

## AVALIAÇÃO QUALITATIVA DA CAPACIDADE PIGMENTOGÊNICA DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM MEIO DE CULTURA SUBMERSO

**Isabela M. Silva** <sup>1\*</sup>; **Igor F. S. Lima**<sup>1</sup>; **Tarcisio M. F. S. de Oliveira**<sup>1</sup>; **Marcio Schmiele**<sup>1</sup>; **Vivian M. Benassi**<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Instituto de Ciência e Tecnologia, Diamantina, Minas Gerais, Brasil, 39100-000.

\*e-mail: isabela.moraes@ufvjm.edu.br

**Palavras-Chave:** Biotecnologia, Micologia, Microrganismo.

### Introdução

A importância dos alimentos para a humanidade é inegável e sua cor é um importante atributo de qualidade que serve, não somente de base para a identificação e aceitação de grande variedade de produtos, como, também, influência negativa ou positivamente na percepção dos atributos sensoriais (Rigolon *et al.*, 2021).

Atualmente, pigmentos de vários tipos e formas têm sido usados como aditivos ou suplementos na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica, ração animal e outras aplicações. O uso massivo de corantes sintéticos vem sendo questionado por seus possíveis efeitos tóxicos, baixa degradação, maior persistência e potencial para causar câncer/alergias (Moraes *et al.*, 2023; Valenzuela-Gloria *et al.*, 2021). Assim, uma alternativa para a produção de pigmentos naturais é o uso de microrganismos, principalmente fungos filamentosos, que são capazes de produzir pigmentos de vários tons, incluindo amarelo, vermelho, laranja e verde (Moleleko *et al.*, 2021).

Os fungos são capazes de produzir uma ampla variedade de biopigmentos, como melaninas, fenazinas, flavinas, carotenoides e quinonas. Além disso, os fungos apresentam crescimento relativamente rápido e secretam pigmentos no meio de cultura, o que possibilita obter extratos metabólicos e produzi-los em escala industrial. Diferentemente da extração de pigmentos de plantas ou animais, esse processo é mais econômico e não depende de condições climáticas ou sazonalidade (Pereira *et al.*, 2024).

A maioria dos fungos produz pigmentos solúveis em água e ideias para a produção industrial, pois são fáceis de escalonar em fermentadores industriais e podem ser extraídos facilmente sem solventes orgânicos (Venil *et al.*, 2020).

Pigmentos fúngicos demonstram, ainda, uma diversidade de bioatividades, como atividades antitumorais, antiobesidade, redutoras de colesterol e/ou antiateroscleróticas, antidoença de Alzheimer, antioxidantes e imunossupressoras (Lin e Xu, 2022).

Assim, o presente trabalho objetivou selecionar fungos capazes de sintetizar pigmentos com propriedades cromáticas desejáveis e atrativas, visando sua futura incorporação em diferentes matrizes alimentícias como alternativa segura aos corantes sintéticos.

### Material e Métodos

Inicialmente, prepararam-se 100 mL de meio de cultura submerso, contidos em Erlenmeyer de 500 mL, composto por 3,5 g de farinha de arroz integral em 100 mL de água destilada, sendo autoclavados à 120 °C, sob pressão de 1 atm, durante 30 minutos.

Em seguida, nove fungos filamentosos identificados com os códigos AQ851, I221, I321, LD26B, MD42, SD21, SD42, SD51 e W01, selecionados do banco de culturas do Laboratório de Micologia, Enzimologia e Desenvolvimento de Produtos (LMEDP/UFVJM) foram inoculados nos meios submersos.

Para isso, utilizaram-se três discos, com diâmetro de 1 polegada cada, do micélio do fungo cultivado em meio de cultura sólido Batata-Dextrose-Ágar (BDA). Além disso, foram preparados meios de cultura controles sem o inóculo do fungo. Os meios foram mantidos em

incubadora tipo BOD a uma temperatura de 30 °C, por dezesseis dias, de forma estacionária, na ausência de luz.

Decorrido o tempo de incubação, os meios foram filtrados utilizando bomba a vácuo com o auxílio de um funil de Büchner e papel de filtro Unifil® 12,5 cm de diâmetro. Em seguida, o extrato bruto contendo o pigmento foi centrifugado à 3100 rpm, por 20 minutos, e posteriormente realizou-se outra etapa de filtração a vácuo. Os extratos obtidos foram armazenados tanto à temperatura ambiente ( $\approx$  20 °C) quanto à temperatura de refrigeração (4 °C).

Os extratos foram avaliados com relação à cor através do espectrofotômetro Mini Scan XE 45/0-L (HunterLab, Reston, USA), nas seguintes condições de teste: iluminante D65 e ângulo de visão de 10°, com leitura direta dos valores das coordenadas L\* (luminosidade), a\* (intensidade de vermelho-verde) e b\* (intensidade de amarelo- azul). O pH final do extrato pigmentado foi analisado no primeiro e sétimo dia por medição direta em potenciômetro digital previamente calibrado com soluções tampão 4,00 e 7,00.

## Resultados e Discussão

Após análises, o extrato pigmentado controle apresentou uma luminância (L\*) de 77,68, índice de vermelho-verde (a\*) de 2,99 e com o índice de azul-amarelo (b\*) de 11,47, resultando em uma coloração acinzentada quando armazenado na bancada, sofrendo poucas variações desses parâmetros quando armazenado em geladeira.

Em relação aos nove microrganismos analisados, o fungo com código LD26B produziu o extrato mais claro, atingindo o branco absoluto ( $L^* = 100$ ) para as duas formas de armazenamento, bancada e refrigeração. Em contrapartida, o fungo SD51 quando armazenado sob refrigeração apresentou o menor valor de L\* 75,59 dentre os extratos obtidos (Tabela 1).

Os valores negativos do parâmetro a\* indicaram que a amostra tendeu para tons mais esverdeados, enquanto valores positivos indicaram tons mais avermelhados. Assim, os extratos dos fungos AQ851 (bancada e geladeira), I321 (bancada), LD26B (bancada e geladeira), MD42 (geladeira), SD21 (bancada e geladeira), SD42 (bancada e geladeira) e W01 (bancada) tenderam para tons mais esverdeados (Tabela 1). Demonstrando que a forma de armazenamento possuía interferência na manutenção ou não da cor de extrato pigmentado, podendo inferir que a temperatura foi um parâmetro que influenciou na estabilidade do pigmento secretado pelos fungos.

Todos os extratos apresentaram tendência para amarelo (b\*+) com diferentes intensidades, no entanto, os extratos obtidos dos fungos I221 e SD51 apresentaram maior valor desse parâmetro em ambas as formas de armazenamento, demonstrando que esses pigmentos possuíram uma coloração mais quente, voltada ao amarelo-alaranjado. A variação geral de b\* em relação ao armazenamento foi pequena, notando-se maior alteração apenas no extrato MD42 com perda de intensidade amarela de 14,33 para 5,40 (Tabela 1). Isso demonstrou que a temperatura de armazenamento influenciou na estabilidade dos pigmentos.

Salienta-se que os parâmetros L\*, a\* e b\* quando avaliados individualmente não refletem as características globais dos extratos. Com os dados obtidos não foi possível estabelecer uma relação direta entre o pH final do extrato pigmentado e a coloração obtida, uma vez que cada extrato sofreu variações diferentes com o aumento ou diminuição desse parâmetro. Assim, a determinação da melhor forma de armazenamento dos extratos foi realizada com base

na menor variação do parâmetro  $a^*$  para os microrganismos que produziram uma pigmentação atrativa.

**Tabela 1 – Análise do pH e da cor dos extratos fúngicos pigmentados à temperatura ambiente e sob refrigeração – dia 1.**

Fungos	Temperatura ambiente				Temperatura de refrigeração			
	pH	L*	a*	b*	pH	L*	a*	b*
<b>Controle</b>	6,21	77,68	2,99	11,47	6,21	77,87	3,05	11,62
<b>AQ851</b>	2,39	98,38	-0,38	7,47	2,49	99,62	-0,23	8,94
<b>I221</b>	5,27	84,62	16,26	21,97	5,42	82,96	19,35	20,09
<b>I321</b>	2,76	99,38	-0,54	5,68	3,16	90,27	1,50	9,34
<b>LD26B</b>	2,96	100,00	-0,37	2,72	3,25	100,00	-0,69	3,80
<b>MD42</b>	3,73	84,37	3,31	14,33	3,84	99,73	-0,17	5,40
<b>SD21</b>	2,24	98,27	-0,40	5,90	2,35	99,33	-0,03	6,83
<b>SD42</b>	2,76	98,45	-0,74	6,27	3,07	99,65	-1,05	4,84
<b>SD51</b>	4,96	86,24	2,85	19,06	5,13	75,59	3,87	20,39
<b>W01</b>	3,96	96,53	-0,30	13,85	4,10	97,42	0,48	13,06

Resultados de cor de acordo com a escala CieLab onde L\* representa a luminosidade, a\* representa a intensidade vermelho-verde e b\* representa a intensidade amarelo-azul.

No sétimo dia de obtenção do extrato pigmentado, os mesmos apresentaram menor intensidade de cor visto que houve o aumento de L\* nos casos dos fungos MD42 (bancada), I321 (bancada e geladeira), SD42 (bancada e geladeira), SD21 (bancada), I221 (bancada e geladeira) e AQ851 (bancada) (Tabela 2).

No que tange ao parâmetro  $a^*$ , no sétimo dia observou-se que a intensidade de vermelho ( $a^*+$ ) diminuiu em relação ao primeiro dia em todos os extratos armazenados sob refrigeração e nos extratos I221 e SD51. Enquanto que os extratos que no primeiro dia apresentaram inclinação para o índice verde ( $a^*-$ ), também apresentaram uma pequena perda de intensidade, adquirindo tonalidades mais neutras. Embora haja uma degradação dos pigmentos em ambas as formas de armazenamento, o extrato pigmentado I221 manteve o maior valor de  $a^*$  com uma menor variação desse parâmetro quando em temperatura de refrigeração, sugerindo uma melhor estabilidade térmica (Tabela 2).

A diminuição na intensidade avermelhada pode estar associada à degradação oxidativa, pH, temperatura de armazenamento ou por intermédio de outros compostos, como enzimas, secretadas pelo microrganismo durante o período de incubação, tornando necessária a investigação acerca dos fatores que interagem com o pigmento (Breitenbach *et al.*, 2015; Vendruscolo *et al.*, 2013; Sugawara *et al.*, 2019).

Extratos obtido a partir dos fungos I221 e LD26B apresentaram aumento no índice de amarelo ( $b^*+$ ) nas duas formas de armazenamento, o que sugeriu maior estabilidade e a capacidade de intensificação da coloração amarela ao longo do tempo. Embora a refrigeração tenha sido benéfica nesses casos do LD26B e SD21, o extrato MD42 apresentou redução significativa de  $b^*$ , tal qual no primeiro dia, evidenciando a degradação do pigmento (Tabela 2).

**Tabela 2 – Análise do pH e da cor dos extratos fúngicos pigmentados à temperatura ambiente e sob refrigeração – dia 7.**

<b>Fungo</b>	<b>Temperatura ambiente</b>				<b>Temperatura de refrigeração</b>			
	<b>pH</b>	<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>	<b>pH</b>	<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>
<b>Controle</b>	4,34	77,56	2,97	11,58	5,80	80,15	2,81	10,96
<b>AQ851</b>	2,77	98,81	-0,25	7,57	3,13	99,11	-0,72	8,31
<b>I221</b>	5,64	88,57	13,84	22,29	5,75	83,06	18,25	23,14
<b>I321</b>	2,86	98,42	0,47	7,87	2,84	96,57	0,74	9,21
<b>LD26B</b>	3,08	99,15	-0,71	3,79	2,91	99,45	-0,71	4,52
<b>MD42</b>	4,60	84,76	3,48	13,74	3,79	98,83	-0,22	5,25
<b>SD21</b>	2,71	98,74	-0,44	6,45	3,04	98,63	-0,30	6,45
<b>SD42</b>	3,01	98,51	-0,01	5,88	2,69	98,92	-0,93	4,48
<b>SD51</b>	5,16	84,54	2,54	18,91	5,27	74,31	3,78	20,30
<b>W01</b>	4,08	95,13	0,88	13,66	4,28	96,69	-1,02	13,83

Resultados de cor de acordo com a escala CieLab onde  $L^*$  representa a luminosidade,  $a^*$  representa a intensidade vermelho-verde e  $b^*$  representa a intensidade amarelo-azul.

## Conclusões

O microrganismo capaz de produzir um pigmento de interesse foi o I221 atingindo um valor elevado de intensidade de vermelho ( $a^* = 19,35$ ) e estabilidade térmica sob refrigeração. A seleção de um microrganismo com potencial na produção de pigmento atrativo e estável para a indústria reforça o potencial biotecnológico dos fungos filamentosos como fontes alternativas de corantes naturais.

Esse trabalho ofereceu resultados iniciais necessários para futuras investigações sobre os mecanismos de degradação e aprimoramento da estabilidade do micropigmento gerado visando sua consolidação na formulação de matrizes alimentícias para aplicação industrial.

## Agradecimentos

À UFVJM, ao Instituto de Ciência e Tecnologia, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo suporte e aos órgãos de fomento CNPq, FAPEMIG e CAPES.

## Referências

BREITENBACH, Michael *et al.* Oxidative Stress in Fungi: its function in signal transduction, interaction with plant hosts, and lignocellulose degradation. **Biomolecules**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 318-342, 3 abr. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/biom5020318>.

LIN, Lan; XU, Jianping. Production of Fungal Pigments: molecular processes and their applications. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 44, 28 dez. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof9010044>.

Morais, Isabela de *et al.* Obtaining and characterizing polyphenol extracts based on anthocyanins from Melinis minutiflora inflorescences and Plinia cauliflora fruits and application in gelatins. **Food Research International**, [S.L.], v. 173, p. 113426, nov. 2023. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113426>

PEREIRA, Dorothy Ívila de Melo *et al.* Isolation and Identification of Pigment-Producing Endophytic Fungi from the Amazonian Species Fridericia chica. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 77, 19 jan. 2024. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof10010077>.

RIGOLON, Thaís Coroline Buttow *et al.* Colorimetria aplicada aos corantes naturais. In:

STRINGHETA, Paulo Cesar. Corantes Naturais: do laboratório ao mercado. Viçosa: Lacbio, 2021. p. 61-98.

SUGAWARA, Kanako *et al.* Degradation of antifungal anthraquinone compounds is a probable physiological role of DyP secreted by Bjerkandera adusta. **Amb Express**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 2-8, 23 abr. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-019-0779-4>.

VALENZUELA-GLORIA, Miriam S. *et al.* Molecular Characterization of Fungal Pigments. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 7, n. 5, p. 326, 23 abr. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof7050326>.

VENDRUSCOLO, Francielo *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, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocab.2013.03.008>.

VENIL, Chidambaram Kulandaivasamy *et al.* Fungal Pigments: potential coloring compounds for wide ranging applications in textile dyeing. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 6, n. 2, p. 68, 20 maio 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jof6020068>.