



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Sabrina Barros Cavalcante

**PRODUÇÃO DE PIGMENTOS POR FUNGOS ANTÁRTICOS E SEU POTENCIAL  
ANTIMICROBIANO**

Florianópolis  
2022.

Sabrina Barros Cavalcante

**PRODUÇÃO DE PIGMENTOS POR FUNGOS ANTÁRTICOS E SEU POTENCIAL  
ANTIMICROBIANO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós- Graduação em  
Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de  
Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em  
Biotecnologia e Biociências; área de concentração:  
Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Robl.

Coorientador: Prof. Dr. Rubens Delgado Tadeu Duarte.

Florianópolis

2022.

Sabrina Barros Cavalcante

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cavalcante, Sabrina Barros

Produção de pigmentos por fungos antárticos e seu potencial antimicrobiano / Sabrina Barros Cavalcante ; orientador, Diogo Robl, coorientador, Rubens Delgado Tadeu Duarte, 2022.  
120 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. I. Robl, Diogo. II. Delgado Tadeu Duarte, Rubens. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Sabrina Barros Cavalcante

**PRODUÇÃO DE PIGMENTOS POR FUNGOS ANTÁRTICOS E SEU POTENCIAL  
ANTIMICROBIANO**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Diogo Robl -Presidente  
PPGBTC – UFSC

Profª. Dra. Jaciane Lutz Ienczak  
Departamento de Engenharia  
Química - UFSC

Prof. Dr. Admir José Giachini  
PPGBTC – UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em biotecnologia e biociências.

---

Prof(a). Dr(a). Patricia Hermes Stoco  
Subcoordenadora do Programa

---

Prof. Dr. Diogo Robl  
Orientador

Florianópolis  
2022.

Dedico este trabalho à minha mãe: Silvani Barros,  
por ser meu exemplo de força, dedicação e amor.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador Professor Diogo Robl, pela oportunidade, empenho, competência e paciência para ensinar. Ao meu coorientador Rubens Duarte por todos os conhecimentos pacientemente transmitidos.

Agradeço o companheirismo dos amigos do Laboratório de Microbiologia e Processos Biotecnológicos (LAMPB/UFSC) que fiz durante minha trajetória, em especial: André Felipe, Isabela Maria, Joana Camila, Gustavo Volpato, Carla Biscaino, Renata Silveira, Edenilson Meyer e Gabi Pinto que sempre estavam ali para dividir os desafios e também comemorar as alegrias ao longo do trajeto.

Agradeço a todo o Departamento do CCB/UFSC por me proporcionarem um ambiente de aprendizado e troca de conhecimento.

Agradeço a Professora Denise Moritz por toda disponibilidade e ajuda.

Agradeço a Lenon Modesto e Daniel Stainer por toda paciência e auxílio durante as análises.

Agradeço todo aprendizado e troca de conhecimento do Laboratório de Química e Produtos Naturais- LQPN/UFSC, especialmente dos colegas Lucas Pradi e Jhully Wellen.

Agradeço à agência financiadora CAPES pelo suporte financeiro.

Agradeço também a mim mesma por reconhecimento de toda a dedicação, determinação, superação e amor ao que faço.

Agradeço com muito carinho especialmente a minha família: Minha mãe Silvani, meu pai Genauro, meu padrasto Elvio e meus irmãos David e Guilherme, por me apoiarem sempre e serem meu alicerce.

Ao meu amor e companheiro, Leonardo Tenório, obrigada por estar sempre ao meu lado, mesmo na distância, sendo meu melhor amigo e me dando forças nos momentos difíceis e também vibrando a cada conquista. *“Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso prazer para mim dividir um planeta e uma época com você.”*

Obrigada!!

Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto.  
(Carl Sagan)

## RESUMO

Nos últimos anos, houve o aumento na busca para adquirir produtos contendo ingredientes naturais. Pigmentos naturais vêm recebendo atenção especial do mercado e da indústria, uma vez que minimizam os danos à saúde e ao meio ambiente causados por pigmentos sintéticos. Esses pigmentos são adjuvantes em diversos produtos, agregando propriedades físico-químicas e biológicas e comumente extraídos de uma ampla gama de organismos, sendo que os pigmentos fúngicos apresentam vantagens como uma ampla gama de cores, rápido crescimento, fácil extração e independe das condições climáticas. Fungos de ambientes extremos tem se mostrado como uma abordagem promissora na busca de biomoléculas com potencial antimicrobiano. Assim, os objetivos deste estudo foram: Elaborar uma revisão bibliográfica sobre produção de pigmentos a partir de isolados antárticos, sua aplicação biotecnológica, toxicidade, mercado e levantamento de patentes destes pigmentos; Isolar e caracterizar fungos de solos da Geleira Collins (Antártica) por meio de análise morfológica e do sequenciamento da região ITS; Selecionar os isolados de fungos filamentosos produtores de pigmentos (extracelulares) e cultivá-los em estado submerso e estado sólido, bem como caracterizar os pigmentos produzidos e avaliar seu potencial antimicrobiano. A revisão bibliográfica verificou que poucos microrganismos antárticos foram patenteados para a produção de pigmentos, entre 12 espécies pesquisadas, apenas 4 possuem patentes registradas até o momento. Além disso, a revisão possibilitou o aprofundamento do tema e contextualização para o delineamento da pesquisa (capítulo II e III desta dissertação); O isolamento permitiu obter um total de 52 fungos isolados de solo de degelo da Geleira Collins-face sudeste, e se reativou 12 fungos da face-oeste da coleção de fungos antárticos do LAMPB/UFSC. Isto permitiu comparar os gêneros/espécies presentes nos dois transectos da geleira de estudo. A identificação presumida permitiu classificar esses isolados em 8 gêneros: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pseudogymnoascus*, *Talaromyces* e *Thelebolus*. A análise filogenética possibilitou inferir espécies como *Talaromyces cnidii* e *Pseudogymnoascus shaanxiensis*, sendo o primeiro relato destas espécies no continente Antártico, sugerindo ampla dispersão e adaptação das espécies a ambientes frios. Além disso, os isolados de *Pseudogymnoascus* sp. (SC04.P3, SC12.P3 e ACF093) agrupam-se em clados distintos de outras espécies, podendo representar novas linhagens fúngicas. A triagem dos fungos produtores de pigmentos foi realizada com os 61 isolados filamentosos, dentre estes, 6 mostraram-se produtor de pigmentos extracelulares e foram selecionados para as próximas etapas de produção e extração de pigmentos. As linhagens selecionadas foram cultivadas em meio sólido de arroz por 14 dias a 15,0 °C e os pigmentos foram extraídos com: metanol, água e acetato de etila. Os pigmentos apresentaram-se com pico de absorbância de carotenoides (495nm), melaninas (488nm) azafilonas (400nm) e naftoquinonas (540nm). A atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de bloco de difusão em ágar e demonstrou que os pigmentos extraídos em acetato de etila dos isolados de *Pseudogymnoascus* sp. (4 isolados) inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Além disso, os pigmentos do gênero *Pseudogymnoascus* se mostraram solúveis em água, o que aumenta a viabilidade e a sustentabilidade do bioprocesso. As características dos pigmentos e os testes antimicrobianos mostraram que os isolados psicofílicos *Pseudogymnoascus* sp. representam uma nova fonte promissora de pigmentos com atividade antimicrobiana. A caracterização química dos extratos se faz necessária para garantir a segurança dos extratos e a seu potencial aplicação na indústria de alimentos, cosméticos e têxteis.

**Palavras-chave:** Antártica; extremófilos; pigmentos; *Pseudogymnoascus*.



## ABSTRACT

In recent years, there has been an increase in the search for products containing natural ingredients. Natural pigments have received special attention from the market and industry as they could overcome the harm to health and the environment caused by synthetic pigments. Natural pigments are adjuvants in several products, add physicochemical and biological properties, and are commonly extracted from a wide range of organisms. They present several advantages such as a wide range of colors, fast growth, easy extraction, and independence of climatic conditions. Fungi from extreme environments showed to be a promising source in the search for biomolecules with antimicrobial potential. Thus, the goals of this study were: Conduct a literature review on pigment production from Antarctic fungi, their biotechnological application, toxicity, market and patent survey of these pigments; Isolate and characterize soil fungi from *Collins* Glacier (Antarctic) through morphological analysis and ITS sequencing region; Screen fungi strains that produce extracellular pigments and cultivate them in submerged and solid state, as well as characterize the produced pigments and evaluate their antimicrobial activity. The literature review found that few Antarctic microorganisms were patented for the pigment production, among 12 species researched, only 4 have registered patents. In addition, the review made it possible to deepen the theme and contextualize the research lineation (chapters II and III); It was isolated a total of 52 fungi from the thaw soil of the *Collins* Glacier-southeast face, and 12 fungi from the west face from the LAMPB/UFSC Antarctic fungi collection were reactivated. This allowed comparing the genera/species present in the two transects of the study glacier. The presumptive identification (morphological) classified these isolates into 8 genera: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pseudogymnoascus*, *Talaromyces* and *Thelebolus*. The phylogenetic analysis infer species such as *Talaromyces cnidii* and *Pseudogymnoascus shaanxiensis*, which is the first report of these species in the Antarctic, suggesting wide dispersion and adaptation of the species to cold environments. In addition, *Pseudogymnoascus* sp. (SC04.P3, SC12.P3 and ACF093) were clustered in distinct clades and may represent new fungal lineages. The screening of pigment-producing fungi was carried out with the 61 filamentous isolates, among which 6 were shown to produce extracellular pigments and were selected for the next stages of pigment production and extraction. The selected strains were cultivated in rice solid medium for 14 days at 15.0 °C and the pigments were extracted with: methanol, water and ethyl acetate. The pigments presented a maximum absorbance of carotenoids (495nm), melanins (488nm), azaphyllones (400nm) and naphthoquinones (540nm). Antimicrobial activity was performed by the agar diffusion block method and demonstrated that the pigments extracted in ethyl acetate from *Pseudogymnoascus* sp. (4 isolates) inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. In addition, *Pseudogymnoascus* pigments were shown to be soluble in water, which could increase the viability and sustainability of the bioprocess. Pigment characteristics and antimicrobial tests showed that the psychrophilic *Pseudogymnoascus* sp. represent a potential new source of pigments with antimicrobial activity. Extract chemical characterization is mandatory to guarantee the extract safety and their potential application in the food, cosmetics and textile industries.

**Keywords:** Antarctic; extremophiles; pigments; *Pseudogymnoascus*.

## LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E UNIDADES DE MEDIDA

**ATCC** - *American Type Culture Collection*  
**ATS** - Sistema do Tratado da Antártica  
**BDA** - Batata Dextrose Ágar  
**Blast** - *Basic Local Alignment Search*  
**CBS** - *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute*  
**CCA** - Centro de Ciências Agrárias  
**CCB** - Centro de Ciências Biológicas  
**CTAB** - Brometo de Cetil Trimetilamônio  
**DMSO** - Dimetilsulfóxido  
**DNA** - Ácido Desoxirribonucleico  
**EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético  
**ITS** - Região transcrita interna  
**L** - Litro  
**MEGA** - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*  
**min** - Minutos  
**mL** - Mililitro  
**mm** - Milímetro  
**nm** - Nanômetro  
**mg L** - Miligramas por litro  
**°C** - Graus Celsius  
**OPERANTAR** - Operação Antártica  
**PCR** - Reação em Cadeia de Polimerase  
**pH** - Potencial hidrogeniônico  
**PROANTAR** - Programa Antártico Brasileiro  
**p/v** - Concentração peso por volume  
**RNA** - Ácido ribonucleico  
**rpm** - Rotações por minuto  
**S** - Segundos  
**Taq polimerase** - *Thermus aquaticus* polimerase  
**UFC** - Unidades Formadoras de Colônia  
**UFSC** - Universidade Federal de Santa Catarina

**UV** - Ultravioleta

**UVA** - Radiação Ultravioleta do tipo A

**UVB** - Radiação Ultravioleta do tipo B

**UVC** - Radiação ultravioleta do tipo C

**YMA** - *Yeast Malt Agar*

**µg** - Micrograma

**µL** - Microlitro(s)

**%** - Porcentagem

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Produção esquemática de pigmentos de hifas de células fúngicas. As estruturas químicas gerais dos carotenoides são mostradas em <b>a</b> , enquanto as das melaninas estão em <b>b</b> .....	24
<b>Figura 2.</b> Número de publicações de pigmentos de fungos (2010-2021, PubMed) .....	29
<b>Figura 3.</b> Número de publicações de espécies de fungos (2010-2021, PubMed) .....	30
<b>Figura 4.</b> Visão esquemática da Ilha Rei George, com ênfase na localização da Península Fildes (Imagem: adaptado, Simões, J. 2004) .....	44
<b>Figura 5.</b> Visão esquemática da Geleira <i>Collins</i> , com ênfase para a localização das duas faces (Sudeste e Oeste). (Imagem: adaptado, Simões, J. 2004) .....	45
<b>Figura 6.</b> Região de coleta do solo da geleira <i>Collins</i> (Sudeste). <b>A)</b> Escavação do bloco de gelo glacial a ser removido; <b>B)</b> Foto do bloco já desprendido, evidenciando a presença de grânulos de sedimento .....	46
<b>Figura 7.</b> Amostras de solo em solução salina contendo peptona (0,1%) após agitação .....	46
<b>Figura 8.</b> Reativação das linhagens fúngicas isoladas de solo da Geleira <i>Collins</i> -face oeste em caldo Sabouraud.....	47
<b>Figura 9.</b> Região de coleta do solo da geleira <i>Collins</i> (Oeste). <b>A.</b> Abertura para acessar o solo com auxílio de uma piqueta; <b>B.</b> Aspecto da amostra após o derretimento da camada de gelo .....	48
<b>Figura 10.</b> Macro e micromorfologia dos gêneros fúngicos isolados em BDA (14 dias a 28 °C). <b>A.</b> <i>Aspergillus</i> ; <b>B.</b> <i>Cladosporium</i> ; <b>C.</b> <i>Curvularia</i> ; <b>D.</b> <i>Paecilomyces</i> ; <b>E.</b> <i>Penicillium</i> ; <b>F.</b> <i>Pseudogymnoascus</i> ; <b>G.</b> <i>Talaromyces</i> ; <b>H.</b> <i>Thelebolus</i> .....	52
<b>Figura 11.</b> Fungos reativados do ponto P1 (0m). <b>A.</b> <i>Pseudogymnoascus</i> sp. (ACF093); <b>B.</b> ACL092 .....	55
<b>Figura 12.</b> <b>A.</b> Morfologia colonial da linhagem <i>Curvularia</i> sp. SCUUV07.P1 em BDA (7 dias a 28°). <b>B.</b> Árvore filogenética construída com bootstrap de 1000 repetições utilizando-se o software MEGA e aplicando o método de maximum-likelihood com sequências da região ITS de espécies referência de <i>Curvularia</i> .....	58
<b>Figura 13.</b> <b>A.</b> Morfologia colonial da linhagem <i>Penicillium</i> sp. SCUUV02.P1 em BDA (7 dias a 28°). <b>B.</b> Árvore filogenética construída com bootstrap de 1000 repetições utilizando-se o software MEGA e aplicando o método de maximum-likelihood com sequências da região ITS de espécies referência de <i>Penicillium</i> .....	60
<b>Figura 14.</b> Morfologia colonial da linhagem <i>Talaromyces</i> sp. SC34.P3 em BDA (7 dias a 28°). <b>B.</b> Árvore filogenética construída com bootstrap de 1000 repetições utilizando-se o software MEGA e aplicando o método de maximum-likelihood com sequências da região ITS de espécies referência de <i>Talaromyces</i> .....	62
<b>Figura 15.</b> Morfologia colonial da linhagem <i>Thelebolus</i> sp. SC29.P3 em BDA (7 dias a 28°). <b>B.</b> Árvore filogenética construída com bootstrap de 1000 repetições utilizando-se o software MEGA e aplicando o método .....	

de maximum-likelihood com sequências da região ITS de espécies referência de <i>Thelebolus</i> .....	65
<b>Figura 16.</b> Morfologia colonial das linhagens de <i>Pseudogymnoascus</i> spp. em BDA (7 dias a 28°). <b>A.</b> SC04.P3; <b>B.</b> SC12.P3; <b>C.</b> SC14.P3; <b>D.</b> SC25.P3; <b>E.</b> SC32.P3; <b>F.</b> ACF093 .....	68
<b>Figura 17.</b> Árvore filogenética construída com bootstrap de 1000 repetições utilizando-se o software MEGA e aplicando o método de maximum-likelihood com sequências da região ITS de espécies referência de <i>Pseudogymnoascus</i> .....	70
<b>Figura 18.</b> Isolados leveduriformes produtores de pigmentos ( <b>A.</b> ACL092; <b>B.</b> SC05L.P3; <b>C.</b> SC35L.P3).....	73
<b>Figura 19.</b> Seleção dos isolados produtores de pigmentos da Geleira <i>Collins</i> . <b>A.</b> <i>Curvularia</i> sp. (SCUV07.P1); <b>B.</b> <i>Talaromyces</i> sp. (SC34.P3); <b>C.</b> <i>Pseudogymnoascus</i> sp. (SC04.P3); <b>D.</b> <i>Pseudogymnoascus</i> sp. (SC12.P3); <b>E.</b> <i>Pseudogymnoascus</i> sp. (SC32.P3); <b>F.</b> <i>Pseudogymnoascus</i> sp. (ACF093) .....	82
<b>Figura 20.</b> Isolados produtores de pigmentos em caldo Sabouraud <b>A.</b> <i>Curvularia</i> sp. (SCUV07.P1); <b>B:</b> <i>Talaromyces</i> sp. (SC34.P3) em shaker a 150 rpm, após 7 dias a 15,0 °C .....	83
<b>Figura 21.</b> Isolados produtores de pigmentos em meio sólido de arroz. Após 2 dias de cultivo ( <b>A</b> ) e após 14 dias de cultivo ( <b>B</b> ) a 15,0 °C.....	84
<b>Figura 22.</b> Extração aquosa dos pigmentos produzidos por <i>Pseudogymnoascus</i> sp. SC12.P3; <i>Pseudogymnoascus</i> sp. SC32.P3; <i>Talaromyces cnidii</i> SC34.P3; <i>Pseudogymnoascus</i> sp. SC04.P3; <i>Pseudogymnoascus</i> sp. ACF093 e <i>Curvularia affinis</i> SCUV07.P1, respectivamente.....	85
<b>Figura 23.</b> Fungo produtor de pigmento em meio extracelular pelo isolado fúngico <i>C. affinis</i> SCUV07.P1 de solo da Geleira <i>Collins</i> -face sudeste em meio BDA ( <b>A:</b> frente; <b>B:</b> verso) .....	86
<b>Figura 24.</b> Extração do isolado <i>C. affinis</i> SCUV07.P1 em solventes (metanol, água e acetato de etila, respectivamente).....	87
<b>Figura 25.</b> Perfil de absorbância do pigmento em metanol do isolado <i>C. affinis</i> SCUV07.P1 .....	87
<b>Figura 26.</b> Fungo produtor de pigmento em meio extracelular pelo isolado fúngico <i>T. cnidii</i> SC34.P3 de solo da Geleira <i>Collins</i> -face sudeste em meio BDA ( <b>A:</b> frente; <b>B:</b> verso) .....	88
<b>Figura 27.</b> Extração do isolado <i>T. cnidii</i> SC34.P3 em solventes (metanol, água e acetato de etila, respectivamente) .....	89
<b>Figura 28.</b> Perfil de absorbância do pigmento em metanol do isolado <i>T. cnidii</i> SC34.P3 .....	89
<b>Figura 29.</b> Fungos produtores de pigmento em meio extracelular pelos isolados fúngicos <b>A.</b> <i>Pseudogymnoascus</i> sp. SC04.P3, <b>B.</b> <i>Pseudogymnoascus</i> sp. SC12.P3, <b>C.</b> <i>Pseudogymnoascus</i> sp. SC32.P3, <b>D.</b> <i>Pseudogymnoascus</i> sp. ACF093 de solo da Geleira <i>Collins</i> em meio BDA.....	91

<b>Figura 30.</b> Extração dos isolados em metanol <b>A.</b> <i>Pseudogymnoascus</i> sp. SC04.P3; <b>B.</b> <i>Pseudogymnoascus</i> sp. SC12.P3; <b>C.</b> <i>Pseudogymnoascus</i> sp. SC32.P3; <b>D.</b> <i>Pseudogymnoascus</i> sp. ACF093 em solventes (metanol, água e acetato de etila, respectivamente).....	91
<b>Figura 31.</b> Perfil de absorbância do pigmento em metanol do isolado <i>Pseudogymnoascus</i> sp. SC04.P3.....	92
<b>Figura 32.</b> Perfil de absorbância dos pigmentos em metanol pelos isolados <i>Pseudogymnoascus</i> sp. <b>A.</b> SC12.P3, <b>B.</b> SC32.P3, <b>C.</b> ACF093 .....	93
<b>Figura 33.</b> Atividade antibacteriana contra <i>S. aureus</i> dos pigmentos utilizando o solvente A.E dos isolados <i>Pseudogymnoascus</i> sp. (SC04.P3, SC12.P3, SC32.P3 e ACF093).....	96
<b>Figura 34.</b> Não formação de halos de inibição dos pigmentos utilizando o solvente <b>A.</b> água; <b>B.</b> metanol.....	97

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Aplicação de pigmentos fúngicos: Carotenoides (astaxantina, $\beta$ -caroteno, cantaxantina, licopeno), Melanina, Antraquinonas e Azafilonas.....	25
<b>Tabela 2.</b> Fungos da Antártica: Pigmentos produzidos por diferentes espécies.....	26
<b>Tabela 3.</b> Patentes de pigmentos fúngicos antárticos.....	39
<b>Tabela 4.</b> Ponto de coleta e temperatura local da amostra de solo da Geleira <i>Collins</i> (Face Sudeste) durante a OPERANTAR XXXV.....	45
<b>Tabela 5.</b> Ponto de coleta e temperatura local da amostra de solo da Geleira <i>Collins</i> (Face Oeste) durante a OPERANTAR XXXV.....	47
<b>Tabela 6.</b> Identificação dos isolados de sedimento do solo de degelo da Geleira- <i>Collins</i> com base em micromorfologia e marcador molecular ITS.....	53
<b>Tabela 7.</b> Total de microrganismos isolados (62) das amostras de solo coletado da geleira <i>Collins</i> (sudeste).....	54
<b>Tabela 8.</b> Total de microrganismos reativados (12) das amostras de solo coletado da geleira <i>Collins</i> (oeste).....	55
<b>Tabela 9.</b> Fungos obtidos de solo da Geleira- <i>Collins</i> na Antártica e identificados por comparação de sequências com a correspondência no BLASTn e banco de dados NCBI <i>GenBank database</i> .....	56
<b>Tabela 10.</b> Isolados da Geleira <i>Collins Curvularia</i> sp. (em negrito) e sequências utilizadas na análise filogenética.....	57
<b>Tabela 11.</b> Isolado da Geleira <i>Collins Penicillium</i> sp. SCUUV02.P1 (em negrito) e sequências utilizadas na análise filogenética.....	59
<b>Tabela 12.</b> Isolado da Geleira <i>Collins Talaromyces</i> sp. SC34.P3 (em negrito) e sequências utilizadas na análise filogenética.....	62
<b>Tabela 13.</b> Isolado da Geleira <i>Collins Thelebolus</i> sp. SC29.P3 (em negrito) e sequências utilizadas na análise filogenética.....	64
<b>Tabela 14.</b> Linhagens e sequências utilizadas na análise filogenética de <i>Pseudogymnoascus</i> sp. Fungos obtidos da Geleira <i>Collins</i> (em negrito) em comparação com sequências de espécies de tipo ou referência depositadas no Genbank.....	68
<b>Tabela 15.</b> Perfil de coloração e absorvância dos isolados produtores de pigmentos da Geleira <i>Collins</i> .....	82
<b>Tabela 16.</b> Triagem da atividade antimicrobiana de pigmentos fúngicos em acetato de etila por metodologia de bloco de difusão em ágar.....	95
<b>Tabela 17.</b> Medidas dos halos de inibição dos isolados de <i>Pseudogymnoascus</i> sp. contra <i>S. aureus</i> .....	96
<b>Tabela 18.</b> Atividade antimicrobiana de pigmentos fúngicos com solvente água e metanol por metodologia de bloco de difusão em ágar.....	97

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Número de Patentes de pigmentos de fungos antárticos.....	38
<b>Gráfico 2.</b> Porcentagem de espécies por gêneros isolados da Geleira <i>Collins</i> .....	52



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. HIPOTÉSES</b> .....	17
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	17
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	18
4.1 Geral.....	18
4.2 Específicos.....	18
<b>5. CAPÍTULOS</b> .....	19
<b>6. CAPÍTULO 1 - “The hidden rainbow: The extensive biotechnological potential of Antarctic fungi pigments”</b> .....	20
6.1 Resumo.....	20
6.2 Introdução.....	21
6.3 Referencial Teórico.....	22
6.3.1 Ambiente antártico: radiação UV .....	22
6.3.2 Fungos Antárticos como fontes potenciais de pigmentos .....	24
a. Carotenoides.....	27
b. Melaninas .....	30
c. Azafilonas .....	32
d. Antraquinonas .....	33
6.3.3 Produção de pigmentos de fungos extremofílicos .....	33
6.3.4 Toxicidade potencial de pigmentos derivados de fungos .....	35
6.3.5 Mercado e propriedade intelectual de pigmentos de fungos antárticos .....	36
6.4 Conclusões e perspectivas futuras.....	40
<b>7. CAPÍTULO 2 - Isolamento e identificação dos fungos de solos de degelo de geleiras da Antártica</b> ...41	
7.1 Resumo.....	41
7.2 Introdução.....	42
7.3 Material e métodos.....	44
7.3.1 Área de coleta.....	44
7.3.2 Transecto 1: Geleira <i>Collins</i> - Face Sudeste.....	45
7.3.3 Isolamento e Preservação dos fungos.....	46
7.3.4 Reativação de fungos da coleção de linhagens da UFSC .....	47
7.3.5 Transecto 2: Geleira <i>Collins</i> - Face Oeste.....	47

7.3.6 Identificação morfológica.....	48
7.3.7 Extração do DNA total.....	49
7.3.8 Amplificação da região ITS.....	50
7.3.9 Purificação das amostras.....	50
7.3.10 Análise computacional das sequências.....	51
7.4 Resultados e Discussão.....	51
7.4.1 Caracterização Taxônomica.....	51
7.4.2 Análises filogenéticas.....	55
7.4.3 <i>Curvularia</i> .....	56
7.4.4 <i>Penicillium</i> .....	59
7.4.5 <i>Talaromyces</i> .....	61
7.4.6 <i>Thelebolus</i> .....	63
7.5 <i>Pseudogymnoascus</i> .....	66
7.6 Leveduras.....	72
7.7 Conclusão.....	75
<b>8. CAPÍTULO 3 - Produção de pigmentos por fungos Antárticos .....</b>	<b>76</b>
8.1 Resumo.....	76
8.2 Introdução.....	77
8.3 Material e métodos.....	79
8.3.1 Fungos e meio de cultivo.....	79
8.3.2 Triagem morfológica dos fungos pigmentados.....	79
8.3.3 Cultivo submerso.....	79
8.3.4 Cultivo em estado sólido.....	80
8.3.5 Extração dos pigmentos do meio de cultivo sólido.....	80
8.3.6 Avaliação do perfil de absorvância dos pigmentos.....	80
8.3.7 Produção do extrato para teste antimicrobiano.....	81
8.3.8 Avaliação da atividade antimicrobiana por bloco de difusão em ágar.....	81
8.4 Resultados e discussão.....	82
8.4.1 Triagem dos gêneros pigmentados.....	82
8.4.2 Extração dos pigmentos em diferentes solventes.....	84
8.4.3 Extração, caracterização e identificação dos pigmentos.....	86
8.4.4 <i>Curvularia affinis</i> SCUV07.P1.....	86
8.4.5 <i>Talaromyces cnidii</i> SC34.P3.....	88
8.4.6 <i>Pseudogymnoascus</i> spp.....	90
8.4.7 <i>Pseudogymnoascus</i> sp. SC04.P3.....	92
8.4.8 <i>Pseudogymnoascus</i> sp. SC12.P3, SC32.P3 e ACF093.....	93
8.5 Atividade antimicrobiana em bloco de difusão em ágar.....	95

8.6 Conclusão.....	99
<b>9. CAPÍTULO 4: Considerações finais e Perspectivas futuras .....</b>	<b>100</b>
<b>10. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>102</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A cor desperta os primeiros sentidos sensoriais de um determinado produto (Sezgin, A. e Sibel 2017). Indústrias como alimentícia, têxtil, cosmética e farmacêutica motivadas pelas tendências e conscientização do consumidor levou ao aumento do uso de ingredientes de cores naturais (Molelekoa TBJ et al. 2021). Nesse contexto, os pigmentos naturais vêm recebendo atenção especial do mercado e da indústria, pois o uso de cores sintéticas é prejudicial à saúde humana e ao meio ambiente, apresentando desvantagens como baixa degradação e potencial para causar carcinogênese e alergias (Lagashetti et al. 2019).

Pigmentos de fontes naturais são sintetizados principalmente por plantas, animais e microrganismos (Sharid et al. 2013). No entanto, o processo de produção de pigmentos a partir de plantas apresenta desvantagens como dependência sazonal (Lagashetti et al. 2019). Atualmente, microrganismos, incluindo bactérias, fungos e algas, têm se mostrado uma excelente fonte alternativa de pigmentos naturais (Lagashetti et al. 2019). Entre os microrganismos produtores de pigmentos, os fungos apresentam-se como produtores mais eficientes, com vantagens como: crescimento independentemente das condições climáticas e capacidade de produzir uma ampla gama de pigmentos, como melanina, carotenoides ou policetídeos (Sharid et al. 2013).

O continente antártico apresenta condições ambientais extremas, como alta incidência de radiação ultravioleta (UV), salinidade, baixas temperaturas e ciclos de congelamento e degelo (Fell et al. 2006; Gonçalves et al. 2012). O sucesso ecológico dos fungos na colonização da Antártica tem sido associado à sua capacidade de produzir metabólitos secundários, como os pigmentos (Venil et al. 2020). Os pigmentos fúngicos possuem diferentes funções fisiológicas e ecológicas, como a proteção contra o estresse ambiental (melanina), proteção contra radiação oxidante letal (carotenos) e como cofatores na catálise enzimática (flavinas) (Mueller et al. 2005). Além disso, agregam propriedades físico-químicas e biológicas como atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena (Tuli et al. 2015).

Diante disso, com a globalização e considerando a tendência mundial por uma biotecnologia mais verde, a demanda por pigmentos naturais devido às suas vantagens sobre os pigmentos sintéticos é crescente. Nos últimos anos, fungos extremófilos surgiram entre as fontes eficientes e ecológicas de pigmentos naturais com atividades biológicas. Sendo assim, o estudo destaca a relevância dos fungos antárticos como fontes de pigmentos naturais com diversas aplicações biotecnológicas.

## **2. HIPÓTESES**

Fungos antárticos são capazes de produzir pigmentos com atividade antimicrobiana e que possam potencial aplicação industrial.

## **3. JUSTIFICATIVA**

Os pigmentos sintéticos têm sido constantemente associados a problemas de saúde e seu uso vêm sendo restrito em diversos países pelo conselho da União Europeia (UE) após pesquisas científicas demonstrarem sua associação com hiperatividade e deficiência de atenção em crianças (Sezgin, A.e Sibel 2017). Diante disso, a busca por pigmentos de fontes naturais utilizando microrganismos, como os fungos, pode representar uma alternativa amigável e eficiente em indústrias de interesse.

Com o aumento da disseminação de infecções microbianas, a busca por novos fármacos que atuem de modo diferente e eficaz daqueles disponíveis atualmente no mercado tem se tornado um desafio de saúde pública (Akova, 2016). Fungos do continente antártico estão sendo frequentemente relatados como produtores de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana, antitumoral, anticancerígena e antiparasitária (Tuli et al. 2015).

Sendo assim, com os danos causados à saúde pelos pigmentos sintéticos e a crescente incidência dos microrganismos multirresistentes aos fármacos disponíveis, a busca por metabólitos secundários com novas moléculas bioativas tem estimulado os pesquisadores. Nessa perspectiva, fungos pigmentados de ambiente extremo podem representar linhagens não descritas que possuem vias metabólicas e bioquímicas desconhecidas. Diante do exposto, o trabalho descrito tem relevância e se justifica por representar a busca por pigmentos naturais de fungos em ambientes extremos que sejam novos, raros e seguros que possam servir como moléculas para o desenvolvimento de novos fármacos menos tóxicos.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Geral

Produzir e caracterizar pigmentos produzidos por fungos pigmentados isolados do solo da Antártica (Geleira *Collins*).

### 4.2 Específicos

- Fazer um levantamento bibliográfico em artigos científicos e patentes sobre pigmentos fúngicos do continente antártico;
- Isolar fungos (filamentosos e leveduriformes) obtidos de solo da Geleira *Collins* (sudeste);
- Identificar fungos (filamentosos e leveduriformes) das amostras de solo da geleira *Collins* (Face Oeste e Sudeste) através de técnicas taxonômicas morfológicas e de biologia molecular;
- Prospectar fungos filamentosos com produção de pigmentos extracelulares;
- Testar diferentes forma de cultivo (líquido e sólido) para produção dos pigmentos;
- Testar diferentes forma de extração dos pigmentos e caracterização dos perfis de absorbância;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos pigmentos fúngicos contra bactérias e fungos de interesse clínico.

## 5. CAPÍTULOS

Os resultados desta dissertação serão apresentados na forma de 4 capítulos, dos quais um (Capítulo 1) já foi submetido na forma de artigo científico em jornal indexado.

**6. Capítulo 1:** Para um entendimento do tema e contextualização da pesquisa, sugere-se a leitura do artigo de revisão submetido ao Brazilian Journal of Microbiology e ainda em revisão pela candidata ao título de mestre, Sabrina Barros Cavalcante: **“The hidden rainbow: The extensive biotechnological potential of Antarctic fungi pigments”** (Cavalcante et al. 2022).

**7. Capítulo 2:** Isolamento e identificação dos fungos de solos de degelo de geleiras da Antártica.

**8. Capítulo 3:** Produção de pigmentos por fungos Antárticos.

**9. Capítulo 4.** Considerações finais e Perspectivas futuras.

## 6 CAPÍTULO 1: “THE HIDDEN RAINBOW: THE EXTENSIVE BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF ANTARCTIC FUNGI PIGMENTS”

Submetido ao Brazilian Journal of Microbiology - Mês Outubro de 2022

### 6.1 Resumo

O continente Antártico é um ambiente extremo reconhecido principalmente por suas temperaturas abaixo de zero. Os fungos são microrganismos ubíquos que se destacam até mesmo entre os organismos antárticos, principalmente pela produção de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas. Os pigmentos são um exemplo dessas moléculas, cuja produção ocorre principalmente em resposta a condições hostis. Uma variedade de fungos pigmentados foi isolada do continente Antártico, não apenas vivendo no solo, rochas sedimentares, neve e água, mas também associados a líquens, musgos, rizosferas e zooplâncton. Ambientes físico-químicos extremos fornecem uma configuração adequada para a produção de pigmentos microbianos com características únicas. Considerando o potencial biotecnológico dos extremófilos e as preocupações com os pigmentos sintéticos, grande interesse por alternativas de pigmentos naturais tem sido levantado. Além das atividades biológicas fornecidas por pigmentos fúngicos para sobreviver em ambientes extremos (por exemplo, fotoproteção, atividade antioxidante e resistência ao estresse), esses pigmentos também podem ser de grande interesse para as indústrias biotecnológicas. Este artigo fornece uma revisão sobre o potencial biotecnológico dos pigmentos fúngicos da Antártica, com uma discussão detalhada sobre o papel biológico dos pigmentos fúngicos, a produção industrial de pigmentos de fungos extremofílicos, a toxicidade dos pigmentos, bem como uma perspectiva de mercado atual e propriedades intelectuais publicadas relacionadas a fungos antárticos pigmentados.

**Palavras-chave:** Antártica; pigmentos microbianos; fungos; carotenoide; melanina.



## 6.2 Introdução

Os pigmentos oferecem diversas aplicações na indústria alimentícia, têxtil, cosmética e farmacêutica. Sua principal função é melhorar os aspectos sensoriais do produto, o que desperta o interesse do consumidor. Nesse contexto, os pigmentos naturais vêm recebendo atenção especial do mercado e da indústria, uma vez que causam menos danos à saúde e ao meio ambiente que os causados por pigmentos sintéticos (Lagashetti et al., 2019). Além de dar cor, os pigmentos naturais são adjuvantes em diversos produtos, agregando propriedades físico-químicas e biológicas como atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena (Tuli et al. 2015). Quanto à sua origem, os pigmentos naturais podem ser extraídos de uma ampla gama de organismos, incluindo plantas, animais e algas, bem como de bactérias e fungos (Rana et al. 2021). Os pigmentos fúngicos têm vantagens como uma ampla gama de cores, rápido crescimento das células fúngicas e fácil extração em comparação com a biomassa vegetal que não está disponível ao longo do ano e é mais dependente das condições climáticas que os fungos (Venil et al. 2020).

O continente antártico apresenta condições ambientais extremas únicas. É considerado o continente mais frio e seco do nosso planeta, com temperaturas que variam entre -10 °C e -30 °C no verão e -60 °C no inverno (Nicolas; Bromwich, 2011). Os microrganismos antárticos desenvolveram uma diversidade metabólica que permitiu a colonização de diferentes nichos, como solos, sedimentos, rochas, neve, gelo glacial, permafrost e vegetação (Ruise et al. 2007; Coleine et al. 2018). Podem ser classificados de acordo com as condições físico-químicas de crescimento, sendo termófilos (alta temperatura), psicrófilos (baixa temperatura), acidófilos (alto pH), halófilos (alto teor de sal), xerófilos (baixo teor de água), oligotróficos (baixos nutrientes) e radiotolerante (radiação) (Singh e Gabani et al. 2011). Em particular, os organismos adaptados ao frio são subdivididos em psicrófilos: encontrados predominantemente em ecossistemas marinhos, com crescimento ótimo a 15,0 °C (Harding et al. 2011) e psicrotolerantes: que sobrevivem a temperaturas abaixo de 20,0 °C, mas apresentam uma taxa de crescimento ótima entre 20,0 °C e 25,0 °C e, portanto, são mais adequados para viver dentro destas faixas de temperaturas (de Maayer et al. 2014).

O sucesso ecológico dos fungos na colonização antártica tem sido associado à capacidade desses organismos de produzir metabólitos secundários para superar condições ambientais desfavoráveis (Venil et al. 2020), como compostos pigmentados. Fungos pigmentados podem tolerar altas incidências de radiação UV melhor do que fungos não pigmentados (Pulschen et al. 2015; Kreusch e Duarte, 2021). Por exemplo, a parede celular

melanizada de alguns fungos filamentosos antárticos atua como um escudo contra radiação, proporcionando resistência para sobreviver em condições tão extremas (Venil et al. 2020). Os pigmentos podem reduzir o fotodano e atuar como mecanismos adaptativos para a osmorregulação, o que leva à tolerância contra salinidade extrema, dessecação e ciclos de congelamento/descongelamento (Mueller et al. 2005).

Essa incrível variedade de funções de pigmento chamou a atenção para potenciais aplicações biotecnológicas nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica (Mitrovic et al. 2011). Pigmentos fúngicos, especialmente melanina, carotenoides e licopeno, têm sido utilizados para aplicações cosméticas, incluindo protetores solares, batons, cremes faciais e tratamentos anti-envelhecimento (Caro 2017, Rao et al. 2017; Sajid & Akbar 2018). Além disso, foi demonstrada a aplicação de carotenoides em produtos alimentícios (Mata-Gómez et al. 2014), e alguns desses compostos também podem ser utilizados na agricultura (Kumar et al. 2010). Nesse contexto, o ambiente antártico apresenta um reservatório natural de fungos produtores de pigmentos como: carotenoides e melaninas e pigmentos potenciais como as: azafilonas e antraquinonas.

Nesta revisão, enfatizamos a relevância dos fungos antárticos como fontes de pigmentos naturais e seu potencial na aplicação biotecnológica, com ênfase mais profunda na radiação UV, fungos antárticos como potenciais fontes de pigmentos, produção de pigmentos por fungos extremófilos, potencial toxicidade de pigmentos derivados de fungos, mercado de pigmentos, propriedade intelectual de pigmentos de fungos antárticos e perspectivas futuras.

### **6.3 Referencial Teórico**

#### *6.3.1 Ambiente antártico: radiação UV*

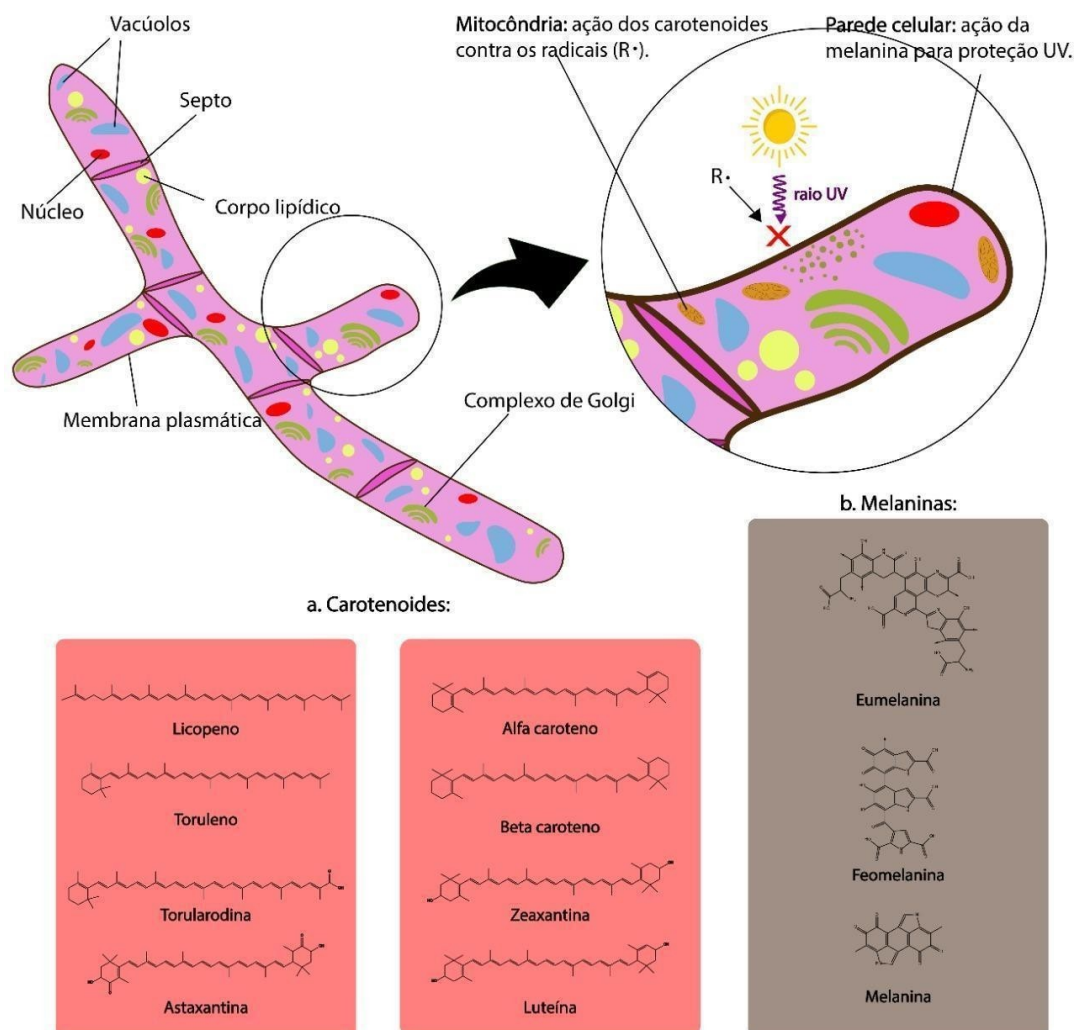
A maioria dos ecossistemas antárticos apresenta uma alta incidência de radiação, particularmente durante as estações de verão, que desafiam as populações microbianas a resistir a altas doses de radiação UV (Ruisi et al. 2007). Dessa forma, microrganismos que vivem em tais condições desenvolveram mecanismos de defesa contra os raios ultravioleta (Reis-Mansur et al. 2019).

A radiação UV é dividida de acordo com faixas de comprimento de onda que atuam como fontes adicionais de dano celular, mas geralmente quando a UV-R atinge o interior da célula, interage com O<sub>2</sub> e compostos orgânicos para produzir espécies reativas de oxigênio (ROS), danificando estruturas intracelulares e reações enzimáticas, causando estresse oxidativo (Núñez-Pons 2018). A radiação UV-A (400-315 nm) leva a efeitos indiretos no DNA, proteínas e lipídios ao produzir intermediários químicos intracelulares, como ROS (Figura 1). UV-B

(315-280 nm) também pode aumentar indiretamente a produção de ROS e causar danos genéticos diretos por indução de fotoprodutos de DNA, como pirimidina de ciclobutano e dímeros de pirimidina-pirimidona (Besaratnia et al. 2004), induzido por UV-A ou UV-B O dano ao DNA resulta em um grande evento deletério em ambas as células (eucarióticas e procarióticas) e pode levar à morte celular ou estar na origem de mutações (Ravanat e Douki et al. 2016). Por fim, os raios UV mais energéticos são os UV-C (280-100 nm), os quais mesmo uma baixa latência de exposição pode levar a danos biológicos extensos. No entanto, a camada de ozônio presente na estratosfera do nosso planeta pode filtrar eficientemente os raios UV-C recebidos, de modo que apenas a radiação UV-A e UV-B passe e atinja efetivamente a superfície da Terra (Reis-Mansur et al. 2019).

Os microrganismos que sobrevivem às condições extremas da Antártica exibem uma série de estratégias de proteção morfológica e bioquímica, incluindo a produção de compostos fotoprotetores (Cavicchioli et al. 2011; Órdenes-Aenishanslins et al. 2016) e sistemas antioxidantes baseados em antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos (Núñez-Pons 2018). Portanto, os pigmentos são um traço característico dos microrganismos adaptados ao frio da Antártica, uma vez que uma grande variedade de compostos com colorações variadas pode ser produzida (Akilandeswari e Pradeep 2016). Além disso, esses microrganismos têm sido considerados uma fonte relevante de metabólitos bioativos com diferentes atividades biológicas (Duarte et al. 2019) e há muito são estudados e explorados para diversas aplicações industriais como: farmacêutica, alimentícia e têxtil com demanda crescente entre os consumidores optando por pigmentos naturais (Sajjad et al. 2020).

**Figura 1.** Produção esquemática de pigmentos de hifas de células fúngicas. As estruturas químicas gerais dos carotenoides são mostradas em **a**, enquanto as das melaninas estão em **b**.



### 6.3.2 Fungos Antárticos como Fontes Potenciais de Pigmentos

Pigmentos contendo anéis aromáticos fornecem uma variedade de cores através da absorção e refração dos comprimentos de onda da luz. Esses pigmentos biológicos são divididos em (i) compostos monoméricos: carotenoides, luciferina, flavonoides, entre outros, e (ii) poliméricos: melaninas, taninos e substâncias húmicas (Cordero et al. 2017). Os pigmentos microbianos derivam da produção intracelular ou extracelular. Os pigmentos fúngicos pertencem principalmente a grupos policetídeos aromáticos, que constituem uma grande classe de metabólitos secundários (Akilandeswari e Pradeep 2016). Dentre os pigmentos conhecidos produzidos por fungos, os mais estudados são as melaninas, que são produzidas extracelularmente e fornecem cores marrom a preta, e os carotenoides produzidos intracelularmente e fornecem cores laranja a vermelho (Figura 1). Entre os carotenoides,  $\beta$ -

caroteno,  $\gamma$ -caroteno e licopeno são os mais encontrados (Vasileva-Tonkova et al. 2014; Alcaíno 2014; Villarreal et al. 2016).

No continente antártico, a absorção e refração da energia da radiação por pigmentos tem múltiplas funções biológicas, incluindo o aproveitamento da energia solar para uso metabólico e proteção contra danos de radiação (Cordero et al. 2017). Além de proteger dos danos celulares diretos e indiretos causados pela radiação solar, a produção de pigmentos também fornece aos microrganismos de ambientes frios estratégias para sobreviver sob temperaturas extremamente baixas. Uma dessas estratégias é estabilizar melhor a estrutura da membrana (de Maayer et al. 2014). Do ponto de vista industrial, a vantagem do uso de pigmentos fúngicos inclui sua aplicação em várias configurações industriais (Akilandeswari e Pradeep 2016), conforme observado na Tabela 1. Uma extensa lista de pigmentos derivados de fungos antárticos é apresentada na Tabela 2.

**Tabela 1:** Aplicação de pigmentos fúngicos: Carotenoides (astaxantina,  $\beta$ -caroteno, cantaxantina, licopeno), Melanina, Antraquinonas e Azafilonas.

(Continua)				
Exemplo de Espécie	Pigmento	Aplicações	Bioatividades	Referências
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Astaxantina	Corante alimentar	Antioxidante	Sen et al. (2019); Zhang. et al. (2020).
<i>Yarrowia lipolytica</i>	$\beta$ -caroteno	Corante alimentar, Fonte de Vitamina A	Antioxidante, Anticâncer e Supressão da síntese de colesterol	Eroglu et al. (2012); Macarena et al. (2017).
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Cantaxantina	Corante alimentar	Antioxidante, Anticâncer	Sen et al. (2019); Rebelo et al. (2020).
<i>Blakeslea trispora</i>	Licopeno	Farmacêutica, cosmética, alimentos	Antioxidante, Anticâncer	Papaioannu et al. (2016).
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Melanina	Cosméticos, cremes fotoprotetores	Antioxidante, quimioprotetor, antitumoral, antiviral, antimicrobiano, e anti-inflamatório	Surwase et al. (2013); Łopusiewicz, (2018).

**Tabela 1:** Aplicação de pigmentos fúngicos: Carotenoides (astaxantina,  $\beta$ -caroteno, cantaxantina, licopeno), Melanina, Antraquinonas e Azafilonas

(Conclusão)

Exemplo de Espécie	Pigmento	Aplicações	Bioatividades	Referências
<i>Monascus ruber</i>	Azafilona	Corante alimentar	Propriedades anticancerígenas, antimicrobianas, antimutagênicas, além de um potencial antiobesidade	Feng et al. (2012); He et al. (2020).
<i>Penicillium oxalicum</i>	Antraquinonas	Corante alimentar	Antioxidante	Fouillaud et al. (2016); Heo et al. (2018).

**Tabela 2.** Fungos da Antártica: Pigmentos produzidos por diferentes espécies.

(Continua)

Organismo fonte	Pigmento	Fórmula molecular	Cor	Função biológica	Referências
<i>Nadsoniella nigra</i>	Melanina	$C_{18}H_{10}N_2O_4$	Preto	Aumentar resistência em leitões e redução de morbidez e mortalidade	Chyizhanska and Beregova (2009).
<i>Exophiala xenobiotica</i>	Melanina	$C_{18}H_{10}N_2O_4$	Preto	Proteção contra radiação UV	Vasileva-Tonkova et al. (2014).
<i>Cryptococcus albidus</i> e <i>Cryptococcus laurentii</i>	$\beta$ -caroteno	$C_{40}H_5$	-	Resistência à radiação ultravioleta UV-A	Dimitrova et al. (2010).
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	$\beta$ -Caroteno, Torularondina e Toruleno	$C_{40}H_{56}$ $C_{40}H_{52}O_2$ $C_{40}H_{54}$	-	Atividade antioxidante	Dimitrova et al. (2013).

**Tabela 2.** Fungos da Antártica: Pigmentos produzidos por diferentes espécies.

					(Conclusão)
Organismo fonte	Pigmento	Fórmula molecular	Cor	Função biológica	Referências
<i>Dioszegia patagonica</i>	Carotenoide	-	Laranja	-	Trochine et al. (2017).
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Toruleno, $\gamma$ -Caroteno e Licopeno	C <sub>40</sub> H <sub>54</sub> C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>	Vermelho claro	Tolerância à radiação UV-C	Villarreal et al. (2016).
<i>Rhodotorula larynges</i>	Toruleno e Licopeno	C <sub>40</sub> H <sub>54</sub> , C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>	Vermelho	Tolerância à radiação UV-C	Villarreal et al. (2016).
<i>Dioszegia</i> sp.	OHK toruleno	C <sub>40</sub> H <sub>54</sub>	Laranja	Tolerância à radiação UV-C	Villarreal et al. (2016).
<i>Sporobolomyces metaroseus</i>	$\beta$ -Caroteno, 4ketotoruleno, $\beta$ criptoxantina e Spirilloxantina	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> , C <sub>24</sub> H <sub>60</sub> O <sub>2</sub> C <sub>40</sub> H <sub>56</sub> O	Vermelho	-	Barahona et al. (2016).
<i>Cryptococcus</i> sp.	Micosporina	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>6</sub>	Rosa	-	Barahona et al. (2016).
<i>Torrubiella</i> sp.	Micosporina	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>6</sub>	Creme	-	Barahona et al. (2016).

- não especificado.

### a. Carotenoides

Os carotenoides são os pigmentos mais amplamente distribuídos na natureza (Maoka 2020). Os carotenoides compreendem dois grupos (Figura 1): carotenos ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno, licopeno e toruleno) - compostos principalmente por hidrocarbonetos, e xantofilas (astaxantina, luteína, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina, fucoxantina e cantaxantina) moléculas compostas por carbono, hidrogênio e oxigênio (Rapoport 2021). Os carotenoides são derivados de tetraterpenos, com duplas ligações conjugadas devido à absorção de luz na faixa

de 400-500 nm, sendo, portanto, responsáveis pelas características de cor da molécula (Duarte B et al. 2021). Atualmente, os carotenoides compreendem o maior e mais diversificado grupo conhecido de pigmentos naturais, com 1204 estruturas de carotenoides compiladas de 722 organismos de origem, de acordo com o Japanese Carotenoid Database (<http://carotenoiddb.jp>).

Essas moléculas são produzidas por vários organismos, desde procariontes não fotossintéticos a plantas superiores (Duarte B et al. 2021). Em microrganismos fotossintéticos, os carotenoides absorvem a luz e transferem essa energia para a clorofila (Koyama 1991; Duarte B et al. 2021). Por outro lado, a fotoproteção dos carotenoides é alcançada prevenindo o dano foto-oxidativo reagindo preferencialmente com o oxigênio singlete oxidante (Silva TR e Silva LCF, 2021). A biossíntese de carotenoides microbianos é derivada de acetil CoA, obtido a partir de ácidos graxos através da via de  $\beta$ -oxidação nas mitocôndrias (Lovisa e Kalluri 2018).

O consumo de carotenoides pode exercer efeitos positivos na saúde, pois, como precursor da vitamina A, pode atuar na prevenção de doenças degenerativas (Toti E et al. 2019). Eles têm sido utilizados ou propostos para uma ampla gama de aplicações industriais, incluindo alimentos (para manter suas propriedades organolépticas ou prolongar a vida útil dos produtos), cosméticos e incorporações farmacêuticas (Lovisa S e Kalluri Ret, 2018).

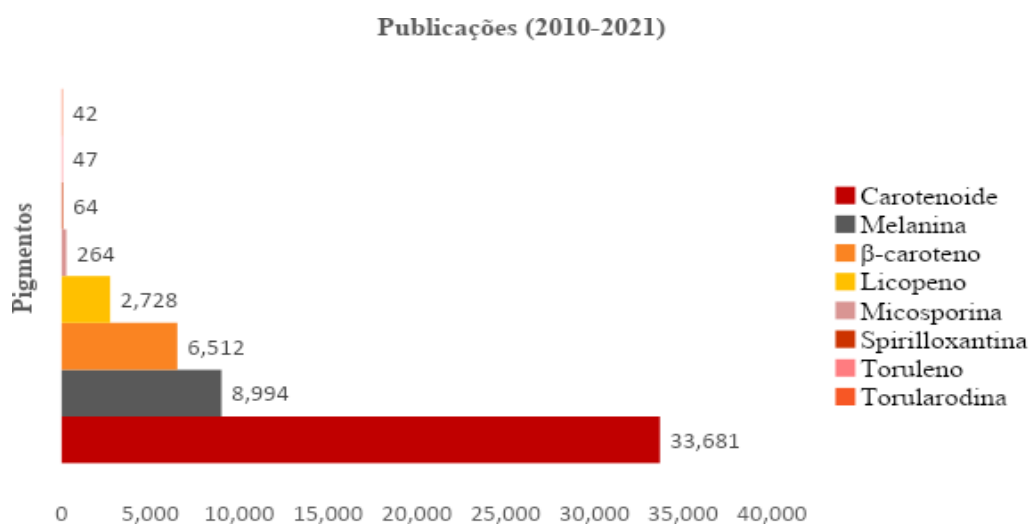
Carotenoides como astaxantina,  $\beta$ -caroteno, cantaxantina e licopeno são pigmentos relatados com aplicação como corantes alimentares (Sen et al. 2019). A astaxantina é uma atividade antioxidante maior do que o  $\beta$ -caroteno e cerca de mil vezes mais eficaz do que a vitamina E (Zhang et al. 2020). Além disso, a aplicação de carotenoides tem se mostrado eficiente para a proteção e terapia de diversas doenças crônicas, com propriedades anti-inflamatórias (Rapoport 2021). Por exemplo, a torularodina é um carotenoide com propriedades antimicrobianas e uma possível aplicação na produção de filmes para revestir implantes médicos. Este carotenoide é produzido principalmente por leveduras dos gêneros *Rhodotorula* e *Sporobolomyces*. Além disso, cepas de *Rhodotorula* merecem atenção especial por sua eficiência no processo de biossíntese e fatores econômicos (Rapoport 2021). Garcia-Cortes et al. (2021) determinaram um minuto de exposição à luz UV entre as características que compreendem a produção ótima de carotenoides para *Rhodotorula mucilaginosa* AJB01, com produção ótima e máxima de carotenoides de 118,3 e 350  $\mu\text{g}$  por grama de levedura, respectivamente. Portanto, o cultivo de microrganismos, particularmente leveduras pigmentadas e fungos filamentosos, pode estimular a demanda por corantes naturais (Usmani Z et al. 2021; Venil et al. 2020).



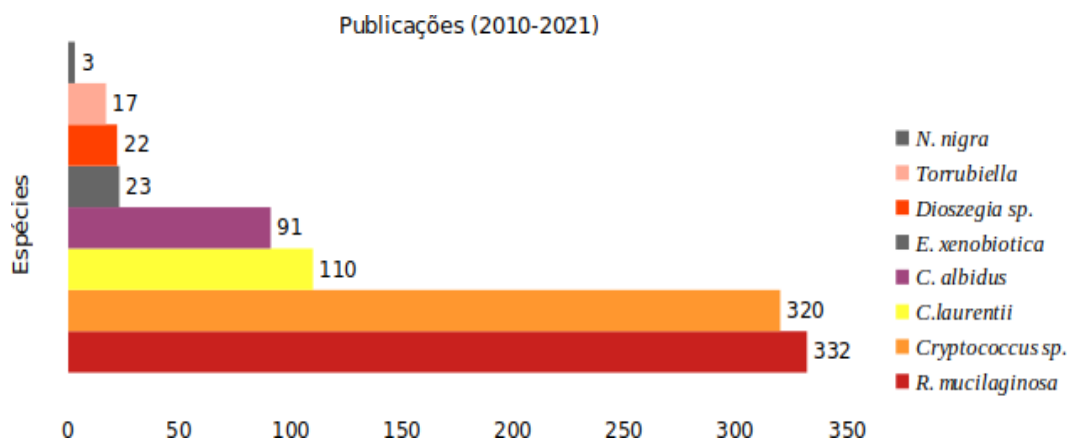
Entre os filamentosos, a espécie *Blakeslea trispora* é o carotenoide de maior importância (Metličar V et al. 2019). Outras espécies de fungos como: *Mucor circinelloides*, *Phycomyces blakesleeanus* e *Blakeslea trispora* foram relatados como produtores de  $\beta$ -caroteno (Rapoport et al. 2021). *Penicillium* sp. (GBPI\_P155), isolado de solo da região do Himalaia indiano por Pandey et al. (2018), produziu pigmento de cor laranja, o que resultou na identificação do pigmento como uma mistura de diferentes derivados de carotenoides. Na Antártica, Singh et al. (2014), destacaram a presença de pigmentos carotenoides amarelo-laranja pelo fungo *Thelebolus microsporus* isolado de solos na Ilha McLeod, no leste da Antártica.

Em nossa pesquisa, os carotenoides são os pigmentos naturais estruturalmente mais diversos descritos na literatura (Figura 2), com um total de 33.681 publicações (2010-2021, PubMed). Mais de 95 mil artigos relacionados a carotenoides foram publicados (Figuras 2 e 3), e o primeiro registro de carotenoides data de 1934 (Euler e Hellstrom 1934). Registros relacionados à produção de carotenoides fúngicos datam de 1955 (Wolf, F.T e Wolf, F.A, 1955). Nos últimos anos o número de publicações com a espécie *R. mucilaginosa* aumentou e pode ser correlacionado com diversas atividades biológicas de pigmentos carotenoides. Entre 2010 e 2021, um total de 332 trabalhos foram publicados com esta espécie (Figura 3). Espécies de *Rhodotorula* colonizam diferentes ecossistemas e crescem abundantemente em ambientes extremos (Buzzini et al. 2018). Na Antártica, estes são comumente isolados de solos terrestres, lagos e sedimentos marinhos (Vaz et al. 2011), e estão associados a macroalgas (Godinho et al. 2013).

**Figura 2.** Número de publicações de pigmentos de fungos (2010-2021, PubMed).



**Figura 3.** Número de publicações de espécies de fungos (2010-2021, PubMed).



### *b. Melaninas*

A melanina é uma classe única de pigmentos insolúveis em água com características amorfas e produção por polimerização de compostos fenólicos e indólicos (Slominski et al. 2005; Ambrico 2016). As melaninas são divididas em três grupos, de acordo com sua estrutura: (i) feomelaninas (vermelhas ou amarelas), (ii) eumelaninas (preto-marrom) e (iii) alomelaninas (preto a marrom escuro) (Sajjad et al. 2020). As melaninas podem ser produzidas endogenamente, por 1,8-di-hidroxi-naftaleno (DHN) e policetídeos, ou pela via exógena - via L-3,4-di-hidroxi-fenilalanina (L-DOPA) (Freitas 2017). Observado em todos os filos, seja com espécies constitutivamente melanizadas ou melanização em fases específicas de desenvolvimento (por exemplo, conídios, crescimento de leveduras filamentosas), como resposta às condições ambientais, ou na presença de precursores fenólicos de melanina (Bell e Wheeler 1986).

A melanina fúngica pode estar localizada na superfície celular ou liberada no espaço extracelular (Cordero et al. 2017). A posição da melanina na superfície celular varia entre as espécies de fungos. Pode ser depositado entre a membrana plasmática e a parte mais interna da parede celular (Eisenman HC et al. 2005) ou na superfície da parede celular (Hikosaka K et al. 2007). A deposição de melanina na parede celular fúngica envolve interações moleculares com estruturas de quitina (Cordero et al. 2017), e a interrupção do metabolismo da quitina resulta em um fenótipo de melanina permeável, no qual o pigmento não está mais contido na parede celular e é liberado para o meio extracelular (Baker LG et al. 2007 ;Banks IR et al. 2005).

Fungos negros são conhecidos por terem uma preferência peculiar por habitats hostis, tóxicos ou extremos (de Hoog et al. 2013). Os topos das montanhas na Antártica e no Himalaia

são cobertos por uma variedade de organismos negros especializados em sobreviver sob condições de alta irradiação solar, temperatura alta ou baixa, deficiência de nutrientes ou toxicidade por hidrocarbonetos ou metais pesados (de Hoog et al. 2013). Rosa et al. (2009) relataram que aproximadamente 80% dos fungos endofíticos presentes nas folhas da planta vascular nativa da Antártica: *Deschampsia antarctica* foram os principais produtores de melanina.

Pacelli C et al. (2020) demonstraram em seu estudo que o fungo negro antártico: *Cryomyces antarcticus*, produtor de pigmento de melanina, possui capacidade de produzir tanto 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN) quanto L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), possibilitando perspectivas interessantes para a proteção contra radiação. Outras espécies de fungos como: *Nadsoniella nigra* e *Exophiala xenobiotica* produtoras de pigmentos de melanina já foram descritas na Antártica. Essas espécies foram descritas como capazes de aumentar a resistência em leitões e reduzir a morbidade e mortalidade e proteção contra a radiação UV, respectivamente (Chyizhanska e Beregova 2009; Vasileva-Tonkova et al. 2014). Leveduras negras causam inúmeras infecções humanas e animais (Gostincar et al. 2018). Nem todos os fatores de virulência envolvidos já são conhecidos. Ainda assim, dado o potencial patogênico altamente polifilético observado na ordem dos ascomicetos, da ordem *Chaetothyriales*, fica implícito que esses organismos têm uma predisposição significativa para o crescimento em tecidos humanos que deve ter surgido durante sua evolução (Vicente et al. 2013). Tsai et al. (2020) relataram que o mutante alb1 de *Aspergillus fumigatus* exibia um fenótipo de conídios albinos e, conseqüentemente, sua perda de virulência, pois o mutante não acumulava flavolina, um produto da via DHN-melanina que determina a virulência fúngica.

As melaninas fornecem propriedades antioxidantes, quimioprotetoras, antitumorais, antivirais, antimicrobianas e anti-inflamatórias (Łopusiewicz. 2018). Ao contrário de outros pigmentos na natureza, as melaninas podem absorver todas as frequências de luz visíveis e refletir quase nenhuma. As melaninas protegem contra a radiação UV e ionizante absorvendo a energia da radiação e dissipando-a na forma de calor e eliminando ou neutralizando moléculas ionizadas (isto é, ROS) dentro da célula. Muitos patógenos microbianos usam as propriedades antioxidantes da melanina para neutralizar as defesas imunológicas do hospedeiro (Cordero et al. 2020). A melanização fúngica serve a muitos propósitos biológicos fora do hospedeiro humano, incluindo fotoproteção, proteção contra estresse por calor e frio, resistência à dessecação (Kreusch e Duarte 2021).

As melaninas têm sido estudadas em fungos de diferentes grupos, com diversos objetivos. Esse aumento de interesse se reflete no número de artigos publicados entre 2010-2021, com um total de 8.994 publicações. A publicação mais antiga sobre melanina data de 1908, e foi encontrado um total de 21.491 publicações (Figuras 2 e 3).

### *c. Azafilonas*

As azafilonas são uma classe distinta de metabólitos secundários de fungos estruturalmente diversos produzidos principalmente por espécies de *Penicillium*, *Monascus*, *Chaetomium* e *Talaromyces*. As azafilonas exibem amplas tonalidades de amarelo, laranja e vermelho (Venil et al. 2020) e um amplo espectro de aplicações clínicas, como anti-hipertensivos, antioxidantes e antimicrobianos (Hu et al. 2012). As atrorosinas, pigmentos que existem dentro das azafilonas, possuem um grupo de pigmentos vermelhos que foram recentemente isolados e caracterizados do fungo filamentoso *Talaromyces atroroseus* (Isbrandt et al. 2020). As atrorosinas são compostas dentro de um arcabouço de azafilona semelhante ao pigmento laranja *Monascus* PP-O. No entanto, as atrorosinas são únicas ao incorporar aminoácidos no sistema isócrono (Isbrandt et al. 2020). As três principais espécies de ascomicetes do gênero *Monascus* (*M. pilosus*, *M. purpureus* e *M. ruber*) são os principais produtores de pigmentos de origem policetídica que foram categorizados em três grupos com base na cor (Sweeny et al. 1981): amarelo (monascina e anaflavina), laranja (monascorubrina e rubropunctatina) e vermelho (monascorubramina e rubropuntamina).

As espécies de *Monascus* são tradicionalmente utilizadas como produtoras de corantes alimentares há quase dois mil anos (Chen et al. 2015). Os pigmentos *Monascus* também possuem uma ampla gama de funções biológicas, como propriedades anticancerígenas, antimicrobianas, antimutagênicas, além de um potencial atividade antiobesidade (Feng et al. 2012). Na biotecnologia industrial, os compostos derivados de *Monascus* são aplicados principalmente como suplementos alimentares (por exemplo, para arroz fermentado) e ingredientes funcionais para fabricação de cerveja, corante alimentar e indústrias da área da saúde (He et al. 2020). Zucconi et al. (2020) relataram a predominância de espécies de Ascomycota em solos antárticos, instigando o potencial de tal descoberta surgir de futuras investigações com fungos deste continente. No entanto, não há registros de isolamento de espécies de *Monascus* na Antártica.

#### *d. Antraquinonas*

As antraquinonas constituem um grande grupo de compostos quinóides, com cerca de 700 moléculas descritas (Fouillaud et al. 2016). Os pigmentos das antraquinonas fúngicas variam de amarelo pálido a vermelho escuro ou marrom (Fouillaud et al. 2016). Essas moléculas apresentam compostos aromáticos com um núcleo de 9,10-dioxoantraceno substituído nos dois anéis benzênicos por um OH fenólico e um grupo alifático (Friedman et al. 2020). As antraquinonas têm sido relatadas como propriedades biológicas benéficas e são aplicadas em áreas da indústria, como farmacêutica, tingimento de roupas e corantes alimentícios (Fouillaud et al. 2016).

Embora as antraquinonas geralmente estejam relacionadas à cor amarela, esses pigmentos são moléculas complexas e podem resultar em uma variedade de cores (Fouillaud et al. 2016), enquanto sua produção é facilmente afetada por parâmetros ambientais (por exemplo, luz, pH, temperatura, transferência de oxigênio, carbono e nitrogênio) (Venil et al. 2020). O pigmento de antraquinona "Arpink Red" é produzido por *Penicillium oxalicum*, aprovado e comercializado como corante alimentar (Heo et al. 2018).

Em nosso levantamento não foram encontrados registros de fungos produtores de antraquinonas no continente antártico. No entanto, espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* estão entre as mais presentes em solos antárticos (Gomes et al. 2018; Zucconi et al. 2020) e *Aspergillus* sp., *Eurotium* sp., *Emericella* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Mycosphaerella* sp. e *Microsporum* sp. são os principais produtores de antraquinonas (Gessler et al. 2013). Assim, estudos futuros neste continente devem revelar o potencial de produção de antraquinonas a partir de fungos extremófilos.

#### *6.3.3 Produção de pigmentos de fungos extremófilos*

O desenvolvimento de bioprodutos fúngicos, requer o uso de tecnologias disponíveis para torná-los comercialmente disponíveis (da Silva et al. 2022; da Silva et al. 2021). Nesse contexto, as etapas relacionadas à produção de pigmentos fúngicos vão desde o isolamento de fungos em ambientes frios, bioprospecção, técnicas moleculares, até a recuperação/purificação desses pigmentos. Em suma, a produção microbiana de pigmentos apresenta vantagens sobre a extração de vegetais ou aqueles obtidos por síntese química uma vez que não há interferência sazonal ou climática nesta produção e há também um melhor controle do processo (Dufossé et al. 2014; de Carvalho et al. 2014, Lagashetti et al. 2019).

O isolamento e bioprospecção de fungos de solos (Villareal 2016), líquens (Dimitrova 2013) e rochas (Barahona, 2016) de ambientes frios são as principais etapas para a obtenção de potenciais cepas produtoras de pigmentos. O isolamento de fungos pode promover a descoberta de espécies novas ou ainda não descritas para a produção de pigmentos (Trochine et al. 2017); ou a domesticação desses isolados para o desenvolvimento de bioprocessos (Pandey et al. 2018). Após o isolamento, a identificação molecular desses isolados é recomendada antes de iniciar qualquer bioprocessos para garantir a biossegurança (Trochine, 2017) uma vez que possíveis isolados pertencentes a gêneros fúngicos produtores de melanina (por exemplo, *Exophiala xenobiotica*) (Vasileva-Tonkova et al 2014) podem ser potencialmente patogênicos (da Silva et al. 2022). Além disso, a caracterização fisiológica de isolados fúngicos produtores de pigmentos por testes bioquímicos permite o desenho experimental de projetos de acordo com parâmetros apropriados para bioprocessos (Trochine et al. 2017; Barahona et al. 2016).

A otimização e manutenção de parâmetros nutricionais e operacionais (pH, temperatura, luz, aeração e agitação) promoveram o aumento da produtividade de pigmento fúngico (Mussagy et al. 2019), pois tais parâmetros influenciam a produção microbiana (Pandey, 2018; Singh e Gabani 2011). A disponibilidade de macro e micronutrientes influencia o metabolismo fúngico que induz a produção do pigmento. Diferentes fontes de carbono, nitrogênio e sais promoveram diferenças na produção de carotenoides por *Penicillium* sp. (Psicrófilo). A este respeito, a suplementação com maltose em caldo de dextrose de batata, aumentou a produção de carotenoides, enquanto a lactose inibiu a produção (Pandey et al. 2018). O uso de poluentes ambientais também tem sido relatado como fonte nutricional para a produção de pigmentos (Sajjad et al. 2020). O pH do meio de cultura deve ser mantido em condições adequadas (geralmente em meio ácido) (Dimitrova et al. 2010), uma vez que este parâmetro influencia no transporte de nutrientes e nas reações enzimáticas envolvidas na produção do pigmento (Sajjad et al. 2020).

O controle de temperatura é um critério importante para induzir a produção de pigmentos, principalmente quando se pretende produzi-los em baixa temperatura. A temperatura para o crescimento da biomassa fúngica não é necessariamente a mesma para a produção de pigmentos (Pandey et al. 2018). Por exemplo, a maior produção de carotenoides e biomassa fúngica foi alcançada por *Penicillium* sp. (Psicrófila) sob 15,0 °C e 25,0 °C, respectivamente, enquanto a produção foi inibida abaixo de 10,0 °C (Pandey et al. 2018). O aumento na produção de pigmentos em uma faixa de temperatura abaixo do ideal pode ser resultado de reações de adaptação que compensam a regulação negativa dos processos metabólicos em baixas temperaturas (Gmoser et al. 2017).

Abordagens moleculares podem melhorar as condições operacionais envolvidas na produção de pigmentos a partir de fungos psicrófilos, o que envolve um possível aumento de rendimento ou redução de custos (manutenção do bioprocessamento). Por exemplo, a mutação aleatória por meio de transposons promoveu a não repressão da via metabólica envolvida na síntese do pigmento (vermelho) em *Geomyces* sp. mutantes sob temperatura mesofílica (25,0 °C), diferentemente de linhagens selvagens que foram condicionadas a produzir este pigmento apenas em baixas temperaturas (Ding et al. 2022). Além disso, essas cepas mutantes apresentaram maior produtividade variando entre 40-50% em relação ao tipo selvagem (Ding et al. 2022).

Outras tecnologias foram desenvolvidas para aumentar a produtividade na produção de pigmentos. Doses de luz visível (Vis) e radiação UV quando aplicadas aos isolados *Sporobolomyces salmonicolor*, *Cryptococcus albidus* e *Cryptococcus laurentii*, aumentaram a produção de carotenoides em 15-87% em relação às cepas controle (Dimitrova, 2013).

O processamento a jusante envolvido na recuperação/purificação do pigmento depende da estrutura química da molécula. A maioria dos fungos produz pigmentos extracelulares hidrofílicos, que são adequados para aplicações industriais, pois tais pigmentos são mais facilmente recuperados (Velmurugan et al. 2010; Venil et al. 2020). Já os pigmentos intracelulares e hidrofóbicos requerem extração convencional com solventes orgânicos, o que torna o processo complexo (por questões toxicológicas e ambientais), demorado e possivelmente mais caro (Hu et al. 2012). Recomenda-se a separação, lavagem e liofilização da biomassa fúngica antes da extração com solvente (Dimitrova, 2013). A seleção do solvente apropriado para a extração do pigmento depende da polaridade da molécula (Sajjad et al. 2020). Solventes como acetona, clorofórmio (Pandey et al. 2018), ciclohexano, acetonitrila, etanol, diclorometano, piridina, hexano e água podem ser usados para extração de pigmentos fúngicos (Sajjad et al. 2020). Em suma, a engenharia de bioprocessos e suas tecnologias investigam e/ou melhoram o desempenho das etapas relacionadas ao desenvolvimento de pigmentos para garantir eficiência na produção, aplicação e segurança ecotoxicológica. No entanto, estudos realizados com fungos isolados de ambientes frios ainda são escassos na literatura.

#### 6.3.4 Toxicidade potencial de pigmentos derivados de fungos

Atualmente, o corante alimentar é o aditivo mais regulamentado na indústria, mas essas leis de segurança alimentar variam de país para país (Lehto et al. 2016). Organizações como a *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA, a *European Food Standards Authority* (EFSA) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) têm defendido dosagens seguras de corantes

sintéticos e naturais em alimentos, medicamentos e itens cosméticos (Sen T et al. 2019). Com o surgimento de problemas associados ao uso excessivo de pigmentos sintéticos, os estudos sobre a produção de pigmentos naturais se aceleraram nos últimos anos (Duarte et al. 2019).

Foi relatado que os pigmentos microbianos proporcionam maiores benefícios à saúde do que os pigmentos sintéticos (Akilandeswari et al. 2016). Além de serem usados como aditivos e intensificarem a cor do produto, também agregam características benéficas (Sen T et al. 2019; Juric et al. 2020).

Como corantes sintéticos, os pigmentos fúngicos podem apresentar níveis de toxicidade. Por exemplo, alguns pigmentos naturais de fontes fúngicas são proibidos porque podem conter micotoxinas (Juric et al. 2020), como aflatoxinas, ocratoxina e citrinina (Jeswal e Kumar 2015). Pigmentos de *Monascus* spp. têm sido amplamente utilizados em países asiáticos, em produtos como arroz vermelho fermentado e arroz de mofo vermelho (Wang J et al. 2021). O pigmento vermelho aumentou a coloração de carnes, peixes e ketchup (Hamano e Kilikian, 2006; Agboyibor et al. 2018). No entanto, a presença de citrinina, uma micotoxina potencialmente cancerígena, tornou-se um obstáculo para sua expansão no mercado Europeu ou nos EUA (Liang et al. 2018).

Cepas do gênero *Monascus*, como: *M. ruber* e *M. purpureus* produzem citrinina e sua produção é dificultada por sua via biossintética ser compartilhada com a síntese dos pigmentos (Blanc et al. 1995; Mapari et al. 2010; Heo et al. 2018). Portanto, para garantir ainda mais o valor industrial dos pigmentos fúngicos, é importante o uso de cepas não tóxicas e não patogênicas (Juric et al. 2020), pois a presença de toxinas limita sua aplicação, principalmente nas indústrias de alimentos e bebidas (Heo et al. 2018).

### 6.3.5 Mercado de pigmentos e propriedade intelectual de pigmentos de fungos antárticos

A demanda do mercado global por pigmentos naturais aumentou nos últimos anos (Sen T et al. 2019), sendo o setor que mais cresce nas indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética (Sajjad et al. 2020) com uma previsão de volume de mercado global de US\$ 387,4 milhões para antocianinas apenas em 2021 (Appelhagen et al. 2019). Um levantamento da Grand View Research, Inc. estima que o mercado mundial de cores pode chegar a US\$ 37,49 bilhões em 2025, com os corantes naturais entre os que mais crescerão.

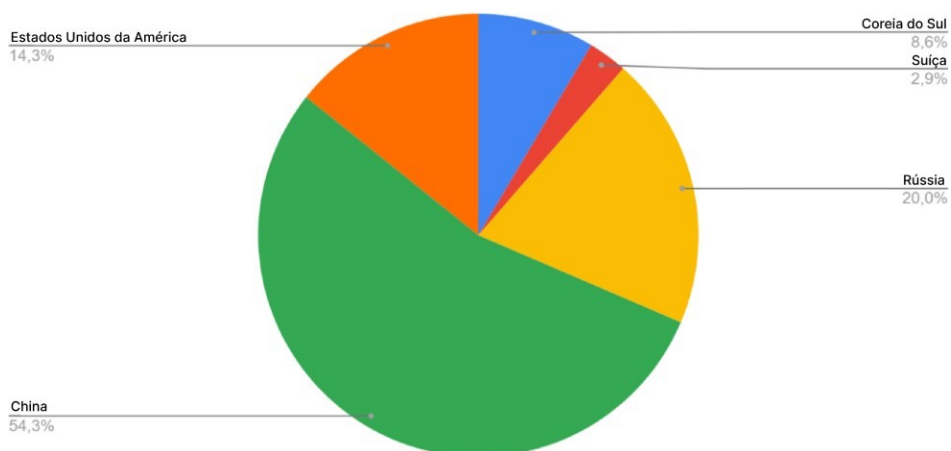
O mercado global de carotenoides foi avaliado em um aumento de R\$ 290 milhões no final de 2021 (Ambati et al. 2019), liderado pela astaxantina e seguido pelos mercados de caroteno e luteína. O licopeno e a zeaxantina também são considerados compostos carotenoides



relevantes devido às suas aplicações bem estabelecidas (Novoveská et al. 2019). Realizando uma pesquisa em bancos de dados de patentes para encontrar tendências biotecnológicas na área de pigmentos para fungos. Os números das patentes foram coletados a partir do EspacenetPatent Search ([worldwide.espacenet.com](http://worldwide.espacenet.com)) utilizando a opção de busca avançada (título ou resumo) e do INPI (Instituto Nacional de Patentes Intelectuais, <https://www.gov.br/inpi/pt-br>) em março de 2021. A análise de patentes foi limitada às patentes publicadas até 2021, considerando todos os fungos antárticos apresentados na Tabela 2. Na barra de busca do site, gênero e espécie do fungo foram digitados juntamente com a palavra "pigmento". Foram encontradas 35 patentes de pigmentos naturais derivados de fungos.

O fungo *Nadsoniella nigra*, produtor de melanina, apresentou um total de sete patentes na Federação Russa e na Organização Mundial da Propriedade Intelectual, com aplicações como antitumorais. *Cryptococcus albidus*, *Dioszegia* sp. e *R. mucilaginoso* são produtores de carotenoides com patentes registradas no Brasil, China, República da Coreia, Estados Unidos da América e na Organização Mundial da Propriedade Intelectual. A espécie *R. mucilaginoso* concedeu um total de 25 patentes registradas na China (19), Estados Unidos da América (5) e República da Coreia (2). Carotenoides de *R. mucilaginoso* são descritos em aplicações de várias áreas, incluindo alimentícias, farmacêuticas e clínicas (Gráfico 1).

**Gráfico 1.** Número de Patentes de pigmentos de fungos antárticos.



Os países com patentes registradas de fungos antárticos produtores de pigmentos de são apresentados na Tabela 3. Esta análise fornece uma avaliação destacada dos países com as implementações mais proeminentes nesta área. A China, a República da Coreia, a Federação Russa, a Suíça e os Estados Unidos da América são os principais produtores de patentes de pigmentos derivados de fungos antárticos com aplicações industriais. A Tabela 3 apresenta uma lista detalhada de patentes registradas para produtores de melanina e carotenoides.

**Tabela 3.** Patentes de pigmentos fúngicos antárticos.

Pigmento	Microrganismo	País	Código da patente	
Carotenoide	<i>Cryptococcus albidus</i>	República da Coreia	KR101964902B1 KR20180114261A	
			<i>Dioszegia</i> sp.	Suíça
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	República da Coreia		KR101718611B1
				KR20160133593A
				KR100900828B1 KR20090008965A
		China		CN104130952A CN104130952B
				CN100543128C CN101008000A
				CN104845893A CN104845893B
				CN108531408A
				CN106010990A
				CN10610990B
				CN107494929A
				CN107699502A
				CN103409328A CN103409328B
				CN108531409A
				CN107319129A
				CN104846049A
				CN108522794A
				CN106350563A
		CN109007813A		
		CN10622227A		
		CN105779551A		
	CN105734104A			
	CN105755086A			
	CN103993062A CN103993062B			
	Estados Unidos da América		EP3234105A1 EP3234105A4 EP3234105B1 ES2787225T3 SG11201704890UA US10308691B2 US2017362285A1 WO2016099401A1	
			AU2006227165A1 AU2006227165B2 BRPI0609040A2 BRPI0609040B1 CA2602183A1 CA2602183C CN101218352A CN101218352B CN103589650A EA016258B1 EA200701974A1 EP1866428A2 EP2371967A1 EP2371967B1 ES2546484T3 JP2008537878A JP2009112320A JP2013128497A JP2015226550A JP6267679B2 KR101482081B1 KR20070121679A NO20075200L UA94038C2 US2007015237A1 US2011021843A1 US2013045504A1	
EP2078092A2 US2011039299A1 US2014234928A1 US8691555B2 US9297031B2 WO2008042338A2 WO2008				
EP2294193A2 EP2294193A4 US2012149886A1 WO2009126890A2 WO2009126890A3				
BR112017022298A2 BR112017022488A2 CA2980649A1 CN107532135A CN107532141A EP3286302A1 EP3286303A1 US2018132515A1 US2018148697A1 WO2016170045A1 WO2016172282A1				
RU2116078C1				
WO9734011A1				
AU7657396A RU2069697C1				
RU2116036C1				
RU2116077C1				
RU2116037C1				
WO9734010A1 AU7657296A RU2069696C1				
RU2004127970A RU2278163C2				
Melanina	<i>Nadsoniella nigra</i>	Federação Russa	RU2116078C1	
			WO9734011A1	
			AU7657396A RU2069697C1	
			RU2116036C1	
			RU2116077C1	
			RU2116037C1	
			WO9734010A1 AU7657296A RU2069696C1	
			RU2004127970A RU2278163C2	

Alguns casos de exclusividade em relação a fungos específicos puderam ser notados, como para o produtor de melanina *N. nigra*, com todas as patentes registradas na Federação Russa. Quanto ao produtor de carotenoides *R. mucilaginoso*, 19 das 26 patentes registradas são chinesas. Isso mostra que as patentes de pigmentação natural estão concentradas em um pequeno número de países. Além disso, poucos microrganismos antárticos foram patenteados para a produção de pigmentos. Entre 12 espécies diferentes apresentadas na Tabela 2, apenas 4 possuem patentes registradas até o momento. Além disso, das 35 patentes registradas analisadas neste trabalho, 26 pertencem a *R. mucilaginoso*. Desta forma, há um interesse no aumento das pesquisas em bioprospecção de novas cepas de fungos pigmentados, além da caracterização química de pigmentos e o desenvolvimento de bioprocessos, bem como na expansão do conhecimento sobre a grande variedade de espécies de fungos antárticos produtores de pigmentos, e com isso potencialmente reduzir a lacuna biotecnológica observada entre os países.

#### 6.3.6 Conclusões e perspectivas futuras

A demanda do mercado de pigmentos naturais aumentou significativamente nas últimas décadas devido às suas vantagens em relação aos pigmentos sintéticos. Esforços devem ser feitos para produzir pigmentos naturais econômicos a partir de microrganismos extremófilos, otimizando os parâmetros de cultivo. Além disso, o melhoramento de cepas por meio da engenharia genética pode aumentar a produção de pigmentos e reduzir ou eliminar a produção de compostos tóxicos (Sajjad et al. 2020).

Portanto, considerando a tendência mundial por biotecnologia mais verde - buscando a redução do uso de pigmentos sintéticos - a exploração de pigmentos produzidos por fungos antárticos abre perspectivas para a busca de microrganismos em ambientes extremos e pode aumentar a oferta de enzimas e biomoléculas para diversas aplicações biotecnológicas.

## 7 CAPÍTULO 2: ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS DE SOLOS DE DEGELO DE GELEIRAS DA ANTÁRTICA

### 7.1 RESUMO

O continente Antártico é conhecido por ser um ambiente extremo devido às suas temperaturas negativas, pois a maior parte de sua área é coberta permanentemente por neve e gelo, substratos estes que, apesar de pouco provável, constituem um habitat natural para diferentes grupos microbianos. Os fungos têm representado um rico reservatório de propriedades químicas com diversas aplicações biotecnológicas. Deste modo, o objetivo desta investigação foi isolar e identificar fungos (filamentosos e leveduriformes) de amostras de dois transectos (face sudeste/oeste) do glaciário da geleira *Collins* na Antártica, localizada na Península Fildes, ao sudoeste da Ilha Rei George. As amostras de solo de diferentes pontos e temperaturas foram coletadas durante a OPERANTAR XXXV (Operação Antártica) no verão austral de 2017. Durante o processamento, as amostras de solo da Geleira *Collins*-face sudeste foram pesadas e colocadas em solução salina (0,85% NaCl) e peptona (0,1%) diluídas e inoculadas em YMA (*Yeast Malt Ágar*) e BDA (*Batata Dextrose Ágar*) e incubadas a 15,0 °C. Foram obtidos 52 isolados fúngicos, sendo 50 filamentosos e 2 leveduriformes. Além disso, foram reativados em caldo Sabouraud do solo da Geleira *Collins*-face oeste 12 fungos, sendo 11 filamentosos e 1 leveduriforme da coleção de 116 fungos antárticos do Laboratório de Microbiologia e Processos Biotecnológicos (LAMPB/UFSC). Assim, foram estudadas 64 linhagens de fungos (61 filamentosos e 3 leveduriformes), que foram agrupados em 10 morfogrupos de acordo com suas características macromorfológicas e identificados a nível de gênero por técnica de microcultivo. Um representante de cada morfogrupo foi selecionado para identificação molecular através do sequenciamento da região ITS. As análises filogenéticas revelaram uma diversidade taxonômica total de 8 gêneros de fungos filamentosos: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pseudogymnoascus*, *Talaromyces* e *Thelebolus*. Verificou-se uma predominância dos gêneros *Pseudogymnoascus*, seguido por *Penicillium*. Dentre as 10 espécies selecionadas para sequenciamento que apresentaram similaridade, 3 espécies foram comuns ao ambiente antártico estudado e 2 espécies estão sendo descritas pela primeira vez neste continente.

**Palavras-chave:** Antártica; *Collins*; fungos; solo.

## 7.2 INTRODUÇÃO

O continente Antártico constitui cerca de 10% da área continental do planeta, com aproximadamente 14 milhões de km<sup>2</sup> (De Mattos, 2016). Por muitos anos, a Antártica permaneceu um continente inexplorado. Em 1961, com a implementação do Sistema do Tratado da Antártica (ATS), o continente foi estabelecido como uma reserva natural, dedicada à paz e à ciência (Correa, T et al. 2020).

Na Antártica verifica-se condições ambientais como alta incidência de radiação ultravioleta, fortes ventos, alta salinidade, baixas temperaturas e uma constante dinâmica de congelamento e degelo (Fell et al. 2006; Gonçalves et al. 2012) circunstâncias essas que influenciam e exercem pressões seletivas na comunidade biológica na região (Gocheva et al. 2006; Foutain et al. 2016).

Os solos antárticos podem ser classificados como um sistema complexo determinado por diversas interações entre os seus componentes biológicos, químicos e físicos (Buscot, 2005). No interior do continente Antártico e península são consideradas as áreas mais secas e frias, e portanto, menos favoráveis à formação dos solos, enquanto a Antártica Marítima é mais úmida e, por isso, mais oportuna a colonização biológica (Simas et al. 2008).

Apesar das condições adversas presentes na Antártica, verifica-se diversas formas de vida em seus diferentes habitats (Rosa et al. 2019). Ao longo dos anos, os fungos Antárticos vêm sendo descritos em diferentes substratos e podem ser a biota mais diversificada (Bridge & Spooner 2012). Entre os gêneros mais encontrados nos solos antárticos estão *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Mortierella*, *Antarctomyces*, *Pseudogymnoascus*, *Rodothorula* e *Cryptococcus* (De Menezes et al. 2017; Gomes et al. 2018).

Atualmente, apesar do extremo abiótico, o número de estudos sobre a diversidade/bioprospecção de microrganismos neste continente tem aumentado ao longo dos anos (Correa, T et al. 2020). Dentre os microrganismos, os fungos antárticos apresentam-se como promissoras fontes de pigmentos com diferentes atividades biológicas (Rosa et al., 2019) como ação antimicrobiana (Shi et al. 2007), antifúngica (Li et al. 2008), antibacteriana (Li et al. 2008, 2018), citotóxica (Li et al. 2012) e antiviral (Wang et al. 2016). Em suma, essas moléculas bioativas produzidas pelos fungos representam um rico reservatório químico para a descoberta de novas substâncias como antioxidantes, antibióticos, anticancerígenos, imunomoduladores e antiparasitários (Santiago et al. 2012).

Diante disso, o objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar fungos que prosperam no solo da Geleira *Collins* da Antártica em dois transectos (sudeste/oeste). Fungos de ambientes frios são frequentemente relatados como produtores de pigmentos capazes de produzir compostos bioativos. O estudo da diversidade da comunidade fúngica cultivável permite a descoberta de novas moléculas bioativas por linhagens não descritas que possuem vias metabólicas e bioquímicas desconhecidas.

## 7.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 7.3.1 Área de coleta

As coletas das amostras de solo foram realizadas durante a XXXV Operação Antártica (OPERANTAR), no verão austral de 2017 na Geleira *Collins*. As amostras foram cedidas pelo Professor Dr. Rubens Tadeu Delgado Duarte. As amostras foram transferidas em sacos de coleta e mantidos em congelamento até a etapa de processamento e isolamento dos microrganismos no departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UFSC.

A Geleira *Collins* localiza-se na Península Fildes, ao sudoeste da Ilha Rei George (Figura 4). Os pontos de coleta da amostragem formam dois transectos em frente a duas diferentes faces do glaciár, sendo elas: a Face Sudeste (Transecto 1), e a Face Oeste (Transecto 2), conforme apresentado na Figura 5.

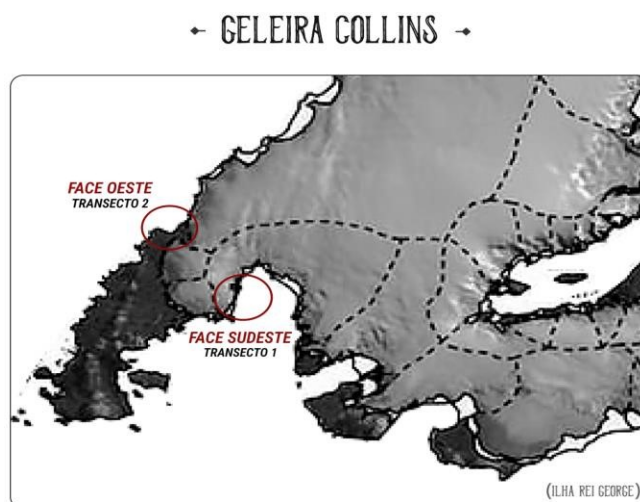
**Figura 4.** Visão esquemática da Ilha Rei George, com ênfase na localização da Península Fildes.



(Imagem: adaptado, Simões, J. 2004).



**Figura 5.** Visão esquemática da Geleira *Collins*, com ênfase para a localização das duas faces (Sudeste e Oeste).



(Imagem: adaptado, Simões, J. 2004).

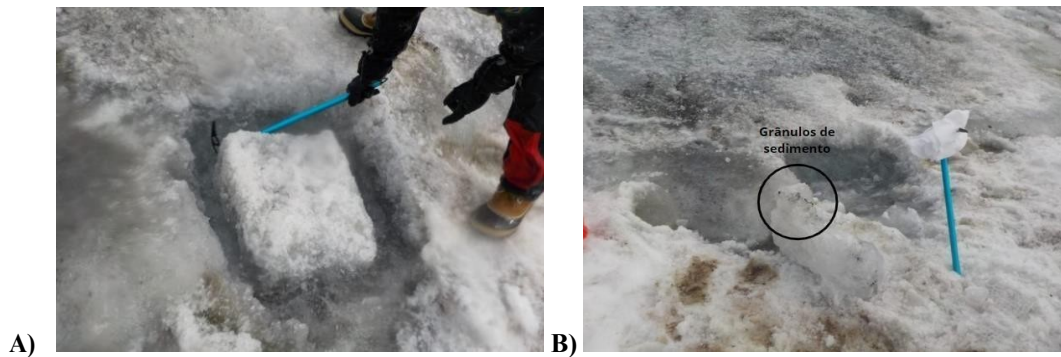
### 7.3.2 Transecto 1: Geleira Collins - Face Sudeste

Estudou-se as amostras coletadas em um transecto de 50 metros, em que 3 pontos foram analisados (Tabela 4). Na face Sudeste, o local de coleta estava coberto por gelo glacial (Figura 6A). Havia nódulos de sedimento presentes no gelo (Figura 6B), o que evidencia o fato do ponto ser a interface geleira-solo, pois os nódulos possivelmente são resquícios de um processo de movimento do glaciar sobre o solo.

**Tabela 4.** Pontos de coleta das amostras de solo da Geleira *Collins* (Face Sudeste) e temperatura local durante a OPERANTAR XXXV.

Ponto de coleta no transecto	Coordenada geográfica	Temperatura no local de coleta (°C)
0m	62°10'21.0"S58°51'21.8"W	3,15
25 m	62°10'21.2"S58°51'20.1"W	6,0
50 m	62°10'21.3"S58°51'18.4"W	6,3

**Figura 6.** Região de coleta do solo da geleira *Collins* (Sudeste). **A)** Escavação do bloco de gelo glacial a ser removido; **B)** Foto do bloco já desprendido, evidenciando a presença de grânulos de sedimento.



Fonte: Renato Romano (2017)

### 7.3.3 Isolamento e preservação dos fungos

Foram pesados 10g de cada amostra de solo dos pontos 0 m, 25 m e 50 m da Geleira *Collins*-face sudeste (Tabela 4), e diluído em frascos do tipo Erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina (0,85% NaCl) e peptona (0,1%). A solução foi agitada a 200 rpm a 15,0 °C por 20 min (Figura 7). Em seguida, foram realizadas as diluições seriadas até  $10^{-4}$  e inoculado 100  $\mu$ L da amostra em Yeast Malt Agar (YMA) (MA et al., 2000) e Batata Dextrose Ágar (BDA) com auxílio de uma alça de Drigalski. Ambos os meios foram suplementados com cloranfenicol (100  $\mu$ g/mL) e as placas foram incubadas a temperatura de 15,0 °C até verificar crescimento fúngico abundante (até 60 dias).

**Figura 7.** Amostras de solo em solução salina contendo peptona (0,1%) após agitação.



Fonte: Autor (2022)

Colônias com aspecto filamentoso e leveduriforme foram purificadas através de subcultivos sucessivos em meio BDA. Os isolados obtidos foram preservados em criotubos contendo glicerol (87%) e peptona (1%) na proporção 1:2 e armazenados em ultrafreezer (-80,0 °C) que encontra-se no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) para coleção de linhagens de fungos.

### 7.3.4 Reativação de fungos da Coleção de Linhagens da UFSC

Para um maior número de isolados para as etapas seguintes de produção dos pigmentos (Capítulo III), e para ter uma comparação com os isolados da Geleira *Collins* (face sudeste e oeste), foram reativados 12 fungos (11 filamentosos e 1 leveduriforme) previamente isolados em 2019 da Geleira em estudo, os quais são pertencentes a coleção de 106 linhagens de fungos antárticos do Laboratório (LAMPB/UFSC). As linhagens foram reativadas em Caldo Sabouraud a 150 rpm durante 7 dias a temperatura de 15,0 °C. A pureza dos isolados foi verificada por características morfológicas, e quando necessário foram identificados (Figura 8).

**Figura 8.** Reativação das linhagens fúngicas isoladas de solo da Geleira *Collins*-face oeste em caldo Sabouraud a 150 rpm durante 7 dias a temperatura de 15,0 °C.



Fonte: Autor (2022)

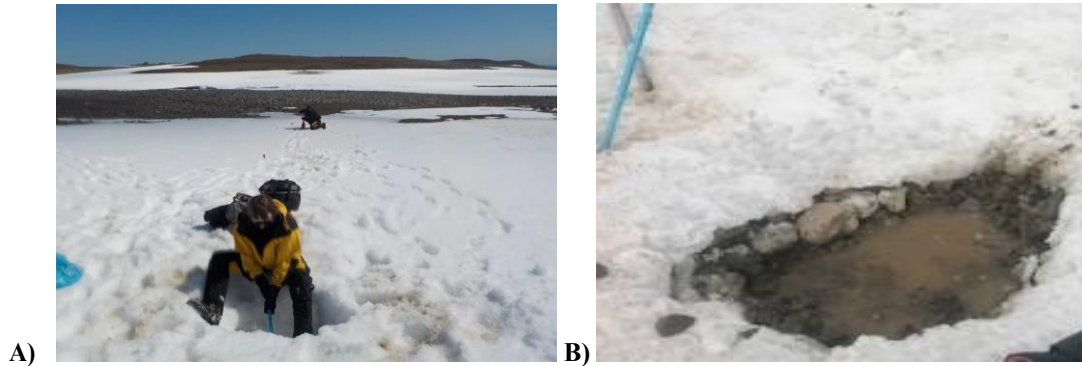
### 7.3.5 Transecto 2: Geleira Collins - face oeste

As amostras reativadas da face oeste da Geleira foram coletadas em um transecto de 800 metros composto por 6 pontos, sendo 1 ponto analisado neste estudo (Tabela 5). O solo do ponto estava totalmente exposto, a camada de gelo estava muito úmida devido ao grande aporte de água oriunda do degelo do glaciár (Figura 9).

**Tabela 5.** Ponto de coleta e temperatura local da amostra de solo da Geleira *Collins* (Face Oeste) durante a OPERANTAR XXXV.

Ponto de coleta no transecto	Coordenada geográfica	Temperatura no local de coleta (°C)
0m	62°09'49.3"S58°55'22.3"W	-0,45

**Figura 9.** Região de coleta do solo da geleira *Collins* (Oeste). **A.** Abertura para acessar o solo com auxílio de uma piqueta; **B.** Aspecto da amostra após o derretimento da camada de gelo.



**Fonte:** Carolina Fernandes, Giulia Scussel e Renato Romano (2017)

### 7.3.6 Identificação Morfológica

Para agrupamento em morfogrupos, todos os isolados foram identificados morfológicamente através de características macromorfológicas por meio de plaqueamento pontual em meio BDA por 7 dias a 15,0 °C. A identificação microscópica foi realizada por meio de técnica de microcultivo de acordo com Gomes et al. (2010) que consiste em uma placa de Petri (30 mL), contendo papel filtro, onde foi colocada uma lâmina e depositados dois blocos de meio cultura BDA. Em seguida, inoculou-se as laterais dos blocos com hifas fúngicas. Após isso, colocou-se uma lamínula estéril sobre os blocos e umedeceu-se o papel filtro com água destilada. As placas contendo o microcultivo foram incubadas por 7 e 14 dias a 25,0 °C. Após o crescimento fúngico nas lamínulas contendo as estruturas de interesse, elas foram retiradas e depositadas em uma nova lâmina com lactofenol. Depois de seladas, as lâminas foram observadas ao microscópio óptico em aumento de 400X para análise das estruturas reprodutivas.

A confirmação de fungos leveduriformes foi realizada através a coloração de Gram (Tripathi, N. & Sapra, A. 2022). Utilizou-se 10 uL de solução salina em lâmina de vidro e realizado o esfregaço com uma colônia pura do microrganismo de interesse com movimentos de rotação, para se obter um esfregaço de forma oval, fino e uniforme. Posteriormente, a lâmina com o esfregaço foi fixada utilizando o bico de Bunsen. Em seguida, os seguintes reagentes foram adicionados até cobrir a superfície do esfregaço: 1. Solução de cristal violeta por 1 min após isso, lavado com água corrente. 2. Solução de lugol (mordente) durante 1 min e lavado novamente com água. 3. Cobriu-se a superfície do esfregaço com algumas gotas do descorante álcool-acetona até que não houvesse mais desprendimento de cor violeta. 4. Acrescentou fucsina de gram por 30 segundos e lavou-se com água corrente. Após isso, utilizou-se uma gota de óleo de imersão sobre a lâmina e observou-se em objetiva de imersão (100X) com o intuito

da distinção de leveduras e bactérias, principalmente pelo tamanho celular e presença de cicatriz de brotamento. A propriedade de reter o Gram é característico das bactérias e das leveduras (Bier, 1994).

### 7.3.7 Extração do DNA total

Para uma identificação molecular, foram utilizados pelo menos um isolado de cada morfogrupo. A extração de DNA total foi realizada de acordo com metodologia descrita por Rosa et al. (2009), com modificações. Os fungos filamentosos foram crescidos por no máximo 20 dias em meio Ágar Sabouraud a 15,0 °C e fragmentos de micélio foram retirados e colocados em tubos de 1,5 mL acrescidos de 400 µL de tampão de lise (Tris-HCl – trishidroximetilaminometano 0,05 10 M, EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS – sódio dodecil sulfato 1%) e mantido a -20,0 °C, por no mínimo 30 min. Em cada tubo foram adicionadas três esferas de aço inox (3,175 mm de diâmetro) e posteriormente o material dos tubos foi submetido à trituração no equipamento Bullet Blender TM 24 (Uniscience). Em seguida, foram adicionados 162 µL de CTAB (Tris 2M, NaCl 8,2%, EDTA 2M e CTAB 0,2%), seguido de homogeneização em vórtex e incubação por 40 min-1h a 65,0 °C. Sequencialmente, foram acrescentados 570 µL da mistura clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Após homogeneização, o tubo foi incubado por 30 min em banho de gelo. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 min e o líquido sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL e acrescentado 10% do volume de uma solução de acetato de sódio 3M (pH 5,2). Após homogeneização por inversão, os tubos foram incubados por 30 min em banho de gelo e centrifugados a 14.800 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e, em seguida, adicionado 50% do volume de isopropanol (Merck), sendo a suspensão gentilmente homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 40 min. Em seguida, foram adicionados 200 µL de etanol 70% (Merck) gelado, sendo os tubos homogeneizados e submetidos à centrifugação a 14.800 rpm 25,0 °C por 5 min. O sobrenadante foi descartado novamente por inversão. Foi realizada mais uma lavagem com 200 µL de etanol 70% (Merck) gelado e, por último, mais uma centrifugação 14.800 rpm por 5 min, seguido do descarte do sobrenadante. A amostra foi então seca, por aproximadamente 60 min a 37,0 °C e deixada *overnight* em temperatura ambiente e então ressuspensa em 50 µL de Tris-EDTA (Tris-HCl 30 0,01 M e EDTA 0,001 M) e incubada a 30,0 °C por 60 min, para hidratação do DNA e armazenadas a -20,0 °C até sua utilização. Todos os produtos obtidos foram quantificados em espectrofotômetro a 260/280 nm (NanoDrop ND 1000 Thechnologies). Esta etapa foi realizada no Centro de Ciências Agrárias (CCA/UFSC).

### 7.3.8 Amplificação da região ITS

O DNA genômico dos isolados fúngicos foi submetido à reação de PCR para amplificação da região rDNA através dos iniciadores ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al. 1990). A reação foi realizada conforme descrito em Singha et al. (2016). A reação da PCR para o volume final de 25 µL consistiu em 0,75µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0,20 µL de dNTPs 100 mM, 0,25 µL de primer 27F a 20 µM, 0,25 µL de primer 1401R a 20 µM, 0,10 µL de Taq Polimerase 5 U. µL<sup>-1</sup> e 1 µL de DNA extraído. As condições de amplificação foram seguidas conforme Sakamoto (2001): *hotstart* de 95,0 °C por 10 min, seguido por 30 ciclos de 30s de desnaturação a 94,0 °C, 30s de anelamento a 55,0 °C e 30s de extensão a 72,0 °C. A extensão final foi de 72,0 °C por 10 min. Um controle positivo contendo DNA extraído de *Rhodotorula* (25 ng) e um controle negativo (água MiliQ) também foram preparados. As amplificações foram realizadas no termociclador Eppendorf 950000040 Mastercycler® personalThermal Cycler. Os produtos da PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose (1%).

### 7.3.9 Purificação das amostras

As amostras amplificadas foram submetidas a uma purificação conforme Green e Sambrook (2017). Foram adicionados ao produto de PCR 11,75 µL de EDTA 125 mM e 141 µL de etanol absoluto (Merck). Os tubos foram homogeneizados por inversão e deixados à temperatura ambiente, por 30 min. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rpm, durante 20 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com a adição 35 de 120 µL de etanol 70% gelado, sendo posteriormente homogeneizado por inversão. Após centrifugação a 14.000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado novamente e os tubos foram deixados abertos para evaporação de todo o excesso de etanol. Após isso, foram adicionados 10 µL de água de injeção esterilizada e os tubos incubados em banho maria a 37,0 °C por 30 min. As amostras purificadas foram enviadas para a empresa de biotecnologia MacroGen (*Online Sequencing Order System*) da Coreia do Sul para o sequenciamento de DNA pelo método de Sanger utilizando os primers ITS-1 e ITS-4.

### 7.3.10 Análise computacional das sequências

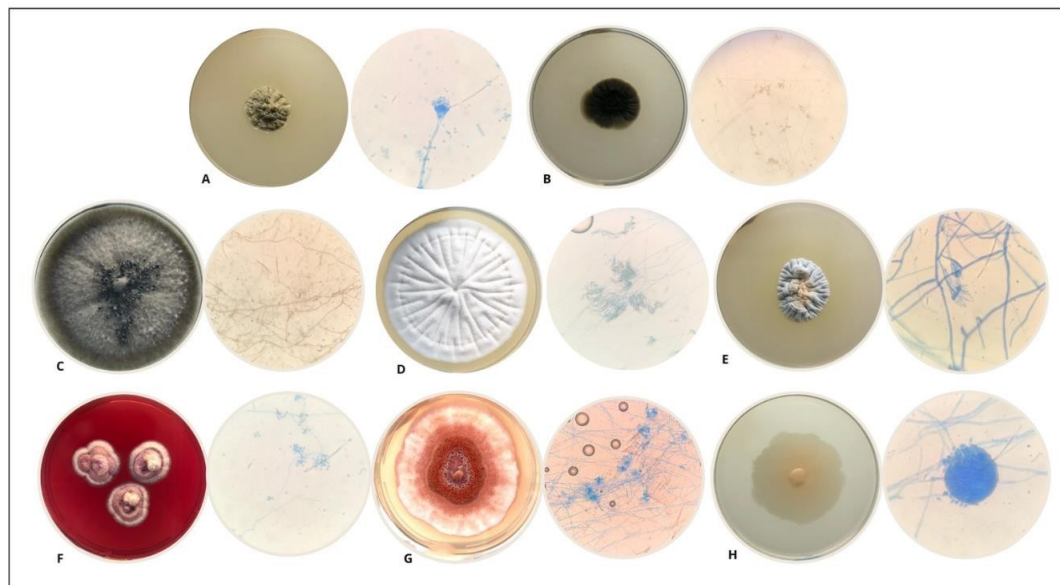
As sequências de DNA obtidas da região ITS foram comparadas com as sequências de espécies tipo ou referência de fungos depositadas no GenBank utilizando o programa BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Os fungos que apresentaram sequências com valor de E=0 e identidade >97% em comparação às sequências de fungos depositadas no Genbank foram considerados como pertencentes à mesma espécie. As árvores filogenéticas foram construídas com bootstrap de 1000 repetições utilizando-se o software MEGA (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) v6., com aplicação do método de *maximum-likelihood* (máxima verossimilhança) e modelo de distância de Tamura-Nei. Esse modelo assume uma análise complexa e específica para estimar distâncias evolutivas (Tamura e Nei 1993).

## 7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.4.1 Caracterização taxonômica

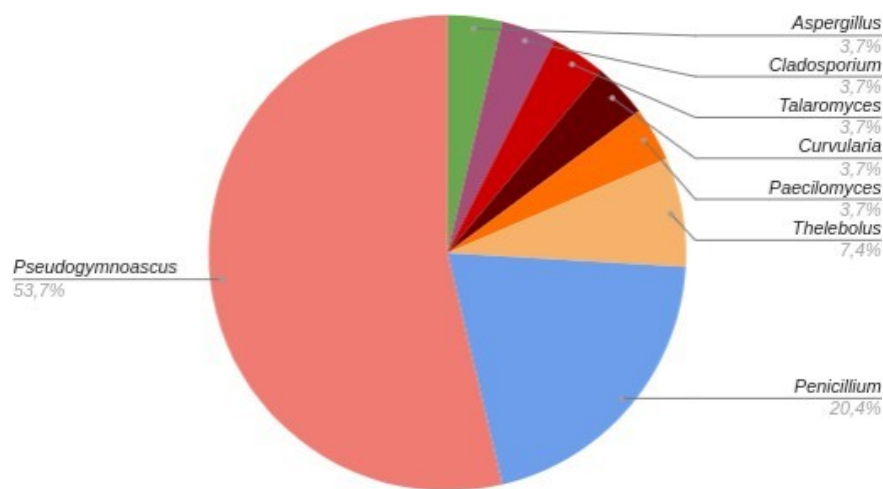
No presente estudo, foram analisados 64 fungos (61 filamentosos e 3 leveduriformes). Obteve-se 52 fungos isolados de solo da Geleira *Collins*-face sudeste e 12 reativados da coleção de fungos antárticos do laboratório-LAMPB provenientes de solo da Geleira *Collins*-face oeste, totalizando 8 gêneros identificados por macromorfologia (Figura 10, Gráfico 2). Posteriormente, os isolados fúngicos foram fotografados (frente e verso) e agrupados em 10 morfogrups de acordo com as seguintes características: cor da colônia, aspecto da borda, textura da superfície e produção de pigmento extracelular.

**Figura 10.** Macro e micromorfologia dos gêneros fúngicos isolados em BDA (14 dias a 28 °C). **A.** *Aspergillus*; **B.** *Cladosporium*; **C.** *Curvularia*; **D.** *Paecilomyces*; **E.** *Penicillium*; **F.** *Pseudogymnoascus*; **G.** *Talaromyces*; **H.** *Thelebolus*.



Fonte: Autor (2022)

**Gráfico 2.** Porcentagem de espécies por gênero isolados da Geleira Collins.



Fonte: Autor (2022)

As análises morfológicas permitiram inferir o gênero de 85% dos isolados (Tabela 6). Posteriormente, foi selecionado um isolado de cada grupo para análise de filogenia molecular através do sequenciamento da região ITS.



**Tabela 6.** Identificação dos isolados de sedimento do solo de degelo da Geleira-*Collins* com base em micromorfologia e marcador molecular ITS.

(Continua)

<b>Isolado</b>	<b>Táxon</b>	<b>Método de identificação</b>
SC01.P1	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia
SC02.P1	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia
SC03.P1	<i>Penicillium</i> sp.	Morfologia
SC04.P1	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia
SC05.P1	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia
SCUV02.P1	<i>Penicillium</i> sp.	Morfologia e Molecular
SCUV03.P1	<i>Paecilomyces</i> sp.	Morfologia
SCUV04.P1	<i>Paecilomyces</i> sp.	Morfologia
SCUV06.P1	<i>Penicillium</i> sp.	Morfologia
SCUV07.P1	<i>Curvularia</i> sp.	Morfologia e Molecular
SC04.P2	<i>Penicillium</i> sp.	Morfologia
SC05.P2	Levedura	Morfologia
SC06.P2	<i>Penicillium</i> sp.	Morfologia
SC07.P2	<i>Penicillium</i> sp.	Morfologia
SC08.P2	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia
SC09.P2	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia
SC01.P3	<i>Paecilomyces</i> sp.	Morfologia
SC02.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia
SC03.P3	NI	Morfologia
SC04.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia e Molecular
SC05.P3	<i>Talaromyces</i> sp.	Morfologia
SC07.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia
SC09.P3	NI	Morfologia
SC10.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia
SC11.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia
SC12.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia e Molecular
SC14.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia e Molecular
SC15.P3	NI	Morfologia
SC16.P3	<i>Thelebolus</i> sp.	Morfologia
SC17.P3	<i>Thelebolus</i> sp.	Morfologia
SC18.P3	NI	Morfologia
SC19.P3	<i>Penicillium</i> sp.	Morfologia
SC20.P3	<i>Curvularia</i> sp.	Morfologia
SC21.P3	<i>Aspergillus</i> sp.	Morfologia
SC23.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia
SC24.P3	NI	Morfologia
SC25.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia e Molecular
SC26.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia
SC27.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia
SC28.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia
SC29.P3	<i>Thelebolus</i> sp.	Morfologia e Molecular

**Tabela 6.** Identificação dos isolados de sedimento do solo de degelo da Geleira-*Collins* com base em micromorfologia e marcador molecular ITS.

(Conclusão)		
<b>Isolado</b>	<b>Táxon</b>	<b>Método de identificação</b>
SC31.P3	<i>Cladosporium</i> sp.	Morfologia
SC32.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia e Molecular
SC33.P3	NI	Morfologia
SC34.P3	<i>Talaromyces</i> sp.	Morfologia e Molecular
SC35.P3	Levedura	Morfologia
ACF092	Levedura	Morfologia
ACF093	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia e Molecular
NU04	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia
NU07	<i>Cladosporium</i> sp.	Morfologia
NU09	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia
NU11	<i>Thelebolus</i> sp.	Morfologia
NU16	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia
NU21	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia
NU22	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia
NU23	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia
NU25	NI	Morfologia
NU26	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Morfologia

NI: Não identificado.

Um total de 52 microrganismos foram isolados de 3 pontos da coleta Geleira *Collins* (face sudeste), dos quais 50 são filamentosos e 2 leveduriformes, com maior número de isolados (32) nas amostras P3, local de coleta com temperatura mais elevada (6,3 °C) (Tabela 7).

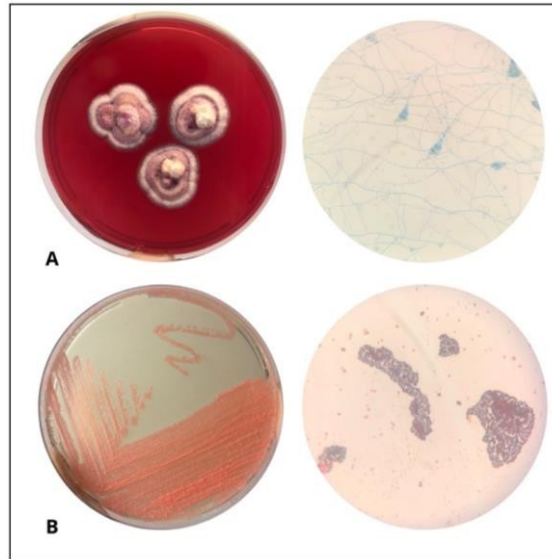
**Tabela 7.** Total de microrganismos isolados (62) das amostras de solo coletado da geleira *Collins* (sudeste).

<b>Amostra</b>	<b>Leveduras</b>	<b>Fungos Filamentosos</b>	<b>Total por amostra</b>
P1 (0m)	0	11	11
P2 (25m)	0	9	9
P3 (50m)	2	30	32
Total de microrganismos	2	50	52

Um total de 12 microrganismos foram reativados da Geleira *Collins* (face oeste), da coleção de 106 isolados de fungos antárticos do Laboratório de Microbiologia e Processos Biotecnológicos-LAMPB. Desses isolados reativados, 11 são filamentosos e 1 leveduriforme (Tabela 8), dos quais apenas 2 (1 filamentoso e 1 leveduriforme) apresentaram produção de pigmentos em meio extracelular (Figura 11).

**Tabela 8.** Total de microrganismos reativados (12) das amostras de solo coletado da Geleira *Collins* (oeste).

Amostra	Leveduras	Fungos Filamentosos	Total por amostra
P1 (0m)	1	11	12
Total de microrganismos	1	11	12

**Figura 11.** Fungos reativados do ponto P1 (0m). **A.** *Pseudogymnoascus* sp. (ACF093); **B.** ACL092.

Fonte: Autor (2022)

#### 7.4.2 Análises filogenéticas

Métodos moleculares para descrever comunidades fúngicas têm usado a amplificação por PCR e a comparação de genes nucleares, como ITS (Martin & Rygiewicz, 2005). Foi realizada uma comparação com as sequências geradas a partir de 10 isolados selecionados da Geleira *Collins*-sudeste/oeste com as de tipo e referências de coleção de cultura do Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (CBS) e/ou de isolados do continente Antártico descritos na literatura que estão disponibilizadas no banco de dados do Genbank do NCBI usando BLASTn. *Mucor circinelloides* foi utilizado como grupo externo (*outgroup*) para a análise concatenada com o marcador ITS.

O alinhamento foi feito no *software* MEGA v.6.0, usando o algoritmo ClustalW e ajustado manualmente conforme necessário. As reconstruções filogenéticas foram feitas usando as abordagens de Máxima Verossimilhança (ML). As sequências nucleotídicas utilizadas neste estudo que apresentaram similaridades com as sequências dos nossos isolados para comparação foram obtidas do GenBank e listados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Fungos obtidos de solo da Geleira-Collins na Antártica e identificados por comparação de sequências com a correspondência no BLASTn e banco de dados NCBI *GenBank database*.

Local de coleta da Geleira Collins	*Código do isolado	Espécie ou grupo taxonômico	Número de Acesso GenBank	Identidade (%)
Sudeste	SCUV07.P1	<i>Curvularia affinis</i>	KU232924.1	97
Sudeste	SCUV02.P1	<i>Penicillium chrysogenum</i>	NR 077145.1	99
Sudeste	SC34.P3	<i>Talaromyces cnidii</i>	LT558960.1	99
Sudeste	SC29.P3	<i>Thelebolus</i> sp.	NR 138367.1	92
Oeste	ACF093	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	MT367223.1	99
Sudeste	SC32.P3	<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	MH128254.1	97
Sudeste	SC12.P3	<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	MW113261.1	99
Sudeste	SC14.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	MT367265.1	97
Sudeste	SC25.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	KY623481.1	96
Sudeste	SC04.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	MH790447.1	97

\*código dos isolados= Código da Coleção de isolados da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. NR= Não reportado

O processo de identificação das linhagens corroborou com os dados da identificação morfológica, obtendo-se isolados dos gêneros *Curvularia* (1), *Penicillium* (1), *Thelebolus* (1), *Talaromyces* (1) e *Pseudogymnoascus* (6).

#### 7.4.3 *Curvularia*

Os fungos demáceos são um grupo heterogêneo de fungos com colônias escuras e elementos fúngicos pigmentados (Yew et al. 2014). O gênero tem atraído a atenção pela sua habilidade em produzir alguns metabólitos secundários com valor farmacêutico, como por exemplo o pigmento melanina (Zhang et al. 2012). Apresenta-se como espécies saprófitas, endofíticas e patogênicas em plantas e oportunistas de humanos (Marin-Felix et al. 2017). Em humanos, podem causar infecções superficiais e profundas que afetam principalmente o trato respiratório, chegando a causar uma lesão rara conhecida como feohifomicose cerebral (de Hoog et al. 2000).

As espécies de *Curvularia* são difíceis de identificar com base apenas na morfologia, pois *Curvularia* é morfologicamente semelhante ao gênero *Bipolaris*, com diferença apenas na

curvatura e comprimento dos conídios (Marin-Felix et al. 2020). Em seu estudo, Tan et al. (2014), demonstraram que algumas espécies colocadas em *Bipolaris* pertenciam à *Curvularia* e vice-versa. Diante disso, Marin-Felix et al. (2017) destacam que para obter uma identificação precisa das espécies do gênero são utilizados a região do espaçador transcrito interno (ITS), e o gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GPD) e fator de alongamento de tradução 1-a (TEF1), embora as regiões ITS sozinhas possam resolver a maioria dos táxons impostos em *Curvularia* (Manamgoda et al. 2015).

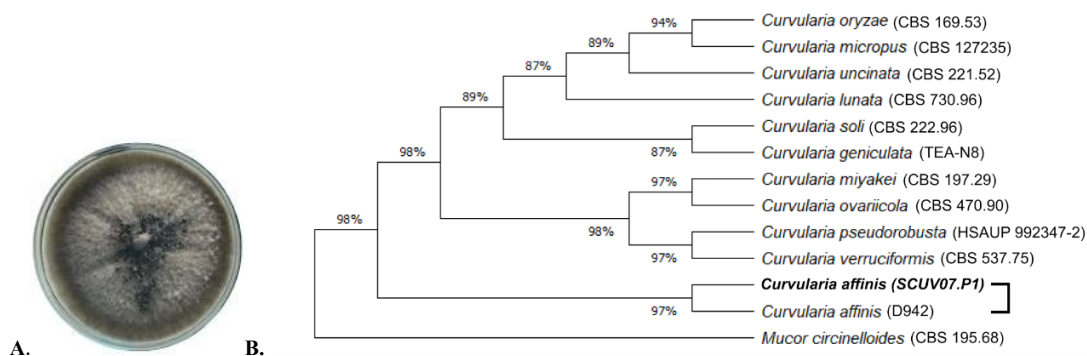
No estudo, a identificação foi realizada usando características morfológicas, bem como o sequenciamento das regiões ITS do gene do DNA ribossômico. A cepa *Curvularia* sp. SCUUV07.P1, previamente isolada do solo de degelo da Geleira *Collins*-sudeste, foi identificada quanto à morfologia e apresentou esporos curvos melanizados, com septos característicos do gênero *curvularia*. Este dado foi confirmado com o sequenciamento da região ITS. As regiões ITS foram submetidos ao GenBank (número de acesso OP603795). As sequências das cepas de referência foram coletadas do banco de dados Genbank, e o resultado da identificação foi resumido na Tabela 10.

**Tabela 10.** Isolado de *Curvularia* sp. SCUUV07.P1 (em negrito) da Geleira *Collins* e sequências utilizadas na análise filogenética.

Gene	Cepa	Espécie ou grupo taxonômico	Número de acesso do Genbank	Número de pb das sequências
ITS	<b>SCUV07.P1</b>	<b><i>Curvularia</i> sp.</b>	<b>OP603795</b>	<b>568</b>
ITS	D942	<i>Curvularia affinis</i>	KU232924.1	570
ITS	CBS 169.53	<i>Curvularia oryzae</i>	NR 138221.1	682
ITS	CBS 127235	<i>Curvularia micropus</i>	NR 157424.1	658
ITS	CBS 221.52	<i>Curvularia uncinata</i>	NR 156234.1	620
ITS	CBS 730.96	<i>Curvularia luneta</i>	NR 138223.1	599
ITS	CBS 222.96	<i>Curvularia soli</i>	NR 152503.1	602
ITS	TEA-N8	<i>Curvularia geniculata</i>	OP037100.1	506
ITS	CBS 197.29	<i>Curvularia miyakei</i>	NR 147463.1	600
ITS	CBS 470.90	<i>Curvularia ovariicola</i>	NR 159856.1	596
ITS	HSAUP 992347-2	<i>Curvularia pseudorobusta</i>	NR 130653.1	576
ITS	CBS 537.75	<i>Curvularia verruciformis</i>	HG779026.1	737
ITS	CBS 195.68	<i>Mucor circinelloides</i>	NR 126116.1	639

Para a construção da árvore filogenética, utilizou-se espécies do gênero *Curvularia* com sequências de tipo ou de referência depositadas no Genbank (Tabela 10). Obteve-se uma sequência de 570 bp que se agrupou com a espécie *Curvularia affinis* (cepa: D942) com 97% de homologia (Figura 12). A sequência ITS mostrou apenas 17 diferenças de nucleotídeos.

**Figura 12.** A. Morfologia colonial da linhagem *Curvularia* sp. SCU07.P1 em BDA (7 dias a 28°C). B. Árvore filogenética construída com bootstrap de 1000 repetições utilizando-se o software MEGA e aplicando o método de maximum-likelihood com sequências da região ITS de espécies referência de *Curvularia*.



*Curvularia affinis* é uma espécie ecologicamente e economicamente importante (Trianto et al. 2020). Esta espécie apresenta conídios de 5 células que frequentemente produzem estromas (Madrid H et al. 2014). Zhang et al. (2012) em seu estudo, destacaram que o extrato de *C. affinis*, cepa HS-FG-196 isolado da China, exibia forte atividade citotóxica contra certas linhagens de células tumorais.

A árvore filogenética revelou cinco clados bem sustentados. Com base na literatura, as espécies de *C. affinis* e *C. verruciformis* são filogeneticamente próximas, sustentando nossos resultados evidenciados na figura 12. As espécies *C. verruciformes* e *C. pseudorobusta* apresentaram uma homologia de 97%. *C. verruciformes* possui conídios verrucosos e espécies com essa característica aparecem em diferentes clados, sugerindo que este tipo de ornamentação evoluiu várias vezes no gênero (Madrid H. et al. 2014).

A semelhança de sequência ITS entre *C. miyakei* e *C. ovariicola* também foi de 97%. Outro clado robusto também foi observado entre os táxons *C. oryzae* e *C. micropus* (94%) e *C. soli* e *C. geniculata* (84%). *C. lutana* agrupou-se em um clado diferente, esta espécie apresenta conídios de 4 células, mais ou menos curvos, em que uma das células intermediárias é maior e mais escura que as demais (Madrid H et al. 2014). Sustentando nossos resultados, Da cunha KC et al. (2013) destacam que a espécie também se alinhou a um clado diferente.

#### 7.4.4 *Penicillium*

A taxonomia de *Penicillium* é bastante complexa devido ao grande número de espécies descritas e à grande variabilidade inerente ao gênero, sendo difícil a distinção entre algumas espécies utilizando apenas a caracterização morfológica, incluindo padrão de colônia, estrutura de conidióforos e produção de escleródios (Samson; Frisvad, 2004). Diante disso, características moleculares como sequência da região ITS e marcadores adicionais, como RNAr ribossômico de subunidade maior (LSU),  $\beta$ -tubulina (*BenA*), calmodulina (*CaM*) e a segunda maior subunidade da RNA polimerase II (*RPB2*) são utilizados (Nguyen, V D et al. 2022).

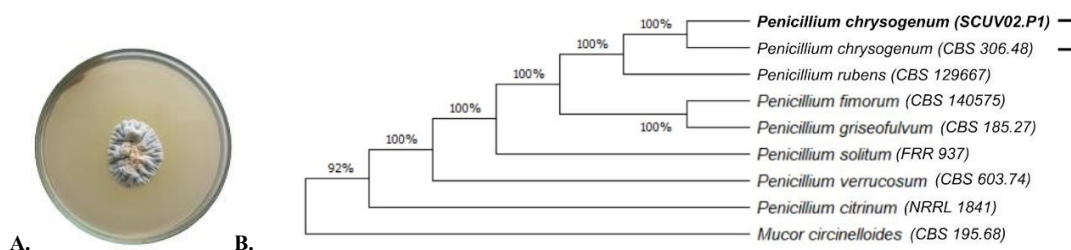
A identificação foi realizada usando características morfológicas como sua forma reprodutiva assexuada (conidióforo ramificado), sendo confirmada com o sequenciamento das regiões ITS. As sequências dos isolados de estudo foram submetidas ao Genbank e as cepas de referência foram coletadas do mesmo banco de dados e resumido na Tabela 11.

**Tabela 11.** Isolado de *Penicillium* sp. SCUV02.P1 (em negrito) da Geleira *Collins* e sequências utilizadas na análise filogenética.

Gene	Cepa	Espécie ou grupo taxonômico	Número de acc. do Genbank	Número de bp das sequências
ITS	<b>SCUV02.P1</b>	<b><i>Penicillium chrysogenum</i></b>	<b>OP603793</b>	<b>555</b>
ITS	CBS 306.48	<i>Penicillium chrysogenum</i>	NR 077145.1	585
ITS	CBS 129667	<i>Penicillium rubens</i>	NR 111815.1	585
ITS	CBS 140575	<i>Penicillium fimorum</i>	NR 153267.1	720
ITS	CBS 185.27	<i>Penicillium grioseofulvum</i>	JX997084.1	584
ITS	FRR 937	<i>Penicillium solitum</i>	AY373932.1	610
ITS	CBS 603.74	<i>Penicillium verrucosum</i>	AB479317.1	609
ITS	NRRL 1841	<i>Penicillium citrinum</i>	NR 121224.1	574
ITS	CBS 195.68	<i>Mucor circinelloides</i>	NR 126116.1	639

O isolado SCUV02.P1 apresentou 100% de homologia com a espécie *P. chrysogenum* (cepa: CBS 306.48) (Figura 13), com uma diferença de apenas 1 nucleotídeo (adenina) ao final do alinhamento. Esta espécie é caracterizada por apresentar conídios elipsóides (Samson, R. A et al. 1977).

**Figura 13.** A. Morfologia colonial da linhagem *Penicillium* sp. SCUUV02.P1 em BDA (7 dias a 28 °C). B. Árvore filogenética construída com bootstrap de 1000 repetições utilizando-se o software MEGA e aplicando o método de maximum-likelihood com sequências da região ITS de espécies referência de *Penicillium*.



O gênero *Penicillium* no continente Antártico é encontrado de forma abundante. De menezes et al. (2019) destacam em seu estudo, que as espécies *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium palitans* e *Penicillium* spp. foram capazes de produzir substâncias com seletivas atividades tripanossomicidas, leishmanicidas e herbicidas, sendo a espécie *P. chrysogenum* com bioatividades mais elevadas. A espécie já foi isolada de diferentes habitats terrestres e marinhos e talvez seja altamente adaptada às condições extremas encontradas na Antártica (De menezes et al. 2019).

A espécie *P. chrysogenum*, produtor de penicilina, cresce em meios com baixa atividade de água e baixo pH, numa faixa de temperatura entre 15,0 a 25,0 °C. No entanto, é capaz de crescer a 5,0 °C (Pitt 1979; 1991). De acordo com Samson; Frisvad (2004), este subgênero é distinto tanto filogeneticamente quanto ecologicamente. A maioria das espécies apresenta importância econômica por produzirem vários metabólitos, dentre estes as micotoxinas que são metabólitos secundários de baixo peso molecular, sendo alguns potenciais agentes carcinogênicos e nefrotóxicos (Hoeltz et al. 2009).

Khan et al. (2020) demonstraram que o extrato do fungo antártico *P. chrysogenum* possui potentes bioatividades antibacterianas, destacando que microrganismos de regiões polares estão surgindo como um novo recurso para a descoberta de produtos naturais que combatem patógenos humanos.

A árvore filogenética incluiu 8 isolados, além da espécie de grupo externo, apresentando 3 clados bem coesos. As espécies *P. griseofulvum* e *P. fimorum* agruparam-se no mesmo clado com 100% de homologia. *Penicillium griseofulvum* possui conidióforos divergentes ramificados com fiálides curtos, já a espécie *P. fimorum* apresenta produção de estipes de conidióforos de paredes rugosas, o que pode ser usado para distinguir as espécies (Houbraken J et al. 2016).



Apesar da semelhança de algumas cepas de *P. verrucosum* que produzem colônias superficialmente aveludadas, muito parecidas com as colônias de *P. chrysogenum*. Em nossa análise filogenética, os clados das espécies ficaram em clados distantes (Figura 13). Isso pode ser evidenciado pelas características dos conidióforos, que em *P. chrysogenum* têm paredes lisas, enquanto que em *P. verrucosum* são ásperas (Samson, R. A et al. 1977). A espécie *P. rubens* agrupou-se próximo a *P. chrysogenum*, assim como no estudo de Suárez-Contreras et al. (2022) e Raper e Thorn (1949) que consideraram *P. rubens* como sinônimo de *P. chrysogenum*, reforçando a efetividade dos nossos resultados.

#### 7.4.5 *Talaromyces*

Samson et al. (2011) avaliaram a relação filogenética entre *Penicillium* e *Talaromyces*. A distinção dos gêneros foi obtida através do sequenciamento parcial da SSU (subunidade menor) e/ou LSU (subunidade maior) do rDNA, bem como da região ITS do rDNA, onde as espécies anamorfias foram atribuídas ao subgênero *Biverticillium* do gênero *Penicillium* e as espécies teleomorfas ao gênero *Talaromyces*. De acordo com os autores, *Talaromyces* foi classificado como um gênero teleomorfo, que forma um grupo monofilético posicionado distantemente das espécies pertencentes a outros subgêneros de *Penicillium* (Caro y et al. 2015).

Algumas espécies de *Talaromyces* estão intimamente relacionadas com a vida humana. Muitas têm potenciais aplicações biotecnológicas como a produção de antibióticos, corantes alimentares ou exoenzimas (Su lei et al. 2018). Outras são patogênicas e causam talaromicose. A espécie *Talaromyces marneffeii*, por exemplo, é um conhecido e importante patógeno humano causador da penicilose (Zhang et al. 2021). Como o *T. marneffeii* costumava ser classificado em *Penicillium*, sua doença ainda é chamada de penicilose (Ylmaz et al. 2014).

No geral, o ITS funciona muito bem para o reconhecimento de espécies no gênero, embora deva ser usado com cautela, pois a variabilidade é baixa em alguns clados (Ylmaz et al. 2014).

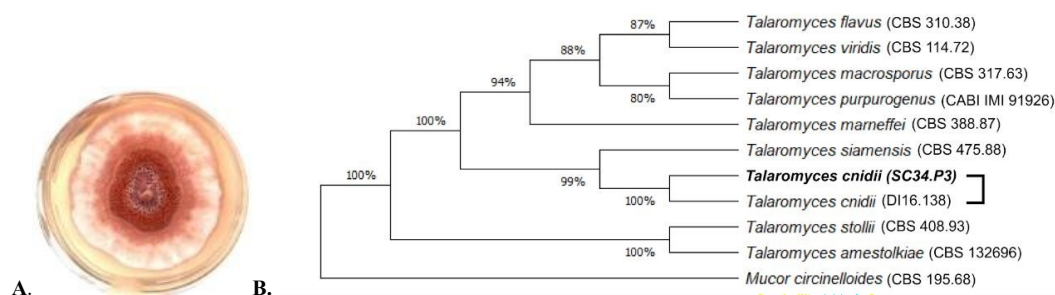
O isolado *Talaromyces cniddi* SC34.P3 foi identificado por características morfológicas como a presença de conídios esféricos conectados no topo dos ramos em forma de vassoura dos conidióforos. Para confirmação do gênero e da espécie do fungo isolado foi realizado o sequenciamento das regiões ITS. Para comparação, foram utilizadas sequências de tipo e/ou referência do gênero depositadas no Genbank e listados na Tabela 12.

**Tabela 12.** Isolado de *Talaromyces cnidii* sp. SC34.P3 (em negrito) da Geleira Collins e sequências utilizadas na análise filogenética.

Gene	Cepa	Espécie ou grupo taxonômico	Número de acesso do Genbank	Número de pb das sequências
ITS	<b>SC34.P3</b>	<i>Talaromyces cnidii</i>	<b>OP603791</b>	<b>551</b>
ITS	DI16.138	<i>Talaromyces cnidii</i>	LT558960.1	1297
ITS	CBS 310.38	<i>Talaromyces flavus</i>	NR 147413.1	502
ITS	CBS 114.72	<i>Talaromyces viridis</i>	NR 160136.1	505
ITS	CBS 317.63	<i>Talaromyces macrosporus</i>	NR 145155.1	444
ITS	CABI IMI 91926	<i>Talaromyces purpurogenus</i>	KC 962107.1	500
ITS	CBS 388.87	<i>Talaromyces marneffeii</i>	NR 103671.2	612
ITS	CBS 475.88	<i>Talaromyces siamensis</i>	NR 103683.2	613
ITS	CBS 408.93	<i>Talaromyces stollii</i>	NR 111781.1	580
ITS	CBS 132696	<i>Talaromyces amestolkiae</i>	NR 120179.1	577
ITS	CBS 195.68	<i>Mucor circinelloides</i>	NR 126116.1	639

O isolado de estudo apresentou uma similaridade de 100% com a espécie *T. cnidii* (cepa: DI16.138), apresentando apenas uma diferença nucleotídica entre si (guanina) no início do alinhamento (Figura 14).

**Figura 14.** Morfologia colonial da linhagem *Talaromyces* sp. SC34.P3 em BDA (7 dias a 28 °C). **B.** Árvore filogenética construída com bootstrap de 1000 repetições utilizando-se o software MEGA e aplicando o método de maximum-likelihood com sequências da região ITS de espécies referência de *Talaromyces*.



*Talaromyces cnidii* apresenta micromorfologia com presença de conidióforos biverticilados com ramos subterminais e estipes de paredes lisas. Além disso, possuem pigmentos solúveis de vermelho a amarelo em meio extracelular (Yılmaz et al. 2014), características que corroboram com aspectos morfológicos da nossa linhagem (Fig 14A).

Entretanto, não há registro na literatura da presença da espécie na Antártica. Yilmaz N et al. (2014) destacam que o fungo *T. cnidii* apresenta crescimento um pouco mais rápido a 25,0 °C e 37,0 °C. Porém, em nosso estudo, o isolado apresentou ótimo crescimento a 15,0 °C, sugerindo a ampla dispersão, adaptação e colonização a ambientes frios.

A árvore filogenética possui quatro clados bem estruturados (Figura 14B). Assim como no estudo de Yilmaz et al 2014, a espécie *Talaromyces siamensis* se agrupou próximo a *T. cnidii* e difere com sete diferenças de nucleotídeos. Yilmaz et al. 2014 destaca que existem apenas pequenas diferenças como morfologia da margem da colônia, métulas e conídios entre essas duas espécies.

Outro clado estruturado também foi observado entre as espécies *T. flavus* e *T. viridis* com inferência de 87%. *Talaromyces flavus* possui conidióforos monovertivulares, enquanto *T. viridis* produz conidióforo com fiálides solitárias, e ambos apresentam forma de conídioselipsoidal. *T. flavus* é descrito como um dos mais importantes antagonistas fúngicos utilizados como biocontrole de patógenos de solo (Yilmaz et al. 2014).

*Talaromyces macrosporus* e *Talaromyces purpurogenus* apresentaram uma homologia de 80%. *Talaromyces macrosporus* possui conidióforos mono a biverticilar e *T. purpurogenus* biverticilar. Ambas espécies são comumente isoladas do solo, humanos com penicilose e produtos alimentícios (Yilmaz et al. 2014). *Talaromyces macrosporus* produz ascósporos resistentes ao calor e causam deterioração de produtos à base de frutas (Dijksterhuis et al. 2007). Já *T. purpurogenus* produz micotoxina (rubratoxina) em produtos alimentícios (Yilmaz et al. 2012).

As espécies *T. stolli* e *T. amestolkiae* agruparam-se no mesmo clado com 100% de homologia, com apenas uma diferença nucleotídica entre si (citocina). Ambos possuem conidióforo biverticilado e com forma elipsoidal. *Talaromyces stolli* distingue-se de *T. amestolkiae* pelo crescimento mais rápido a 37,0 °C (Yilmaz et al. 2014). As espécies possuem importância clínica e já foram relatados a presença em pulmões e escarros de pacientes imunocomprometidos (Yilmaz et al. 2012). Os resultados filogenéticos apresentados em nosso estudo, estão de acordo com a literatura, comprovando a robustez das nossas análises.

#### 7.4.6 *Thelebolus*

A família *Thelebolaceae* pertence à ordem *Thelebolales*, considerada a evolução ascomatal dentro da classe *Leotiomycetes* (Zhang et al. 2020). A família *Thelebolaceae*, representada por *Thelebolus* e *Antarctomyces*, compartilha um ancestral comum com a família *Pseudeurotiaceae*, representada pelo gênero *Pseudogymnoascus* (Johnston et al., 2019; Batista

et al., 2020). A ordem *Thelebolales* contém 11 gêneros, e dentro dessa ordem *Thelebolus* é o gênero mais diversificado, com espécies com ascas fechados (Quijada et al. 2022).

Hoog et al. (2005) destacam a utilização de 3 marcadores (SSU, ITS e  $\beta$ -tubulina) para avaliar o agrupamento de espécies do gênero *Thelebolus*. Bovio et al. (2018) utilizaram os marcadores ITS e  $\beta$ -tubulina para identificar novas espécies (*T. balaustiformis* e *T. spongiae*) isoladas de esponjas marinhas da Antártica.

O gênero *Thelebolus* tem distribuição ubíqua e representa espécies psicrófilas. As espécies têm sido frequentemente relatadas em (1) associação com esterco de animais e (2) climas frios (Hoog et al. 2005). Membros do gênero foram relatadas no Ártico e na Antártica (Rosa et al. 2020), com ótimo crescimento geralmente abaixo de 20,0 °C (Wicklow & Malloch 1971). Hoog et al (2005) destacam o bom crescimento das espécies na faixa de 0 °C a 25,0 °C. Isso pode apresentar uma vantagem competitiva em temperaturas mais baixas, impulsionado pela adaptação a fatores ambientais (Quijada et al. 2022).

O isolado *Thelebolus* sp. SC29.P3 foi identificado quanto à morfologia e apresentou hifas entrelaçadas e ascas fechados característico do gênero *Thelebolus*. Este dado foi confirmado com o sequenciamento da região ITS. As linhagens de referência para análise filogenética do gênero são listadas na Tabela 13.

**Tabela 13.** Isolado de *Thelebolus* sp. SC29.P3 (em negrito) da Geleira *Collins* e sequências utilizadas na análise filogenética.

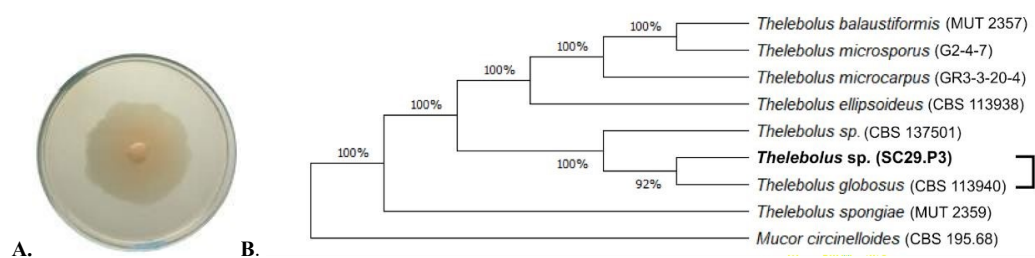
(Continua)				
Gene	Cepa	Espécie ou grupo taxonômico	Número de acesso. do Genbank	Número de pb das sequências
ITS	<b>SC29.P3</b>	<b><i>Thelebolus</i> sp.</b>	<b>OP603739</b>	<b>523</b>
ITS	CBS 113940	<i>Thelebolus globosus</i>	NR 138367.1	483
ITS	MUT 2357	<i>Thelebolus balaustiformis</i>	NR 159056.1	531
ITS	G2-4-7	<i>Thelebolus microsporus</i>	LC514937.1	1089
ITS	GR3-3-20-4	<i>Thelebolus microcarpus</i>	LC515006.1	1100
ITS	CBS 113938	<i>Thelebolus ellipsoideus</i>	NR 160216.1	570
ITS	CBS 137501	<i>Thelebolus</i> sp.	LN609269.1	1441

**Tabela 13.** Isolado de *Thelebolus* sp. SC29.P3 (em negrito) da Geleira Collins e sequências utilizadas na análise filogenética.

				(Conclusão)
Gene	Cepa	Espécie ou grupo taxonômico	Número de acesso. do Genbank	Número de pb das sequências
ITS	MUT 2359	<i>Thelebolus spongiae</i>	NR 159057.1	527
ITS	CBS 195.68	<i>Mucor circinelloides</i>	NR 126116.1	639

O isolado do presente estudo agrupou-se ao clado da espécie *Thelebolus globosus* (cepa: CBS 113940). Apesar de apresentar uma homologia de 92% e uma diferenciação de 53 nucleotídeos, outros genes são necessários para confirmar a identificação a nível de espécie (Figura 15).

**Figura 15.** Morfologia colonial da linhagem *Thelebolus* sp. SC29.P3 em BDA (7 dias a 28 °C). **B.** Árvore filogenética construída com bootstrap de 1000 repetições utilizando-se o software MEGA e aplicando o método de maximum-likelihood com sequências da região ITS de espécies referência de *Thelebolus*.



As espécies *T. globosus* e *T. ellipsoideus* são endêmicas da Antártica e foram descritas recentemente (Hoog et al. 2005). Ambas possuem ascomas fechados. Quijada et al. (2022) sugerem a presença de espécies com ascomas fechados como novas linhagens na Antártica. Provavelmente, a evolução da espécie foi em resposta ao clima severo e perda de dispersão por aves ou mamíferos, uma vez que sua ocorrência regular em fezes de animais sugere que o vetor de dispersão desta espécie é consistente (Hoog et al. 2005). Além disso, o número de esporos presentes em um asco tem representado uma característica importante na distinção dos táxons dentro do gênero (Hoog et al. 2005).

Em seu estudo, Rodríguez et al. (2018) descreveram a produção de metabólito secundário pelo fungo Antártico *T. globosus*. O fungo mostrou ser produtor de compostos

benzodiazepínicos, viridicatinas e policetídeos. Além disso, várias espécies da família *Thelebolaceae* foram relatadas com potenciais valores biotecnológicos como produtoras de proteínas anticongelantes (AFP), proteínas ligantes de gelo (IBP), alguns metabólitos secundários (Batista et al. 2020) e pigmentos do tipo carotenoides (especialmente pelo fungo *Thelebolus microsporus* isolado da Antártica) (Singh et al. 2013).

Uma árvore de parcimônia contendo 7 espécies mais semelhantes é apresentada na Figura 15. A análise filogenética apresentou 2 clados bem suportados. A espécie *T. spongiae* agrupou-se próximo ao clado do nosso isolado de estudo (*T. globosus* SC29.p3), tendo sido recentemente isolada de esponja marinha por Bovio et al. (2018).

As espécies *T. microsporus* e *T. balaustiformes* agruparam-se com 100% de homologia, com quatro diferenças nucleotídicas. *Thelebolus microsporus* possui ampla distribuição tanto no continente Antártico, quanto em outros lugares, sendo sua dispersão associada a fezes de animais (Hoog et al. 2005). A espécie *T. balaustiformis* foi recentemente identificada de esponja (Bovio et al. 2018) e em fragmentos de gelo na Antártica (De Menezes et al. 2020).

### 7.5 *Pseudogymnoascus*

*Pseudogymnoascus* é conhecido como um fungo psicrófilico, sendo frequentemente encontrado em ambientes frios, incluindo os de clima polar, alpino e regiões temperadas (Rosa et al. 2020). A taxonomia do gênero é bastante complexa, sendo que a filogenia de *Geomyces*, *Pseudogymnoascus* e outros gêneros próximos foi recentemente reorganizada, incluindo a transferência de três espécies oriundas de outros gêneros, sendo elas *P. destructans* (anteriormente *G. destructans*), *P. pannorum* (anteriormente *G. pannorum*), e *P. carnis* (anteriormente *Sporotrichum carnis*) (Minnis e Lindner, 2013).

A partir do estudo de análises filogenéticas baseadas em cinco marcadores gênicos, ITS (espaçador transcrito interno), LSU (rDNA de subunidade nuclear maior), MCM7 (fator de licenciamento de replicação de DNA), RPB2 (segunda maior subunidade de RNA polimerase II) e TEF1 (fator de alongamento de tradução EF-1a) e com base na morfologia, foram descritas quatro novas espécies: *P. antarcticus*, *P. australis*, *P. griseus* e *P. lanuginosus* (Villanueva et al. 2021).

Segundo Zhang et al. (2021), o gênero tem 23 espécies descritas até o momento: *P. alpinus*, *P. antarcticus*, *P. australis*, *P. appendiculatus*, *P. bhattii*, *P. carnis*, *P. catenatus*, *P. caucasicus*, *P. destructans*, *P. fujianensis*, *P. griseus*, *P. guizhouensis*, *P. lanuginosus*, *P. lindneri*, *P. palmeri*, *P. pannorum*, *P. roseus*, *P. shaanxiensis*, *P. sinensis*, *P. turneri*, *P.*

*verrucosus*, *P. yunnanensis* e *P zhejiangensis*. É possível que várias outras aguardem serem descritas (Minnis e Lindner, 2013).

*Pseudogymnoascus* está incluso no filo Ascomycota, um dos mais abundantes descritos na Antártica (Wentzel et al. 2019). O gênero apresenta distribuição ubíqua no continente (Shi et al. 2021), ocorrendo em diversos substratos (Rosa et al., 2019), sendo a maioria dos trabalhos concentrados na espécie *Pseudogymnoascus destructans*. Esta espécie é caracterizada como patogênica, uma vez que é considerada agente causador da síndrome do nariz branco (SNM) que promoveu uma redução de populações de morcegos em regiões temperadas (Lorch et al. 2011). *Pseudogymnoascus pannorum* também tem relevância devido a sua importância clínica (Villanueva et al. 2021).

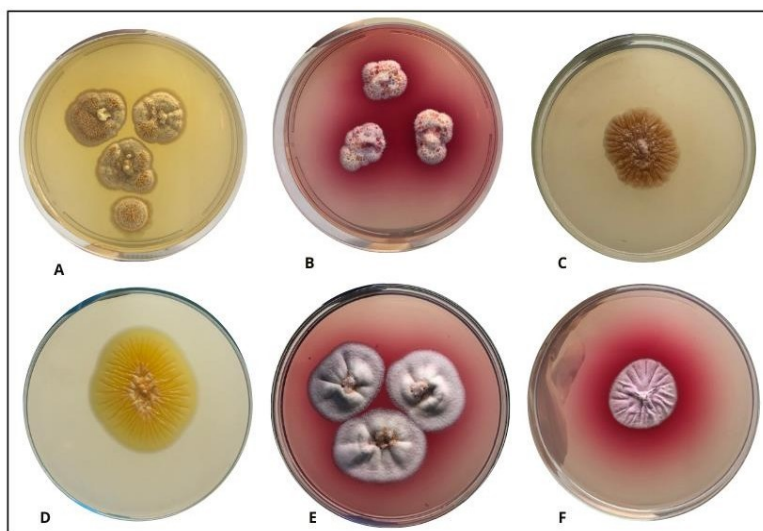
Fungos de ambientes extremos provaram ser excelentes produtores de estruturas químicas incomuns que os tornam particularmente interessantes. As pesquisas sobre metabólitos secundários de fungos antárticos são relativamente mais escassas do que as de outras regiões (Shi et al. 2021). Apesar do aumento dos estudos micológicos, a diversidade fúngica na Antártica permanece pouco conhecida (Rosa et al. 2020).

Dada a relevância do gênero em diversas áreas de importância socioeconômica, detectamos uma rica diversidade de espécies de fungos do gênero *Pseudogymnoascus*, o que reafirma a característica psicrófila e seus diferentes mecanismos de adaptação e colonização a ambientes extremos (Duarte et al. 2018).

A identificação foi realizada usando características morfológicas e confirmadas pelo sequenciamento das regiões ITS do gene do DNA ribossômico. Os isolados fúngicos foram identificados quanto à morfologia e apresentaram características inerentes ao gênero, como a capacidade de produzir aleurioconídios e/ou artroconídios. Este dado foi confirmado com o sequenciamento da região ITS.

Para a construção da árvore filogenética, utilizamos as sequências dos isolados (Figura 16) para comparação com sequências inseridas no GenBank de 18 cepas do gênero *Pseudogymnoascus* de tipo e/ou de referência. Seus números de acesso foram submetidos no Genbank e estão listados na Tabela 14.

**Figura 16.** Morfologia colonial das linhagens de *Pseudogymnoascus* spp. em BDA (7 dias a 28 °C). **A.** SC04.P3; **B.** SC12.P3; **C.** SC14.P3; **D.** SC25.P3; **E.** SC32.P3; **F.** ACF093.



Fonte: Autor (2022)

**Tabela 14.** Linhagens e sequências utilizadas na análise filogenética de *Pseudogymnoascus* sp. Fungos obtidos da Geleira Collins (em negrito) em comparação com sequências de espécies de tipo ou referência depositadas no Genbank.

(Continua)

Gene	Cepa	Espécie ou grupo taxonômico	Número de acesso do Genbank	Número de pb das sequências
ITS	SC04.P1	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	OP603797	540
ITS	SC12.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	OP603796	539
ITS	SC14.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	OP603799	542
ITS	SC25.P3	<i>Pseudogymnoascus shaanxiensis</i>	OP603800	541
ITS	SC32.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	OP603802	541
ITS	ACF093	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	OP603798	538
ITS	UAMH 10509	<i>Pseudogymnoascus appendiculatus</i>	NR 137875.1	499
ITS	F09-T18-3	<i>Pseudogymnoascus australis</i>	MN417287.1	527



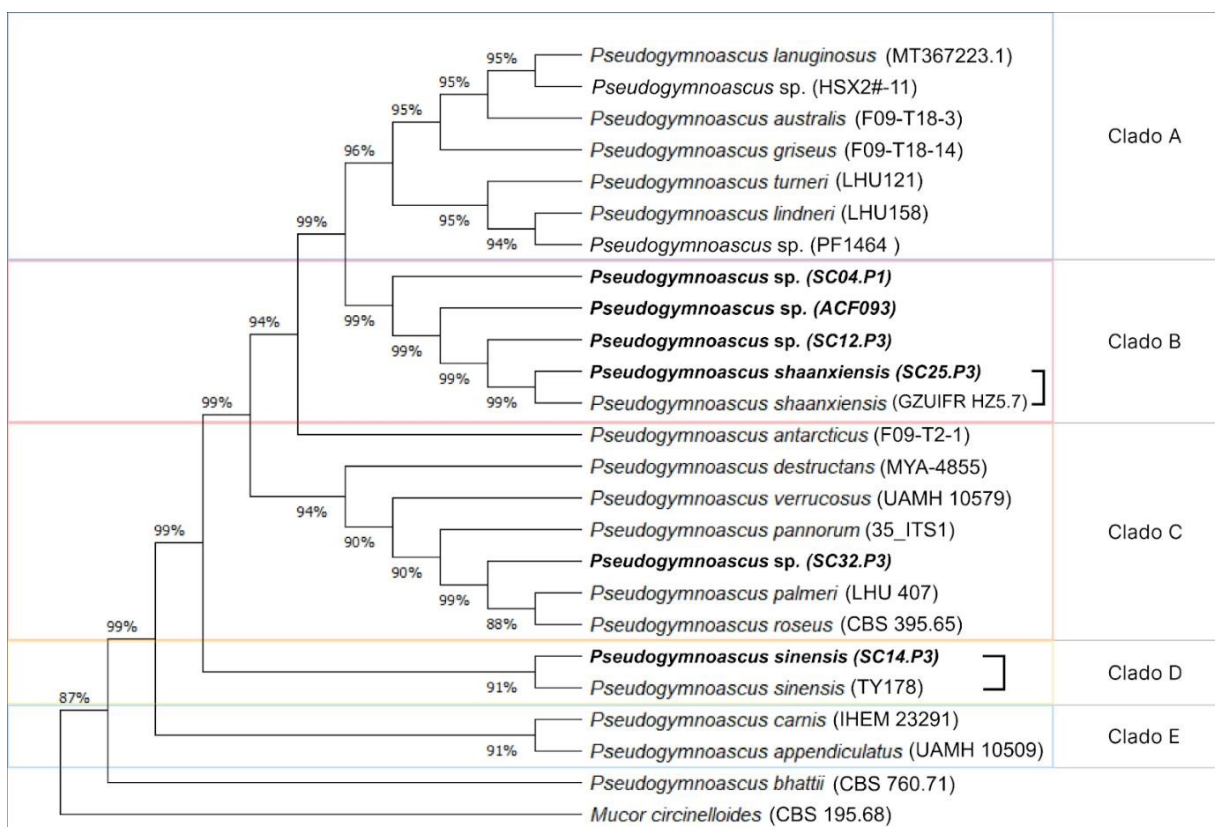
**Tabela 14.** Linhagens e sequências utilizadas na análise filogenética de *Pseudogymnoascus* sp. Fungos obtidos da Geleira Collins (em negrito) em comparação com sequências de espécies de tipo ou referência depositadas no Genbank.

(Conclusão)

Gene	Cepa	Espécie ou grupo taxonômico	Número de acesso do Genbank	Número de pb das sequências
ITS	CBS 760.71	<i>Pseudogymnoascus bhattii</i>	MH860337.1	489
ITS	IHEM 23291	<i>Pseudogymnoascus carnis</i>	OW986845.1	582
ITS	F09-T18-14	<i>Pseudogymnoascus griseus</i>	MN417288.1	527
ITS	F09-T18-3	<i>Pseudogymnoascus australis</i>	MN417287.1	527
ITS	LHU121	<i>Pseudogymnoascus turneri</i>	MN542213.1	522
ITS	LHU 407	<i>Pseudogymnoascus palmeri</i>	MT988150.1	556
ITS	LHU158	<i>Pseudogymnoascus lindneri</i>	MN542212.1	513
ITS	35 ITS1	<i>Pseudogymnoascus pannorum</i>	OL334749.1	489
ITS	MYA-4855	<i>Pseudogymnoascus destructans</i>	NR 111838.1	525
ITS	UAMH 10579	<i>Pseudogymnoascus verrucosus</i>	NR 111197.1	507
ITS	CBS 395.65	<i>Pseudogymnoascus roseus</i>	NR 165894.1	489
ITS	HSX2#-11	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	MT367223.1	576
ITS	HSX2#-11	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	MT367223.1	576
ITS	PF1464	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	LC598725.1	548
ITS	GZUIFR HZ5.7	<i>Pseudogymnoascus shaanxiensis</i>	MT509366.1	542
ITS	TY178	<i>Pseudogymnoascus sinensis</i>	MT133941.1	496
ITS	F09-T2-1	<i>Pseudogymnoascus antarcticus</i>	JX845280.1	525
ITS	CBS 195.68	<i>Mucor circinelloides</i>	NR 126116.1	639

A árvore filogenética apresentou seis clados bem sustentados. As filogenias indicaram que a maioria dos isolados neste estudo, presentes no clado B, foram colocados em ramos distintos, formando um clado separados de outras espécies (Figura 17).

**Figura 17.** Árvore filogenética construída com bootstrap de 1000 repetições utilizando-se o software MEGA e aplicando o método de maximum-likelihood com sequências da região ITS de espécies referência de *Pseudogymnoascus*.



O clado A é composto por sete táxons. As espécies *P. lindneri* e *P. turneri*, descritas a partir de amostras de sedimentos de uma mina e túnel ferroviário, respectivamente (Crous et al. 2019), apresentaram inferência filogenética, agrupando-se próximas. Ambas espécies possuem conídios globosos e obovóides (Crous et al. 2020).

As espécies *P. australis*, *P. lanuginosus* e *P. griseus* isoladas de amostras de esponjas da Antártica por Villanueva et al. (2021), agruparam-se ao mesmo clado. Assim como as espécies anteriormente mencionadas, *P. antarcticus*, também isolada de esponja na Antártica e descrita por Villanueva et al. (2021), foi agrupada próximo ao clado B, formando uma linhagem independente e bem sustentada. Os resultados obtidos em nossa análise filogenética estão de acordo com o descrito na literatura.

O clado B é composto por cinco táxons, ao qual estão presentes a maioria dos nossos isolados (SC04.P3, ACF093, SC12.P3 e SC25.P3). Os isolados agruparam-se em ramos distintos, formando clados separados de outras espécies. SC04.P3, SC12.P3 E SC25.P3 foram isolados do mesmo ponto de coleta de solo da Geleira *Collins* (face sudeste), enquanto o isolado ACF093 foi obtido da Geleira *Collins* (face oeste). Isso pode inferir que diferentes locais podem

abrigar espécies similares. Em relação às características ecológicas, todos os membros atuais do clado B foram isolados de amostras de solos de diferentes origens.

O isolado SC25.P3 apresentou homologia de 99% com a espécie *P. shaanxiensis* (cepa: GZUIFR HZ5.7) com apenas quatro diferenças nucleotídicas. Esta espécie foi descrita recentemente na China. Morfológicamente, *P. shaanxiensis* assemelha-se a *P. appendiculatus* e *P. verrucosus* devido aos conídios piriformes (Zhang et al. 2020). No entanto, não há relatos na literatura sobre a presença da espécie no continente, o que sugere ampla capacidade de dispersão/colonização. Vale ressaltar que nosso estudo representa o primeiro registro de *P. shaanxiensis* na Antártica.

Assim como no estudo de Villanueva et al. (2021), onde descreveram quatro novas espécies do gênero *Pseudogymnoascus* na Antártica, seus isolados agruparam-se em ramos distintos, apresentando similaridades apenas com a espécie *P. shaanxiensis*, sugerindo que nosso estudo pode apresentar uma dominância de fungos possivelmente não descritos.

Além disso, os respectivos isolados no nosso estudo SC04, ACF093 e SC12.P3, produtores de pigmentos, ficaram próximos a espécie do clado A, representado por *Pseudogymnoascus* sp. (LC598725.1). Esta espécie, como anteriormente mencionado, produz metabólitos secundários abundantes e diversos.

O clado C, por sua vez, é composto por seis táxons. A maioria das espécies presentes nesse clado aparecem em ramos distintos. O isolado SC32.P3 agrupou-se próximo a *P. pannorum* (cepa: 35 ITS1). Esta espécie cresce tanto em faixas de temperatura psicrófilas quanto mesófilas, e raramente causa doenças humanas e caninas (Chatuverdi et al. 2018). *Pseudogymnoascus pannorum* tem sido amplamente relatado na Antártica (Misiak M et al. 2020). Em seu estudo, Misiak et al. 2020, destacaram a presença de enzimas extracelulares produzidas pelo isolado antártico *P. pannorum*, como a celulase e a quitinase. O isolado de estudo apresenta produção de pigmento em meio extracelular. Porém, até o momento, não há relatos na literatura sobre a produção de pigmentos pela espécie *P. pannorum*.

As espécies *P. destructans* e *P. verrucosus* agruparam-se no mesmo clado, porém em ramos distintos. Já *P. palmeri* e *P. roseus* apresentaram similaridade de 88%. Diante disso, o clado C abriga um grupo diversificado de *Pseudogymnoascus* que inclui fungos degradadores de madeira, fungos de solo e fungos associados a esponjas marinhas (Rice e Currah 2006 e Villanueva et. al 2021).

O clado D apresenta dois táxons, sendo que o isolado SC14.P3 apresentou uma similaridade de 91% com a espécie *P. sinensis* (cepa: TY178) com 45 diferenças nucleotídicas.

A espécie foi descrita recentemente na China (Zhang et al. 2020), corroborando mais uma vez com a ampla distribuição geográfica e adaptação deste gênero.

Por fim, o clado E, composto por dois táxons, *P. carnis* e *P. appendiculatus*, que se agruparam com 91% de homologia. A espécie *P. appendiculatus*, isolada da Antártica, foi descrita como produtora de metabólitos com alta atividade herbicida. O estudo parece ser o primeiro relato sobre a espécie isolada de ambientes extremos capazes de produzir compostos bioativos (Ogaki et al. 2020). *Pseudogymnoascus carnis* foi encontrada associada à deterioração de carne (Brooks e Hansford, 1923). O estudo de Minnis e Lindner (2013) destaca que ambas as espécies se agruparam no mesmo clado e apresentaram-se como sinônimas, porém são necessários mais dados moleculares de isolados destas espécies para confirmar este posicionamento filogenético.

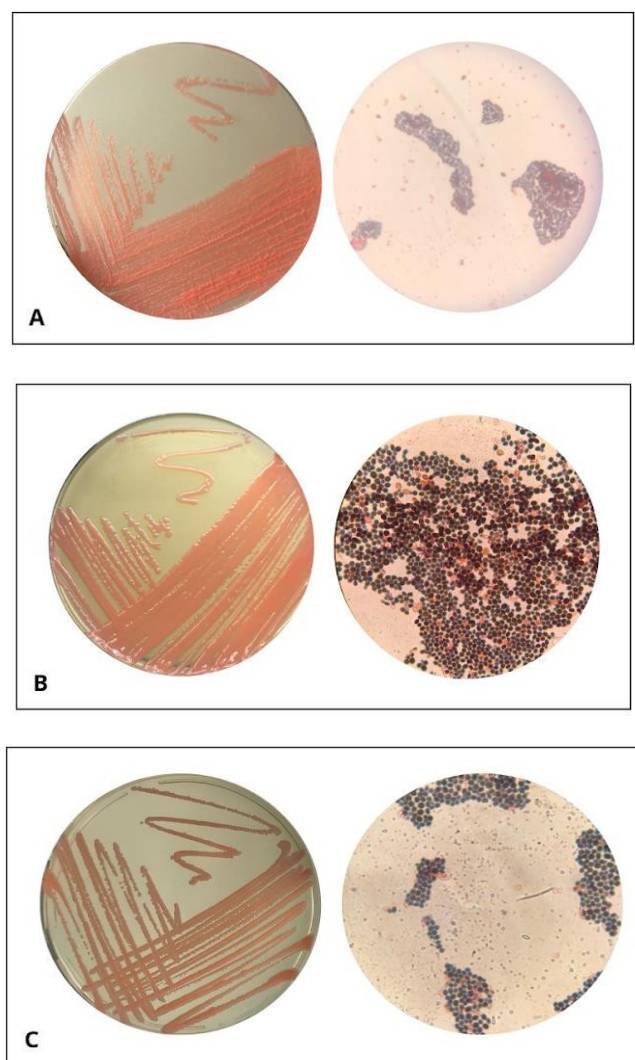
A espécie *P. bhattii* aparece como um ramo distinto e independente de outras espécies de *Pseudogymnoascus*. Esta espécie foi descrita por Samson (1972) com base em características morfológicas. No entanto, em seu estudo, Zhang et al. (2020) sugerem, baseados que em análises filogenéticas contendo dados de *Thelebolaceae* (ITS e LSU), que a espécie *P. bhattii* estava intimamente relacionada com *Gymnostellatospora*, separada de *Pseudogymnoascus*, portanto, o nomearam *G. bhattii*. Diante disso, os nossos resultados confirmam e corroboram com o estudo de Zhang et al. (2020).

A adaptação e colonização do gênero *Pseudogymnoascus* a diversos ambientes foi reportada por diversos estudos na literatura, corroborando com os dados deste estudo. Mais pesquisas são necessárias para obter uma visão completa da taxonomia do gênero. Nesse contexto, nossos resultados sugerem que os ambientes antárticos podem constituir importantes reservatórios para novas espécies de *Pseudogymnoascus* sp. de origem Antártica com potencial biotecnológico.

## 7.6 Leveduras

No presente estudo obteve-se um total de três leveduras pigmentadas. Os isolados foram agrupados por características morfológicas, como aspecto opaco/brilhante da colônia. Dos 3 isolados, um foi da face oeste (ACL092) e dois da face sudeste (SC05L.P3 e SC35L.P3). Posteriormente, os isolados foram identificados por micromorfologia pela técnica de coloração de Gram, para confirmar a presença dos blastoconídios (Figura 18). Os isolados foram identificados morfológicamente como pertencentes ao gênero *Rhodotorula*.

**Figura 18.** Isolados leveduriformes produtores de pigmentos (**A.** ACL092; **B.** SC05L.P3; **C.** SC351.P3).



Fonte: Autor (2022)

*Rhodotorula* é um gênero de leveduras unicelulares pertencentes ao filo Basidiomycota (Coutinho et al. 2022). O gênero é conhecido por apresentar produção de pigmento intracelular de cor rosa (Touchette D et al. 2022). Possui distribuição ubíqua, podendo crescer abundantemente em ambientes extremos (Touchette D et al. 2022) por ter alta capacidade de resistir à desidratação (Coutinho et al. 2022). Várias espécies adaptadas ao frio, incluindo *R. aurantiaca*, *R. psychrophila*, *R. psychrophenolica*, *R. glacialis* e *R. himalayensis* já foram descritas na literatura (Touchette D et al. 2022).

A espécie *R. mucilaginosa* está presente em diferentes habitats e substratos, incluindo ambientes frios e extremos. Na Antártica, *R. mucilaginosa* é comumente isolada de substratos terrestres e marinhos (Rosa et al. 2019).

Santiago et al. (2015) destacaram que as espécies *Rhodotorula laryngis* e *Rhodotorula mucilaginosa* foram capazes de resistir a intensidades maiores que 900J/m<sup>2</sup> de radiação UVC e

mais que 30 minutos de exposição à radiação UV ambiental, respectivamente. Mais recentemente, Touchette D et al. (2022) isolaram a suposta nova cepa psicrotolerante *Rhodotorula* JG1b de solo de permafrost, a qual foi capaz de crescer em temperaturas de -10,0 °C e tolerou até 15% de NaCl e 12% de perclorato.

Além disso, estudos têm relatado que o uso de carotenoides pela espécie de *R. mucilaginosa* com capacidade de produzir antioxidantes, antibacterianos, antibiofilme não são citotóxicos, surgindo como uma excelente alternativa para a descoberta de novos produtos com aplicações biotecnológicas (Coutinho et al. 2022).

No entanto, experimentos adicionais são necessários para confirmar com efetividade o gênero/espécie das leveduras. Para isso, é necessário sequenciar as regiões de interesse utilizando primers, como o espaçador transcrito interno-ITS.

## 7.7 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que o solo da Geleira *Collins* na Antártica possui uma rica diversidade de gêneros fúngicos, como substratos promissores para caracterização de novas espécies, como *Pseudogymnoascus shaanxiensis* e *Talaromyces cnidii* relatadas aqui pela primeira vez no continente.

A Geleira *Collins* demonstrou ser dominada por espécies psicrófilas do gênero *Pseudogymnoascus* endêmicas e cosmopolitas, com perspectiva para a descrição de novas espécies adicionais pertencentes ao gênero. Foi descoberta uma comunidade fúngica rica e diversificada, com um total de oito gêneros, incluindo espécies não relatadas antes na geleira de estudo. Além disso, esta comunidade foi dominada por táxons do gênero *Pseudogymnoascus*, entre elas, quatro espécies relatadas como produtoras de pigmentos em meio extracelular, com capacidade de produzir substâncias bioativas, que podem representar vias genéticas e bioquímicas únicas, capazes de gerar novos metabólitos secundários com diversas aplicações biotecnológicas.

Os resultados do estudo poderão auxiliar sobre a taxonomia, distribuição e colonização de diversos gêneros fúngicos e suas adaptações a condições extremas. Além disso, os resultados também proporcionam possíveis indicações de novas espécies presentes no continente Antártico. No entanto, mais estudos utilizando técnicas de genoma completo e desreplicação química serão necessários para determinar o número de diferenças moleculares dessas espécies, identificar e caracterizar seus compostos bioativos.

## 8 CAPÍTULO 3: PRODUÇÃO DE PIGMENTOS POR FUNGOS ANTÁRTICOS

### 8.1 RESUMO

Devido a globalização e preocupação da população com a saúde, a busca por pigmentos de fontes naturais tem aumentado cada vez mais, uma vez que pigmentos sintéticos têm sido associados com graves riscos à saúde. Assim, pigmentos produzidos por microrganismos, especialmente fungos, são fontes potenciais de pigmentos naturais. Além disso, esses pigmentos adicionam recursos extras como atividade antioxidante, antimicrobiana, antiparasitária e antitumoral. Com o passar dos anos, a resistência aos antimicrobianos se tornou um dos maiores problemas para saúde pública, por isso muitos estudos se esforçam na busca por novas alternativas de tratamento para infecções causadas por microrganismos resistentes. Fungos de ambientes frios tem se mostrado como uma abordagem promissora na busca de biomoléculas com potencial antimicrobiano. Diante disso, o objetivo deste capítulo foi avaliar a produção e caracterização dos pigmentos quanto o seu perfil de absorbância e testar a atividade antimicrobiana de pigmentos naturais a partir de seis linhagens fúngicas adaptadas ao frio de *Curvularia* sp. (1 isolado), *Talaromyces* sp. (1 isolado) e *Pseudogymnoascus* sp. (4 isolados). Os fungos de estudo produziram pigmentos em meio sólido de arroz em frascos Roux a 15,0 °C durante 14 dias. Após a produção, as extrações dos pigmentos foram realizadas utilizando três solventes: metanol, água e acetato de etila. Tais pigmentos foram parcialmente caracterizados por meio de UV/vis, como pertencentes à classe das melaninas, carotenoides e policetídeos (azafilona e naftoquinona). Posteriormente, foi realizada uma triagem da atividade antimicrobiana pelo método de bloco de difusão em ágar, a qual demonstrou que o pigmento extraído em acetato de etila pelos isolados do gênero *Pseudogymnoascus* sp.: SC04.P3, SC12.P3, SC32.P3 e ACF093 exibiram halo de inibição para pelo menos uma das cepas padrão testadas, a bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538).

**Palavras chave:** Antártica; pigmentos; *Pseudogymnoascus*; *Talaromyces*.



## 8.2 INTRODUÇÃO

Pigmentos naturais são provenientes de diversas fontes como plantas, insetos, minerais e microrganismos. Dentre os microrganismos, os fungos filamentosos apresentam-se como os produtores mais eficientes (Sharid et al. 2013). Com o aumento dos problemas relacionados aos corantes sintéticos, os produtos provindos de fonte naturais e sustentável vêm ganhando destaque devido aos benefícios como: fonte renovável, de baixo impacto ambiental e alta capacidade para biodegradação (Sharid et al. 2013).

Os fungos adaptados ao frio estão ganhando cada vez mais reconhecimento devido ao seu significado ecológico e biotecnológico. Esses fungos apresentam compostos de aplicações comerciais em diferentes indústrias, como têxtil, alimentícia e farmacêutica (Mitrovic et al. 2011). Eles também possuem propriedades biológicas como anticancerígenas, antioxidantes, anti-inflamatória, antimicrobianas e anti-parasitárias (Kumaresan et al. 2008).

Os pigmentos são geralmente produzidos no citoplasma da célula como resposta a condições ambientais adversas (Pagano e Dhar 2015), como radiação UV, ciclos de congelamento e degelo, escassez de água e nutrientes (Fell et al., 2006; Gonçalves et al., 2012), condições essas presentes no continente Antártico. Diferentes pigmentos (carotenoides, melanina, cantaxantina e astaxantina) ajudam a melhorar a sobrevivência dos fungos e tendem a se acumular em resposta ao estresse ambiental (Bhosale 2004). Além disso, fungos pigmentados podem tolerar altas incidências de radiação UV melhor do que fungos não pigmentados (Pulschen et al. 2015; Kreusch e Duarte, 2021).

A região da Antártica, sendo um dos pontos mais frios do planeta, além de ter condições climáticas extremas, oferece um enorme potencial para o isolamento de uma microbiota única com ricas aplicações biotecnológicas (Rosa et al. 2019). Sendo assim, fungos antárticos produtores de pigmentos já foram descritos por produzirem melaninas (Pacelli et. al 2017), carotenoides (Singh et al. 2014; Trochine et al. 2017), como é o caso de *Geomyces* sp.WNF-15<sup>a</sup>, produtor de pigmento vermelho-púrpura (Wang et al. 2013), e o endêmico *Antarctomyces pellizariae*, com pigmento intracelular azul (De Menezes et al. 2017).

O filo Ascomycota, o mais representativo no continente antártico, tem um grande potencial para produzir pigmentos que podem ser utilizados como alternativa aos pigmentos sintéticos (Shi et al. 2021). Os fungos filamentosos produtores de pigmentos mais estudados pertencem aos gêneros *Talaromyces*, *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Monascus*, *Neurospora* e *Penicillium* (Dufosse et al. 2014; Gmoser et al. 2017). O gênero *Monascus*, apesar de produzir vários tipos de pigmentos (vermelho: monascorubina, monascorubramina e

rubropunctamina, amarelo: ankaflavina e xantomonascina e laranja: Rubropunctatina) (Pattanagul P. et al. 2008), produz uma micotoxina (citrinina) potencialmente cancerígena (Liang et al. 2018). Com isso, há o aumento no interesse dos cientistas para a exploração de novas espécies de fungos com potencial para produzir pigmentos naturais seguros.

Vários relatos de espécies de *Pseudogymnoascus* foram descritos indicando a potencialidade das espécies em produzir compostos com bioatividades (Shi et al. 2021), como por exemplo solubilização de fosfato, biodegradação, produção de enzimas e pigmentos (Pandey et al. 2008, 2016). A diversidade de fungos psicrotolerantes tem sido explorada ao longo do tempo, novas espécies de *Pseudogymnoascus* isoladas do continente Antártico foram descritas recentemente por Villanueva et al. (2021). No entanto, poucos estudos foram feitos sobre os metabólitos secundários do gênero mostrando atividades antimicrobianas (Shi et al. 2021). Diante disso, considerando o potencial dos microrganismos antárticos, espécies de *Pseudogymnoascus* vêm sendo cada vez mais estudados para a obtenção de pigmentos naturais e outros produtos com usos biotecnológicos.

Sendo assim, o objetivo deste estudo buscou-se realizar uma triagem com três gêneros de fungos filamentosos psicrotolerantes produtores de pigmentos: *Curvularia*, *Talaromyces* e *Pseudogymnoascus*, com foco na extração, caracterização dos pigmentos e análise da bioatividade dos pigmentos, avaliando sua atividade antimicrobiana contra patógenos de interesse clínico.

## 8.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 8.3.1 Fungos e meio de cultivo

Os fungos pigmentados incluídos neste estudo pertencem aos gêneros *Curvularia* (1), *Talaromyces* (1) e *Pseudogymnoascus* (4). Os isolados foram adquiridos de amostras de solo de degelo da Geleira *Collins*, na Antártica. O processo de isolamento e reativação dos isolados está descrito no Capítulo II desta dissertação.

Os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA. Após o cultivo por 7 a 14 dias de incubação a 15,0 °C, as cepas foram selecionadas de acordo com o tamanho, forma e cor das colônias. Os isolados fúngicos que apresentaram produção de pigmentos em meio extracelular foram purificados e selecionados para as etapas posteriores. Sendo assim, as culturas puras foram armazenadas em ultrafreezer a -80,0 °C.

### 8.3.2 Triagem morfológica dos fungos pigmentados

Os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA por 7 a 14 dias de incubação a 15,0 °C. Após isso, a triagem morfológica foi realizada com um total de 61 isolados de fungos filamentosos e observada a produção de pigmento em meio extracelular. Dentre estes, seis mostram-se produtores de pigmentos. A maioria dos fungos que produzem pigmentos extracelulares são adequados para aplicações industriais, pois tais pigmentos são mais facilmente recuperados (Velmurugan et al. 2010; Venil et al. 2020). Diante disso, os isolados foram analisados e classificados quanto à forma e a coloração.

### 8.3.3 Cultivo submerso

Estudou-se as estratégias de produção dos pigmentos e a fim de obter-se a produção do pigmento em meio líquido. O objetivo deste estudo foi relacionar as suas alterações morfológicas com a formação de altas e baixas concentrações de pigmentos. Desta forma, tomaram-se as amostras em frascos tipo Erlenmeyer, contendo 50 mL de caldo Sabouraud (pH 5,0). Utilizando um perfurador de 5mm foram feitos 3 discos dos fungos filamentosos e incubados sob as mesmas condições de agitação (150 rpm) e temperatura (15,0 °C) em agitador tipo shaker por 7 dias. Com a observação do pigmento ao meio, foi realizada a filtração em um funil de separação, utilizando gaze e algodão, ambos estéreis, para a remoção do micélio fúngico.

#### *8.3.4 Cultivo em estado sólido*

O cultivo dos fungos para produção de pigmentos foi realizado em suporte de arroz. Os ensaios para o cultivo em estado sólido foram realizados em frascos tipo Roux de 500 mL contendo 200 g de arroz orgânico cozido e 200 mL de água destilada. Os frascos foram submetidos a esterilização em autoclave a 121,0 °C por 30 min (Da silva V.L et al. 2021). Após resfriamento, utilizando um perfurador, foram retirados 5 discos de 5mm da colônia de cada fungo que foram inseridos nos frascos contendo o meio de cultura esterilizado e incubados por 14 dias a 15,0 °C.

#### *8.3.5 Extração dos pigmentos do meio de cultivo sólido*

Para as etapas de extração dos pigmentos e testes posteriores, optou-se por utilizar apenas os extratos do meio sólido de arroz, por ter uma maior concentração do pigmento ao meio e para ter uma comparação com todos os pigmentos fúngicos no mesmo substrato. Além disso, o meio de arroz é rico em amido que é facilmente degradado pelos fungos sem presença de lignina (Okamoto k et al. 2011), que pode interferir negativamente no processo de produção do pigmento.

A extração foi realizada com os solventes metanol, água e acetato de etila (Hagerthey, S. et al. 2006). O meio cultivado (arroz cultivado juntamente com os fungos) foi macerado com os respectivos solventes mencionados (100 mL) e deixado em repouso por 2 horas em temperatura ambiente. Na sequência, o extrato foi filtrado em funil com auxílio de gaze e algodão (estéreis).

#### *8.3.6 Avaliação do Perfil de Absorbância dos Pigmentos*

Os pigmentos diluídos em diferentes solventes, como metanol, água e acetato de etila foram submetidos aos ensaios de varredura da absorbância em espectrofotômetro marca MultiSpec-1501. A leitura se deu entre 400 nm e 700 nm (espectro de luz visível) (Valenzuela, G. et al. 2021). A calibração do equipamento se deu com a solução branco para zerar, utilizando apenas os respectivos solventes anteriormente mencionados.

### 8.3.7 Produção do extrato para teste antimicrobiano

Os extratos com os respectivos solventes (acetato de etila e metanol) foram colocados em capela de exaustão por 48h, nos quais o líquido (solvente) foi transformado em produto seco. Para o teste antimicrobiano, foram utilizados os extratos dos pigmentos seco obtido no processo de secagem e em seguida adicionado 1 mL do solvente orgânico Dimetilsulfóxido (DMSO) (Vinken M et al. 2017) com concentração de 0,1%.

### 8.3.8 Avaliação da atividade antimicrobiana por bloco de difusão em ágar

Testaram-se as linhagens *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922), *Candida albicans* ATCC 10231, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, cedidas gentilmente pela Prof. Fabienne Ferreira, do Laboratório de Genética Molecular Bacteriana (GeMBac) da UFSC.

Para o preparo do inóculo as linhagens foram crescidas em Ágar Mueller-Hinton (KASVI) à 37,0 °C por 24h e então uma suspensão celular com uma concentração aproximada de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL foi obtida com solução salina estéril (NaCl 0,85% m/v), de acordo com a escala 0,5 de McFarland (CLSI, 2018). Em seguida, cada inóculo foi inoculado em placas contendo Ágar Mueller-Hinton através de um swab estéril. Cada placa continha, previamente, poços de 6 mm de diâmetro. Em seguida, 70 µL de cada cultivo fúngico do extrato do pigmento foi aplicado no poço. O controle positivo utilizado foi 70 µL de clorexidina 0,2% (p/v) no poço, e o controle negativo foi a adição de 70 µL de DMSO 1% (p/v), usado para diluir o extrato seco. Para cada amostra foi realizada uma replicata técnica e o teste foi repetido duas vezes nas mesmas condições para replicação biológica dos resultados. As placas foram então incubadas por 24h à 37,0 °C (CLSI, 2018). O resultado foi considerado positivo quando observada presença de halo de inibição ao redor dos poços.

## 8.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

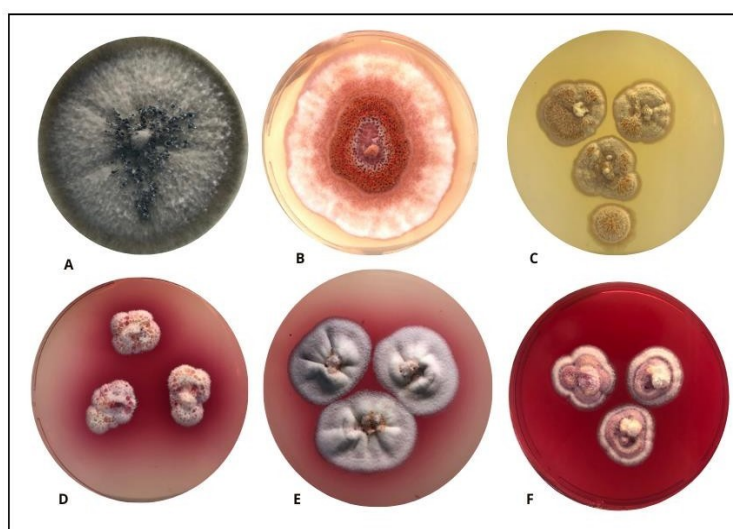
### 8.4.1 Triagem dos gêneros fúngicos pigmentados

Os resultados da triagem dos fungos filamentosos com sua identificação molecular e o perfil de absorvância dos pigmentos estão apresentados na Tabela 15. Após o período proposto de incubação das amostras (7 a 14 dias), foi possível observar que seis isolados apresentaram potencial para produzir pigmentos em meio extracelular, como observado na figura 19.

**Tabela 15.** Perfil de coloração e absorvância dos isolados produtores de pigmentos da Geleira *Collins*.

Isolado	Identificação molecular	Cor	Perfil de absorvância (nm)
SCUV07.P1	<i>Curvularia</i> sp.	Marrrom/preto	488
SC34.P3	<i>Talaromyces</i> sp.	Vermelho/laranja	495
SC12.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Rosa/violeta	540
SC32.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Rosa/violeta	540
SC04.P3	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Amarelo	400
ACF093	<i>Pseudogymnoascus</i> sp.	Rosa/violeta	540

**Figura 19.** Seleção dos isolados produtores de pigmentos da Geleira *Collins*. **A.** *Curvularia* sp. (SCUV07.P1); **B.** *Talaromyces* sp. (SC34.P3); **C.** *Pseudogymnoascus* sp. (SC04.P3); **D.** *Pseudogymnoascus* sp. (SC12.P3); **E.** *Pseudogymnoascus* sp. (SC32.P3); **F.** *Pseudogymnoascus* sp. (ACF093).



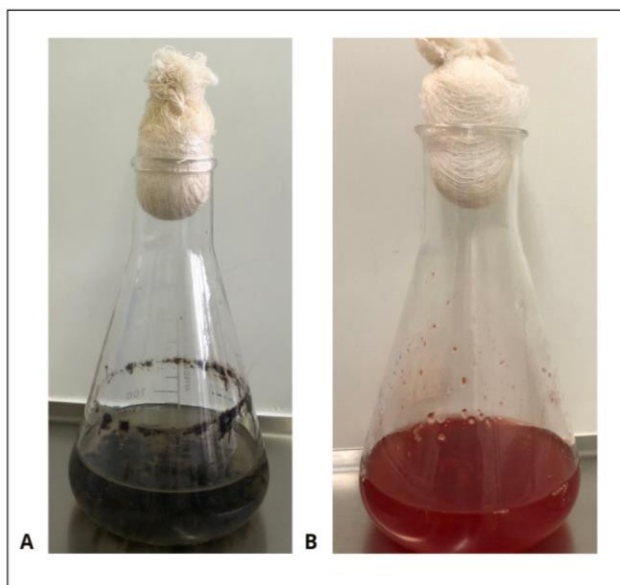
Fonte: Autor (2022)

Os bioprocessos conduzidos neste estudo foram em cultivo submerso e cultivo em estado sólido. O cultivo em estado sólido compreende o crescimento microbiano e a formação de produtos em menores valores de água livre (Lin 1973). Este processo possui algumas

vantagens em relação ao cultivo submerso como a elevada produção, baixos custos de operação e de investimento, além da simplificação dos processos de recuperação do produto de interesse (Miyashira et al. 2003).

Uma das condições para o sucesso do cultivo é a utilização de baixa umidade inicial no substrato, reduzindo o risco de contaminação (Juzlova, Martinkova e Kren, 1996). Além disso, Lin (1973) demonstrou que a produção de pigmentos em cultura submersa foi muito menor do que quando comparado com o cultivo em estado sólido (10%). Esses dados corroboram com os cultivos feitos com fungos da Antártica, no qual apenas um isolado de *Curvularia* sp. SCUV07.P1 e um isolado de *Talaromyces* sp. SC34.P3 conseguiram apresentar produção de pigmento em cultivo submerso nas condições testadas (Figura 20).

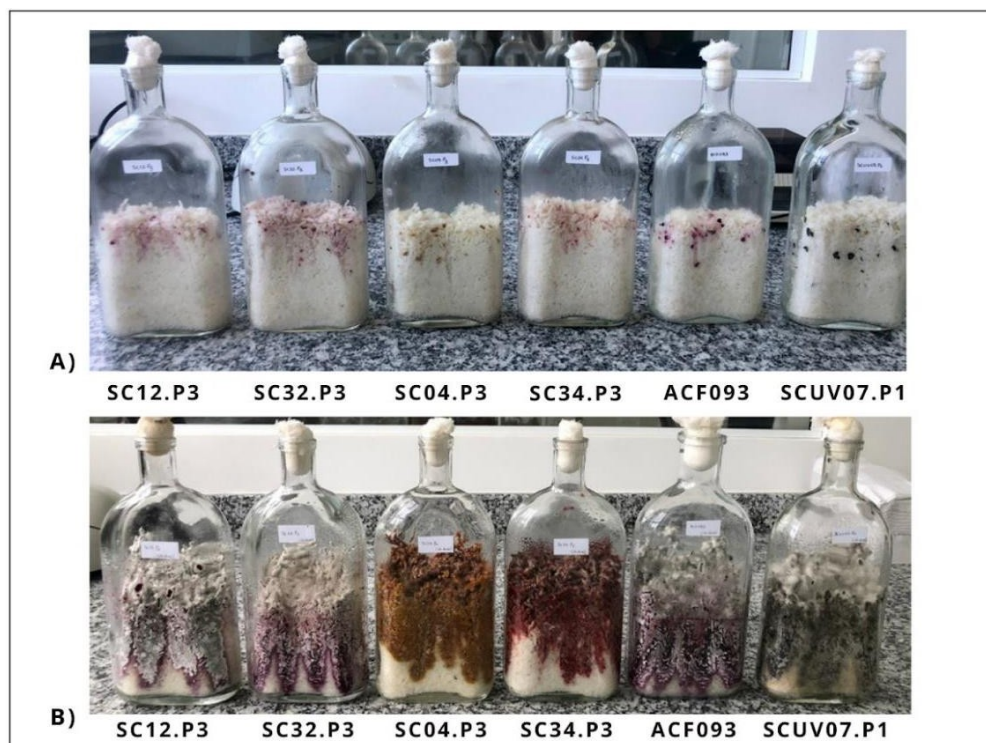
**Figura 20.** Isolados produtores de pigmentos em caldo Sabouraud. **A:** *Curvularia* sp. (SCUV07.P1); **B:** *Talaromyces* sp. (SC34.P3) em shaker a 150 rpm, após 7 dias a 15,0 °C.



Fonte: Autor (2022)

Desta forma, optou-se por utilizar o cultivo em estado sólido para as etapas posteriores de produção e extração, a fim de comparar a otimização de pigmentos com todos os fungos em um mesmo substrato (Figura 21). Além disso, a fim de reduzir custos no desenvolvimento de bioprocessos, substratos de baixo custo e com ausência de substâncias inibidoras, como o arroz, são preferíveis (Da Silva VL et al. 2021).

**Figura 21.** Isolados produtores de pigmentos em meio sólido contendo arroz após 2 dias de cultivo (A) e após 14 dias de cultivo (B) a 15,0 °C.



Fonte: Autor (2022)

#### 8.4.2 Extração dos pigmentos com diferentes solventes

A extração do pigmento é feita por diferenças na composição das paredes celulares e na polaridade do pigmento (Wright et al. 1997). A escolha do solvente deve ser feita para não interferir em sua estrutura, observando a capacidade do pigmento ser dissolvido e extraído (Nwoba et al. 2020). A estrutura química é um parâmetro chave relacionado ao método de extração de pigmentos, afetando também sua solubilidade tanto em água quanto em solventes orgânicos (Kantifedakia A et al. 2018). A verificação da solubilidade dos pigmentos em solvente polar foi realizada em água. O extrato aquoso dos pigmentos pode ser observado na Figura 22.



**Figura 22.** Extração aquosa dos pigmentos produzidos por *Pseudogymnoascus* sp. SC12.P3; *Pseudogymnoascus* sp. SC32.P3; *Talaromyces cnidii* SC34.P3; *Pseudogymnoascus* sp. SC04.P3; *Pseudogymnoascus* sp. ACF093 e *Curvularia affinis* SCUV07.P1, respectivamente.



Fonte: Autor (2022)

A maioria dos fungos produz pigmentos extracelulares que são solúveis em água, ideais para aplicações em diferentes indústrias (Velmurugan et al. 2010; Venil et al. 2020). Por outro lado, compostos pigmentados intracelulares e insolúveis em água requerem extração convencional com solventes orgânicos (Hu et al. 2012).

O uso de solventes orgânicos é uma opção simples, fácil e viável para extração de pigmentos (Rammuni et al. 2018). Em comparação com outros métodos, a extração de pigmentos com solventes orgânicos frequentemente atinge resultados eficientes ao ponto de ser destinados para grandes processos industriais (Ceróngarcía et al. 2018). Estudos relatam várias metodologias para extração de pigmentos baseadas na utilização de solventes orgânicos como etanol e/ou metanol (Kantifedakia A et al 2018). Carvalho et al. (2005) relataram que o etanol tem desempenho quase igual ao metanol em termos de eficiência/pureza de extração do pigmento.

O rendimento do pigmento depende de como o solvente é capaz de recuperar compostos cuja sua polaridade é similar (Almeida et al. 2012). Neste estudo, os pigmentos dos seis isolados apresentaram comportamentos diferentes. Os testes de estabilidade mostraram que o isolado *T. cnidii* SC34.P3 apresentou afinidade com solvente de polaridade maior, como extrato metanólico. O metanol é um solvente no qual carotenoides apresentaram maior estabilidade (Rivera et al. 2012).

Os isolados de *C. affinis* SCUV07.P1 e os de *Pseudogymnoascus* sp. SC04.P3, SC12.P3, SC32.P3 e ACF093 apresentaram natureza de extração similar para os três solventes analisados (metanol, água e acetato de etila). Os pigmentos produzidos por *Pseudogymnoascus* sp. derivados de policetídeos apresentaram maior estabilidade em água e foram menos afetados

negativamente. Pigmentos policetídeos do filo Ascomycota têm sido relatados com atividade antioxidante semelhante ao corante natural curcumina, produzindo pigmento amarelo solúvel em água pelo fungo *Epicoccum nigrum* (Mapari et al. 2010).

Após análise dos pigmentos, os solventes orgânicos metanol e acetato de etila foram selecionados para este estudo, para verificar o efeito do solvente na extração sólido-líquido dos pigmentos produzidos pelos fungos aqui estudados. Para todos os experimentos de extração e procedimentos analíticos, foram usados solventes com pureza acima de 96% (Merck®, Alemanha).

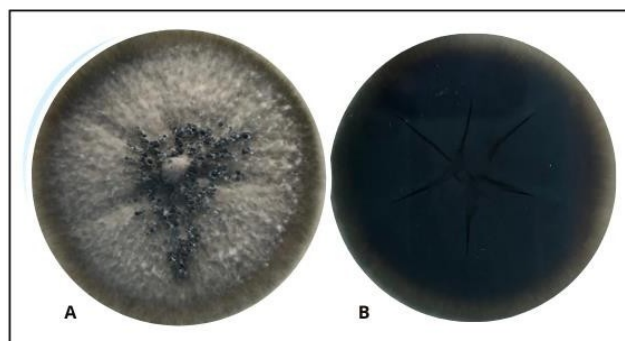
#### 8.4.3 Extração, caracterização e identificação dos pigmentos

Para a caracterização dos pigmentos dos isolados, os extratos contendo os pigmentos (conforme descritos anteriormente) foram analisados por UV-vis para identificar as moléculas de ligação. O extrato de metanol foi selecionado para avaliar o perfil de absorbância dos pigmentos.

#### 8.4.4 *Curvularia affinis* SCUUV07.P1

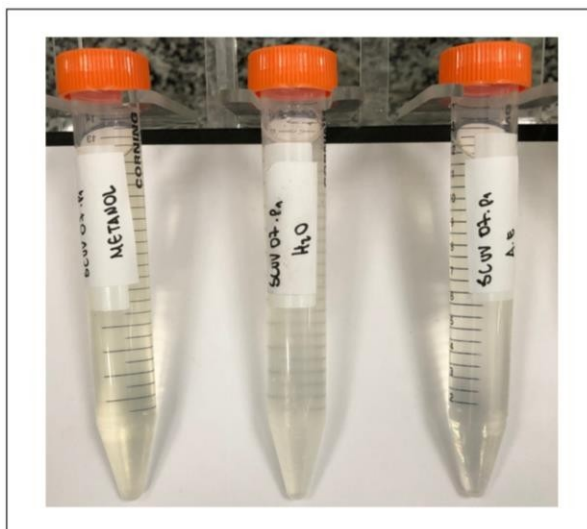
O fungo *C. affinis* SCUUV07.P1 produtor de pigmento preto/marrom em meio extracelular foi cultivado em placa com meio BDA a 15,0 °C (Figura 22). A extração do pigmento com os solventes: metanol, água e acetato de etila pode ser observada na figura 23.

**Figura 23.** Fungo produtor de pigmento em meio extracelular pelo isolado fúngico *C. affinis* SCUUV07.P1 (A: frente; B: verso).



Fonte: Autor (2022)

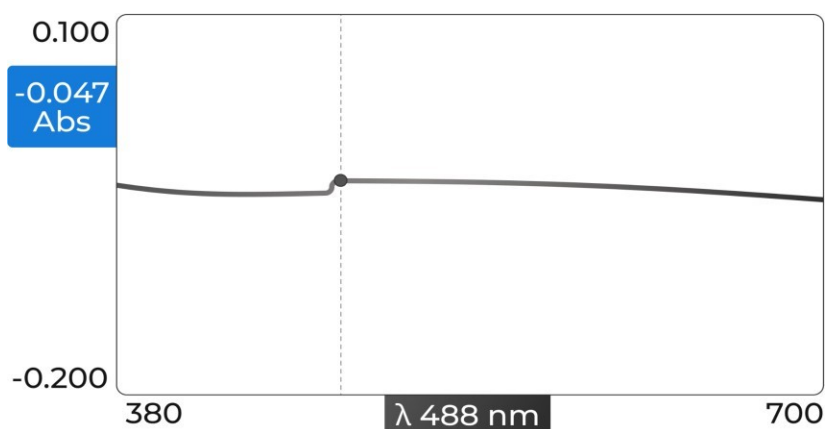
**Figura 24.** Extração do isolado *C. affinis* SCUV07.P1 em solventes (metanol, água e acetato de etila, respectivamente).



Fonte: Autor (2022)

Após a extração com os três solventes, os pigmentos apresentaram a mesma característica, não sendo possível visualizar o pigmento preto/marrom do meio de cultivo extracelular (Figura 24). A verificação da mudança colorimétrica deve-se pela melanina ser insolúvel em água e solventes orgânicos (Guo et al. 2014). Apesar disso, a parte separada dos solventes foi submetida a varredura em um espectrofotômetro UV-vis e o lambda max ( $\lambda_{max}$ ) característico do pigmento foi registrado (Figura 25). O pigmento inicial visto apresenta pico de absorvância em metanol na faixa de luz visível em 488 nm, correspondendo ao perfil característico descrito em literatura como pigmento do tipo melanina.

**Figura 25.** Perfil de absorvância do pigmento em metanol do isolado *C. affinis* SCUV07.P1.



Fonte: Autor (2022)

As melaninas são um grupo de pigmentos naturais complexos, sendo encontradas em todos os grupos biológicos e caracterizadas pela coloração preto-marrom (Zhang w. et al. 2020). Nos últimos anos, há um crescente interesse no estudo do pigmento melanina e seus derivados para o desenvolvimento de produtos na área médica, industrial, alimentícia e cosmética (Ghattavi, K. et al. 2022). A melanina desempenha um papel importante no desenvolvimento de produtos benéficos com atividade antioxidantes, anti-inflamatórios, imunomoduladores, radioprotetores e gastrointestinais (Ghattavi, K. et al. 2022).

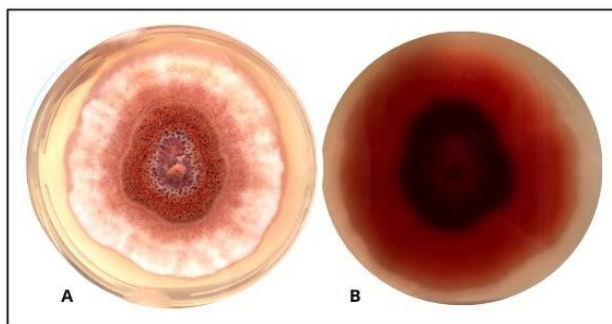
O isolado de estudo *C. affinis* SCUUV07.P1 apresenta produção de pigmento em meio extracelular, facilitando o processo de extração, pois a melanina encontra-se presente fora da célula fúngica, diferente da melanina contida na parede celular, o que dificulta a extração (Liu R et al. 2022).

Os fungos antárticos vêm sendo descritos como potentes produtores de melanina como resposta às condições ambientais extremas, sendo envolvidos principalmente na proteção contra alta radiação UV, dessecação, salinidade e oxidação (Pacelli C et al. 2020). Além disso, vários estudos reportam a diversidade do pigmento encontrado no continente Antártico por diversos gêneros fúngicos (Rosa et al. 2019), com capacidade de sobrevivência a altos níveis de radiação por espécies melanizadas (Pacelli C et al. 2020).

#### 8.4.5 *Talaromyces cnidii* SC34.P3

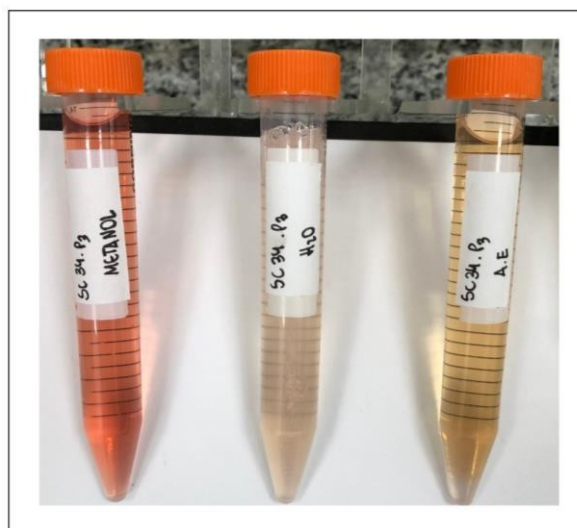
O fungo *T. cnidii* SC34.P3 produtor de pigmento vermelho/alaranjado em meio extracelular foi cultivado em placa com meio BDA a 15,0 °C (Figura 26). A característica dos extratos em diferentes solventes pode ser observada na Figura 27.

**Figura 26.** Fungo produtor de pigmento em meio extracelular pelo isolado fúngico *T. cnidii* SC34.P3 em meio BDA (A: frente; B: verso).



Fonte: Autor (2022)

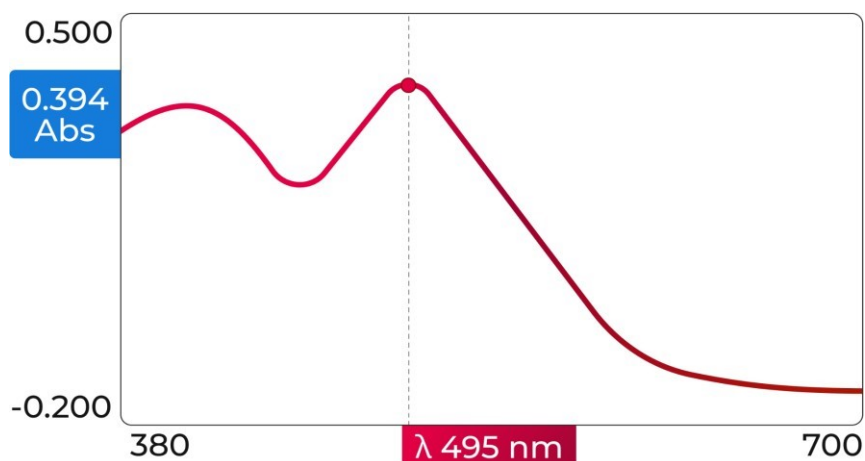
**Figura 27.** Extração do isolado *T. cnidii* SC34.P3 em solventes (metanol, água e acetato de etila, respectivamente).



Fonte: Autor (2022)

Embora os três solventes tenham possibilitado a extração de pigmento, os solventes metanol e acetato de etila conseguiram obter maior concentração de pigmento (Figura 27), então, considerados os mais adequados para fins de extração. A varredura sob espectroscopia UV-vis resultou em um pico de absorção principal do extrato em metanol a 495 nm. Uma visão geral do perfil do pico de absorbância do pigmento em metanol é mostrada na Figura 28.

**Figura 28.** Perfil de absorbância do pigmento em metanol do isolado *T. cnidii* SC34.P3.



Fonte: Autor (2022)

Pandey et al. (2018) demonstraram que o pigmento vermelho/alaranjado produzido por fungo do gênero *Penicillium* também resultou em um pico de absorção principal em 495 nm, sendo um candidato promissor para a produção de carotenoides que mostraram atividade contra bactérias e actinobactérias. Os carotenoides são comumente encontrados nos pigmentos amarelo, laranja ou vermelho e são classificados como compostos antioxidantes (KX Ye et al. 2019) que desempenham o papel de precursores da vitamina A ou como antioxidantes, além de auxiliar na prevenção de doenças degenerativas e crônicas (Wang Y et al. 2022).

A espécie *T. cnidii* produz pigmentos de azafilona semelhantes a *Monascus* (Lagashetti et al. 2019). Vários estudos identificaram espécies de *Talaromyces* que produzem pigmentos vermelhos do tipo *Monascus* (produzida por *Monascus* spp.) sem a coprodução de micotoxina, como a citrinina (Zhao et al. 2018). Espécies de *Talaromyces* como *T. purpurogenus*, *T. albobiverticillius*, *T. marneffei* e *T. minioluteus* produzem grandes quantidades de pigmento vermelho (Venkatachalam et al. 2020). Portanto, estudos recentes exploram a possibilidade de substituição de pigmentos produzidos por cepas não micotoxigênicas do gênero fúngico *Talaromyces* em escala industrial (Rapoport A et al. 2021).

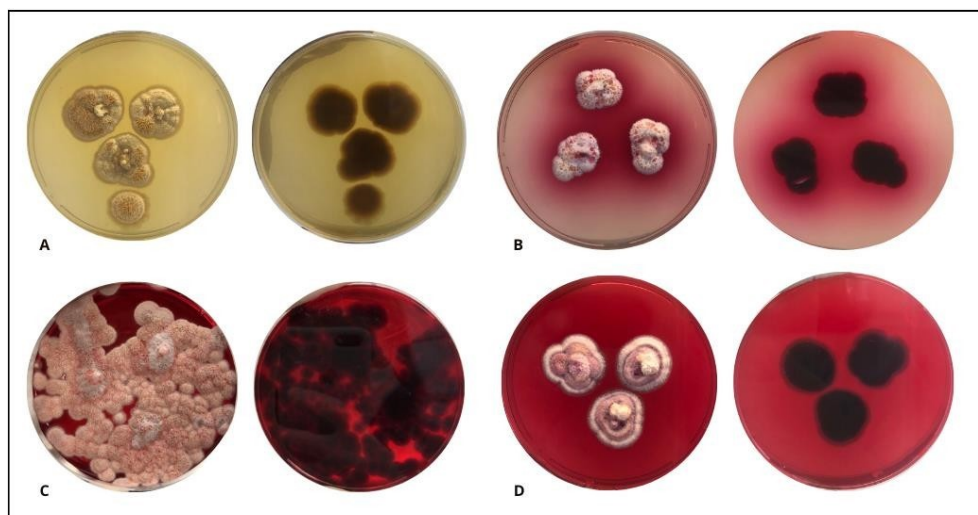
A partir do presente estudo pode-se concluir que o fungo psicrófilico *T. cnidii* SC34.P3 é um isolado promissor para a produção de pigmento vermelho/alaranjado. Devido às descobertas atuais referentes à produção de pigmentos mais sustentáveis, o isolado relatado aqui pode ser usado no futuro para aplicações em alimentos, cosméticos ou diferentes indústrias farmacêuticas; após a realização de estudos completos e convencionais de sua segurança e toxicidade.

#### 8.4.6 *Pseudogymnoascus* spp.

No presente estudo, quatro fungos produtores de pigmentos foram identificados como sendo do gênero *Pseudogymnoascus*. O isolado *Pseudogymnoascus* sp. SC04.P3 apresentou coloração amarela, enquanto *Pseudogymnoascus* sp. SC12.P3, SC32.P3 e ACF093 apresentaram coloração rosa/violeta. Os resultados mostraram que o perfil de absorbância do isolado SC04.P3 foi em 400 nm, e os isolados SC12.P3, SC32.P3 e ACF093 apresentaram absorbância em 540 nm.

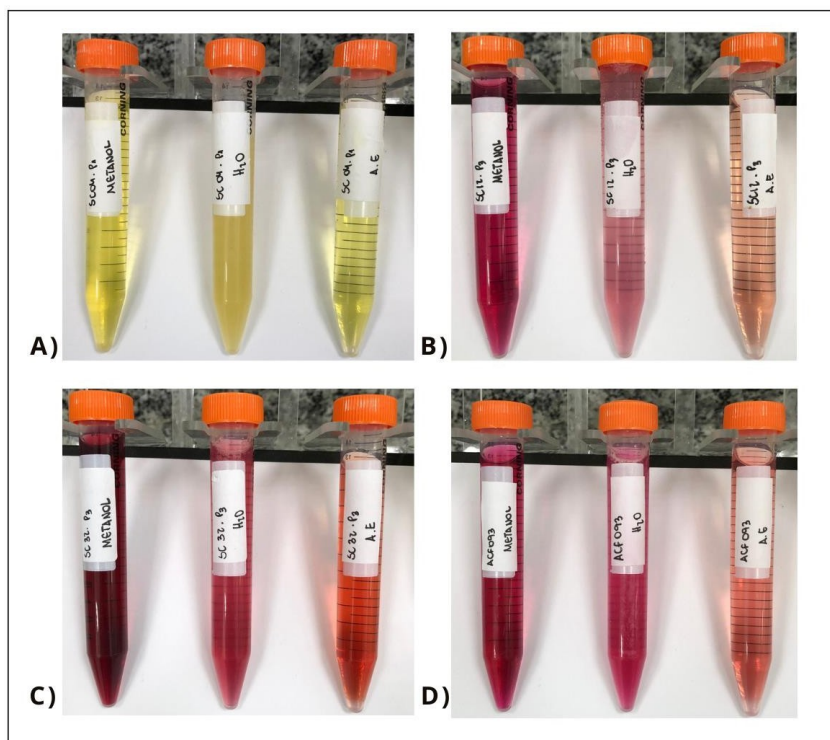
Os fungos produtores de pigmentos extracelulares foram cultivados em placas com meio BDA a 15,0 °C (Figura 29) e a produção do pigmento pode ser observado na Figura 30.

**Figura 29** Fungos produtores de pigmento em meio extracelular pelos isolados fúngicos **A.** *Pseudogymnoascus* sp. SC04.P3, **B.** *Pseudogymnoascus* sp. SC12.P3, **C.** *Pseudogymnoascus* sp. SC32.P3, **D.** *Pseudogymnoascus* sp. ACF093 de solo da Geleira Collins cultivados em meio BDA por 14 dias a 15,0 °C.



Fonte: Autor (2022)

**Figura 30.** Extração dos isolados em metanol **A.** *Pseudogymnoascus* sp. SC04.P3; **B.** *Pseudogymnoascus* sp. SC12.P3; **C.** *Pseudogymnoascus* sp. SC32.P3; **D.** *Pseudogymnoascus* sp. ACF093 em solventes (Metanol, água e acetato de etila, respectivamente).



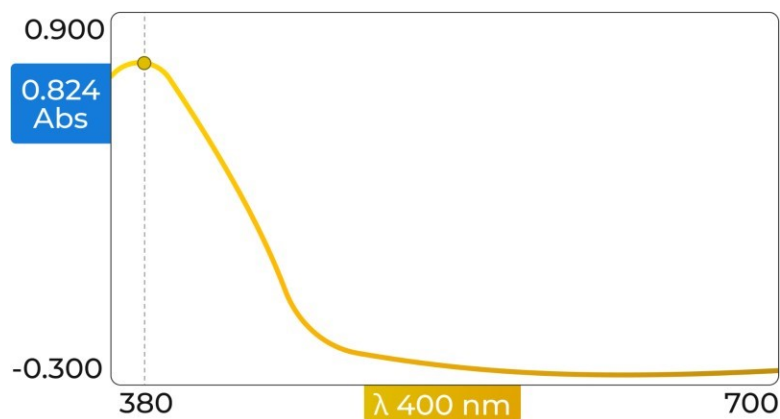
Fonte: Autor (2022)

A parte separada dos solventes foi submetida a varredura em um espectrofotômetro UV/vis e o perfil característico do pigmento foi registrado. Os três solventes analisados apresentaram extração significativa. Os quatro isolados antárticos do gênero *Pseudogymnoascus* são produtores de pigmentos e possuem o diferencial de serem solúveis em água, não exigindo solventes orgânicos. Isso os torna mais sustentáveis e menos custosos, podendo ser uma boa alternativa para substituir corantes sintéticos.

#### 8.4.7 *Pseudogymnoascus* sp. SC04.P3

A varredura sob espectroscopia UV-vis resultou em um pico de absorção principal em 400 nm. O perfil de absorbância do pigmento em metanol é mostrado na Figura 31.

**Figura 31.** Perfil de absorbância do pigmento em metanol do isolado *Pseudogymnoascus* sp. SC04.P3.



Fonte: Autor (2022)

O pico de absorbância em 400 nm do pigmento corresponde à cor observada amarelo e de acordo com o descrito na literatura. A linhagem produtora de pigmento amarelo, com perfil de absorbância em 400 nm por *Penicillium purpurogenum*, produziu pigmentos do tipo *Monascus* sem coprodução de micotoxinas (Carvalho et al. 2008). Em outro estudo, cepas de *Penicillium* (produtoras de pigmentos vermelho e amarelo) foram descritas com capacidade de sintetizar pigmentos azafilona do tipo *Monascus*, na ausência de micotoxinas (Mapari et al., 2010; Dufossé et al. 2014).

Os pigmentos de *Monascus* são metabólitos secundários, incluindo constituintes de coloração amarela (monascina e ankaflavina). Pigmentos amarelo e vermelho de *Monascus* sp. têm sido amplamente utilizados na indústria alimentícia (Panesar et al., 2015). No entanto, a



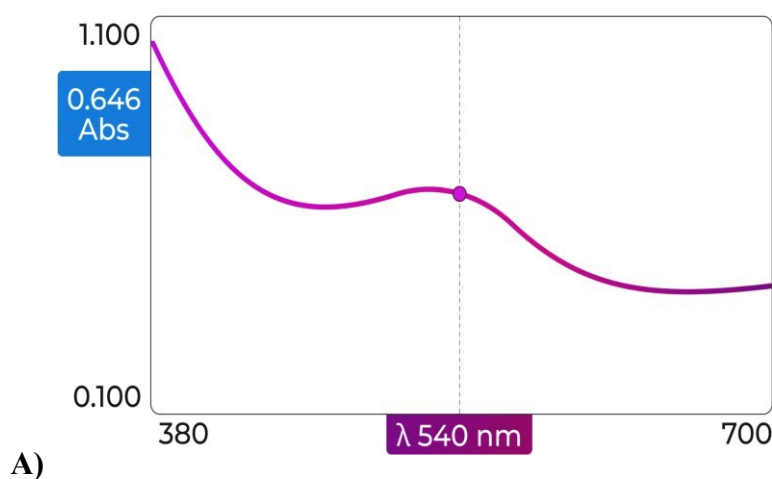
potencial produção de citrinina por cepas de *Monascus* impede sua comercialização na União Européia e nos EUA (Liang et al. 2018)

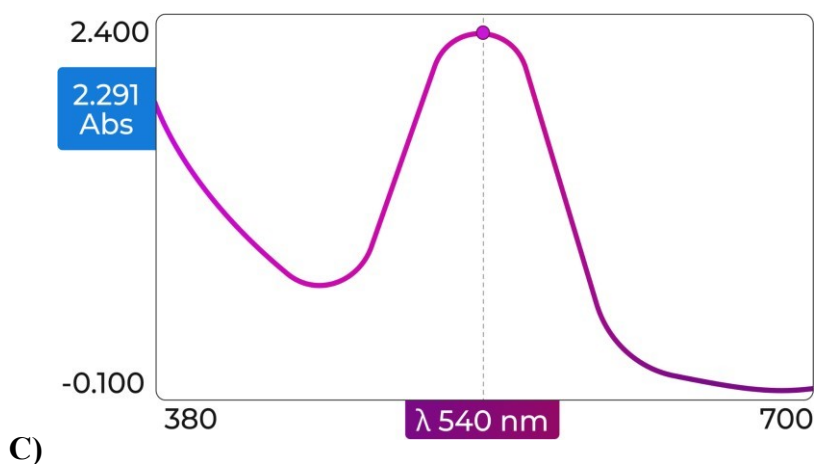
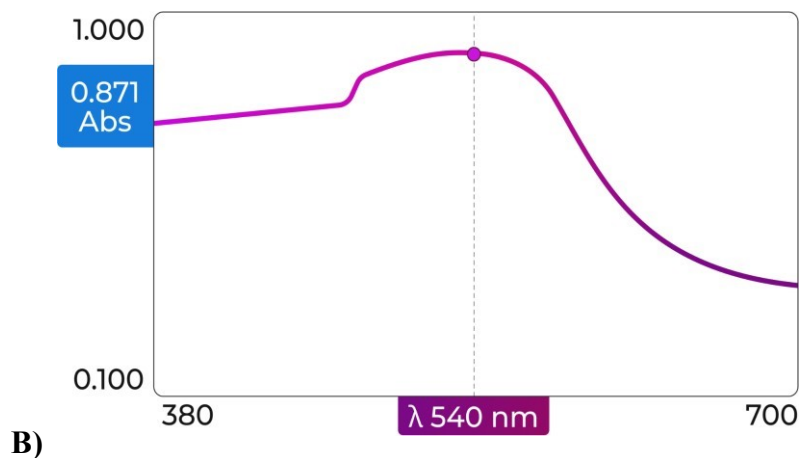
Azafilonas são derivados de policetídeos e compõem um grupo estruturalmente diverso de metabólitos secundários de fungos (Lin L et al. 2020). Fungos filamentosos, especialmente os ascomicetos, são frequentemente reportados por biossintetizar uma extraordinária gama de pigmentos azafilonas com uma ampla diversidade estrutural. Azafilonas apresentam atividades biológicas como citotóxica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral, antiviral e antioxidante (Pimenta LPS et al. 2021). Porém, não há relatos na literatura sobre a produção do pigmento azafilona por *Pseudogymnoascus* sp. Além disso, este estudo pode representar o primeiro relato de fungo antártico produtor de pigmento azafilona. Para isso, será necessário a realização de mais estudos sobre sua caracterização química, a qual se encontra em análise.

#### 8.4.8 *Pseudogymnoascus* sp. SC12.P3, SC32.P3 e ACF093

Os isolados produtores de pigmento rosa/violeta, apresentaram, sob espectroscopia UV-vis, um pico de absorção principal em 540 nm. Uma visão geral do perfil de absorbância dos pigmentos é mostrada na Figura 32.

**Figura 32.** Perfil de absorbância dos pigmentos em metanol pelos isolados *Pseudogymnoascus* sp. A. SC12.P3, B. SC32.P3, C. ACF093.





Fonte: Autor (2022)

O perfil de absorbância dos pigmentos de acordo com a literatura apresenta característica de naftoquinona. A espécie fúngica *Fusarium oxysporum* LCP531, produz pigmento roxo com pico de absorção de 510 a 550 nm (Lebeau J et al. 2018). As naftoquinonas são um grande grupo de metabólitos secundários obtidos de várias fontes, incluindo fungos, com potenciais biotecnológicos (Meruvu, H et al. 2021).

Os policetídeos fúngicos apresentam cores variadas representados por antraquinona, estruturas de hidroxiantraquinona, naftoquinona e azafilona (Mapari S et al. 2010). Estudos relataram novas naftoquinonas com presença de pigmento vermelho-violeta isoladas de *Trypethelium eluteriae*, que possuem atividades antioxidantes e citotóxicas contra linhagens de células cancerosas (Meruvu, H et al. 2021).

Pesquisas sobre o gênero *Pseudogymnoascus* produtores de pigmentos são escassas. Os resultados obtidos neste estudo indicam que pigmentos de fungos antárticos são potencialmente

promissores. O gênero apresenta-se como bom produtor de metabólitos secundários incluindo pigmentos, possivelmente azafilona e naftoquinona, e com isso reforça a necessidade de investigar ainda mais as rotas químicas/biológicas desses pigmentos. Assim, os isolados de *Pseudogymnoascus* de ambientes extremos podem produzir pigmentos raros, novos e eficientes com potencial para diversas aplicações biotecnológicas.

### 8.5 Atividade antimicrobiana em bloco de difusão em ágar

Para verificar a capacidade antimicrobiana dos extratos produzidos, os pigmentos foram testados através da técnica de bloco de difusão em ágar. Os resultados obtidos na triagem com blocos de ágar possibilitaram realizar uma seleção dos principais isolados fúngicos com atividade antimicrobiana. Os isolados com atividade positiva foram considerados aqueles que apresentaram um halo inibitório ao redor do bloco. Inicialmente, seis isolados fúngicos produtores de pigmento foram submetidos a esta triagem contra quatro microrganismos: *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Entre estes, apenas quatro (66%) apresentaram atividade contra as linhagens de microrganismos-teste. Os isolados que apresentaram atividade contra a linhagem padrão de *S. aureus* (ATCC 6538) foram os isolados fúngicos do gênero *Pseudogymnoascus*, representados pelos isolados SC04.P3, SC12.P3, SC32.P3 e ACF093, como observado na Tabela 16.

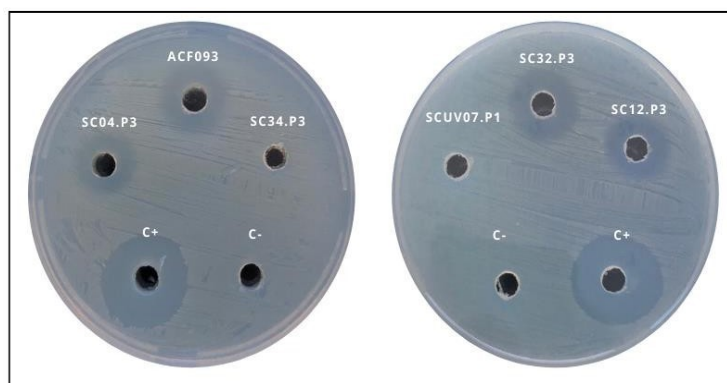
**Tabela 16.** Triagem da atividade antimicrobiana de pigmentos fúngicos em acetato de etila por metodologia de bloco de difusão em ágar.

Isolado fúngico	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Curvularia affinis</i> SCUV07.P1	-	-	-	-
<i>Talaromyces cnidii</i> SC34.P3	-	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. SC04.P3	+	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. SC12.P3	+	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. SC32.P3	+	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. ACF093	+	-	-	-

Legenda: + :observada presença de halo de inibição; -: não foi observado nenhum halo de inibição.

Os resultados dos testes com os pigmentos das culturas fúngicas foram extraídos com três solventes, metanol, água e acetato de etila. Os extratos dos pigmentos de *Pseudogymnoascus* sp. em acetato de etila apresentaram halos de inibição contra a cepa *S. aureus* (ATCC 6538) (Figura 33). Os halos foram medidos e detalhados abaixo (Tabela 17).

**Figura 33.** Atividade antibacteriana contra *S. aureus* dos pigmentos utilizando o solvente A.E dos isolados de *Pseudogymnoascus* sp. (SC04.P3, SC12.P3, SC32.P3 e ACF093).



Legenda: C+: controle positivo (clorexidina 0,2%) e C-: controle negativo (DMSO 0,1%).

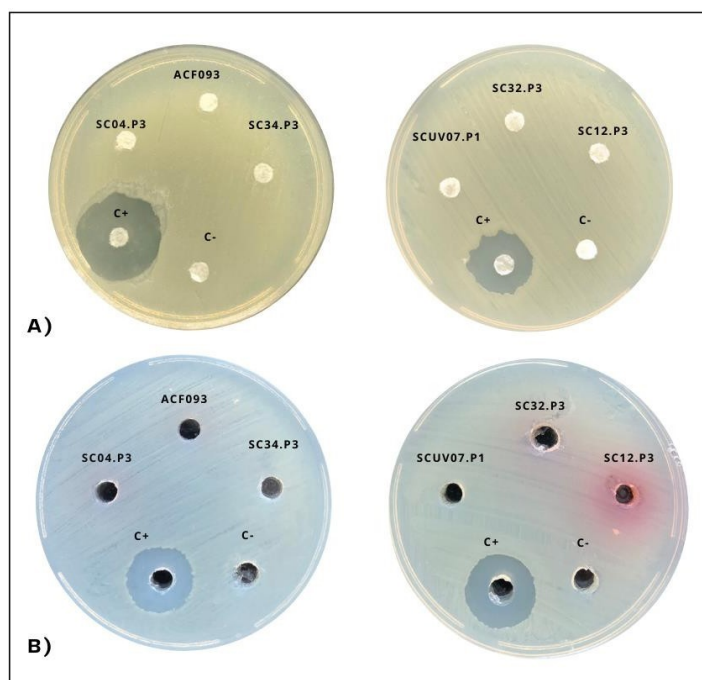
Fonte: Autor (2022)

**Tabela 17.** Medidas dos halos de inibição dos isolados de *Pseudogymnoascus* sp. contra *S. aureus*.

Isolado fúngico	halo de inibição
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. SC04.P3	1,5cm
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. SC12.P3	1,5cm
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. SC32.P3	1,6cm
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. ACF093	1,5cm

No entanto, os pigmentos extraídos com os solventes: água e metanol não apresentaram halo de inibição contra os patógenos testados, figura 34 e Tabela 18. Os resultados obtidos podem-se inferir sobre a natureza dos componentes antimicrobianos presentes nos pigmentos, pois em acetato de etila os extratos apresentaram halo de inibição contra a bactéria gram-positiva (*S. aureus*), porém nos solventes água e metanol não apresentou inibição contra os patógenos analisados. Desta forma, será necessário a identificação e caracterização dos compostos presentes nos pigmentos para verificar qual o componente foi capaz de inativar a bactéria. Para isso, destacamos a importância da análise de espectrofotômetro de massas para caracterizar as moléculas, e assim, obter informações sobre os compostos presentes nos pigmentos.

**Figura 34.** Não há formação de halos de inibição dos pigmentos utilizando o solvente **A.** Água; **B.** metanol.



Fonte: Autor (2022)

**Tabela 18.** Atividade antimicrobiana de pigmentos fúngicos com solvente água e metanol por metodologia de bloco de difusão em ágar.

Isolado fúngico	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
<i>Curvularia affinis</i> SCUV07.P1	-	-	-	-
<i>Talaromyces cnidii</i> SC34.P3	-	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. SC04.P3	-	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. SC12.P3	-	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. SC32.P3	-	-	-	-
<i>Pseudogymnoascus</i> sp. ACF093	-	-	-	-

Legenda: + :observada presença de halo de inibição; -: não foi observado nenhum halo de inibição.

O gênero fúngico *Pseudogymnoascus* é prevalente na Antártica (Villanueva et al. 2021). Inúmeras cepas desse gênero de fungos foram isoladas de diferentes ambientes antárticos. No entanto, apenas quatro estudos foram feitos sobre os metabólitos secundários do gênero mostrando atividades antimicrobianas (Shi et al. 2021).

*Pseudogymnoascus* sp. PF1464 isolado de uma amostra de solo coletada no Japão foi relatado como produtor de metabólito antifúngico denominado anfiol. O metabólito possui atividade antifúngica direcionado à membrana (ergosterol) (Fujita K et al. 2021). Em outro estudo, *Pseudogymnoascus* sp. HSX2#-11 foi descrito como um fungo antártico isolado de

amostra de solo da Península Fildes, com capacidade de produzir metabólitos secundários abundantes e diversos (Shi et al. 2021).

Por se tratar de um gênero fúngico com menos relatos sobre seu potencial biotecnológico na literatura, no presente estudo ficou comprovado que fungos psicofílicos são potenciais fontes de pigmentos com possíveis aplicações em diversas atividades biotecnológicas. Além disso, sugere-se que espécies do gênero *Pseudogymnoascus* presentes em ambientes antárticos podem constituir importantes reservatórios de novos produtos naturais com estruturas químicas únicas.

## 8.6 CONCLUSÃO

Os pigmentos dos isolados apresentaram uma variedade de cores através da absorção dos comprimentos de onda característicos ao descrito na literatura como pertencentes a melaninas, carotenoides, azafilonas e naftoquinonas. A produção em meio sólido utilizando arroz apresentou pigmentos de diferentes cores no espectro e destaca o potencial da produção de metabólitos fúngicos com maior crescimento na ausência de água e de substâncias inibidoras.

Os pigmentos fúngicos naturais foram testados contra patógenos bacterianos e fúngicos para verificar a atividade antimicrobiana. Os resultados indicaram que os pigmentos testados contra a bactéria gram-positiva *S. aureus* exibiram atividade antibacteriana em termos de zona máxima de inibição. Em conclusão, dos seis fungos produtores de pigmentos, os isolados de *Pseudogymnoascus* sp. (SC04.P3, SC12.P3, SC32.P3 e ACF 093) produziram halo de inibição para pelo menos um patógeno clínico de interesse analisado neste estudo.

O estudo revelou que o gênero *Pseudogymnoascus* parece ser um candidato promissor para a produção de compostos bioativos valiosos, o que pode ser devido ao mecanismo preventivo de estresse que o fungo possui para lidar com as condições adversas do continente Antártico. Além disso, todos os pigmentos do gênero analisados neste estudo, são solúveis em água, não exigindo solventes orgânicos, e por isso, mais sustentáveis.

## 9 CAPÍTULO 4: CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A Antártica é um ecossistema único que abrange uma variedade de gêneros fúngicos descritos como produtores de uma extensa gama de pigmentos e com diversas aplicações biotecnológicas. Para obtermos um estudo aprofundado do tema, realizamos uma revisão bibliográfica (Capítulo I) sobre os pigmentos de fungos antárticos, metodologia de produção/extração, toxicidade dos pigmentos, mercado atual dos biopigmentos e sua propriedade intelectual. Esta revisão enriqueceu e nos auxiliou para as próximas etapas deste estudo (Capítulo II e III).

A metodologia utilizada para a identificação dos 64 isolados inicialmente identificados a nível de gênero foi aplicada com sucesso com base em suas características morfológicas. As análises filogenéticas foram realizadas com dez isolados selecionados de cada morfogrupo utilizando como marcador a região ITS e permitiu a identificação de alguns dos microrganismos aqui estudados.

Os isolados foram identificados como pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pseudogymnascus*, *Talaromyces* e *Thelebolus*, com a inferência de espécie >97% para os isolados *Curvularia affinis*, *Penicillium chrysogenum*, *Pseudogymnoascus shaanxiensis* e *Talaromyces cnidii*.

Além disso, os dados de distribuição revelam que os representantes de *Pseudogymnoascus* estudados possuem a capacidade de colonização e adaptação a regiões geográficas distintas, e que diferentes espécies podem ser encontradas em um mesmo substrato, de um mesmo local. Representantes psicofílicos dos gêneros *Curvularia*, *Penicillium*, *Pseudogymnoascus*, *Talaromyces* e *Thelebolus* são reportados em literatura como sendo capazes de produzir metabólitos secundários com diversas aplicações biotecnológicas.

*Pseudogymnoascus shaanxiensis* SC25.P3 e *Talaromyces cnidii* SC34.P3 isoladas e identificadas neste estudo podem representar o primeiro relato das espécies no continente antártico. Além disso, não há registro em literatura da produção de pigmento pela espécie psicofílica *T. cnidii*. Pigmentos descritos neste estudo produzidos pelo gênero *Pseudogymnoascus* (azafilona e naftoquinona) também podem representar o primeiro registro produzido pelo gênero isolados de solos antárticos. Para comprovar a caracterização dos compostos pigmentados, os extratos encontram-se em fase de identificação das moléculas por espectrometria de massas.

Deste modo, fungos de origem Antártica são microrganismos produtores de pigmentos possivelmente ainda não descritos na literatura. Os isolados investigados (representantes de



diferentes morfotipos) apresentam capacidade de produção de pigmentos de diversas classes, como melanina, carotenoides, azafilona e naftoquinona. A determinação de fungos produtores de pigmentos não patogênicos permitirá a produção biotecnológica de biopigmentos naturais e viáveis com diversas aplicações na área têxtil, farmacêutica, cosmética e alimentícia.

Os isolados de *Pseudogymnoascus* spp. podem ser considerados como bons candidatos para estudos posteriores de produção e aplicação biotecnológica de pigmentos, por serem solúveis em água, destacando assim, a produção de pigmentos mais sustentáveis, ideais para aplicações industriais em alimentos, cosméticos, farmacêutica e têxtil. Além disso, as quatro espécies produtoras de pigmentos do gênero apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (ATCC 6538).

Dessa maneira, considerando o potencial dos microrganismos da Antártica, o presente trabalho destaca a presença de possíveis novos pigmentos de fungos psicrófilos antárticos com usos biotecnológicos. Mais estudos são necessários para obter pigmentos comerciais a partir destas cepas fúngicas específicas e sua caracterização química abrirão novos caminhos na indústria de biopigmentos, o que acabará ajudando a minimizar os efeitos adversos do uso de corantes e pigmentos sintéticos.

Os resultados obtidos com a condução do presente estudo permitiram avanços na taxonomia de fungos antárticos mantidos na coleção de pesquisa do Laboratório de Microbiologia e Processos Biotecnológicos-LAMPB da UFSC, bem como revelam o potencial de possíveis novas espécies produtoras de pigmentos com atividade antimicrobiana, abrindo novas perspectivas no campo da biotecnologia de microrganismos de ambientes extremos. As perspectivas futuras incluem mais estudos sobre as estruturas químicas dos pigmentos e sua biossíntese para entender as necessidades de nutrientes para a produção de biomassa e melhoria da produtividade.

## 10 REFERÊNCIAS

- Almeida, P. P., Mezzomo N., Ferreira, S. R. S. Extraction of *Menthaspicata* L. volatile compounds: evaluation of process parameters and extract composition. *Food and Bioprocess Technology*. 2012
- Ambrico M. Special issue: Melanin, a long lasting history bridging natural pigments and organic bioelectronics. *Polymer International*. 2016.
- Akilandeswari P, Pradeep B v. Exploration of industrially important pigments from soil fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016.
- Akova, M. Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. *Virulence*, v. 7, n. 3, p. 252–266, 2016. Taylor & Francis.
- Alcaíno J, Romero I, Niklitschek M, et al. Functional characterization of the *Xanthophyllomyces dendrorhous* farnesyl pyrophosphate synthase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase encoding genes that are involved in the synthesis of isoprenoid precursors. *PLoS One*. 2014.
- Agboyibor C, Kong WB, Chen D, et al. *Monascus pigments production, composition, bioactivity and its application: A review*. Elsevier Ltd. Epub ahead of print. 2018.
- Appelhagen I, Wulff-Vester AK, Wendell M, et al. Colour bio-factories: Towards scale-up production of anthocyanins in plant cell cultures. *Metab Eng*. 2018.
- Ambati RR, Gogisetty D, Aswathanarayana RG, et al. Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019.
- Baker LG, Specht CA, Donlin MJ, et al. Chitosan, the deacetylated form of chitin, is necessary for cell wall integrity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. 2007.
- Banks IR, Specht CA, Donlin MJ, et al. A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell*. 2005.
- Barahona S, Yuivar Y, Socias G, et al. Identification and characterization of yeasts isolated from sedimentary rocks of Union Glacier at the Antarctica. *Extremophiles*. 2016.
- Batista, T. M., Hilário, H. O., de Brito, G. A. M., Moreira, R. G., Furtado, C., de Menezes, G. C. A., et al. Whole-genome sequencing of the endemic Antarctic fungus *Antarctomyces pellizariae* reveals an ice-binding protein, a scarce set of secondary metabolites gene clusters and provides insights on Thelebolales phylogeny. *Genomics*. 2020.
- Bell AA, Wheeler MH. *Biosynthesis and functions of fungal melanins*. 1986.

- Besaratinia A, Bates SE, Synold TW, et al. Similar mutagenicity of photoactivated porphyrins and ultraviolet A radiation in mouse embryonic fibroblasts: Involvement of oxidative DNA lesions in mutagenesis. *Biochemistry*. 2004.
- Blanc PJ, Loret MO, Goma G, et al. Received as revised 7th January. *Production*. 1995.
- Bhosale P. 2004. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 63:351–361.
- Brooks, F. T., and C. G. Hansford. "Brit, mycol. Soc." *Trans*. 1923.
- Bridge, P.D.; Spooner B.M. Non-lichenized Antarctic fungi: transient visitors or members of a cryptic ecosystem? *Fungal ecology*, v.4, p.381-394. 2012.
- Buscot, F. What are soils. *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Heidelberg: Springer Verlag, p.3-18. 2005.
- Buzzini P, Turchetti B, Yurkov A. Extremophilic yeasts: the toughest yeasts around? *Yeast*. 2018.
- Burston, J. A.; Black M.; Fretwell P.T.; Kaluza G.J. An automated methodology for differentiating rock from snow, clouds and sea in Antarctica from Landsat 8 imagery: a new rock outcrop map and area estimation for the entire Antarctic continent. *The Cryosphere*, v.10, p.1665-1677. 2016.
- Caro Y. Fungi as producer of colorants. In: Mérillon J-M, Ramawat KG (eds) *Fungal Metabolites*. Switzerland: Cham, pp. 15–18.
- Cavicchioli R, Amils R, Wagner D, et al. Life and applications of extremophiles. *Environmental Microbiology*. 2011.
- Ceron-Garcia, M. C. et al. Maximizing carotenoid extraction from microalgae used as food additives and determined by liquid chromatography (HPLC). *Food Chemistry*, v. 257, 1 mar. 2018.
- Cinthya Gomes, DDS, MSc, PhD, Sandra Fidel, DDS, MSc, PhD, Rivail Fidel, DDS, MSc, PhD, and Maria Inês de Moura Sarquis, MSc, PhD. Isolation and Taxonomy of Filamentous Fungi in Endodontic Infections. 2010.
- Chen G, Yang S, Wang C, et al. Investigation of the mycelial morphology of *Monascus* and the expression of pigment biosynthetic genes in high-salt-stress fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020.
- Chyizhanska N, Beregova T. Effect of melanin isolated from antarctic yeasts on preservation of pig livestock after ab lactation. 2009.
- Correa, Tarcisio. Physiological and Biotechnological Aspects of Extremophiles. *Antarctic microorganisms as sources of biotechnological products*, 269–284. doi:10.1016/B978-0-12-818322-9.00020-4. 2020.

- Coleine C, Stajich JE, Zucconi L, et al. Antarctic cryptoendolithic fungal communities are highly adapted and dominated by Lecanoromycetes and Dothideomycetes. *Front Microbiol.* 2018.
- Cordero RJB, Casadevall A. Quick guide Melanin. *Current Biology Magazine.* 2020.
- Cordero RJB, Vij R, Casadevall A. Microbial melanins for radioprotection and bioremediation. *Microb Biotechnol.* 2017.
- Coutinho, J.O.P.A., Quintanilha, M.F., Campos, M.R.A. *et al.* Antarctic Strain of *Rhodotorula mucilaginosa* UFMGCB 18,377 Attenuates Mucositis Induced by 5-Fluorouracil in Mice. *Probiotics & Antimicro.* 2022.
- Da Cunha KC, Sutton DA, Fothergill AW, Gené J, Cano J, Madrid H, Hoog Sd, Crous PW, Guarro J. In vitro antifungal susceptibility and molecular identity of 99 clinical isolates of the opportunistic fungal genus *Curvularia*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013.
- Da Silva AF, Banat IM, Robl D, et al. Fungal bioproducts for petroleum hydrocarbons and toxic metals remediation: recent advances and emerging technologies. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2022.
- Da Silva AF, Banat IM, Giachini AJ, et al. Fungal biosurfactants, from nature to biotechnological product: bioprospection, production and potential applications. *Bioprocess and Biosystems Engineering.* 2021.
- Da Silva, V.L., Ienczak, J.L. & Moritz, D. Agro-industrial residues for the production of red biopigment by *Monascus ruber*: rice flour and sugarcane molasses. *Braz J Microbiol* 52, 587–596. 2021.
- De Carvalho J, Cardoso L, Ghiddi V, et al. Biotransformation of waste biomass into high value biochemicals. In: Brar SK (ed) *Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals*. New York: Springer. 2014.
- De Mattos, L.F.A inclusão da Antártica no conceito de Entorno Estratégico Brasileiro. CAPA- 440 REVISTA DA EGN. 2016.
- De Maayer P, Anderson D, Cary C, et al. Some like it cold: Understanding the survival strategies of psychrophiles. *EMBO Reports.* 2014.
- De Menezes GCA, Porto BA, Amorim SS, Zani CL, de Almeida Alves TM, Junior PAS, Murta SMF, Simões JC, Cota BB, Rosa CA, Rosa LH. Fungi in glacial ice of Antarctica: diversity, distribution and bioprospecting of bioactive compounds. *Extremophiles.* 2020.
- De Hoog GS, Vicente VA, Gorbushina AA. The bright future of darkness-the rising power of black fungi: Black yeasts, microcolonial fungi, and their relatives. *Mycopathologia.* 2013.

Dimitrova S, Pavlova K, Lukanov L, et al. Production of metabolites with antioxidant and emulsifying properties by antarctic strain *Sporobolomyces salmonicolor* AL1. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013.

Dimitrova S, Pavlova K, Lukanov L, et al. Synthesis of coenzyme Q10 and  $\beta$ -carotene by yeasts isolated from Antarctic soil and lichen in response to ultraviolet and visible radiations. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010.

Ding L, Huang H, Lu F, et al. Transposon insertion mutation of Antarctic psychrotrophic fungus for red pigment production adaptive to normal temperature. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2022.

Díaz A, Villanueva P, Oliva V, Gil-Durán C, Fierro F, Chávez R, Vaca I. Genetic Transformation of the Filamentous Fungus *Pseudogymnoascus verrucosus* of Antarctic Origin. *Front Microbiol*. 2019.

Dijksterhuis, Jan. "Heat-resistant ascospores." *Food Mycology*. CRC press, 2007.

Duarte, A. W. F.; Barato, M. B.; Nobre, F. S.; Polezel, D. A.; De Oliveira, T. B.; Dos Santos, J. A.; Rodrigues, A.; Sette, L.D. Production of cold-adapted enzymes by filamentous fungi from King George Island, Antarctica. *Polar Biology*. 2018a.

Duarte B, Feijão E, Goessling JW, et al. Pigment and fatty acid production under different light qualities in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Applied Sciences (Switzerland)*. 2021.

Duarte A, de Menezes GCA, Bicas JL, et al. Antarctic Fungi as Producers of Pigments. In: Rosa LH (ed) *Fungi of Antarctica: Diversity, Ecology and Biotechnological Applications*. Switzerland: Springer. 2019.

Dufossé L, Fouillaud M, Caro Y, et al. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. *Curr Opin Biotechnol*. 2014.

Eisenman HC, Nosanchuk JD, Webber JBW, et al. Microstructure of cell wall-associated melanin in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Biochemistry*. 2005.

Euler H van, Hellström H. Über Asterinsäure, eine Carotinoidsäure aus Seesternen. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*. 1934.

Fell, J.W.; Scorzetti G.; Connel L.; Craig S. Biodiversity of micro-eukaryotes in Antarctic Dry Valley soils with < 5% soil moisture. *Soil Biology and Biochemistry*, v.10, 470 p.3107-3119. 2006.

Feng Y, Shao Y, Chen F. *Monascus* pigments. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012.

Freitas DF. *Caracterização e produção de melanina pelo fungo nematófago Duddingtonia flagrans e avaliação da sua participação na atividade predatória*. Thesis, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Fibeiro. 2017.

Friedman M, Xu A, Lee R, et al. The Inhibitory Activity of Anthraquinones against Pathogenic Protozoa, Bacteria, and Fungi and the Relationship to Structure. *Molecules*. 2020.

Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Larsen, T.O., Samson, R.A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus. *Studies in Mycology*. 2004.

Fouillaud M, Venkatachalam M, Girard-Valenciennes E, et al. Anthraquinones and derivatives from marine-derived fungi: Structural diversity and selected biological activities. *Mar Drugs*. 2016.

Fountain, A.G. et al. The impact of a large-scale climate event on Antarctic ecosystem processes. *BioScience*. 2016.

Garcia-Cortes A, Garcia-Vásquez JA, Aranguren Y, et al. Pigment production improvement in *rhodotorula mucilaginosa* ajb01 using design of experiments. *Microorganisms*. 2021.

Ghattavi, K.; Homaei, A.; Kamrani, E.; Kim, S.-K. Melanin pigment derived from marine organisms and its industrial applications. *Dye. Pigm.* 2022.

Gessler NN, Egorova AS, Belozerskaya TA. Fungal anthraquinones. *Appl Biochem Microbiol*. 2013.

Gocheva, Y.G.; Krumova, E.T.; Slokoska, L.S.; Miteva, J.G.; Vassiley, S.V.; Angelova, M.B. Cell response of Antarctic and temperate strains of *Penicillium* sp. to different growth temperature. *Mycological research*. 2006.

Gmoser R, Ferreira JA, Lennartsson PR, et al. Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. *Fungal Biol Biotechnol*. 2017.

Godinho VM, Furbino LE, Santiago IF, et al. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *ISME Journal*. 2013.

Gomes ECQ, Godinho VM, Silva DAS, et al. Cultivable fungi present in Antarctic soils: taxonomy, phylogeny, diversity, and bioprospecting of antiparasitic and herbicidal metabolites. *Extremophiles*. 2018.

Gonçalves, V.N.; Vaz A.B.; Rosa, C.A.; Rosa, L.H. Diversity and distribution of fungal 520 communities in lakes of Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*, v.2, p.459-471, 2012.

Gostinçar C, Muggia L, Grube M. Polyextremotolerant black fungi: Oligotrophism, adaptive potential, and a link to lichen symbioses. *Front Microbiol*. 2012.

- Guo X, Chen S, Hu Y, Li G, Liao N, Ye X, Liu D, Xue C. Preparation of water-soluble melanin from squid ink using ultrasound-assisted degradation and its anti-oxidant activity. *J Food Sci Technol*. 2014.
- Hamano PS, Kilikian B v. Production of red pigments by *Monascus ruber* in culture media containing corn steep liquor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2006.
- Han, Yanfeng & Zhang, Zhi-Yuan & Dong, Chunbo & Chen, Wanhao & Mou, Quanrong & Lu, Xiaoxiao & Huang, Jianzhong & Liang, Zongqi. The Enigmatic Thelebolaceae (Thelebolales, Leotiomyces): One New Genus *Solomyces* and Five New Species. *Frontiers in Microbiology*. 2020.
- Hagerthey, S. E., William Louda, J., & Mongkronsri, P. (2006). Evaluation of pigment extraction methods and a recommended protocol for periphyton chlorophyll a determination and chemotaxonomic assessment. *Journal of Phycology*. 2006.
- Harding T, Jungblut AD, Lovejoy C, et al. Microbes in high arctic snow and implications for the cold biosphere. *Appl Environ Microbiol*. 2011.
- He Y, Liu J, Chen Q, et al. *Monascus sanguineus* May Be a Natural Nothospecies. *Front Microbiol*. 2020.
- Heo YM, Kim K, Kwon SL, et al. Investigation of filamentous fungi producing safe, functional water-soluble pigments. *Mycobiology*. 2018.
- Hikosaka K, El-Abasy M, Koyama Y, et al. Immunostimulating effects of the polyphenol-rich fraction of sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) extract in chickens. *Phytotherapy Research*. 2007.
- Hoog, G.S.; Göttlich, E.; Platas, G.; Genilloud, O.; Leotta, G.; Brummelen, J. van Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. *Stud. Mycol*. 2005.
- Hoeltz, M., Fagundes, C.A., Alcayaga, E.A.L., Noll, I.B. Micobiota e micotoxinas em amostras de arroz coletadas durante o sistema estacionário de secagem e armazenamento *Ciência Rural*. 2009.
- Houbraken, JAMP, Frisvad, JC & Samson, RA Taxonomia de *Penicillium citrinum* e espécies relacionadas. *Diversidade Fúngica* 44 , 117–133. 2010.
- Houbraken J, Wang L, Lee HB, Frisvad JC. New sections in *Penicillium* containing novel species producing patulin, pyripyropens or other bioactive compounds. *Persoonia*. 2016.
- Hu Z, Zhang X, Wu Z, et al. Perstraction of intracellular pigments by submerged cultivation of *Monascus* in nonionic surfactant micelle aqueous solution. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012.

- Hu F, Liu S, Liu Y, Li X, Pang R, Wang F. The decreased number and function of lymphocytes is associated with *Penicillium marneffei* infection in HIV-negative patients. *J Microbiol Immunol Infect.* 2021.
- Isbrandt T, Tolborg G, Ødum A, et al. Atrososins: a new subgroup of *Monascus* pigments from *Talaromyces atroseus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020.
- Jeswal P, Kumar D. Mycobiota and Natural Incidence of Aflatoxins, Ochratoxin A, and Citrinin in Indian Spices Confirmed by LC-MS/MS. *Int J Microbiol.* 2015.
- Johnston, P. R., Quijada, L., Smith, C. A., Baral, H.-O., Hosoya, T., Baschien, C., et al. A multigene phylogeny toward a new phylogenetic classification of Leotiomyces. *IMA Fungus.* 2019.
- Jurić S, Jurić M, Król-Kilińska Ż, et al. Sources, stability, encapsulation and application of natural pigments in foods. *Food Reviews International.* 2020.
- Julie Paulín García Rodríguez. Tese: Abordagens alternativas para obtenção de novos metabólitos secundários produzidos a partir de linhagens fúngicas. Universidade de São Paulo - USP. 2018.
- Kreusch MG, Duarte RTD. Photoprotective compounds and radioresistance in pigmented and non-pigmented yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2021. Koyama Y. Structures and functions of carotenoid in photosynthetic systems. *J Photochem Photobiol B.* 1991.
- Kohei Fujita, Misa Ikuta, Shinichi Nishimura\*, Ryosuke Sugiyama, Aya Yoshimura and Hideaki Kakeya\*. Amphiol, an Antifungal Fungal Pigment from *Pseudogymnoascus* sp. PF1464. *J. Nat. Prod.* 2021.
- Kumar JIN, Bora A, Amb MK. Chronic toxicity of the triazole fungicide tebuconazole on a heterocystous, nitrogen-fixing rice paddy field cyanobacterium, *Westiellopsis prolifica* Janet. *J Microbiol Biotechnol.* 2010.
- Lagashetti AC, Dufossé L, Singh SK, et al. Fungal pigments and their prospects in different industries. *Microorganisms.* 2019.
- Lang, Q.; Wal, C. M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies — a practical review. 2001.
- Liang B, Du XJ, Li P, et al. Investigation of citrinin and pigment biosynthesis mechanisms in *monascus purpureus* by Transcriptomic Analysis. *Front Microbiol.* 2018.
- Liu, R., Meng, X., Mo, C. et al. Melanin of fungi: from classification to application. *World J Microbiol Biotechnol.* 2022.
- Lin, C. F. Isolation and cultural conditions of *Monascus* sp. for the production of pigments in a submerged culture. *Journal Fermentation Technology.* 1973.



- Lebeau, J., Petit, T., Clerc, P., Dufossé, L., & Caro, Y. Isolation of two novel purple naphthoquinone pigments concomitant with the bioactive red bikaverin and derivatives thereof produced by *Fusarium oxysporum*. *Biotechnology Progress*. 2018.
- Lehto S, Buchweitz M, Klimm A, et al. Comparison of food colour regulations in the EU and the US: a review of current provisions. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2017.
- Łopusiewicz Ł. Antioxidant, antibacterial properties and the light barrier assessment of raw and purified melanins isolated from *Citrullus lanatus* (watermelon) seeds. *Herba Polonica*. 2018.
- Lorch, J. M. et al. Experimental infection of bats with *Geomyces destructans* causes white-nose syndrome. *Nature*. 2011.
- Lovisa S, Kalluri R. Fatty Acid Oxidation Regulates the Activation of Endothelial-to-Mesenchymal Transition. *Trends Mol Med*. 2018.
- Maoka T. Carotenoids as natural functional pigments. *J Nat Med*. 2020.
- Mata-Gómez LC, Montañez JC, Méndez-Zavala A, et al. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: An overview. *Microb Cell Fact*. 2014.
- Madrid H, da Cunha KC, Gené J, Dijksterhuis J, Cano J, Sutton DA, Guarro J, Crous PW. Novel *Curvularia* species from clinical specimens. *Persoonia*. 2014.
- Manamgoda DS, Rossman AY, Castlebury LA et al. A taxonomic and phylogenetic re-appraisal of the genus *Curvularia* (Pleosporaceae): human and plant pathogens. *Phytotaxa* 212:175–198. 2015.
- Mapari SAS, Thrane U, Meyer AS. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? *Trends Biotechnol*. 2010.
- Marta Misiak, William P. Goodall-Copestake, Tim H. Sparks, M. Roger Worland, Lynne Boddy, Naresh Magan, Peter Convey, David W. Hopkins, Kevin K. Inhibitory effects of climate change on the growth and extracellular enzyme activities of a widespread Antarctic soil fungus. *Global change biology*. 2020.
- Marin-Felix Y, Groenewald JZ, Cai L, Chen Q, Marincowitz S, Barnes I, Bensch K, Braun U, Camporesi E, Damm U, De Beer ZW. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. *Studies in Mycology*. 2017a.
- Marin, Y & Hernández-Restrepo, Margarita & Crous, Pedro. Multi-locus phylogeny of the genus *Curvularia* and description of ten new species. *Mycological Progress*. 2020.
- Martin KJ Rygiewicz PT. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiol*. 2005.

- Menezes, G. C. A.; Godinho, V. M.; Porto, B. A.; Goncalves, V. N.; Rosa, L. H. *Antarctomyces pellizariae* sp. nov., a new, endemic, blue, snow resident psychrophilic ascomycete fungus from Antarctica. *Extremophiles*. 2017.
- Mekala Venkatachalam; Alain Shum-Chéong-Sing; Yanis Caro; Laurent Dufossé; Mireille Fouillaud. OVAT Analysis and Response Surface Methodology Based on Nutrient Sources for Optimization of Pigment Production in the Marine-Derived Fungus *Talaromyces albobiverticillius* 30548 Submerged Fermentation. *Marine Drugs*. 2021.
- Meruvu H, Dos Santos JC. Colors of life: a review on fungal pigments. *Crit Rev Biotechnol*. 2021.
- Metličar V, Vovk I, Albreht A. Japanese and bohemian knotweeds as sustainable sources of carotenoids. *Plants*. 2019.
- Minnis, A. M., and Lindner, D. L. (2013). Phylogenetic evaluation of geomyces and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. nov., in bat hibernacula of eastern North America. *Fungal Biol*. 117, 638–649. doi: 10.1016/j.funbio. 2013.
- Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, et al. *Lichens as source of versatile bioactive compounds*. 2011.
- Miyashira, G.; Rodrigues R.; Kilikian B. V. Seleção de Linhagens de *Monascus* sp. para Cultivo em Meio Semi-sólido. SINAFERM - XIV Simpósio Nacional de Fermentações. Florianópolis - SC: Anais - artigo. 2003.
- Mueller DR, Vincent WF, Bonilla S, et al. Extremotrophs, extremophiles and broadband pigmentation strategies in a high arctic ice shelf ecosystem. In: *FEMS Microbiology Ecology*. 2005.
- Muneta, P. Enzymatic blackening in potatoes: Influence of pH on dopachrome oxidation. *American Potato Journal*. 1977.
- Mussagy CU, Winterburn J, Santos-Ebinuma VC, et al. Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019. Nicolas JP, Bromwich DH. Climate of West Antarctica and influence of marine air intrusions. *J Clim*. 2011.
- Novoveská L, Ross ME, Stanley MS, et al. Microalgal carotenoids: A review of production, current markets, regulations, and future direction. *Mar Drugs*. 2019.
- Nguyen, Van Duy & pham thu, Thuy. *Penicillium vietnamense* sp. nov., the First Novel Marine Fungi Species Described from Vietnam with a Unique Conidiophore Structure and Molecular Phylogeny of *Penicillium* Section Charlesia. *Mycobiology*. 2022.
- Núñez-Pons L, Avila C, Romano G, et al. UV-protective compounds in marine organisms from the southern ocean. *Mar Drugs*. 2018.
- Nwoba, E. et al. *Microalgal Pigments: A Source of Natural Food Colors*. 2020.

Ogaki, M. B., Vieira, R., Lírio, J. M., Rosa, C. A., & Rosa, L. H. Diversity and Ecology of Fungal Assemblages Present in Lakes of Antarctica. *Fungi of Antarctica*. 2019.

Pitt, J.I. The Genus *Penicillium* and its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London, Academic Press. 1979. Órdenes-Aenishanslins N, Anziani-Ostuni G, Vargas-Reyes M, et al. Pigments from UV-resistant Antarctic bacteria as photosensitizers in Dye Sensitized Solar Cells. *J Photochem Photobiol B*. 2016.

Pacelli C, Cassaro A, Maturilli A, et al. Multidisciplinary characterization of melanin pigments from the black fungus *Cryomyces antarcticus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020.

Pandey N, Jain R, Pandey A, et al. Optimisation and characterisation of the orange pigment produced by a cold adapted strain of *Penicillium* sp. (GBPI\_P155) isolated from mountain ecosystem. *Mycology*. 2018.

Pagano MC, Dhar PP. Fungal pigments: an overview. In: Gupta VK, Mach RL, Sreenivasaprasad S, editors, *Fungal biomolecules: sources, applications and recent developments*. 2015.

Pattanagul P, Pinthong R, Phianmongkhol A, Tharatha S. Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus* sp. *International Journal of Food Microbiology*. 2008.

Pitt, J.I. A laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. North Wales: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization – Division of Food Processing. 1991.

Pitt, J.I. The Genus *Penicillium* and its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*. London, Academic Press. 1979.

Pulschen AA, Rodrigues F, Duarte RTD, et al. UV-resistant yeasts isolated from a high-altitude volcanic area on the Atacama Desert as eukaryotic models for astrobiology. *Microbiology Open*. 2015.

Quijada, Luis & Matočec, Neven & Kušan, Ivana & Tanney, Joey & Johnston, Peter & Mesic, Armin & Pfister, Donald. Apothecial Ancestry, Evolution, and Re-Evolution in Thelebolales (Leotiomycetes, Fungi). *Biology*. 2022.

Rammuni, M. N. et al. Comparative assessment on the extraction of carotenoids from microalgal sources: Astaxanthin from *H. pluvialis* and  $\beta$ -carotene from *D. salina*. *Food Chemistry*, v. 277. 2018.

Rana B, Bhattacharyya M, Patni B, et al. The Realm of Microbial Pigments in the Food Color Market. *Front Sustain Food Syst*. 2021.

Rao MPN, Min X, Li W-J. Fungal and bacterial pigments: Secondary metabolites with wide applications. *Frontiers in Microbiology*. 2017.

Ravanat JL, Douki T. UV and ionizing radiations induced DNA damage, differences and similarities. *Radiation Physics and Chemistry*. 2016.

- Rapoport A, Guzhova I, Bernetti L, Buzzini P, Kieliszek M, Kot AM. Carotenoids and Some Other Pigments from Fungi and Yeasts. *Metabolites*. 2021.
- Reis-Mansur MCPP, Cardoso-Rurr JS, Silva JVMA, et al. Carotenoids from UV-resistant Antarctic Microbacterium sp. LEMMJ01. *Sci Rep*; 9. 2019.
- Rivera, S.; Canela, R. Influence of Sample Processing on the Analysis of Carotenoids in Maize. *Molecules*. 2012.
- Rosa LH, Vaz ABM, Caligiorne RB, et al. Endophytic fungi associated with the Antarctic grass *Deschampsia antarctica* Desv. (Poaceae). *Polar Biol*. 2009.
- Rosa, L. H.; Zani, C. L.; Cantrell, C. L.; Duke, S. O.; Van Dijck, P. Desideri, A.; Rosa, C. A. Fungi in Antarctica: Diversity, Ecology, Effects of Climate Change, and Bioprospection for Bioactive Compounds. In *Fungi of Antarctica*. Springer. 2019.
- Rosa, L. H; Pinto, O. H. B.; Convey, P.; Silva, M. C.; Rosa, C. A; Câmara Mara RA, P. E. A. S. DNA Metabarcoding to Assess the Diversity of Airborne Fungi Present over Keller Peninsula, King George Island, Antarctica. *Microbial Ecology*. 2021.
- Ruisi S, Barreca D, Selbmann L, et al. Fungi in Antarctica. *Rev Environ Sci Biotechnol*. 2007.
- Sajid S, Akbar N. Applications of fungal pigments in Biotechnology. *Pure and Applied Biology*. 2018.
- Sajjad W, Din G, Rafiq M, et al. Pigment production by cold-adapted bacteria and fungi: colorful tale of cryosphere with wide range applications. *Extremophiles*. 2020.
- Şanal, İ. S. et al. Determination of optimum conditions for SC-(CO<sub>2</sub>+ ethanol) extraction of βcarotene from apricot pomace using response surface methodology. *The Journal of supercritical fluids*. 2005.
- Samson, R. A., Hadlok, R., & Stolk, A. C. A taxonomic study of the *Penicillium chrysogenum* series. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1977.
- Santiago, I. F.; Rosa, C. A.; Rosa, L. H. Endophytic symbiont yeasts associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis*. *Polar Biology*. 2017.
- Samson, R.A., Yilmaz, N., Houbraken, J., Spierenburg, H., Seifert, K.A., Peterson, S.W., Varga, J., Frisvad, J.C. Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in Mycology*. 2011.
- Samson, R. A. Notes on *Pseudogymnoascus*, *Gymnoascus* and related genera. *Acta Bot. Neerlandic*. 1972.
- Sharid, M., UL-Islam, S. & Mohammad, F. Recent advancements in natural dye applications: a review. *Journal of cleaner production*. 2013.

- Sen T, Barrow CJ, Deshmukh SK. Microbial pigments in the food industry—challenges and the way forward. *Front Nutr*; 6. 2019.
- Sezgin, A.; Sibel, A. Food Additives: Colorants. 2017.
- Simas, F.N.B. et al. Genesis, properties and classification of Cryosols from Admiralty Bay, maritime Antarctica. Geoderma Amsterdam. 2008.
- Singh, Shiv M.; Singh, Paras N.; Singh, Sanjay K.; Sharma, Prabhat K. Pigment, fatty acid and extracellular enzyme analysis of a fungal strain *Thelebolus microsporus* from Larsemann Hills, Antarctica. *Polar Record*. 2014.
- Shi, T.; Yu, Y.-Y.; Dai, J.-J.; Zhang, Y.-T.; Hu, W.-P.; Zheng, L.; Shi, D.-Y. New Polyketides from the Antarctic Fungus *Pseudogymnoascus* sp. HSX2#-11. *Mar. Drugs*. 2021.
- Singh O v., Gabani P. Extremophiles: Radiation resistance microbial reserves and therapeutic implications. *J Appl Microbiol*. 2011.
- Singh SM, Singh PN, Singh SK, et al. Pigment, fatty acid and extracellular enzyme analysis of a fungal strain *Thelebolus microsporus* from Larsemann Hills, Antarctica. *Polar Record*. 2014.
- Singha IM, Kakoty Y, Unni BG, Das J, Kalita MC. Identification and characterization of *Fusarium* sp. using ITS and RAPD causing fusarium wilt of tomato isolated from Assam, North East India. *J Genet Eng Biotechnol*. 2016.
- Silva TR e., Silva LCF, de Queiroz AC, et al. Pigments from Antarctic bacteria and their biotechnological applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2021.
- Slominski A, Wortsman J, Plonka PM, et al. Hair follicle pigmentation. *Journal of Investigative Dermatology*. 2005.
- Sweeny JG, Estrada-Valdes MC, Iacobucci GA, et al. Photoprotection of the Red Pigments of *Monascus anka* in Aqueous Media in 1,4,6-Trihydroxynaphthalene. *J Agric Food Chem*. 1981.
- S.W. Jeffrey, R.F.C. Mantoura, S.W.G. 78, S.W. Wright, U. Staff, I.C. of Scientific Unions. Scientific Committee on Oceanic Research, Unesco, Phytoplankton Pigments in Oceanography: Guidelines to Modern Methods, UNESCO Publishing. 1997.
- Tamura K., M. Nei. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees *Mol. Biol*. 1993.
- Toti E, Oliver Chen CY, Palmery M, et al. Non-provitamin A and provitamin A carotenoids as immunomodulators: Recommended dietary allowance, therapeutic index, or personalized nutrition? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2018.

Touchette, D., Altshuler, I., Gostinčar, C. *et al.* Novel Antarctic yeast adapts to cold by switching energy metabolism and increasing small RNA synthesis. *ISME J* 16, 221–232. 2022.

Trianto A, Radjasa OK, Sibero MT, Sabdono A, Haryanti D, Zilullah WOM, Syanindyta AR, Bahry MS, Widiananto PA, Helmi M, Armono HD, Supriadi, Igarashi Y. The effect of culture media on the number and bioactivity of marine invertebrates associated fungi. *Biodiversitas*. 2020.

Tripathi N, Sapra A. *Gram Staining*. Treasure Island (FL). 2022.

Trochine A, Turchetti B, Vaz ABM, et al. Description of *Dioszegia patagonica* sp. nov., a novel carotenogenic yeast isolated from cold environments. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017.

Tsai H-F, Chang YC, Washburn RG, et al. *The Developmentally Regulated alb1 Gene of Aspergillus fumigatus: Its Role in Modulation of Conidial Morphology and Virulence*. 1998.

Tuli HS, Chaudhary P, Beniwal V, et al. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. *Journal of Food Science and Technology*. 2015.

Usmani Z, Sharma M, Awasthi AK, et al. Bioprocessing of waste biomass for sustainable product development and minimizing environmental impact. *Bioresource Technology*. 2021.

Vaz ABM, Rosa LH, Vieira MLA, et al. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011.

Vasileva-Tonkova E, Romanovskaya V, Gladka G, et al. Ecophysiological properties of cultivable heterotrophic bacteria and yeasts dominating in phytocenoses of Galindez Island, maritime Antarctica. *World J Microbiol Biotechnol*. 2014.

Venil CK, Velmurugan P, Dufossé L, et al. Fungal pigments: Potential coloring compounds for wide ranging applications in textile dyeing. *Journal of Fungi*. 2020.

Valenzuela-Gloria, Miriam S., Nagamani Balagurusamy, Mónica L. Chávez-González, Oscar Aguilar, Ayerim Hernández-Almanza, and Cristóbal N. Aguilar. Molecular Characterization of Fungal Pigments" *Journal of Fungi*. 2021.

Velmurugan P, Kim M-J, Park J-S, et al. Dyeing of cotton yarn with five water soluble fungal pigments obtained from five fungi. *Fibers and Polymers*. 2010.

Velmurugan P, Lee, Y. H., Venil, C. K., Lakshmanaperumalsamy P., Chae, J. C. & OH, B. T. Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2010.

Vicente VA, Najafzadeh MJ, Sun J, et al. Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis. *Fungal Divers*. 2014.

Villarreal P, Carrasco M, Barahona S, et al. Tolerance to Ultraviolet Radiation of Psychrotolerant Yeasts and Analysis of Their Carotenoid, Mycosporine, and Ergosterol Content. *Curr Microbiol*. 2016.

Villanueva, P.; Vasquez, G.; Duran, C.G. et. al. I. Description of the First Four Species of the Genus *Pseudogymnoascus* From Antarctica. *Frontiers in Microbiology*. 2021.

Vinken M, Blaauboer BJ. In vitro testing of basal cytotoxicity: Establishment of an adverse outcome pathway from chemical insult to cell death. *Toxicol In Vitro*. 2017.

Wang Z, Tschirhart T, Schultzhaus Z, Kelly EE, Chen A, Oh E, Nag O, Glaser ER, Kim E, Lloyd PF, Charles PT, Li W, Leary D, Compton J, Phillips DA, Dhinojwala A, Payne GF, Vora GJ. Melanin Produced by the Fast-Growing Marine Bacterium *Vibrio natriegens* through Heterologous Biosynthesis: Characterization and Application. *Appl Environ Microbiol*. 2020.

Wang, F.; Xu, B.; Sun, Y.; Zang, J.; Li, X.; Wang, N. Identification of an Antarctic fungus and property analysis of its secretory pigment. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*. 2013.

Wang J, Huang Y, Shao Y. From Traditional Application to Genetic Mechanism: Opinions on *Monascus* Research in the New Milestone. *Front Microbiol*. 2021.

Wang Y, Yang F, Liu T, Zhao C, Gu F, Du H, Wang F, Zheng J, Xiao H. Carotenoid fates in plant foods: Chemical changes from farm to table and nutrition. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2022.

Wentzel, L. C. P. Diversidade de fungos de solos antárticos e prospecção de enzimas ligninolíticas. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Microbiologia Aplicada) - 53 Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro. 2017.

Wolf FT, Wolf FA. The carotenoid pigments of the cedar apple rust fungus. *Experientia*. 1955.

Yilmaz, N., et al. "Delimitation and characterisation of *Talaromyces purpurogenus* and related species." *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 2012.

Yilmaz, N.; Visagie, C.M.; Houbraken, J.; Frisvad, J.C.; Samson, R.A. Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. *Studies in Mycology*. 2014.

Yew SM, Chan CL, Lee KW, Na SL, Tan R, Hoh C-C, et al. A Five-Year Survey of Dematiaceous Fungi in a Tropical Hospital Reveals Potential Opportunistic Species. 2014.

Ye, Kai-Xiong & Fan, Ting-Ting & Keen, Lawrence & Han, Bing-Nan. A Review of Pigments Derived from Marine Natural Products. *Israel Journal of Chemistry*. 2018.

Zhang ZK, Wang XC, Zhuang WY, Cheng XH, Zhao P. New Species of *Talaromyces* (Fungi) Isolated from Soil in Southwestern China. *Biology* (Basel). 2021.

Zhang C, Chen X, Too HP. Microbial astaxanthin biosynthesis: recent achievements, challenges, and commercialization outlook. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2020.

Zucconi L, Canini F, Temporiti ME, et al. Extracellular enzymes and bioactive compounds from antarctic terrestrial fungi for bioprospecting. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020.