



Produção de pigmentos extracelulares por espécies de *Fusarium* e *Aspergillus*

Brenda Kischkel¹, Erika Seki Kioshima², Terezinha Inez Estivalet Svidzinski² e Melyssa Fernanda Norman Negri^{2*}

Recebido: 11 de setembro de 2017 Recebido após revisão: 28 de setembro de 2018 Aceito: 17 de dezembro de 2018
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/4064>

RESUMO: (Produção de pigmentos extracelulares por espécies de *Fusarium* e *Aspergillus*). Atualmente, a busca para substituir os corantes sintéticos, devido ao seu potencial carcinogênico e aparecimento de reações alérgicas, por fontes sustentáveis, que gerem impactos mínimos ao meio ambiente durante o processo de coloração vêm ganhando destaque. Assim, o objetivo do presente estudo foi realizar uma triagem com fungos filamentosos dos gêneros *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp. para extração de biocorante. Um total de cinco espécies pertencentes ao gênero *Fusarium* e *Aspergillus* foram fermentados em soluções líquidas de sais-glicose e formulações semissólidas de batata. Cada espécie foi testada em pH 4,6 e 5,6 e incubadas sob condições estacionárias a temperatura de 20 e 27 °C por 4-6 semanas. O biocorante foi extraído, concentrado em rotaevaporador e liofilizado para sua obtenção em forma de pó. *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus flavus* produziram pigmentos alaranjados e amarelos, respectivamente no meio líquido. *Fusarium graminearum* produziu pigmentos vermelhos em formulação semissólida. Com base nesses resultados foi possível observar que os fungos citados são eficientes produtores de biocorantes.

Palavras-chave: Biocorantes, fungos, triagem, fermentação, ambiente.

ABSTRACT: (Extracellular pigment production by *Fusarium* and *Aspergillus* species). The search for substitutes of synthetic dyes has been gaining increasing attention, due to their carcinogenic and allergenic potential. In that sense, the primary focus has been to find sustainable sources, which generate minimal environmental impact during the dyeing process. We aimed to perform a screening on filamentous fungi from genera *Fusarium* and *Aspergillus* for biodye extraction. Five species from these genera were fermented in glucose-salts broth and semi-solid potato substrate. Each species was tested in pH 4.6 and 5.6 and incubated under stationary conditions at 20 and 27 °C for 4-6 weeks. The biodye was extracted, concentrated in a rotary evaporator and lyophilized for isolation of its powdered form. *Aspergillus parasiticus* and *A. flavus* respectively produced orange and yellow pigments in liquid medium, while *Fusarium graminearum* produced red pigments in semi-solid substrate. We concluded that the studied fungi are effective biodye producers.

Keywords: biodyes, fungi, screening, fermentation, environment.

INTRODUÇÃO

Desde tempos remotos os corantes naturais eram utilizados na coloração de alimentos e tecidos. Entretanto, a descoberta do corante artificial 'malva' por Perkin em 1856, mudou completamente o cenário da coloração de produtos para o consumo humano, substituindo os corantes naturais por corantes sintéticos. Contudo, devido aos inúmeros problemas relacionados aos corantes sintéticos, os produtos provindos de fonte renovável e sustentável vêm ganhando destaque devido a benefícios que trazem a saúde, segurança e meio ambiente (Sharid *et al.* 2013).

Muitos países aderiram a normas ambientais mais rigorosas em vista do grande aparecimento de alergias e reações tóxicas ligadas aos corantes sintéticos (pois alguns compostos para sinterização desses corantes são potencialmente carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos (Nagia & El-Mohamedy 2007, Babitha *et al.* 2007, Muzzall & Cook 1979). Segundo Chequer e colaboradores (2015), cosméticos que utilizam o com-

posto quinolina amarela interferem na estabilidade do DNA *in vitro* de células metabolicamente competentes (HepG2), causando quebras e perdas cromossômicas sendo genotóxico aos consumidores de produtos que contenham este corante em sua composição. A exposição de mulheres grávidas a tinturas de cabelo e alisamento já foi relatado como causa do desenvolvimento de leucemia em crianças com menos de 2 anos de idade (Couto *et al.* 2013). Corantes alimentares como o amaranto, tartrazina e eritrocina, apresentaram em um estudo, potencial tóxico para os linfócitos humanos *in vitro* se ligando diretamente com o DNA (Mpountoukas *et al.* 2010). Assim, emerge novamente os corantes naturais como sendo a alternativa mais viável em substituição aos corantes sintéticos (Velmurugan *et al.* 2010a).

Os biocorantes são provenientes de diversas fontes naturais como plantas, insetos, minerais e micro-organismos, sendo os fungos filamentosos produtores mais eficientes (Sharid *et al.* 2013, Velmurugan *et al.* 2010a),

1. Departamento de Biologia, Laboratório de Micologia Médica, Universidade Estadual de Maringá (UEM). Av. Colombo, 5790, Bloco T-20, CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil.

2. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Laboratório de Micologia Médica, UEM. Av. Colombo, 5790, Bloco T-20, CEP 87020-900, Maringá, PR, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: melyssanegri@gmail.com

fato este relacionado com o metabolismo fúngico, já que a maioria dos fungos é consumidora de matéria orgânica, capazes de produzir metabólitos secundários como ácidos orgânicos e pigmentos. (Akilandeswari & Pradeep 2016). Assim, a obtenção de biocorantes a partir de fungos tem vantagens como: fonte renovável, de baixo impacto ambiental e alta capacidade para biodegradação, sendo mais harmônico com o meio ambiente (Mirjalili et al. 2011). Além disso, a capacidade que esses micro-organismos têm de crescer sobre culturas submersas e sólidas, tolerar diferentes pHs e temperaturas, torna vantajosa sua utilização na produção de pigmentos, uma vez que podem ser geneticamente modificados para aumentar sua produtividade.

Estudos já relataram que fungos como *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. e *Trichoderma* spp. produzem durante seu crescimento uma ampla gama de metabólitos secundários como os pigmentos (Akilandeswari & Pradeep 2016). No entanto, ainda é desconhecida a capacidade de produção de pigmentação e rentabilidade de alguns fungos quando expostos a fermentação para obtenção do corante natural.

Ao longo do processo de produção a cor está sujeita a variações devido à sensibilidade do microrganismo a parâmetros como temperatura, luz, acidez, oxigenação e umidade (Babitha et al. 2007). Alguns dos fatores que estimulam a produção de metabólitos secundários por fungos são: composição do meio, aeração, escassez de nutrientes e excesso de fontes de carbono (Akilandeswari & Pradeep 2016). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi realizar uma triagem com gêneros de fungos filamentosos de *Fusarium* spp., e *Aspergillus* spp., avaliando as condições ideais do processo de fermentação para obtenção de biocorantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos fungos

Foram incluídos neste estudo cinco espécies de fungos filamentosos: *Fusarium solani*, isolado de unhas das mãos de paciente atendido no laboratório de ensino e pesquisa em análises clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá (UEM), *Fusarium graminearum*, obtido no campo de trigo da Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (CODETEC) de Palotina (PR), *Fusarium fujikuroi* NRRL 2278, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, da Fundação André Tosello, e *Aspergillus nidulans*, do Fungal Genetic Stock Center (FGSC, Kansas, USA). Todos os fungos foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos da UEM.

Fermentação Submersa (FS)

Os fungos foram armazenados em ágar batata 20% (PDA), a 27 °C, e repicados sete dias antes de serem expostos a fermentação. O meio utilizado para fermentação submersa foi o de sais-glicose contendo por litro de água deionizada: 30 g glicose; 1,0 g (NH₄)₂SO₄; 0,5

g MgSO₄.7H₂O; 1,4 g K₂HPO₄; 0,6 g K₂PO₄; 0,8 mg ZnSO₄.7H₂O; 0,8 mg FeCl₃.6H₂O; 0,8 mg NaMoO₄.2H₂O; 0,4 mg MnSO₄.2H₂O; 0,08 mg CuSO₄.5H₂O. Um pedaço de aproximadamente 12 mm de diâmetro do fungo em ágar batata foi colocado no meio sais-glicose e incubado sob condições estacionárias e na ausência de luz por 4 a 6 semanas. Foram variadas as seguintes condições: pH para 4,6 ou 5,6 e temperatura 20 °C ou 27 °C (procedimento realizado para cada isolado fúngico e em cada situação).

Fermentação semissólida (FSS)

Um meio semissólido de batata 0,36% foi preparado contendo 200 g de batata, 20 g de Dextrose (Synth, Brasil) e 1,8 g de ágar bacteriológico (Kasvi, Itália) por litro de água deionizada e pH aferido em 6,3. Os fungos foram suspensos em eppendorf contendo 1 mL de salina e transferidos, posteriormente, para o meio de FSS que foi incubado a 20 °C ou 27 °C, sob condições estacionárias e na ausência de luz por 3 a 4 semanas. Apenas os fungos que apresentaram coloração no meio ao qual foram mantidos (ágar batata) foram expostos à metodologia para fermentação semissólida, neste caso, as espécies de *Fusarium*.

Extração do pigmento

Após o período de incubação, foi confirmado visualmente a produção de pigmentos. Em cada frasco contendo pigmento, foram adicionados 0,200 mg/L de timerosal, indicado para matar fungo filamentosos, por 48 horas. Posteriormente, iniciou-se a etapa de extração do pigmento, onde os meios foram filtrados em gaze esterilizada e papel filtro, para retenção do micélio. Em seguida, foi adicionado ao filtrado 60 % de uma solução dois volumes de etanol 95 % (v/v) e incubado por 30 min a 180 rpm e em 30 °C. Após este período, a solução foi centrifugada (ROTINA 420r, Hettich) a 3780 rpm por 15 min, recuperado o sobrenadante, adicionado o restante de etanol (40 %) e repetido a mesma centrifugação por mais 5 min. Por fim, o sobrenadante foi recuperado e filtrado em papel filtro de 47 mm para a obtenção da solução pigmentada.

A fim de se avaliar a produção de pigmentos nos meios, foi utilizado um espectrofotômetro UV - Vis (Q7980RM, Quimis), para leitura de densidade óptica. As soluções pigmentadas foram medidas a 400, 520, 530, 550 nm, pois representam a absorção máxima de pigmentos de amarelos, marrom, vermelho e cor de rosa, respectivamente (Velmurugan 2010b).

Para avaliar a capacidade de crescimento e desenvolvimento dos isolados sob os diferentes parâmetros aos quais foi exposto, o micélio colhido na etapa de extração foi filtrado em papel filtro e posto em placa de Petri e armazenado em estufa a 50 °C durante 7 dias para secagem e obtenção do peso seco da biomassa micelial.

Concentração de pigmento e obtenção em forma de pó

A solução pigmentada foi concentrada em um evapo-

rador rotativo (R - 210, Buchi) a 78 °C por 10 min. Em seguida a amostra foi congelada e liofilizada (Alpha 1-4 LD plus, Christ) durante 12 horas para a obtenção do corante em forma de pó.

RESULTADOS

Os resultados da triagem dos fungos filamentosos estão apresentados na Tabela 1, conforme temperatura e pH ao qual foram expostos. Após o período proposto para fermentação, foi possível observar que três dos isolados testados apresentaram potencial para produzir pigmentos nos meios de cultura artificiais: *F. graminearum*, *A. flavus* e *A. parasiticus*. Os demais fungos não apresentaram pigmentação dos meios de cultura.

A cultura de *F. graminearum* exposta a fermentação semissólida produziu pigmentos vermelhos, enquanto as culturas de *A. flavus* e *A. parasiticus*, produziram pigmentos amarelos e alaranjados, respectivamente. Portanto, a densidade óptica (DO) dos extratos foi medida a 400 e 530 nm, pois representam a absorção máxima de pigmentos amarelo e vermelho, respectivamente (VELMURUGAN, 2010b) em espectrofotômetro. A Tabela 1 apresenta o rendimento de pigmentos por grama de substrato seco. É possível observar que *F. graminearum* expressou mais pigmentos no meio de FSS, em uma DO de 1,821. Dentre os isolados que produziram pigmentos em fermentação submersa, *A. parasiticus* foi mais eficiente que *A. flavus*, sob determinados parâmetros de fermentação que se mostraram muito influentes na geração do produto final. Em razão de que tanto a maior DO como a menor DO, foram alcançados por *A. parasiticus*, que quando exposto a pH 4,6 a 27 °C, desenvolveram e pigmentaram de modo eficiente e, quando exposto ainda à 27 °C, mas pH 5,6, seu rendimento caiu de 1,235 para 0,283. O isolado *A. flavus* demonstrou quase o dobro de concentração de pigmentos quando fermentado em cultura artificial com pH de 5,6 e temperatura a 20 °C, mas seu rendimento caiu de 0,611 para 0,370, quando alteramos o pH da cultura para 4,6.

O isolado de *A. parasiticus*, em pH 5,6 e incubado a 27 °C, apresentou o maior desenvolvimento de biomassa micelial durante a fermentação, contudo foi o que produziu menos pigmentos. O mesmo isolado mantido sob

Tabela 1. Fungos produtores de pigmentos conforme pH e temperatura de exposição. Rendimento de pigmento em densidade óptica (DO).

Isolados*	DO
<i>Fusarium graminearum</i> (20 °C)	1,821
<i>F. graminearum</i> (27 °C)	1,281
<i>Aspergillus flavus</i> (pH 4,6; 20 °C)	0,370
<i>A. flavus</i> (pH 5,6; 20 °C)	0,611
<i>A. parasiticus</i> (pH 4,6; 20 °C)	1,074
<i>A. parasiticus</i> (pH 4,6; 27 °C)	1,235
<i>A. parasiticus</i> (pH 5,6; 20 °C)	1,192
<i>A. parasiticus</i> (pH 5,6; 27 °C)	0,283

*Para os isolados de *Aspergillus*, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 400 nm e, para *Fusarium*, a 530 nm.

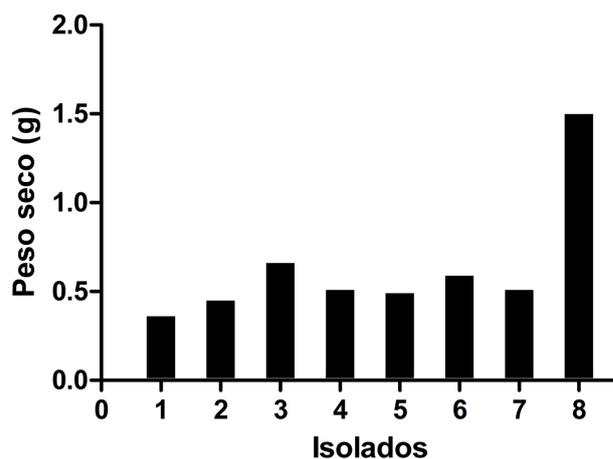


Figura 1. Produção de biomassa micelial estimado por peso seco (g) em diferentes fungos filamentosos isolados. 1. *Fusarium graminearum* (20 °C). 2. *F. graminearum* (27 °C). 3. *Aspergillus flavus* (pH 4,6; 20 °C). 4. *A. flavus* (pH 5,6; 20 °C). 5. *A. parasiticus* (pH 5,6; 20 °C). 6. *A. parasiticus* (pH 4,6; 20 °C). 7. *A. parasiticus* (pH 5,6; 27 °C). 8. *A. parasiticus* (pH 4,6; 27 °C).

diferentes combinações de temperatura e pH produziram no meio, juntamente com *A. flavus* e *F. graminearum*, quantidades de biomassa micelial muito próximas, como pode ser observado na Figura 1.

DISCUSSÃO

No presente estudo ficou comprovado que fungos filamentosos são potenciais fontes para biocorantes, pois três dos isolados avaliados foram capazes de produzir pigmentos nos meios de cultura artificiais. *F. graminearum*, *A. flavus* e *A. parasiticus* produziram pigmentos vermelhos, amarelos e alaranjados, respectivamente.

Além disso, ficou clara a importância da avaliação quanto às condições de cultivo, variando desde a disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura, entre outras variáveis. Conforme a Tabela 1, é possível verificar que essa produção não ocorreu homogênea, mas em determinadas condições. *A. parasiticus* em FS incubado a 27 °C em pH 5,6 apresentou crescimento micelial, na cultura fermentada, muito superior aos demais (Fig. 1); no entanto, apresentou também menor expressão de pigmentos. Segundo Akilandeswari e Pradeep (2016) a expressão de pigmentos é influenciada pela fase de desenvolvimento do fungo, sendo a temperatura e pH, dois fatores extrínsecos e intrínsecos, dentre outros como substrato e aeração, que podem agir a favor ou não da produção de metabólitos secundários. No entanto, a temperatura e o pH ao qual o fungo estava exposto, sendo um filamentosos, propiciou seu crescimento e reprodução no meio, ou seja, a expressão de mais metabólitos primários, essenciais para o desenvolvimento do fungo, e menos de metabólitos secundários, como os pigmentos, não essenciais para o seu crescimento. O mesmo isolado mantido com pH 5,6 a 20 °C, pH 4,6 a 27 °C e pH 4,6

a 20 °C, apresentaram resultados aproximados, sendo a combinação mais favorável em fermentação submersa, como aponta a Tabela 1.

Méndez e colaboradores (2011), relataram a importância do controle de pH e temperatura durante os processos industriais, pois estes são fatores capazes de influenciar significativamente a biossíntese de metabólitos primários e secundários, o crescimento celular e formação do micélio, e oxidação da célula, afetando diretamente a atividade de proteínas essenciais, alterando suas conformações. Esses autores avaliaram a produção de pigmentos e crescimento micelial do fungo filamentosso *Penicillium purpurogenum* em cultura submersa, onde a maior concentração de biomassa foi obtida no fermentado a pH 7. No entanto, para este tratamento a produção de pigmento foi menor, assim como em nosso estudo onde em pH 5,6, *A. parasiticus* foi capaz de se desenvolver melhor, mas produzir menos pigmentos do que em uma faixa de pH menor (4,6), confirmando que as condições para a produção de biomassa não são as mesmas necessárias para a produção de pigmentos. A produção maior de biomassa em pH 7 pode estar intimamente ligada ao aumento da produção de trifosfato de adenosina (ATP), que acelera o produção de oxidação, favorecendo a produção de biomassa, mas não a biossíntese de metabólitos secundários (Vázquez-duhalt 2002).

F. graminearum forneceu a maior concentração de pigmentos dentre todos os isolados em meio semissólido de batata. Estudos já reportaram a produção metabólitos secundários por *A. versicolor* obtidos de caldo de dextrose de batata como meio de cultura para fermentação (Miao et al. 2012). É importante ressaltar que pigmentos naturais por fungos do gênero *Fusarium* spp., já foram relatados por Nagia e EL-Mohamedy (2007). Este autores obtiveram pigmentos de *F. oxysporum* por fermentação em meio artificial de sais-glicose, o mesmo meio líquido utilizado neste estudo, caracterizando dois compostos de antraquinona presentes na cultura fermentada, objetivando ainda, a aplicação industrial dos pigmentos produzidos por *F. oxysporum* no tingimento de lã.

Os isolados de *A. flavus*, ambos mantidos a 20 °C, apresentaram concentrações de pigmentos distintas, sendo obtido a máxima da expressão do metabólito secundário de interesse em pH 5,6. Estudos mostram que variando as condições de crescimento do fungo, pode-se influenciar significativamente a produção de pigmento, como demonstrado por Mapari e colaboradores (2010), em que *Monascus* sp. pode produzir pigmentos que variam do amarelo-alaranjado ao vermelho púrpura. Velmurugan e colaboradores (2010a) obtiveram pigmentos extraídos de cinco fungos filamentosos sendo eles, *Monascus purpureus*, *Isaria* spp., *Emericella* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp., expondo-os a mesma cultura artificial e pH utilizados neste estudo, com a finalidade de corar amostras de couro para aplicação industrial, obtendo maior concentração de pigmentos por *M. purpureus*, seguido de *Penicillium* spp. e *Emericella* spp. Porém, apesar da realidade acima, pouco tem sido descrito e ava-

liado sobre fungos ambientais frequentes em nosso meio.

De fato, a expectativa por esse potencial é plausível já que os fungos filamentosos incluem uma variedade de metabólitos muito ativos, capazes de produzir substâncias de valor econômico, incluindo os pigmentos. Esse fato é animador já que testes toxicológicos apontam a confiabilidade dos pigmentos orgânicos extraídos, como uma fonte alternativa mais viável em substituição aos corantes sintéticos. Uma das maiores preocupações em relação aos corantes sintéticos está ligada a toxicidade de alguns de seus compostos e ao número de reações alérgicas (Nagia & El-mohamedy 2007), além de serem potencialmente carcinogênicos, teratogênicos (Babitha, Soccol & Pandey 2007) e mutagênicos (Muzzall & Cook 1979).

Outra vantagem dos biocorantes produzidos por fungos é a capacidade destes em crescer sob culturas variadas, como líquidas ou sólidas, tolerância a diversas faixa de pH e temperatura, tornam os fungos filamentosos fonte promissora para a extração de pigmentos (Akilandeswari & Pradeep 2016).

CONCLUSÃO

Diante da avaliação da capacidade de produção de pigmentos por fungos filamentosos expondo-os a diferentes condições de cultivos artificiais como culturas líquidas, semissólidas e sob combinação de duas variações para temperatura e pH, três isolados de fungos filamentosos foram capazes de produzir pigmentos, sendo eles, *Fusarium graminearum*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Apresentando-se como promissores produtores de pigmentos naturais, de alto apelo social, de cores vibrantes e ainda, com possibilidades de aplicações variadas.

AGRADECIMENTOS

Ao laboratório de genética molecular de microrganismos da Universidade Estadual de Maringá, por ceder parte dos isolados utilizados neste estudo, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

- AKILANDESWARI, P. & PRADEEP, B. V. 2016. Exploration of industrially important pigments from soil fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(4): 1631–1643.
- BABHITA, S., SOCCOL, C. R. & PANDEY, A. 2007. Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. *Bioresource technology*, 98(8): 1554-1560.
- CHEQUER, F. M. D., VENÂNCIO, V. P.; PRADO, M. R. S., CUNHA JÚNIOR, L. R. C.S., LIZIER, T. M., ZANONI, M. V. B., BURBANO, R. R., BIANCHI, M. L. P. & GREGGI, L. M. A. 2015. The cosmetic dye quinoline yellow causes DNA damage *in vitro*. *Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 777: 54-61.
- COUTO, A. C., FERREIRA, J. D., ROSA, A. C. S., POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S. & KOIFMAN, S. 2013. Pregnancy, maternal exposure to hair dyes and hair straightening cosmetics, and early age leucemia. *Chemico-Biological Interactions*, 205(1): 46-52.

- MAPARI S. A. S., THRANE U. & MEYER A. S. 2010. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants. *Trends in Biotechnology*, 28(6): 300–307.
- MÉNDEZ, A., PÉREZ, C., MONTAÑÉZ, J. C., MARTÍNEZ, G. & AGUILAR, C. N. 2011. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and Temperature. *Journal of Zhejiang University Science B*, 12(12): 961-968.
- MIAO, F-P., LI, X-D., LIU, X-H., CICHEWICZ, R. H. & JI, N-Y. 2012. Secondary metabolites from an algicolous *Aspergillus versicolor* strain. *Marine drugs*, 10(1):131–139.
- MIRJALILI, M., NAZARPOOR, K. & KARIMI, L. 2011. Eco-friendly dyeing of wool using natural dye from weld as co-partner with synthetic dye. *Journal of Cleaner Production*, 19(9-10): 1045-1051.
- MPOUNTOUKAS, P., PANTAZAKI, A., KOSTERELI, E., CHRITODOULOU, D. K., POLILIOU, S., MOURELATOS, C., LAMBROPOULOU, V. & LIALIARIS, T. 2010. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10): 2934-2944.
- MUZZALL, J. M. & COOK, W. L. 1979. Mutagenicity test of dyes used in cosmetics with the salmonella/mammalian-microsome test. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 67(1): 1-8.
- NAGIA, F.A. & EL-MOHAMEDY, R. S. R. 2007. Dyeing of wool with natural anthraquinone dyes from *Fusarium oxysporum*. *Dyes and Pigments*, 75(3): 550-555.
- PASTORE, G. M., BICAS, J. B. & MARÓSTICA JUNIOR, M. R. 2013. *Biotechnologia de alimentos*. 1ed. São Paulo: Atheneu. 520p.
- SHARID, M., UL-ISLAM, S. & MOHAMMAD, F. 2013. Recent advancements in natural dye applications: a review. *Journal of cleaner production*, 53: 310-331.
- VAZQUEZ-DUHALT R. 2002. *Biological Thermodynamics*. México: AGT Editor S.A de C.V. 223p.
- VELMURUGAN, P., HUR, H., BALACHANDAR, V., KAMALA-KANNAN, S., LEE, K. J., LEE, S. M., CHAE, J. C., SHEA, P. J. & OH, B. T. 2011. *Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corncob substrate. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 112(6): 590-594.
- VELMURUGAN, P., KAMALA-KANNAN, S., BALACHANDAR, V., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P., CHAE, J. C. & OH, B. T. 2010. Natural pigment extraction from five filamentous fungi for industrial applications and dyeing of leather. *Carbohydrate Polymers*, 79(2): 262-268 a.
- VELMURUGAN, P., LEE, Y. H., VENIL, C. K., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P., CHAE, J. C. & OH, B. T. 2010. Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(4): 346-350b.