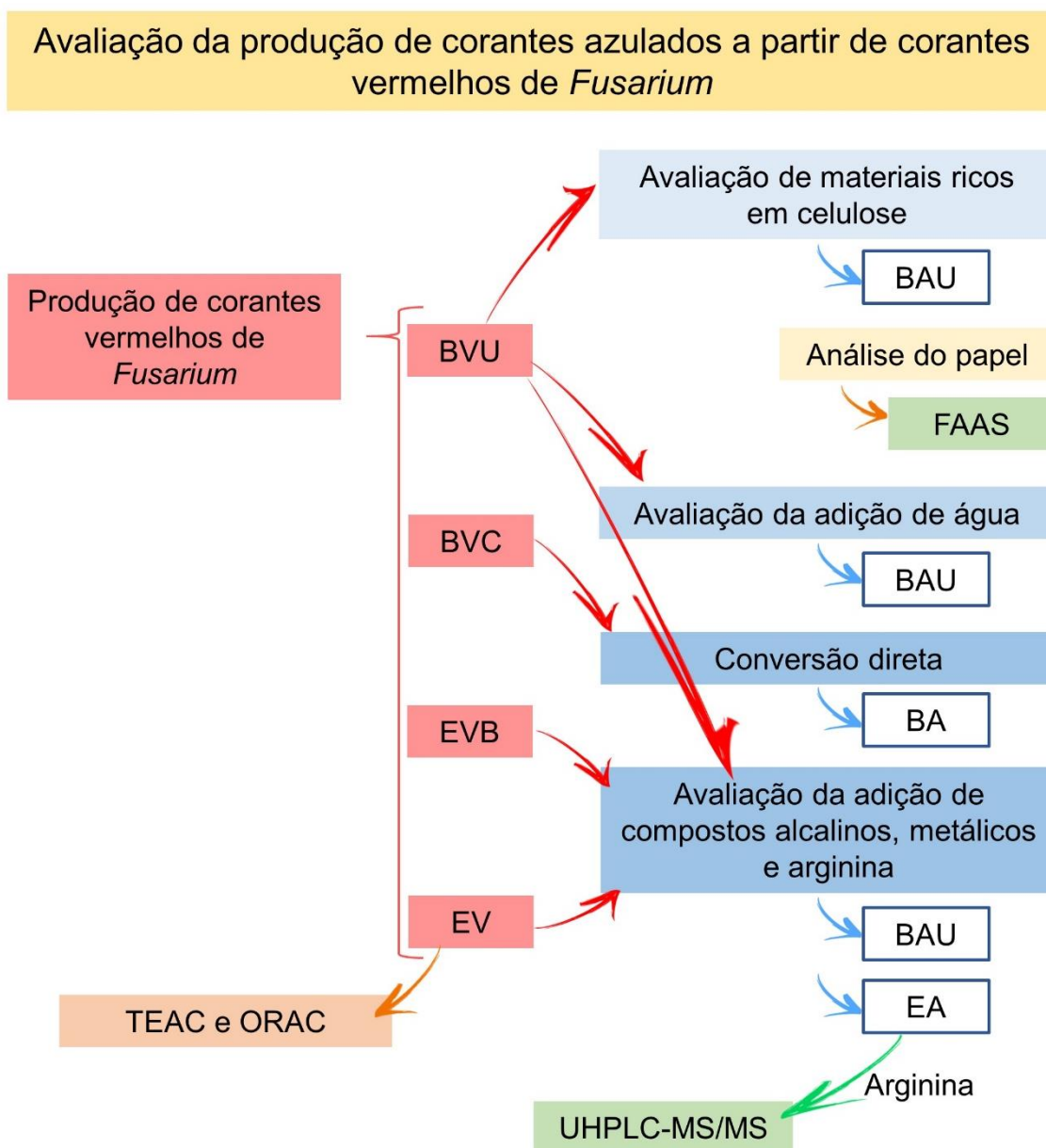
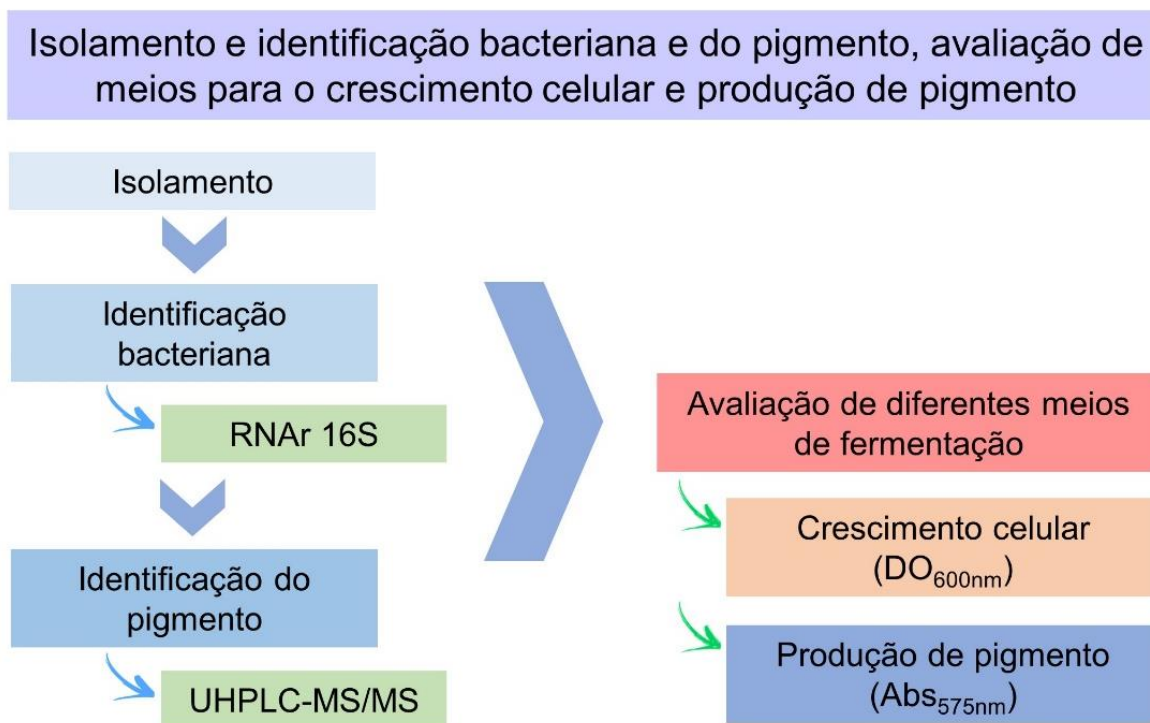


Figura 7. Esquema dos principais procedimentos realizados para o isolamento e identificação bacteriana e do pigmento, avaliação de meios líquidos para crescimento celular e produção de pigmento.



4.1 Avaliação das condições de produção das biomassas e extratos azulados por fermentação de *F. oxysporum* CCT7620

4.1.1 Manutenção do *F. oxysporum* CCT7620 e obtenção do inóculo

O fungo filamentoso utilizado neste estudo foi isolado, identificado e depositado em estudo anterior realizado por Bicas e Silva (2013). O fungo foi isolado a partir de suspensão de solo em água estéril coletado nas proximidades da Universidade Federal de São João Del-Rei Campus Alto Paraopeba (UFSJ-CAP) no município de Ouro Branco-MG, caracterizado morfológicamente como fungo fusiforme *Fusarium oxysporum*, e depositado na Coleção de Culturas Tropicais do Instituto André Tozello (Campinas, Brasil) sob o código CCT7620.

Neste trabalho, a linhagem *F. oxysporum* CCT7620 foi mantida em placas de Petri contendo meio sólido de arroz na proporção 50 g/L de arroz moído e 20 g/L de ágar em água destilada, sob incubação a 30°C, realizando-se repique sempre que foi necessário. O inóculo foi obtido a partir do repique por estriamento da linhagem em

placa de Petri contendo meio sólido de arroz e incubação a 30°C por 72 h, e utilizado na inoculação da fermentação em meio líquido de arroz e obtenção da biomassa vermelha úmida (BVU) (em 4.1.2).

4.1.2 Fermentação em meio líquido e obtenção da biomassa vermelha (BVU e BVC)

A biomassa vermelha foi obtida a partir da transferência de um pedaço de 1,5 cm² do inóculo preparado anteriormente (em 4.1.1), para cada frasco de vidro cônico contendo 200 mL de meio líquido de arroz na proporção 20 g de arroz moído por litro de água, o qual foi homogeneizado com Ultra-Turrax a 7000 rpm sob condições estéreis por 30 s. A fermentação procedeu-se sob incubação agitada a 28°C e 250 rpm por 96 h, e a biomassa vermelha (BVC) recuperada por centrifugação do meio fermentado (biomassa vermelha úmida - BVU) a 9000 rpm por 5 min. A BVC foi utilizada para a obtenção do extrato vermelho (EV) (em 4.1.7) e da biomassa azul (BA) (em 4.1.6).

Curiosamente, o processo de descontaminação por tratamento térmico para descarte do sobrenadante juntamente com papel toalha utilizado para limpeza do meio fermentado extravasado, acabou produzindo pigmentos azulados. Evento que levou à avaliação da adição de diferentes papéis e materiais ricos em celulose na BVU para obtenção de biomassa azul úmida (BAU) e buscar esclarecer o ocorrido (em 4.1.3).

Posteriormente, também observou a formação de pigmentos azulados após processo de descontaminação por tratamento térmico dos frascos de vidro cônico sujos de BVU utilizados na fermentação, nos quais foi adicionada água da torneira. A adição de água foi com o intuito de manter úmidas as sujidades dos frascos e assim facilitar o processo de lavagem e limpeza dos frascos. Dessa forma, foram realizadas também análise de formação de pigmentos azulados com a adição de diferentes tipos de água (em 4.1.5).

4.1.3 Avaliação dos materiais ricos em celulose para obtenção de BAU

Durante o processo de descontaminação e descarte do sobrenadante resultante do processo de centrifugação da biomassa úmida (em 4.1.2), o qual ainda continha significativa quantidade de pigmento vermelho, notou-se que a introdução de

papel toalha comumente usado no laboratório ao sobrenadante e subsequente autoclavagem a 121°C por 20 min converteu o pigmento vermelho remanescente para azul. Devido ao papel toalha ser majoritariamente composto por celulose, acreditou-se que este polissacarídeo estivesse reagindo com a bicaverina do sobrenadante e produzindo um pigmento azul. Dessa forma, foi realizada a avaliação de conversão de cor da biomassa vermelha úmida utilizando outros materiais ricos em celulose como: papel pardo, papelão, papel sulfite, dois papéis toalha de aspectos e marcas diferentes, papel filtro qualitativo, algodão e gaze. Dentre os papéis toalhas, foram avaliados o papel toalha Alveflor (PA), produzido por Abbaspel Ind. e Comércio de Papéis Ltda de aspecto mais branco e macio, e o papel toalha Biopel (PB), produzido por Biopel Ind. e Comércio de Papéis e Artefatos de aspecto mais amarronzado e áspero e que foi o responsável pelo evento de conversão de cor da biomassa vermelha.

Foram avaliadas seis concentrações diferentes de cada material: 13,0; 6,5; 3,2; 1,6; 1,1; 0,8 mg/mL. Cada material foi adicionado à biomassa vermelha úmida em tubos de ensaio, e os tubos foram submetidos ao tratamento térmico a 121°C por 20 min em autoclave. Após resfriamento, foram realizadas medidas de pH em pHmetro de bancada (Kasvi) de cada amostra.

Apesar de todos os materiais serem ricos em celulose, nem todos foram capazes de converter a BVU em BAU, levantando a suposição de que houvesse outros componentes no papel toalha responsáveis pela conversão de cor. Dessa forma, seguiu-se com a avaliação da adição de minerais como fonte de metais comumente presentes no processo de produção de polpa e papel (em 4.1.4).

4.1.4 Avaliação da adição de compostos alcalinos e metálicos para obtenção de BAU

Sabe-se que durante o processo de digestão química da madeira em cavacos para produção de polpa de papel é utilizado o licor negro, um líquido escuro que contém compostos químicos alcalinos como NaOH, Na₂S, Na₂CO₃, Na₂SO₄, NaS₂O₃, além de metais como chumbo, ferro, bário, manganês, níquel, zinco, cádmio, cromo, cobalto, cobre e arsênio (KEVLICH; SHOFNER; NAIR, 2017). Suspeitou-se na possibilidade de que algum desses compostos ainda estivessem presentes no produto finalizado, o que levou a prosseguir com a avaliação da adição

de alguns dos compostos presentes no licor negro e de outros compostos químicos na BVU e subsequente tratamento térmico.

Foram avaliados os seguintes compostos químicos: ZnSO_4 , MnSO_4 , MgSO_4 , FeSO_4 , CoSO_4 , CuSO_4 , $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, CaCl_2 , CaCO_3 , NaCl , $\text{Na}_3\text{C}_6\text{HSO}_7$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , KOH , Al_2O_3 . Para cada composto químico, foi preparada uma solução aquosa 1 mol/L a partir da qual foram preparadas diluições seriadas de fator 2 até a concentração de 122 $\mu\text{mol/L}$. Meio mililitro (0,5 mL) de cada solução foi adicionado nos respectivos tubos de ensaio contendo 4,5 mL de BVU, tampados, agitados em agitador de tubos por 5 s e submetidos ao tratamento térmico a 121°C por 20 min em autoclave. O controle foi realizado com a adição de 0,5 mL de água deionizada em 4,5 mL de BVU. Após o tratamento térmico, foram realizadas medidas de pH em pHmetro de bancada (Kasvi) de cada amostra.

Ademais, a possibilidade da presença de alguns desses minerais no papel, que estariam reagindo com a bicaverina presente na BVU, também levou à realização de análise por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS - do inglês Flame Atomic Absorption Spectrometry) dos papéis toalha (em 4.3.1).

4.1.5 Avaliação da adição de diferentes tipos de água na formação de BAU

A observação da formação de pigmentos azulados após processo de descontaminação por tratamento térmico dos frascos de vidro cônico sujos de BVU utilizados na fermentação, nos quais foram adicionados água da torneira, levou a realização de diluições de BVU, a fim de permitir a variação da concentração dos possíveis íons metálicos presentes na água para interação com o pigmento, em diferentes tipos de água e subsequente tratamento térmico.

Foram avaliados três tipos de água: (1) água da torneira, por conter uma variedade de minerais e íons provenientes da fonte e tipo de tratamento utilizado, além de ocasionar a conversão de cor da biomassa vermelha para azul; (2) água deionizada, por ser uma água que passa por um processo de remoção dos íons; e (3) água purificada (Soft Star – Everest), por ser uma água obtida pela passagem da água de torneira por processos de filtragem para retenção de impurezas.

Foram realizadas oito diluições seriadas de fator 2 da BVU nos três tipos de água: água da torneira, deionizada e purificada. Cinco mililitros (5 mL) de cada diluição foram colocados em tubos de ensaio de vidro, tampados, e submetidos ao

tratamento térmico a 121°C por 20 min em autoclave. O controle de 5 mL de BVU também foi submetido ao tratamento térmico nas mesmas condições, e após o tratamento foram realizadas medidas de pH em pHmetro de bancada (Kasvi) de cada amostra. Este mesmo procedimento também foi realizado com o sobrenadante resultante do processo de centrifugação de BVU. Os pHs das diferentes águas também foram medidos em pHmetro de bancada.

4.1.6 Obtenção de BA por conversão direta da BVC

A BA por conversão direta foi obtida pelo espalhamento da BVC em placas de Petri de vidro, em camadas finas e deixando-as abertas ao ar para melhor secagem, porém não deixando-as secar completamente, e subsequente submissão ao tratamento térmico (121°C por 20 min) em autoclave (BICAS; SILVA, 2013).

4.1.7 Obtenção do EVB e EV

O EV foi obtido por extração por solvente acetato de etila na proporção 1:1 (m:v) da BVC. A BVC com o solvente foi colocada sob agitação a 25°C e 200 rpm por 4 h 20 min, e o extrato obtido foi submetido à leitura da absorbância a 500 nm utilizando espectrofotômetro UV-Vis para quantificação de bicaverina (MENDONÇA, 2019). O processo de extração foi repetido por mais duas vezes, e o extrato vermelho foi submetido à rotaevaporação para obtenção do extrato vermelho bruto concentrado em acetato de etila (EVB), o qual foi submetido à secagem final com gás nitrogênio e obtenção do EV. O EVB foi utilizado para obtenção de EA por reação com sais metálicos (em 4.1.8.), e o EV foi utilizado para a obtenção do EA por reação com arginina (em 4.1.8.), e análise *in vitro* da capacidade antioxidante (em 4.3.3).

4.1.8 Obtenção de EA a partir da adição de compostos alcalinos, metálicos e arginina nos corantes vermelhos

O EA foi obtido de 3 formas: (1) por extração a partir de BA; (2) por reação de EV com arginina; (3) por reação de EVB com sais.

1) Extração a partir de BA: a obtenção do EA da BA foi realizada utilizando como solvente o dimetilsulfóxido (DMSO). Para 0,30 g de BA pesados em tubo de fundo cônico foram adicionados 2 mL de DMSO, prosseguindo-se com a agitação em agitador de tubos por 1 min e centrifugação a 3600 rpm por 15 min. Alíquotas do EA

foram transferidos para microtubos, criodessecadas em liofilizador e armazenados para análises posteriores.

2) Reação de EV com arginina: estudos anteriores do grupo mostraram que a reação entre a BVU logo após a fermentação e os aminoácidos arginina e histidina na proporção 1:2 (v:m) para cada aminoácido e subsequente tratamento térmico, resultaram na produção de pigmento azul (SANTOS, M. N.; BICAS; SANTOS, 2017). Dessa forma, avaliou-se a conversão do EV para EA por meio da reação entre o aminoácido arginina em concentração equimolar. Foram realizadas duas reações, uma em solução de água deionizada e a outra, devido à dificuldade de solubilização do EV em água, em solução de Tween 80 1%. Foram pesados 0,020 g ($6,28 \cdot 10^{-6}$ mol de bicaverina) de EV em tubos de ensaio, seguindo-se pela adição de 5 mL de solução equimolar de arginina em água deionizada ou Tween 80 1%, agitação em agitador de tubos por 1 min e tratamento térmico a 121°C por 20 min em autoclave. Após o resfriamento, as reações foram agitadas em agitador de tubos por 1 min, transferidas para tubos de fundo cônico e centrifugadas a 3600 rpm por 15 min. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para outros tubos de fundo cônico para extração com solventes imiscíveis em água como acetato de etila e diclorometano (DCM), e os precipitados reservados para extração com solventes miscíveis em água como DMSO, acetonitrila, metanol e a própria água. Para cada sobrenadante, adicionou-se 4 mL de solvente imiscível em água para a extração dos pigmentos, agitou em agitador de tubos por 30 s e deixou em repouso para a separação das fases. Alíquotas de 1 mL de extrato foram transferidas em microtubos e reservadas para avaliação da extração. As extrações com DCM, que melhor conseguiu extrair os pigmentos, foram deixadas abertas overnight para evaporação total do solvente e então armazenadas sob congelamento para posterior análise por UHPLC-MS/MS e possível explicação das alterações na molécula de bicaverina que provocaram a mudança de cor na biomassa (em 4.3.2). Em relação aos precipitados, foram adicionados 4 mL de solvente miscível em água para cada tubo, agitados em agitador de tubos por 30 s e centrifugados a 3600 rpm por 15 min. Alíquotas de 1 mL de extrato foram transferidas em microtubos e reservadas para avaliação. As extrações com DMSO, que melhor extraiu os pigmentos, foram criodessecadas em liofilizador e então armazenadas sob congelamento para posterior análise por UHPLC-MS/MS (em 4.3.2). Reações controle

foram realizadas com EV em soluções de água deionizada e Tween 80 1% sem arginina, e submetidas aos mesmos procedimentos.

3) Reação de EVB com sais: a partir das observações obtidas na avaliação da adição de compostos químicos na BVU e da identificação dos minerais presentes nos papéis, foram escolhidos os compostos químicos ZnSO_4 , MnSO_4 , MgSO_4 , FeSO_4 , CoSO_4 , CuSO_4 , $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, CaCl_2 e CaCO_3 para reagirem com o EVB. Para cada composto químico, foi preparada uma solução equimolar em etanol 70%. Em tubos de ensaio foram colocados 1,25 mL de solução de sais em etanol 70% e 0,5 mL de EVB ($7,34 \cdot 10^{-6}$ mol/mL de bicaverina), os quais foram agitados em agitador de tubos por 10 s e submetidos ao tratamento térmico a 121°C por 20 min em autoclave. Após o tratamento térmico, deixou-se os tubos abertos em estufa de secagem a 70°C por 4 h, e a extração dos pigmentos formados foi realizada adicionando 1 mL de DMSO, seguindo-se de agitação em agitador de tubos por 1 min. Os extratos foram transferidos em microtubos, criodessecados em liofilizador e armazenados sob congelamento para análises posteriores.

4.2 Isolamento, identificação de bactéria púrpura e avaliação de diferentes meios de crescimento celular e produção de violaceína

4.2.1 Isolamento e identificação de bactéria púrpura

A bactéria púrpura utilizada neste estudo foi isolada a partir de arroz cozido no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Brasil ($22,90556^\circ\text{S}$, $47,06083^\circ\text{W}$). O isolamento foi realizado utilizando os meios: ágar batata dextrose (PDA, do inglês Potato Dextrose Agar) composto de 4 g/L de extrato de batata, 20 g/L de dextrose, 15 g/L de ágar; ágar YM (do inglês, Yeast Malt Extract media) composto por 10 g/L de glicose, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L peptona, 3 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de ágar; ágar YM adaptado composto por 10 g/L de sacarose, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de ágar; sólido PY-S (do inglês Peptone Yeast Extract Broth with Sucrose) adaptado, que neste trabalho será chamado de meio YPS, composto por 5 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de sacarose e 20 g/L de ágar; e 1 kg/L de arroz em grãos. Após isolamento das colônias puras, microscopia ótica e coloração de Gram foram realizadas. O pigmento produzido foi extraído e submetido à análise

UHPLC-MS/MS para a identificação (em 4.3.4), e a identificação da bactéria realizada por sequenciamento do gene RNAr 16S.

A identificação molecular da colônia isolada foi realizada em parceria com o Centro de Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade Estadual de Campinas (CPQBA/UNICAMP) – Divisão de Recursos Microbianos. O DNA genômico foi extraído utilizando protocolo descrito por Van Soolinger et al. (1993). A integridade e concentração do DNA foi estimada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain 10.000X in DMS (Invitrogen™), usando como padrão de concentração o DNA do fago lambda (λ).

A amplificação e purificação do gene RNAr 16S do DNA bacteriano foram realizadas através da amplificação por reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) do gene RNA ribossomal 16S utilizando os primers (oligonucleotídeos sintéticos iniciadores) p10f (5'- GAG TTT GAT TCA GGC CCT G-3') e p1100r (5'-GTT GTG AGG GTT GGG G-3'), complementares a regiões conservadas do gene RNA ribossomal 16S de bactérias. O programa de amplificação de PCR consistiu em um ciclo a 95°C por 2 min, 30 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 3 min, além de 1 ciclo final de extensão a 72°C por 3 min. Cada reação continha: 2,0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™); tampão de PCR (Invitrogen™) 1 X; 1,5 mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$); 200 μ M dNTP mix (Invitrogen™), 0,5 μ M de cada primer e 5,0 μ L (~50 ng) da amostra de DNA genômico, totalizando um volume final de reação de 25 μ L. Os resultados de amplificação dos fragmentos do gene RNAr 16S foram confirmados usando gel de agarose 1% corados com 0,02 μ L/mL SYBR Safe™ 10.000X in DMSO (Invitrogen™). Os produtos das amplificações foram então purificados utilizando mini colunas (GFX PCR DNA e gel band purification kit, GE Healthcare).

O sequenciamento dos fragmentos de DNAr 16S foi realizado em sequenciador automático ABI 3500XL (Life Technologies™). A reação de sequenciamento utilizou de 1 μ L de DNA (aproximadamente 10 ng de DNA) do isolado bacteriano previamente purificado, 0,5 μ L de um único primer (forward ou reverse) (5 mM), 2 μ L de tampão Save Money (500 μ L de $MgCl_2$ 50 mM e 1 mL de Tris-HCl 1 mol/L pH 9,0), 2 μ L do reagente Big Dye (Applied Biosystems™) e 10 μ L de água ultrapura q.s.p. As condições da reação foram: desnaturação inicial a 96°C durante 2

min, seguida de 26 ciclos, sendo cada ciclo constituído das etapas de desnaturação (96°C por 45 s), pareamento (50°C por 30 s) e extensão (60°C por 4 min). As reações foram realizadas em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf™). Posteriormente, as reações de sequenciamento foram precipitadas, suspensas em formamida e então aplicadas no respectivo sequenciador automático.

A análise filogenética da bactéria foi realizada utilizando as sequências parciais do gene RNAr 16S obtidas com cada primer. Estas foram montadas em uma única sequência consenso (contig), combinando os diferentes fragmentos obtidos com ajuda do programa phredPhrap (EWING *et al.*, 1998). Após a montagem do contig correspondente ao organismo alvo, este foi comparado com sequências de RNAr 16S de organismos representados nas bases de dados Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e RDP (Ribosomal Database Project, Wisconsin, USA, <http://www.rdp.cme.msu.edu/>), usando as rotinas BLASTn e SequenceMatch, respectivamente. Foram, então, selecionadas sequências de organismos tipo relacionados ao organismo desconhecido para realização das análises filogenéticas. As sequências foram alinhadas utilizando o programa CLUSTAL X (THOMPSON *et al.*, 1997) e analisadas com o software MEGA v. 7 (TAMURA *et al.*, 2007). As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987), com valores de “bootstrap” calculados a partir de 1000 replicatas, utilizando as rotinas incluídas no software MEGA. As afiliações filogenéticas foram determinadas com a utilização da rotina Classifier (RDP – Ribosomal Database Project, Wisconsin, USA, <http://www.rdp.cme.msu.edu/>), sendo confirmadas através da rotina BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

4.2.2 Manutenção do isolado e preparo do inóculo

A manutenção do isolado bacteriano foi realizada em meio sólido YPS em placa de Petri, que se apresentou mais adequado durante o processo de isolamento (4.2.1). O repique foi realizado sempre que foi necessário e o crescimento realizado sob incubação a 25°C.

Após identificação da bactéria e do pigmento produzido, buscou-se na literatura os meios mais utilizados (CORTÉS-OSORIO *et al.*, 2017; KANELLI *et al.*,

2018; VENIL *et al.*, 2015). Dessa forma, o meio caldo nutriente (NB - do inglês Nutrient Broth) foi utilizado. No entanto, testes preliminares com o meio não produziram pigmento, então seguiu-se com a utilização de meio líquido YPS, que teve melhor desempenho na etapa de isolamento, para o preparo de inóculo e avaliação de diferentes meios para fermentação (4.2.3).

Dessa forma, o meio para o preparo do inóculo foi composto por 5 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de sacarose em água deionizada, e chamada de YPS. O inóculo foi obtido a partir da transferência de uma alçada cheia de células, retiradas de cultura em placas que foram repicadas e crescidas por 24 h à 25°C, em 100 mL de meio líquido YPS. O inóculo foi incubado a 25°C sob agitação de 200 rpm overnight até a obtenção da concentração celular de valor 3 na leitura de absorbância em espectrofotômetro à densidade óptica de 600 nm (OD₆₀₀).

O número de unidades formadoras de colônias (UFC) do inóculo foi determinado pelo método de contagem UFC em placa, no qual diluições seriadas na razão 10 das amostras em água peptonada (peptona 1 g/L, NaCl 8,5 g/L) foram plaqueadas por espalhamento em meio sólido YPS e incubadas a 25°C, seguindo-se pela contagem das colônias formadas, considerando apenas placas contendo entre 30 a 300 UFC. Todas as fermentações e contagens foram realizadas em triplicata.

4.2.3 Avaliação de diferentes meios para o crescimento celular e produção de violaceína pela bactéria púrpura

Como a linhagem utilizada apresentou perfil de crescimento e produção de pigmento particular em relação às espécies descritas na literatura, realizou-se avaliação do crescimento celular e produção de pigmento em diferentes meios, variando-se as fontes de carbono e nitrogênio, para possibilitar a produção de violaceína por nossa linhagem.

Foram avaliados os meios NB, NB suplementados, PY (do inglês Peptone Yeast Extract Broth) adaptados, além dos meios obtidos pela combinação par a par de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio, e meios com somente extrato de levedura. As fontes de carbono avaliadas foram: lactose, glicerol, glicose, sacarose e frutose. As fontes de nitrogênio foram: uréia, NH₄Cl, peptona e triptona. Na Tabela 5 estão descritos códigos e a composição de todos os meios testados para o crescimento e produção de violaceína.

Tabela 5. Códigos e composição dos meios testados para crescimento celular e produção de violaceína.

Fonte de nitrogênio e outros	Fonte de carbono					
	Lactose 10 g/L	Glicerol 10 g/L	Glicose 10 g/L	Sacarose 10 g/L	Frutose 10 g/L	Nenhum
Uréia 0,5 g/L	UL05	UGL05	UG05	US05	-	-
Uréia 5 g/L	UL	UGL	UG	US	UF	-
NH ₄ Cl 5 g/L	NL	NGL	NG	NS	NF	-
Peptona 5 g/L	PL	PGL	PG	PS	PF	-
Triptona 5 g/L	TL	TGL	TG	TS	TF	-
NB 8 g/L	NBL	NBGL	NBG	NBS	NBF	NB
YP (extrato de levedura 3 g/L + peptona 5 g/L)	-	-	YPG	YPS	YPF	-
YT (extrato de levedura 3 g/L + triptona 5 g/L)	-	-	YTG	YTS	YTF	-
Extrato de levedura 3 g/L	-	-	Y3G	Y3S	Y3F	Y3
Extrato de levedura 5 g/L	-	-	Y5G	Y5S	Y5F	Y5

As fermentações foram iniciadas pela adição de 1%, em relação ao volume total do meio fermentativo, de inóculo preparado previamente (em 4.2.2), e conduzidas sob incubação a 25°C e agitação a 200 rpm. Amostras de 1 mL foram coletadas a cada 24 h, e submetidas à leitura de absorbância a 600 nm em espectrofotômetro para

acompanhamento do crescimento celular. Amostras de 5 mL foram coletadas para extração e quantificação de violaceína produzida. As extrações foram realizadas centrifugando-se as amostras a 3600 rpm por 10 min, o precipitado foi suspenso em 3 mL de etanol absoluto por agitação em agitador de tubos por 1 min, seguindo-se por centrifugação a 3600 rpm por 15 min e leitura da absorbância a 575 nm em espectrofotômetro.

4.3 Ensaios analíticos

4.3.1 Análise quantitativa de elementos químicos selecionados por FAAS dos papéis PA e PB

As análises dos papéis foram realizadas em parceria com o Laboratório de Análises de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Foram submetidos a esta análise dois papéis toalha de aspectos e marcas diferentes: papel toalha Alveflor (produzido por Abbaspel Ind. e Comércio de Papéis Ltda) (PA) e papel toalha Biopel (produzido por Biopel Ind. e Comércio de Papéis e Artefatos) (PB), sendo última a responsável pelo evento de conversão da coloração avermelhada da biomassa para o azulado.

A análise dos papéis foi realizada por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS, do inglês Flame Atomic Absorption Spectrometry), de acordo com o descrito por Silva, J. G. S. et al. (2017). A partir de testes preliminares de reações de BVU com algumas soluções salinas contendo íons metálicos, foram definidos os metais alvo para análise: zinco (Zn), manganês (Mn), magnésio (Mg) e níquel (Ni). O cálcio (Ca) também foi quantificado devido à identificação de coloração característica de queima da chama de amostras que contêm este elemento durante a análise.

Foram pesados 0,20 g de amostra de cada papel em vaso de pressão e adicionou-se 8 mL de ácido nítrico concentrado (HNO_3 65%) e 2 mL de peróxido de hidrogênio concentrado (H_2O_2 30%). A seguir, digeriu-se as amostras em forno microondas (Ethos Easy, Millestone, Itália) por 45 min em temperatura máxima de 180°C. Após o resfriamento das amostras digeridas, estas foram quantitativamente transferidas para um balão volumétrico de 25 mL. O conteúdo do balão foi filtrado em papel filtro quantitativo e a solução resultante foi utilizada para fazer as diluições necessárias a fim de obter concentrações de minerais adequadas à faixa de

concentração da curva analítica de cada elemento a ser quantificado. Para quantificação dos minerais, foram utilizadas curvas de calibração externa e a leitura das amostras foram realizadas em espectrômetro de absorção atômica com chama (FAAS) (AAAnalyst 200, Perkin Elmer), utilizando lâmpadas monoelementares de catodo oco.

4.3.2 Análise UHPLC-MS/MS do EA obtido por reação com arginina

As análises de Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrômetro de Massas (UHPLC-MS/MS, Ultrahigh-pressure Liquid Chromatography – tandem Mass Spectrometer) das amostras criodessecadas de EA obtidos por reação com arginina e extração com DMSO, e as respectivas reações controle, foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Costa et al. (2019) com modificações, e em parceria com o Laboratório de Biologia Química Microbiana do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ/UNICAMP) – Departamento de Química Orgânica.

Cada amostra foi preparada pela adição de 1 mL de metanol, solubilização em banho ultrassônico, seguido de filtragem. A amostra foi submetida à análise UHPLC-MS/MS usando espectrômetro de massas Thermo Scientific QExactive® hybrid Quadrupole-Orbitrap nos seguintes parâmetros: modo positivo da ionização electrospray, voltagem capilar a +3,5 kV; temperatura capilar a 250°C; S-lens de 50 V e faixa de m/z de 133,40 – 2000,00. As fragmentações MS/MS foram realizadas utilizando energia de colisão normalizada (NCE, normalized collision energy) de 30 eV e 5 precursores por ciclo foram selecionados. Fase estacionária: coluna Thermo Scientific Accucore C18 2.6 µm (2.1 mm x 100 mm). A fase móvel foi composta de 0,1% (v/v) ácido fórmico em água (A) e acetonitrila (B). Perfil do eluente (A:B) 0 – 10 min, gradiente de 95:5 a 2:98; mantido por 5 min; 15 – 16,2 min em gradiente até 95:5; mantido por 8,8 min. Vazão de 0,2 mL/min. Volume de injeção de 3 µL. A análise da operação e o processamento dos espectros foram conduzidos utilizando software Xcalibur (versão 3.0.63) desenvolvido por Thermo Fisher Scientific.

4.3.3 Avaliação da capacidade antioxidante do EV

A avaliação da capacidade antioxidante do pigmento de *Fusarium* foi realizada com o EV, uma vez que os pigmentos azulados de *Fusarium* (BA, EA) são insolúveis, sendo somente em solúveis em DMSO, um solvente reativo que poderia

estar reagindo com os radicais formados nos ensaios e assim interferindo no resultado obtido.

A avaliação foi realizada utilizando o método Capacidade Antioxidante Equivalente a Trolox (TEAC) e Capacidade de Absorção do Radical Oxigênio (ORAC), pois o métodos como Atividade Sequestradora do Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) sofreria interferência da cor da amostra, que absorve luz no comprimento de onda próximo ao comprimento de onda utilizado para a quantificação da capacidade antioxidante.

4.3.3.1 TEAC

O método TEAC foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Leite et al. (2011), no qual radical catiônico 2,21-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS^{•+}) foi utilizado para determinação da atividade antioxidante total. O ensaio foi realizado utilizando leitor de microplaca NOVostar (BMG Labtech^R, Alemanha) e software de análise de dados MARS v. 1.3 (BMG Labtech^R, Alemanha). O ABTS^{•+} foi preparado pela reação de 5 mL de ABTS (7 mM) com 88 µL de persulfato de potássio (140 mM) mantido em repouso à temperatura ambiente por 12 a 16 h sob abrigo da luz, para então ser diluída em água destilada até absorbância entre 0,698 a 0,702 a 734 nm. As amostras e os padrões Trolox (TE) foram preparados em etanol e homogeneizados em agitador de tubos por 15 s (avaliação lipofílica). 10 mg de amostra foram dissolvidos em 1 mL de etanol, do qual foram feitas as diluições seriadas para obtenção das diferentes concentrações. Semelhantemente, preparou-se a solução mãe Trolox pela dissolução de 2 mg de Trolox em 10 mL de etanol, da qual foram feitas as diluições seriadas. Em cada poço da microplaca conteve 50 µL de amostra ou padrão em diferentes concentrações e 250 µL de solução ABTS^{•+} totalizando 300 µL de sistema reacional, o qual foi incubado por 5 min protegido da luz, à temperatura ambiente (25°C), antes da leitura da absorbância a 734 nm. O branco da reação foi 50 µL de água destilada e 250 µL de solução ABTS^{•+}. Os resultados foram obtidos através da equação resultante da curva padrão Trolox (12,5 a 250 µmol/mL) preparados nas mesmas condições experimentais, e os valores foram expressos em µM TE/mg. O valor IC₅₀ (do inglês Inhibitory Concentration) do extrato foi calculado a partir da concentração de amostra que foi necessária para inibição de 50% dos radicais ABTS^{•+}.

4.3.3.2 ORAC

O ensaio ORAC foi realizado, de acordo com o protocolo descrito por Leite et al. (2011), utilizando leitor de microplaca NOVOstar (BMG Labtech^R, Alemanha) e software de análise de dados MARS v. 1.3 (BMG Labtech^R, Alemanha). Para o ensaio da fração hidrofílica, as amostras de EV e o padrão Trolox foram preparados em etanol, no entanto, as diferentes concentrações foram obtidas por diluição em tampão fosfato de potássio 75 mM pH 7,4 e homogeneizados em agitador de tubos por 15 s. 10 mg de EV foram dissolvidos em 1 mL de etanol, do qual foram feitas as diluições seriadas em tampão fosfato de potássio 75 mM pH 7,4 para obtenção das diferentes concentrações. O sistema reacional foi obtido a partir da junção de 20 µL de amostra ou padrão, 120 µL de solução de fluoresceína 0,00378 mg/mL em tampão fosfato de potássio 75 mM pH 7,4, e 60 µL de 2,2'-azobis (2'-metilpropionamidine) dihidroclorato (AAPH) 108 mg/mL em tampão fosfato de potássio 75 mM pH 7,4, o qual a intensidade de fluorescência (485 nm_{Ex}/520 nm_{Em}) foi medida à temperatura constante de 37°C, em ciclos de 1 min, durante 1h20min. O branco foi preparado substituindo-se o volume da amostra por tampão fosfato de potássio 75 mM pH 7,4.

Em relação ao ensaio da fração lipofílica, as amostras e o padrão Trolox foram preparados em etanol como foi feito no ensaio hidrofílico, porém as diferentes concentrações foram obtidas por diluição em solução RMDC 7% em solução acetona-água (1:1), e homogeneizadas em agitador de tubos por 15 s. O sistema reacional foi obtido a partir da junção de 20 µL de amostra ou padrão, 120 µL de solução de fluoresceína 0,00378 mg/mL em tampão fosfato de potássio 75 mM pH 7,4, e 120 µL de AAPH 108 mg/mL em tampão fosfato de potássio 75 mM pH 7,4, o qual a intensidade de fluorescência (485nm_{Ex}/520nm_{Em}) foi medida à temperatura constante de 37°C, em ciclos de 1 min, durante 1h20min. O branco desta reação foi preparado substituindo-se o volume da amostra por RMDC 7%.

Tanto no ensaio da fração hidrofílica quanto no ensaio da fração lipofílica, os valores de ORAC foram expressos em µmol TE/mg que foram calculados por cálculo utilizando a fórmula:

$$\text{ORAC}(\mu\text{mol TE/mg}) = (C_{\text{Trolox}} \cdot (\text{AUC}_{\text{Amostra}} - \text{AUC}_{\text{Branco}}) \cdot k) / (\text{AUC}_{\text{Trolox}} - \text{AUC}_{\text{Branco}})$$

onde o C_{Trolox} é a concentração (μmol) de Trolox, k o fator de diluição da amostra, e a AUC a área abaixo da curva de decaimento da fluorescência da amostra, branco e Trolox, respectivamente, calculado através da equação:

$$\text{AUC} = 1 + f_i/f_0 + f_{i+1}/f_0 + \dots + f_{i+1}/f_0 + f_{80}/f_0, \quad 0 < i \leq 80$$

onde, f_0 é a fluorescência obtida no tempo 0 e f_i a fluorescência nos tempos subsequentes entre 0 e 80 min. Os valores de AUC do Trolox foram obtidos através preparo de curva padrão Trolox (12,5 a 700 $\mu\text{mol/mL}$).

4.3.4 Identificação por UHPLC-MS/MS do pigmento produzido pela bactéria púrpura

O extrato de coloração púrpura usado para a análise foi obtido a partir do crescimento da bactéria em meio sólido à base de arroz (1kg/L) por 72 h, incubado à 25°C. A extração do pigmento foi realizada pela adição de etanol, homogeneização por 1 min e centrifugação do extrato a 3600 rpm por 10 min. A alíquota de 2 mL foi transferida para um microtubo e o etanol foi evaporado por borbulhamento de gás nitrogênio.

A identificação do pigmento produzido pela colônia isolada foi realizada de acordo com o descrito por Costa et al. (2019) com modificações, e em parceria com o Laboratório de Biologia Química Microbiana do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (IQ/UNICAMP) – Departamento de Química Orgânica.

O preparo da amostra e a análise UHPLC-MS/MS foram realizados de forma e parâmetros semelhantes ao descrito na seção 4.3.2, assim como o processamento dos dados obtidos utilizando software Xcalibur (versão 3.0.63) desenvolvido por Thermo Fisher Scientific.

4.4 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão, e avaliados por análise de variância de um fator (one-way ANOVA) seguida de teste de comparação múltipla Tukey, ao nível de 5% ($n=3$, $p < 0,05$). As correlações entre os dados obtidos foram calculadas por meio de coeficiente de correlação de Pearson (r).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

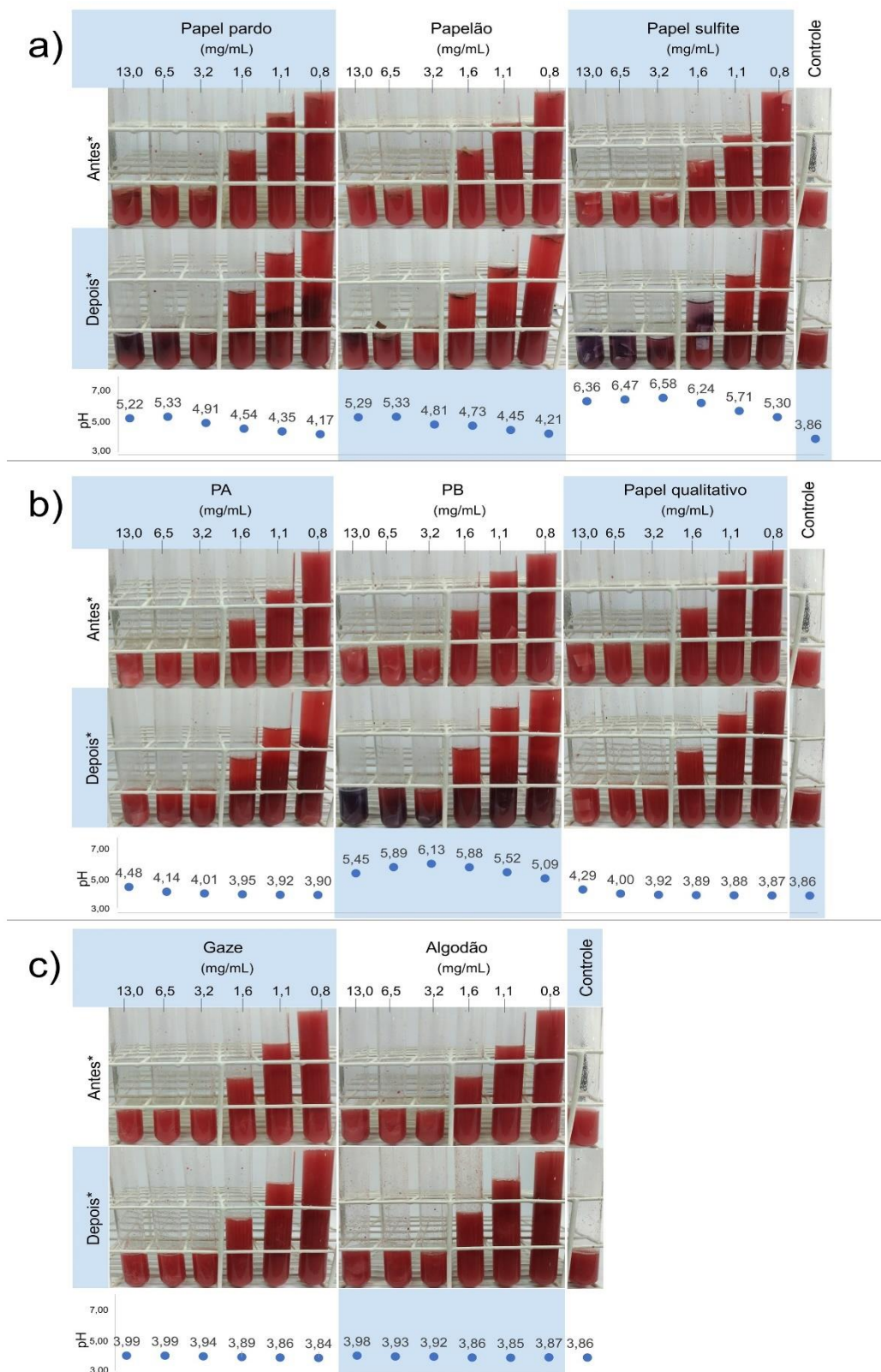
5.1 Avaliação das condições de produção das biomassas e extratos azulados por fermentação de *F. oxysporum* CCT7620

5.1.1 Avaliação dos materiais ricos em celulose para obtenção de BAU

A celulose é um polímero linear constituído por monômeros de glicose ligados via ligação glicosídica β -(1-4) e grupos hidroxil reativos, que pode ser encontrado na sua forma pura no algodão ou principalmente combinado com lignina ou outros polissacarídeos em plantas (HEINZE; LIEBERT, 2012). Os produtos baseados em papel geralmente possuem 90 a 99% de fibras de celulose arranjadas em estruturas de redes, as quais dependendo do tipo de arranjo podem mudar as características físico-químicas do material (SAHIN; ARSLAN, 2008).

Dessa forma, considerou-se a possibilidade de que a bicaverina remanescente no sobrenadante resultante da centrifugação da BVU estivesse reagindo com a celulose do papel e formando pigmentos azulados. Esperou-se que dentre os materiais testados ricos em celulose, principalmente aqueles que possuem composição mais pura, como o algodão, gaze e o papel filtro qualitativo fossem capazes de produzir biomassa azulada (Figura 8 b e c). No entanto, nenhum desses materiais foi capaz de produzir BAU, sendo somente o PB, papel sulfite, papel pardo e papelão os materiais que resultaram na formação de pigmentos azulados, com destaque ao PB (Figura 8 a e b).

Figura 8. Avaliação da adição de diferentes materiais celulósicos na BVU, formação de BAU e as respectivas medidas de pH.



*Antes/Depois do tratamento térmico por autoclavagem; PA: papel toalha Alveflor; PB: papel toalha Biopel.

Para a liberação das fibras de celulose a partir da madeira são aplicados tratamentos mecânicos e químicos (polpação), ambos tratamentos aplicados para a produção de polpa para fabricação de papel (VILKARI *et al.*, 2009). A polpação química depende principalmente de reagentes químicos e calor para dissolução da lignina e outras substâncias (KEVLICH; SHOFNER; NAIR, 2017). Dentre os principais processos químicos, o processo kraft envolve a utilização de compostos alcalinos como NaOH, Na₂S, Na₂CO₃, Na₂SO₄, NaS₂O₃, além de compostos que contêm metais como chumbo, ferro, bário, manganês, níquel, zinco, cádmio, cromo, cobalto, cobre e arsênio (KEVLICH; SHOFNER; NAIR, 2017), enquanto que outro processo de polpação química bastante utilizado, o processo sulfito, envolve a utilização de sulfitos de hidrogênio proveniente de sais de Ca⁺, Mg⁺, Na⁺ ou NH⁴⁺ (HEINZE; LIEBERT, 2012). Dessa forma, escolhemos testar alguns sais que contêm esses compostos na conversão da BVU para BAU, sendo os resultados apresentados adiante na seção 5.1.3.

A observação de mudança de pH para pH mais alcalino em algumas amostras nas quais foram adicionados os papéis, com maior intensidade para amostra adicionado com papel sulfite (Figura 8), e sabendo-se que a bicaverina é vermelha em meios ácidos, ficando bem azulada em meios mais alcalinos (CHELKOWSKI; ZAJKOWSKI; VISCONTI, 1992), considerou-se a possibilidade de que os papéis ainda poderiam conter resíduos de compostos alcalinos provenientes do processo de fabricação. No entanto, a alcalinização não pode ser considerada como único causador da conversão de cor da biomassa, já que é observada a não correlação entre aumento de pH e mudança de cor na reação de PB (Figura 8b). Dessa forma, avaliou-se a adição de diferentes compostos alcalinos na BVU para a produção de BAU, sendo os resultados apresentados na seção seguinte (5.1.3).

De forma semelhante, as antocianinas que são uma classe de compostos polifenólicos encontrados na natureza, possuem uma variedade de cores dependendo do pH do meio em que estão inseridas, sendo avermelhadas em meio ácido e azuladas em meio alcalino (SIGURDSON *et al.*, 2016). Ademais, as antocianinas podem exibir coloração azulada mesmo em condições ácidas devido à auto-associação, co-pigmentação e formação de quelatos com íons metálicos (YOSHIDA; MORI; KONDO, 2009), eventos poderiam estar acontecendo com a bicaverina presente na biomassa (em 5.1.3).

Outro processo da fabricação de papel que poderia estar deixando resíduos de compostos químicos no produto final, é o processo de branqueamento. A polpa resultante do processo kraft ainda possui 10% de lignina, sendo a principal responsável pela coloração marrom característica dos papéis não branqueados (papel pardo, papelão e outros). Para remoção da lignina residual a polpa pode passar pelo processo de branqueamento que envolve principalmente compostos químicos que têm cloro como dióxido de cloro, e também outros compostos como ozônio, oxigênio, peróxidos e peroxiácidos (VIIKARI *et al.*, 2009). Assim, foram incluídos na avaliação compostos que contêm cloro na fórmula molecular como CaCl_2 e NaCl , sendo os resultados apresentados adiante na seção 5.1.3.

Diferenças observadas de formação de pigmentos azulados entre os papéis toalhas testados (PA e PB), com a produção de BAU com a adição de PB e não produção de BAU com o PA, evidenciou a presença de diferentes compostos não celulósicos na composição do material. Os papéis do tipo *tissue* possuem grande variedade de aspectos de aparência, pureza, maciez, absorbância, e resistência que são controlados a partir dos processos de produção de polpa de madeira, que são geralmente polpa de madeira branqueada (YOUNG; KUNDROT; TILLMAN, 2003). Analisando-se a aparência do PB, notou-se que era um papel menos branco e mais denso em comparação com o PA, que era mais branco e macio. Isso sugeriu que o PB poderia conter maiores quantidades de impurezas ou resíduos provenientes dos processos de fabricação, principalmente de íons metálicos, o que levou à análise FAAS desses dois papéis toalha e identificação de diferenças significativas nas quantidades de elementos como cálcio, magnésio, zinco e manganês presentes, sendo os resultados apresentados com maiores detalhes adiante na seção 5.1.2.

5.1.2 Análise da composição de minerais dos papéis toalha por FAAS

Os resultados obtidos pela análise FAAS dos dois papéis demonstraram de fato as diferenças químicas entre os papéis que estão refletindo na capacidade de conversão de cor da BVU para BAU de um papel e não do outro. Na Tabela 6 estão as quantificações obtidas dos elementos analisados.

Tabela 6. Quantificação dos elementos analisados nos papéis.

Elementos	PA	PB
	(mg/Kg)	(mg/Kg)
Ca	359,11 ± 7,07	65426,26 ± 776,47
Mg	143,88 ± 6,13	943,14 ± 12,20
Zn	4,57 ± 0,41	116,75 ± 1,38
Mn	< 5 (LQ)	7,51 ± 0,26
Ni	< 15 (LQ)	< 15 (LQ)

LQ: Limite de quantificação do método.

Observou-se quantidades superiores de Ca, Mg, Zn e Mn para o PB, destacando-se o Ca e Mg, que foram encontrados em quantidades maiores que 180 e 6 vezes a quantidade encontrada em PA, respectivamente.

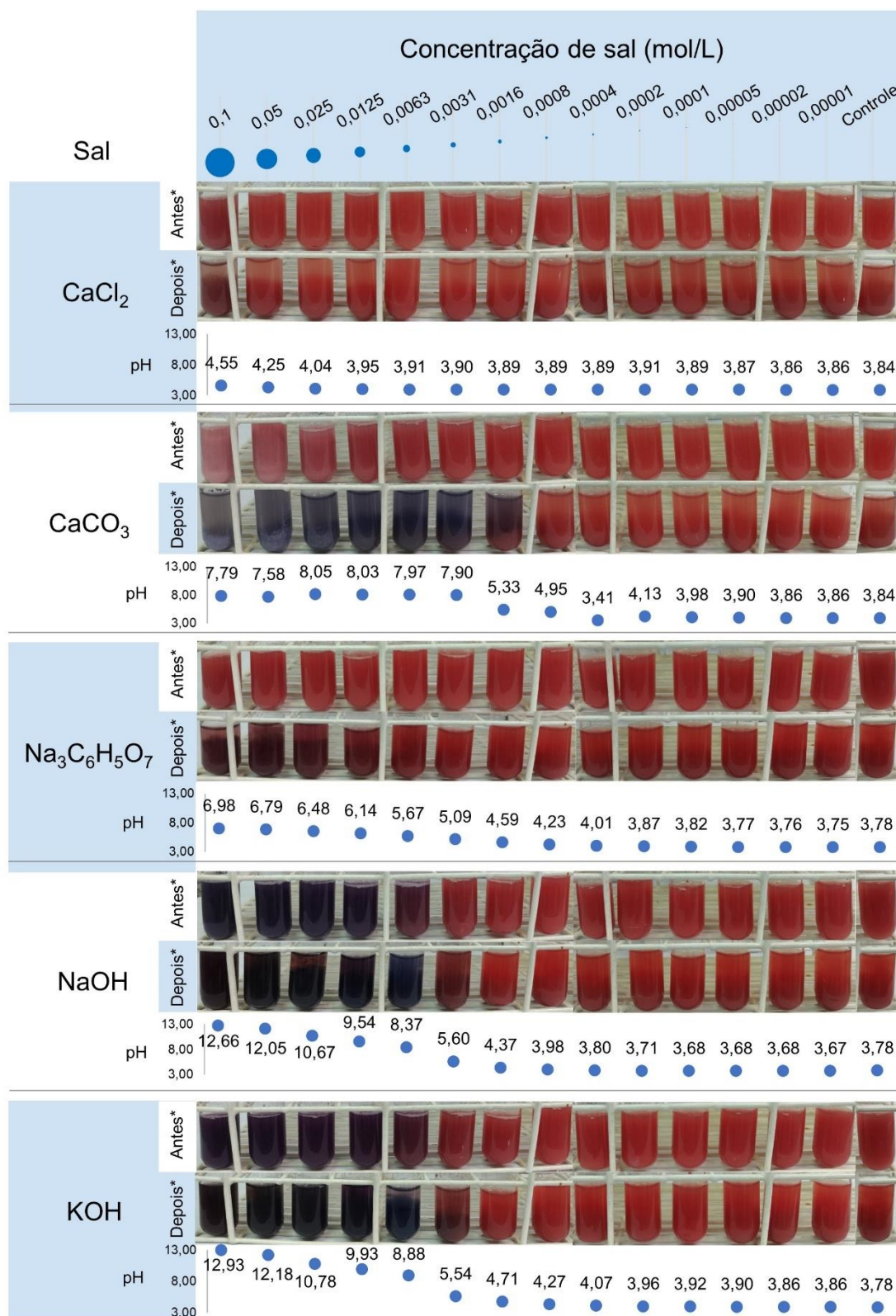
Nos testes de conversão de cor da BVU com o PB (em 5.1.1) observou-se que 13 mg/mL de material foram suficientes para a produção de BAU. Em 13 mg de papel, de acordo com as quantificações que temos, seriam encontrados aproximadamente 0,014 mg de metais que são capazes de produzir BAU (Mg, Zn, Mn). Mesmo que se considere que esses 0,014 mg sejam totalmente de Zn, de maior capacidade de produção de pigmento azul na avaliação da seção 5.1.3, o volume de BVU que seria convertido em BAU seria de aproximadamente 15,45 µL. Dessa forma, pode-se notar que além desses elementos quantificados, muitos outros de capacidade de formação de BAU podem estar presentes em grande quantidade no PB. Estes resultados serviram de base e motivaram a realização de ensaios de obtenção de BAU (5.1.3) e EA (5.1.5) pela adição de compostos metálicos descritos na sequência.

5.1.3 Avaliação da adição de compostos alcalinos e metálicos para obtenção de BAU

Sabe-se que, como foi mencionado anteriormente, durante o processo de fabricação de papel está envolvida uma variedade de compostos químicos, e que há a possibilidade de que alguns desses compostos ainda possam ficar retidos no produto final. A produção de pigmentos azulados com a adição de alguns papéis evidenciou a presença desses compostos, o que levou à presente avaliação.

Como esperado, a BVU ficou azulada com a alcalinização do meio, em pHs acima de 5. A mudança de cor da biomassa com a adição de bases fortes como NaOH e KOH ocorreu imediatamente com a adição das soluções desses compostos à BVU, não necessitando de algum tratamento térmico (Figura 9). Enquanto que a adição de CaCO_3 levou à produção de pigmentos azulados somente depois do tratamento térmico devido à melhor solubilização por aumento da temperatura e consequente aumento do pH no meio em concentrações maiores de sal (Figura 9). A não formação de pigmentos azulados com a adição de CaCl_2 e formação em CaCO_3 nos leva a considerar que os pigmentos azulados foram formados devido à alcalinização do meio e não devido à ligação com íons de Ca^{2+} .

Figura 9. Avaliação da adição de diferentes soluções alcalinas ou metálicas na BVU e os respectivos pH medidos após tratamento térmico (1).



*Antes/Depois do tratamento térmico por autoclavagem.

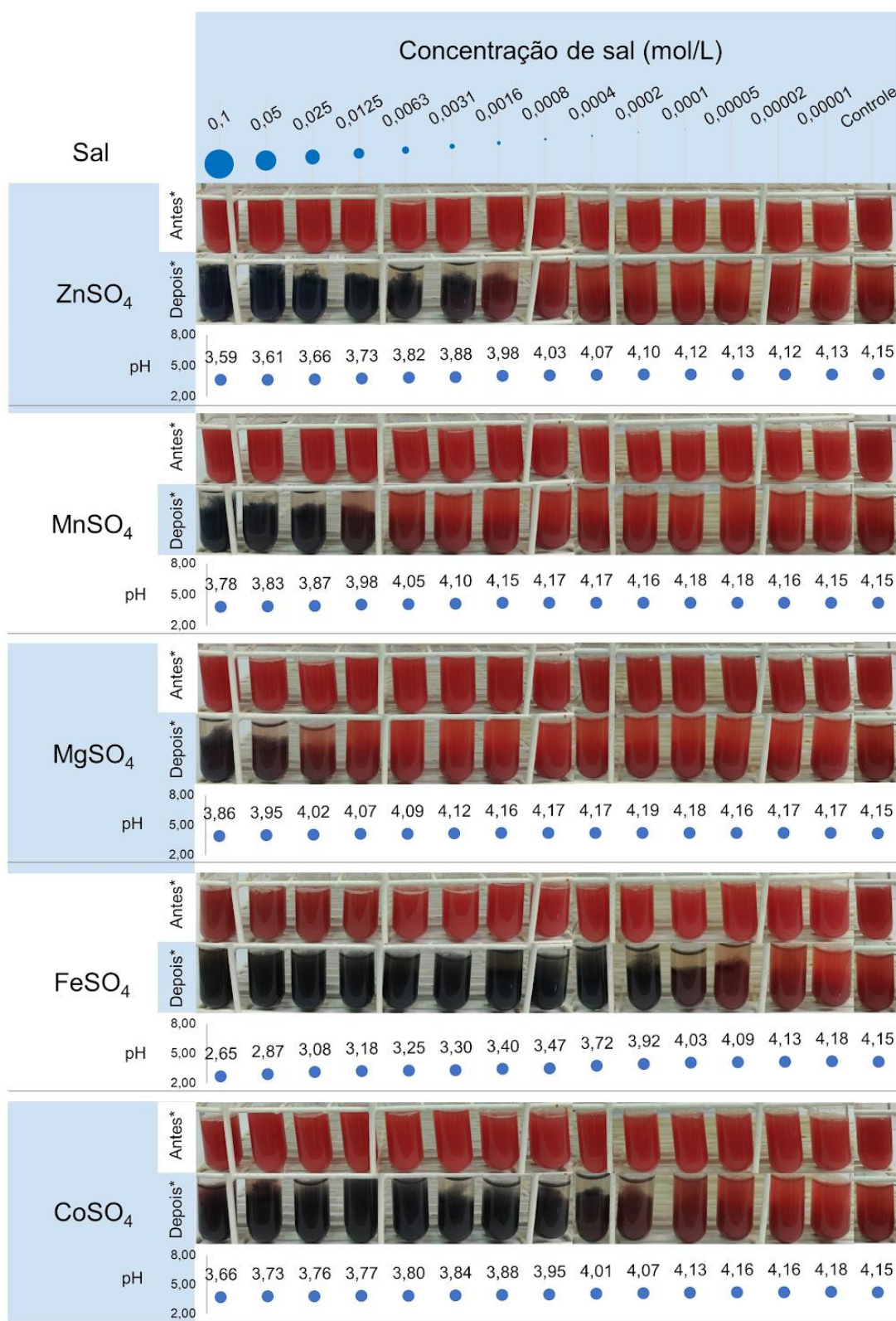
O $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ por ser uma base fraca levou a uma menor alteração no pH e cor da biomassa, enquanto que os compostos $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl , Al_2O_3 , CaCl_2 não alteraram a cor da biomassa (Figura 11).

Esta sensibilidade de mudança da cor observada com a alcalinização do meio, também é observada nas antocianinas. A alcalinização do meio resulta na desprotonação da molécula levando a formação de formas quinoidais que manifestam uma coloração mais azulada (NEWSOME; CULVER; BREEMEN, 2014). No entanto, apesar da observação semelhante de mudança de cor do vermelho para o azul-violeta, neste estudo, não se sabe se esta reação seria reversível, ou seja, se a biomassa azul-violeta retornaria à coloração vermelha com a acidificação do meio.

Outro fator que deve ser avaliado é se o tratamento térmico possui influência sobre a habilidade de conversão ou reversibilidade da coloração formada. Dessa forma, estudos de reversibilidade seriam necessários para maiores informações sobre a estabilidade. Contudo, com os resultados até então obtidos, estes pigmentos azulados formados poderiam ser potenciais corantes azulados para alimentos ou outras matrizes alcalinas.

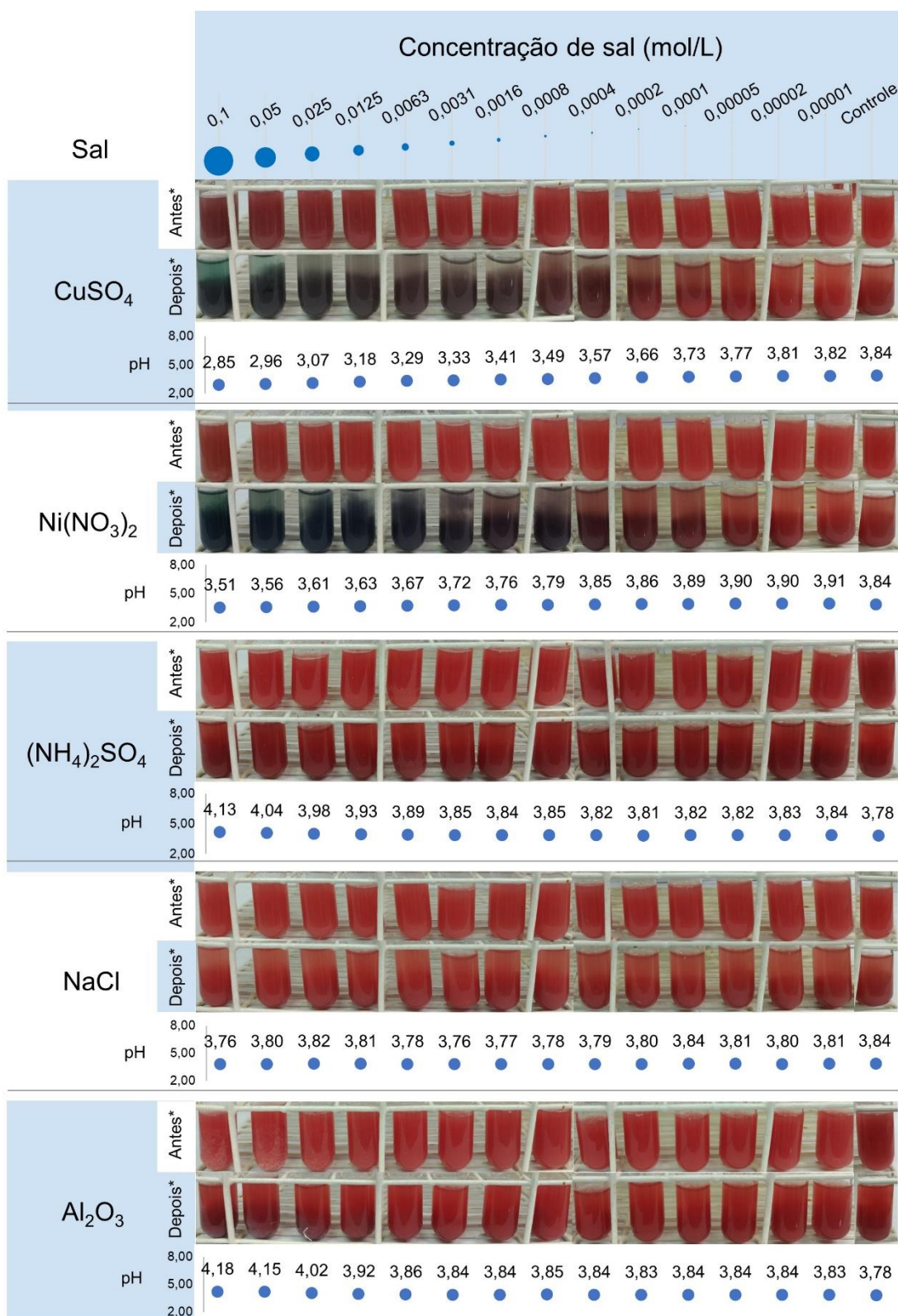
A adição de sulfatos de íons metálicos e o $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, levaram à produção, em diferentes graus de indução e em pH ácido, de pigmentos que variaram entre os tons preto, azul e roxo. Íons Fe^{2+} e Co^{2+} , produziram pigmentos com tons próximos ao preto, íons Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , produziram pigmentos com tons mais azulados (Figura 10) e o íon Cu^{2+} produziu pigmento com tom arroxeado (Figura 11).

Figura 10. Avaliação da adição de diferentes soluções alcalinas ou metálicas na BVU e os respectivos pH medidos após tratamento térmico (2).



*Antes/Depois do tratamento térmico por autoclavagem.

Figura 11. Avaliação da adição de diferentes soluções alcalinas ou metálicas na BVU e os respectivos pH medidos após tratamento térmico (3).



*Antes/Depois do tratamento térmico por autoclavagem.

Muitos íons metálicos têm sido descritos como indutores do deslocamento batocrômico na absorção de luz visível de antocianinas, sendo todos multivalentes incluindo Mg^{2+} , Cu^{2+} e principalmente os íons trivalentes como Al^{3+} e Fe^{3+} (SIGURDSON *et al.*, 2016). Neste estudo, como foram avaliados íons metálicos majoritariamente divalentes, seria interessante realizar uma avaliação com íons trivalentes na mudança de cor da BVU em estudos futuros.

Nas antocianinas, a interação com íons metálicos leva a remoção dos íons hidrogênio dos grupos hidroxil presentes na molécula. Essa remoção possui um efeito semelhante ao efeito de alcalinização do meio, induzindo a formação das bases quinoidais azuladas (SCHREIBER; SWINK; GODSEY, 2010). O nível de desprotonação pode variar entre os íons metálicos adicionados. Por exemplo, a interação da antocianina com o íon Al^{3+} leva à liberação de um próton, enquanto que o íon Fe^{2+} , sofrendo autooxidação rápida no complexo para Fe^{3+} , leva a liberação de dois prótons e maior deslocamento batocrômico (FENGER *et al.*, 2021).

Ademais, sugere-se que o grau de indução do deslocamento batocrômico depende das características de densidade e organização eletrônica nos orbitais específicos, afetando assim a interação entre o íon e o pigmento (SIGURDSON *et al.*, 2016). Como pode ser observado neste estudo, a adição de íons metálicos de mesma valência levou a conversão de cor da BVU em concentrações diferentes, citando o caso do íon Zn^{2+} que apresentou início da formação de pigmentos azulados em concentração de 0,0016 mol/L, enquanto que o íon Mg^{2+} teve como início da formação de pigmentos azulados em concentração maior de 0,025 mol/L (Figura 11).

Outros estudos com antocianinas ainda mostram que os íons metálicos também têm a capacidade de coordenar a formação de interações intramoleculares π - π stacking entre o cromóforo cianidina e os resíduos acil fenólicos (FENGER *et al.*, 2021), e complexos macromoleculares com outras moléculas incluindo favonóis, quercetina e ácido clorogênico (JURD; ASEN, 1966; YOSHIDA *et al.*, 2006), além da formação de complexos metal(Al^{3+} , Fe^{2+})-antocianina de estequiometrias 1:1, 1:2; 1:3. Essa combinação com os íons metálicos (Al^{3+} , Fe^{2+}) resulta em compostos de coloração azulada de melhor estabilidade, entretanto, podendo possuir ainda sensibilidade às alterações de pH e adição de água como foi mostrado por Fenger *et al.* (2021). A observação de perda de cor quando água é adicionada na solução contendo complexos metal(Fe^{2+})-antocianina evidenciou que a hidratação e a ligação

com metal atuam de forma competitiva nos átomos de oxigênio presentes no anel fenólico (FENGER *et al.*, 2021).

Contudo, a estabilidade dos complexos metálicos formados depende dos grupos químicos presentes nas antocianinas que participam na interação, podendo formar complexos de características estruturais que resultam em uma coloração azul vibrante e intensa de alta estabilidade. Como foi mostrado por Denish *et al.* (2021), a antocianina do repolho roxo possuidora de um único resíduo sinapoil foi capaz de formar um complexo de alumínio de estequiometria 1:3, no qual os três ligantes de antocianina adotaram uma conformação octaédrica quiral causando uma intensa mudança na característica da dispersão rotatória óptica no comprimento de onda de absorção.

A formação de quelatos metálicos e consequente deslocamento do comprimento de onda de absorção do visível ocorre também em vários outros pigmentos, incluindo a astaxantina e o ácido carmínico. No entanto, nesses casos o deslocamento batocrômico resulta na manifestação de uma coloração mais intensa da coloração avermelhada original acompanhada do melhoramento da estabilidade (HERNÁNDEZ-MARIN; BARBOSA; MARTÍNEZ, 2012; KUNKELY; VOGLER, 2011).

Um estudo computacional e experimental mostrou a existência de um sítio de interação na molécula de bicaverina e consequente sensibilidade aos íons metálicos por emissão de fluorescência (HUSSAIN *et al.*, 2019). O estudo testou todos os elementos químicos computacionalmente e mostrou experimentalmente que os íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Al^{3+} ligaram-se fortemente ao sítio de interação da bicaverina e aumentaram a intensidade da fluorescência da molécula, sendo o Ca^{2+} , o íon que mostrou maior afinidade com a bicaverina. Em nosso estudo, há a possibilidade de que os íons Ca^{2+} tenham se ligado às moléculas de bicaverina presentes na biomassa, no entanto essa ligação não resultou em mudanças no espectro de absorção de luz no visível. Avaliações com misturas de íons Ca^{2+} e outros íons metálicos seriam uma alternativa para verificar se realmente os íons Ca^{2+} possuem maior afinidade com a bicaverina, atuando de forma competitiva e impedindo a ligação de outros íons no sítio de interação.

De forma semelhante às reações de conversão com a alcalinização da biomassa, os pigmentos azulados formados com a adição de íons metálicos ainda precisam ser avaliados no quesito estequiometria da formação de complexos

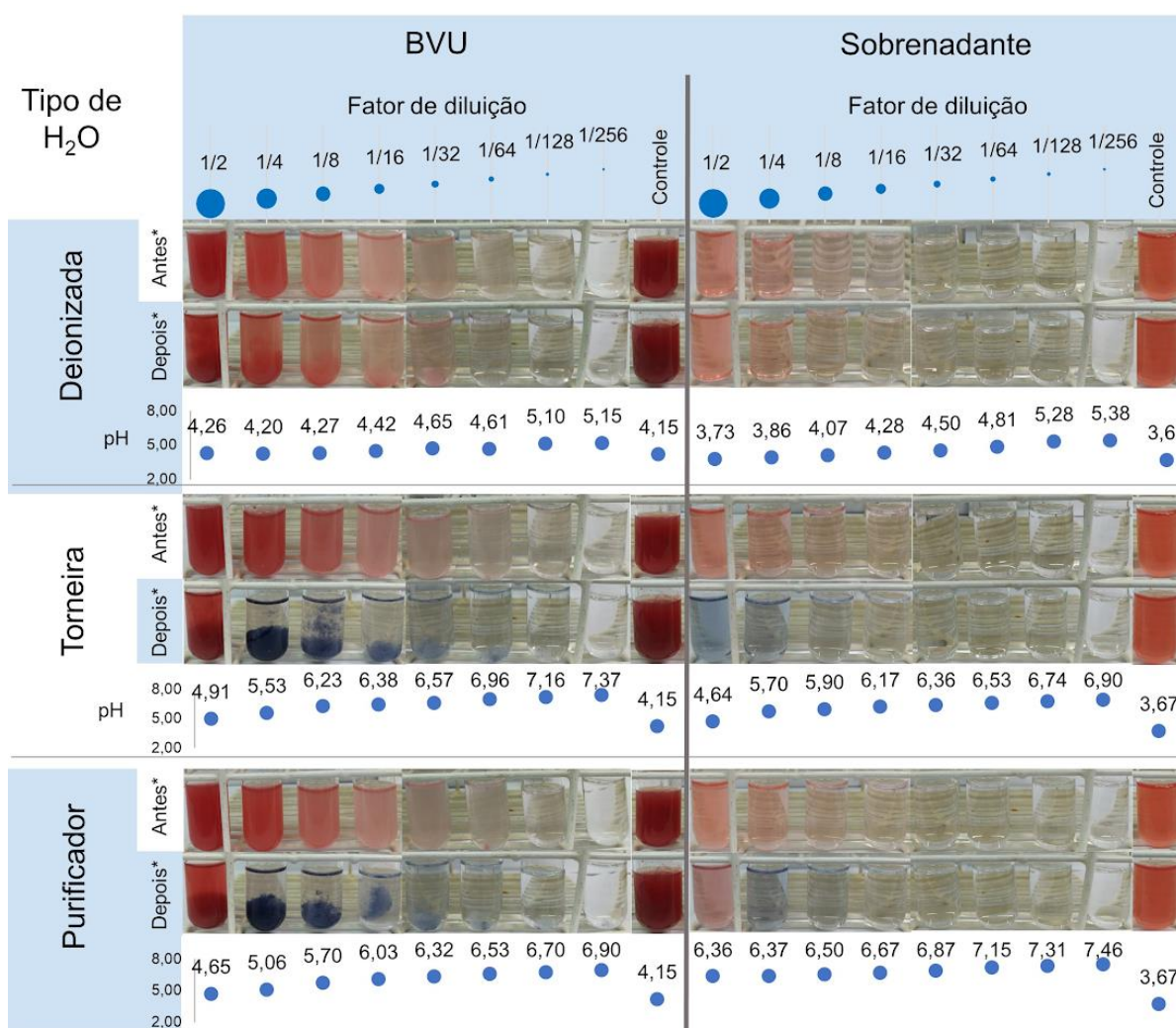
macromoleculares e a capacidade de reversão com a remoção dos íons adicionados para obtenção de maiores informações sobre os mecanismos de interação e estabilidade. Contudo, com os resultados até então obtidos, estes pigmentos azulados formados com a adição de íons metálicos representam potenciais alternativas para o desenvolvimento de novos corantes para alimentos.

5.1.4 Avaliação dos diferentes tipos de água na formação de BAU

As águas naturais e tratadas possuem uma ampla variedade de minerais que variam dependendo do local da fonte, do tipo de tratamento da água utilizado e até do material utilizado para a distribuição da água (WHO, 2017). Dentre os compostos químicos que são frequentemente encontrados na água tratada estão os carbonatos, sulfatos, cloretos, sódio, potássio, cálcio, magnésio e flúor (WHO, 2017). No entanto, íons metálicos de alumínio, arsênio, cádmio, cobalto, bário, boro, cromo, cobre, ferro, manganês, níquel, chumbo e zinco também podem estar presentes na água (MORGANO *et al.*, 2002; WHO, 2017).

Consequentemente, a presença desses compostos na água da torneira (pH 6,75) fez com que a adição dela na BVU produzisse pigmentos azulados (Figura 12). Evento que não ocorreu com a adição de água deionizada (pH 7,33), que é uma água obtida por processo de remoção de íons por sistemas de resinas de troca iônica. Em relação à água de purificador Soft Star (Everest) (pH 6,50), com pré-filtragem por microfibras de polipropileno (retenção de impurezas maiores que 5 µm) e filtragem de água por carvão vegetal (coco de Babaçú) impregnado com prata coloidal (conforme descrito pelo fabricante, Everest Ind. e Com. de Plásticos Ltda), observou-se o mesmo perfil de formação de pigmentos azulados na mistura com BVU observado com a adição de água da torneira. No entanto, a não formação de pigmentos azulados na menor diluição do sobrenadante em água de purificador em comparação com a menor diluição em água da torneira, pode estar evidenciando a retenção de íons pelo sistema de filtragem do purificador Soft Star.

Figura 12. Avaliação da adição de diferentes tipos de água na BVU e as respectivas medidas de pH.



*Antes/Depois do tratamento térmico por autoclavagem.

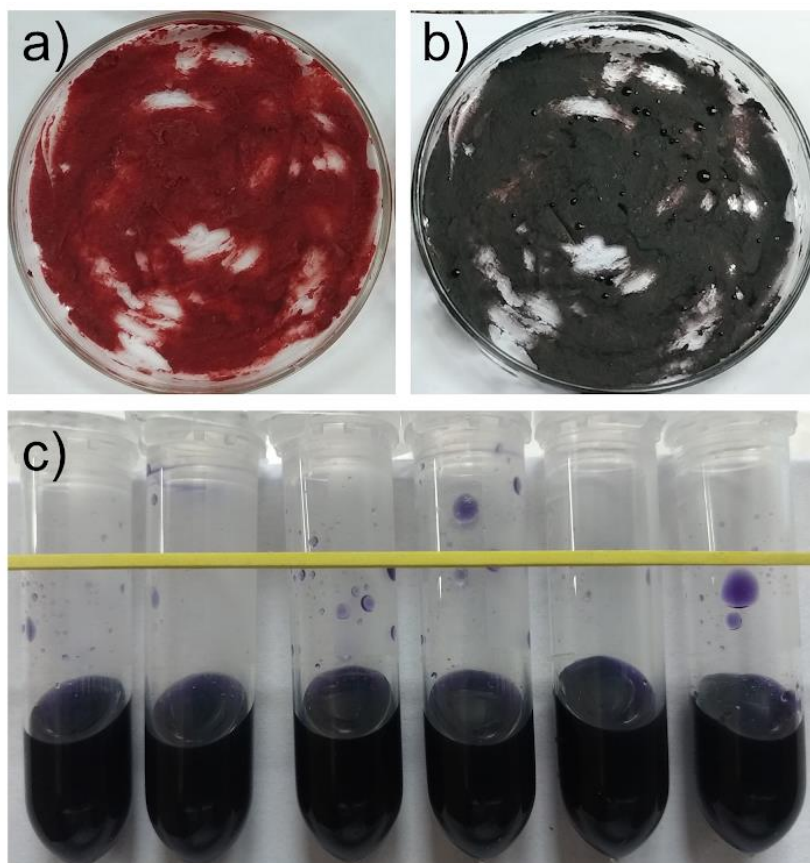
Dessa forma, pode-se observar a sensibilidade do pigmento bicaverina presente na biomassa em relação aos íons, podendo sofrer conversão de cor do vermelho para o azul apenas pela adição de água seguido de tratamento térmico.

5.1.5 Obtenção do EA

Supõe-se que a conversão direta da cor da BVC para uma coloração azulada após tratamento térmico (Figura 13 a e b) e a impossibilidade de extração do pigmento formado por solventes orgânicos tradicionais como acetato de etila, hexano e etanol, possa estar associada com a reação entre os componentes da parede celular e a bicaverina (SILVA, W. S. Da; BICAS, 2013). Ademais, há a possibilidade de que a

bicaverina esteja reagindo com os minerais provenientes do meio de arroz utilizado na fermentação, ou até com aminoácidos específicos como a arginina, reação que será apresentada adiante. Tentativas de extração do pigmento azulado formado foram realizados em estudos prévios, sendo o DMSO o único solvente capaz de realizar a extração. Dessa forma, realizou-se a extração da BA utilizando este solvente, produzindo um extrato de coloração arroxeado escuro (Figura 13 c).

Figura 13. Imagens de BVC, BA e extrato de BA em DMSO.



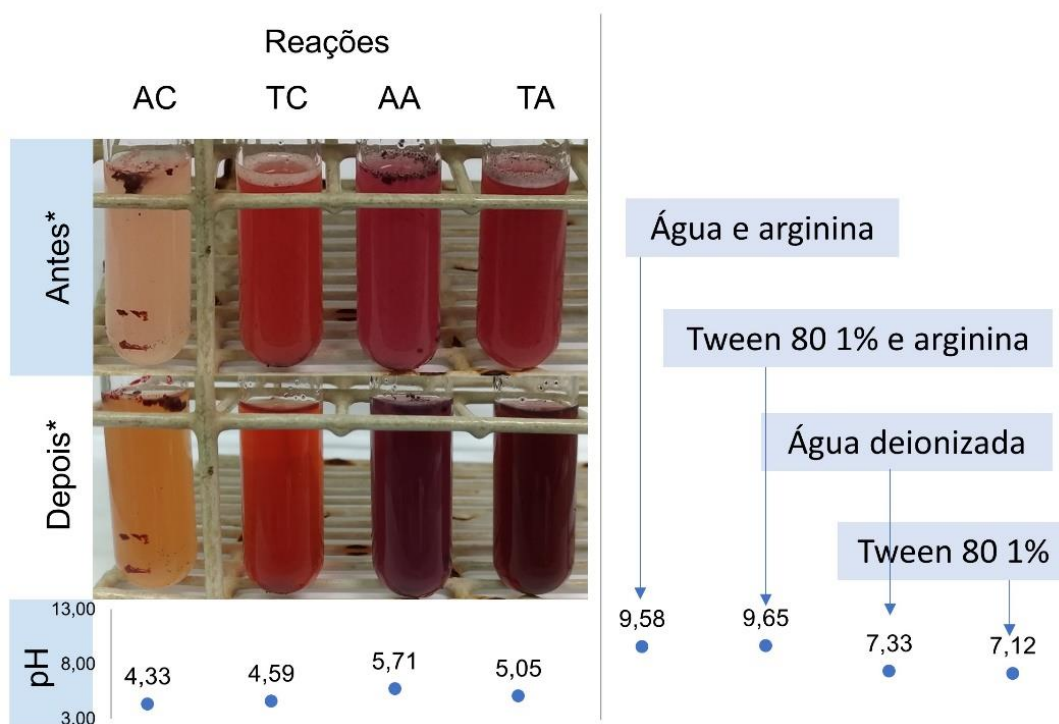
a) BVC espalhada em placa de vidro antes do tratamento térmico. b) BA formado após tratamento térmico, por conversão direta de BVC. c) extrato de BA em DMSO.

Estudos anteriores do grupo mostraram que a reação entre a BVU logo após a fermentação e os aminoácidos arginina e histidina (1:2, v:m) e subsequente tratamento térmico, resultaram na produção de pigmento azul (SANTOS, M. N.; BICAS; SANTOS, 2017), supondo-se que seja um evento semelhante ao observado com a genipina, uma aglicona incolor que sob aquecimento reage com proteínas e aminas primárias como lisina, histidina, arginina, glutamina, e asparagina,

entre outros, produzindo pigmentos azulados (SANTOS, M. C. Dos; BICAS, 2021). Dessa forma, para elucidar a natureza da modificação de cor da reação de EV e o aminoácido arginina, obteve-se o EA através dessa reação e investigou-se o EA obtido por UHPLC-MS/MS, sendo os resultados detalhados adiante na seção 5.1.6.

As reações de obtenção de EA a partir do EV e adição do aminoácido arginina resultaram na formação de pigmentos arroxeados em ambos os tipos de soluções utilizadas (Figura 14). Notou-se uma leve alteração de cor nas reações com arginina antes mesmo do tratamento térmico, cor que se desenvolveu mais intensamente após o tratamento térmico. Apesar do aumento do pH da reação devido a arginina ser um aminoácido polar básico, a alcalinização do meio pode não estar relacionada com a conversão de cor, já que no estudo de Santos, M. N.; Bicas e Santos (2017) a adição de lisina, também de caráter básico, não resultou na formação de pigmento azulado.

Figura 14. Reações do EV com arginina e as respectivas medidas de pH.



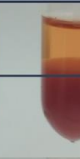
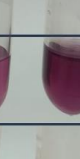
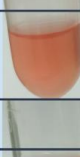
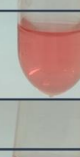
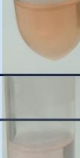
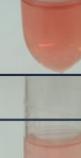
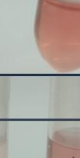
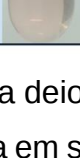
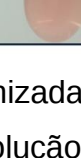
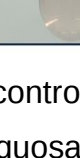
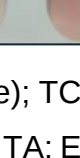
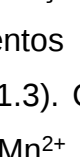
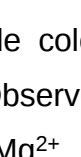
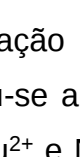
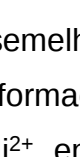
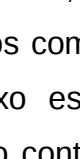
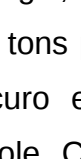
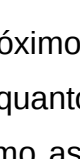
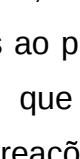
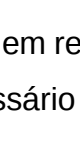
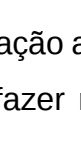
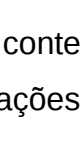
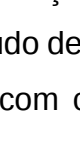
*Antes/Depois do tratamento térmico; AC: EV em água deionizada (controle); TC: EV em solução Tween 80 1% (controle); AA: EV e arginina em solução aquosa; TA: EV e arginina em solução Tween 80 1%.

Observou-se melhora na solubilização da EV mesmo antes do tratamento térmico em água deionizada, evento que é observado também em pigmentos laranja de *Monascus* insolúveis, no qual a reação com resíduos de aminoácidos leva a forte alteração na hidrofobicidade dos pigmentos, melhorando a solubilidade em água (WONG; KOEHLER, 1983).

Além da melhora na solubilidade dos pigmentos de *Monascus*, os derivados formados ainda apresentam maior estabilidade térmica (VENDRUSCOLO *et al.*, 2013), de pH (JUNG *et al.*, 2011; JUNG; KIM; SHIN, 2005), e têm o comprimento de onda de absorção deslocado para comprimentos de onda maiores ou menores dependendo do aminoácido reagido (JUNG *et al.*, 2003), características que podem diminuir as limitações e ampliar o potencial de aplicação em alimentos desses pigmentos (LIU *et al.*, 2018).

Dentre os solventes utilizados para a extração dos pigmentos formados, o DMSO foi o solvente que mais conseguiu extrair os pigmentos arroxeados produzidos (Figura 15). No entanto, a secagem e análise de UHPLC-MS/MS foram realizados também nos extratos de DCM, sendo os resultados apresentados a seguir na seção 5.1.6.

Figura 15. Extrações dos pigmentos formados após reação com arginina em diferentes solventes.

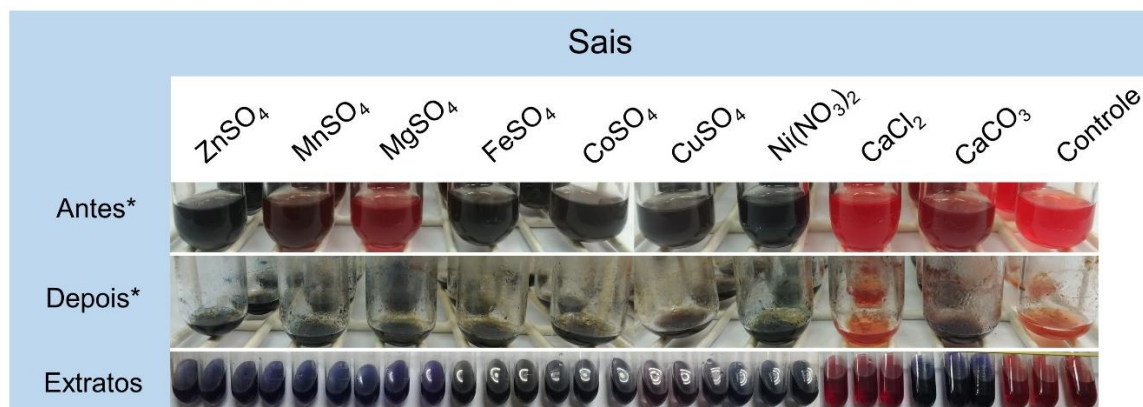
Solvente	Extratos			
	AC	TC	AA	TA
Acetato de etila				
				
DCM				
				
DMSO				
				
Acetonitrila				
				
Metanol				
				
Água*				

*água deionizada; AC: EV em água deionizada (controle); TC: EV em solução Tween 80 1% (controle); AA: EV e arginina em solução aquosa; TA: EV e arginina em solução Tween 80 1%.

Como observado na avaliação da adição de sais em BVU, os sais reagiram com o EVB e produziram pigmentos de coloração semelhantes (Figura 16) aos observados anteriormente (em 5.1.3). Observou-se a formação de pigmentos mais azul-arroxeados nos sais de Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} , enquanto os sais de íons Fe^{2+} e Co^{2+} , produziram pigmentos com tons próximos ao preto e cinza escuros. O $CaCO_3$ produziu um extrato roxo escuro enquanto que a reação com $CaCl_2$ permaneceu avermelhada como o controle. Como as reações foram efetuadas em concentrações equimolares de sal em relação ao conteúdo de bicaverina no EVB com conversão das cores, seria necessário fazer reações com concentrações menores

para verificar se seriam necessários pelo menos um íon para cada molécula de bicaverina para que ocorresse a formação de pigmentos azulados.

Figura 16. Reações de EVB com diferentes sais e os respectivos extratos obtidos por extração em DMSO.



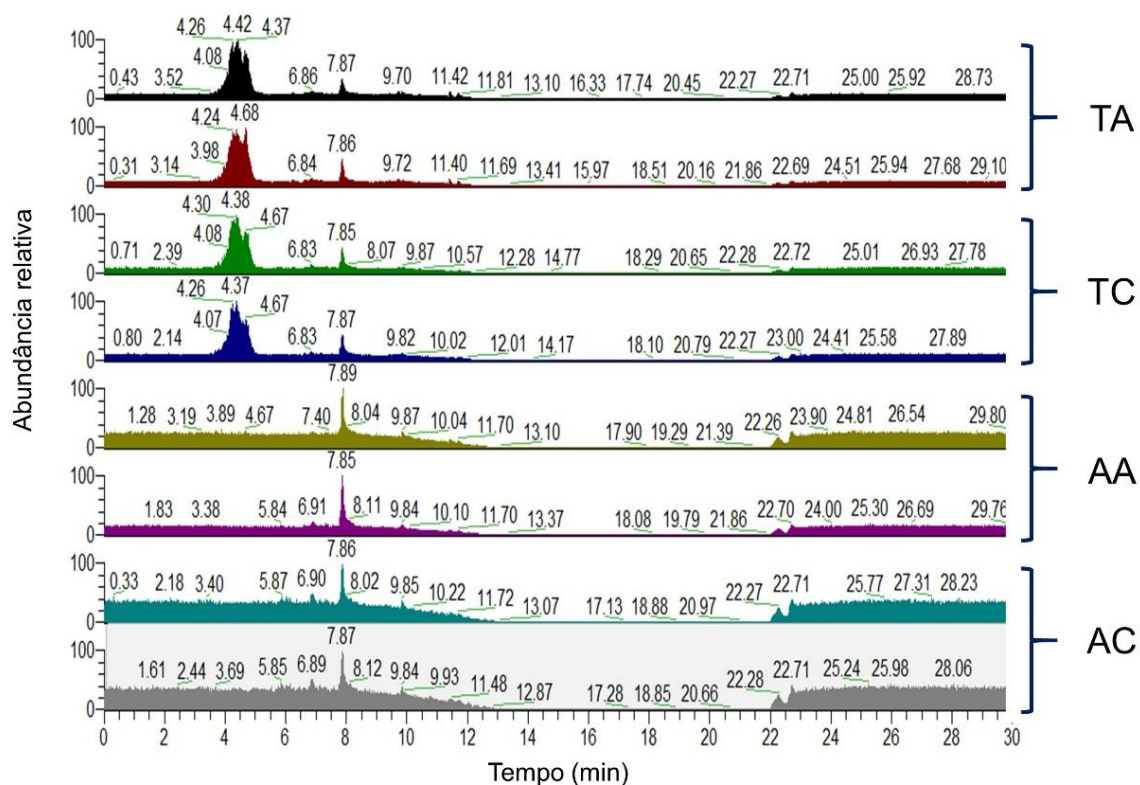
*Antes/Depois do tratamento térmico.

5.1.6 Análise UHPLC-MS/MS de EA obtido por reação com arginina

A cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada a espectrômetro de massas em tandem (UHPLC-MS/MS) aliou a alta eficiência, resolução, rapidez, robustez e confiabilidade de separação de compostos da cromatografia líquida de ultra-eficiência (UHPLC) e a seletividade, sensibilidade e o alto rendimento da espectrometria de massas (MS) para análise de amostras complexas, e tem se tornado o método analítico de escolha para a avaliação e identificação de drogas, contaminantes, metabólitos ou biomarcadores de amostras biológicas (NOVÁKOVÁ; SVOBODA; PAVLÍK, 2017).

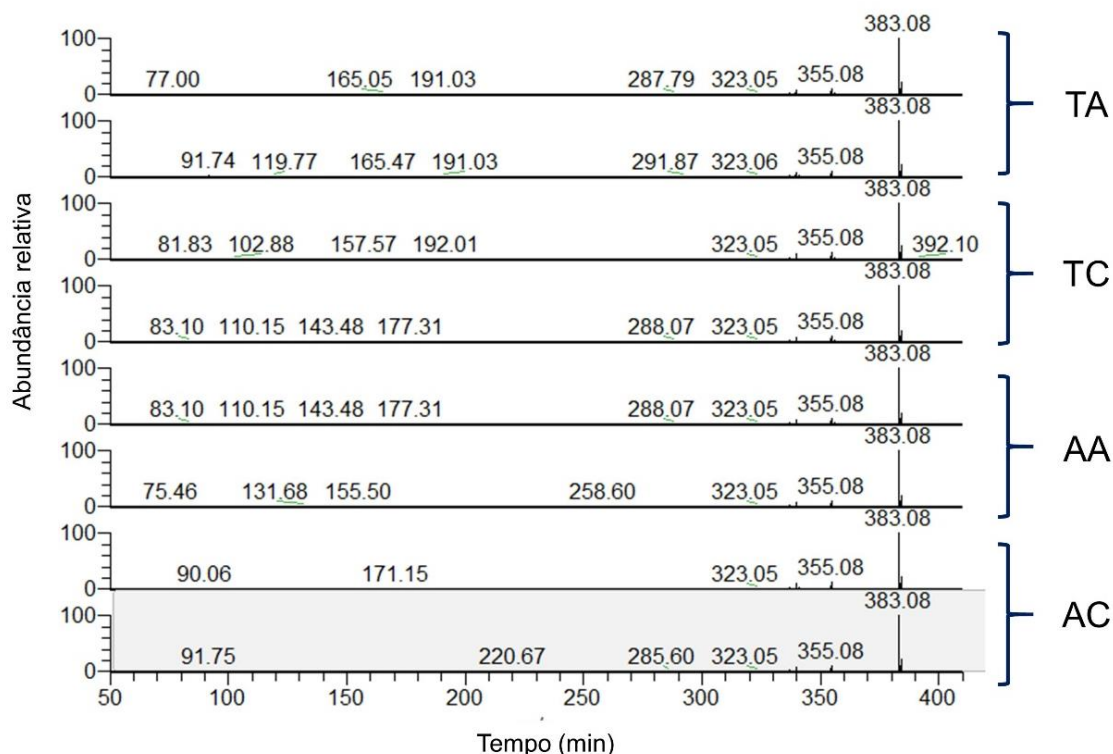
A análise UHPLC-MS/MS das amostras de EAs extraídas com DCM das reações de EV com arginina em ambas as soluções (água deionizada e Tween 80 1%), revelou a presença de picos intensos de bicaverina nos cromatogramas no tempo de retenção aproximado entre 7,70 a 7,90 min (Figura 17), que foi reconhecida através da análise dos fragmentos de massa carga (m/z) 383,0760 $[M + H]^+$ nos tempos de retenção entre 7,78 a 7,80 min e verificação dos fragmentos MS 383, 355, 340 e 323 (Figura 18), de acordo com o descrito por Busman et al. (2012). Intensidades semelhantes também são observadas nas respectivas amostras controle.

Figura 17. Cromatogramas das amostras de EA obtidos por extração com DCM das reações de EV com arginina em água deionizada ou Tween 80 1%.



Cada tipo de amostra possui dois cromatogramas, um para cada replicata. TA: EV e arginina em solução Tween 80 1%; TC: EV em solução Tween 80 1% (controle); AA: EV e arginina em solução aquosa; AC: EV em água deionizada (controle).

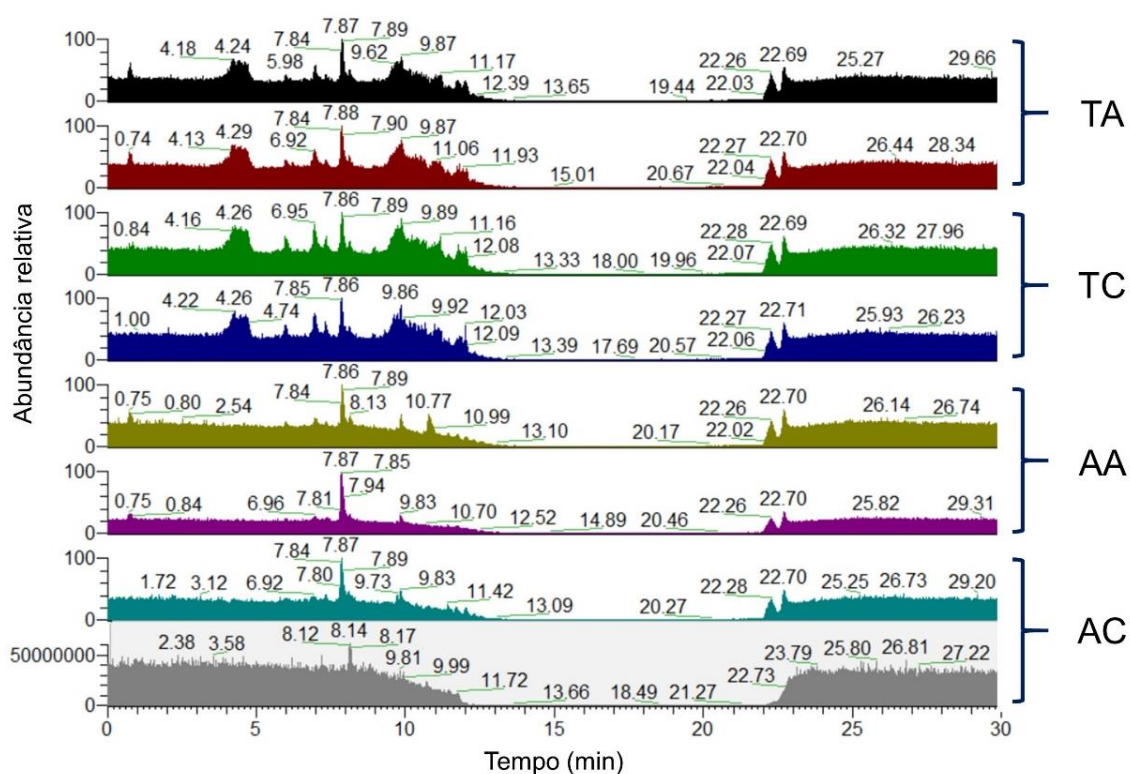
Figura 18. Espectros de fragmentação MS dos picos de bicaverina nos cromatogramas no tempo de retenção aproximado entre 7,78 a 7,80 min das amostras obtidas por extração com DCM.



Cada tipo de amostra possui dois espectros de fragmentação, um para cada replicata. TA: EV e arginina em solução Tween 80 1%; TC: EV em solução Tween 80 1% (controle); AA: EV e arginina em solução aquosa; AC: EV em água deionizada (controle).

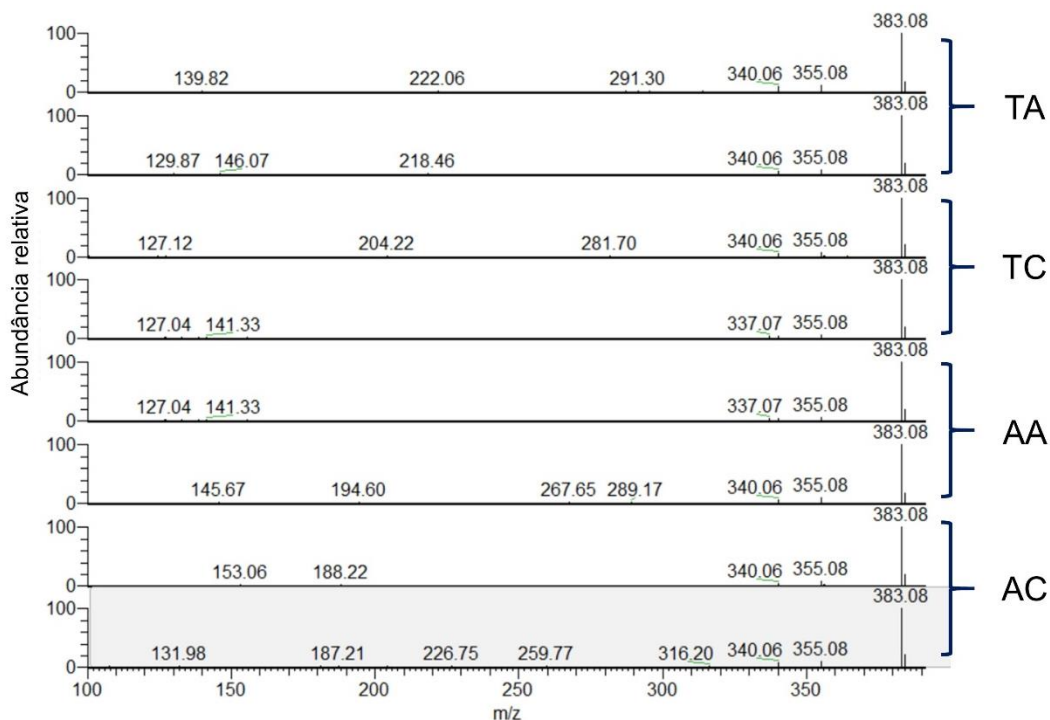
Semelhantemente aos picos de bicaverina observados nas amostras obtidas por extração em DCM, picos intensos são observados nos cromatogramas das amostras de EAs extraídas com DMSO das reações de EV com arginina em ambas as soluções (água deionizada e Tween 80 1%). São observados picos intensos de bicaverina nos cromatogramas no tempo de retenção aproximado entre 7,80 a 7,90 min, com um deslocamento para 8,14 min em uma das replicatas da amostra de reação controle em água deionizada (Figura 19). Os picos foram reconhecidos através da análise dos fragmentos de massa carga (m/z) 383,0760 $[M + H]^+$ nos tempos de retenção entre 7,78 a 7,81 min e verificação dos fragmentos MS 383, 355, 340 e 337 (Figura 20), de acordo com o descrito por Busman et al. (2012).

Figura 19. Cromatogramas das amostras de EA obtidos por extração com DMSO das reações de EV com arginina em água deionizada ou Tween 80 1%.



Cada tipo de amostra possui dois cromatogramas, um para cada replicata. TA: EV e arginina em solução Tween 80 1%; TC: EV em solução Tween 80 1% (controle); AA: EV e arginina em solução aquosa; AC: EV em água deionizada (controle).

Figura 20. Espectros de fragmentação MS dos picos de bicaverina nos cromatogramas no tempo de retenção aproximado entre 7,86 a 7,87 min das amostras obtidas por extração com DMSO.



Cada tipo de amostra possui dois espectros de fragmentação, um para cada replicata. TA: EV e arginina em solução Tween 80 1%; TC: EV em solução Tween 80 1% (controle); AA: EV e arginina em solução aquosa; AC: EV em água deionizada (controle).

A observação de picos intensos na faixa de tempo de retenção entre 2,5 e 5,5 min somente nas amostras TA e TC (controle sem adição de arginina) em ambos os tipos de extração (DCM ou DMSO), que são amostras obtidas de reações envolvendo solução de Tween 80 1%, mostra a forte interferência desse surfactante nessa faixa de tempo. De fato, esta interferência pode ser observada entre as faixas de tempo de retenção entre 0,5 a 5,5 min e tem sido um desafio para a avaliação de compostos insolúveis em água, já que é um surfactante amplamente utilizado para facilitar a solubilização de compostos microbianos, farmacêuticos e cosméticos (JÄPELT; JOHNSEN; CHRISTENSEN, 2016). Assim, deve-se atentar para esta limitação durante a análise dos dados nessa faixa de tempo, em nosso trabalho.

Esperou-se que a adição de arginina no EV produzisse um composto azulado resultante da ligação entre este aminoácido e a bicaverina, principalmente

nas amostras obtidas por extração com DMSO que se mostraram mais arroxeadas em comparação com as amostras obtidas por extração com DCM (Figura 15). Dessa forma, foram realizadas buscas dos fragmentos de massa carga (m/z) próximos de 557,5 $[M + H]^+$, soma das massas moleculares da arginina (174,2 g/mol) e bicaverina (382,3 g/mol), e também foram avaliados os fragmentos de m/z de 558 até 439 $[M + H]^+$, para verificação de possível formação de compostos constituídos de partes de cada molécula alvo. No entanto, não foram encontrados nenhum provável composto que tenha aparecido somente nas amostras que foram adicionadas à arginina.

Ademais a observação de perfis cromatográficos semelhantes entre as amostras de reação e seus respectivos controles acompanhado com picos de bicaverina de intensidades fortes e semelhantes, sugere que talvez a bicaverina e a arginina não estejam reagindo de forma a produzir uma nova molécula de estrutura diferente, e sim interagindo de forma intermolecular sem a formação de ligações e apenas modificando a distribuição da densidade eletrônica molecular da bicaverina, que conseqüentemente altera o seu espectro de absorção de cor e/ou emissão de fluorescência, como foi observado por Hussain et al. (2019). Este evento pode estar acontecendo também com a adição de íons metálicos na produção de pigmentos azulados realizados neste trabalho, que serão avaliados mais adiante em outros estudos.

No entanto, estas hipóteses ainda precisam ser avaliadas com maior cuidado, já que estamos tratando de amostras complexas, por se tratar de extrato vermelho bruto, nos quais estão presentes uma ampla gama de compostos químicos além da bicaverina. Uma alternativa para possibilitar o encontro de possíveis moléculas produzidas pela adição de arginina no EV seria a submissão e anotação dos dados de UHPLC-MS/MS na plataforma GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) (WANG, M. *et al.*, 2016), que é uma plataforma de dados espectrais específicos para produtos naturais que facilita e agiliza a dereplicação dos dados de cromatografia acoplada à espectrometria de massas além de rastrear análogos estruturais de moléculas ainda não disponíveis nas bibliotecas ou descritas na literatura.

5.1.7 Avaliação da capacidade antioxidante do EV

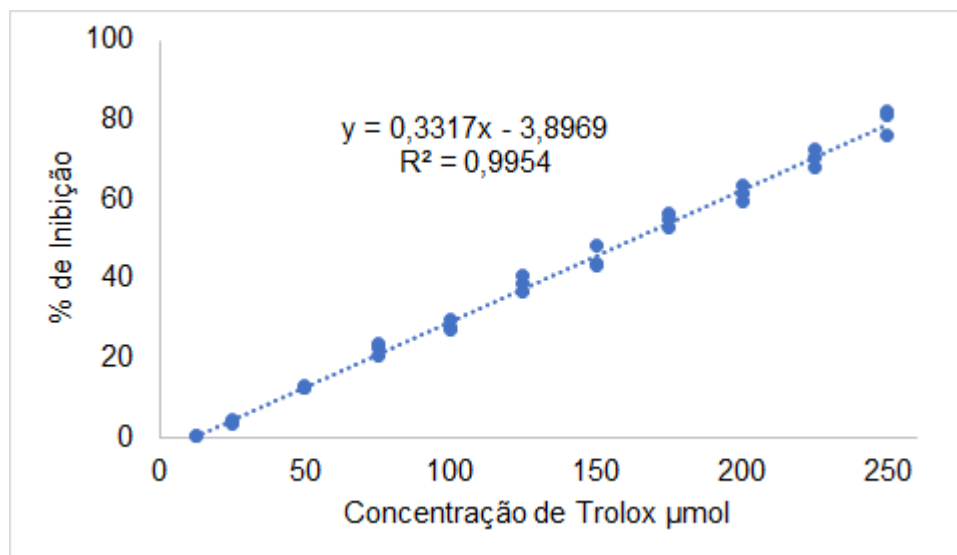
5.1.7.1 TEAC

O método TEAC está entre os métodos químicos mais utilizados para a determinação da capacidade antioxidante através do sequestro de radicais livres, sendo o radical livre utilizado o radical ABTS^{•+}, que é um composto cromóforo quimicamente estável de absorbância máxima de 414 nm e absorbâncias secundárias de 645, 734 e 815 nm (MILLER *et al.*, 1993; THAIPONG *et al.*, 2006). Possui alta solubilidade em água, mas pode também ser solubilizado em meios orgânicos, solventes definidos de acordo com a natureza dos compostos antioxidantes a serem analisados (ARNAO, 2000). O método avalia a habilidade dos antioxidantes em sequestrar o radical ABTS^{•+}, de coloração azul esverdeado, através do decréscimo da cor medidos por absorbância da reação de inibição radical-antioxidante, sendo o percentual de inibição determinado em função do padrão Trolox que é submetido às mesmas condições de análise (SUCUPIRA *et al.*, 2012).

A aplicação do método é simples, rápido e reprodutível, com flexibilidade para determinação tanto da capacidade antioxidante de amostras hidrofílicas quanto lipofílicas (AWIKA *et al.*, 2003), favorecendo a avaliação do EV de considerável lipofilicidade.

Dessa forma, a partir da curva padrão de Trolox e da equação da reta obtida (Figura 21), foi possível a obtenção do resultado de capacidade antioxidante do EV, expressos em $\mu\text{mol TE/mg}$, encontrando-se o valor de $235,49 \pm 7,03 \mu\text{mol TE/mg}$ para o EV.

Figura 21. Curva padrão do Trolox para cálculo da capacidade antioxidante de sequestro do radical ABTS com a equação e coeficiente de correlação linear (R^2).



5.1.7.2 ORAC

O método ORAC apesar de ser mais dispendioso em questões de custo e tempo, este método também está entre os métodos químicos mais utilizados para a determinação da capacidade antioxidante (AWIKA *et al.*, 2003; OU *et al.*, 2013). No entanto, difere do método ABTS por basear-se em reações de transferência de átomos de hidrogênio e assim possuindo maior relevância devido ao uso de radicais semelhantes aos presentes em sistemas biológicos (PRIOR *et al.*, 2003).

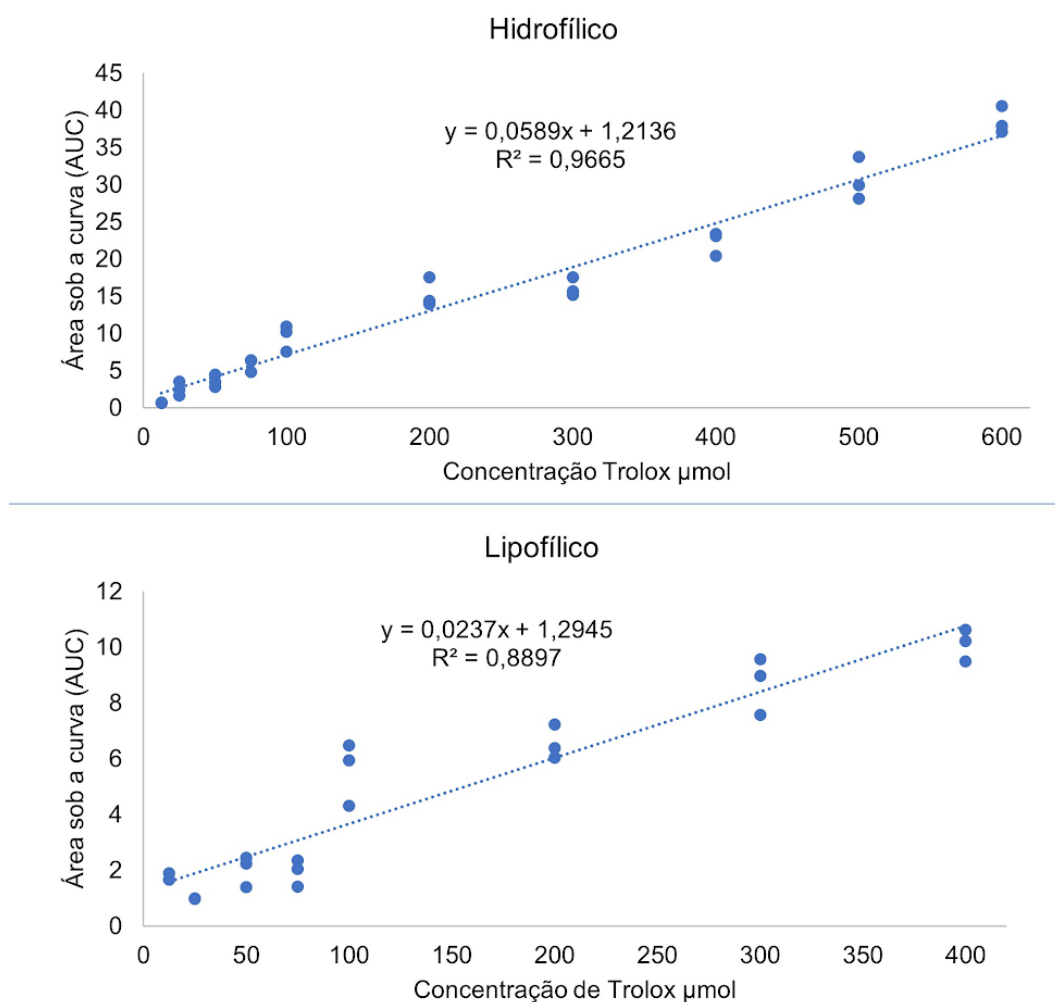
A reação do método é composta pelo AAPH [2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) dihidrocloruro], promotor da geração de peroxilas, e fluoresceína, que é um marcador fluorescente, fotoestável e termoestável, que sofre redução pela peroxila e tem sua fluorescência reduzida (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004).

O antioxidante atua como competidor pelos radicais formados, que doando átomos de hidrogênio produz compostos menos reativos e consequentemente inibe a perda da intensidade da fluorescência, que é proporcional à atividade do antioxidante (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004).

Semelhantemente ao TEAC, o ORAC pode ser aplicado para a determinação da capacidade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos, e ainda possui vantagem de não ser fortemente afetado por amostras com compostos coloridos por se basear na mensuração de fluorescência (HUANG, D. *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos também podem ser expressos em função do padrão Trolox (OU *et al.*, 2013). Dessa forma, foram construídas duas curvas padrão Trolox (Figura 22), pois este método permite a determinação da capacidade antioxidante de ambos os compostos, hidrofílicos e lipofílicos. Cada curva foi construída de acordo com os valores das áreas sob a curva de decréscimo (AUC) da perda de fluorescência das diferentes concentrações de Trolox.

Figura 22. Curva padrão de Trolox para capacidade antioxidante determinado por ORAC hidrofílico e lipofílico e suas equações e coeficientes lineares (R^2).



O resultado da fração hidrofílica foi de $282,64 \pm 7,04 \mu\text{mol TE/mg}$, enquanto a fração lipofílica obteve valor próximo ao dobro do obtido pela fração hidrofílica, de $564,84 \pm 132,32 \mu\text{mol TE/mg}$, sendo o total igual a $847,49 \pm 126,93 \mu\text{mol TE/mg}$.

As diferenças entre as capacidades antioxidantes determinadas nos diferentes ensaios, TEAC e ORAC, devem-se às diferenças de princípios, reagentes, afinidades químicas entre os radicais e a amostra, possíveis erros de análise, e diferentes características e mecanismo de ação dos compostos que estão presentes na amostra (THAIPONG *et al.*, 2006), visto que o extrato possui outros compostos além da bicaverina que podem ter reatividades diferentes aos reagentes de cada ensaio.

No entanto, a avaliação pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) mostrou que os valores de capacidade antioxidante obtidos no ensaio TEAC e na fração hidrofílica de ORAC, não têm diferença estatística significativa, evidenciando que apesar da utilização de solventes de funções diferentes no preparo da amostra, lipofílica para TEAC e hidrofílica para ORAC, resultaram em resposta similar. Ademais, o resultado expressivo de ORAC da fração lipofílica mostra uma possível eficiência do solvente utilizado neste ensaio para nossa amostra que possui caráter hidrofóbico.

A análise de correlação de Pearson foi efetuada entre os dois tipos de métodos, no entanto não foi possível encontrar uma correlação significativa ($p = 0,696$). Desse modo, observa-se dificuldade na comparação dos resultados entre diferentes métodos visto à complexidade e diversidade de compostos antioxidantes e das peculiaridades das metodologias.

5.2 Isolamento, identificação de bactéria púrpura e avaliação de diferentes meios de crescimento celular e produção de violaceína

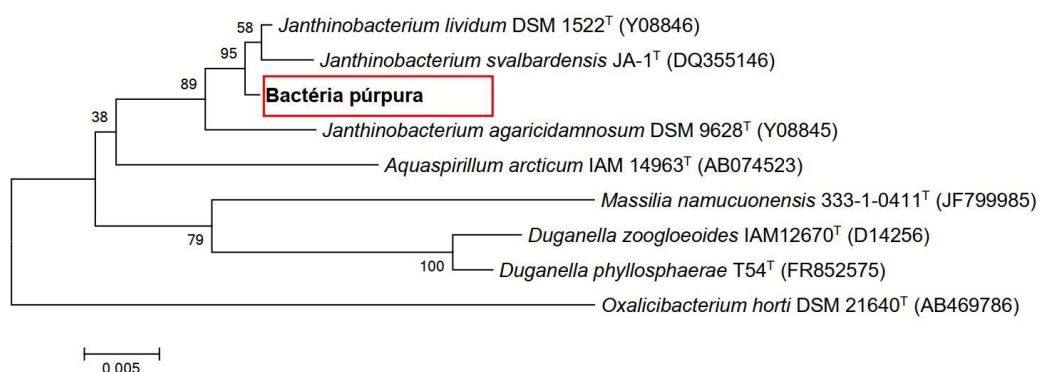
5.2.1 Isolamento, identificação de bactéria púrpura

Durante o processo de isolamento foram utilizados diferentes meios sólidos, sendo o meio sólido YPS, o meio no qual as colônias apresentaram crescimento morfológico homogêneo, produção de pigmento e maior tempo de sobrevivência na placa. Dessa forma, a linhagem isolada foi mantida em placas de Petri contendo meio sólido YPS, sob incubação a 25°C, realizando-se repique sempre que foi necessário. A microscopia óptica mostrou que o isolado se tratava de uma bactéria baciliforme Gram-negativa.

A análise UHPLC-MS/MS mostrou que o pigmento produzido foi a violaceína, e o sequenciamento do gene RNAr 16S do DNA bacteriano identificou que o isolado se tratava potencialmente de uma nova linhagem pertencente ao gênero

Janthinobacterium, com 99,90% de identidade, apresentando maior proximidade ao *J. lividum* DSM 1522^T e ao *J. svalbardensis* JA-1^T (Figura 23). Membros destas duas espécies são conhecidos por produzir pigmentos como a violaceína em *J. lividum* (KANELLI *et al.*, 2018) e outros pigmentos semelhantes à violaceína em *J. svalbardensis* (AVGUŠTIN *et al.*, 2013).

Figura 23. Árvore filogenética da bactéria púrpura isolada.



5.2.2 Avaliação de diferentes meios para o crescimento celular e de produção de violaceína pela bactéria púrpura

Após identificação da bactéria, identificação do pigmento produzido foram realizadas buscas na literatura pelos meios mais utilizados nos estudos com espécies do mesmo gênero ou outras espécies comumente conhecidas pela produção de violaceína. De acordo com a revisão de Durán, N. et al (2016), muitos estudos sobre produção de violaceína reportam as concentrações do pigmento baseando-se no coeficiente de extinção, determinado pela utilização de análise espectrofotométrica, que pode variar (10,96 a 74,3 L/g.cm⁻¹) significativamente de acordo com o comprimento de onda de absorção máxima (565 – 575 nm) e o solvente (etanol, acetona-água) utilizado. Esta discrepância nos valores dos coeficientes de extinção para determinação das concentrações de violaceína pode resultar na superestimação das concentrações de até 680%, como foi destacado por Rodrigues, A. L. et al. (2012), e ainda dificultar as comparações de produção do pigmento entre diferentes estudos.

Ademais, a determinação baseada em espectrofotometria nos fornece estimativa da concentração de violaceína bruta, ou seja, do pigmento azulado

resultante da mistura do componente majoritário violaceína e de pequena concentração de deoxiviolaceína, o qual dependendo da concentração presente na mistura com a violaceína pode ocasionar a mudança de até aproximadamente 50% do coeficiente de extinção (RODRIGUES, A. L. *et al.*, 2012). Devido à dificuldade na extração e isolamento da deoxiviolaceína a partir do extrato bruto de violaceína, a deoxiviolaceína pode representar uma interferência considerável para a quantificação acurada de violaceína (WANG, H. *et al.*, 2012). Dessa forma, recomenda-se o uso do método por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a determinação e quantificação acurada de violaceína e deoxiviolaceína, devido à obtenção do coeficiente de extinção a partir da lei de Beer em diferentes concentrações do padrão (violaceína ou deoxiviolaceína pura) (DURÁN, N. *et al.*, 2016). No entanto, para a estimativa da concentração de violaceína para acompanhamento de culturas bacterianas, é considerado conveniente o uso das determinações espectrofotométricas com o uso do coeficiente de extinção, desde que seja determinada previamente a pureza da violaceína por HPLC (DURÁN, N. *et al.*, 2016).

Como o presente trabalho avaliou grande quantidade de diferentes meios para a produção de violaceína por nossa linhagem bacteriana, optou-se pelo monitoramento e estimativa da concentração de pigmento produzido por método espectrofotométrico, sem o uso do coeficiente de extinção, para auxiliar na seleção preliminar dos melhores meios para a produção de violaceína. Dessa forma, a avaliação e comparação da produção de violaceína foi realizada através dos valores de absorbância obtidos a 575 nm, deixando o uso do método de quantificação mais acurado por HPLC para trabalhos futuros de maximização da produção de violaceína.

Conforme estudos encontrados na literatura, o meio NB e NB suplementado com outros nutrientes, como glicerol e glicose, foram os meios que proporcionaram a produção de violaceína por linhagens de *J. lividum* (CORTÉS-OSORIO *et al.*, 2017; KANELLI *et al.*, 2018; VENIL *et al.*, 2015). No estudo de Kanelli *et al.* (2018), a produção de violaceína em meio NB suplementado com glicerol alcançou leitura de absorbância de aproximadamente 5 a 6,5 (580 nm) e 1,83 g/L de violaceína bruta sob fermentação em biorreator por 144 h. No estudo de Cortés-Orsorio *et al.* (2017), a produção de violaceína alcançou aproximadamente 12 unidades de absorbância (575 nm) em meio NB suplementado com glicerol, aproximadamente 0,4

g/L, enquanto que o meio NB suplementado com glicose produziu aproximadamente 0,9 g/L de violaceína bruta após 120 h de fermentação em frascos cônicos de vidro.

No entanto, ensaios de crescimento celular e produção de pigmento utilizando esses meios (NB, NBGL, NBG) resultaram apenas em crescimento celular sem a produção de violaceína (vide ensaios 25, 27 e 28 das Figuras 24 e 25). Ademais, a suplementação com outras fontes de carbono no meio NB (NBL, NBS e NBF) também não resultou no aumento significativo da produção de violaceína, observando-se somente considerável crescimento celular alcançando valores acima de 11 de DO_{600nm} para os meios NB suplementados com sacarose e frutose (vide ensaios 26, 28, 29, e 30 das Figuras 24 e 25). Dessa forma, foi necessário realizar uma avaliação com outros meios, variando-se as fontes de carbono e nitrogênio, para possibilitar a produção de violaceína por nossa linhagem.

Figura 24. Mapa de crescimento celular de *Janthinobacterium* sp. nos diferentes meios e tempos de fermentação.

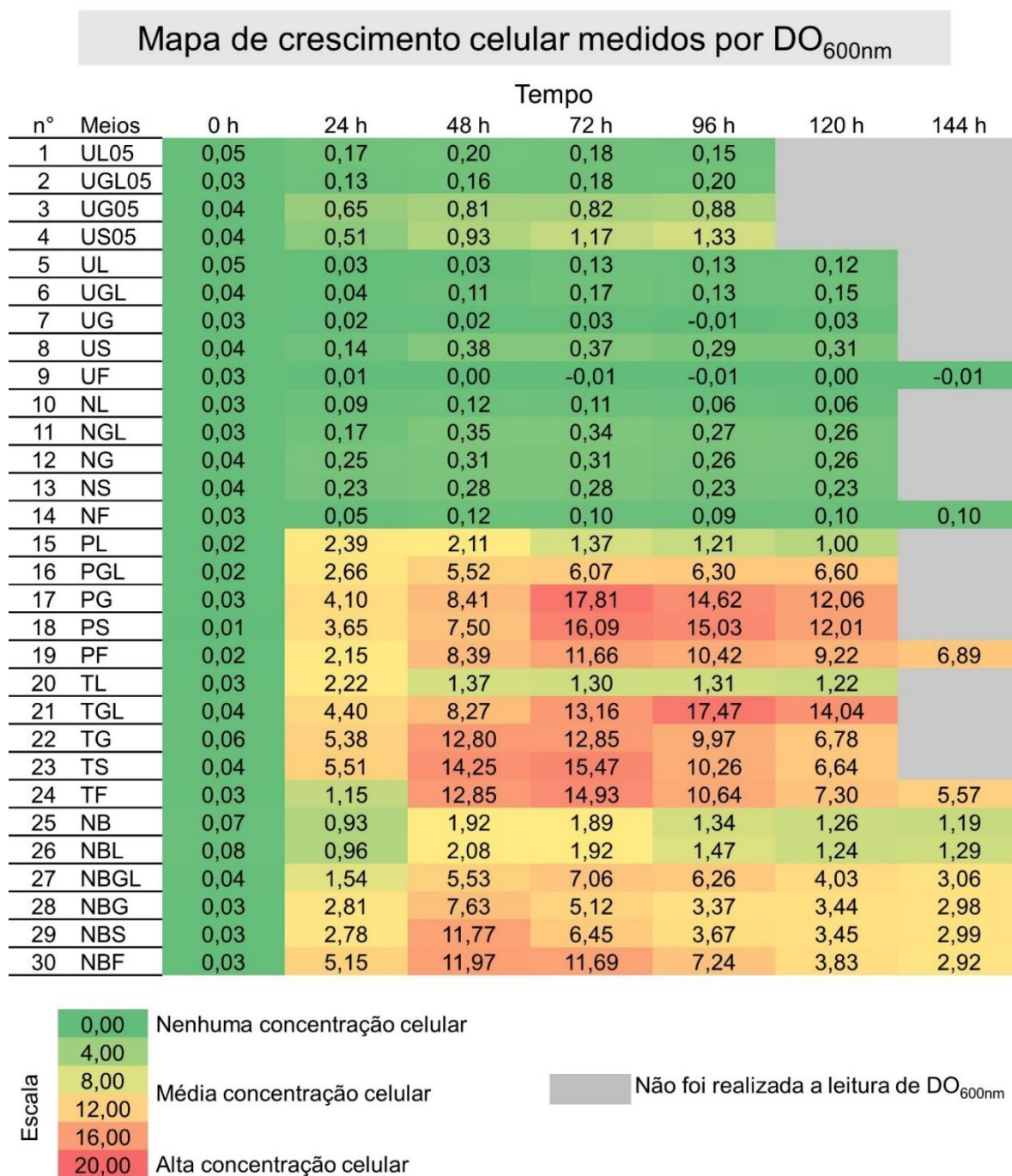
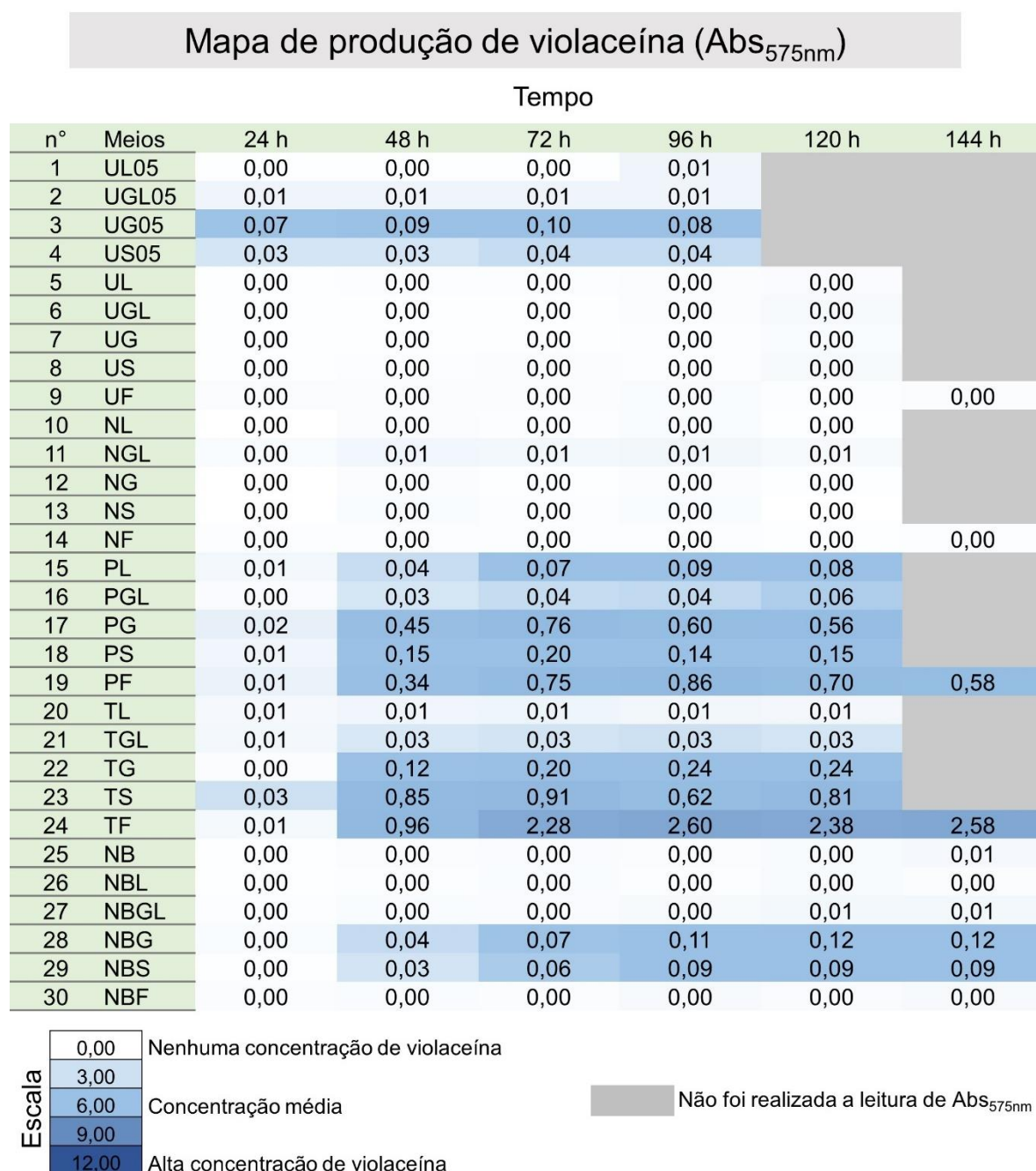


Figura 25. Mapa de produção de violaceína por *Janthinobacterium* sp. nos diferentes meios e tempos de fermentação.



Como o meio sólido de manutenção YPS promoveu a produção de pigmento pelas colônias de *Janthinobacterium* sp. optou-se pela utilização deste meio na forma líquida para o preparo do inóculo. Ponderou-se a possibilidade de utilização do meio YPS, para produção de pigmentos, mas a baixa produção de pigmento, de valor pouco mais da metade do valor alcançado por Kanelli et al. (2018) e a produção de pigmento em teste preliminar de meio com apenas dois componentes, peptona e

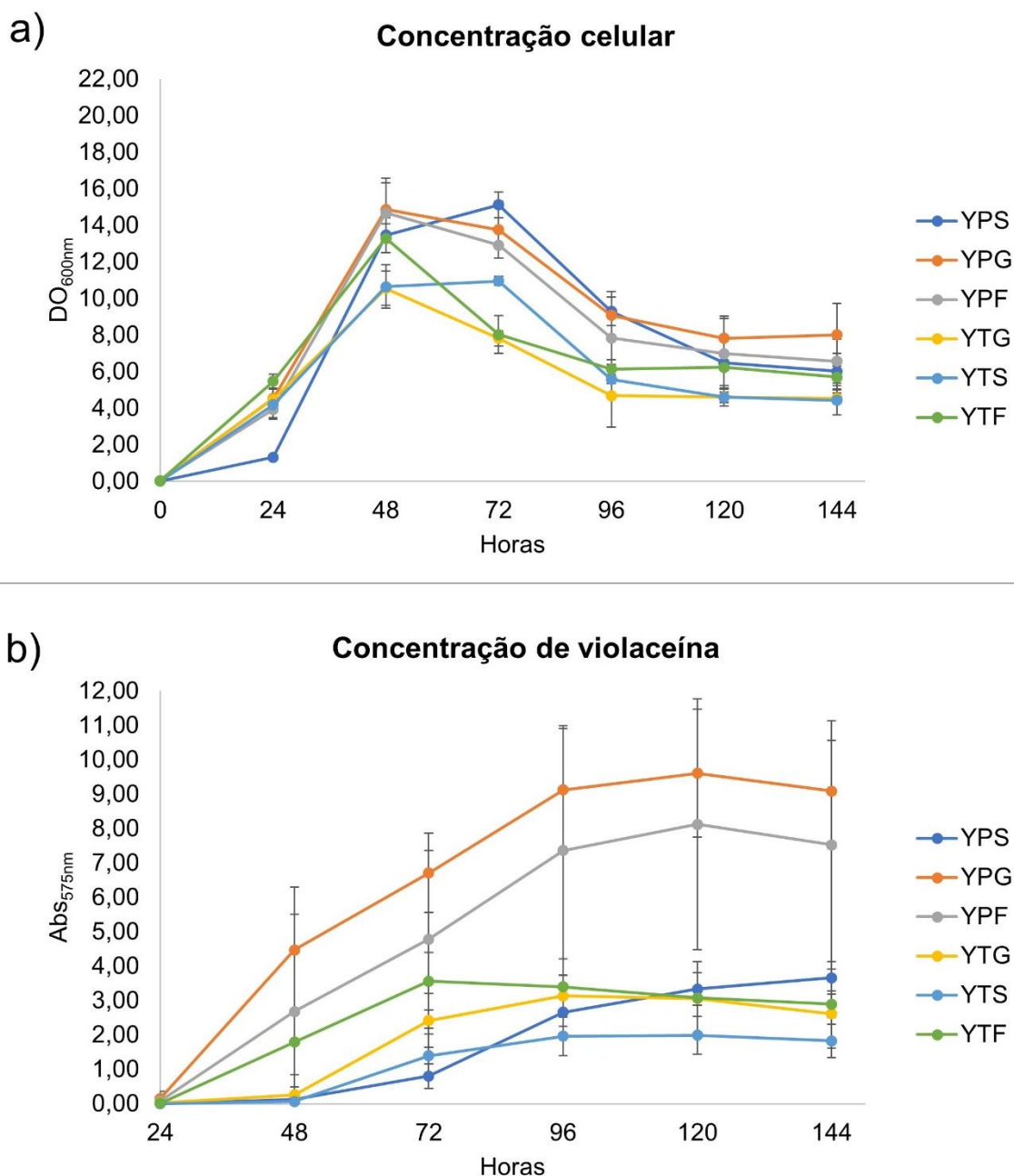
glicerol, motivaram a avaliação da adição ou troca de componentes do meio fermentativo. Adição e/ou troca de componentes que foram realizadas de acordo com os resultados de produção de violaceína que foram sendo obtidos dos meios avaliados.

De forma semelhante aos estudos com diferentes espécies produtoras de violaceína avaliou-se diferentes fontes de carbono e nitrogênio no meio fermentativo para a produção de violaceína. Estudos com *J. lividum* avaliaram fontes de carbono como glicose, glicerol (CORTÉS-OSORIO *et al.*, 2017; KANELLI *et al.*, 2018), enquanto que a sacarose, lactose, frutose e diferentes fontes de nitrogênio inorgânico (NH_4Cl) e orgânico (peptona, triptona, extrato de levedura) foram avaliados com *Iodobacter* sp. (KUMAR *et al.*, 2021). A uréia foi também adicionada em nosso estudo pela não identificação de estudos que avaliaram este composto na produção de violaceína, pela disponibilidade e por ser uma fonte alternativa de nitrogênio para crescimento bacteriano (JØRGENSEN, 2009).

As fermentações nos diferentes meios foram iniciadas com inóculo contendo em média $1,9 \cdot 10^9$ UFC. Apesar de Kumar *et al.* (2021) ter observado pouca produção de violaceína com *Iodobacter* sp. em meios contendo 0,5 g/L de NH_4Cl , corroborados por testes preliminares utilizando 0,5 g/L de uréia e insuficiente crescimento celular e produção de pigmento (vide ensaios 1 a 4 das Figuras 24 e 25), optou-se seguir pela utilização de 5 g/L, semelhante a quantidade de peptona utilizada no meio YPS, e esperando uma melhora nos resultados. No entanto, os meios de fermentação contendo 5 g/L de uréia ou NH_4Cl , não apresentaram crescimento celular (vide ensaios 5 a 9 da Figura 24) assim como produção de violaceína (vide ensaios 5 a 9 da Figura 25), mostrando-se inadequados como fonte de nitrogênio para nossa linhagem.

As avaliações dos meios com peptona e triptona variando as fontes de carbono prosseguiram. Obteve-se melhor crescimento celular e produção de violaceína, tendo como melhor resultado para produção de violaceína ($\text{Abs}_{575\text{nm}}$ $2,58 \pm 0,33$), o meio com triptona e frutose (TF) (vide ensaio 24 da Figura 25). Mas, ainda em menor quantidade do que a observada com o meio YPS ($\text{Abs}_{575\text{nm}}$ $3,66 \pm 0,47$) (Figura 26).

Figura 26. Cinética de crescimento celular e produção de violaceína por *Janthinobacterium* sp. nos meios contendo extrato de levedura.

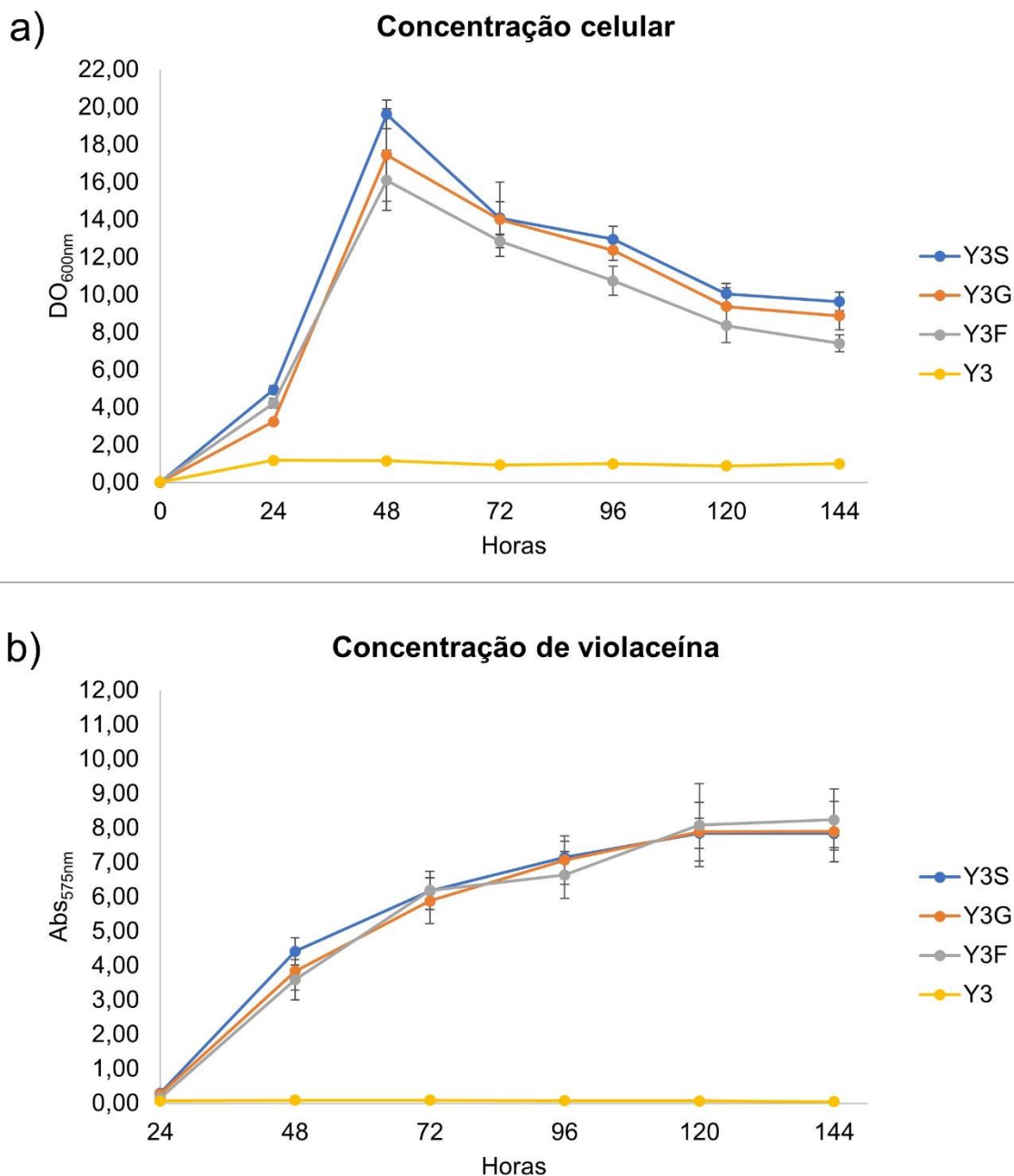


Prosseguiu-se com as avaliações dos meios de fermentação YPS e suas variações, substituindo-se a sacarose e a peptona como fontes de carbono e nitrogênio de YPS. Assim, obteve-se os meios compostos por peptona e glicose (YPG), peptona e frutose (YPF), triptona e glicose (YTG), triptona e sacarose (YTS), e triptona e frutose (YTF). A lactose e o glicerol não foram considerados como fontes de carbono alternativas neste ensaio devido ao baixo desempenho de produção de pigmento nos

meios anteriores. Como até então os meios TF e YPS apresentaram os melhores resultados, esperava-se observar melhor desempenho do meio YTF. No entanto, as maiores produções de pigmento foram evidenciadas nos meios YPG ($\text{Abs}_{575\text{nm}} 9,61 \pm 1,86$) e YPF ($\text{Abs}_{575\text{nm}} 8,13 \pm 3,65$) (Figura 26 b), sugerindo que o extrato de levedura (presente em YTF e YPF, mas não em TF) pode interferir de forma negativa no meio com triptona, e de forma sinérgica no meio contendo peptona.

O efeito positivo do extrato de levedura na produção de violaceína, estimulou a avaliação de meios contendo apenas este extrato e variadas fontes de carbono. Assim, foram testados os meios contendo apenas 3 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de sacarose (Y3S), glicose (Y3G) ou frutose (Y3F), ou apenas 3 g/L de extrato de levedura, sem fonte de carbono adicional (Y3). Os resultados indicaram altas produções de violaceína nos meios Y3G ($\text{Abs}_{575\text{nm}} 7,90 \pm 0,88$), Y3S ($\text{Abs}_{575\text{nm}} 7,84 \pm 0,41$) e Y3F ($\text{Abs}_{575\text{nm}} 8,24 \pm 0,88$) (Figura 27).

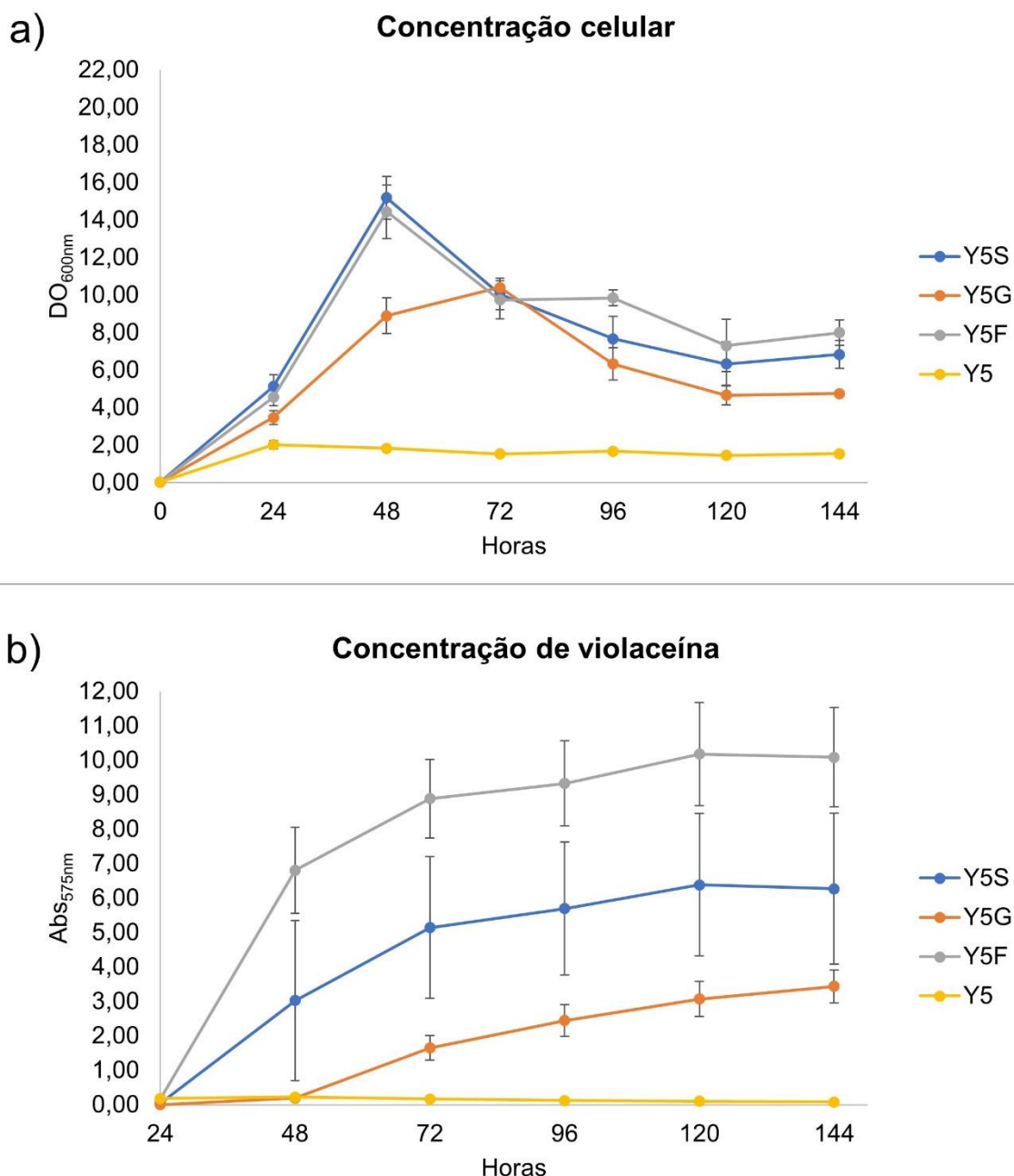
Figura 27. Cinética de crescimento celular e produção de violaceína por *Janthinobacterium* sp. nos meios contendo apenas 3 g/L de extrato de levedura como fonte de nitrogênio.



Assim, foi considerado testar os mesmos meios, mas aumentando a concentração de extrato de levedura para 5 g/L, ou seja, a mesma concentração das fontes de nitrogênio nos demais meios testados anteriormente. Dessa forma, os novos meios testados eram compostos por apenas 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de sacarose (Y5S), glicose (Y5G) ou frutose (Y5F), ou apenas 5 g/L de extrato de

levedura, sem fonte de carbono adicional (Y5) (Figura 28). Grande quantidade de violaceína ($Abs_{575nm} 10,18 \pm 1,49$) foi produzida com o meio Y5F, seguindo pelos meios Y5S e Y5G ($Abs_{575nm} 6,38 \pm 2,07$ e $3,44 \pm 0,47$), e pequena quantidade com os meios sem fonte de carbono Y3 e Y5 ($Abs_{575nm} 0,07 \pm 0,01$ e $0,10 \pm 0,02$), mostrando a necessidade de uma fonte de carbono junto com o extrato de levedura para a produção de pigmento.

Figura 28. Cinética de crescimento celular e produção de violaceína por *Janthinobacterium* sp. nos meios contendo apenas 5 g/L de extrato de levedura como fonte de nitrogênio.



Os meios que obtiveram maiores níveis de produção de violaceína foram, em ordem decrescente: Y5F, YPG, Y3F, YPF, Y3G, Y3S e Y5S. O perfil de concentração celular e produção de violaceína no tempo foi semelhante para estes sete meios, sendo um pouco menor para o meio Y5S. No entanto, a análise ANOVA do dados de produção de violaceína em todos os tempos avaliados durante a

fermentação mostrou que não há diferença estatística ($p > 0,05$) de produção de pigmento entre os sete melhores meios testados (Y5F, YPG, Y3F, YPF, Y3G, Y3S e Y5S).

Os resultados evidenciam a importância do extrato de levedura como fonte de nitrogênio na produção de violaceína e também das fontes de carbono de fácil metabolização, frutose e glicose, enquanto que a peptona pode ser considerada uma fonte de nitrogênio auxiliar ao extrato de levedura, e não como uma alternativa como substituinte completo. Dessa forma, levantamos informações sobre os fatores que podem ser avaliados em estudos futuros de planejamento experimental e otimização de processos para permitir a determinação dos parâmetros para maximização de produção de violaceína por nossa linhagem de *Janthinobacterium*.

Sabe-se que para alguns microrganismos, fontes de carbono de rápido metabolismo como a glicose e frutose resultam em aumento de massa celular e diminuição da produção de metabólitos secundários (MENDES *et al.*, 2001). Assim, a disponibilidade de fontes de carbono de consumo lento, como o glicerol, resulta em diminuição do crescimento celular e um aumento na produção de metabólitos secundários (MENDES *et al.*, 2001; PANTANELLA *et al.*, 2006).

De fato, observou-se um aumento notável de massa celular nas fermentações com meios de cultura que continham glicose e frutose e baixa produção de violaceína. No entanto, quando no meio foi incluído o extrato de levedura, o crescimento celular ainda continuou intenso, mas com considerável aumento na produção de violaceína. Esta condição foi descrita em estudo de otimização de meio para produção de violaceína por *C. violaceum*, no qual o aumento nos níveis de glicose e extrato de levedura resultou em aumento da massa celular e de violaceína produzida (MENDES *et al.*, 2001). Ademais, nota-se a utilização de meios contendo glicose e extrato de levedura para produção de violaceína também em linhagens de microrganismos transformados de *E. coli* (ZHOU *et al.*, 2018) e *Yarrowia lipolytica* (KHOLANY *et al.*, 2019).

A adição de glicerol nos meios não impactou consideravelmente a produção de violaceína nos meios testados, contrariando outros estudos que adicionaram glicerol para aumento na produção de violaceína utilizando *J. lividum* (CORTÉS-OSORIO *et al.*, 2017; KANELLI *et al.*, 2018; PANTANELLA *et al.*, 2006).

Semelhantemente à interação positiva entre a glicose e extrato de levedura observada, meios com sacarose juntamente com o extrato de levedura demonstraram produção considerável de violaceína. Porém, em meios que também continham peptona (YPS) ou triptona (YTS), a produção de pigmento pareceu ser dificultada.

Em relação à lactose, observou-se que esta não foi utilizada pela linhagem de *Janthinobacterium* empregada neste estudo, não apresentando considerável crescimento celular e produção de violaceína, assim como foi observado na fermentação com *Iodobacter* sp. (KUMAR *et al.*, 2021).

Muitos estudos de produção de violaceína adicionam ao meio fermentativo o aminoácido triptofano puro como fonte de precursora para a síntese de violaceína (AHMAD *et al.*, 2012; ARULDASS *et al.*, 2015; KHOLANY *et al.*, 2019; WANG, H. *et al.*, 2009), e a triptona é rica nesse aminoácido. Estudos demonstraram que a triptona foi a melhor fonte de nitrogênio para o aumento da produção de violaceína em espécies produtoras desse pigmento como em *Janthinobacterium* sp. (CORTÉS-OSORIO *et al.*, 2017), *Duganella* sp. (WANG, H. *et al.*, 2009), e *Idobacter* sp. (KUMAR *et al.*, 2021), assim como com outras fontes de nitrogênio ricos nesse aminoácido em espécies de *Janthinobacterium* (ALEM *et al.*, 2020; PANTANELLA *et al.*, 2006).

No entanto, a suplementação do meio com triptofano pode aumentar demasiadamente a quantidade disponível deste nutriente para a bactéria, tornando-se um composto tóxico e inibindo o crescimento celular e a produção de pigmentos (ALEM *et al.*, 2020; CORTÉS-OSORIO *et al.*, 2017). Condição que pode estar ocorrendo nos meios que contêm triptona e extrato de levedura, nos quais foram observadas produção de violaceína reduzida em comparação com os meios de extrato de levedura e diferentes fontes de carbono (exceto lactose e glicerol).

A elevada produção de violaceína em meios com extrato de levedura demonstra que é uma fonte de nitrogênio importante para nossa linhagem, assim como foi observado em *C. violaceum* por Ahmad *et al.* (2012). Considerada uma mistura complexa, o extrato de levedura possui principalmente em sua composição aminoácidos livres, peptídeos, carboidratos, ácidos nucleicos, vitaminas e minerais (CHEN *et al.*, 2013), e é utilizada como a melhor fonte de nitrogênio para a síntese microbiana de triptofano (CHEN *et al.*, 2013; LIM *et al.*, 2020).

Vale destacar que Aruldass *et al.* (2015), utilizando *C. violaceum*, em condições otimizadas de cultivo em biorreator e resíduo líquido de abacaxi

suplementado com triptofano como meio, alcançou elevada produção de violaceína de aproximadamente 16,26 g/L em 24 h. Como nossa linhagem foi capaz de produzir maior quantidade de violaceína nos meios que continham frutose, glicose e sacarose, os resíduos líquidos de frutas, como o abacaxi que é conhecido por possuir altas concentrações desses açúcares, podem ser alternativas promissoras como fonte de carbono barata para a maximização da produção de pigmento por nossa linhagem.

Outro componente que pareceu contribuir para síntese de violaceína quando em conjunto com o extrato de levedura (YPG, YPS, YPS), foi a peptona. Resultante da digestão de proteína do leite ou outra proteína animal, a peptona é constituída de peptídeos de baixo peso molecular e polipeptídeos (STAM; SMILEY, 2014), que também é usada como uma fonte de nitrogênio para síntese microbiana de triptofano (CHEN *et al.*, 2013; LIM *et al.*, 2019). Contudo, acredita-se que o *Janthinobacterium* esteja metabolizando os componentes do extrato de levedura e da peptona de forma lenta, produzindo gradualmente o triptofano e evitando os efeitos deletérios das altas concentrações deste nutriente para a biossíntese de violaceína.

Embora o meio NB seja composto de altas concentrações de peptona e extrato de levedura (AHMAD *et al.*, 2012), a produção de violaceína baixa ou nula nos meios testados evidencia a sensibilidade dos microrganismos perante as diferentes fontes de peptona e extrato de levedura na síntese de triptofano (CHEN *et al.*, 2013). Ademais, esses compostos também podem apresentar caráter inibitório na biossíntese de metabólitos, tal como em *Pediococcus acidilactini* na biossíntese de triptofano (LIM *et al.*, 2020) e em *Iodobacter* sp. na biossíntese de violaceína (KUMAR *et al.*, 2021).

Essas diferenças nas respostas dos nutrientes para o crescimento celular e síntese de metabólitos reiteram a existência de preferências nutricionais específicas de cada microrganismo e a necessidade de avaliar esses compostos a fim de maximizar as respostas de interesse (LIM *et al.*, 2020).

6 CONCLUSÃO

Neste estudo foram obtidos corantes azulados de diferentes fontes. A primeira delas foi a partir de corantes vermelhos de *Fusarium oxysporum*, tanto por adição de compostos alcalinos, íons metálicos e arginina. Esses compostos possivelmente interagiram com a bicaverina, pigmento ainda pouco estudado com propriedades biológicas interessantes, de forma com que houve o deslocamento do comprimento de onda de absorção de luz da molécula resultando na absorção de luz vermelha e produção da cor azulada. Verificou-se que a intensidade da sensibilidade aos íons variou, mostrando que esse efeito pode estar relacionado com as características de densidade e organização eletrônica nos orbitais específicos de cada íon. Sensibilidade observada até pela adição de água potável e produção de pigmentos azulados. A verificação de atividade antioxidante do extrato vermelho levanta a possibilidade de que corantes obtidos a partir de corantes ricos em bicaverina também apresentem essa propriedade, abrindo perspectivas para estudos futuros para a elucidação dos mecanismos de alteração estrutural relacionada à mudança de cor pela molécula e suas implicações nas propriedades físico-químicas e biológicas.

Ademais, o isolamento e identificação de possível nova espécie de *Janthinobacterium* permitiu a avaliação de diferentes meios líquidos para a produção de violaceína, pigmento conhecido pela boa capacidade tintorial e de estabilidade com variedade de propriedades biológicas. A variação das fontes de carbono e de nitrogênio mostraram os efeitos de cada um, principalmente das fontes de nitrogênio como peptona, triptona e extrato de levedura como fonte de triptofano, molécula conhecida como precursora para a biossíntese de violaceína. Destaque pela presença de extrato de levedura nos sete melhores meios de produção de violaceína, que geraram concentrações consideravelmente altas, e que ainda podem ser melhorados por aplicação de metodologias de planejamento experimental e otimização das condições de fermentação.

Desse modo, este trabalho mostrou que a investigação da conversão de cor dos corantes vermelhos ricos em bicaverina para corantes azulados e a obtenção preliminar de considerável concentração de violaceína, abrem possíveis novas alternativas para o escasso painel de corantes naturais azulados disponíveis para aplicação na indústria de alimentos e cosméticos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELHAMEED, Reda M. *et al.* Separation of bioactive chamazulene from chamomile extract using metal-organic framework. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s. l.], v. 146, p. 126–134, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.020>. Acesso em: 6 mar. 2021.

AGUILAR, Diederich *et al.* Effect of ozone processing conditions on stability of fungal pigments. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s. l.], v. 45, p. 255–263, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.11.002>

AHMAD, Wan Azlina *et al.* Production and characterization of violacein by locally isolated chromobacterium violaceum grown in agricultural wastes. *In*: , 2012. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. [S. l.]: Springer, 2012. p. 1220–1234. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9553-7>. Acesso em: 1 mar. 2021.

ALEM, Diego *et al.* Production and antiproliferative effect of violacein, a purple pigment produced by an Antarctic bacterial isolate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 36, n. 8, p. 120, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02893-4>. Acesso em: 28 fev. 2021.

AMCHOVA, Petra; KOTOLOVA, Hana; RUDA-KUCEROVA, Jana. Health safety issues of synthetic food colorants. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 914–922, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.09.026>

ANANTHARAMAN, Amrita *et al.* **Colorants and cancer: A review**. [S. l.]: Elsevier, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.025>

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Biblioteca de Alimentos. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA**, [s. l.], 2019.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico nº 68, de 3 de setembro de 2015. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA**, [s. l.], p. 1–7, 2015. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/pt_BR/informacoes-tecnicas13/-/asset_publisher/WvKKx2fhjdjM2/content/informe-tecnico-n-68-de-3-de-setembro-de-2015/33916?redirect=%2Fpt_BR%2Falimentos-

antigo&inheritRedirect=true. Acesso em: 27 fev. 2021.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução cnpa n. 44, de 1977. **Diário Oficial da União**, [s. l.], 1977.

ARAB, Masoumeh *et al.* Microencapsulation of microbial canthaxanthin with alginate and high methoxyl pectin and evaluation the release properties in neutral and acidic condition. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 121, p. 691–698, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.114>

ARNAO, Marino B. **Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case.** [S. l.]: Elsevier Ltd, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00027-9](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00027-9)

ARNDT, Birgit *et al.* Genetic engineering, high resolution mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy elucidate the bikaverin biosynthetic pathway in *Fusarium fujikuroi*. **Fungal Genetics and Biology**, [s. l.], v. 84, p. 26–36, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.09.006>

ARULDASS, Clair Arul *et al.* Violet pigment production from liquid pineapple waste by *Chromobacterium violaceum* UTM5 and evaluation of its bioactivity. **RSC Advances**, [s. l.], v. 5, n. 64, p. 51524–51536, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c5ra05765e>

ASKER, Dalal. High throughput screening and profiling of high-value carotenoids from a wide diversity of bacteria in surface seawater. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 261, p. 103–111, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.109>

AVALOS, Javier *et al.* Carotenoid Biosynthesis in *Fusarium*. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 39, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof3030039>. Acesso em: 27 fev. 2021.

AVGUŠTIN, Jerneja Ambrožič *et al.* Isolation and characterization of a novel violacein-like pigment producing psychrotrophic bacterial species *Janthinobacterium svalbardensis* sp. nov. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of**

General and Molecular Microbiology, [s. l.], v. 103, n. 4, p. 763–769, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9858-0>

AWIKA, Joseph M. *et al.* Screening Methods to Measure Antioxidant Activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 23, p. 6657–6662, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf034790i>. Acesso em: 1 mar. 2021.

BALAN, J. *et al.* Bikaverin, an antibiotic from *Gibberella fujikuroi*, effective against *Leishmania brasiliensis*. **Folia Microbiologica**, [s. l.], v. 15, n. 6, p. 479–484, 1970. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF02880192>

BARREIRO, Carlos; BARREDO, José Luis. Carotenoids production: A healthy and profitable industry. *In*: METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY. [S. l.]: Humana Press Inc., 2018. v. 1852, p. 45–55. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8742-9_2. Acesso em: 27 fev. 2021.

BATIHA, Gaber El Saber *et al.* **Bioactive compounds, pharmacological actions, and pharmacokinetics of wormwood (*Artemisia absinthium*)**. [S. l.]: MDPI AG, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060353>. Acesso em: 1 mar. 2021.

BECK, William A.; REDMAN, Richard. SEASONAL VARIATIONS IN THE PRODUCTION OF PLANT PIGMENTS. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 81–94, 1940. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.15.1.81>. Acesso em: 27 fev. 2021.

BECKER, Eleonora Miquel; NISSEN, Lise R.; SKIBSTED, Leif H. **Antioxidant evaluation protocols: Food quality or health effects**. [S. l.]: Springer, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00217-004-1012-4>. Acesso em: 1 mar. 2021.

BELL, Alois A. *et al.* United States Department of Agriculture - Agricultural Research Service studies on polyketide toxins of *Fusarium oxysporum* f sp *vasinfectum*: Potential targets for disease control. **Pest Management Science**, [s. l.], v. 59, n. 6–7, p. 736–747, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ps.713>

BERZAS, J. J. *et al.* Spectrophotometric resolution of ternary mixtures of

Tartrazine, Patent Blue V and Indigo Carmine in commercial products. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 391, n. 3, p. 353–364, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00215-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00215-9)

BICAS, Juliano Lemos; SILVA, Wesley Santiago da. **Process of production and deriving pigment application of the fungus *Fusarium oxysporum*, Brasil: patent BR102013015305**. Concessão: 2013.

BOULTON, Roger. The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. **American Journal of Enology and Viticulture**, [s. l.], v. 52, n. 2, 2001.

BROMBERG, Natália *et al.* Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 186, n. 1, p. 43–52, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.04.016>

BRUCKER, Robert M. *et al.* Amphibian chemical defense: Antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus*. **Journal of Chemical Ecology**, [s. l.], v. 34, n. 11, p. 1422–1429, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10886-008-9555-7>. Acesso em: 28 fev. 2021.

BURROWS, J.D. Palette of Our Palates: A Brief History of Food Coloring and Its Regulation. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 394–408, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00089.x>. Acesso em: 27 fev. 2021.

BUSMAN, M.; BUTCHKO, R.A.E.; PROCTOR, R.H. LC-MS/MS method for the determination of the fungal pigment bikaverin in maize kernels as an indicator of ear rot. **Food Additives & Contaminants: Part A**, [s. l.], v. 29, n. 11, p. 1736–1742, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19440049.2012.704528>. Acesso em: 28 maio 2020.

CARO, Yanis *et al.* Pigments and Colorants from Filamentous Fungi. In: **FUNGAL METABOLITES**. [S. l.]: Springer International Publishing, 2017. p. 499–568. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_26. Acesso em: 27 fev.

2021.

CAUZ, Ana C.G. *et al.* Violacein targets the cytoplasmic membrane of bacteria. **ACS Infectious Diseases**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 539–549, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00245>

CHELKOWSKI, J.; ZAJKOWSKI, P.; VISCONTI, A. Bikaverin production by *Fusarium* species. **Mycotoxin Research**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 73–76, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF03192219>

CHEN, Xiong *et al.* Effect of yeast extract on L-tryptophan production in batch culture of *Escherichia coli*. In: , 2013. **Advanced Materials Research**. [S. l.]: Trans Tech Publications Ltd, 2013. p. 2009–2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.807-809.2009>. Acesso em: 1 mar. 2021.

CHOI, Seong Yeol *et al.* **Violacein: Properties and production of a versatile bacterial pigment**. [S. l.]: Hindawi Publishing Corporation, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/465056>

CHOI, Woon Yong; LEE, Hyeon Yong. Kinetic Analysis of Stabilizing C-Phycocyanin in the *Spirulina platensis* Extracts from Ultrasonic Process Associated with Effects of Light and Temperature. **Applied Sciences**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 1662, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app8091662>. Acesso em: 27 fev. 2021.

COPETTI, Marina Venturini. **Fungi as industrial producers of food ingredients**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.02.006>

CORNFORTH, J. W. *et al.* Isolation and characterization of a fungal vacuolation factor (bikaverin). **Journal of the Chemical Society C: Organic Chemistry**, [s. l.], v. 16, p. 2786–2788, 1971. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/J39710002786>

CORTÉS-OSORIO, Natalia *et al.* Influence of Environmental Factors on the Production of Violacein Synthesized By *Janthinobacterium lividum*. **The International Journal of Engineering and Science**, [s. l.], v. 06, n. 01, p. 76–83, 2017. Disponível

em: <https://doi.org/10.9790/1813-0601037683>. Acesso em: 1 mar. 2021.

COSTA, Jonas Henrique *et al.* Antifungal potential of secondary metabolites involved in the interaction between citrus pathogens. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55204-9>. Acesso em: 22 jun. 2021.

DE BOER, J. J. *et al.* Crystal and molecular structure of the chloroform solvate of bikaverin. **Journal of the Chemical Society C: Organic Chemistry**, [s. l.], n. 0, p. 2788–2791, 1971. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/J39710002788>. Acesso em: 27 fev. 2021.

DEJSUNGKRANONT, Monchai; CHISTI, Yusuf; SIRISANSANEEYAKUL, Sarote. Simultaneous production of C-phycocyanin and extracellular polymeric substances by photoautotrophic cultures of *Arthrospira platensis*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [s. l.], v. 92, n. 10, p. 2709–2718, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jctb.5293>. Acesso em: 27 fev. 2021.

DESHMUKH, Radhika; MATHEW, Anoop; PUROHIT, Hemant J. Characterization of antibacterial activity of bikaverin from *Fusarium* sp. HKF15. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [s. l.], v. 117, n. 4, p. 443–448, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.09.017>

DOUCET, Stéphanie M. *et al.* Iridescent plumage in satin bowerbirds: Structure, mechanisms and nanostructural predictors of individual variation in colour. **Journal of Experimental Biology**, [s. l.], v. 209, n. 2, p. 380–390, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.01988>. Acesso em: 28 fev. 2021.

DRESP-LANGLEY, Birgitta; REEVES, Adam. Colour for Behavioural Success. **i-Perception**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 2041669518767171, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/2041669518767171>. Acesso em: 27 fev. 2021.

DUFOSSÉ, Laurent. Current and Potential Natural Pigments From Microorganisms (Bacteria, Yeasts, Fungi, Microalgae). *In*: HANDBOOK ON NATURAL PIGMENTS IN FOOD AND BEVERAGES: INDUSTRIAL APPLICATIONS FOR IMPROVING FOOD COLOR. [S. l.]: Elsevier Inc., 2016. p. 337–354. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100371-8.00016-6>

DUFOSSÉ, Laurent *et al.* **Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry.** [S. l.]: Elsevier Ltd, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.007>

DUFOSSÉ, Laurent. Microbial Pigments From Bacteria, Yeasts, Fungi, and Microalgae for the Food and Feed Industries. *In*: NATURAL AND ARTIFICIAL FLAVORING AGENTS AND FOOD DYES. [S. l.]: Elsevier, 2018a. p. 113–132. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811518-3.00004-1>

DUFOSSÉ, Laurent. Red colourants from filamentous fungi: Are they ready for the food industry? **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 69, p. 156–161, 2018b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2017.11.002>

DURÁN, Marcela *et al.* **Potential applications of violacein: A microbial pigment.** [S. l.]: Springer, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00044-011-9654-9>. Acesso em: 28 fev. 2021.

DURÁN, Nelson *et al.* **Advances in Chromobacterium violaceum and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review.** [S. l.]: Elsevier Inc., 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.06.003>

EARLY, R. Pathogen control in primary production: Crop foods. *In*: **FOODBORNE PATHOGENS: HAZARDS, RISK ANALYSIS AND CONTROL: SECOND EDITION.** [S. l.]: Elsevier Ltd, 2009. p. 205–279. Disponível em: <https://doi.org/10.1533/9781845696337.1.205>

EDWARDS, Jacqueline *et al.* *Fusarium agapanthi* sp. nov., a novel bikaverin and fusarubin-producing leaf and stem spot pathogen of *Agapanthus praecox* (African lily) from Australia and Italy. **Mycologia**, [s. l.], v. 108, n. 5, p. 981–992, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3852/15-333>

EMERY, Kara J.; WEBSTER, Michael A. **Individual differences and their implications for color perception.** [S. l.]: Elsevier Ltd, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2019.05.002>

ESCOTT, Carlos *et al.* Study of the Interaction of Anthocyanins with Phenolic Aldehydes in a Model Wine Solution. **ACS Omega**, [s. l.], v. 3, n. 11, p. 15575–15581, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b01828>. Acesso em: 28 fev. 2021.

EWING, Brent *et al.* Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 175–185, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.175>. Acesso em: 1 mar. 2021.

FAIETA, Marco *et al.* Effect of Encapsulation Process on Technological Functionality and Stability of Spirulina Platensis Extract. **Food Biophysics**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 50–63, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11483-019-09602-1>

FDA. Color Additive Inventories - Summary of Color Additives for Use in the United States in Foods, Drugs, Cosmetics, and Medical Devices. **Food and Drug Administration**, [s. l.], p. 1–20, 2017. Disponível em: <https://www.fda.gov/industry/color-additive-inventories/summary-color-additives-use-united-states-foods-drugs-cosmetics-and-medical-devices>. Acesso em: 1 mar. 2021.

FDA. Color additives permitted for use in cosmetics. **Food and Drug Administration**, [s. l.], p. 3–7, 2020. Disponível em: <https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetic-ingredient-names/color-additives-permitted-use-cosmetics>. Acesso em: 1 mar. 2021.

FENGER, Julie Anne *et al.* Acylated anthocyanins from red cabbage and purple sweet potato can bind metal ions and produce stable blue colors. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 4551, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms22094551>. Acesso em: 14 jun. 2021.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, José A. *et al.* Thermal Stability of Selected Natural Red Extracts Used as Food Colorants. **Plant Foods for Human Nutrition**, [s. l.], v. 68, n. 1, p. 11–17, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11130-013-0337-1>

FORONI, Francesco; PERGOLA, Giulio; RUMIATI, Raffaella Ida. Food color is in the eye of the beholder: The role of human trichromatic vision in food evaluation. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 1–6, 2016. Disponível em:

<https://doi.org/10.1038/srep37034>. Acesso em: 27 fev. 2021.

FRANDSEN, Rasmus J.N. *et al.* Heterologous production of the widely used natural food colorant carminic acid in *Aspergillus nidulans*. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30816-9>. Acesso em: 27 fev. 2021.

FRANZONI, Giulia *et al.* Bioactive molecules as regulatory signals in plant responses to abiotic stresses. *In: PLANT SIGNALING MOLECULES: ROLE AND REGULATION UNDER STRESSFUL ENVIRONMENTS*. [S. l.]: Elsevier, 2019. p. 169–182. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00010-1>

FUSKA, J.; PROKSA, B.; FUSKOVA, A. New potential cytotoxic and antitumor substances. I. In vitro effect of bikaverin and its derivatives on cells of certain tumors. **Neoplasma**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 335–338, 1975.

GIER, Steffie de; VERHOECKX, Kitty. Insect (food) allergy and allergens. **Molecular Immunology**, [s. l.], v. 100, p. 82–106, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.03.015>

GRAUPNER, Katharina *et al.* Imaging Mass Spectrometry and Genome Mining Reveal Highly Antifungal Virulence Factor of Mushroom Soft Rot Pathogen. **Angewandte Chemie International Edition**, [s. l.], v. 51, n. 52, p. 13173–13177, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/anie.201206658>. Acesso em: 28 fev. 2021.

GREWAL, Parbir S. *et al.* Bioproduction of a betalain color palette in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, [s. l.], v. 45, p. 180–188, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.12.008>

GUPTA, Prabhuddha L. *et al.* **Eminence of Microbial Products in Cosmetic Industry**. [S. l.]: Springer, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13659-019-0215-0>. Acesso em: 27 fev. 2021.

GÜRSES, Ahmet *et al.* Dyes and Pigments: Their Structure and Properties. *In: [S. l.]: Springer, Cham, 2016. p. 13–29. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-33892-7_2. Acesso em: 27 fev. 2021.*

HAIDAR, Samer *et al.* In vitro and in silico evaluation of bikaverin as a potent inhibitor of human protein kinase CK2. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24071380>

HEINZE, T.; LIEBERT, T. Celluloses and Polyoses/Hemicelluloses. *In*: POLYMER SCIENCE: A COMPREHENSIVE REFERENCE, 10 VOLUME SET. [S. l.]: Elsevier, 2012. v. 10, p. 83–152. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00255-7>

HERNÁNDEZ-ALMANZA, Ayerim *et al.* **Lycopene: Progress in microbial production.** [S. l.]: Elsevier Ltd, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.08.013>

HERNÁNDEZ-MARIN, Elizabeth; BARBOSA, Andrès; MARTÍNEZ, Ana. The metal cation chelating capacity of astaxanthin. Does this have any influence on antiradical activity? **Molecules**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 1039–1054, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules17011039>. Acesso em: 14 jun. 2021.

HISANO, Ai. Standardized Color in the Food Industry: The Co-Creation of the Food Coloring Business in the United States, 1870-1940. **SSRN Electronic Journal**, [s. l.], 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2139/ssrn.2861902>. Acesso em: 27 fev. 2021.

HUANG, Dejian *et al.* High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 50, n. 16, p. 4437–4444, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf0201529>. Acesso em: 1 mar. 2021.

HUANG, Tao *et al.* Metabolism and secretion of yellow pigment under high glucose stress with *Monascus ruber*. **AMB Express**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 79, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0382-5>. Acesso em: 28 fev. 2021.

HUSSAIN, Zakir *et al.* Exploring bikaverin as metal ion biosensor: A computational approach. **Acta Chimica Slovenica**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 351–359, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.17344/acsi.2018.4843>

JÄPELT, Kristina B.; JOHNSEN, Lea Giørtz; CHRISTENSEN, Jan H. Removal of Polysorbate 80 by complexation prior to LC-MS analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, [s. l.], v. 408, n. 9, p. 2303–2307, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9326-1>. Acesso em: 23 mar. 2021.

JØRGENSEN, N. O.G. Organic Nitrogen. *In*: **ENCYCLOPEDIA OF INLAND WATERS**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2009. p. 832–851. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-012370626-3.00119-8>

JUNG, Heeyong *et al.* Color characteristics of monascus pigments derived by fermentation with various amino acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 1302–1306, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf0209387>. Acesso em: 1 mar. 2021.

JUNG, Heeyong *et al.* Degradation patterns and stability predictions of the original reds and amino acid derivatives of monascus pigments. **European Food Research and Technology**, [s. l.], v. 232, n. 4, p. 621–629, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1427-7>. Acesso em: 1 mar. 2021.

JUNG, Heeyong; KIM, Chulyoung; SHIN, Chul Soo. Enhanced photostability of monascus pigments derived with various amino acids via fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 53, n. 18, p. 7108–7114, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf0510283>. Acesso em: 1 mar. 2021.

JURD, Leonard; ASEN, Sam. The formation of metal and “co-pigment” complexes of cyanidin 3-glucoside. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 1263–1271, 1966. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86122-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86122-1)

KALLSCHEUER, Nicolai *et al.* **Production of plant metabolites with applications in the food industry using engineered microorganisms**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.07.008>

KANELLI, Maria *et al.* Microbial Production of Violacein and Process Optimization for Dyeing Polyamide Fabrics With Acquired Antimicrobial Properties. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. JUL, p. 1495, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01495>. Acesso em: 25 maio 2020.

KANG, Seung Hoon *et al.* Two bacterial entophytes eliciting both plant growth promotion and plant defence on pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 96–103, 2007.

KAPADIA, Govind J. *et al.* Cancer chemopreventive activity of synthetic colorants used in foods, pharmaceuticals and cosmetic preparations. **Cancer Letters**, [s. l.], v. 129, n. 1, p. 87–95, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(98\)00087-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(98)00087-1)

KEVLICH, Nikita S.; SHOFNER, Meisha L.; NAIR, Sankar. **Membranes for Kraft black liquor concentration and chemical recovery: Current progress, challenges, and opportunities**. [S. l.]: Taylor and Francis Inc., 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01496395.2017.1279180>. Acesso em: 1 mar. 2021.

KHOLANY, Mariam *et al.* Extraction and purification of violacein from *Yarrowia lipolytica* cells using aqueous solutions of surfactants. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, [s. l.], v. 95, n. 4, p. jctb.6297, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jctb.6297>. Acesso em: 25 maio 2020.

KIM, H.-Y. *et al.* Some fungal endophytes from vegetable crops and their anti-oomycete activities against tomato late blight. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 332–337, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2006.02093.x>. Acesso em: 27 fev. 2021.

KJÆR, D. *et al.* Bikaverin and norbikaverin, benzoxanthentrione pigments of *Gibberella fujikuroi*. **Journal of the Chemical Society C: Organic Chemistry**, [s. l.], v. 16, p. 2792–2797, 1971. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/J39710002792>

KRAMER, Nynke I. *et al.* Characterizing the coverage of critical effects relevant in the safety evaluation of food additives by AOPs. **Archives of Toxicology**, [s. l.], v. 93, n. 8, p. 2115–2125, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02501-x>. Acesso em: 1 mar. 2021.

KREITMAN, G.; NORD, F. F. Lycopersin, a pigment from *Fusarium lycopersici*. **Archives of biochemistry**, [s. l.], v. 21, n. 2, p. 457, 1949. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/18120664>. Acesso em: 27 fev. 2021.

KUMAR, Vijay *et al.* Bioprocess for co-production of polyhydroxybutyrate and violacein using Himalayan bacterium *Iodobacter* sp. PCH194. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 319, p. 124235, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124235>

KUNDU, Aditi *et al.* Anti-nemic secondary metabolites produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 631–636, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2016.06.003>

KUNKELY, Horst; VOGLER, Arnd. Absorption and luminescence spectra of cochineal. **Inorganic Chemistry Communications**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 1153–1155, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2011.04.011>

KWON, Hyeok Ran *et al.* Nematicidal activity of bikaverin and fusaric acid isolated from *Fusarium oxysporum* against pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. [S. l.: s. n.], 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.5423/PPJ.2007.23.4.318>

LEBEAU, Juliana *et al.* Isolation of two novel purple naphthoquinone pigments concomitant with the bioactive red bikaverin and derivatives thereof produced by *Fusarium oxysporum*. **Biotechnology Progress**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. e2738, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/btpr.2738>. Acesso em: 27 fev. 2021.

LEHTO, Sari *et al.* Comparison of food colour regulations in the EU and the US: a review of current provisions. **Food Additives & Contaminants: Part A**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 335–355, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1274431>. Acesso em: 27 fev. 2021.

LEITE, Alice V. *et al.* Antioxidant potential of rat plasma by administration of freeze-dried jaboticaba peel (*Myrciaria jaboticaba* Vell Berg). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 59, n. 6, p. 2277–2283, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf103181x>. Acesso em: 27 fev. 2021.

LEMONS, C *et al.* High sucrose consumption induces memory impairment in rats associated with electrophysiological modifications but not with metabolic changes in the hippocampus. **Neuroscience**, United States, v. 315, p. 196–205, 2016.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.12.018>

LIM, Ye Heng *et al.* Comparative studies of versatile extracellular proteolytic activities of lactic acid bacteria and their potential for extracellular amino acid productions as feed supplements. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 15, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0323-z>. Acesso em: 1 mar. 2021.

LIM, Ye Heng *et al.* Rapid evaluation and optimization of medium components governing tryptophan production by *Pediococcus acidilactici* tp-6 isolated from Malaysian food via statistical approaches. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 779, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25040779>. Acesso em: 1 mar. 2021.

LINNEMANNSTÖNS, Pia *et al.* The polyketide synthase gene *pkS4* from *Gibberella fujikuroi* encodes a key enzyme in the biosynthesis of the red pigment bikaverin. **Fungal Genetics and Biology**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 134–148, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00501-7](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00501-7)

LIU, Lujie *et al.* Diversifying of chemical structure of native *Monascus* pigments. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, p. 3143, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03143>. Acesso em: 1 mar. 2021.

LOE, D. L. Light, colour and human response. *In*: COLOUR DESIGN: THEORIES AND APPLICATIONS: SECOND EDITION. [S. l.]: Elsevier Inc., 2017. p. 349–369. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101270-3.00015-1>

LU, Huibin *et al.* *Janthinobacterium violaceinigrum* sp. nov., *Janthinobacterium aquaticum* sp. nov. and *Janthinobacterium rivuli* sp. nov., isolated from a subtropical stream in China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 70, n. 4, p. 2719–2725, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004097>. Acesso em: 28 fev. 2021.

LYAKHOVCHENKO, Nikita S. *et al.* A Blue-Purple Pigment-Producing Bacterium Isolated from the Vezelka River in the City of Belgorod. **Microorganisms**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 102, 2021. Disponível em:

<https://doi.org/10.3390/microorganisms9010102>. Acesso em: 28 fev. 2021.

MA, Yong *et al.* Antimicrobial activity of anthocyanins and catechins against foodborne pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella*. **Food Control**, [s. l.], v. 106, p. 106712, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106712>

MARTELLI, Giulia *et al.* Thermal stability improvement of blue colorant C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* for food industry applications. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 154–159, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.10.008>

MARTÍN, J. F. *et al.* **Sensing and transduction of nutritional and chemical signals in filamentous fungi: Impact on cell development and secondary metabolites biosynthesis**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.014>

MCCANN, Donna *et al.* Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. **Lancet**, [s. l.], v. 370, n. 9598, p. 1560–1567, 2007. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61306-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61306-3)

MCINNIS, A. G. *et al.* Biosynthesis of bikaverin in *Fusarium oxysporum*. Use of ¹³C nuclear magnetic resonance with homonuclear ¹³C decoupling to locate adjacent ¹³C labels. **The Journal of Antibiotics**, [s. l.], v. 29, n. 10, p. 1050–1057, 1976. Disponível em: <https://doi.org/10.7164/antibiotics.29.1050>

MEDENTSEV, A. G.; AKIMENKO, V. K. **Naphthoquinone metabolites of the fungi**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)80053-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)80053-8)

MEDENTSEV, A. G.; ARINBASAROVA, A. Yu; AKIMENKO, V. K. Biosynthesis of naphthoquinone pigments by fungi of the genus *Fusarium*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, [s. l.], v. 41, n. 5, p. 503–507, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10438-005-0091-8>

MENDES, Armando S. *et al.* Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production.

Biotechnology Letters, [s. l.], v. 23, n. 23, p. 1963–1969, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1013734315525>. Acesso em: 1 mar. 2021.

MENDONÇA, Mayra de Lima. **Estudo da recuperação e purificação de bicaverina produzida por *Fusarium oxysporum* CCT7620**. 75 f. 2019. - Universidade Estadual de Campinas, [s. l.], 2019.

MICHIELSE, CAROLINE B.; REP, MARTIJN. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 311–324, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x>. Acesso em: 27 fev. 2021.

MILLER, N. J. *et al.* A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, [s. l.], v. 84, n. 4, p. 407–412, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/cs0840407>. Acesso em: 1 mar. 2021.

MISHRA, Jitendra; ARORA, Naveen Kumar. **Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.12.004>

MOJIB, Nazia; ANDERSEN, Dale T.; BEJ, Asim K. Structure and function of a cold shock domain fold protein, CspD, in *Janthinobacterium* sp. Ant5-2 from East Antarctica. **FEMS Microbiology Letters**, [s. l.], v. 319, n. 2, p. 106–114, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02269.x>. Acesso em: 28 fev. 2021.

MORALES-OYERVIDES, L. *et al.* Effect of heat exposure on the colour intensity of red pigments produced by *Penicillium purpurogenum* GH2. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 164, p. 21–29, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.04.020>

MORGANO, Marcelo A. *et al.* Avaliação físico-química de águas minerais comercializadas na região de Campinas, SP. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 239–243, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0101->

20612002000300007. Acesso em: 1 mar. 2021.

MOUSSA, Tarek A.A. *et al.* Two new species of the *Fusarium fujikuroi* species complex isolated from the natural environment. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 110, n. 6, p. 819–832, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0855-1>. Acesso em: 27 fev. 2021.

MPOUNTOUKAS, Panagiotis *et al.* Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 48, n. 10, p. 2934–2944, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.030>

NANOU, Konstantina; ROUKAS, Triantafyllos. Stimulation of the biosynthesis of carotenes by oxidative stress in *Blakeslea trispora* induced by elevated dissolved oxygen levels in the culture medium. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 102, n. 17, p. 8159–8164, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.027>. Acesso em: 28 fev. 2021.

NEWSOME, Andrew G.; CULVER, Catherine A.; BREEMEN, Richard B. Van. **Nature's palette: The search for natural blue colorants**. [S. l.]: American Chemical Society, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf501419q>. Acesso em: 27 fev. 2021.

NGAMWONGLUMLERT, Luxsika; DEVAHASTIN, Sakamon; CHIEWCHAN, Naphaporn. Natural colorants: Pigment stability and extraction yield enhancement via utilization of appropriate pretreatment and extraction methods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 57, n. 15, p. 3243–3259, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1109498>. Acesso em: 27 fev. 2021.

NIGAM, Poonam Singh; LUKE, Jasmine Sharon. **Food additives: Production of microbial pigments and their antioxidant properties**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.004>

NIRMALADEVI, D. *et al.* Neuroprotective Effects of Bikaverin on H₂O₂-Induced Oxidative Stress Mediated Neuronal Damage in SH-SY5Y Cell Line. **Cellular**

and Molecular Neurobiology, [s. l.], v. 34, n. 7, p. 973–985, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10571-014-0073-6>

NOVÁKOVÁ, Lucie; SVOBODA, Pavel; PAVLÍK, Jakub. Ultra-high performance liquid chromatography. *In: LIQUID CHROMATOGRAPHY: FUNDAMENTALS AND INSTRUMENTATION: SECOND EDITION*. [S. l.]: Elsevier, 2017. v. 1, p. 719–769. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00029-4>

O'SULLIVAN, JOSEPH *et al.* Janthinocins A, B and C, novel peptide lactone antibiotics produced by *Janthinobacterium lividum*. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological characterization. **The Journal of Antibiotics**, [s. l.], v. 43, n. 8, p. 913–919, 1990. Disponível em: <https://doi.org/10.7164/antibiotics.43.913>. Acesso em: 28 fev. 2021.

OU, Boxin *et al.* Determination of total antioxidant capacity by oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using fluorescein as the fluorescence probe: First action 2012.23. **Journal of AOAC International**, [s. l.], v. 96, n. 6, p. 1372–1376, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-175>. Acesso em: 1 mar. 2021.

OVERY, David *et al.* The Neglected Marine Fungi, *Sensu stricto*, and Their Isolation for Natural Products' Discovery. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 42, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md17010042>. Acesso em: 27 fev. 2021.

PALACIO-BARRERA, Ana María *et al.* Induction of pigment production through media composition, abiotic and biotic factors in two filamentous fungi. **Biotechnology Reports**, [s. l.], v. 21, p. e00308, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00308>

PANTANELLA, F. *et al.* Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 0, n. 0, p. 061120055200056-???, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03155.x>. Acesso em: 1 mar. 2021.

PELAGEEV, Dmitry N.; BORISOVA, Ksenia L.; ANUFRIEV, Victor Ph. A Simple Route to Benzo[b]xanthene-6,11,12-triones: Synthesis of Bikaverin. **Synthesis**

(Germany), [s. l.], v. 50, n. 19, p. 3931–3935, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1055/s-0036-1591587>

PEPSICO. **Celebrate the 90s with Crystal Pepsi -- Iconic Clear Cola to Hit Shelves This Summer.** [S. l.], 2016. Disponível em: <https://www.pepsico.com/news/press-release/celebrate-the-90s-with-crystal-pepsi---iconic-clear-cola-to-hit-shelves-this-su06292016>. Acesso em: 27 fev. 2021.

PERKIN, W. H. Dyeing fabrics. **British Patent**, [s. l.], v. 26, p. 1984, 1856.

PEYRAT, Laure-Anne *et al.* Terrestrial Microorganisms: Cell Factories of Bioactive Molecules with Skin Protecting Applications. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 9, p. 1836, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24091836>. Acesso em: 27 fev. 2021.

PIEL, Jörn. The chemistry of symbiotic interactions. *In*: COMPREHENSIVE NATURAL PRODUCTS II: CHEMISTRY AND BIOLOGY. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2010. v. 2, p. 475–510. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-008045382-8.00049-6>

PIMENTEL, Filipa *et al.* Macroalgae-Derived Ingredients for Cosmetic Industry—An Update. **Cosmetics**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 2, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cosmetics5010002>. Acesso em: 27 fev. 2021.

PINHEIRO, Maria Clara de Oliveira; ABRANTES, Shirley de Mello Pereira. Determinação dos corantes artificiais presentes em balas consumidas por crianças com idade entre 3 e 9 anos. **Revista Analytica**, [s. l.], p. 10–23, 2015. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/12341>. Acesso em: 27 fev. 2021.

POLTURAK, Guy; AHARONI, Asaph. **“La Vie en Rose”: Biosynthesis, Sources, and Applications of Betalain Pigments.** [S. l.]: Cell Press, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.10.008>

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes Artificiais Em Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 237–250, 2003. Disponível em: <http://200.145.71.150/seer/index.php/alimentos/article/view/865>. Acesso em: 27 fev. 2021.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Teores de corantes artificiais em alimentos determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 268–273, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200005>. Acesso em: 27 fev. 2021.

PRIOR, Ronald L. *et al.* Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 11, p. 3273–3279, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf0262256>. Acesso em: 1 mar. 2021.

RAHMAN, D. Y. *et al.* Thermostable phycocyanin from the red microalga *Cyanidioschyzon merolae*, a new natural blue food colorant. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 29, n. 3, p. 1233–1239, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-016-1007-0>. Acesso em: 27 fev. 2021.

RAMESH, Chatragadda *et al.* Multifaceted Applications of Microbial Pigments: Current Knowledge, Challenges and Future Directions for Public Health Implications. **Microorganisms**, [s. l.], v. 7, n. 7, p. 186, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms7070186>. Acesso em: 27 fev. 2021.

RAO, Manik Prabhu Narsing; XIAO, Min; LI, Wen Jun. **Fungal and bacterial pigments: Secondary metabolites with wide applications**. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01113>. Acesso em: 27 fev. 2021.

REZA, Joel; TREJO, Arturo; VERA-ÁVILA, Luz Elena. Determination of the temperature dependence of water solubilities of polycyclic aromatic hydrocarbons by a generator column-on-line solid-phase extraction-liquid chromatographic method. **Chemosphere**, [s. l.], v. 47, n. 9, p. 933–945, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00069-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00069-3)

RODRIGUES, A. L. *et al.* Microbial production of the drugs violacein and deoxyviolacein: Analytical development and strain comparison. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 717–720, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0827-x>. Acesso em: 7 jun. 2021.

RODRIGUES, T. A. *et al.* Valorization of solid wastes from the brewery and biodiesel industries for the bioproduction of natural dyes. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 99–107, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190361s20170608>. Acesso em: 27 fev. 2021.

RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. **Natural food pigments and colorants**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.08.004>

RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. **Food Research International**, [s. l.], v. 124, p. 200–205, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.028>

RUGER-HERREROS, Macarena *et al.* Comparative transcriptomic analysis unveils interactions between the regulatory CarS protein and light response in *Fusarium*. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 67, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5430-x>. Acesso em: 27 fev. 2021.

SAHIN, Halil Turgut; ARSLAN, Mustafa Burak. A study on physical and chemical properties of cellulose paper immersed in various solvent mixtures. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 78–88, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms9010078>. Acesso em: 1 mar. 2021.

SAINI, Dinesh Kumar; PABBI, Sunil; SHUKLA, Pratyosh. Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches. **Food and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 120, p. 616–624, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.002>

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>. Acesso em: 1 mar. 2021.

SALEEM, Hina *et al.* Bio-characterization of food grade pyocyanin bio-pigment extracted from chromogenic *Pseudomonas* species found in Pakistani native flora. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 103005, 2021. Disponível

em: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2021.103005>

SANTOS, Marcela Colombo dos. **Estudos para obtenção de pigmentos vermelhos e azuis de *Fusarium oxysporum* com potencial aplicação em alimentos**. 2020. - Universidade Estadual de Campinas, [s. l.], 2020.

SANTOS, Marcela Colombo dos; BICAS, Juliano Lemos. **Natural blue pigments and bikaverin**. [S. l.]: Elsevier GmbH, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126653>

SANTOS, Monica Nunes; BICAS, Juliano Lemos; SANTOS, Marcela Colombo dos. Avaliação do efeito da adição de aminoácidos e proteínas na transformação da cor da biomassa de *Fusarium oxysporum* CCT7620. *In: , 2017. XXV Congresso de Iniciação Científica da Unicamp*. [S. l.]: Galoa, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.19146/pibic-2017-79178>

SATHASIVAM, Ramaraj; KI, Jang-Seu. A Review of the Biological Activities of Microalgal Carotenoids and Their Potential Use in Healthcare and Cosmetic Industries. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 26, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md16010026>. Acesso em: 27 fev. 2021.

SCHLANGEN, Luc J.M. **CIE statement on non-visual effects of light recommending proper light at the proper time**. [S. l.: s. n.], 2015. Disponível em: <https://research.tue.nl/en/publications/cie-position-statement-on-non-visual-effects-of-light-recommendin>. Acesso em: 27 fev. 2021.

SCHREIBER, Henry D.; SWINK, Amy M.; GODSEY, Taylor D. The chemical mechanism for Al³⁺ complexing with delphinidin: A model for the bluing of hydrangea sepals. **Journal of Inorganic Biochemistry**, [s. l.], v. 104, n. 7, p. 732–739, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.03.006>

SEN, Tanuka; BARROW, Colin J.; DESHMUKH, Sunil Kumar. **Microbial pigments in the food industry—challenges and the way forward**. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00007>. Acesso em: 27 fev. 2021.

SHAHID-UL-ISLAM; RATHER, Luqman J.; MOHAMMAD, Fageer.

Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications - A review. [S. l.]: Elsevier, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.11.002>

SIGURDSON, Gregory T. *et al.* Evaluating the role of metal ions in the bathochromic and hyperchromic responses of cyanidin derivatives in acidic and alkaline pH. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 208, p. 26–34, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.109>

SIGURDSON, Gregory T.; TANG, Peipei; GIUSTI, M. Mónica. Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources. **Annual Review of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 261–280, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030216-025923>. Acesso em: 16 mar. 2020.

SILVA, Joyce Grazielle Siqueira *et al.* Optimization and Validation of a Simple Method for Mineral Potential Evaluation in Citrus Residue. **Food Analytical Methods**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1899–1908, 2017.

SILVA, Wesley Santiago da; BICAS, Juliano Lemos. **Produção de pigmentos fúngicos e seu uso no tingimento de tecidos**. 2013. - Universidade Federal de São João Del-Rei (UFSJ) Campus Alto Paraopeba (CAP), [s. l.], 2013.

SILVA, Tiago Rodrigues e. *et al.* **Pigments from Antarctic bacteria and their biotechnological applications**. [S. l.]: Taylor and Francis Ltd., 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1888068>. Acesso em: 23 mar. 2021.

SINGH, Bhim Pratap *et al.* Editorial: Microbial Secondary Metabolites: Recent Developments and Technological Challenges. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. APR, p. 914, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00914>. Acesso em: 27 fev. 2021.

SLINEY, D. H. What is light? the visible spectrum and beyond. **Eye (Basingstoke)**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 222–229, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/eye.2015.252>. Acesso em: 27 fev. 2021.

SOLYMOSI, K. *et al.* Food colour additives of natural origin. *In*: COLOUR ADDITIVES FOR FOODS AND BEVERAGES. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2015. p. 4–34.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-011-8.00001-5>

SON, S. W. *et al.* Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 104, n. 3, p. 692–698, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03581.x>

SPENCE, Charles. **On the changing colour of food & drink**. [S. l.]: AZTI-Tecnalia, 2019a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2019.100161>

SPENCE, Charles. On the Relationship(s) Between Color and Taste/Flavor. **Experimental Psychology**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 99–111, 2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.1027/1618-3169/a000439>. Acesso em: 27 fev. 2021.

SPRAKER, Joseph E. *et al.* Conserved responses in a war of small molecules between a plant-pathogenic bacterium and fungi. **mBio**, [s. l.], v. 9, n. 3, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.00820-18>

SRIANTA, I. *et al.* **Recent research and development of Monascus fermentation products**. [S. l.: s. n.], 2014. Disponível em: https://www.academia.edu/35776050/Recent_research_and_development_of_Monascus_fermentation_products. Acesso em: 27 fev. 2021.

STAM, C. N.; SMILEY, R. D. *Vibrio*: Standard Cultural Methods and Molecular Detection Techniques in Foods. *In*: **ENCYCLOPEDIA OF FOOD MICROBIOLOGY: SECOND EDITION**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2014. p. 699–707. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00347-5>

STICH, E. Food Color and Coloring Food: Quality, Differentiation and Regulatory Requirements in the European Union and the United States. Quality, Differentiation and Regulatory Requirements in the European Union and the United States. *In*: **HANDBOOK ON NATURAL PIGMENTS IN FOOD AND BEVERAGES: INDUSTRIAL APPLICATIONS FOR IMPROVING FOOD COLOR**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2016. p. 3–27. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100371-8.00001-4>

STINCO, Carla M. *et al.* Effect of high-pressure processing on carotenoids profile, colour, microbial and enzymatic stability of cloudy carrot juice. **Food Chemistry**,

[s. l.], v. 299, p. 125112, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125112>

STOLL, Liana *et al.* Poly(acid lactic) films with carotenoids extracts: Release study and effect on sunflower oil preservation. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 281, p. 213–221, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.100>

STUDT, Lena; TUDZYNSKI, Bettina. Gibberellins and the Red Pigments Bikaverin and Fusarubin. *In*: [S. l.: s. n.], 2014. p. 209–238. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1191-2_10

SUCUPIRA, N R *et al.* **Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits** 263 UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde. [S. l.: s. n.], 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2012V14N4P%P>. Acesso em: 1 mar. 2021.

TAKEO, Naoko *et al.* Cochineal dye-induced immediate allergy: Review of Japanese cases and proposed new diagnostic chart. **Allergology International**, [s. l.], v. 67, n. 4, p. 496–505, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.alit.2018.02.012>. Acesso em: 27 fev. 2021.

TAMURA, K. *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, [s. l.], v. 24, n. 8, p. 1596–1599, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>. Acesso em: 1 mar. 2021.

THAIPONG, Kriengsak *et al.* Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 19, n. 6–7, p. 669–675, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.01.003>

THOMPSON, Julie D. *et al.* The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 25, n. 24, p. 4876–4882, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>. Acesso em: 1 mar. 2021.

TULI, Hardeep S. *et al.* **Microbial pigments as natural color sources:**

current trends and future perspectives. [S. l.]: Springer India, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1601-6>. Acesso em: 27 fev. 2021.

TYLER, Christopher W; SOLOMON, Joshua A. Color perception in natural images. **Current Opinion in Behavioral Sciences**, [s. l.], v. 30, p. 8–14, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2019.04.002>. Acesso em: 27 fev. 2021.

VAISHNAV, Preeti; DEMAINE, Arnold L. **Unexpected applications of secondary metabolites.** [S. l.]: Elsevier, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.11.006>

VAN SOOLINGEN, D *et al.* Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 31, n. 8, 1993.

VENDRUSCOLO, Franciello *et al.* Thermal stability of natural pigments produced by *Monascus ruber* in submerged fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 278–284, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.03.008>

VENIL, Chidambaram Kulandaisamy *et al.* Spray drying of violet pigment from *Chromobacterium violaceum* UTM 5 and its application in food model systems. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s. l.], v. 102, p. 324–329, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.02.006>

VENIL, Chidambaram Kulandaisamy; DUFOSSÉ, Laurent; RENUKA DEVI, Ponnuswamy. **Bacterial Pigments: Sustainable Compounds With Market Potential for Pharma and Food Industry.** [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00100>. Acesso em: 27 fev. 2021.

VENKATACHALAM, Mekala *et al.* Production of pigments from the tropical marine-derived fungi *Talaromyces albobiverticillius*: New resources for natural red-colored metabolites. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 70, p. 35–48, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.03.007>

VIDAL, Benedicto de Campos. Butterfly scale form birefringence related to

photonics. **Micron**, [s. l.], v. 42, n. 8, p. 801–807, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.04.006>. Acesso em: 28 fev. 2021.

VIERA, Isabel; PÉREZ-GÁLVEZ, Antonio; ROCA, María. Green Natural Colorants. **Molecules**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 154, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules24010154>. Acesso em: 27 fev. 2021.

VIIKARI, L. *et al.* Forest Products: Biotechnology in Pulp and Paper Processing. *In*: **ENCYCLOPEDIA OF MICROBIOLOGY**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2009. p. 80–94. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00123-1>

WANG, Haisheng *et al.* Biosynthesis and characterization of violacein, deoxyviolacein and oxyviolacein in heterologous host, and their antimicrobial activities. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 67, p. 148–155, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.06.005>

WANG, Haisheng *et al.* Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain of *Duganella* sp. B2. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 44, n. 2–3, p. 119–124, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.11.008>

WANG, Mingxun *et al.* **Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>. Acesso em: 23 mar. 2021.

WHO. Evaluation of Certain Food Additives: Eighty-sixth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **World Health Organization**, [s. l.], v. 965, 2019.

WHO. Guidelines for drinking-water quality, 4th edition: 1st addendum. **World Health Organization**, [s. l.], n. April 2017, p. 1–4, 2017. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950>. Acesso em: 1 mar. 2021.

WIEMANN, Philipp *et al.* Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. **Molecular Microbiology**, [s. l.], v. 72, n. 4, p. 931–946, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365->

2958.2009.06695.x. Acesso em: 27 fev. 2021.

WIEMANN, Philipp *et al.* Deciphering the Cryptic Genome: Genome-wide Analyses of the Rice Pathogen *Fusarium fujikuroi* Reveal Complex Regulation of Secondary Metabolism and Novel Metabolites. **PLoS Pathogens**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. e1003475, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003475>

WONG, HIN-CHUNG; KOEHLER, PHILIP E. Production of Red Water-Soluble *Monascus* Pigments. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 1200–1203, 1983. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb09191.x>. Acesso em: 1 mar. 2021.

WROLSTAD, Ronald E.; CULVER, Catherine A. Alternatives to Those Artificial FD&C Food Colorants. **Annual Review of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 59–77, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101118>. Acesso em: 1 mar. 2021.

YANG, Cheng *et al.* Fed-batch fermentation of recombinant *Citrobacter freundii* with expression of a violacein-synthesizing gene cluster for efficient violacein production from glycerol. **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 55–62, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.08.008>

YANGILAR, Filiz; YILDIZ, Pinar Oguzhan. Effects of using combined essential oils on quality parameters of bio-yogurt. **Journal of Food Processing and Preservation**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. e13332, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfpp.13332>. Acesso em: 20 jul. 2020.

YOSHIDA, Kumi *et al.* Ferric ions involved in the flower color development of the Himalayan blue poppy, *Meconopsis grandis*. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 67, n. 10, p. 992–998, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.03.013>

YOSHIDA, Kumi; MORI, Mihoko; KONDO, Tadao. **Blue flower color development by anthocyanins: From chemical structure to cell physiology**. [S. l.]: The Royal Society of Chemistry, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/b800165k>. Acesso em: 1 mar. 2021.

YOUNG, Raymond A.; KUNDROT, Robert; TILLMAN, David A. Pulp and Paper. *In*: **ENCYCLOPEDIA OF PHYSICAL SCIENCE AND TECHNOLOGY**. [S. l.]: Elsevier, 2003. p. 249–265. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00619-0>. Acesso em: 1 mar. 2021.

YUSUF, Mohd; SHABBIR, Mohd; MOHAMMAD, Faqeer. **Natural Colorants: Historical, Processing and Sustainable Prospects**. [S. l.]: Springer, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13659-017-0119-9>

ZHAN, Jixun *et al.* Search for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: Beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 70, n. 2, p. 227–232, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/np060394t>

ZHANG, Rui *et al.* Molecular and biochemical characterization of a new alkaline β -propeller phytase from the insect symbiotic bacterium *Janthinobacterium* sp. TN115. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 92, n. 2, p. 317–325, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3309-0>. Acesso em: 28 fev. 2021.

ZHOU, Yikang *et al.* Enhanced Production of Crude Violacein from Glucose in *Escherichia coli* by Overexpression of Rate-Limiting Key Enzyme(S) Involved in Violacein Biosynthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 186, n. 4, p. 909–916, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2787-2>

8 ANEXO



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº AF66904

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AF66904**
 Usuário: **UNICAMP**
 CPF/CNPJ: **46.068.425/0001-33**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Fusarium oxysporum

Título da Atividade: **Produção de pigmento bicaverina por Fusarium oxysporum**

Equipe

Marcela Colombo dos Santos	UNICAMP
Juliano Lemos Bicas	Unicamp
Caroline Kie Ishimoto	Unicamp
Mayra de Lima Mendonça	Unicamp
Wesley Santiago da Silva	Universidade Federal de São João del Rei (UFSJ)

Data do Cadastro: **15/10/2018 00:16:08**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **13:15** de **22/03/2021**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº A9E3DF1

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro:	A9E3DF1
Usuário:	UNICAMP
CPF/CNPJ:	46.068.425/0001-33
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Espécie

Impossibilidade de identificação

Título da Atividade:	Isolamento, identificação e caracterização de bactéria isolada de arroz e do pigmento púrpura produzido.
----------------------	---

Equipe

Caroline Kie Ishimoto	UNICAMP
Juliano Lemos Bicas	Unicamp

Data do Cadastro:	21/11/2019 15:02:49
Situação do Cadastro:	Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **12:44** de **22/03/2021**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**