

DENISE ESTEVES MORITZ

**PRODUÇÃO DO PIGMENTO MONASCUS POR**  
***Monascus ruber* CCT 3802 EM CULTIVO**  
**SUBMERSO**

FLORIANÓPOLIS, MAIO DE 2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**PRODUÇÃO DE PIGMENTOS MONASCUS POR *Monascus*  
*ruber* CCT 3802 EM CULTIVO SUBMERSO**

Tese submetida à Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau de doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gláucia Maria Falcão de Aragão

**DENISE ESTEVES MORITZ**

Florianópolis, Maio de 2005.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina.



**UFSC**



**CTC**



**EQA**

**ENGEBIO**



Aos meus filhos Ana Luiza e Pedro Henrique,  
meu esposo Hécio Jr  
e aos meus pais com todo amor e carinho.

## Agradecimentos

*“Algumas pessoas percorrem ao nosso lado, vendo muitas luas passarem alimentando o nosso ego com alegria...”*. Obrigado Jorge Ninow e Gláucia Maria Falcão de Aragão, por estarem sempre ao meu lado como amigos e orientadores. Obrigada pelo apoio e confiança dedicados todos estes anos, principalmente pela credibilidade no meu trabalho e incentivo durante toda esta caminhada.

*“...Cada pessoa que passa em nossa vida é única. Sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de nós...”*. Aos professores Dr. Gildo Almeida da Silva, Dra. Maria Elisa Esposito, Dr. Agenor Furigo Junior e Dr. Willibaldo Schmidell por aceitarem participar da banca de defesa desta tese.

*“...Muitos desses denominados amigos do peito, do coração, são sinceros, são verdadeiros e sabem quando não estamos bem, sabem o que nos deixa feliz...”*. Obrigada aos meus amigos Cíntia Marangoni, Ernandes Pereira e Murilo Costelli, companheiros de todas as horas.

*“...Existem pessoas em nossas vidas que nos deixam felizes pelo simples fato de terem cruzado o nosso caminho...”*. Minha gratidão aos colegas do ENGEBIO, Renata, em especial à Vanessa e Beatriz, e aos professores Dr. Agenor Furigo Junior e Dr. Ricardo F. A. Machado.

*“...Mas também há aqueles amigos por um tempo, talvez umas férias ou mesmo um dia ou uma hora que costumam colocar muitos sorrisos na nossa face, durante o tempo que estamos por perto...”*. Obrigada Loiva e Gildo por fazerem parte desta história!

*“...O destino nos apresenta outros amigos, que não sabiam que iam cruzar o nosso caminho e que foram muito importantes ...”*. Aos bolsistas Alex, Suzana, Renato e Thiago, pelo convívio, amizade, companheirismo e “noites mal dormidas” contribuindo assim para tornar meu projeto em realidade.

*“...O tempo passa, o verão se vai, o outono se aproxima, e perdemos algumas de nossas folhas. Algumas nascem num outro verão e outras permanecem por muitas estações...”*. Aos colegas funcionários que sempre me impulsionaram e me acolheram com muito carinho e amizade, Rogéria, Eiza, Ildo, Edevilson, Sandro, Izilda, Carlúcia, Carlos, Silvana, Rosa, Sandra e Mauro.

*“...Alguns amigos dão brilho aos nossos olhos, música aos nossos lábios, pulos aos nossos pés e sentido à nossa vida...”*. Todo meu amor e gratidão à minha família, meu esposo Junior, meus filhos Ana Luiza e Pedro Henrique, meus pais Ruy e Daise e irmãos, Sérgio, Regis e Rosana.

## SUMÁRIO

<u>Sumário</u>	<u>vi</u>
<u>Índice de Figuras</u>	<u>ix</u>
<u>Índice de Tabelas</u>	<u>xiv</u>
<u>Lista de abreviaturas, siglas e unidades</u>	<u>1</u>
<u>Resumo</u>	<u>1</u>
<u>Abstract</u>	<u>2</u>
<u>CAPÍTULO I – Introdução e objetivos</u>	<u>3</u>
<u>I. Introdução</u>	<u>4</u>
<u>II.Objetivos</u>	<u>9</u>
<u>Capítulo II - Revisão Bibliográfica Geral</u>	<u>10</u>
PIGMENTOS	11
II.1 - PIGMENTOS NATURAIS PARA ALIMENTOS	14
II.2 – MERCADO MUNDIAL DE CORANTES	17
II.3 - MERCADO NACIONAL DE CORANTES	17
II.4 - LEGISLAÇÃO NACIONAL E INTERNACIONAL DE CORANTES	19
II.4.1 - CORANTES PERMITIDOS PARA ALIMENTAÇÃO NO BRASIL	19
II.4.2 - CORANTES NATURAIS PERMITIDOS NA ALIMENTAÇÃO PELOS PRINCIPAIS MERCADOS INTERNACIONAIS	20
II.5 - PIGMENTOS SINTÉTICOS X PIGMENTOS NATURAIS	21
II.6 - VANTAGENS E DESVANTAGENS NA PRODUÇÃO DE CORANTES NATURAIS.	25
II.7– MÉTODOS DE OBTENÇÃO DO PIGMENTO VIA BIOTECNOLÓGICA	26
II.8– CARACTERÍSTICAS DO PIGMENTO MONASCUS	28
<u>Capítulo III – Material e Métodos</u>	<u>33</u>
III.1 - EXPERIMENTOS REALIZADOS	34
III.2 – MICRORGANISMO	34
III.3 - MEIOS DE CULTURA	35
III.3.1 - MANUTENÇÃO DA CULTURA	35
III.3.2 – INÓCULO	35
III.4- MEIOS DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO	35
III.4.1 - PREPARO DO MEIO DE CULTURA E INOCULAÇÃO DO FUNGO	36
III.4.2 - PREPARO DA SOLUÇÃO DE MILHOCINA	36

---

III.5 - ENSAIOS REALIZADOS EM FERMENTADOR	37
III.6 - MÉTODOS ANALÍTICOS	38
III.6.1 - TRATAMENTO DA AMOSTRA	38
III.6.2 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR	38
III.6.3 - DOSAGEM DE GLICOSE	38
III.6.4 - DOSAGEM DE AÇÚCARES REDUTORES	39
III.6.5 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ETANOL	39
III.6.6 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTO MONASCUS	40
III.6.7 – DETERMINAÇÃO CONCENTRAÇÃO DE AMILASE	40
III.6.8 – DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DE CITRININA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (TLC)	41
III.6.9– TRATAMENTO DE DADOS	42
<b>Capítulo IV – Estudo Físio-Morfológico do Fungo <i>Monascus ruber</i></b>	<b>44</b>
IV.1 - INTRODUÇÃO	45
IV.2 – MORFOLOGIA DOS FUNGOS	47
IV.3 - GÊNERO MONASCUS	48
IV.4 – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO <i>MONASCUS RUBER</i>	49
IV.5 – METODOLOGIA ESPECÍFICA	51
IV.6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
IV.7 – AUXANOGRAMA	57
IV.7.1 - METODOLOGIA ESPECÍFICA	57
IV.7.2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
IV.8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
<b>Capítulo V – Produção de Biopigmentos em Frascos Agitados</b>	<b>61</b>
V.1. - FORMAS DE PRODUÇÃO DO PIGMENTO MONASCUS - VIA METABÓLICA	62
V.2 – AVALIAÇÃO DOS CARBOIDRATOS DA AGRO-INDÚSTRIA PARA PRODUÇÃO DE BIOPIGMENTOS	65
V.3 – INFLUÊNCIA DAS FONTES DE CARBONO: GLICOSE , MALTOSE, AMIDO DE ARROZ E FARELO DE ARROZ	67
V.3.1 – MATERIAL E MÉTODOS	67
V.3.2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO - GLICOSE E MALTOSE	68
V.3.3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO - AMIDO DE ARROZ E FARELO DE ARROZ	72
V.3.2.2 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
V.4 – ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE PIGMENTOS VERMELHOS	79
V.4.1 - INTRODUÇÃO	79
V.4.2 – METODOLOGIA	80
V.4.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	81

---

V.4.4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
V.5– ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE FARELO DE ARROZ E GLICINA SOBRE A PRODUÇÃO DE PIGMENTOS VERMELHOS	86
V.6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS DO CAPÍTULO V	87
<u>Capítulo VI – Influência da adição de ácidos graxos ao meio de cultivo na produção de pigmento Monascus</u>	<u>88</u>
VI.1 - INTRODUÇÃO	89
VI.2 – CITRININA	91
VI.3 – METODOLOGIA	97
VI.4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	98
VI.5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	103
<u>Capítulo VII – Influência do pH e da Frequência de agitação na Produção de Biopigmentos em Biorreator</u>	<u>104</u>
VII.1 –VARIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE AGITAÇÃO SOB A FORMAÇÃO DE PIGMENTOS	105
VII.1.1 - INTRODUÇÃO	105
VII.1.2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
VII.2 – ESTUDOS DO CONTROLE DO PH PARA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS	108
VII.2.1 - INTRODUÇÃO	108
VII.2.2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
VII.2 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
<u>Capítulo VIII - Considerações Finais Do Trabalho, Conclusão E Perspectivas Para Novos Estudos</u>	<u>114</u>
VIII. 1 – CONSIDERAÇÕES FINAIS DO TRABALHO	115
VIII. 2 – CONCLUSÃO	116
VIII. 2 – PERSPECTIVAS PARA NOVOS ESTUDOS	116
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>117</u>
<u>Apêndice</u>	<u>128</u>
<u>Anexo</u>	<u>132</u>

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura II.1 – Mercado Mundial de corantes alimentícios, dados de 1992 (KILLIKIAN, 2002). .....	17
Figura II.2 - Participação das Indústrias de Corantes Naturais brasileiras no Setor . .....	18
Figura II.3 – Processo de produção industrial do pigmento <i>Monascus</i> (Fonte:MANDT, 2003). .....	28
Figura II.4 - Tipos de pigmentos formados pelo <i>Monascus ruber</i> . Fonte: HAJJAJ et al., 1997. ....	29
Figura II.5 - Processos de purificação e caracterização das estruturas envolvidas para formação dos pigmentos extracelulares (bem como a ocorrência de complexos “EDA” destes pigmentos ( <i>N</i> -glutarylribropunctamina – GTR; <i>N</i> -glutarylmonascorubramina – GTM; <i>N</i> -glucosylmonascorubramina - GCM e <i>N</i> -glucosylribropunctamina – GCR) Fonte : HAJJAJ et al (1997). .....	31
Figura III.6 - Cultura estoque em BDA. ....	35
Figura III.7- Biorreator utilizado para as culturas celulares.....	37
Figura IV.8- Via Metabólica dos policetídeos. Fonte: (HAJJAJ, BLANC, GROUSSAC et al., 1999a) .	46
Figura IV.9 - Estrutura micromorfológica de um fungo <i>Monascus ruber</i> caracterizando os conídeos e as hifas. ....	47
Figura IV.10 - Formas de reprodução do gênero <i>Monascus</i> ilustrando a formação de cadeia de conídeos após 2 dias crescendo em BDA (a); germinação dos conídeos após 6 horas de plantio em ágar Sabouraud (b-c); cleistotécio após 48 de cultivo em ágar Sabouraud (d - e); cleistotécio jovem (f - g) Fonte: MACARIO et al, (1960). ....	49
Figura IV.11 - Características morfológicas do fungo <i>Monascus ruber</i> . Fonte: (ALLOK, 1998). ....	50
Figura IV.12 - Micromorfologia (hifas e conídios) (aumento de 400X) (Fonte: ALLOK, 1998) e Macromorfologia do <i>Monascus ruber</i> . ....	51
Figura IV.13 - Montagem de placa autoclavada para a realização de microcultivo, contendo bastão de vidro como suporte, lâmina, lamínula e algodão. Retirada de fragmento de colônia do tubo. Inoculação do fragmento de colônia na parte central das quatro laterais da porção de ágar batata. Fonte: (DATAFUNGI, 2002) .....	52

- Figura IV.14– (A) Meio de cultivo sólido e (B) cultivo em meio líquido após cinco dias de incubação. O primeiro em estufa 30°C e o segundo em incubador rotativo à temperatura de 30°C e 150 rpm. .... 53
- Figura IV. 15 – Presença de hifas e conídeos após 48 horas de crescimento em cultivo sólido em todas as fontes de carbono estudadas (glicose (1), farelo de arroz (2), e amido de arroz (3))...... 54
- Figura IV.16 – Apresentação da cultura sólida e do cultivo submerso após 96 horas de cultivo em meio contendo (a) glicose (meio sólido) e (b) amido de arroz 3 g/L e sais ( cultivo submerso) respectivamente. .... 54
- Figura IV.17 – Etapas da reprodução sexuada do *Monascus ruber* CCT 3802. 1 – conídeos. 2 – hifa e formação do ascogônio; 3 septação do ascogônio; – 4 e 5 – cleistotécio. .... 55
- Figura IV.18 – Estudo morfológico comparativo dos ensaios com pouca ou nenhuma produção de pigmentos (A e D – glicose + milhocina em cultivo sólido e submerso respectivamente), B e E considerados produção intermediária de pigmentos vermelho ( $UDO_{480}$  entre 0,8 e 1,5  $UDO_{480}$ ) em meio sólido e cultivo submerso respectivamente e finalmente C e F, elevada produção de pigmentos vermelhos após 96 horas de cultivo ( $UDO_{480} > 1,5 UDO_{480}$ ). .... 55
- Figura IV.19 - Teste colorimétrico de carboidratos – auxanograma (Auxacolor® - SANOFI) formado por quatorze açúcares : glicose (controle positivo – segundo pocinho superior), maltose, sacarose, galactose, lactose, rafinose, inositol na primeira fila superior e celobiose, trealose, adonitol, melobiose, xilose, arabinose e actidiona. O primeiro pocinho corresponde ao controle negativo e o último, teste de feniloxidase. A cor azul indica que o fungo não assimilou o referido açúcar - teste negativo (-) enquanto que a cor amarela indica assimilação - teste positivo (+). .... 58
- Figura IV.20 - Estudos auxanográficos em frascos agitados obtidos com os seguintes substratos: maltose e glicose (1 e 2)(vermelho-púrpura), frutose (3)(vermelho claro) e Glicose + Milhocina (4) (sem produção de pigmento) respectivamente..... 60
- Figura V.21 – Fermentadores industriais utilizados na produção de pigmentos vermelho (fermentação sólida) a partir do arroz. Fonte: (ALLOK, 2001). .... 63
- Figura V.22 - Pigmentos vermelhos produzidos milenarmente no oriente pelo cultivo do fungo *Monascus* em meio sólido a base de arroz. Fonte:(ALLOK, 2001). .... 64
- Figura V.23 – Evolução da concentração de biomassa, absorvância do pigmentos vermelho ( $UDO_{480}$ ), concentração de etanol (g/L) e consumo de glicose e pH durante o

crescimento do <i>Monascus ruber</i> em meio de cultivo, segundo Pastrana (1995), em <i>shaker</i> com agitação recíproca.....	69
Figura V.24 – Evolução da concentração de biomassa, absorbância do pigmento vermelho (UDO <sub>480</sub> ), concentração de etanol (g/L) e consumo de maltose em meio de cultivo (Pastrana, 1995) contendo 30 g/L de maltose em <i>shaker</i> com agitação recíproca. ....	69
Figura V.25 - Esquema da Fermentação alcoólica pelos fungos. ....	70
Figura V.26 - Evolução das concentrações de amilase, biomassa, pH e pigmento <i>Monascus</i> em meio de cultivo submerso contendo amido de arroz (3 g/L), glutamato monossódico (GMS) e sais à temperatura de 30 <sup>0</sup> C e a 160 min <sup>-1</sup> de frequência de agitação em <i>shaker</i> com agitação orbital.....	72
Figura V.27 - Evolução das concentrações de amilase, biomassa, pH e pigmento <i>Monascus</i> em meio de cultivo submerso contendo farelo de arroz (3 g/L), glutamato monossódico (GMS) (5 g/L) e sais (meio segundo Pastrana, 1995) à temperatura de 30 <sup>0</sup> C e a 160 min <sup>-1</sup> de frequência de agitação em <i>shaker</i> com agitação orbital. ....	73
Figura V.28- Evolução das concentrações de biomassa e pigmento <i>Monascus</i> em meio de cultivo submerso contendo farelo de arroz (3 g/L) e glutamato monossódico (GMS), baseado em estudos de Kim (Meio A – pH inicial 6,5) e Orozco (Meio B – pH inicial 5,5) à temperatura de 30 <sup>0</sup> C e a 160 min <sup>-1</sup> de frequência agitação em <i>shaker</i> com agitação orbital.....	74
Figura V.29 - Evolução das concentrações de biomassa, pH e pigmento <i>Monascus</i> em meio de cultivo submerso contendo farelo de arroz parboilizado (3 g/L), glicose (5 g/L) e glutamato monossódico (GMS) (5 g/L) sem adição de sais inorgânicos à temperatura de 30 <sup>0</sup> C, pH inicial 6,5 e a 160 min <sup>-1</sup> de frequência agitação em <i>shaker</i> com agitação orbital. ....	75
Figura V.30 - Evolução das concentrações de biomassa, pH e pigmento <i>Monascus</i> em meio de cultivo submerso contendo farelo de arroz parboilizado (3 g/L), glicose (5 g/L), glutamato monossódico (GMS) sem adição de sais inorgânicos à temperatura de 30 <sup>0</sup> C, pH inicial 5,5 e a 160 min <sup>-1</sup> de frequência agitação em <i>shaker</i> com agitação orbital. ....	76
Figura V.31 - Evolução de fermentação submersa em meio de cultivo sintético contendo 20 g/L de glicose e 5 g/L de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , em meio de sais à temperatura 30 <sup>0</sup> C e a 160 min <sup>-1</sup> de frequência agitação.....	81
Figura V.32 - Evolução de fermentação submersa em meio de cultivo sintético contendo 20 g/L de glicose e 5 g/L de glutamato monossódico (GMS) em meio de sais à temperatura 30 <sup>0</sup> C e a 160 min <sup>-1</sup> de frequência agitação.....	81

Figura V.33 - Evolução de fermentação submersa em meio de cultivo sintético contendo 20 g/L de glicose e 5 g/L de glicina em meio de sais à temperatura 30 <sup>o</sup> C e a 160 min <sup>-1</sup> de frequência agitação.....	82
Figura V.34 - Evolução de fermentação submersa em meio de cultivo sintético contendo 20 g/L de glicose e 5 g/L de histidina em meio de sais à temperatura 30 <sup>o</sup> C e a 160 min <sup>-1</sup> de frequência agitação.....	82
Figura V.35 – Produtividade média expressa em UDO <sub>480</sub> .h <sup>-1</sup> para os aminoácidos estudados.....	83
Figura V.36 - Evolução de fermentação submersa em meio de cultivo sintético contendo 3 g/L de farelo de arroz, 5 g/L de glicose, 5 g/L de glicina e sais (Pastrana, 1995) à temperatura de 30 <sup>o</sup> C e 160 min <sup>-1</sup> de frequência agitação.....	84
Figura VI.37 - Formação hipotética de N-glutarilmonascorubramina por <i>Monascus ruber</i> Fonte: HAJJAJ, 2000.....	89
Figura VI.38 – Fórmula estrutural da molécula de citrinina (Fonte: FRANCO et al., 1996).....	92
Figura VI.39 - Esquema de formação de citrinina e pigmentos vermelhos a partir da condensação de 1 molécula de acetil CoA e 3 moléculas de malonil CoA (Fonte: HAJJAJ, 1999a).....	93
Figura VI.40 - Reações químicas ocorridas para formação de citrinina (HAJJAJ, 1999a).....	94
Figura VI.41 - Efeito da concentração de octanoato de sódio sobre a produção de pigmentos vermelhos e citrinina no cultivo de <i>Monascus ruber</i> em presença de glicose (MEIO A - meio sintético contendo glicose (20 g/L), glicina (5 g/L) e sais) e farelo de arroz (MEIO B - meio complexo contendo farelo de arroz (25 g/L), glicose (5 g/L) e glicina (5 g/L)). Em ambos os experimentos o volume útil foi de 4L em biorreator. O pH inicial foi 5,5, não sendo controlado durante o processo em 76 horas de cultivo. ....	98
Figura VI.42 - Cinética de produção de pigmentos vermelhos durante cultivo descontínuo em biorreator do <i>Monascus ruber</i> em meio sintético contendo glicose (20 g/L), glicina (5 g/L) e sais, na <b>ausência</b> de octanoato de sódio. O pH inicial foi 5,5, não sendo controlado durante o processo. ....	99
Figura VI.43 - Cinética de produção de pigmentos vermelhos durante cultivo descontínuo em biorreator do <i>Monascus ruber</i> em meio sintético contendo glicose (20 g/L), glicina (5 g/L) e sais, na <b>presença</b> de de octanoato de sódio (2 mM). O pH inicial foi 5,5, não sendo controlado durante o processo.....	100
Figura VI.44 - Cinética de produção de pigmento vermelho durante cultivo descontínuo em biorreator do <i>Monascus ruber</i> em meio complexo contendo farelo de arroz (25 g/L), glicose (5 g/L)	

e glicina (5 g/L), na <b>ausência</b> de de octanoato de sódio. O pH inicial foi 5,5, não sendo controlado durante o processo e a vazão específica de ar foi de 0,4 vvm à temperatura de 30°C. ....	100
Figura VI.45 - Cinética de produção de pigmento vermelho durante cultivo descontínuo em biorreator do <i>Monascus ruber</i> em meio complexo contendo farelo de arroz (25 g/L), glicose (5 g/L) e glicina (5 g/L) , na <b>presença</b> de de octanoato de sódio (2 mM). O pH inicial foi 5,5, não sendo controlado durante o processo e a vazão específica de ar foi de 0,4 vvm à temperatura de 30°C. ....	101
Figura VII.46 – Cinética da formação de pigmentos vermelhos, citrinina, biomassa, pH, consumo de substrato e percentual de percentual de saturação de oxigênio para o cultivo conduzido em farelo de arroz (100 g/L), glicina (5 g/L) e glicose (5 g/L) em pH inicial 5.5 sem controle, à frequência de agitação de <b>500</b> min <sup>-1</sup> , vazão específica de ar 0,4 vvm e 30°C. ....	106
Figura VII.47 - Cinética da formação de pigmentos vermelhos, citrinina, biomassa, pH, consumo de substrato e percentual de saturação de oxigênio para o cultivo conduzido em farelo de arroz (100 g/L), glicina (5 g/L) e glicose (5 g/L) em pH inicial 5.5 sem controle, à frequência de agitação de <b>300</b> min <sup>-1</sup> , vazão específica de ar 0,4 vvm e 30°C.....	106
Figura VII.48 - Cinética da formação de pigmentos vermelhos, citrinina, biomassa, pH, consumo de substrato e percentual de saturação de oxigênio para o cultivo conduzido em farelo de arroz (100 g/L), glicina (5 g/L) e glicose (5 g/L) em pH inicial 5.5 sem controle, à frequência de agitação de 500 min (fase de crescimento) e 300 min <sup>-1</sup> (fase de produção), vazão específica de ar 0,4 vvm e 30°C. ....	107
Figura VII.49 - Cinética da formação de pigmentos vermelhos, citrinina, biomassa, pH, consumo de substrato e percentual de saturação de oxigênio para o cultivo conduzido em farelo de arroz (100 g/L), glicina (5 g/L) e glicose (5 g/L), com controle de pH (5,5) e à frequência de agitação de 300 min <sup>-1</sup> , vazão específica de ar 0,4 vvm e 30°C.....	110
Figura VII.50 - Cinética da formação de pigmentos vermelhos, citrinina, biomassa, pH, consumo de substrato e percentual de saturação de oxigênio para o cultivo conduzido em farelo de arroz (100 g/L), glicina (5 g/L) e glicose (5 g/L), com controle de pH (8,0) e à frequência de agitação de 300 min <sup>-1</sup> , vazão específica de ar 0,4 vvm e 30°C.....	111
Figura VII.51 - Cinética da formação de pigmentos vermelhos, citrinina, biomassa, pH, consumo de substrato e percentual de saturação de oxigênio para o cultivo conduzido em farelo de arroz (100 g/L), glicina (5 g/L) e glicose (5 g/L), com controle de pH (5,5) e à frequência de agitação de 300 min <sup>-1</sup> , vazão específica de ar 0,4 vvm e 30°C., suplementado com sulfato de zinco. ....	111

---

## ÍNDICE DE TABELAS

---

Tabela II.1 – Pigmentos naturais usados no Japão em 1994.....	12
Tabela II.2 – Pigmentos naturais aprovados para uso no Brasil. (ANVISA, 2001).....	13
Tabela II.3 - Fontes naturais dos pigmentos alimentares. ....	16
Tabela II.4 - Aceitação dos Corantes Naturais nos Principais Mercados Internacionais .....	21
Tabela II.5 - Lista de corantes sintéticos autorizados nos países da União Européia e nos Estados Unidos. ....	23
Tabela II.6 - Lista de corantes naturais disponíveis no mercado mundial.....	24
Tabela IV.7 - Teste colorimétrico de assimilação de substratos (auxanograma) pelo <i>Monascus ruber</i> utilizando o Kit Auxacolor® - (SANOFI).....	59
Tabela IV.8 – Teste de produção de pigmentos vermelhos em meio de cultivo submersos (frascos agitados).....	59
Tabela IV.9 - Teste de produção de pigmentos vermelhos em meio de cultivo submersos (frascos agitados) para as seguintes fontes de carbono: glicose, maltose e frutose.....	59
Tabela V.10 - Influência da fonte de aminoácidos, na concentração de 5 g/L, sobre a produção de pigmento vermelho, expresso em UDO <sub>500</sub> e citrulina. ....	79
Tabela V.11 – Resultados obtidos nos ensaios contendo diferentes concentrações de farelo de arroz parboilizado a 30°C de temperatura, 160 min <sup>-1</sup> de frequência agitação em <i>shaker</i> e pH inicial 5,5. ....	86
Tabela VI.12 - Efeito da adição dos ácidos graxos (1 mM) sobre a produção de pigmentos e citrulina durante a fermentação submersa do <i>Monascus ruber</i> em presença de glicose e glutamato monossódico. Fonte: (HAJJAJ, KLAEBE, GOMA et al., 2000b). ....	91
Tabela V.13 - Bactérias sensíveis à ação antimicrobiana produzida por <i>Monascus purpureus</i> CCRC 31499 Fonte: (SABATER-VILAR, MAAS e FINK-GREMMELS, 1999).....	95
Tabela VII.14 – Descrição dos ensaios realizados. ....	105

Tabela VII.15 – Parâmetros cinéticos máximos para produção de pigmentos vermelhos. .... 107

Tabela VII.16 - Descrição dos ensaios realizados. .... 109

Tabela VII.17 – Parâmetros cinéticos máximos para produção de pigmentos vermelhos. .... 109

# LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

---

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

BDA – Batata Dextrose Ágar;

dL – decilitro ( $1 \times 10^{-1}$ L)

DO% - Percentual de Oxigênio Dissolvido;

EFAP – Extrato de Farelo de Arroz Parboilizado;

GENAMAZ - Rede Para Conservação E Uso Dos Recursos Genéticos

GMS – Glutamato Monossódico;

$\text{min}^{-1}$  – Unidades de Frequência de agitação;

mM – Unidade em milimolar;

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

$K_{La}$  – Coeficiente de Transferência de massa do oxigênio da fase gasosa para a fase líquida;

$L_D$  – Limite de detecção

PA – Para análise;

PM – Peso Molecular;

$P_M$  – Produtividade média em pigmentos ( $\text{UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$ ), no instante de tempo ( $t - t_0$ );

$r$  – coeficiente de correlação da reta;

$S_{g/L}$  – Concentração de Substrato (g/L);

$t$  – Tempo;

$\text{UDO}_{480}$  – Unidade de Densidade Óptica a 480 nm que representa a quantidade de pigmento vermelho (pigmento Monascus);

U/dL – Unidades Caraway (que representa a quantidade de amilase por dL)

UI – Unidades Internacionais;

vvm -- Volume de ar por volume por minuto;

$X$  – Concentração Celular (g/L);

$Y_{M/S}$  = Fator de conversão de substrato  $S$  no componente  $M$  (pigmento Monascus, ( $\text{UDO}_{480} \cdot \text{g}^{-1}$ ) ou  $X$ , biomassa ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )).

$Y_{X/S}$  – Fator de Conversão de Substrato em Células;

$M$  = componente que pode representar a biomassa (g), biomassa residual (g) ou pigmento Monascus ( $\text{UDO}_{480}$ ).

$\mu_{\text{max}}$  = Velocidade específica máxima de crescimento;

## RESUMO

---

A produção de pigmentos alimentares de origem natural está em pleno desenvolvimento nos países da União Européia e Estados Unidos. O desenvolvimento dos produtos com uma aparência atrativa foi sempre um objetivo importante para a indústria alimentícia. Tal é o caso da utilização do corante vermelho produzido por espécies do fungo filamentosso *Monascus*. Atualmente, estes pigmentos estão substituindo os sais de nitrito, precursores de nitrosamina. O foco principal deste trabalho foi estudar a produção de pigmentos vermelhos formados por *Monascus ruber* em cultivo submerso utilizando substratos de baixo custo da agro-indústria. O objetivo foi aumentar a produção de corante vermelho e reduzir a concentração de citrinina (micotoxina indesejável). Os dados cinéticos e estequiométricos, assim como, as características de reprodução da linhagem escolhida *Monascus ruber* CCT 3802 foram também investigados. O trabalho experimental foi realizado em duas etapas. Em uma primeira etapa, foram estudadas as condições de produção de pigmentos vermelhos, tais como: tipo de substrato, influência da fonte de nitrogênio, tipos de meios de cultivo (sintético ou complexo) e influência da adição de ácidos graxos ao meio de cultivo. Verificou-se que os substratos que mais favoreceram a produção de pigmentos vermelhos foram o farelo de arroz e o amido de arroz quando associados com a glicina como fonte de nitrogênio. A adição de octanoato de sódio 2 mM reduziu a concentração de citrinina ( de 33,7 para 7,9 mg/L) no meio de cultivo contendo glicose, aumentando também a produção de pigmento. Porém, quando foi utilizado como fonte de carbono o farelo de arroz, a adição de 2 mM de octanoato de sódio não influenciou a concentração de citrinina. Também, foi constatado que existe relação direta entre a produção de pigmentos vermelhos e o ciclo de reprodução sexuada do fungo (formação de cleistotécios). Na segunda etapa, foram estabelecidas as condições de cultivo em biorreator para produção do corante. Nesta etapa foi verificado que o controle da frequência de agitação e variações nos valores de pH são fundamentais para que ocorra aumento na produção de pigmentos vermelhos e redução da concentração de citrinina. Foram encontradas concentrações três vezes superiores às relatadas na bibliografia destes pigmentos vermelhos (33,5 UDO<sub>480</sub>), além de baixas concentrações de citrinina (7,0 mg/L) em meio de cultivo submerso contendo em g/L extrato de farelo de arroz (100), glicina (5) e sulfato de zinco (0,01), uma frequência de agitação de 300 min<sup>-1</sup> e 0,4 vvm. A temperatura foi de 30° C e o pH inicial foi 5,5, sem controle). A produtividade elevada de 0,84 DO<sub>480</sub>.h<sup>-1</sup> indica que a produção industrial deste corante por espécies de *Monascus* em fermentação submersa, utilizando meios de cultivo de baixo custo, pode ser tão promissora quanto a produção industrial em fermentação sólida que utilizam meios tradicionais (arroz e pão).

## ABSTRACT

---

The production of alimentary pigment of natural origin has been fully developed in the European Union and United States. Developing products with an attractive aspect has always been the main target of the food industry. An example of that is the use of the red pigment produced by the filamentous fungus *Monascus*. Currently these pigments are replacing nitrit salts, nitrosamin precursory. The aim of this work has been to study the production of red pigments formed by *Monascus ruber* in submerged cultivation using low cost substrate from agro-industry. The target was to increase the production of this red pigment and reduce the concentration of citrinin (undesirable micotoxin). The kinetic and stochiometric data, as well as the reproduction characteristics, of this chosen strain *Monascus ruber* CCT 3802 has been investigated aswell. This experimental work has been accomplished in two stages. The first stage studied the conditions for the production of this red pigment, such as: type of substrate, influence of the nitrogen source, ways of cultivation (synthetic or complex) and the influence of acids over the cultivation. It was verified that substrates that worked best over the red pigment production were rice bran and starch when associated to glicin as a carbon source. The addition of sodium octanoate 2 mM decreased the concentration of citrinin (from 33,7 to 7,9 mg/L) on the cultivation which contained glucose, it has also increased the production of the pigment. It was also discovered that there is a direct connection between the red pigment production and the sexual reproduction cycle of this fungus (development of cleistothecium). On the second stage, the cultivation conditions had been established in a bioreactor, in order to produce the pigment. On this stage, it was proved that the frequency control of agitation and variation of pH values is essential to maximize the red pigments and minimize the concentration of citrinin. It was found that these concentrations happened to be three times superior than they were on previous experiments of red pigment production, (33,5 UDO<sub>480</sub>) except the low concentrations of citrinin (7,0 mg/L) in submerged cultivation which contained in g/L extract of rice bran (100), glicin (5) and zinc sulphate (0,01), the agitation frequency was 300 min<sup>-1</sup> and 0,4 vvm. The temperature was 30°C and the initial pH was 5,5, no control). The high productivity of 0,84 DO<sub>480</sub>.L<sup>-1</sup> means that the industrial production of this pigment by *Monascus* in submerged fermentation, using low cost cultivations, can be as promising as the industrial production over the solid fermentation, which uses traditional means (rice and bread).

"Sucesso é conseguir aquilo que você quer.  
Felicidade é gostar daquilo que você conseguiu".  
(Autor desconhecido)

## **CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

---

Este capítulo apresenta os conceitos introdutórios necessários à compreensão do objetivo deste trabalho de doutorado. Este consiste no estudo da produção de pigmentos vermelhos a partir do fungo filamentoso *Monascus ruber*. Para tanto, são avaliadas as condições de cultivo em fermentação submersa, os metabólitos produzidos por este microrganismo e os parâmetros cinéticos para a obtenção do pigmento.

Estudos em fermentação submersa são pouco abordados, com este fungo no Brasil e, explorar esta área, permite avaliar etapas como o aumento de escala da produção do pigmento a partir da engenharia biotecnológica.

# I. INTRODUÇÃO

---

Ao final do século XIX, o desenvolvimento da indústria de alimentos levou à produção de inúmeros corantes sintéticos, os quais chegaram a totalizar o número de 700. Prevaleram razões de ordem estética em detrimento da qualidade do produto. Seguiu-se então a formulação de leis para uso destes corantes, com o objetivo de proteger a saúde do consumidor. Assim, no início do século XX, uma lista dos corantes permitidos foi divulgada nos EUA e hoje, apenas sete corantes sintéticos são permitidos. Nos últimos vinte anos, a preocupação dos consumidores com a qualidade dos alimentos vem aumentando, e assim, estabeleceu-se uma tendência cada vez maior de preferência por produtos naturais. Com o progresso da ciência e tecnologia, a população reconhece gradualmente que os pigmentos sintéticos podem induzir o câncer. Conseqüentemente, são ou serão proibidos em muitos campos de aplicação, em especial na coloração dos alimentos (SAKO, KOBAYASHI, WATABE ET AL., 1983; CHAGAS, CAMPELLO, KLUPPEL ET AL., 1995; SCUDAMORE E HETMANSKI, 1995; KREJCI, BRETZ E KOECHEL, 1996; STORMER E HOIBY, 1996; BERNDT, 1998; BONDY E ARMSTRONG, 1998; PFEIFFER, GROSS E METZLER, 1998; RIBEIRO, CAMPELLO, CHAGAS ET AL., 1998; MANDT, BLUME-PEYTAVI, PFROMMER ET AL., 1999; WIGGER-ALBERTI, BAUER, HIPLER ET AL., 1999).

A utilização de substâncias sintéticas, derivados de produtos petroquímicos, atinge diretamente a produção de corantes alimentares, fato este que preocupa quanto ao aspecto de alterações orgânicas que possam ser causadas pela ingestão destas substâncias ao longo do tempo (WIGGER-ALBERTI, BAUER, HIPLER et al., 1999; VANDENPLAS, CAROYER, CANGH et al., 2000; HIPLER, WIGGER-ALBERTI, BAUER et al., 2002). De vinte e nove corantes para alimentos aprovados pela União Européia, dezesseis são sintetizados quimicamente, e treze provêm de fontes naturais. É bem provável que o aumento das restrições quanto aos derivados petroquímicos venha a eliminar alguns corantes que são atualmente utilizados. Conseqüentemente, há a necessidade de se encontrar fontes alternativas para corantes em alimentos, sendo a cultura microbiana uma ferramenta importante para ser explorada.

A exportação de corantes naturais pelo Brasil para os países desenvolvidos, poderá ser de grande importância nos próximos anos, em face das restrições legais ao consumo de alguns corantes sintéticos que são fundamentais na aparência dos produtos de clorofila, clorofilina de sódio ou de cobre, hematoxilina, hematina, tornassol e outras matérias (MAIMOM, 2000).

A indústria processadora de corantes no Brasil concentra-se na produção dos naturais. A maioria das indústrias instaladas é, também, importadora de corantes ou matérias-primas semi-processadas para garantir a produção de corantes sintéticos, sintéticos idênticos aos naturais e inorgânicos. A matéria-prima para a produção do carmim é toda importada (MAIMOM, 2000).

Enquanto os pigmentos sintéticos estão sendo reduzidos, o mercado de pigmentos naturais está em expansão. Neste contexto, os métodos mais adequados de produção e extração destes pigmentos merecem ser estudados. A base científica brasileira deve ser incrementada para a industrialização e introdução destes produtos de origem biotecnológica principalmente no mercado nacional. Porém, mesmo nos países da União Européia, a fermentação submersa para a produção de pigmentos, ainda é um campo a ser explorado.

Os fungos filamentosos, potenciais produtores de pigmentos naturais, são organismos promissores para a indústria produtora de proteínas heterólogas, ácidos orgânicos e policetídeos. Policetídeos são produtos naturais estruturalmente complexos e extremamente ricos em moléculas bioativas. Incluem um número grande de importantes produtos farmacêuticos, antibióticos, agentes anticancerígenos, imunossuppressores, agentes antiparasitários, antifúngicos, agentes cardiovasculares; produtos veterinários e aditivos alimentares, especialmente pigmentos (KUJUMDZIEVA, HALLET, SAVOV et al., 1997).

Diante deste cenário, o fungo *Monascus* se destaca, uma vez que existe mais de cinquenta patentes sobre a produção de pigmentos vermelhos, laranja e amarelo, por este microrganismo, principalmente no Japão, EUA, França e Alemanha. O consumo anual de pigmentos, obtidos a partir de espécies do fungo *Monascus*, no Japão cresceu de 100 toneladas em 1981 para 600 toneladas em 1992 e em valores de 12 milhões de dólares de acordo com relatos publicados em 1992 e 1995 (LIN, YAKUSHIJIN e DEMAIN, 1992; LEE, CHEN, CHAUVATCHARINS et al., 1995; HAJJAJ, KLAEBE, LORET et al., 1997). Estima-se que o consumo brasileiro de pigmentos naturais seja da ordem 200 toneladas por ano, os quais movimentam cerca de oitenta milhões de reais. Este consumo pode vir a ser aumentado, considerando-se o amplo uso de carmim de cochinha e sais de nitrito e nitrato (substâncias mais tóxicas que o pigmento *Monascus*) na coloração de alimentos cárneos, além das demais aplicações na indústria alimentícia (FINK-GREMMELS, DRESEL e LEISTNER, 1991; KILIKIAN, 2002).

Dentre os pigmentos formados pelo *Monascus*, o vermelho é o de maior importância na indústria de alimentos, devido à sua aplicabilidade. Produtos cárneos, peixes, "ketchup", chocolates, sorvetes, vinagre, pickles, sopas, cremes, salgadinhos e outros fazem uso deste corante. Especial interesse existe nesta cor devido à sua estabilidade à temperatura e à luz (FINK-GREMMELS, DRESEL e LEISTNER, 1991).

Cabe ressaltar que os estudos apresentados atualmente, tanto no Brasil quanto nos países citados, são realizados com fermentação sólida. No estado sólido, a produção de pigmentos vermelhos por espécies do fungo *Monascus* ainda é maior, uma vez que a produção do pigmento é extracelular (JACOBSEN e WASILESKI, 1994). Diversos estudos tentando aumentar a eficiência destes processos (meio de cultivo sólido) são relatados, justificando sua importância econômica (TENG e FELDHEIM, 2001). Por isso, torna-se necessário investir mais no conhecimento do processo bioquímico e biotecnológico em cultivo submerso com o objetivo de tornar competitivo ou mesmo melhorar a produção de pigmentos obtidos nos processos que utilizam o meio de cultivo sólido.

Alguns autores (HAJJAJ, BLANC, GOMA et al., 1998; SABATER-VILAR, MAAS e FINK-GREMMELS, 1999), afirmam que a produção de pigmentos vermelhos em cultivo submerso deve ser melhor explorada, por acreditarem ser possível produzir elevadas concentrações destes corantes neste tipo de processo (cultivo submerso). Estratégias para extrair o pigmento do interior das células fúngicas, descobertas de novos metabólitos bioativos e enzimas de interesse comercial, são atrativos que favorecem o investimento nesta área de conhecimento. Além disso, é sabido que moléculas tóxicas (citrinina) são produzidas concomitantemente com os pigmentos vermelhos durante o cultivo em meio sólido ou líquido (submerso). Porém, modificações e controle dos principais parâmetros de cultivo, podem ser melhor administrados em cultivo submerso que em cultivo em meios sólidos. Estes fatos são extremamente importantes, uma vez que a utilização dos pigmentos vermelhos foi proibida em alguns países devido à presença de citrinina. Tal avaliação ainda é polêmica na atualidade, pois, segundo vários autores, o potencial tóxico do extrato de espécies de *Monascus* é muito mais baixo que da nitrosamina, que ocorre em carnes curadas (BLANC, LAUSSAC, LE BARS et al., 1995; BLANC, 1999; BAKOSOVA, 2001).

São consideradas doses letais de citrinina, valores entre 10 a 100mg/kg de massa corporal, determinadas em camundongos e ratos. Tomando-se por referência uma pessoa de 60kg, a dosagem máxima de corante permitida pela legislação (0,01%), a dose mínima letal (10mg/kg), e ainda, o teor de citrinina frequentemente encontrado nos extratos importados (0,03mg/g), seria necessário o consumo de 200 kg de alimento colorido com extrato de *Monascus* para a ocorrência do efeito letal. Embora tal dose letal, claramente não possa ser atingida, é importante selecionar cepas e condições de cultivo que minimizem a formação deste metabólito, como, por exemplo, composição do meio de cultivo e cepa empregada (BRESLER, BRIZZIO e VAAMONDE, 1995; CHAGAS, CAMPELLO, KLUPPEL et al., 1995; BONDY e ARMSTRONG, 1998; RIBEIRO, CAMPELLO, CHAGAS et al., 1998; SABATER-VILAR, MAAS e FINK-GREMMELS, 1999; HAJJAJ, KLAEBE, LORET et al., 1999b; BEGUM e SAMAJPATI, 2000; ATROSHI, RIZZO, WESTERMARCK et al., 2002; BAILLY, QUERIN, LE BARS-BAILLY et al., 2002; KILIKIAN, 2002).

Diante das potencialidades metabólicas do fungo *Monascus ruber*, tornou-se necessária a realização de um estudo das suas características fisiológicas, morfológicas e bioquímicas, buscando alternativas para uma maior produtividade de pigmentos vermelhos. Este estudo é fundamental uma vez que as condições de cultivo em fermentação submersa se alteram de uma linhagem do microrganismo para outra. Além disso, muito poucos estudos são realizados nesta área no Brasil segundo o relatório do Projeto BRA/96/025 - ACORDO SUDAM/PNUD (MAIMOM, 2000).

O objetivo deste trabalho foi o estudo da formação de pigmentos vermelhos, através da avaliação do substrato (resíduo agro-industrial), da fonte de nitrogênio e das condições de cultivo, como alternativa para redução dos custos de produção, extração e purificação do produto final, além da minimização da concentração de toxina (citrinina) formada juntamente com os pigmentos vermelhos. Parâmetros como a temperatura e o pH foram avaliados baseados em estudos de outros autores (CARELS e SHEPHERD, 1979; HAMDY, BLANC e GOMA, 1996; BLANC, 1999; KILIKIAN, 2002). Um estudo investigativo pode evidenciar a produção de enzimas importantes, como a amilase.

Este documento está dividido em capítulos de acordo com as etapas realizadas no trabalho. Cada capítulo apresenta uma introdução específica, bem como a metodologia aplicada a cada objetivo.

Os conceitos gerais, aplicados a todos os objetivos do trabalho são apresentados no Capítulo II. Neste, foi realizada a revisão bibliográfica, definindo-se pigmento natural e sintético, enquadrando o pigmento *Monascus* neste contexto, indicando sua importância econômica no mercado nacional e internacional e justificando a escolha do processo biotecnológico para produção de pigmentos vermelhos (também conhecido como Pigmento *Monascus*).

No Capítulo III, foram descritos os materiais, os equipamentos, o microrganismo e o meio de cultivo. São relatados também, os métodos analíticos usados na determinação da concentração de biomassa, glicose, pigmento vermelho e etanol.

Nos Capítulos IV e V, são apresentados os estudos físiomorfológico do fungo *Monascus* e a avaliação dos substratos utilizáveis para produção de pigmentos vermelhos. O objetivo deste estudo (realizados em frascos agitados) foi a escolha do melhor substrato capaz aumentar a produtividade do corante vermelho. No capítulo V, foi avaliada também a influência da fonte de nitrogênio sobre a produção de pigmento. Nesse capítulo foi determinado o tipo de substrato (farelo de arroz e glicose) para estudos posteriores.

No capítulo VI, foi verificada a utilização de ácidos graxos adicionados ao meio de cultivo, com o objetivo de reduzir a produção de citrinina. Esta etapa foi realizada em biorreator.

No capítulo VII, foi fundamentada a importância das etapas realizadas em frascos agitados para produção de pigmentos vermelhos em fermentador, estudou-se, neste capítulo, o pH e a frequência de agitação com o objetivo de aumentar a concentração de pigmentos vermelhos e sua influência sobre a produção de citrinina.

Finalmente, a conclusão dos resultados obtidos e as perspectivas para novos estudos são relatadas no capítulo VIII.

## II. OBJETIVOS

---

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver estratégias de aumento da produção de pigmentos vermelhos a partir de substratos de baixo custo em cultivo submerso, utilizando o fungo filamentoso *Monascus ruber* (CCT 3802).

Os objetivos específicos foram:

1. Estudar a micromorfologia do fungo filamentoso *Monascus ruber* relacionando as suas características de reprodução (sexuada e assexuada) com a produção de biopigmentos.
2. Avaliar os substratos utilizáveis, especificamente farelo de arroz parboilizado, para produção de pigmentos vermelhos a partir do fungo *Monascus ruber* CCT 3802, observando também a formação de amilase.
3. Estudar a influência de fontes de nitrogênio ao meio de cultivo buscando aumentar a produção de pigmentos extracelular em cultivo submerso.
4. Reduzir a concentração de citrinina durante a produção de pigmentos vermelhos.
5. Estudar os parâmetros de cultivo de produção de pigmentos vermelhos em biorreator.

*"Pouco conhecimento faz que as criaturas se sintam orgulhosas.  
Muito conhecimento, que se sintam humildes."  
Leonardo da Vinci*

## **CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA GERAL**

---

Neste capítulo é apresentada uma revisão abordando conceitos gerais aplicados a todo o escopo do trabalho; enfatizando os principais pigmentos utilizados na indústria de alimentos, situando os pigmentos vermelhos (pigmento Monascus) dentre estes. Detalhes sobre a fundamentação de cada parte específica deste trabalho são apresentados nos capítulos subseqüentes.

## **PIGMENTOS**

Embora o consumo de um determinado alimento devesse depender principalmente do seu valor nutricional, a sua cor, aroma e textura são fatores que conduzem à preferência do consumidor. Dentre estes fatores, a cor é o mais importante fator de preferência, já que a qualidade que mais facilmente desperta a atenção do consumidor (BOBBIO e BOBBIO, 1995), e é conseqüentemente, o principal critério para identificação e julgamento da qualidade do produto (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).

Para a indústria alimentícia, a cor também é extremamente importante e fator determinante na palatabilidade e aparência dos alimentos. Pigmentos sintéticos, tradicionalmente usados nos processamentos alimentícios, continuam sendo utilizados com sucesso, mas, por outro lado, está ocorrendo o aumento da preferência do consumidor por aditivos alimentares naturais. Apesar da ótima oportunidade na utilização de pigmentos de origem biotecnológica, como o  $\beta$ -caroteno e a riboflavina, seu segmento é limitado. Isto se deve ao elevado custo de produção destes pigmentos extraídos de fontes naturais em relação aos pigmentos sintéticos (GUNNARD, WASILESKI e ALAN, 1994).

Uma grande variedade de vegetais, plantas, animais e microrganismos produzem pigmentos. Sua forma de produção é variada e a tecnologia utilizada para sua produção, depende principalmente, do agente empregado neste processo. A Tabela II.1 resume os corantes usados como aditivos alimentares no Japão. Estes pigmentos são considerados como essenciais nos processos de produção de alimentos.

Os corantes alimentares podem ser naturais (Tabela II.1 e II.2) ou sintéticos (Tabela II.5) e, na maioria das vezes, isentos de qualquer valor nutricional. A maior desvantagem dos corantes sintéticos se deve à crescente descoberta de efeitos desagradáveis como toxicidade, mutagênese e potencial carcinogênico (EL-KADY, EL-MARAGHY e ZOHRI, 1994; SCUDAMORE e HETMANSKI, 1995; KREJCI, BRETZ e KOECHEL, 1996; BERNDT, 1998; BONDY e ARMSTRONG, 1998; DA LOZZO, OLIVEIRA e CARNIERI, 1998; JANARDHANA, RAVEESHA e SHETTY, 1999; SABATER-VILAR, MAAS e FINK-GREMMELS, 1999; BEGUM e SAMAJPATI, 2000; HIPLER, WIGGER-ALBERTI, BAUER et al., 2000; ABRUNHOSA, PATERSON, KOZAKIEWICZ et al., 2001; JUNG, TAKEDA, KIM et al., 2001; ATROSHI, RIZZO, WESTERMARCK et al., 2002; BAILLY, QUERIN, LE BARS-BAILLY et al., 2002).

Quase todos os pigmentos naturais (Tabela II.1 e Tabela II.2) presentes nos alimentos possuem estruturas complexas com diferentes grupos funcionais nas moléculas. Os principais tipos de pigmentos naturais estão agrupados pelo tipo de estrutura básica em:

- Porfirinas;
- Betalaínas;

- Flavonóides
  - Antocianinas (cores azul e vermelho)
  - Antoxantinas (cores nos tons amarelos)
  - Leucoantocianidinas (incolores)
- Carotenóides;
- Taninos;
- Outros pigmentos (quinonas – ácido carmínico, polifenóis, Monascus - Monascin, etc.) (BOBBIO e BOBBIO, 1995).

Tabela II.1 – Pigmentos naturais usados no Japão em 1994.

<i>Pigmento alimentar</i>	<i>Quantidade (kg)</i>	<i>Pigmento alimentar</i>	<i>Quantidade (kg)</i>
Carotenóides	1230 000	Antraquinonas	133 000
Anato	550 000	Corante vermelho de cochonilla (inseto)	120 000
Páprica	250 000	Madder (Alizarin)	10 000
Gardenia amarela	350 000	Lac derivado da Araucária	3 000
Extrato de caroteno	80 000	Outros	1 195 000
Antocianinas	385 000	Beterraba	230 000
Repolho vermelho	100 000	Curcumin (diferuloyl methane)	150 000
Casca de uva	100 000	<b>Monascus</b>	700 000
Bago de uva	90 000	Gardenia azul	100 000
Milho roxo	50 000	Espirulina	15 000
Suco de uva	20 000	Óleo vegetal <i>Safflower</i>	180 000
Painço vermelha	15 000		
Batata doce púrpura	10 000		
Flavonóides	308 000		
Sorgo	26 000		
Cebola	50 000		
Flor da árvore <i>Parkii de Butyrosperum</i>	2 000		
cacau	50 000	TOTAL	3 251 000 Kg

Fonte: WATANABE et al., 1999.

O Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares, conforme apresenta a Tabela II.2, foi elaborado pelo Comitê do Codex sobre Aditivos Alimentares e Contaminantes de Alimentos para estabelecer um sistema numérico internacional (INS) de identificação dos aditivos alimentares nas listas de ingredientes como alternativa à declaração do nome específico do aditivo (CI *name*), baseado no número de identificação (CI). O *International Numbering System* (INS) não supõe uma aprovação toxicológica da substância pelo Codex (ANVISA, 2001).

Tabela II.2 – Pigmentos naturais aprovados para uso no Brasil. (ANVISA, 2001).

INS*	CI**	CI name***	Corante
100	75300	<i>Natural Yellow 3</i>	Curcuma/ curcumina
101i	-	-	Riboflavina
101ii	-	-	Riboflavina 5' fosfato de sódio
120	75470	<i>Natural Red 4</i>	Carmim, ácido carmínico, cochonilha, sais de Na, k, NH <sub>4</sub> , Ca
140i	75810	<i>Natural Green 3</i>	Clorofila
140ii	75810	<i>Natural Green 3</i>	Clorofilina
141i	75815	<i>Natural Green 3</i>	Clorofila cúprica
141ii	75815	<i>Natural Green 3</i>	Clorofilina cúprica, sais de Na e K
153	-	-	Carvão vegetal
160 a (ii)	75130	<i>Food orange 5</i>	Carotenos: extratos naturais (alfa, beta, gama)
160b	75120	<i>Natural Orange 4</i>	Urucum, bixina, norbixina, annato, sais de Na e K
160c	-	-	Páprica, capsorubina, capsantina
160d	75125	<i>Natural Yellow 27</i>	Licopeno
160e	40820	<i>Food Orange 6</i>	Beta-apo-8'-carotenal
160f	40825	<i>Food Orange 7</i>	Éster metílico ou etílico do ácido Beta-apo-8'-carotenal
161 b	-	-	Luteína
161g	40850	<i>Food Orange 8</i>	Cataxantina
162	-	-	Vermelho de beterraba, betanina
163 i	-	-	Antocianinas (de frutas e hortaliças)
163ii	-	-	Extrato de casca de uva

**Fonte:** ANVISA, 2001

**INS\***- Sistema Numérico Internacional

**CI\*\*** – Número de Identificação

**CI name\*\*\*** – Nome específico do aditivo

Inovações tecnológicas podem melhorar a produção de pigmentos, melhorando microrganismos ou formando novas linhagens que justifiquem a substituição dos produtos sintéticos. Neste contexto, o desenvolvimento de novos sistemas fermentativos como cultura de células, de plantas ou microalgas, em níveis competitivos; ou ainda técnicas de mutagênese que aumentem a produtividade destes metabólitos e/ou reduzam sua toxicidade (DEVLIN, 1998). Oportunidades adicionais para pigmentos derivados de fermentação existem em função da raridade do produto ou na dificuldade de síntese, como por exemplo, o pigmento *Monascus*, as ficocianinas e as xantofilas, onde avanços tecnológicos sempre serão de grande contribuição (FRANCIS, 1989; GUNNARD, WASILESKI e ALAN, 1994; FABRE, GOMA e BLANC, 1998; STRANDI, HUDON, CELENTANO et al., 1998; NEGRO e FERNANDEZ, 2000; PANDEY, SOCCOL e MITCHELL, 2000; DURAN, TEIXEIRA, DE CONTI et al., 2002).

Embora os corantes sejam considerados essenciais à indústria de alimentos, podendo ser obtidos através de fontes naturais, este campo ainda não é bem explorado, em particular os produzidos por microrganismos. Os corantes vermelhos produzidos por culturas em meios sólidos (arroz, por exemplo) são os mais estudados na Ásia, por diversas espécies do gênero *Monascus*; utilizados principalmente para colorir alimentos fermentados (PASTRANA, BLANC, SANTERRE et al., 1995). Tal fato demonstra que os países em desenvolvimento também podem investir neste campo de conhecimento, buscando competir neste mercado, principalmente o Brasil devido a sua imensa biodiversidade.

Suas propriedades terapêuticas e sua relativa estabilidade com respeito ao pH e temperatura são aspectos importantes para que possam substituir os corantes sintéticos.

## **II.1 - PIGMENTOS NATURAIS PARA ALIMENTOS**

Os pigmentos naturais são grupos de substâncias com estruturas, propriedades químicas e físicas diferentes. São compostos instáveis, participam de diferentes reações e, em função disto, a alteração de cor de um alimento é um indicador das alterações químicas e bioquímicas possíveis de ocorrer durante o processamento e estocagem. Devido à instabilidade de alguns pigmentos às condições de processo, algumas vezes é necessário adicionar corantes ao alimento (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).

O conhecimento da estrutura e das propriedades dos pigmentos naturais é essencial para o dimensionamento adequado de um processo, de forma a preservar a cor natural do alimento e evitar mudanças indesejáveis de cor, e é muito importante, também, para o desenvolvimento e aplicações de corantes (RIBEIRO E SERAVALLI, 2004).

Os pigmentos naturais são normalmente agrupados, em função de sua estrutura química, em:

- 1 Compostos heterocíclicos com estrutura tetrapirrólica - correspondem às clorofilas (espinafre e orégano), grupo Heme (sangue) e grupo Bile (algas e cianobactérias), que apresentam em seu núcleo, a presença e o estado de oxidação de um íon metálico, importante componente cromóforo (Tabela II.3) (JACOBSEN e WASILESKI, 1994; RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).
- 2 Compostos de estrutura isoprenóide - conhecidos como carotenóides. Os carotenóides e as xantofilas são, provavelmente, os maiores grupos de corantes e o mais bem distribuído na natureza. Estes são produzidos por bactérias, fungos, leveduras e plantas. Diversos carotenóides possuem atividade pró-vitáminica A e, conseqüentemente, agregam ao alimento um importante valor nutricional, bem como estético. A síntese dos carotenóides não requer elevados custos de produção,

- principalmente para os  $\beta$ -carotenóides,  $\beta$ -apo-8'-carotenal, cantaxantina e astaxantina, utilizados como corantes na indústria de laticínios, sorvetes, saladas, maioneses temperadas e bebidas. Os carotenóides possuem boa estabilidade em relação ao pH dos alimentos e não são afetados por agentes redutores como o ácido ascórbico, por exemplo. Sua desvantagem é que são facilmente oxidáveis (Tabela II.3) (JACOBSEN e WASILESKI, 1994; RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).
- 3 Pigmentos benzopiranos (Tabela II.3) - incluem os flavonóides e as antocianinas. Os flavonóides possuem baixo poder de tingimento e não contribuem muito na coloração dos alimentos. As antocianinas, entretanto, são responsáveis pela cor laranja, vermelha e roxa (cor de uva e framboesa). As antocianinas extraídas das uvas têm sido usadas como corantes alimentares desde 1880 (FRANCIS, 1989; NEGRO e FERNANDEZ, 2000; ZOCHLING, MURKOVIC e PFANNHAUSER, 2002). A cor das antocianinas é pH dependente, possuindo cor mais intensa em valores de pH mais baixos. Também são sensíveis ao calor e à fotooxidação, conseqüentemente perdem sua cor durante o processamento ou estocagem dos alimentos. Alguns grupos de pesquisa têm produzido estes pigmentos a partir do cultivo de células vegetais. (FRANCIS, 1989).
  - 4 As betalainas- são um grupo de pigmentos amarelos, vermelhos e púrpuras, que incluem as betacianinas e as betaxantinas (Tabela II.3), encontrados na família das plantas *Centrospermae*. Estes pigmentos também são sensíveis ao calor, luz e oxigênio, sendo limitado seu uso como corante alimentar. A produção destes pigmentos também está sendo estudada a partir do cultivo de células vegetais por SAKUTA E KOMAMINE (1987), citado por JACOBSEN E WASILESKI (1994).
  - 5 Pigmentos derivados de processamento - considerado um corante alimentar resultante do calor ou outro processamento como caramelização dos carboidratos. Um exemplo destes pigmentos são os produtos das reações Maillard e pigmentos formados a partir de aldeídos (caramelos e melanóides, respectivamente) (Tabela II.3) (JACOBSEN e WASILESKI, 1994; RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).
  - 6 Outros: (Taninos, Pigmentos Quinoidais, Riboflavina) – Os taninos - são compostos fenólicos especiais que possuem a habilidade de se combinar com proteínas e outros polímeros, tais como polissacarídeos. Eles estão presentes nos frutos verdes e desaparecem ao longo da maturação. Pigmentos quinoidais – O grupo maior é os dos pigmentos antraquinonas. Os mais importantes pigmentos quinoidais, para uso em alimentos, são cochonila e carmim-cochonila. O principal pigmento da cochonila é o ácido carmínico, o qual representa cerca de 20% da massa seca dos insetos fêmeas das espécies *Dactylopius coccus* ou *Coccus cacti*. Estes insetos são

encontrados principalmente no Peru, Equador, Guatemala e México. Riboflavina – (Vitamina B<sub>12</sub>) é um pigmento amarelo que está presente em muitos alimentos vegetais e de origem animal. (JACOBSEN E WASILESKI, 1994; RIBEIRO E SERAVALLI, 2004).

Tabela II.3 - Fontes naturais dos pigmentos alimentares. .

<b>Componentes</b>	<b>Fontes Naturais</b>
<b>Tetrapirrólicos</b>	
Clorofilas	Vegetais de folhas verdes
Hemes	Carnes
<b>Isoprenóides</b>	
Carotenos	Cenoura, tomate
Xantofilas	Pimenta, salmão
<b>Benzopiranos</b>	
Antocianinas	Uva, maçã
Flavonas e flavonóides	Nozes, casca de cebola, chá
<b>Betalainas</b>	
Betacianina	Beterraba
Betaxantina	Beterraba
<b>Pigmentos derivados de processamento</b>	
Caramelos	Mel, calda de açúcar
Melanóides	Calda de açúcar

Fonte: JACOBSEN E WASILESKI, 1994.

A utilização de corantes naturais, como pigmentos alimentares, depende principalmente da sua extração econômica a partir de fontes naturais. Durante a extração, os corantes são passíveis de sofrerem oxidação, isomerização, fotooxidação ou formação de complexos metálicos. Em adição, a sua forma concentrada não pode sofrer precipitação ou polimerização. Os métodos para estabilização dos pigmentos incluem o uso alternativo de aditivos como o ácido ascórbico, íons metálicos e vários ácidos orgânicos, ou então o encapsulamento dos pigmentos ou adsorção em gelatinas, alginatos ou silicilatos (GUNNARD, WASILESKI e ALAN, 1994).

Regulamentações específicas em certas áreas da alimentação humana e propagandas (ANEXO) têm ressaltado o termo NATURAL. Estes produtos formados por síntese orgânica, ou por processos biotecnológicos, têm recebido grande importância dos laboratórios de investigação. É chegado o momento de que sintetizar estruturas complexas mediante microrganismos é mais fácil e seguro do que a utilização de sistemas clássicos de síntese orgânica. O resultado tecnológico é o reflexo de uma palavra impressa em uma etiqueta que acompanha um alimento: *natural* (CHANG, HUANG, LEE et al., 2002a).

## **II.2 – MERCADO MUNDIAL DE CORANTES**

Segundo um estudo realizado pelo grupo GENAMAZ (Projeto BRA/96/025 - SUDAM/PNUD) em 2000 (MAIMOM, 2000) “Observa-se a substituição dos corantes artificiais decorrentes da sensibilização ecológica que se traduz em uma exigência crescente dos consumidores e dos órgãos de saúde que questionam os efeitos colaterais dos aditivos químicos. Os consumidores entendem que quanto mais natural o alimento, mais saudável ele é.”

O mercado mundial dos pigmentos, apresentado na Figura II.1 é estimado em quase um bilhão de dólares americanos. Segundo BLANC (1999), o mercado de pigmentos naturais, é o que apresenta maior crescimento, a uma velocidade de 5 a 10% ao ano. (comparado com 3% a 5% para seu concorrente sintético).

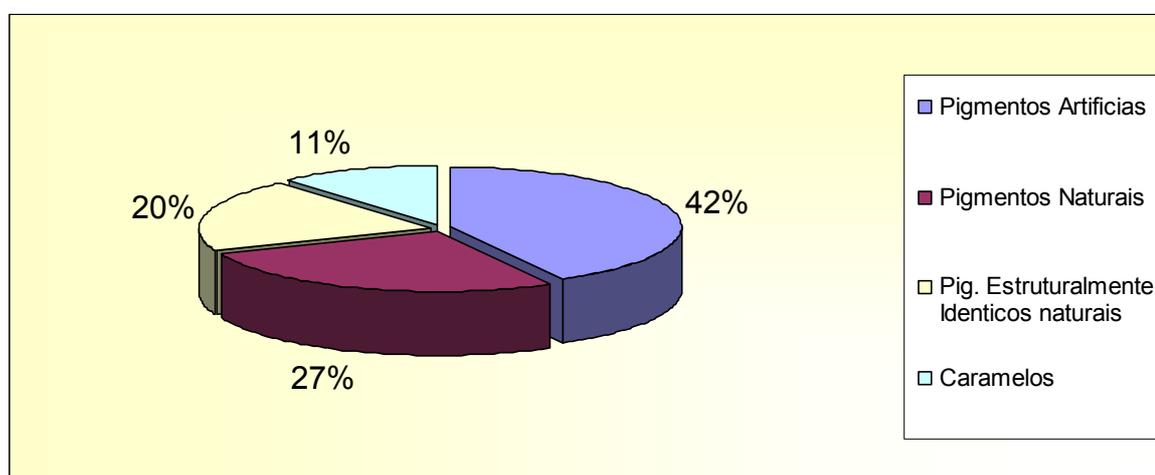


Figura II.1 – Mercado Mundial de corantes alimentícios, dados de 1992 (KILLIKIAN, 2002).

## **II.3 - MERCADO NACIONAL DE CORANTES**

No Brasil, a indústria de alimentos representa 4% do PIB e 30% do total das exportações. O setor conta com 38 mil empresas, 750 mil empregos diretos e faturamento anual de R\$ 58,1 bilhões. Considerando que a maioria dos alimentos processados leva corantes, o mercado destes pigmentos está em franca expansão (MAIMOM, 2000).

Embora a tecnologia disponível nas indústrias brasileiras nem sempre seja competitiva em nível de qualidade e de preços com a tecnologia existente no Japão, EUA e Europa, há no Brasil indústrias com capacidade técnica e produtos com excelente qualidade (MASCARENHAS, 1999).

As empresas que compõem o mercado de corantes naturais são diversificadas quanto à sua estrutura física e tecnológica. Considerando aquelas pertencentes a um mesmo patamar, podem ser citadas: CHR Hansen's Ind. e Com. Ltda.; Baculêrê

Agroindustrial Ltda.; Basf Brasileira S/A, SBI System Bio industries do Brasil Ltda.; Caal - Casa Americana de Artigos para Laboratórios Ltda.; IFF Essências Ltda.; Brastóquio, Roche, Star & Arty Indredientes alimentícios Ltda.; Duas Rodas industrial Ltda.; Cordianil; Condicor, Star e Arty; Corin; Sabor; Liotécnica; Penina; Corantec; Sanrisil; Adicon; Firance; Orgâna; Simexport; M. Cassab; Laboratório Exato; Dragogo; Quest; Ciesa; Mix; Gremafer; Kraki Lopesco; CAQ - Casa Química; Divital; Coveg; e Macalé (MAIMOM, 2000).

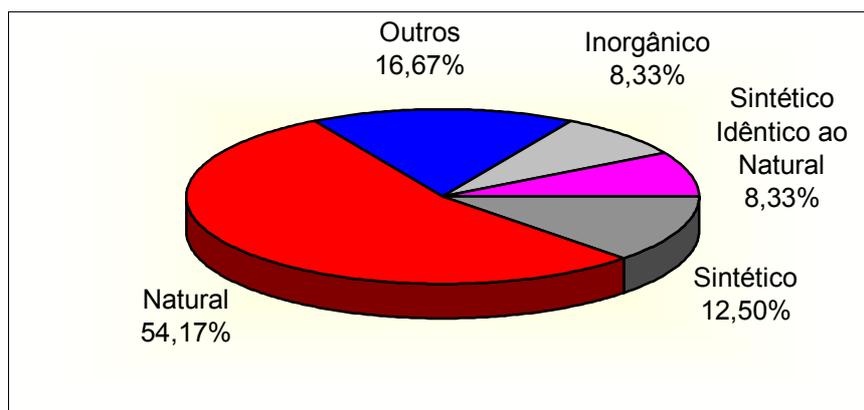


Figura II.2 - Participação das Indústrias de Corantes Naturais brasileiras no Setor<sup>1</sup>.  
Fonte: MASCARENHAS (1995) citado por MAIMOM, 2000.

A exportação de corantes naturais pelo Brasil para os países desenvolvidos, poderá ser de grande importância nos próximos anos, em face das restrições legais ao consumo de alguns corantes sintéticos (MASCARENHAS, J. M. O., 1998).

Segundo Mascarenhas (1998), dentre estas novas fontes de corantes naturais destacam-se: dendê (*Flaes guinensis*), cacau (*Theobroma cacao*), jenipapo (*Genipa americana*), açaí (*Euterpe alata*), cará-roxo (*Dioscora alata*), buriti (*Palmae*), camapu (*Solanaceae*), carajuru (*Bigniaceae*), cumatê (*Myrtaceae*), guaraná (*Sapindaceae*), mucujá (*Palmae*), pequi (*Caryocaraceae*), pupunha (*Palmae*), tatajuba (*Moraceae*), tucumã (*Palmae*) e indigofera (*Leguminosae*).

Dos corantes citados, a EMBRAPA está estudando o jenipapo (*Genipa americana*), o açaí (*Euterpe alata*) e o cará-roxo (*Dioscora alata*), que podem ser cultivados sem agredir o meio ambiente e sem provocar danos às matas tropicais (MAIMOM, 2000).

Como resposta aos riscos oferecidos pelos corantes sintéticos, o Brasil assim como outros países têm manifestado esforços nas pesquisas com corantes naturais, o que faz

<sup>1</sup> A análise teve por base o survey aplicado por MASCARENHAS (1995) do qual participaram 22 empresas que representavam 63% do universo das 35 indústrias constantes no catálogo da ABIA (Associação Brasil das Indústrias de Alimentação e do Fispal (Feira Internacional de Alimentação)) Gremafer, IFF, Brastóquio, Mix, Kraki Lopesco, Star & Arty, SBI do Brasil, Corin, Christian Hansen, Basf, Cordianil, Corantec, Baculerê, Sanrisil, Laboratório Exato, Adicon, Organa, CAQ - Casa Química, Coveg, Firace, Arco Iris e Macalé.

com que o interesse por produtos naturais esteja crescendo no Brasil e no mundo, embora a maioria das indústrias concorde que o custo para produzir os corantes naturais seja bastante elevado. Ainda assim, há forte tendência de utilização desses nos mercados interno e externo (MASCARENHAS, J. M. O., STRINGHETA, P.C., 1998).

Embora a tecnologia disponível nas indústrias brasileiras nem sempre seja competitiva em nível de qualidade e de preços com a tecnologia existente no Japão, EUA e Europa, há no Brasil indústrias com capacidade técnica e produtos com excelente qualidade. Recentemente, surgiram no mercado os corantes microencapsulados, representando o último avanço da biotecnologia. Esse processo de encapsulamento protege os corantes dentro de cápsulas microscópicas. Esses corantes oferecem uniformidade, padronização e são totalmente solúveis em água. Contêm emulsificantes adicionados, pH neutro e oferecem maior estabilidade à luz e ao calor (MASCARENHAS, 1998).

## **II.4 - LEGISLAÇÃO NACIONAL E INTERNACIONAL DE CORANTES**

No Brasil, a legislação de alimentos e cosméticos está a cargo do Ministério da Saúde (ANEXO), sendo que as normas brasileiras para corantes e aditivos são baseadas nas normas americanas especificadas pelo FDA. A legislação brasileira passou por diversas modificações, nos anos de 1965, 1987, 1989, 1990, 1991 e 1996, necessitando de urgentes atualizações e revisões (Mascarenhas, 1998).

### **II.4.1 - Corantes Permitidos para Alimentação no Brasil**

O Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares, conforme apresenta a Tabela II.2, foi elaborado pelo Comitê do Codex sobre Aditivos Alimentares e Contaminantes de Alimentos para estabelecer um Sistema Numérico internacional (INS) de identificação dos aditivos alimentares nas listas de ingredientes como alternativa à declaração do nome específico do aditivo (CI *name*), baseado no número de identificação (CI). O *International Numbering System* (INS) não supõe uma aprovação toxicológica da substância pelo Codex (ANVISA, 2003).

Os corantes e lacas<sup>2</sup> permitidos pela legislação brasileira para uso em alimentos estão divididos nos seguintes grupos (ANGELLUCI, 1989; NAZÁRIO, 1987):

---

<sup>2</sup> A diferença básica entre uma laca e um corante é que os corantes são compostos químicos que exibem seu poder tintorial ao ser dissolvido em um solvente, enquanto a laca se comporta como um pigmento que vai colorindo mediante sua dispersão ao meio. Em geral, a laca possui maior resistência à luz e uma melhor estabilidade que o corante (NOONAM, 1975; CERTIFIED COLOURS (1995)), é mais resistente a meios em pH e temperaturas elevadas (STRICKER e MCCOMB, 1995).

**C.I** – Corante Orgânico Natural: é aquele obtido a partir de um vegetal ou, eventualmente, de um animal, cujo princípio tenha sido isolado com o emprego de processos tecnológicos adequados.

**C.II** – Corante Orgânico Sintético – é aquele obtido por síntese orgânica, mediante o emprego de processos tecnológicos adequados, e não encontrado em produtos naturais.

**C.III** – Corante Orgânico Sintético Idêntico ao Natural: é o corante elaborado sinteticamente, cuja estrutura química é semelhante a do princípio isolado do corante orgânico natural.

**C.IV** – Corante Inorgânico: é aquele obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados a seu emprego em alimentos.

**C.V** – Corante Caramelo: é aquele obtido pelo aquecimento controlado do açúcar invertido ou de outros carboidratos na presença de compostos de amônia e de sulfitos.

Nos rótulos dos corantes fabricados no mercado brasileiro devem constar o nome comercial reconhecido e o tipo de alimento no qual pode ser aplicado. É permitida apenas a mistura de três corantes (ANVISA, 2001).

A partir da Resolução n.º 4 de 24 de novembro de 1988 (ANVISA, 2001), a qual revisou todas as tabelas referentes a aditivos dispostos no decreto n.º 55.871, ficaram definidos como **Corantes Sintéticos**: amarelo crepúsculo F.C.F., tartrazina, azul brilhante F.C.F., indigtina, bordeaux S ou amarantho, eritrosina, ponceau 4R e vermelho 40.

Os **Corantes Naturais** permitidos para uso são: açafreão, ácido carmínico, antocianinas, cacau, carmim, carotenóides (alfa-caroteno, beta-caroteno, gama-caroteno, licopeno, bixina, norbixina), carvão, clorofila, clorofila cúprica, sal de amônio de clorofila cúprica, sal de potássio de clorofila cúprica, sal de sódio de clorofila cúprica, cochonilha, cúrcuma, curmina, hemoglobina, índigo, páprica, riboflavina, urzela (orceína sulfonada) e urucum, vermelho de beterraba, xantofilas (cantaxantina, criptoxantina, flavoxantina, luteína, rodoxantina, rubixantina, violaxantina) (ANVISA, 2001).

#### **II.4.2 - Corantes Naturais Permitidos na Alimentação Pelos Principais Mercados Internacionais**

No mercado internacional há uma nítida preferência em liberar o uso de corantes naturais e restringir o uso dos sintéticos, seja no ramo de alimentos ou no de cosméticos. Entretanto, os limites de Ingestão Diária Aceitáveis (IDA) para os corantes naturais precisam

---

As lacas foram aprovadas desde 1959, pelo FD&C (Food and Drugs, Cosmetics), como uma importante classe de corantes (NOONAM, 1975). Podem ser definidas como sais de alumínio, com os quais os corantes formam complexos. São utilizadas em alimentos, cosméticos e materiais de embalagem destinados à indústria de alimentos (CERTIFIED COLOURS (1995)). Ainda podem ser definidas como corantes orgânicos derivados de ácidos e bases solúveis em água ou diretamente do corante inorgânico por tratamento com compostos orgânicos e inorgânicos apropriados (STRICKLER e MCCOMB, 1995).

ser estabelecidos para simplificar sua comercialização atual e expandir seu mercado futuro. Os carotenóides, carvão, clorofila simples, urzela, vermelho de beterraba e xantofilas, são exemplos de corantes naturais que não possuem tal atributo (MASCARENHAS, 1999)(Tabela II.4).

Tabela II.4 - Aceitação dos Corantes Naturais nos Principais Mercados Internacionais

Nome/ano de estabel. da IDA	IDA mg/kgp.c	EUA	União Européia	Mercosul*	Japão
Açafrão – 1985	Ingrediente	X	GB**		X
Antocianina (Enocianina) – 1982	0-25,0		X	X	X
Carotenos naturais – 1987	Não-estabelecida	X	X	X	X
Carmim – 1982	0-5,0	X	X	X	X
Carvão – 1987	Não-estabelecida		X	X	X
Clorofila – 1969	Não-limitada		X	X	X
Clorofila/cobre – 1969	0-15,0		X	X	X
Clorofila/cobre (Na, K) – 1978	0-15,0		X	X	X
Cúrcuma – 1986	Ingrediente	X	GB	X	X
Cúrcuma (óleo resina) – 1986	0-0,3	X	GB		X
Curcumina – 1986	0-0,1				X
Páprica – 1970	Ingrediente	X	X	X	X
Urucum – 1982	0-0,065	X	X	X	X
Urzela – 1974	Não-estabelecida				X
Vermelho-de-beterraba - 1987	Não-estabelecida	X	X	X	X
Xantofilas – 1987	Não-estabelecida		X		X

Fonte: MASCARENHAS, 1998.

\* No caso do Mercosul, trata-se de corantes naturais harmonizados (Resolução nº 14, de 1993, Conselho do Mercado Comum.)

\*\* Permitido apenas na Grã Bretanha.

## **II.5 - PIGMENTOS SINTÉTICOS X PIGMENTOS NATURAIS**

A coloração dos alimentos, bem como dos produtos têxteis, remonta os tempos da antiguidade. Durante dez séculos, os corantes disponíveis eram de origem animal (carmin), vegetal (xantofilas, antocianinas, curcumina, etc.) ou mineral. Em 1856 o químico britânico William Perkin obteve um oxidante da anilina, produto da destilação do índigo, um corante estável e de longa duração. O baixo custo decorrente das economias de escala na produção e da flexibilidade de localização perto dos centros consumidores e, sobretudo, a homogeneidade da composição e garantia da qualidade foram responsáveis pela acelerada substituição dos corantes naturais (MAIMOM, 2000) . A partir desta data, os corantes

naturais progressivamente foram substituídos pelos sintéticos que foram aprovados nos Estados Unidos e na União Européia (Tabela II.5) (BLANC, 1998).

Nos últimos dez anos, observa-se uma nova tendência no consumo de corantes que resultou em uma pequena substituição dos corantes sintéticos pelos naturais. O uso indiscriminado e cumulativo dos aditivos sintéticos aumentou as intoxicações por chumbo, arsênico e mercúrio, além do risco de se contrair câncer. Atualmente, nos EUA, o FDA (Food and Drug Administration) permite o uso de apenas sete corantes artificiais na indústria alimentícia e de cosméticos. Este número já chegou a 80 (MAIMOM, 2000).

Outro fator que incentivou o consumo de produtos naturais é a consolidação da sensibilização ecológica da população. A utilização destes corantes nas indústrias alimentícia, farmacêutica e de cosméticos vem sendo uma exigência dos consumidores.

Dentre os corantes sintéticos de maior uso podemos citar os xantenos (eritrosina), trifenilmetanos (azul-brilhante), os monoazos (vermelho-sólido E, escarlate GN, ponceau 4 R, vermelho 40, amarelo-crepúsculo e laranja GGN), a pirazolone (tartazina) e a indigóide (indigotina) (MAIMOM, 2000).

As vendas totais de corantes e pigmentos da indústria química brasileira foram de US\$ 274 milhões, em 1995, tendo decrescido em relação a 1990, quando atingiu US\$ 391 milhões. Das indústrias brasileiras de corantes, cerca de 60% são produtoras de corantes naturais e 10% de sintéticos. Dentre os corantes naturais, o urucum é o mais produzido. Essas empresas, na sua grande maioria, não são exportadoras (MAIMOM, 2000).

O Brasil vende significativamente parcela de sua produção de corante para a própria América do Sul (Argentina, Venezuela, Uruguai, Paraguai e Colômbia), Japão e EUA. Os países da Europa são compradores restritos de poucas indústrias, por exigirem padrão de qualidade e volume maior de mercadoria, que apenas as grandes indústrias conseguem fornecer (MASCARENHAS, 1999).

Tabela II.5 - Lista de corantes sintéticos autorizados nos países da União Européia e nos Estados Unidos.

<b>Corantes sintéticos</b>	<b>UE</b>	<b>EUA</b>	<b>Efeitos na Saúde</b>
<i>Azul brilhante FCF</i>	-	Azul n <sup>o</sup> 1	Danos cromossomais
<i>Azul patente V</i>	E 131		-
<i>Carmin índigo</i>	E 132	Azul n <sup>o</sup> 2	Tumor cerebral
<i>Verde ácido brilhante</i>	E 142	-	-
<i>Verde FCF</i>	-	Verde n <sup>o</sup> 3	Tumor no baço
<i>Tartrazine</i>	E 102	Amarelo n <sup>o</sup> 5	Tumor em tireóide e linfático
<i>Amarelo de quinolina</i>	E 104		-
<i>Amarelo Laranja S</i>	E 110	Amarelo n <sup>o</sup> 6	Tumor renal, danos cromossomais
<i>Amarelo Citrino</i>	-	Amarelo citrino n <sup>o</sup> 2	-
<i>Laranja B</i>	-	Orange b	-
<i>Amaranto</i>	E 123		-
<i>Eritrosina</i>	E 127		-
<i>Vermelho Metálico</i>	-	Rouge n <sup>o</sup> 40	Tumor linfático, hiperatividade
<i>Azorubine</i>	E 122		-
<i>Vermelho</i>	E 124		-
<i>Pigmento rubi</i>	E 180		-
<i>Preto brilhante</i>	E 151		-

Fonte: (BLANC, 1998; ESPOSITO e AZEVEDO, 2004).

Ainda são poucos os corantes naturais disponíveis no mercado internacional. Porém, esta tendência se reverteu aos antigos padrões, onde a maioria dos corantes era natural. Os corantes alimentares, que são aditivos pobres no seu valor organoléptico, são, entretanto, indispensáveis, e estão se tornando alvo de diversos grupos de pesquisa. Estes cientistas, se aliaram às grandes indústrias alimentícias, liderados pela França (Blanc et al. Toulouse) e seguidos pela China (Wang Li – *Science & Technology Service Center of West Che*), Japão (Toshio, Shuzo), Tailândia e recentemente o Brasil (Kilikian - USP), entre outros. Conforme ilustra a Tabela II.6, a lista de corantes naturais, legalmente autorizados, tende a aumentar, não só pela pressão em nível de regulamentação, como também pela maior exigência dos consumidores (PEREIRA e KILIKIAN, 2001; OROZCO, PEREIRA e KILIKIAN, 2003).

Tabela II.6 - Lista de corantes naturais disponíveis no mercado mundial.

<b>CORANTES NATURAIS</b>	<b>CÓDIGO</b>
<b>Amarelos</b>	
Curcumina	E 100
Riboflavina	E 101
Annato	E 160
Xantofilas	E 161
<b>Vermelhos</b>	
Ácido carmínico	E 120
Vermelho beterraba	E 162
Antocianina	E 163
<b>Verdes</b>	
Clorofila	E 140
Clorofilina	E 141
Vert S	E 142
<b>Marrom</b>	
Caramelo amoniacal	E 150
Caramelo sulfato de amônio	E 150
<b>Preto</b>	
Carbo medicinalis	E 153

**Fonte:** BLANC, 1998.

Os vegetais são largamente explorados para colorir os alimentos e os tecidos, mas sua linha de produção não é muito rentável, além do mais, sofrem problemas de colheita, de cultivo, armazenamento e purificação da fração final. Os solventes utilizados no processo extrativo são geralmente importados e caros. Uma solução encontrada foi o cultivo de células vegetais *in vitro*. Seu procedimento é explorado industrialmente, principalmente no Japão para produzir *shikonina*, pigmento vermelho utilizado na cosmetologia a partir da erva *Lithospermum erythrorhizon* (BLANC, 1998).

Outra alternativa é a exploração industrial dos fungos filamentosos, em particular, os micromicetos que podem ser facilmente cultivados. Certos fungos são comuns na Europa, como os descobertos em 1880 por um botânico francês Philippe Van Tieghem, que descreveu três espécies produtoras de pigmentos vermelhos: *Monascus purpureus*, *Monascus ruber* e *Monascus pilosus* (BLANC, 1998). Estes pigmentos são até hoje largamente utilizados na Ásia, conhecidos pelo nome *Anka* (ou *Ang-Kak*) para colorir vinho de arroz, queijo de soja, *Ketchup*, peixe e carnes vermelhas, inclusive com diversas patentes (GUNNARD E WASILESKI, 1994). São igualmente utilizados no sul da China, Taiwan, Japão e Indonésia sendo tradicionalmente cultivados em meio sólido, em grãos de arroz ou pão. Devido à falta de controle dos parâmetros de cultivo nesta metodologia, diversos grupos estão recentemente tentando melhorar a sua industrialização a partir do cultivo submerso tanto em meios naturais como sintéticos (HAJJAJ, BLANC, GROUSSAC et al., 1999a; LIN e DEMAINE., 2000; CARDENAS, ALVAREZ, ALVAREZ et al., 2001).

Estes pigmentos, produzidos por espécies de *M. ruber* e *M. purpureus*, estão sendo industrializados, desde a década de oitenta, por grandes marcas, tais como, NESTLÉ®, QUAKER OAT COMPANY®, SHELL®, empresa japonesa YAEGAKI *Bioindustry Inc. et Riken Vitamine Co Ltda*® (Blanc, 1998) e empresa chinesa LUZHOU CHEMICAL – CHINA, 2003.

## **II.6 - VANTAGENS E DESVANTAGENS NA PRODUÇÃO DE CORANTES NATURAIS.**

Os corantes naturais, obtidos através de diversos processos, além de serem reconhecidos com o rótulo de “naturais”, apresentam outras vantagens, como:

- São encontrados em vegetais, frutas, raízes e sementes. Estima-se que somente 0,5% das plantas terrestres é explorada quanto aos seus corantes. Portanto, a exploração de pigmentos naturais pode crescer muito, embora novas moléculas devam passar por todas as etapas do *Food and Drug Administration* (FDA) antes do uso regular, demandando elevados investimentos.
- Na formulação do pigmento natural industrializado, são utilizadas moléculas que conferem maior solubilidade, estabilidade, poder de emulsificação, espessantes. Estas moléculas mantêm as propriedades terapêuticas dos corantes e sua estabilidade é relativamente alta com respeito ao pH e temperatura.

Estes são fatores importantes que favorecem sua substituição em detrimento dos pigmentos sintéticos (LIN e DEMAIN, 1995; BLANC, 1998; HAJJAJ, BLANC, GOMA et al., 1998; KILIKIAN, 2002; KIM, J.H.KIM e HYUCK, 2002).

Como principais desvantagens para obtenção dos corantes naturais, citam-se:

- Estas moléculas possuem baixa solubilidade em água. Porém, podem facilmente reagir com compostos aminados do meio de cultura e formar complexos solúveis em água.
- A cinética de cultivo submerso para obtenção dos corantes naturais tem sido muito pouco descrita na literatura impedindo assim, um maior conhecimento dos parâmetros cinéticos e, conseqüentemente, um aumento na escala de reatores mais eficazes para produção destes pigmentos (PEREIRA, OROZCO, TONSO et al., 2003).
- Formação conjunta de metabólitos indesejáveis (por exemplo, citrinina), acarretando longos e caros testes de segurança, realizados antes do emprego destes produtos, como aditivos alimentares (situação em países desenvolvidos).

- A maior parte dos pigmentos formados por via biotecnológica, não é excretada pelas células, mas sim, armazenada em seu interior, aumentando com isso, os gastos com processos de extração e purificação dos corantes intracelulares (KILIKIAN, 2002).

Embora o custo para produzir os corantes naturais seja mais elevado em relação aos sintéticos, o interesse por esses produtos está crescendo no Brasil e no mundo. Segundo a “Biotropical” empresa de corantes naturais, Belém do Pará (PA), citado por MAIMON (2000), o mercado internacional de corantes naturais movimenta US\$ 5 bilhões. Em termos da distribuição geográfica, estimou-se que esta acompanha o mercado de alimentos, aumentando-se a participação do Japão, pelo fato deste país registrar um consumo privilegiado de corantes naturais. Sendo assim, pesquisadores nacionais (Grupo GENAMAZ) citaram, em seu último relatório, a seguinte participação no mercado: EUA (30%), Europa (30%), Japão e Ásia (30%), resto do mundo (10%) (MAIMOM, 2000).

## **II.7– MÉTODOS DE OBTENÇÃO DO PIGMENTO VIA BIOTECNOLÓGICA**

Em 1990, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o primeiro ingrediente alimentar derivado do DNA recombinante. Tal fato abre novos espaços para outros aditivos, como aromas e pigmentos alimentares, mesmo que, sua utilização no mercado internacional seja ainda limitada (JACOBSEN e WASILESKI, 1994).

BLANC (1998) tem estimado um crescimento anual de 10% na busca de novos pigmentos alimentares oriundos de processos biotecnológicos. Os Estados Unidos gastaram em 1990 aproximadamente 135 milhões de dólares em pesquisas de novos pigmentos alimentares. KLAÛI (1998), citado por ZOCHLING et al. (2002) estimou um gasto mundial de 320 milhões de dólares em 1987 em investimentos na área de aditivos alimentares, sendo, um terço (ou aproximadamente 120 milhões de dólares) aplicado só em corantes naturais.

No Brasil, com a recente permissão de utilização do corante do urucum na coloração de massas pelo *Codex Alimentarius*, espera-se um crescimento de 20% na sua produção nos próximos anos. Na Região Norte, em particular, do Estado do Pará, terceiro produtor nacional, deverá haver crescimento na mesma proporção (MAIMOM, 2000).

Em uma reunião da Comunidade Econômica Européia, 43 economistas previram, para o ano de 2000, que 50% dos 75% de corantes sintéticos utilizados em 1989 seriam substituídos pelos corantes naturais. Previsão comprovada recentemente nos números divulgados, onde constatam que apenas dezesseis são sintetizados quimicamente, contra treze obtidos de fontes naturais (Tabela II.6) (BLANC, 1999; MARTINKOVA, PATAKOVA-JUZLOVA, KRENT et al., 1999; ZOCHLING, MURKOVIC e PFANNHAUSER, 2002).

Os corantes produzidos por fermentação industrial estão ainda limitados à produção de  $\beta$ -caroteno por algas. Porém existem muitas outras formas de produção de corantes, com grande potencial de mercado. Por exemplo, a riboflavina pode ser produzida por fungos, bactérias e leveduras. No entanto, seu uso como suplemento nutricional é mais atrativo que o uso como corante alimentar.

Outro método promissor de obtenção de novos pigmentos alimentares via biotecnológica é o cultivo de células vegetais, que representam uma grande fonte de produção destes pigmentos. Pesquisas que incluem a produção de carotenóides, betalaínas, antocianinas, naftaquinonas e antraquinonas puras estão sendo muito divulgadas (HANAGATA, UEHARA, ITO et al., 1994; HARKER, PECKER e HIRSCHBERG, 2000; NEGRO e FERNANDEZ, 2000).

O espectro de componentes para alimentos que podem ser produzidos por via microbiana, embora vasto, encontra ainda várias limitações, principalmente pela dificuldade de escolha de linhagens de microrganismos que tenham produção significativa de determinados compostos e também pelo controle e estabelecimento de condições ótimas de processo.

Os principais componentes dos seis pigmentos produzidos por espécies do gênero *Monascus* incluem: pigmentos laranja: monascorubrina e rubropunctatina, pigmentos vermelhos: monascorubramina e rubropunctamina e pigmentos amarelos: monascina e ankaflavina (JUNG-HAE E SHIN, 2000). Considera-se que o pigmento vermelho é produzido pela conversão química a partir do pigmento laranja, a elevados valores de pH, em presença de uma fonte apropriada de nitrogênio. Entre os pigmentos formados por *Monascus*, os pigmentos vermelhos merecem maior atenção devido ao seu potencial valor comercial (FABRE, GOMA e BLANC, 1998).

Em um processo fermentativo tradicional (Figura II.3), como ocorre nos países do oriente, o pigmento formado pelo *Monascus* é adicionado ao mosto de arroz. Após um período de 2 a 4 semanas, o produto é seco e armazenado na forma de grão ou pó. O *Monascus purpureus* produz pigmento que essencialmente consiste em monascorubramina e monascina. Estas moléculas são produzidas em pequenas concentrações em relação à quantidade de arroz utilizada.

Diversas formas de imobilização do *Monascus purpureus* já foram avaliadas, como Ca-alginato, poliuretano, esponja e carvão ativo (FENICE et. al., 2000), demonstrando resultados promissores para escala industrial em cultivo submerso. Em alguns estudos, os resultados obtidos foram até mesmo superiores aos processos em fermentação sólida. Fato este que motiva os estudos das formas de produção dos pigmentos vermelhos e outros

metabólitos de relevância industrial (enzimas e lovastatina) em cultura submersa, utilizando, meio sintético ou meio complexo.

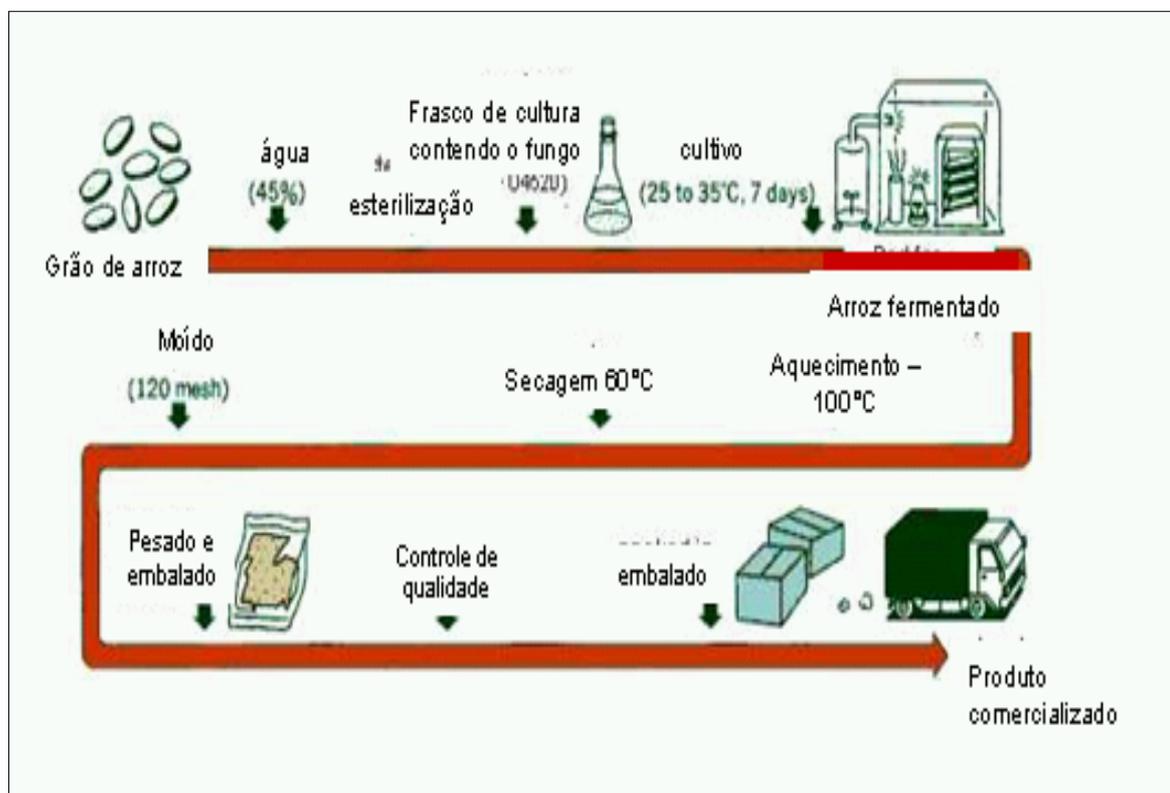


Figura II.3 – Processo de produção industrial do pigmento *Monascus* (Fonte:MANDT, 2003).

## **II.8– CARACTERÍSTICAS DO PIGMENTO MONASCUS**

Os pigmentos obtidos do fungo *Monascus* formam um grupo de metabólitos secundários chamados azafilonas, produzindo seis tipos diferentes de pigmentos, divididos em três grupos, (1) pigmento laranja, rubropunctatina ( $C_{21}H_{22}O_5$ ) e monascorubrin ( $C_{23}H_{26}O_5$ ); (2) pigmento vermelho, rubropunctamina ( $C_{21}H_{23}NO_4$ ) e monascrubramina ( $C_{23}H_{27}NO_4$ ) e (3) pigmento amarelo, monascin ( $C_{21}H_{26}O_5$ ) e ankaflavin ( $C_{23}H_{30}O_5$ ) que são formas reduzidas dos dois pigmentos laranja (Figura II.4) (SWEENEY e DOBSON, 1998; SUH e SHIN, 2000).

Estudos realizados por HAJAJ (1997), demonstraram que, em um processo fermentativo submerso de aproximadamente 120 horas, a perda da concentração de pigmento extracelular observada foi de aproximadamente 15% no final da cultura, que poderia ser explicada pela degradação fotoquímica (luz do dia) (HAJAJ, KLAEBE, LORET et al., 1997).

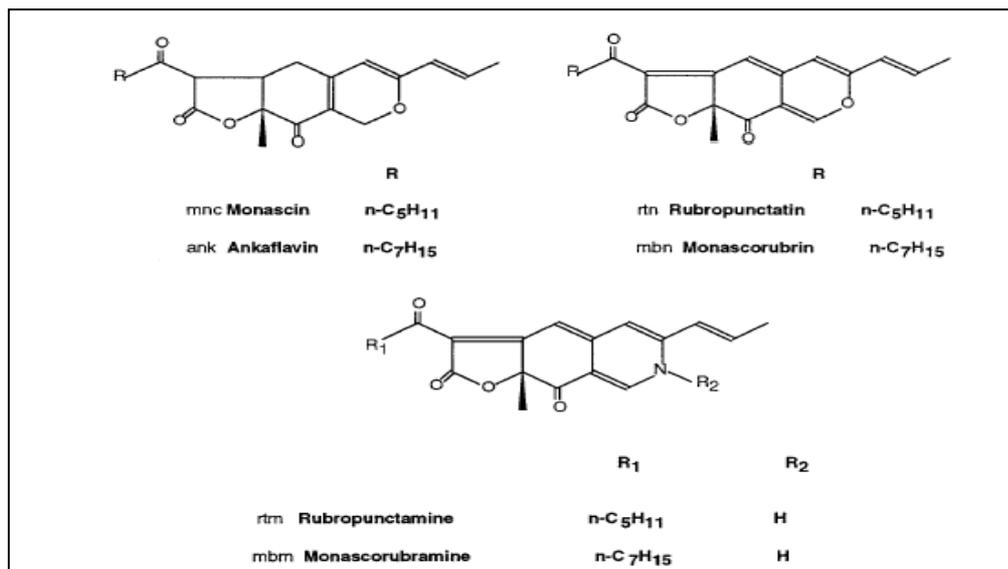


Figura II.4 - Tipos de pigmentos formados pelo *Monascus ruber*. Fonte: HAJJAJ et al., 1997.

Os pigmentos produzidos pelo *Monascus* possuem baixa solubilidade na água, são sensíveis ao calor e instáveis a valores extremos de pH (2,0 e 10,0) e exposição à luz. Estes pigmentos reagem rapidamente com grupamentos amino contido em proteínas, aminoácidos e ácidos nucléicos, formando complexos hidrossolúveis mantendo sua coloração estável por diversos meses quando conservados em solventes orgânicos (butanol), enquanto que em solução aquosa ele é degradado em poucos dias. Sua estabilidade é favorecida por um complexo doador-aceptor de elétrons (EDA), demonstradas pelas moléculas extracelulares, quinona-amina (HAJJAJ, KLAEBE, LORET et al., 1997).

Segundo HAJJAJ et al. (1997), ficou comprovado que a degradação do pigmento é fotoquímica e contínua. Porém não sofre nenhuma ação pelo oxigênio dissolvido. Outra conclusão importante deste trabalho foi que a produção de GCR (*N-glucosylrubropunctamina*) e GCM (*N-glucosylmonascorubramina*) depende da concentração de glicose inicial no meio de cultivo. Em elevadas concentrações (20g/L), GCR e GCM representam 10% dos pigmentos vermelhos, enquanto GTR (*N-glutarylrubropunctamina*) e GTM (*N-glutarylmonascorubramina*) somam mais de 80% da produção do corante. Em contraste, concentrações menores de glicose (5g/L), GTR e GTM são bem mais baixas, enquanto GCR e GCM não são produzidos (Figura II.5).

Ensaio como efeito da temperatura, luz (incluindo UV) e associação com alguns aditivos alimentares foram estudados por CHANGLING et al. (1998), comparando os pigmentos produzidos pelo *Monascus purpureus* aos pigmentos comerciais Chineses e Japoneses, após exposição a várias condições físico-químicas. Estes dados serviram para demonstrar as possíveis aplicações, com sucesso, do pigmento *Monascus* como, por exemplo, na lingüiça chinesa, no macarrão instantâneo e em produtos lácteos. Entretanto,

os resultados de estudos de sua aplicabilidade como corante em doces e balas, que requerem altas temperaturas, foram desastrosos, impossibilitando seu uso na manufatura destes produtos, pois este corante não resiste a altas temperaturas ( $> 150^{\circ}\text{C}$ ) (FABRE, GOMA e BLANC, 1998).

Estes pigmentos não são hidrossolúveis, são instáveis em pH extremo (2 e 14), ao calor e à luz. Estes pigmentos lipofílicos, intracelulares podem reagir com grupamentos amina de proteínas, aminoácidos, ácidos nucléicos e aminoaçúcares formando complexos de pigmentos extracelulares solúveis em água. O recente uso de ácido glutâmico como fonte de nitrogênio tem apontado resultados promissores, seja como estimulante do acúmulo extracelular dos pigmentos, seja contribuindo para o aumento da eficiência do processo de produção de pigmentos vermelhos (HAJJAJ, BLANC, GROUSSAC et al., 2000a).

Os pigmentos sintéticos, utilizados desde 1856, substitutos dos corantes naturais antes utilizados, estão sendo colocados “à prova”, diminuindo o seu uso a cada ano. Baseados em estudos toxicológicos, a utilização de alguns corantes sintéticos (como o *azorubi* e *tartrazin*), têm sido relatados como sendo causadores de casos graves de alergias (KREJCI, BRETZ e KOECHEL, 1996; STORMER e HOIBY, 1996; PFEIFFER, GROSS e METZLER, 1998; WIGGER-ALBERTI, BAUER, HIPLER et al., 1999; VANDENPLAS, CAROYER, CANGH et al., 2000).

Segundo FABRE, GOMA et al. (1998), o pigmento vermelho obtido a partir do cultivo do *Monascus*, serve como substituto de aditivos sintéticos tradicionais como sais nitrito (E249). Porém, a utilização do pigmento *Monascus* como corante alimentar irá depender das interações com os componentes dos produtos alimentícios.

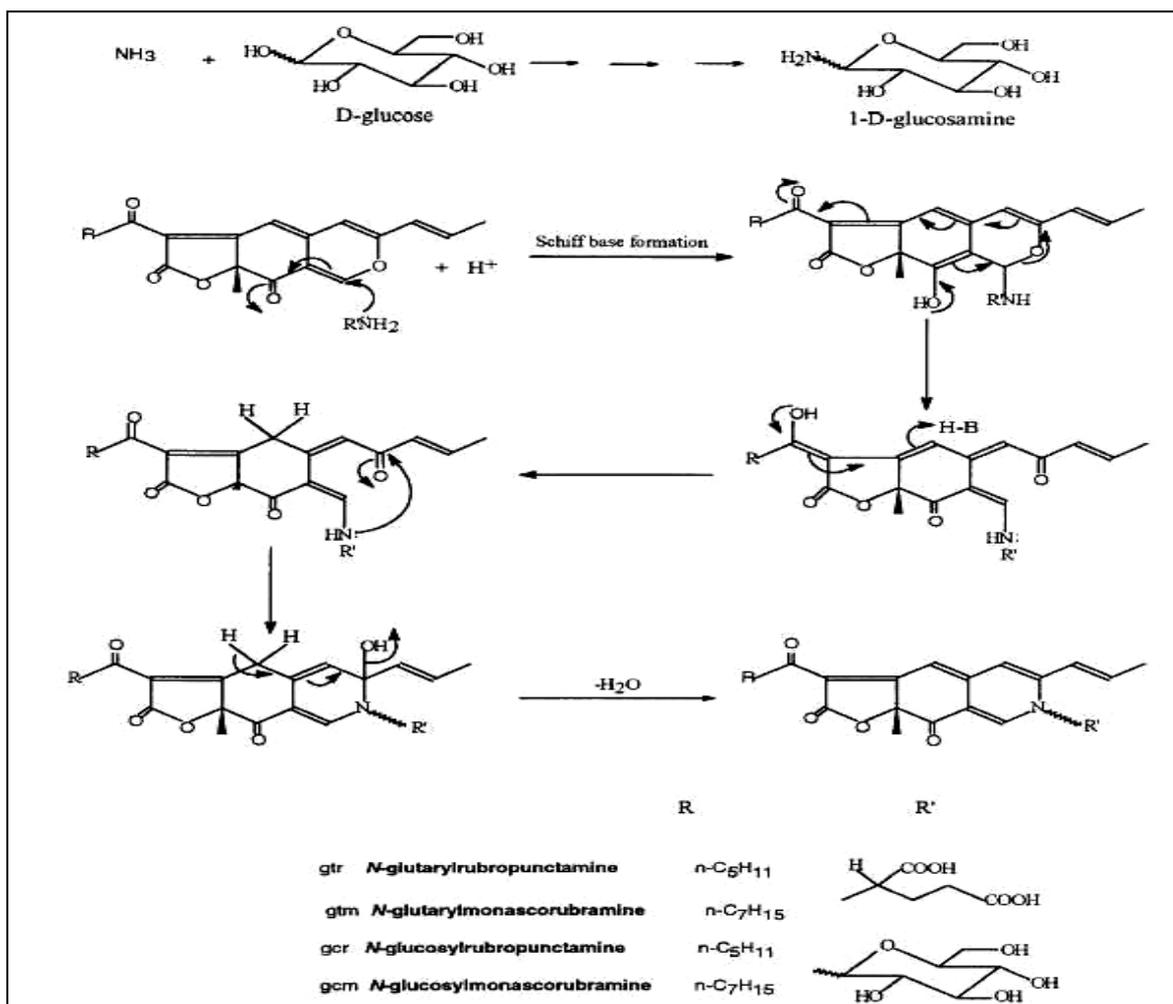


Figura II.5 - Processos de purificação e caracterização das estruturas envolvidas para formação dos pigmentos extracelulares (bem como a ocorrência de complexos “EDA” destes pigmentos (*N*-glutarylribropunctamina – GTR; *N*-glutarylmonascorubramina – GTM; *N*-glucosylmonascorubramina – GCM e *N*-glucosylribropunctamina – GCR) Fonte : HAJAJ et al (1997).

No que tange à indústria de alimentos os novos corantes devem ser submetidos a ensaios toxicológicos para garantir a segurança do seu uso. Os estudos de toxicologia custam em torno de US\$ 50 mil o que restringe os trabalhos dos centros de pesquisa como a Universidade da Bahia e Fiocruz. A Sociedade Brasileira de Corantes Naturais e o Genamaz deveriam insistir no papel de estimular e viabilizar a interface entre centros de pesquisa e o setor privado (MASCARENHAS, 1999).

Assim, para melhorar a qualidade dos pigmentos já produzidos e incentivar a produção de novos corantes no Brasil, há de se estreitar os vínculos com as poucas indústrias que investem em tecnologia (apenas 5 investem acima de 2% do seu faturamento bruto em tecnologia). Este investimento pode ser observado principalmente nas indústrias de grande porte que buscam garantir produção em escala e diferencial competitivo através de um padrão de qualidade (MAIMOM, 2000).

Em termos da introdução de novos produtos no mercado internacional deve se atentar que a regulamentação dos aditivos e corantes é implementada pelo Comitê Misto FAO/OMS (Food and Agriculture Organization/Organização Mundial da Saúde). Esse Comitê, denominado de JEFCA (Joint Expert Committee on Food Additives da FAO/OMS), assessora os países membros no que se refere à pureza e inocuidade dos alimentos com base no Acordo de Implementação de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias (SPS). Como foi mostrado, os corantes sintéticos e sintéticos idênticos aos naturais tiveram sua IDA estabelecida, ao passo que os naturais, caramelos e inorgânicos apenas para alguns grupos. O FDA alega que eles não necessitariam ser especificados, por não oferecerem risco à saúde. Isto nem sempre é verdade, pois em 1984 criou-se uma IDA bem restritiva para o urucum, corante natural de maior comércio internacional (MAIMOM, 2000).

O pigmento Monascus é amplamente aplicado na indústria de alimentos, principalmente nos países Asiáticos, isoladamente ou em combinações com outros corantes. Devido aos altos custos e às dificuldades de obtenção deste pigmento purificado em cultivo sólido, o cultivo submerso tornou-se uma estratégia alternativa de alguns pesquisadores na Europa, (Blanc e colaboradores) e no Brasil, (Kilikian e colaboradores), não apenas para obterem maiores concentrações deste produto de elevado valor agregado, mas como também para um maior conhecimento metabólico e enzimático de produção deste pigmento.

Neste trabalho, empregou-se como principal substrato um resíduo da produção de arroz, o farelo de arroz parboilizado. Este resíduo, rico em amido, sais minerais e vitaminas, principalmente as do complexo B, é produzido em grandes quantidades no Estado de Santa Catarina, sendo apenas uma pequena parte destinada à alimentação humana e animal. Por ser altamente solúvel, o seu aproveitamento como substrato para produção de pigmento vermelho é adequado para o cultivo submerso. Desta forma, o foco principal deste estudo é investigar a capacidade de produção de pigmento Monascus em cultivo submerso por uma linhagem reconhecidamente produtora (*Monascus ruber* CCT 3802).

"Após criar todas as condições favoráveis, tenha paciência, não desista.  
Para alcançar a Boa Sorte, tenha confiança."

Fernando Trias de Bes  
Alex Rovira Celma

## **CAPÍTULO III – MATERIAL E MÉTODOS**

---

Neste capítulo são relatados aspectos sobre o microrganismo utilizado e as condições de cultivo empregadas nos estudos propostos. São descritos também, os equipamentos adotados e os procedimentos a serem utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

### **III.1 - EXPERIMENTOS REALIZADOS**

A condução dos experimentos foi realizada em 5 etapas, descritas a seguir.

**1ª etapa:** cultivos de *Monascus ruber* CCT 3802 estudando-se as estratégias de produção de pigmentos vermelhos, usando como ferramenta o ensaio micromorfológico de cultivo deste fungo, o objetivo deste estudo foi relacionar as suas alterações morfológicas com a formação de altas e baixas concentrações de pigmentos vermelhos em diferentes substratos.

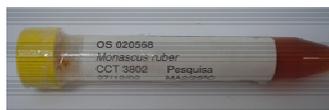
**2ª etapa:** testes em frascos agitados buscando a melhor produção de pigmento, utilizando meios de cultivo e condições experimentais já citados na literatura (CARELS e SHEPHERD, 1975; BLANC, 1998; COX, PAUL e THOMAS, 1998; BLANC, 1999; ALLOK, 2001). Estes ensaios foram fundamentais para um melhor conhecimento metabólico do fungo, objeto deste estudo.

**3ª etapa:** também em frascos agitados, foram testadas diferentes fontes de carbono (frutose, glicose, maltose, sacarose, amido de arroz e farelo de arroz parboilizado) e como fontes de nitrogênio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; milhocina, glutamato monossódico, histidina e glicina), capazes de aumentar a produção de pigmentos vermelhos no meio de cultivo.

**4ª etapa:** com objetivo de estudar a produção de citrinina formada concomitantemente com o pigmento *Monascus*, foi verificada a influência da adição de ácidos graxos de cadeia curta (octanoato de sódio) ao meio de cultivo em biorreator.

**5ª etapa:** Após selecionar as melhores estratégias para produção de pigmentos vermelhos a partir das etapas anteriores (frascos agitados), as culturas foram conduzidas em batelada simples em fermentador. Influência do pH e frequência de agitação foram os focos desta etapa.

### **III.2 – MICRORGANISMO**



A linhagem de microrganismo utilizada foi o *Monascus ruber* CCT 3802, um fungo filamentosos obtido da Fundação André Tosello (correspondente à cepa ATCC nº. 36928), Campinas SP (*Monascus ruber* van Tieghem alt. *Basipetospora rubra* Cole & Kendrick).

Taxonomia: Filo *Eumycota*, Sub-filo *Ascomycotina*, Classe *Plectomycetes*, Ordem *Eurotiales*, família *Monascaceae*.

**Corante utilizado para visualização do microrganismo em microscopia ótica:**

Lactofenol azul Algodão (FISHER e COOK, 2001).

Fenol..... 20g  
 Ácido Láctico..... 20 mL  
 Glicerol.....40 g  
 Azul de Poirrier.....0,05 (azul algodão)

### **III.3 - MEIOS DE CULTURA**

#### **III.3.1 - Manutenção da cultura**

A cultura estoque foi mantida em BDA (Batata Dextrose Ágar – DIFCO) em pH 5,5 ajustado com ácido fosfórico 30%. Após incubação por 7 dias a 30°C, as culturas foram conservadas a 4°C, em refrigerador e repicadas a cada dois meses (Figura II.6) (HAJJAJ et al., 2000a).

Este meio foi usado no repique e na conservação da cepa. A esterilização do meio foi feita a 121°C por 15 min (OROZCO, PEREIRA e KILIKIAN, 2003) .



Figura III.6 - Cultura estoque em BDA.

#### **III.3.2 – Inóculo**

Pré-inóculo: aos tubos de ensaio contendo culturas de *Monascus ruber* CCT 3802 (7 dias a 30 °C) foram adicionados 3 a 4 ml de meio de fermentação, e a superfície da cultura foi raspada com pipeta Pasteur. A suspensão da cultura assim obtida foi transferida para frascos de Erlenmeyer aletados de 500 mL com o meio a ser estudado. A incubação foi realizada por 48 horas, sob frequência de agitação de 160 min<sup>-1</sup> e temperatura de 30°C (OROZCO et al., 2003).

Inóculo: cada frasco com 80 mL de meio de cultivo foi inoculado com 20 mL do pré-inóculo (PEREIRA e KILIKIAN, 2001).

### **III.4- MEIOS DE CULTIVO E CONDIÇÕES DE OPERAÇÃO**

Foram avaliados três principais meios de cultivo sintéticos, baseados nos estudos de PASTRANA, BLANC et al., (1995), (KIM, J.H.KIM e HYUCK, 2002; OROZCO, PEREIRA e KILIKIAN, 2003).

**Meio segundo Pastrana:**(PASTRANA, BLANC, SANTERRE et al., 1995).

Meio contendo, em gramas por litro de água destilada: glicose, 20; glutamato monossódico (GMS), 5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5; CaCl<sub>2</sub>, 0,1; MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 0,5; FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 0,01; ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 0,01 e MnSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O, 0,03.

**Meio segundo Kim (KIM, J.H.KIM e HYUCK, 2002)**

Meio contendo, em gramas por litro de água destilada: glicose, 30; glutamato monossódico (GMS), 5; Extrato de levedura, 3; NaNO<sub>3</sub>, 2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1; MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 0,5; KCl, 0,5; FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 0,01, em pH inicial 6,5.

**Meio segundo Pereira (OROZCO, PEREIRA e KILIKIAN, 2003)**

Meio contendo, em gramas por litro de água destilada: glicose, 20; glutamato monossódico (GMS), 7,6; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5; NaCl, 0,4; MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 4,8; FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 0,1; ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 0,01 e extrato de levedura, 1 em pH inicial 5,5.

Como substratos, foram testados também maltose, amido de arroz e farelo de arroz.

Além do glutamato monossódico foram testados como fontes de nitrogênio a glicina, histidina, milhocina e nitrato de amônia.

**Meio farelo de arroz parboilizado**

Meio contendo em gramas por litro de água destilada: glutamato monossódico (GMS), 5; farelo de arroz parboilizado, (concentrações de 3, 5, 10, 15, 25 e 30 e 100). Neste meio foi testada a adição ou ausência de glicose (5) e adição ou ausência de nutrientes (sais). O pH foi ajustado em 5,5 com ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). Neste ensaio também foram testadas a glicina e a histidina como fontes de nitrogênio (substituindo o glutamato monossódico), além da adição de octanoato de sódio.

**III.4.1 - Preparo do Meio de cultura e inoculação do fungo**

As soluções de fosfatos, sulfatos e magnésio foram preparadas em frascos de Erlenmeyer distintos, para evitar a complexação durante tratamento térmico. Todas as soluções foram autoclavadas à temperatura de 121<sup>o</sup>C por 15 min.

**Inoculação**

Os frascos de Erlenmeyer aletados de 500 mL com 100 mL de meios de cultivo a serem testados, foram inoculados com 20 mL do pré-inóculo de *Monascus ruber* e incubado em *shaker* orbital (Marca BRAUN) na temperatura de 30<sup>o</sup>C a uma frequência de 160 min<sup>-1</sup>.

**III.4.2 - Preparo da Solução de Milhocina**

A milhocina, (CSL = *Corn Steep Liquor*), um subproduto do processamento do milho contendo 40% de sólidos totais e correspondendo à água de maceração do milho, foi fornecida pela *Refinações de Milho Brasil* e necessitou de um tratamento prévio à sua utilização.

Este resíduo foi preparado seguindo-se os passos sugeridos por HOCH (1997), citado por (MARANGONI, 2000) e adaptados de acordo com a capacidade dos equipamentos disponíveis. A seqüência utilizada consistiu em:

- 1 Centrifugação a 5000 rpm por 20 minutos;
- 2 Elevação do pH do sobrenadante a 7,0 com NaOH 7M;
- 3 Centrifugação a 5000 rpm por 20 minutos;
- 4 Esterilização do sobrenadante.
- 5 Congelamento.

De acordo com os dados fornecidos pela empresa, este resíduo contém 64 g/L de nitrogênio.

Neste trabalho foi empregada uma solução de 0,1 mL de milhocina, diluídos em 100 mL de água destilada, para o preparo do meio líquido utilizado nos estudos micromorfológicos e a mesma concentração acrescido de agar-ágar para o preparo do meio sólido (microcultivo).

### **III.5 - ENSAIOS REALIZADOS EM FERMENTADOR**

O cultivo do microrganismo foi realizado em biorreator de 6 L Modelo BIOFLO III, fabricado pela *New Brunswick Scientific Co INC*, em regime descontínuo, com volume útil de 4L (Figura III.7).



Figura III.7- Biorreator utilizado para as culturas celulares.

A temperatura foi mantida constante em todos os experimentos a 30°C. Foram realizados estudos com pH controlado fazendo-se a adição de ácido (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) ou base (NaOH). Também foram realizados estudos sem controle de pH (OROZCO, PEREIRA e KILIKIAN, 2003). A vazão específica de ar foi de 0,4vvm (PEREIRA, OROZCO, TONSO et al., 2003). As freqüências de agitação utilizadas foram 300 e 500 min<sup>-1</sup>, baseado em estudos

de PEREIRA et al., 2003. O controle de formação de espuma foi realizado com antiespumante polipropileno glicol (AVERAGE  $M_n$  ca.2.000 - ALDRICH CHEMICAL COMPANY, INC.). Os diferentes valores de agitação usados (300 e 500  $\text{min}^{-1}$ ) foram estudados no capítulo VII.

## **III.6 - MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **III.6.1 - Tratamento da amostra**

As amostras para as análises foram submetidas à centrifugação em centrífuga MARCA HSIANGTAI-MACHNERI Ind. Corporation Ltda, a 10.000 x g a 20°C por 15 min e o sobrenadante filtrado em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  (MILLIPORE, Bedford, MA).

As leituras dos pigmentos contidos nos sobrenadantes, foram realizadas em espectrofotômetro (SPECTRONIC UNICAM – GENESYS 10 *vis*) em comprimento de onda ( $\gamma$ ) 480nm (HAJJAJ, BLANC, GROUSSAC et al., 2000a). Para manter uma precisão adequada, a faixa de absorbância utilizada foi de até 0,800  $\text{UDO}_{480}$  fazendo diluições, quando necessário com água destilada, para manter a linearidade.

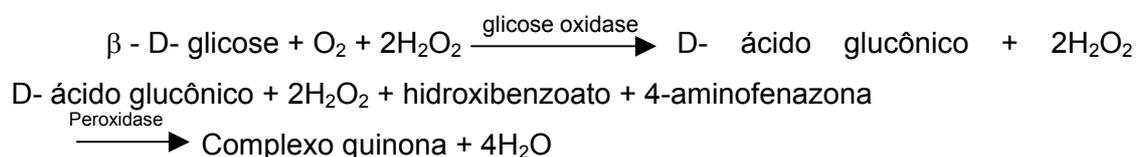
### **III.6.2 - Determinação da concentração celular**

Cada amostra foi pesada em balança analítica (BEL ENGEINEERING 210 g x 0,1 mg) depois filtrada sob vácuo através de membrana de fibra de vidro de porosidade 1,2  $\mu\text{m}$  (MILLIPORE, Bedford, MA) previamente pesada, e o retido foi submetido à secagem em forno microondas durante 15 min em potência 20 (180 W) (PEREIRA e KILIKIAN, 2001). O conjunto foi resfriado em dessecador por 15 min e depois pesado para a determinação da biomassa seca retida na membrana.

### **III.6.3 - Dosagem de glicose**

O teste empregado para a determinação de glicose foi o da “Biodiagnóstica - Enz color®” (GOLDANALISA, 2003).

#### **.Princípio do método “glicose enz color”**



O peróxido de hidrogênio formado reage com a 4- aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase (POD - Doador hidrogênio-peróxidorredutase), através de uma reação oxidativa de acoplamento formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra.

#### **Cálculo**

$$\text{mg de glicose por } dl = \frac{At}{Ap} \times 100, \text{ onde,} \quad \text{Eq. 1}$$

At= Absorbância do teste e

Ap = Absorbância do padrão (100 mg/dL).

#### **III.6.4 - Dosagem de açúcares redutores**

Os açúcares redutores foram medidos pelo método do 3,5 dinitrosalicilato (DNS) conforme resume a Tabela III.6. O reativo foi preparado da seguinte forma:

- 1 300 g de tartarato duplo de sódio e potássio e 16 g de NaOH foram dissolvidos em água destilada.
- 2 Aos poucos foi adicionado 10 g de ácido dinitrosalicílico (aquecido quando necessário).
- 3 O volume final foi completado para 1 litro de água destilada.

A metodologia de análise foi a seguinte: um volume de 200 µL de sobrenadante, previamente diluído foi adicionado a 200 µL de reativo DNS e depois colocado em ebulição, durante 5 minutos, em banho-maria. Após o resfriamento em banho de gelo, adicionou-se 2mL de água destilada. Um tempo de 15 min foi necessário para que a amostra se estabilizasse “à temperatura ambiente”. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 540 nm contra um branco de água destilada. A escala foi compreendida entre 0 e 2 g/L de glicose.

Foram lançados em gráfico, a leitura de absorbância x concentração de glicose e determinado o coeficiente angular ( $\Delta\text{Abs}/\Delta c$ ) e o fator ( $c/\Delta\text{Abs}$ ) da reta obtida (VASCONCELLOS e VALLE, 1997).

#### **III.6.5 - Determinação da concentração de etanol**

A concentração de etanol foi determinada por cromatografia em fase gasosa, usando-se cromatógrafo CG-90 com detector de ionização de chama (DIC ar-hidrogênio), injetor manual e coluna HP-1 (Crosslinked Methyl siloxane 30 m X 0,53 mm x 1,5 mm) acoplado a um microcomputador, onde foi realizada a integração das análises cromatográficas. A integração e os cromatogramas foram obtidos através de uma placa de

interface AD/DA - MICROQUÍMICA. A análise de etanol foi feita por injeção direta da amostra filtrada em filtro Millipore com poro de 0,22  $\mu\text{m}$ . de abertura.

**Condições de operação:**

- \* Gases de arraste: Nitrogênio com fluxo de 25 mL/min.
- \* Gases da chama: Hidrogênio e ar sintético com vazão de 35 mL/min e 300 mL/min respectivamente.
- \* Temperatura da coluna: 105<sup>o</sup>C.
- \* Temperatura do detector: 230<sup>o</sup>C.
- \* Temperatura do injetor: 185<sup>o</sup>C.
- \* Volume da amostra: 1,0  $\mu\text{L}$ .

Uma curva de calibração foi preparada para cada série de testes, com concentração de etanol variando entre 0,2 e 4,0 g/L. O tempo de análise foi de 4,0 minutos. As amostras, bem como os padrões, foram diluídas, de forma que a concentração se encontrasse na faixa da curva de calibração.

### **III.6.6 – Determinação da concentração de pigmento Monascus**

As amostras contendo o pigmento Monascus foram analisadas em espectrofotômetro (SPECTRONIC UNICAM – GENESYS 10 *vis*) no comprimento de onda de ( $\lambda$ ) 480 nm (HAJJAJ, KLAEBE, GOMA et al., 2000b).

### **III.6.7 – Determinação concentração de amilase**

A análise da concentração de amilase foi realizada utilizando-se o kit da *Análise Diagnóstica*® (Metodologia Cinética – colorimétrica de Caraway modificado) (GOLDANALISA, 2003).

A amilase hidrolisa o amido liberando moléculas de açúcares e dextrina, e com a adição de iodo, ocorre a formação de cor azul com o amido não hidrolisado. A atividade da amilase é inversamente proporcional à intensidade de cor azul e é calculada em comparação com um controle de substrato.

**Procedimento:**

Ajusta-se o comprimento de onda do espectrofotômetro para 660nm. Utilizando o branco com água destilada. Segundo o procedimento descrito a seguir:

	Teste	Controle
Substrato <sup>(1)</sup>	250 µL	250 µL
Tampão <sup>(2)</sup>	250 µL	250 µL

Incubar em BM 37°C por 2 minutos. O nível da água no banho deve ser superior aos reagentes no tubo de ensaio.

Amostra	10 µL	
---------	-------	--

Misturar e incubar em BM **EXATAMENTE** 7 minutos e 30 segundos

Solução Iodo de Uso <sup>(3)</sup>	500 µL	500 µL
Água dest/desionizada	4 mL	4 mL

(1) – Contém ácido benzoico 20 mmol/L e amido solúvel 0,8 g/L.

(2) – Contém ácido benzóico 0,25%; fosfato monobásico de sódio 750 mmol/L e azida sódica 7,7 mmol/L..

(3) – Contém iodato de potássio 16,7 mmol/L, iodeto de potássio 271 mmol/L, ácido clorídrico 110 mmol/L e fluoreto de sódio 83 mmol/L dissolvidos em 45 mL de água destilada.

A reação enzimática é paralisada no instante em que o reagente de cor (de uso) é adicionado. Após mistura, com água desionizada, espera-se 5 minutos. Mistura-se bem e determinam-se as absorbâncias do C (controle) e T (teste) em espectrofotômetro, em 660 nm. A cor final é estável por 120 minutos, à temperatura de 20 °C a 30 °C.

#### Cálculo:

$$\text{Unidades de amilase/dL} = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 800, \text{ onde,} \quad \text{Eq. 2}$$

A<sub>c</sub>= Abs do Controle e

A<sub>t</sub>=Absorbância do teste

#### Limite de Detecção

$$L_D = 4 \text{ U/dL}$$

#### Linearidade:

O resultado da medição é proporcional à atividade enzimática até 400 U/dL. Para valores superiores, as amostras foram diluídas com NaCl 150 mmol (0,85%) e repetida a medição. O resultado obtido foi multiplicado pelo fator de diluição.

### **III.6.8 – Determinação qualitativa de citrinina por cromatografia em camada delgada (TLC)**

A determinação quantitativa de citrinina (ácido 4,6 dihidro-8 hidróxi-3,4,5 trimetil-6 oxo- 3H – 2-benzopirano - 7-carboxílico) foi realizada por técnica de TLC (cromatografia em camada delgada) utilizando-se placas de gel agarose (MERCK- 20 x 20 cm), usando

acetona/acetato de etila/água (10:10:4) como fase móvel (PEPELJNJAK, SEGVIC e OZEGOVIC, 2002).

**Validação do teste:** Diluições sucessivas de 0,9; 1,8; 3,6; 9, 18 e 36 mg/L foram preparadas a partir do padrão citrinina SIGMA C = 180 µg/ml para servirem como parâmetros de referência. As amostras (5 mL) foram retiradas dos meios de cultivo, centrifugadas, filtradas e tratadas com 5 mL de uma mistura de acetonitrila e água (9:1) por 10 minutos. Foram adicionados às amostras 5 mL de n-hexano (para remoção dos lipídeos), 2,5 mL de carbonato de sódio hidrogenado e 2,5 mL de água (pH=8,9) e extraídas com clorofórmio (2,5 mL). A fração de clorofórmio foi filtrada com sulfato de sódio, evaporada, seca e redissolvida em 0,2 mL de clorofórmio para análise em cromatografia de camada delgada (TLC) (PEPELJNJAK et al., 2002).

A presença de citrinina foi determinada pela incidência da luz UV (UV366 nm) com tempo de retenção (Rf) 0,5 sobre a placa de gel agarose, após corrida com o gradiente de separação. A presença de uma banda fluorescente (amarelo intenso) comparada ao padrão de citrinina adicionado à mesma placa de gel agarose caracterizou a presença desta molécula (PEPELJNJAK, SEGVIC e OZEGOVIC, 2002).

### **III.6.9– Tratamento de Dados**

#### **a) Velocidades Específicas Máximas de Crescimento:**

As velocidades específicas máximas de crescimento durante a fase exponencial foram calculadas a partir do coeficiente angular da curva linearizada pelo logaritmo neperiano da biomassa residual com o tempo de acordo com a equação 3.

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu t$$

onde:

Eq. 3

X = biomassa (g)

X<sub>0</sub> = biomassa inicial (g)

μ = velocidade específica máxima de crescimento celular (h<sup>-1</sup>)

t = tempo (h)

#### **b) Produtividade Média de Formação de Pigmentos Vermelhos:**

A produtividade média foi calculada pela diferença entre a concentração de pigmentos vermelhos (UDO<sub>480</sub>) em um instante *t* e a concentração inicial de pigmentos vermelhos dividida pelo intervalo de tempo correspondente, conforme equação 4.

$$P_M = \frac{(DO_{480t}) - (DO_{480t_0})}{t - t_0}$$

Eq. 4

Onde:

$P_{\text{máx}}$  = Produção máxima de formação de Pigmentos vermelhos no instante de tempo  $(t - t_0)$  ( $\text{UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

$\text{UDO}_{480t}$  = quantidade de pigmentos vermelhos no instante de tempo  $t$ .

$\text{UDO}_{480t_0}$  = quantidade de pigmentos vermelhos no instante de tempo  $t_0$ .

### c) Fatores de Conversão:

O fator de conversão foi obtido a partir do coeficiente angular da porção linear do gráfico da quantidade analisada (biomassa) contra a quantidade de substrato, de acordo com a equação 5.

$$Y_{M/S} = \frac{dM}{dS}$$

Eq. 5

Onde:

$Y_{Q/S}$  = Fator de conversão de substrato S no componente P (pigmento,  $(\text{UDO}_{480} \cdot \text{g}^{-1})$  ou X, biomassa  $(\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$ ).

$M$  = componente que pode representar a biomassa (g), ou pigmento *Monascus* ( $\text{UDO}_{480}$ ).

$S$  = substrato.

"Noventa por cento do sucesso se baseia em insistir"  
Wood Allen

## **CAPÍTULO IV – ESTUDO FÍSIO-MORFOLÓGICO DO FUNGO *Monascus ruber***

---

Neste item, será apresentada uma metodologia capaz de avaliar a correlação entre a variação físico-morfológica do fungo em estudo e a produção de pigmentos vermelhos.

## **IV.1 - INTRODUÇÃO**

Os fungos são amplamente encontrados na natureza e são essenciais na degradação e reciclagem da matéria orgânica. Alguns fungos melhoram acentuadamente nossa qualidade de vida e contribuem na produção de alimentos e bebidas alcoólicas; outros podem servir à medicina fornecendo metabólitos bioativos úteis, como antibióticos e agentes imunossupressores (ciclosporinas). Os fungos estão presentes em quase todos os nichos ecológicos, são um grupo muito diversificado e numeroso. Estão descritas cerca de 69.000 espécies de fungos embora estejam estimadas 150.0000 espécies diferentes por todo o mundo (BROOKS, BUTEL e MORSE, 2000).

Os fungos produzem diversas substâncias defensivas, que utilizam como marcadores de território e como meio de defesa dos seus recursos alimentares. Estas substâncias, venenos, toxinas ou antibióticos, têm implicações muito importantes para o homem, principalmente pela exploração industrial destas moléculas (LACAZ, PORTO, J.E.C.MARTINS et al., 2002).

Os fungos liberam enzimas para se alimentarem. Estas degradam os substratos em moléculas mais acessíveis que são depois absorvidas e assimiladas. Este sistema de alimentação envolve um grande gasto de energia por parte dos fungos estando por isso, necessariamente, associados aos mecanismos de sobrevivência. De um modo geral, três fatores contribuem para o seu sistema de defesa: o sistema de enzimas degradativas está acoplado a um mecanismo de *feedback* de modo que a produção de enzimas é controlada de acordo com a quantidade de recursos disponíveis, degradados e utilizados, a fase final da degradação é realizada por enzimas associadas à parede do fungo e o fungo produz antibióticos, toxinas ou outros produtos supressores do crescimento de outros organismos (ALEXOUPOULOS, MIMS e BLACKWELL, 1996).

O efeito destes antibióticos na natureza é difícil de analisar, pois eles são produzidos em quantidades mínimas e em locais muito específicos. A partir de estudos realizados em laboratório prevê-se que os antibióticos sejam produzidos em situações de limitação de nutrientes, sendo por isso, importantes para o fungo em crescimento como meio de garantir o acesso aos recursos nutritivos ou como defesa de um recurso escasso. Por exemplo, os antibióticos produzidos por *Aspergillus* e *Penicillium* os ajudam a defender os grãos ricos em amido do ataque de outros microrganismos, pois impedem o seu desenvolvimento (ALEXOUPOULOS, MIMS e BLACKWELL, 1996).

Tanto os fungos microscópicos como os macroscópicos têm sido largamente utilizados na indústria. Em 1976, 100 milhões de libras de penicilina haviam sido produzidas; de ácido cítrico, 200 milhões de toneladas e de glutamato monossódico, 400 milhões de

toneladas. Nesse mesmo ano, produzia-se momensina – produto veterinário usado no controle da coccidiose – e a validamicina, produto empregado no tratamento de infecções bacterianas, em plantas. Em 1963, cerca de 337.850 toneladas de leveduras haviam sido produzidas para consumo humano e animal (LACAZ, PORTO, J.E.C.MARTINS et al., 2002).

As características biológicas dos fungos e as estratégias do seu ciclo de vida constituem por si só um dos maiores desafios biotecnológicos. É importante também salientar que a fase de reprodução sexuada típica da maioria dos fungos permite-lhes adaptar gradualmente às condições mais desfavoráveis ao seu desenvolvimento, tornando-os mais resistentes e com maiores defesas contra os seus inimigos (ALEXOUPOULOS, MIMS e BLACKWELL, 1996).

São inúmeras as aplicações biotecnológicas utilizando fungos. A partir de moléculas simples como a glicose, estes organismos são capazes de transformar moléculas como o acetil CoA e malonil CoA (principalmente na condensação destes dois compostos) em produtos altamente complexos (Figura IV.8). A capacidade enzimática, o potencial bioquímico e sua adaptação às condições extremas de vida em meio líquido têm sido explorados para a produção de moléculas de interesse industrial (penicilinas, cefalosporinas), alcalóides, enzimas ( $\alpha$ -amilase, celulase), ácidos orgânicos (ácido cítrico) e pigmentos alimentares (ex. *Anka*) (HAJJAJ, KLAEBE, GOMA et al., 2000b; CARDENAS, ALVAREZ, ALVAREZ et al., 2001; SCHNEWEIS, MEYER, HORMANSDORFER et al., 2001).

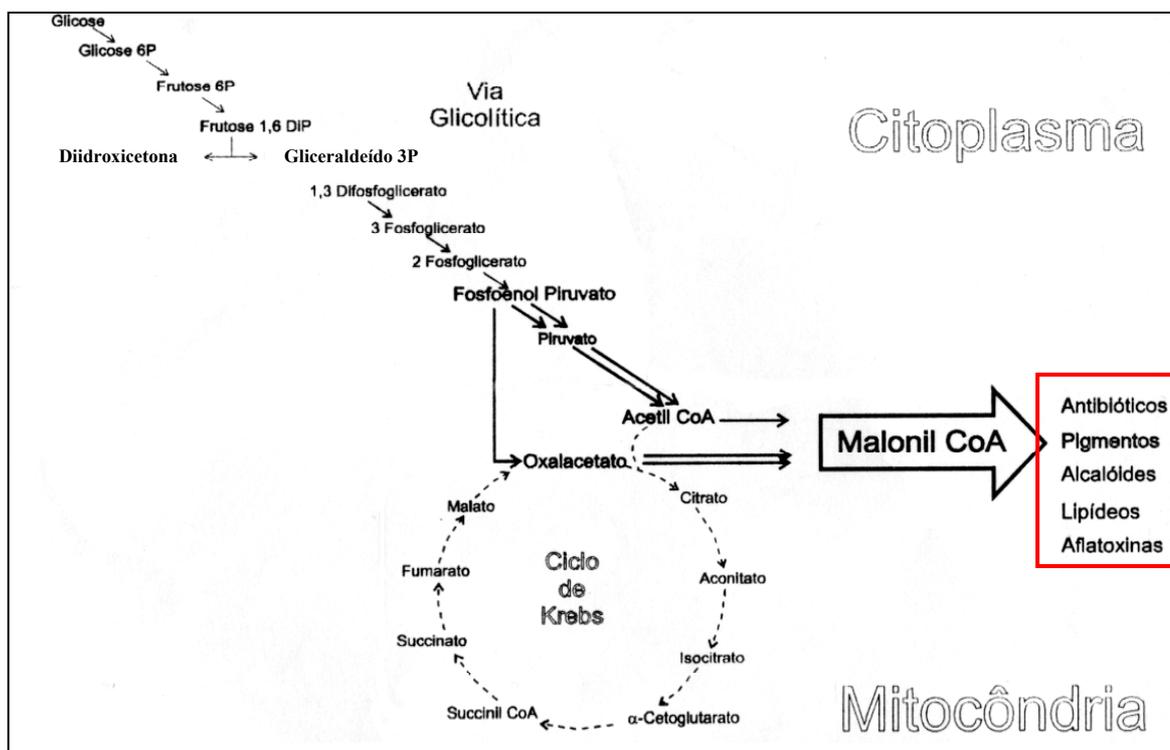


Figura IV.8- Via Metabólica dos policetídeos. Fonte: (HAJJAJ, BLANC, GROUSSAC et al., 1999a)

## **IV.2 – MORFOLOGIA DOS FUNGOS**

Os fungos se disseminam no globo terrestre produzindo, na maioria das vezes, estruturas denominadas esporos (reprodução sexuada) ou conídeos (reprodução assexuada) (Figura IV.9), dos mais diversos tipos, formados ou não em estruturas especializadas para essa função, e resultantes de um de seus ciclos de reprodução. O esporo, encontrando um substrato adequado e em condições ambientais, temperatura, umidade, pH, luminosidade, ideais, se desenvolve dando formação a um ou mais tubos germinativos, se for originado de fungo filamentoso ou a um blastoconídeo se for originado de um fungo leveduriforme (LACAZ, PORTO, J.E.C.MARTINS et al., 2002).

Os tubos germinativos desenvolvem-se formando hifas, e o conjunto de hifas é denominado micélio. O micélio que está em contato com o substrato, envolvido principalmente com a nutrição do fungo é denominado micélio vegetativo e o que é responsável pela produção de esporos é denominado micélio reprodutor (ou aéreo).

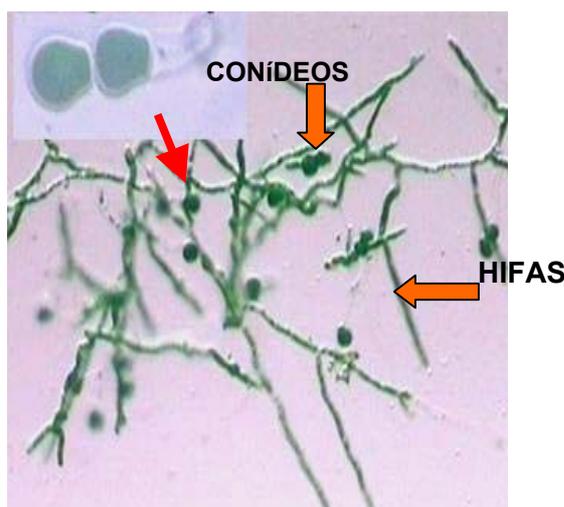


Figura IV.9 - Estrutura micromorfológica de um fungo *Monascus ruber* caracterizando os conídeos e as hifas.

As hifas do micélio vegetativo liberam e absorvem substâncias do substrato necessárias à nutrição do fungo e servem também para fixar o fungo a esse substrato. O micélio reprodutivo, responsável pela produção de esporos nas mais variadas formas, apresentará alterações morfológicas de acordo com o fungo e a fase de reprodução considerada, e essa diversificação morfológica é que permite a identificação e classificação dos fungos.

A produção de pigmentos tem sido estudada por fungos do filo *Ascomycotina*, que apresentam reprodução sexuada (teleomórfica) e assexuada (anamórfica), sendo observado

nos indivíduos que compõem este filo um micélio septado. A meiose, algumas vezes seguida por divisão mitótica, ocorre na formação sexuada de ascósporos dentro de um asco, na classe Ascomycetos. Alguns ascomycetos exibem ascósporos livres e outros produzem ascos dentro de um órgão frutificador chamado de ascocarpo. Se o ascocarpo estiver inteiramente fechado, sem nenhuma abertura, recebe a designação de cleistotécio. Neste caso, os ascos são liberados quando o cleistotécio maduro se rompe. (SIDRIM e MOREIRA, 1999; KIM, J.H.KIM e HYUCK, 2002).

### **IV.3 - GÊNERO MONASCUS**

O gênero *Monascus* é dividido em 7 espécies denominadas *M. ruber*; *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. floridans*, *M. pallens* e *M. sanguineus* (BLANC, 1998) e recentemente *M. mucoroides* (CARDENAS, ALVAREZ, ALVAREZ et al., 2001). Porém, as espécies de maior significância para a indústria alimentícia são: *M. ruber*, *M. purpureus* e *M. pilosus* (MARTINKOVA, PATAKOVA-JUZLOVA, KRENT et al., 1999).

Recentemente, pesquisadores estudando fungos termoresistentes, descobriram que o fungo *Monascus ruber* também faz parte deste grupo, tendo sido isolado após processamento térmico de conservas de azeitonas verdes (PANAGOU, SKANDAMIS e NYCHAS, 2003).

*Monascus* é um fungo filamentosos produtor de pigmentos vermelhos, também chamados *Monascus* (ou *Anka*), usado para colorir carnes, peixes, "ketchup", chocolates, sorvetes, vinagre, pickles, sopas e cremes, queijos. Estes pigmentos são usados principalmente no sul da China, Taiwan, Japão e Indonésia. São tradicionalmente cultivados em meio sólido, grão de arroz ou pão. Porém, o controle de alguns parâmetros de cultura tais como transferência de oxigênio, concentração celular e umidade, é difícil neste tipo de cultivo. Já em cultivo submerso em meio complexo ou sintético, os estudos começaram a ser desenvolvidos recentemente (BLANC, 1999; FENICE, FEDERICI, SELBMANN et al., 2000b; TENG e FELDHEIM, 2001; CALVO e SALVADOR, 2002; KIM, J.H.KIM e HYUCK, 2002; JUNG, KIM, KIM et al., 2003; OROZCO, PEREIRA e KILIKIAN, 2003; PANAGOU, SKANDAMIS e NYCHAS, 2003).

#### **IV.4 – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO *MONASCUS RUBER***

Micromorfológicamente estes fungos apresentam numerosos ascocarpos circulares com cadeias de conídeos (Figura IV.10) também presentes, isolados ou ligados às hifas (aleuriósporos); ascósporos ovais, lisos, medindo entre 5,5 – 6  $\mu\text{m}$  X 3,4 – 4  $\mu\text{m}$  e conídeos medindo entre 9 – 10,5  $\mu\text{m}$  X 7 – 9  $\mu\text{m}$  (Figura IV.11) formados por hifas indiferenciadas. Os conídeos, observados na Figura IV.11, podem variar de tamanho, chegando a dimensões bem menores, denominados então (microconídeos) (MACARIO, PALO e MACEDA, 1960).

Colônias de *Monascus ruber* (Figura IV.12) apresentam um crescimento relativamente rápido (5 dias) em meio BDA (Batata Dextrose Ágar) à temperatura ambiente. São saprófitas do solo, suas colônias apresentam topografias levemente rugosas, circulares, flocosas, de coloração púrpura, reverso também púrpura opaca.

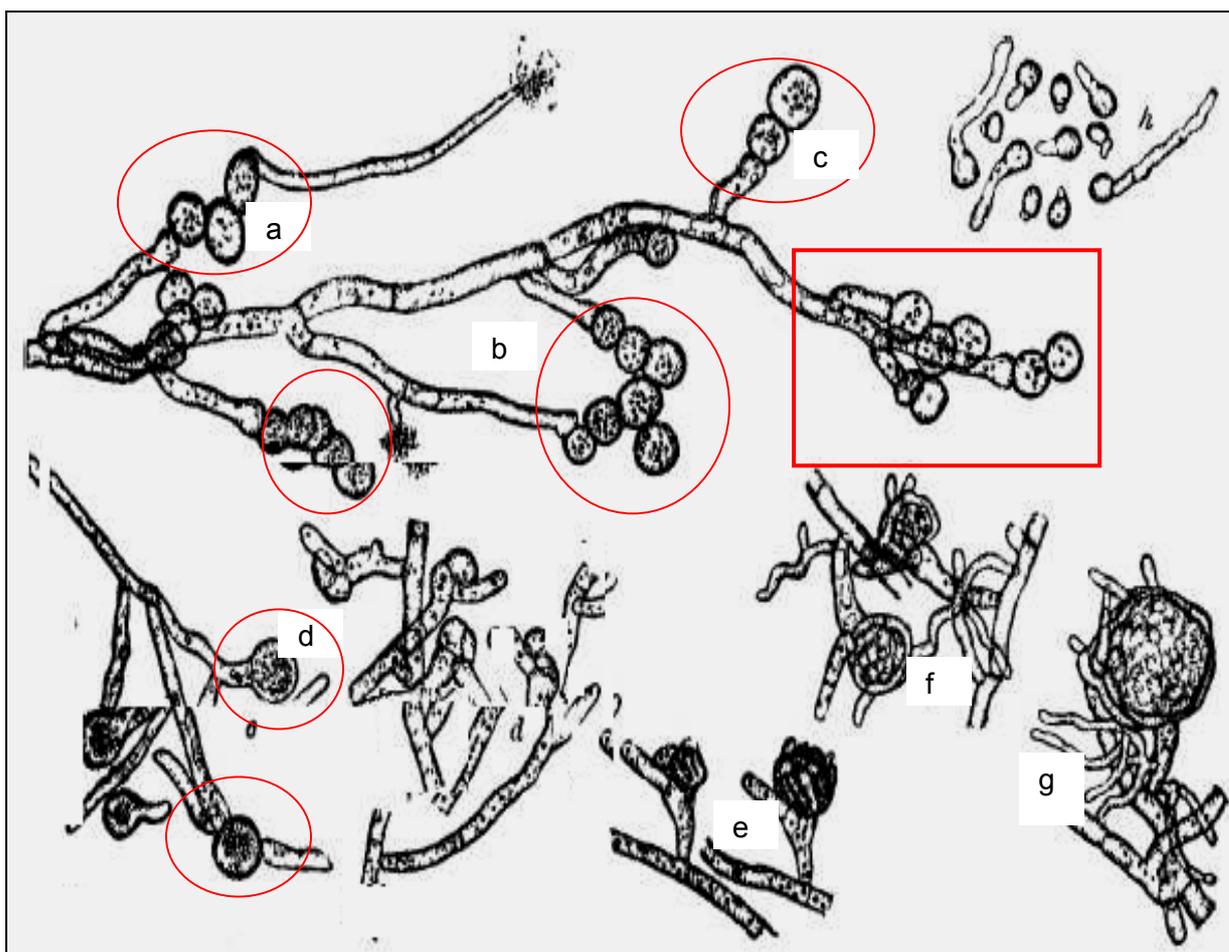
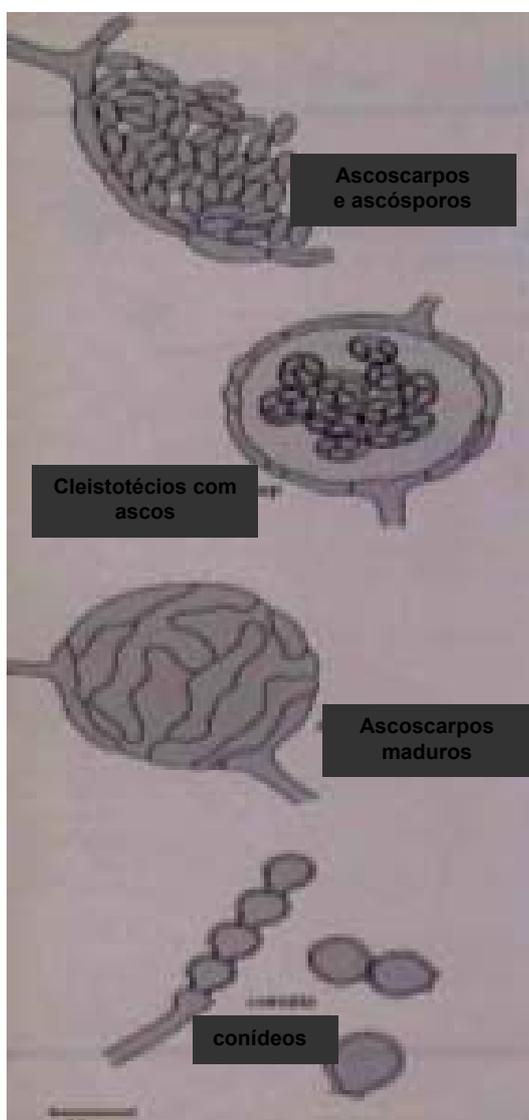


Figura IV.10 - Formas de reprodução do gênero *Monascus* ilustrando a formação de cadeia de conídeos após 2 dias crescendo em BDA (a); germinação dos conídeos após 6 horas de plantio em ágar Sabouraud (b-c); cleistotécio após 48 de cultivo em ágar Sabouraud (d - e); cleistotécio jovem (f - g) Fonte: MACARIO et al, (1960).

O fungo *Monascus* cresce muito bem em ágar Sabouraud, ágar Czapek's, ágar extrato de malte, ágar batata dextrosado (BDA); além de arroz e outros grãos (milho, soja), dependendo do teor de umidade nestes últimos substratos (MACARIO, PALO e MACEDA, 1960). Porém, é inibido pela adição de cicloheximida (antibiótico inibidor do crescimento de fungos contaminantes) ao meio de cultivo. A tonalidade do pigmento varia de acordo com o meio utilizado, bem como a variedade do arroz ou outros cereais.

Este gênero pode crescer a diferentes temperaturas que podem variar entre 20 e 82°C. Porém para a produção de pigmentos, a temperatura ideal varia entre 27°C – 30°C (MACARIO, PALO e MACEDA, 1960).



## ***Monascus ruber***

### **Aparência da Colônia**

A 30 °C em ágar peptona-dextrose:

Diâmetro: 40 mm em 7 dias.

Topografia: Lisa, espalhada.

Textura: Flóculos finos.

Cor: Vermelho púrpura.

Reverso: Vermelho púrpura intenso.

### **Aparência Microscópica 30°C**

Estruturas Predominantes: numerosos ascocarpos arredondados, cadeia de conídios também presentes.

Corpos de Frutificação: arredondados, ascocarpos de paredes finas, ascocarpos maduros são empacotados com ascósporos frouxos. Os ascos podem ser vistos claramente, até nos ascocarpos jovens.

Esporos: ascósporos ovais, 5,5 – 6 µm, lisos, incolores, cadeias redondas, conídios incolores, 9-10,5 µm X 7-9 µm, com base achatada. São também formadas hifas indiferenciadas.

Figura IV.11 - Características morfológicas do fungo *Monascus ruber*. Fonte: (ALLOK, 1998).

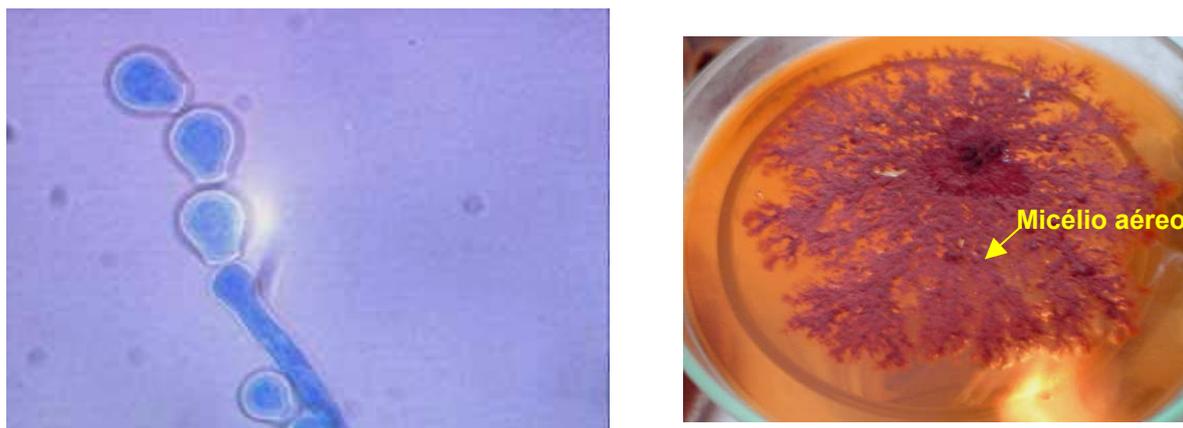


Figura IV.12 - Micromorfologia (hifas e conídios) (aumento de 400X) (Fonte: ALLOK, 1998) e Macromorfologia do *Monascus ruber*.

A existência de diferentes morfologias (PAMBOUKIAN, FACCIOTTI e SCHMIDELL-NETO, 1998; WONGWICHARN, MCNEIL e HARVEY, ; MA, LI, YE et al., 2000) em fungos filamentosos, classificadas como hifas (filamentos dispersos), *clumps* (pequenos aglomerados) e *pellets* (aglomerados maiores e mais densos – grumos) (KILIKIAN, 2002), e a possibilidade de formas distintas de crescimento, principalmente relacionados com as características de reprodução (assexuada – conídeos e sexuada – cleistotécio) induzirem a formação de diferentes compostos de interesse industrial, torna assim, importante a análise morfológica e sua classificação. Por exemplo, no estudo do fungo *Monascus purpureus* para produção de pigmentos vermelhos, alguns autores verificaram que ele produz também uma substância anticolesterolêmica da família das vastatinas (MA, LI, YE et al., 2000), quando cresce na forma de *pellet*, devido à diferença de concentração de nutrientes e transferência de oxigênio em seu interior.

Este estudo teve como objetivo relacionar a produção de pigmentos vermelhos pelo fungo *Monascus ruber* CCT 3802 com as suas características morfológicas de fases de reprodução, sexuada e assexuada em diferentes substratos (glicose, farelo de arroz, amido de arroz e milhocina).

## **IV.5 – METODOLOGIA ESPECÍFICA**

### **Microcultivo**

Neste estudo inicial, com o objetivo de conhecer as variações morfológicas em meio sólido, o fungo *Monascus ruber* CCT 3802 foi cultivado em diferentes meios: meio de glicose (20 g/L), meio contendo farelo de arroz (3 g/L), meio contendo amido de arroz (3 g/L), meio contendo milhocina e glicose (20 g/L) (suplementados com sais e glutamato monossódico). Para tanto, foi utilizada a técnica de microcultivo, conforme ilustra a Figura IV.13. Este

método consiste em favorecer a verificação das estruturas dos fungos filamentosos em meio sólido (cuja técnica é descrita a seguir) (LACAZ, PORTO, J.E.C.MARTINS et al., 2002):

Foram montadas lâminas com lamínulas sobre um suporte de vidro, sendo que este material foi previamente autoclavado; um cubo de ágar (amido de arroz 3g/L, farelo de arroz 3 g/L, glicose 20 g/L e milhocina + glicose – preparada conforme o capítulo III.4 diferindo apenas pela adição de ágar no meio sólido) foi cortado e transferido para cada lâmina. Com o auxílio de alça em L, foram retirados fragmentos da colônia a ser estudada e inoculada em cada lado do cubo de ágar. As lamínulas recobriram os cubos de ágar previamente inoculados.

As lâminas prontas foram examinadas ao microscópio acoplado a uma câmera de vídeo e as análises morfológicas foram realizadas na tela do monitor acoplado ao computador.

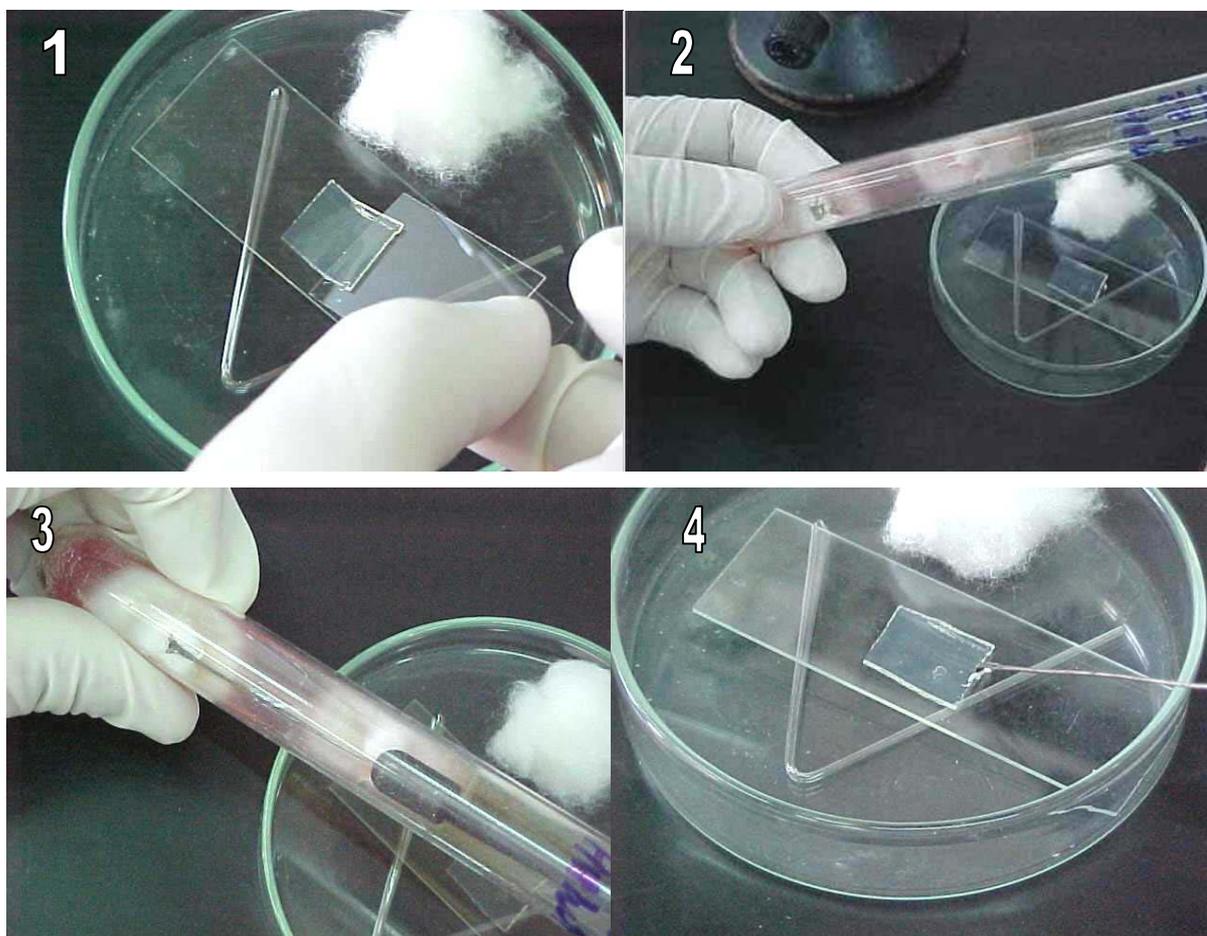


Figura IV.13 - Montagem de placa autoclavada para a realização de microcultivo, contendo bastão de vidro como suporte, lâmina, lamínula e algodão. Retirada de fragmento de colônia do tubo. Inoculação do fragmento de colônia na parte central das quatro laterais da porção de ágar batata. Fonte: (DATAFUNGI, 2002).

As placas foram incubadas em estufa à temperatura de 30°C por quatro dias. Após este período, retiraram-se as lamínulas que cobriam as placas de ágar e colocou-se sobre

as lâminas secas e desengorduradas contendo uma gota de corante (lactofenol azul algodão) cada uma delas.

As lâminas foram fixadas com Entelan® (MERCK) e observadas em microscopia ótica com aumento de 400X ou 100X (Microscópio acoplado com câmera de vídeo) . Estas lâminas fixadas foram conservadas por seis meses ou mais.

### **Estudo micromorfológico em cultivo submerso**

A fim de caracterizar a relação morfológica do fungo e a produção de pigmentos vermelhos em meio líquido, tomaram-se amostras em incubador rotativo (inóculo e culturas), sob as mesmas condições de agitação, temperatura e pH, variando-se apenas o tipo de substrato utilizado, glicose, farelo de arroz, milhocina e amido de arroz.

Os parâmetros morfológicos foram baseados nos estudos taxonômicos de (MACARIO, PALO e MACEDA, 1960; LACAZ, PORTO, J.E.C.MARTINS et al., 2002).

## **IV.6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Como parâmetros morfológicos de análise, foi relacionada, a presença de estruturas de reprodução assexuada (conídios) e sexuada (cleistotécios) com a pigmentação do meio (considerada avermelhada a partir do quarto dia de incubação, conforme demonstra a Figura IV.14.

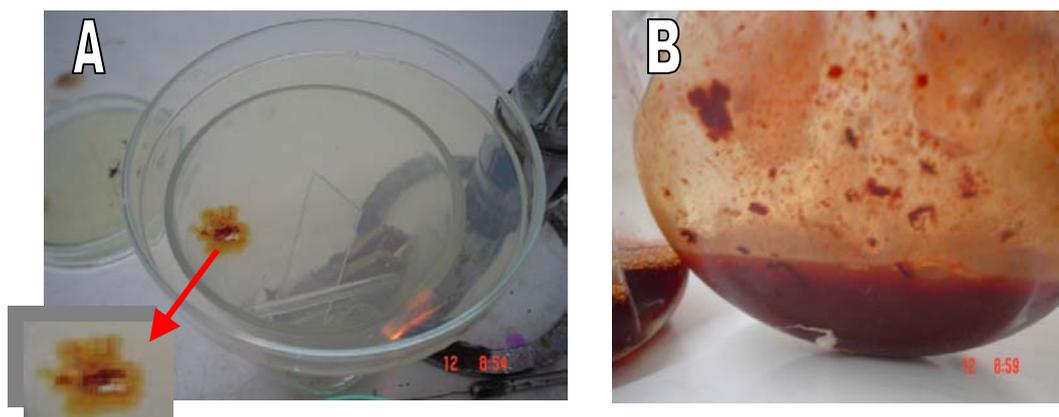


Figura IV.14– (A) Meio de cultivo sólido e (B) cultivo em meio líquido após cinco dias de incubação. O primeiro em estufa 30°C e o segundo em incubador rotativo à temperatura de 30°C e 150 rpm.

As observações das estruturas (Aumento de: A=400X e B=100X) ocorreram após 48 horas de cultivo nas duas condições testadas (Figura IV.15).

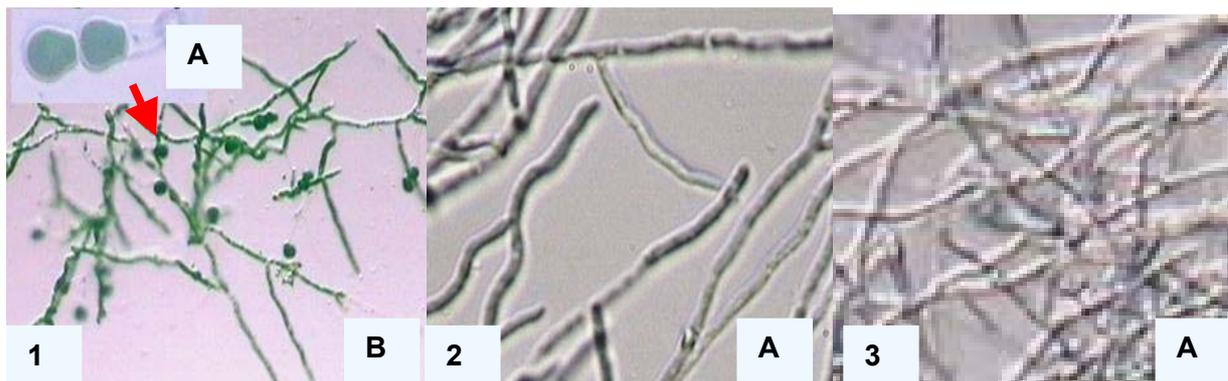


Figura IV. 15 – Presença de hifas e conídios após 48 horas de crescimento em cultivo sólido em todas as fontes de carbono estudadas (glicose (1), farelo de arroz (2), e amido de arroz (3)).

Observa-se na Figura IV.15, apenas a presença de estruturas de reprodução assexuada, ou seja, conídios e hifas.

Os ensaios contendo glicose e milhocina não apresentaram produção pelo fungo de pigmentos vermelhos. Tendo em vista a incapacidade de produção destes pigmentos nestes substratos, estes foram rejeitados para os estudos posteriores.

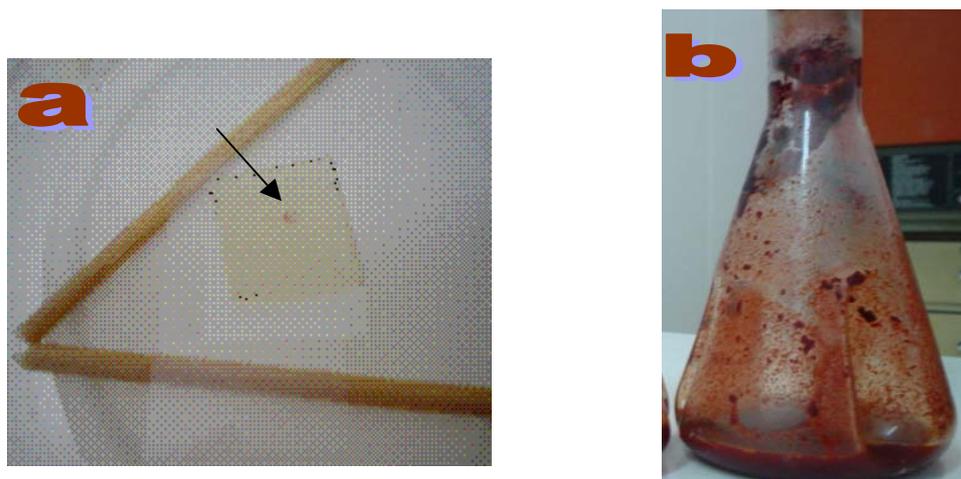


Figura IV.16 – Apresentação da cultura sólida e do cultivo submerso após 96 horas de cultivo em meio contendo (a) glicose (meio sólido) e (b) amido de arroz 3 g/L e sais (cultivo submerso) respectivamente.

Após 96 horas de cultivo, o meio sólido estava levemente avermelhado (Figura IV.16a) e o meio líquido contendo amido de arroz como substrato, apresentava uma cor vermelha *bordeau* intensa, conforme demonstra a Figura IV.16b.

Nesta etapa, foram evidenciadas inúmeras estruturas de reprodução sexuada (clestotécio) conforme ilustram as Figuras IV.17 e IV.18.

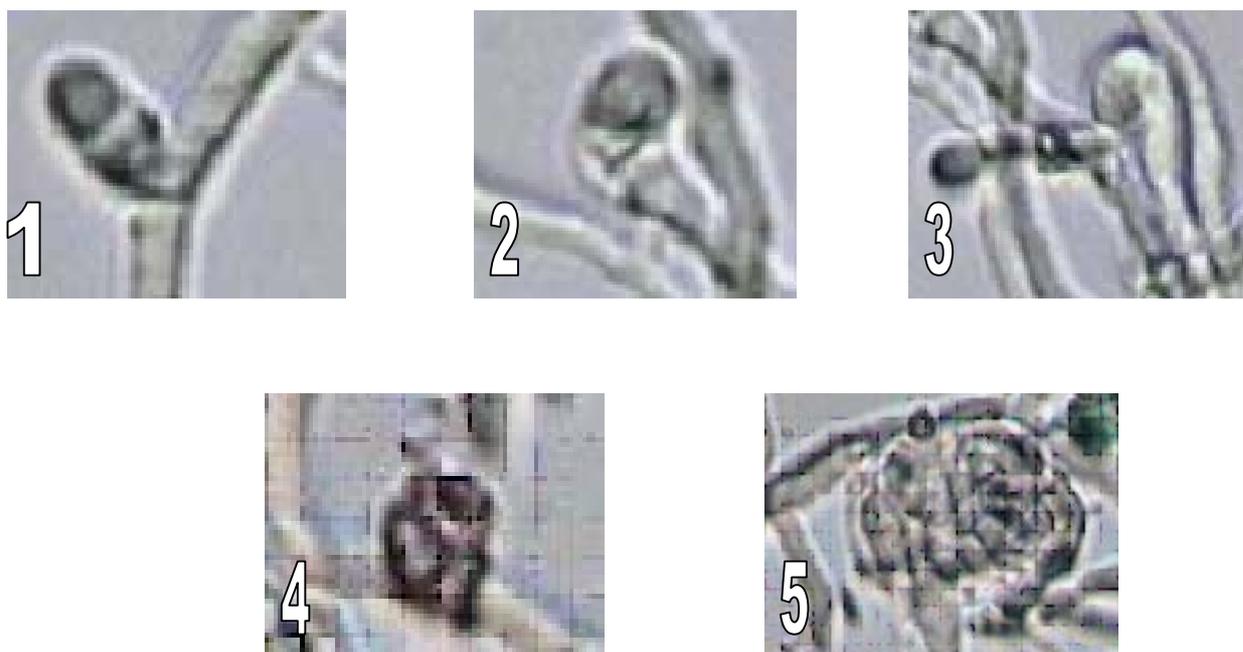
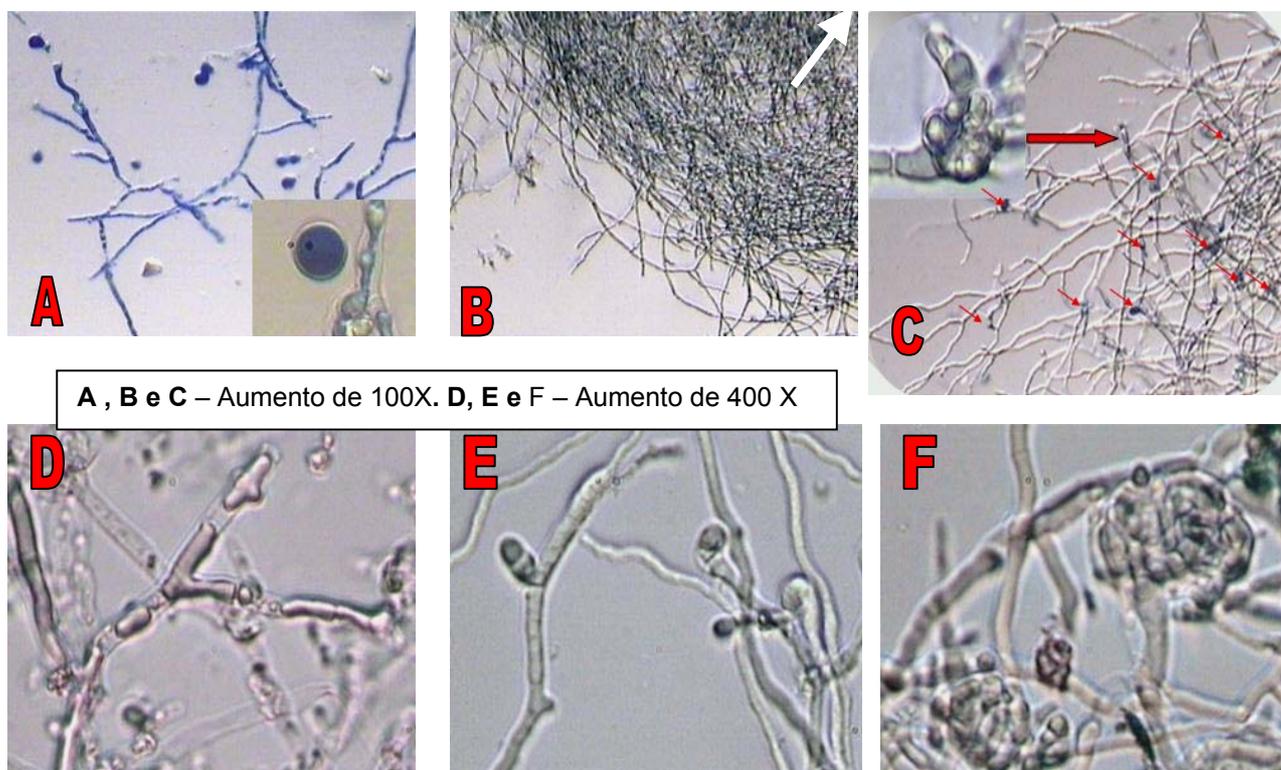


Figura IV.17 – Etapas da reprodução sexuada do *Monascus ruber* CCT 3802. 1 – conídeos. 2 – hifa e formação do ascogônio; 3 septação do ascogônio; – 4 e 5 – cleistotécio.



A , B e C – Aumento de 100X. D, E e F – Aumento de 400 X

Figura IV.18 – Estudo morfológico comparativo dos ensaios com pouca ou nenhuma produção de pigmentos (A e D – glicose + milhocina em cultivo sólido e submerso respectivamente), B e E considerados produção intermediária de pigmentos vermelho ( $UDO_{480}$  entre 0,8 e 1,5  $UDO_{480}$ ) em meio sólido e cultivo submerso respectivamente e finalmente C e F, elevada produção de pigmentos vermelhos após 96 horas de cultivo ( $UDO_{480} > 1,5 UDO_{480}$ ).

Quase todos os fungos, quando cultivados em condições favoráveis e abundância de carboidratos de fácil assimilação, crescem rapidamente formando abundante micélio, e quando as condições tendem a deter o crescimento por falta de nutrientes eles formam corpos de frutificação, ou estruturas de reprodução (SILVEIRA, 1996). A formação de estruturas de reprodução e sustentação são influenciadas por outros nutrientes tais como: zinco, manganês e ferro, por exemplo. Assim sendo, acredita-se por este estudo, que é possível determinar as condições ótimas de crescimento e produção de pigmentos pelo fungo *Monascus*, monitorando as estruturas de frutificação e de conidiação. Ou seja, em condições de limitação, observam-se cleistotécios, em condições de abundância de alimentos, conídios.

Em outras palavras, pode-se afirmar também que, a formação de pigmentos vermelhos ocorre na fase de limitação, e que o número de cleistotécios presentes indica a fase de início da formação de pigmentos vermelhos.

É importante salientar que, neste estudo ficou evidenciada a importância do acompanhamento da morfologia fúngica num processo de cultivo. Uma vez que a produção de pigmento *Monascus* está relacionada com a formação de estruturas de reprodução sexuada (formação de cleistotécios), o acompanhamento microscópico destas estruturas aliadas ao controle de outros fatores importantes de cultivo (concentração de substrato, pH, aeração e frequência de agitação, por exemplo) poderia ser utilizado como uma ferramenta de controle, inclusive reduzindo custos nas etapas do processo.

## **IV.7 – AUXANOGRAMA**

### **IV.7.1 - Metodologia específica**

Algumas espécies do grupo dos fungos filamentosos apresentam características especiais, no que diz respeito às suas necessidades nutricionais. O estudo sistematizado das necessidades nutricionais que algumas espécies demonstram é conhecido como provas nutricionais, ou teste de assimilação de carboidratos (auxanogramas). Esta técnica baseia-se na capacidade dos fungos em utilizar determinado carboidrato como única fonte de carbono, para sua viabilidade celular. Desta forma, utilizou-se, nessa técnica, um meio basal destituído de qualquer fonte de carbono, onde foi semeado o fungo em estudo. Após a semeadura, adiciona-se ao cultivo um carboidrato, como é descrito a seguir.

1. Foi preparado um inóculo suspendendo uma única colônia isolada em aproximadamente 5 ml de água estéril. Agitou-se no misturador tipo vortex. Ajustou-se a suspensão com água estéril para aproximar a turbidez de um padrão de 0,5 da escala *McFarland*.

2. Um cotonete estéril de algodão foi umedecido na suspensão ajustada do inóculo. Listou-se a superfície de uma placa de ágar isenta de carboidratos em 4 sentidos diferentes (em ângulos de 90 graus) para cobrir a superfície inteira.

3. Usando pinças estéreis aplicaram-se os discos que contêm os carboidratos a serem testados na superfície da placa de ágar inoculada.

4. Incubou-se a placa a 30<sup>o</sup>C por 48 horas. As placas foram avaliadas após incubação e os resultados registrados.

Esta técnica foi comparada à outra técnica de identificação de fungos, *Kit* com bateria de provas e meios diferenciais, cujo princípio básico está fundamentado na capacidade de assimilação de carboidratos, por parte de diversas espécies de fungos. Os resultados foram traduzidos por reação colorimétrica, pela viragem do indicador de pH de azul para amarelo.

Esta metodologia só foi possível devido às características de reprodução do *Monascus ruber*, pois, este fungo forma numerosos microconídeos quando semeado em meio basal, fazendo com que se tenha uma boa homogeneização destas estruturas quando dissolvidas em água destilada estéril.

### **IV.7.2 – Resultados e Discussão**

A Figura IV.19 e a Tabela IV.7 apresentam os resultados obtidos para o crescimento do fungo em diferentes fontes de carbono. Nota-se que o crescimento foi observado em glicose, maltose, sacarose, galactose, rafinose, celobiose, trealose, adonitol, melobiose, xilose e arabinose.

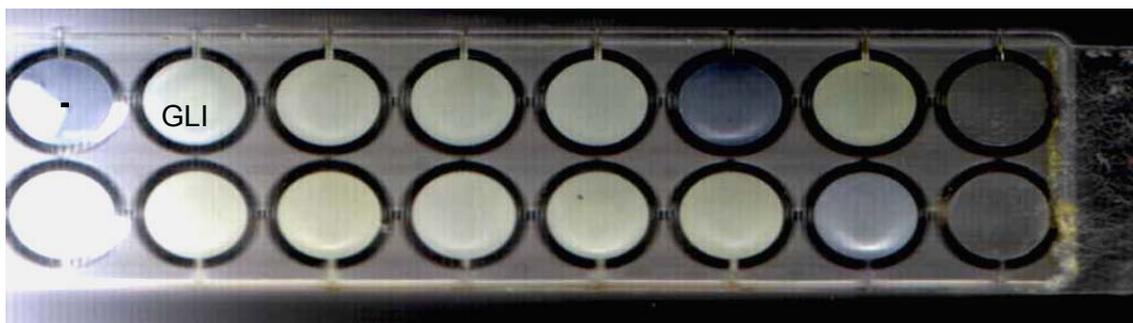


Figura IV.19 - Teste colorimétrico de carboidratos – auxanograma (Auxacolor® - SANOFI) formado por quatorze açúcares : glicose (controle positivo – segundo pocinho superior), maltose, sacarose, galactose, lactose, rafinose, inositol na primeira fila superior e celobiose, trealose, adonitol, melobiose, xilose, arabinose e actidiona. O primeiro pocinho corresponde ao controle negativo e o último, teste de feniloxidase. A cor azul indica que o fungo não assimilou o referido açúcar - teste negativo (-) enquanto que a cor amarela indica assimilação - teste positivo (+).

Neste estudo, ficou claro que o fungo *Monascus* possui uma enorme capacidade de adaptação e assimilação das mais diversas fontes de carbono. Porém, não são todos os substratos que favorecem a produção do metabólito desejável, ou seja, a prova auxanográfica por si só, não avalia as condições fermentativas de um fungo (zimograma). No entanto, sabe-se que, para que um microrganismo fermente determinada fonte de carbono, é necessário primeiro que esta seja assimilada.

Como dos seis pigmentos produzidos pelo fungo *Monascus ruber*, apenas o pigmento vermelho é de interesse, testou-se a formação deste pigmento nos substratos onde o crescimento foi observado. Para tanto, foram realizados ensaios em frascos agitados (Fracos de Erlenmeyer de 500 mL aletados com volume útil de 100 mL) contendo sais, (em gramas por litro de água destilada:  $K_2HPO_4$ , 5;  $KH_2PO_4$ , 5;  $CaCl_2$ , 0,1;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,5;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,01;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,01 e  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0,03), carboidratos (5g/L) (glicose, maltose, sacarose, galactose, rafinose, celobiose, trealose, adonitol, melobiose, xilose, arabinose e amido de arroz) e glutamato monossódico (5 g/L).

Assim sendo, mesmo que o fungo assimile uma grande variedade de fontes de carbono (Auxacolor® - SANOFI), como demonstra a Tabela IV.7, a formação de pigmentos vermelhos não ocorre com todos os tipos de substratos (Tabela IV.8). Os testes de produção de corante utilizando os substratos, onde foi observado crescimento, mostram que

o pigmento vermelho foi produzido, em quantidades expressivas ( $UDO_{480} > 0,7$ ), apenas nos meios contendo glicose, maltose e frutose.

Tabela IV.7 - Teste colorimétrico de assimilação de substratos (auxanograma) pelo *Monascus ruber* utilizando o Kit Auxacolor® - (SANOFI).

Glicose	Maltose	Sacarose	Galactose
+	+	+	+
Lactose	Rafinose	Inositol	Celobiose
-	+	-	+
Trealose	Adonitol	Melobiose	Xylose
+	+	+	+
Arabinose	Actidiona	Fenoloxidades	
+	-	-	

Tabela IV.8 – Teste de produção de pigmentos vermelhos em meio de cultivo submersos (frascos agitados).

Glicose	Maltose	Sacarose	Galactose
1,8 $UDO_{480}$	1,92 $UDO_{480}$	0,18 $UDO_{480}$	0,21 $UDO_{480}$
Lactose	Rafinose	Inositol	Celobiose
-	0,16 $UDO_{480}$	-	0,68 $UDO_{480}$
Trealose	Adonitol	Melobiose	Xylose
0,24 $UDO_{480}$	0	0,24 $UDO_{480}$	0,23 $UDO_{480}$
Arabinose	Actidiona	Fenoloxidades	Frutose
0,38 $UDO_{480}$	-	-	0,74 $UDO_{480}$

Segundo JUZLOVA et al.(1996), espécies de *Monascus ruber* produzem pigmento Monascus nos seguintes substratos: glicose, celobiose, maltose e frutose, mas não produzem este pigmento com a sacarose. Estes dados foram comprovados neste estudo, conforme demonstram os resultados apresentados na Tabela IV.7.

Fundamentado neste estudo, foram escolhidas as seguintes fontes de carbono para novos ensaios em frascos agitados, glicose, maltose e frutose. Para tanto, o *Monascus ruber* foi cultivado (segundo o meio de PASTRANA et. al. (1995) - item III.4) em diferentes concentrações (5, 10, 20 e 30 g/L): Para este estudo foi considerada apenas a concentração final de pigmentos vermelhos após cinco dias de incubação em frascos agitados à temperatura de 30°C em agitação orbital (160  $\text{min}^{-1}$ ) conforme mostra a Tabela IV.9.

Tabela IV.9 - Teste de produção de pigmentos vermelhos em meio de cultivo submersos (frascos agitados) para as seguintes fontes de carbono: glicose, maltose e frutose.

Concentração	Glicose	Maltose	Frutose
5 g/L	1,88 $UDO_{480}$	1,98 $UDO_{480}$	0,68 $UDO_{480}$
10 g/L	2,01 $UDO_{480}$	2,47 $UDO_{480}$	0,74 $UDO_{480}$
20 g/L	2,56 $UDO_{480}$	2,72 $UDO_{480}$	0,81 $UDO_{480}$
30 g/L	2,16 $UDO_{480}$	3,21 $UDO_{480}$	0,86 $UDO_{480}$

Os ensaios preliminares, aqui apresentados, definiram que os substratos mais promissores para a produção de pigmentos vermelhos são: glicose e maltose nas seguintes

concentrações: 20 g/L e 30 g/L respectivamente. Estudos mais aprofundados foram realizados no capítulo V.

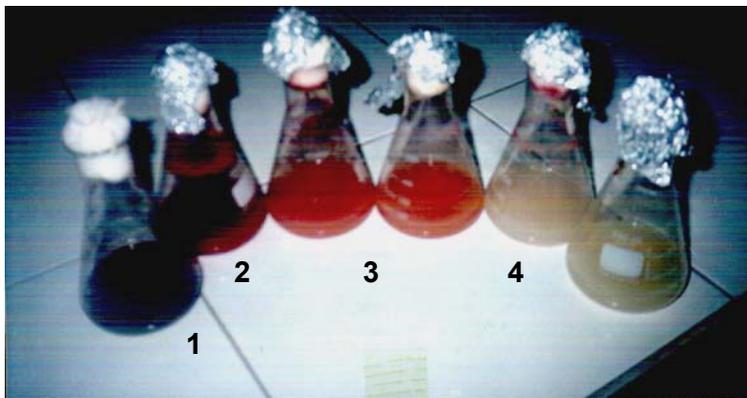


Figura IV.20 - Estudos auxanográficos em frascos agitados obtidos com os seguintes substratos: maltose e glicose (1 e 2)(vermelho-púrpura), frutose (3)(vermelho claro) e Glicose + Milhocina (4) (sem produção de pigmento) respectivamente.

A Figura IV.20 apresenta os resultados obtidos com o estudo auxanográfico, demonstrando as diferentes tonalidades da cor vermelha, que variaram dependendo do tipo de substrato utilizado.

## **IV.8 – CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Este estudo físico-morfológico do fungo *Monascus ruber* fundamentou etapas importantes do bioprocesso, principalmente por auxiliar na escolha do substrato utilizado e avaliar seu comportamento reprodutivo em situações de limitação de nutrientes. O acompanhamento das características morfológicas durante o cultivo com este fungo pode servir de ferramenta valiosa, por ser indicativo da etapa de produção de pigmento *Monascus*.

"Noventa por cento do sucesso se baseia em insistir"  
Wood Allen

## **CAPÍTULO V – PRODUÇÃO DE BIOPIGMENTOS EM FRASCOS AGITADOS**

---

Neste capítulo são apresentados os estudos em frascos agitados necessários ao entendimento do processo de formação de pigmento *Monascus*, tais como: tipos de substratos utilizáveis e a influência da fonte de nitrogênio na produção destes pigmentos vermelhos. Descrevem-se ainda a importância das fontes de carbono utilizadas para produção de pigmentos vermelhos e o mecanismo de utilização destes, pelo fungo em questão (vias metabólicas). As principais fontes de carbono apresentadas neste estudo, para produção de pigmentos vermelhos pelo fungo em estudo, são: a glicose, a maltose, o amido de arroz e farelo de arroz. Os resultados aqui apresentados serviram como base para os estudos realizados em biorreator.

## **V.1. - FORMAS DE PRODUÇÃO DO PIGMENTO MONASCUS - VIA METABÓLICA**

Os fungos filamentosos são bons candidatos à produção de proteínas heterólogas, ácidos orgânicos entre outros. Entretanto, pouco conhecimento da atividade metabólica, condições de cultivo e metabólitos intermediários destes organismos impede a utilização de uma estratégia bioquímica para aumentar o seu desempenho.

O crescimento do *M. ruber* em meio sintético contendo glicose e glutamato está associado à co-produção de L-malato e succinato. Porém, estes últimos, inibem fracamente a produção de pigmentos vermelhos quando adicionados ao meio de cultivo. No entanto, não modificam a produção de citrinina (HAJJAJ, BLANC, GROUSSAC et al., 2000a).

A escolha dos nutrientes adequados à geração do produto de interesse está relacionada à atividade metabólica desenvolvida pelos microrganismos. Neste ponto, destaca-se a importância das informações obtidas sobre as exigências nutricionais dos organismos envolvidos no processo. Assim, é preciso suplementar o meio de cultivo ou controlar os componentes que possam inibir o seu desenvolvimento, de modo a permitir uma rápida e eficiente conversão da fonte de carbono em produto com rendimento desejável (BON e PEREIRA, 2002).

Encontrar a melhor composição do meio de cultivo em laboratório, onde as dimensões dos biorreatores são pequenas, é mais fácil do que em escala industrial (Figura IV.21). No entanto, para compor o meio industrial da fermentação, alguns nutrientes devem ser selecionados de acordo com as características nutricionais e econômicas. Não podem ser esquecidas as particularidades inerentes ao microrganismo, agente do processo, quanto ao aproveitamento em suas reações metabólicas e quanto aos eventuais inibidores destas reações ou do produto final. Ressalta-se que este procedimento envolve um grande número de experimentos e demanda um tempo muito grande para se chegar à composição otimizada do meio, sendo os constituintes muitas vezes investigados um a um e, via de regra, negligenciados os efeitos interativos entre os mesmos.

A produção de pigmentos por *Monascus*, tem sido estudada tanto em cultivo submerso quanto em meio sólido.



Figura V.21 – Fermentadores industriais utilizados na produção de pigmentos vermelho (fermentação sólida) a partir do arroz. Fonte: (ALLOK, 2001).

A produção industrial de pigmentos vermelhos em cultivo sólido não possibilita uma interpretação da regulação metabólica para a síntese do corante. O uso de um meio sintético, em cultivo submerso, pode permitir o estudo metabólico do sistema, produzindo pigmentos complexos de fácil identificação química (estruturalmente). Relatos bibliográficos utilizando o gênero *Monascus* em cultivo submerso, limitaram-se às duas espécies: *M. anka* e *M. purpureus*. Porém, estudos cinéticos envolvendo *Monascus ruber*, potencial produtor de pigmentos vermelhos, começaram a ser realizados há uma década (PASTRANA, BLANC, SANTERRE et al., 1995).

Os bioprocessos em meio sólido (FES) podem ser definidos como o crescimento microbiano e formação de produtos em partículas sólidas, em carência de água livre. Este processo possui algumas vantagens em relação ao cultivo submerso como a elevada produção (produto por volume de meio fermentado), baixos custos de operação e de investimento, além da simplificação dos processos de recuperação do produto de interesse. Dentre as desvantagens da FES podem ser destacadas a dificuldade de se obter sensores para medir variáveis como atividade de água, crescimento celular, a capacidade limitada para dissipar calor e outras dificuldades como transferência de oxigênio e nutrientes, reduzindo as taxas de crescimento (MIYASHIRA, RODRIGUES e KILIKIAN, 2003).

O cultivo tradicional de fungos do gênero *Monascus* para produção de pigmentos é feito em suporte de arroz (Figura V.22), obtendo assim altas concentrações destes metabólitos secundários. Uma das condições para o sucesso do cultivo é a utilização de baixa umidade inicial no substrato (em torno de 25%), reduzindo o risco de contaminação e de aglomeração do substrato (JUZLOVA, MARTINKOVA e KREN, 1996).

A recuperação dos pigmentos formados pela fermentação do arroz por espécies de *Monascus* é realizada pela retirada da parte sólida do substrato, secagem, trituração e extração com etanol 70% a 60° C por 2 horas, seguindo-se uma filtração a vácuo para retirada dos resíduos sólidos (MIYASHIRA, RODRIGUES e KILIKIAN, 2003).

Por meio do trabalho de purificação e identificação dos metabólitos secundários produzidos por *Monascus*, realizados por BLANC et al. (1995), foi isolado um composto denominado monascidina A. Este é um antibiótico poderoso, que atua como composto nefrotóxico em animais, também é conhecido como citrinina (MIYASHIRA, RODRIGUES e KILIKIAN, 2003).



Figura V.22 - Pigmentos vermelhos produzidos milenarmente no oriente pelo cultivo do fungo *Monascus* em meio sólido a base de arroz. Fonte:(ALLOK, 2001).

## **V.2 – AVALIAÇÃO DOS CARBOIDRATOS DA AGRO-INDÚSTRIA PARA PRODUÇÃO DE BIOPIGMENTOS**

A avaliação econômica do processo de produção de pigmentos vermelhos indica que o custo do substrato tem uma contribuição importante no custo global de produção, podendo representar uma economia de mais de 30% no preço final do corante natural (MASCARENHAS, J. M. O., STRINGHETA, P.C., 1998). O alto custo na produção de corantes naturais pode ser minimizado usando resíduos orgânicos de baixo custo provenientes da agro-indústria principalmente os grãos comestíveis das gramíneas de cultivo como aveia, cevada, centeio, milho, trigo e especialmente arroz, importante produto agrícola da Região Sul do Brasil.

A comparação das composições químicas dos grãos de arroz, milho, trigo e aveia, mostra que arroz possui a mais baixa percentagem de proteína e a mais alta percentagem de carboidratos solúveis.

O arroz é uma gramínea anual classificada no grupo de plantas C3 (Planta C3 responde de forma mais positiva ao aumento do CO<sub>2</sub> do que outra, por exemplo, o milho, que é uma planta C4.) adaptada ao ambiente aquático. Esta adaptação é devida à presença de um tecido (aerênquima) no colmo da planta, que possibilita a passagem de oxigênio do ar para a camada da rizosfera. Para expressão de seu potencial produtivo, a cultura requer temperatura entre 24 e 30°C e radiação solar elevada, uma vez que a disponibilidade hídrica não é um fator limitante, devido ao fato da cultura ser cultivada em condições de solo inundado nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

Botanicamente, o grão de arroz é um fruto, denominado cariopse, em que o pericarpo está fundido com o tegumento da semente propriamente dita. Este está envolvido pela casca (lema e pálea) (SINDARROZ-SC, 2004).

No Brasil, a classificação do Ministério da Agricultura divide em dois grupos gerais: arroz em casca e arroz beneficiado. O beneficiado apresenta os seguintes subgrupos:

- Polido (arroz branco comum);
- Integral (macrobiótico ou esbramado);
- Parboilizado integral;
- Parboilizado.

O parboilizado integral é o produto que recebe o tratamento hidrotérmico. Entretanto, somente sofre descascamento, não sendo retirada a película que dá origem ao farelo, portanto, enriquecido com vitaminas (principalmente do complexo B) e sais minerais (Ca, P, Fe, Na e K) (SINDARROZ-SC, 2004).

O farelo de arroz é um subproduto do processamento do grão de arroz. É constituído pelas camadas que envolvem o endosperma amiláceo do grão, e apresenta em sua composição vitaminas, minerais, carboidratos, proteínas, fibras e lipídios, sendo o último um dos principais responsáveis pela instabilidade do farelo. Isso ocorre porque o farelo de arroz, na sua forma natural, apresenta grande quantidade de enzimas lipolíticas, as quais causam a instabilidade do óleo, provocando sua acidificação, o que pode resultar em sabor e odor rançosos ao produto final. O farelo de arroz cru não é indicado para consumo humano devido a essas alterações. A utilização do farelo no preparo de alimentos torna-se mais segura se ele for ministrado na sua forma estabilizada, ou seja, após ter-se extraído seu óleo, e inibido a ação enzimática. O farelo estabilizado e o farelo cru apresentam os mesmos constituintes. Porém, diferem em suas proporções (AZEREDO, 2000).

A escolha do farelo de arroz (amido de arroz) baseou-se em dois fatores principais. O primeiro pela sua estrutura química (maltose – glicose), uma vez que é um homopolissacarídeo neutro formado por duas frações: amilose e amilopectina. A amilose é composta de unidades de glicose com ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas formando assim unidades de maltose e, a amilopectina, por unidades de glicose unidas em  $\alpha$ -1,4 com cadeias de glicose ligadas em  $\alpha$ -1,6 de modo que além de unidades de maltose tem em menor quantidades isomaltose nos pontos de ramificação. O segundo fator foi que, segundo relatos bibliográficos (SABATER-VILAR, MAAS e FINK-GREMMELS, 1999; CARDENAS, ALVAREZ, ALVAREZ et al., 2001) espécies de *Monascus* são produtores de diversas enzimas, entre elas,  $\alpha$  - amilase,  $\beta$ -amilase e glicoamilase (todas utilizadas na hidrólise total do amido à glicose).

Cabe ressaltar que os ensaios apresentados no capítulo III já indicavam para a produção de pigmentos vermelhos, o amido de arroz, a glicose e a maltose como principais fontes de carbono.

Estudos de produção de pigmentos vermelhos foram relatados em diversos resíduos tais como: bagaço de cana de açúcar (CHIU E CHEN, 1992), melaço (MOLINA, KILIKIAN e MIYASHIRA, 2003), suco da casca do abacaxi, água de lavagem da mandioca (manipueira) (BAEDYANONDA, PHOOLPHUNDH e WONGWICHARN, 2000) entre outros já foram relatados, tanto em cultivo submerso quanto em fermentação sólida.

Dados bibliográficos relatando a produção de pigmentos vermelhos em cultivo submerso utilizando farelo de arroz ainda não foram descritos.

## **V.3 – INFLUÊNCIA DAS FONTES DE CARBONO: GLICOSE, MALTOSE, AMIDO DE ARROZ E FARELO DE ARROZ**

### **V.3.1 – Material e Métodos**

Neste estudo, em frascos agitados, foram testadas diferentes fontes de carbono (frutose, glicose, maltose, sacarose, amido de arroz e farelo de arroz parboilizado) e como fontes de nitrogênio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; glutamato monossódico, histidina e glicina), capazes de aumentar a produção de pigmentos vermelhos no meio de cultivo.

Nestes ensaios o pré-inóculo e inóculo foram tratados de forma diferente do apresentado no item III.3.2 (Capítulo III – Material e Métodos). Nestes ensaios, foram utilizados também os frascos de Erlenmeyer aletados de 500 mL com 100 mL de meios de cultivo, também inoculados com 20 mL do pré-inóculo de *Monascus ruber*, porém, a incubação foi feita em *shaker* de agitação recíproca (Marca FANEM) na temperatura de 30°C a uma frequência de 110 rpm.

Cabe ressaltar aqui, que devido à ineficiência e falta de reprodutibilidade dos ensaios realizados no *shaker* de agitação recíproca (Fanem) nos experimentos iniciais (item 5.3.2), os experimentos posteriores foram realizados em *shaker* com agitação orbital (Marca BRAUN).

Os seguintes meios de cultivo foram utilizados nesta etapa:

**Meio segundo Pastrana:**(PASTRANA, BLANC, SANTERRE et al., 1995).

Meio contendo, em gramas por litro de água destilada: glicose, 20; glutamato monossódico (GMS), 5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5;  $\text{CaCl}_2$ , 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 e  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,03.

Como substratos, foram testados também maltose (30 g/L), amido de arroz (3 g/L) e farelo de arroz (3 g/L).

**Meio segundo Kim** (KIM, J.H.KIM e HYUCK, 2002)

Meio contendo, em gramas por litro de água destilada: glicose, 30; glutamato monossódico (GMS), 5; Extrato de levedura, 3;  $\text{NaNO}_3$ , 2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5;  $\text{KCl}$ , 0,5;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01, em pH inicial 6,5.

**Meio segundo Pereira** (OROZCO, PEREIRA e KILIKIAN, 2003)

Meio contendo, em gramas por litro de água destilada: glicose, 20; glutamato monossódico (GMS), 7,6;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,5;  $\text{NaCl}$ , 0,4;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 4,8;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 e extrato de levedura, 1 em pH inicial 5,5.

**Meio farelo de arroz parboilizado**

Meio contendo em gramas por litro de água destilada: glutamato monossódico (GMS), 5; farelo de arroz parboilizado, 3; sem adição de sais e com adição, nas seguintes

proporções:  $K_2HPO_4$ , 5;  $KH_2PO_4$ , 5;  $CaCl_2$ , 0,1;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,5;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,01;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,01 e  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0,03, pH inicial 6,5.

Em todos os ensaios o pH inicial foi ajustado com ácido fosfórico 30% ( $H_3PO_4$ ), em frascos de Erlenmeyer aletados de 500 mL, com 100 mL de meio temperatura de 30°C.

### **V.3.2 – Resultados e Discussão - Glicose e Maltose**

Baseados nos estudos auxanográficos (Tabela IV.9 – Capítulo IV) , foram avaliados em fermentação submersa (frascos agitados), a produção de pigmentos vermelhos variando os seguintes substratos: glicose, maltose e frutose, nas concentrações de 5, 10, 20 e 30 g/L para cada uma das fontes de carbono.

Como os resultados mostraram que os ensaios contendo 20 g/L de glicose ou 30 g/L de maltose (Tabela IV.9 ) eram mais promissores para os estudos cinéticos e estequiométricos de produção de pigmento realizou-se uma curva de crescimento em frascos agitados, nas seguintes condições: meio de cultivo segundo Pastrana, 1995 (capítulo II), pH 6,5 e 30°C e 110 rpm de agitação em shaker de agitação recíproca (Fanem) (Figura V.23 e Figura V.24).

Cabe ressaltar aqui que os resultados apresentados neste capítulo foram importantes para efeitos comparativos, com relação a diferentes condições de cultivo em relação ao tipo de agitação. A discussão destes resultados é apresentada no item V.3.2.1.

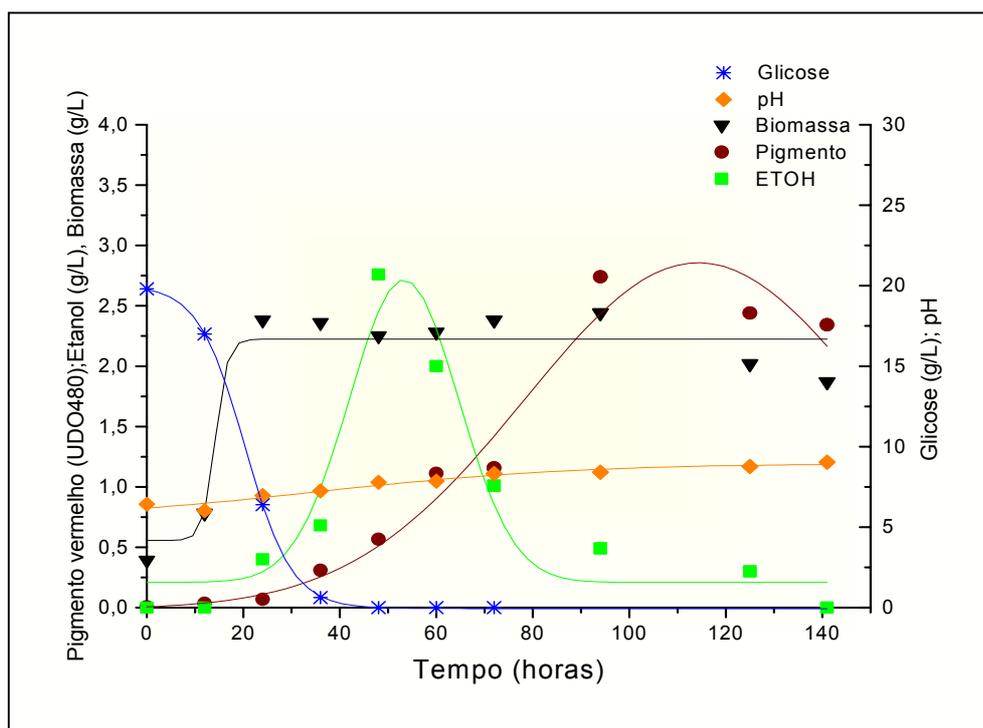


Figura V.23 – Evolução da concentração de biomassa, absorbância do pigmento vermelho (UDO<sub>480</sub>), concentração de etanol (g/L) e consumo de glicose e pH durante o crescimento do *Monascus ruber* em meio de cultivo, segundo Pastrana (1995), em *shaker* com agitação recíproca.

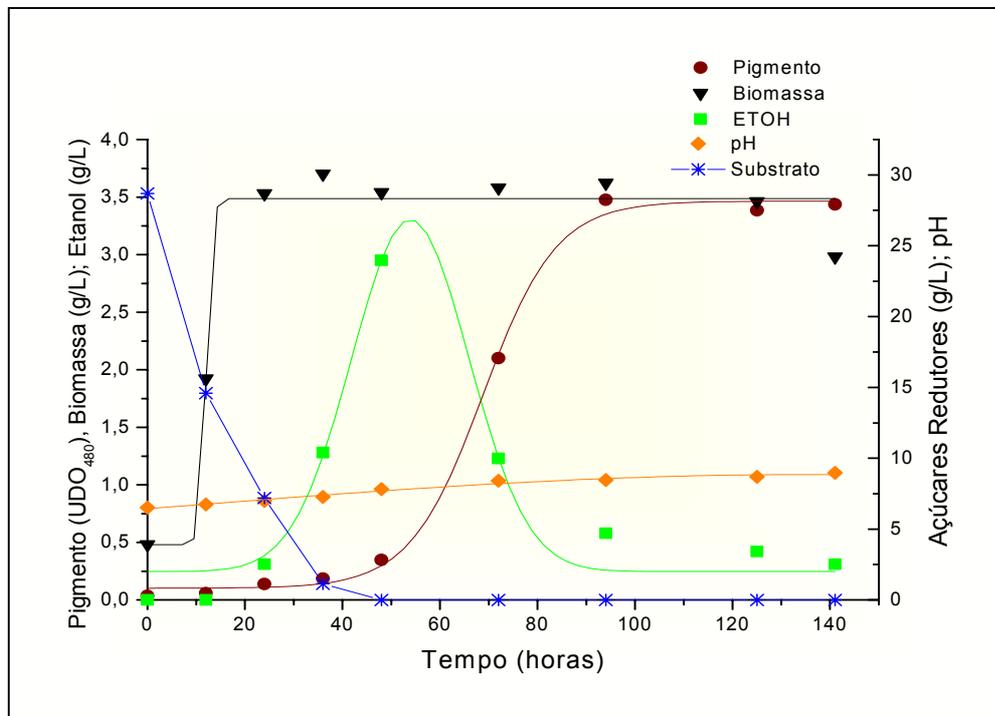


Figura V.24 – Evolução da concentração de biomassa, absorbância do pigmento vermelho (UDO<sub>480</sub>), concentração de etanol (g/L) e consumo de maltose em meio de cultivo (Pastrana, 1995) contendo 30 g/L de maltose em *shaker* com agitação recíproca.

Foi verificado nestes ensaios, que o emprego de um inóculo vegetativo promoveu um crescimento isento da fase "lag", em contraste com o longo período de adaptação verificado, quando o inóculo é constituído por esporos.

Observa-se, nas Figura V. 23 e V.24, o crescimento da biomassa fúngica até 20 horas do processo, demonstrando predominância do metabolismo oxidativo. Após este período, começa a aumentar a formação de etanol, caracterizando o início do metabolismo fermentativo, até aproximadamente 48 horas, com redução ou estabilização da concentração celular. Após este tempo, o microrganismo passa a consumir álcool coincidindo com o aumento da produção de pigmentos vermelhos ( $UDO_{480}:3,0$  e  $UDO_{480}:3,2$ , respectivamente). Estes dados foram similares aos encontrados na literatura (HAMDI, BLANC e GOMA, 1996).

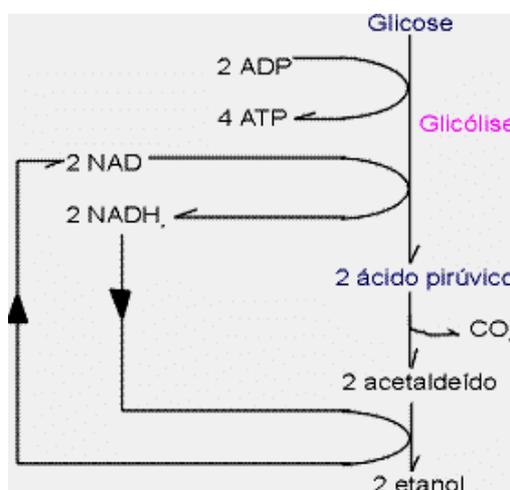


Figura V.25 - Esquema da Fermentação alcoólica pelos fungos.

O esquema apresentado na Figura V.25, caracteriza o que se chama de “fermentação clássica”, ou seja: um processo independente do oxigênio, ou um artifício do metabolismo fúngico, no qual o  $NADH_2$  que é produzido durante a glicólise (ou outra via de degradação) é utilizado para reduzir um aceptor orgânico de elétrons produzido pela própria célula. Fato este, que pode explicar a formação de etanol (Figura V.23) antes que a glicose fosse completamente extinta do meio de cultivo, ou seja, o etanol foi formado para que o  $NADH_2$  em excesso fosse regenerado a  $NAD$  e assim continuar a via glicolítica (JAWETZ, ADELBERG, BROOKS et al., 2000).

A glicose quando consumida por *Monascus* é primeiro metabolizada a acetil CoA, que integra a via dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e está relacionada com a produção de pigmentos quando se associa ao Malonil CoA para iniciar o ciclo dos tetracetídeos (via metabólica apresentada na Figura VI.39 – Capítulo VI). Este é um indicativo de que o

pigmento *Monascus* pode servir como fonte de carbono por incorporação do átomo de carbono de sua molécula ao acetil-CoA quando a glicose é praticamente extinta do meio de cultivo (YONGSMITH, KITPRECHAVANICH, CHITRADON et al., 1997).

Na ausência de respiração, as células microbianas dependem totalmente da fosforilação dos substratos para obtenção de energia: a geração de ATP deve ser acoplada ao rearranjo químico de compostos orgânicos. Muitos compostos podem atuar como substratos de crescimento por fermentação, e muitas vias desenvolvem-se para regenerar coenzimas fundamentais para que a dinâmica metabólica continue acontecendo. A oxidação da glicose pelas leveduras se desenvolve segundo o esquema apresentado por Meyerhoff, em uma seqüência de reações em 14 fases, envolvendo 15 enzimas e 3 coenzimas. As reações incluem transferência de fosfato, oxidação-redução, descarboxilação e isomerização além de outras. É processo de oxidação-redução intramolecular, anaeróbico, exotérmico (PAIVA, 2004).

Estas vias apresentam três estágios gerais: (1) conversão do composto passível de fermentação para doador de fosfato para a fosforilação de substrato. Este estágio quase sempre contém reações metabólicas na qual o  $\text{NAD}^+$  é reduzido a NADH, o qual o piruvato é descarboxilado a acetaldeído, que é então utilizado para oxidar o NADH. (2) Fosforilação do ADP pelo doador de fosfato rico em energia. (3) Etapas metabólicas que colocam os produtos de fermentação em equilíbrio químico com os materiais iniciais. A necessidade mais freqüente neste último estágio consiste num mecanismo para a oxidação do NADH, gerado no primeiro estágio da fermentação, em  $\text{NAD}^+$  (etanol, por exemplo), de modo que a fermentação possa prosseguir (JAWETZ, ADELBERG, BROOKS et al., 2000).

### V.3.3 – Resultados e Discussão - Amido de arroz e Farelo De Arroz

Da mesma forma que o estudo anterior, estudou-se a cinética de crescimento do fungo *Monascus* nos dois substratos (amido de arroz e farelo de arroz) onde foi realizada uma curva de crescimento em frascos agitados, nas seguintes condições: Meio de cultivo em g/L de água destilada: amido de arroz ou farelo de arroz parboilizado, 3; glutamato monossódico (GMS), 5;  $K_2HPO_4$ , 5;  $KH_2PO_4$ , 5;  $CaCl_2$ , 0,1;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,5;  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,01;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,01 e  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 0,03. O pH inicial foi ajustado para 6,5 com ácido fosfórico 30% ( $H_3PO_4$ ), em frascos de Erlenmeyer aletados de 500 mL, com 100 mL de meio temperatura de  $30^\circ C$  e  $160 \text{ min}^{-1}$  de frequência de agitação em *shaker* com agitação orbital.

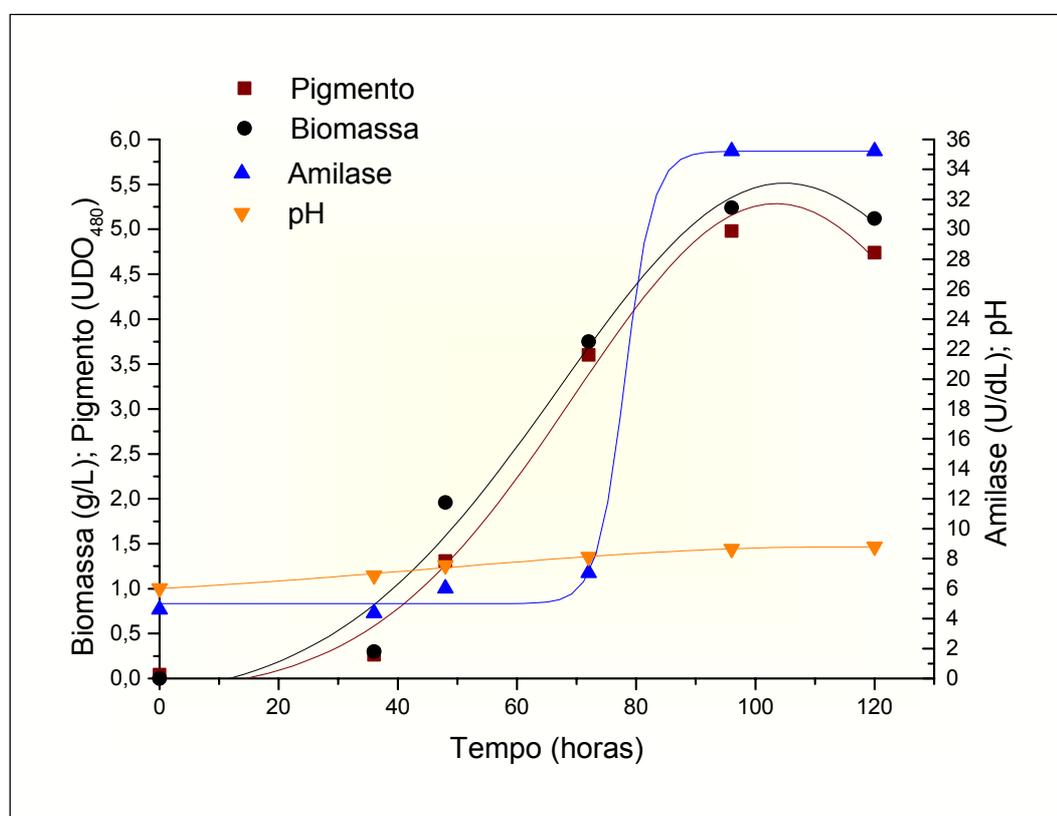


Figura V.26 - Evolução das concentrações de amilase, biomassa, pH e pigmento *Monascus* em meio de cultivo submerso contendo amido de arroz (3 g/L), glutamato monossódico (GMS) e sais à temperatura de  $30^\circ C$  e a  $160 \text{ min}^{-1}$  de frequência de agitação em *shaker* com agitação orbital.

A Figura V.26 ilustra a cinética de crescimento do fungo em presença de amido de arroz associado ao GMS como fonte de nitrogênio, observando-se que as concentrações de pigmento vermelho ( $4,98 \text{ U}_{480}$ ) e biomassa ( $5,24 \text{ g/L}$ ) foram maiores neste experimento, quando comparada aos estudos realizados com glicose e maltose,  $2,74 \text{ UDO}_{480}$ ;  $2,44 \text{ g/L}$  e  $3,48 \text{ UDO}_{480}$ ;  $3,62 \text{ g/L}$ , respectivamente. Estes resultados sugerem que o substrato capaz de formar mais pigmento vermelho pelo fungo *Monascus ruber* é o amido de arroz apesar da fase *lag* ter sido maior que nos experimentos anteriores. Uma explicação para tal fato, é a

fase de síntese protéica, etapa necessária para que a célula sintetize as enzimas amilolíticas necessárias para a quebra de moléculas de amido contidas no meio de cultivo.

Fazendo uma análise dos fatores de conversão substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) para os substratos glicose, maltose e amido, obtêm-se os mesmos valores:  $0,11 \text{ g.g}^{-1}$  para glicose e maltose e  $0,91 \text{ g.g}^{-1}$  para o amido.

Uma hipótese para este valor elevado de fator de conversão poderia ser explicada pela produção suficiente de enzimas amilolíticas, capazes de degraçarem o amido com maior velocidade. Com isso, as células crescem como uma constante limitação de carbono, ou mais provavelmente, limitação de energia.

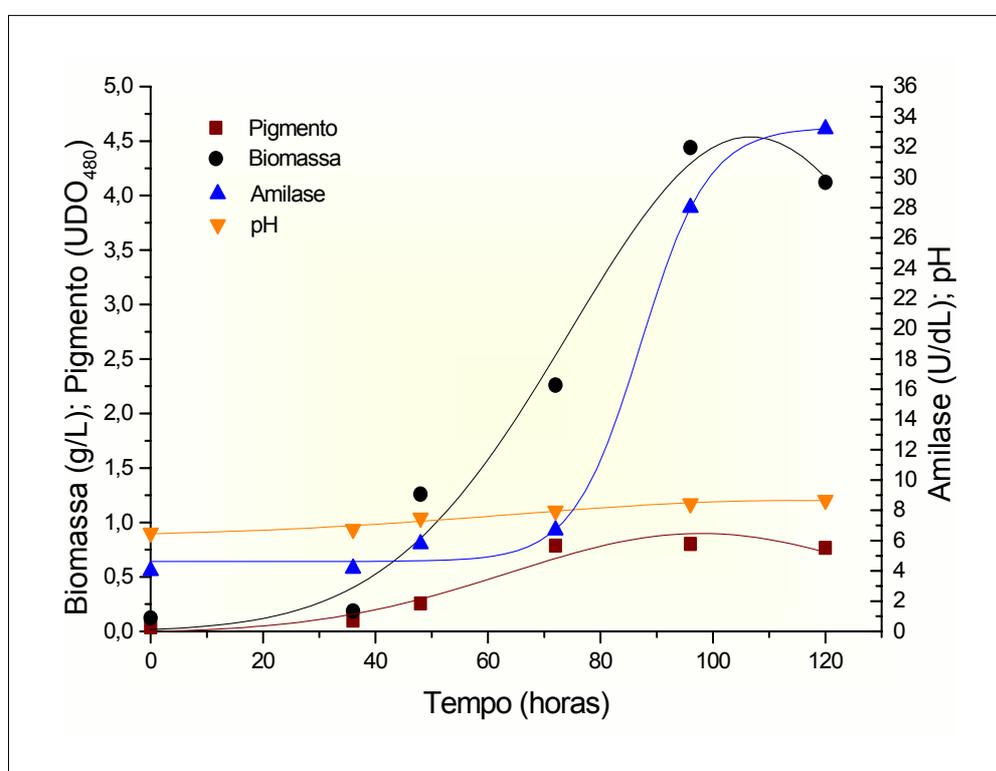


Figura V.27 - Evolução das concentrações de amilase, biomassa, pH e pigmento *Monascus* em meio de cultivo submerso contendo farelo de arroz (3 g/L), glutamato monossódico (GMS) (5 g/L) e sais (meio segundo Pastrana, 1995) à temperatura de  $30^{\circ} \text{C}$  e a  $160 \text{ min}^{-1}$  de frequência de agitação em *shaker* com agitação orbital.

O mesmo ensaio foi realizado utilizando farelo de arroz parboilizado em substituição ao amido de arroz, como demonstra a Figura V.27, Contrariamente ao esperado, os resultados foram insatisfatórios para produção de pigmentos vermelhos ( $0,802 \text{ UDO}_{480}$ ) e muito inferiores (6 vezes mais baixos) que os estudos realizados com amido de arroz.

Foram então testados outros meios de cultivo, buscando-se justificativas para a baixa produção de pigmentos vermelhos em farelo de arroz, os meios de cultivo foram baseados

em estudos de Kim (**Meio A**) (KIM, J.H.KIM e HYUCK, 2002) e Orozco (**Meio B**) (OROZCO, PEREIRA e KILIKIAN, 2003), substituindo a glicose por farelo de arroz cujos meios de cultivo contém, em gramas por litro de água destilada: farelo de arroz, 3; glutamato monossódico (GMS), 5; Extrato de levedura, 3;  $\text{NaNO}_3$ , 2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5;  $\text{KCl}$ , 0,5;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01, em pH inicial 6,5 e farelo de arroz, 3; glutamato monossódico (GMS), 7,6;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,5;  $\text{NaCl}$ , 0,4;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 4,8;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 e extrato de levedura, 1 em pH inicial 5,5 respectivamente, ambos cultivados em Frascos de Erlenmeyer de 500 mL, com 100 mL de volume de meio temperatura de  $30^\circ\text{C}$  e  $160 \text{ min}^{-1}$  de frequência agitação.

Da mesma forma, os resultados não foram os esperados, como demonstra a Figura. V.28. Acreditou-se que a adição de extrato de levedura e as diferentes concentrações de sais adicionados ao meio de cultivo pudessem alterar a produção de pigmentos vermelhos por *Monascus*.

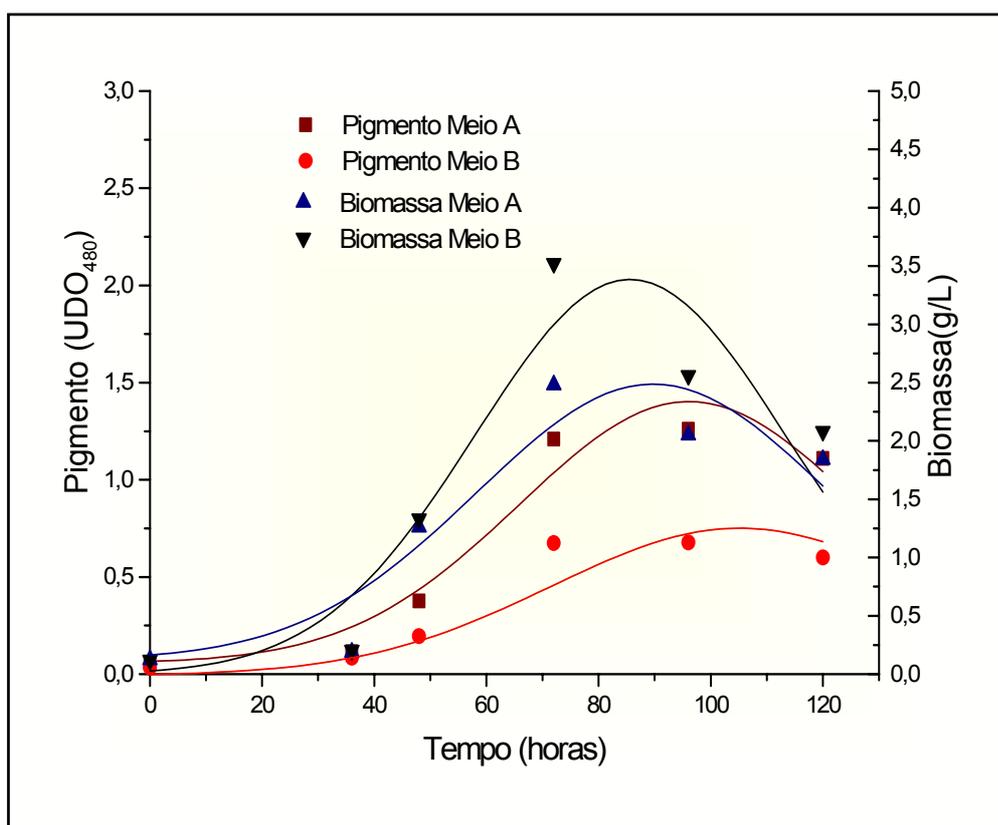


Figura V.28- Evolução das concentrações de biomassa e pigmento *Monascus* em meio de cultivo submerso contendo farelo de arroz (3 g/L) e glutamato monossódico (GMS), baseado em estudos de Kim (Meio A – pH inicial 6,5) e Orozco (Meio B – pH inicial 5,5) à temperatura de  $30^\circ\text{C}$  e a  $160 \text{ min}^{-1}$  de frequência agitação em *shaker* com agitação orbital.

Um estudo comparativo demonstra que os valores de biomassa em todos os meios testados foram similares, bem como a produção de pigmentos vermelhos, muito baixas,

quando comparadas aos ensaios que utilizaram o amido de arroz como principal fonte de carbono.

Uma das hipóteses para os baixos valores de pigmento obtidos com farelo de arroz seria a inibição da formação de pigmentos por excesso de sais presentes no meio de cultivo, uma vez que, como o farelo é parboilizado, os teores de Ca, P, Fe, SO<sub>4</sub>, Na e K presentes neste, poderiam ser suficientes para o crescimento do fungo.

Novo ensaio foi então realizado excluindo a adição de sais inorgânicos ao meio de cultivo. Um novo meio foi elaborado contendo em gramas por litro de água destilada: farelo de arroz, 3 e glutamato monossódico, 5. Porém, foi verificada uma fase *lag* muito grande, em torno de 50 horas. Assim sendo, foi adicionado ao meio de cultivo 5 g/L de glicose, com objetivo de reduzir a fase de adaptação do fungo *Monascus*. Cabe ressaltar que a concentração escolhida de glicose (5 g/L) foi aleatória. A adição de um monossacarídeo (glicose) ao meio de cultivo foi capaz de reduzir pela metade a fase de adaptação do fungo *Monascus* (*lag*), conforme apresentado na Figura V. 29.

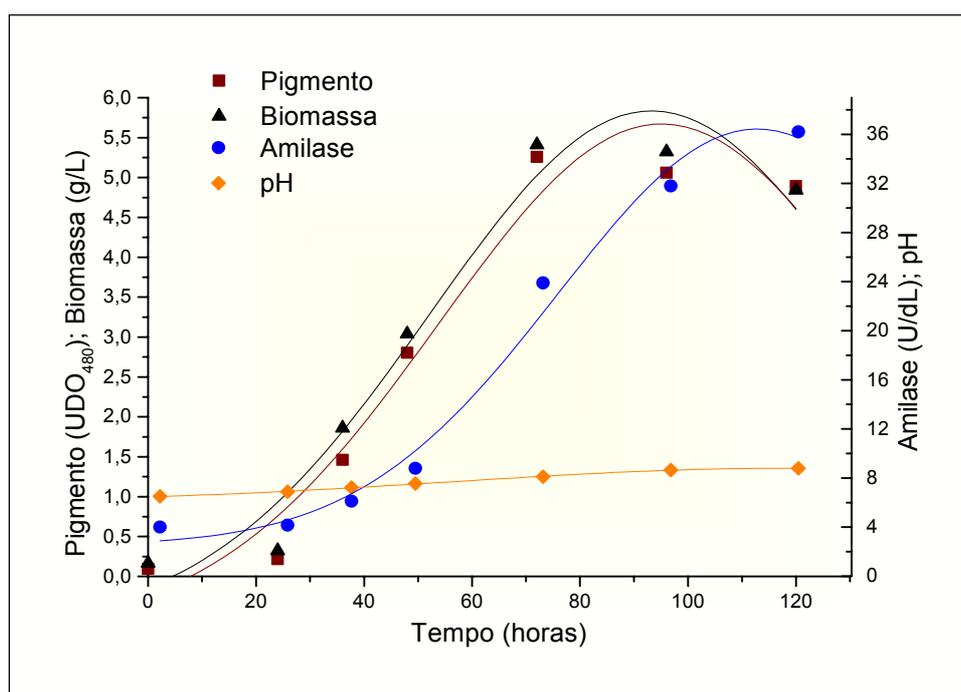


Figura V.29 - Evolução das concentrações de biomassa, pH e pigmento *Monascus* em meio de cultivo submerso contendo farelo de arroz parboilizado (3 g/L), glicose (5 g/L) e glutamato monossódico (GMS) (5 g/L) sem adição de sais inorgânicos à temperatura de 30<sup>o</sup> C, pH inicial 6,5 e a 160 min<sup>-1</sup> de frequência agitação em *shaker* com agitação orbital.

Neste ensaio, a produção máxima de pigmentos vermelhos foi de 5,26 UDO<sub>480</sub> e a concentração máxima de biomassa 5,41 g/L, resultados semelhantes aos obtidos com amido de arroz. Porém, podemos notar uma produção máxima após 60 horas de cultivo, ou

seja, uma redução de 12 horas no tempo final de processo, aumentando a produtividade média.

Como era suspeitado, o excesso de nutrientes, principalmente sais inorgânicos, pode inibir a formação de pigmentos vermelhos. A suplementação do farelo de arroz com vitaminas do complexo B<sup>3</sup> aparentemente favoreceu a formação de corantes.

Com a finalidade de verificar a influência do extrato de levedura no meio de cultivo, repetiu-se o ensaio acima descrito, acrescentando ao meio uma concentração de 2 g/L de extrato de levedura (Difco). Os resultados dos experimentos são apresentados na Figura V.30.

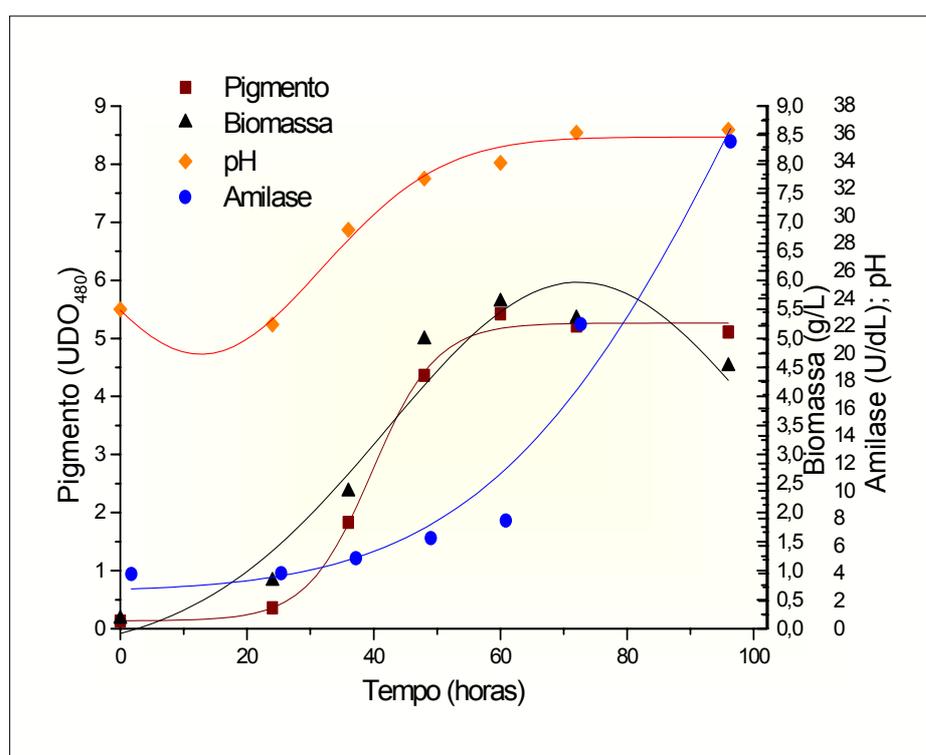


Figura V.30 - Evolução das concentrações de biomassa, pH e pigmento *Monascus* em meio de cultivo submerso contendo farelo de arroz parboilizado (3 g/L), glicose (5 g/L), glutamato monossódico (GMS) sem adição de sais inorgânicos à temperatura de 30<sup>o</sup> C, pH inicial 5,5 e a 160 min<sup>-1</sup> de frequência agitação em *shaker* com agitação orbital.

Pode-se observar no gráfico da Figura V.30 que houve uma redução ainda maior no tempo de fermentação. Foram obtidos valores máximos de pigmentos vermelhos (5,42

<sup>3</sup> A semente do cereal é formada pelo endosperma e o germe, que são recobertos por 3 camadas: testa, camada hialina e aleurona. Do ponto de vista botânico, a aleurona é parte do endosperma, mas no processo de moagem ela faz a parte do farelo. Os constituintes químicos não se distribuem uniformemente pelo grão. O pericarpo (cerca de 5% do peso do grão) é rico em pentosanas, celulose, cinzas e proteína. A aleurona (7%) é uma camada rica em cinza (fósforo, fitato), proteína, lipídios, vitaminas (niacina, tiamina, riboflavina) e enzimas. O endosperma (82%) é composto basicamente de amido, mas sua parte mais externa (subaleurona) contém mais proteína que a porção interna. O germe (3%) tem alto conteúdo de proteína, lipídios, açúcares redutores e cinzas (RIBEIRO e SERAVALLI, 2004).

UDO<sub>480</sub>) e biomassa (4,98 g/L) após 60 horas de cultivo submerso, indicando que o extrato de levedura favorece o metabolismo do *Monascus ruber*, como já havia sido relatado em estudos anteriores (KIM, J.H.KIM e HYUCK, 2002) e (OROZCO, PEREIRA e KILIKIAN, 2003).

Os experimentos realizados mostram que, o início da formação de pigmento *Monascus* coincide com valores de pH alcalinos, independentemente das variáveis de fonte de carbono, adição ou ausência de sais inorgânicos, presença ou não de extrato de levedura. Sugere-se que esta variação possa estar relacionada com o aumento da permeabilidade celular da parede do fungo, facilitando assim a passagem do pigmento acumulado no interior da célula para o meio de cultivo. Estes dados serão melhor avaliados em estudos posteriores (Capítulo VII).

Cabe aqui, ressaltar que nos ensaios representados pelas Figuras V.23 e V.24, a produção de pigmento *Monascus* não está associado ao crescimento fúngico. Já nas culturas subseqüentes, principalmente nos ensaios representados pelas Figuras V.26, V.29 e V.30, ficou nítida esta associação. Como justificativa para tal efeito, pode-se destacar as diferentes condições de cultivo, outro fator relevante, é que, como os primeiros ensaios foram preliminares, possivelmente a cepa ainda não estava adaptada ao meio de cultivo, uma vez que foi obtida de coleção de cultura, onde era mantida em cultivo sólido (BDA). Desta forma, estes resultados não devem servir de parâmetros de comparação com os estudos posteriores.

### **V.3.2.2 – Considerações finais**

O consumo de fonte de carbono parece ser linhagem-dependente, uma vez que, em alguns relatos bibliográficos (LIN, 1973; YOSHIMURA, YAMANADA, MITSUGI et al., 1975) foi observado crescimento e produção de pigmentos vermelhos em meio contendo sacarose como fonte de carbono. No entanto, em relatos de TSENG et al. (2000) tal fato, não foi observado.

As maiores concentrações de pigmentos vermelhos (4,98 U<sub>480</sub>) e biomassa (5,24 g/L) foram encontradas nos ensaios contendo o amido de arroz como fonte de carbono (comparado aos estudos realizados com glicose e maltose, 2,74 UDO<sub>480</sub>; 2,44 g/L e 3,48 UDO<sub>480</sub>; 3,62 g/L, respectivamente. Estes resultados sugerem que o substrato preferencial do *Monascus ruber* é o amido de arroz.

Uma das hipóteses para as concentrações baixas de pigmentos obtidos com farelo de arroz seria a inibição da formação de pigmentos por excesso de sais presentes no meio

de cultivo, uma vez que, como o farelo é parboilizado, os teores de Ca, P, Fe, SO<sub>4</sub>, Na e K presentes neste, poderiam ser, nutricionalmente, satisfatórios para o crescimento do fungo.

Foram obtidos valores máximos de pigmentos vermelhos (5,42 UDO<sub>480</sub>) e biomassa (4,98 g/L) após 48 horas de cultivo submerso em agitador rotativo, indicando que o extrato de levedura favorece o metabolismo do *Monascus ruber*, como já havia sido relatado na literatura (KIM, J.H.KIM e HYUCK, 2002); (OROZCO, PEREIRA e KILIKIAN, 2003).

Valores de pH iniciais entre 6,5 ou 5,5, parecem não alterar a formação de pigmentos vermelhos. Porém, foi observado que, em todos os ensaios realizados até o presente momento, o início da formação de pigmentos vermelhos coincide com valores de pH próximos de 8,0, independentemente das variáveis de fonte de carbono, adição ou ausência de sais inorgânicos, presença ou não de extrato de levedura. Tal fato será objeto de estudo posterior (Capítulo VII).

## **V.4 – ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE PIGMENTOS VERMELHOS**

Nesta etapa, foi verificada a importância da fonte de nitrogênio sobre a produção de pigmentos vermelhos pelo *Monascus ruber*. Este ensaio serviu como base para a definição do tipo de fonte de nitrogênio utilizada nos ensaios posteriores.

### **V.4.1 - Introdução**

Sais de amônio, especialmente nitrato de amônio, têm sido usados tradicionalmente como fonte de nitrogênio para produção de pigmento vermelho em fermentação sólida (LIN, 1973; JOHNSON e MCHAN, 1975; LIN, 1975; CARELS e SHEPHERD, 1977). Entretanto, em estudos mais recentes, foi relatado que o nitrato de amônio é uma fonte pobre para produção de corantes quando comparado à adição de aminoácidos como, glutamato e glicina, principalmente em cultivo submerso (BLANC, 1999; BONDIOLI; e MANFREDINI, ; HAJJAJ, BLANC, GROUSSAC et al., 2000a).

BLANC et al, (1998) estudaram a adição de diversos aminoácidos com o objetivo de reduzir a concentração de citrinina no meio de cultivo sintético (PASTRANA, 1995; contendo em gramas por litro de água destilada: glicose, 20; GMS, 5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5; CaCl<sub>2</sub>, 0,1; MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 0,5; FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 0,01; ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 0,01 e MnSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O, 0,03) e aumentar a produção de pigmento vermelho em cultivo submerso conforme apresentado na Tabela V.10.

Tabela V.10 - Influência da fonte de aminoácidos, na concentração de 5 g/L, sobre a produção de pigmento vermelho, expresso em UDO<sub>500</sub> e citrinina.

<b>Aminoácidos</b>	<b>Biomassa (g/L)</b>	<b>UDO<sub>500</sub></b>	<b>Citrinina (mg/L)</b>	<b>Tempo de fermentação (h)</b>
Glicina	<b>7</b>	<b>26</b>	<b>58</b>	287
Alanina	5,5	5	100	262
Valina	9	3	0	287
Leucina	9,5	2	0	161
Serina	8	12	57	161
Histamina	6,7	9	6	219
Tirosina	7	15	19	212
Glutamato	<b>8</b>	<b>17</b>	100	172
Triptofano	4	0,8	0	212
Histidina	<b>8,3</b>	<b>24</b>	<b>57</b>	320

Fonte: BLANC et al., 1998.

Observa-se pelos resultados de BLANC et al. (1998) que a maior produção de pigmentos vermelhos ocorreu com os aminoácidos glicina, histidina e glutamato. Porém, a produtividade média foi com o glutamato ( $0,099 \text{ UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$ ), seguido da glicina ( $0,091 \text{ UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$ ) e histidina ( $0,075 \text{ UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Levando-se em conta a produção de pigmentos associada à produção de citrinina, os aminoácidos de escolha seriam a glicina e a histidina.

Constata-se que a escolha do aminoácido adicionado ao meio de cultivo é de fundamental importância na produção de pigmentos vermelhos e formação de citrinina.

Baseado em relatos anteriores, o presente trabalho teve por objetivo comparar a produção de pigmento *Monascus* frente a três diferentes fontes de nitrogênio (histidina, glicina e glutamato), utilizando glicose (20 g/L) como fonte de carbono. A concentração de glicose foi baseada nos ensaios realizados no item V.3.1.

Relatos bibliográficos de cultivo sólido para produção de pigmentos vermelhos por espécies de *Monascus*, sugerem a utilização do nitrato de amônio com principal fonte de nitrogênio. Baseado nisso, esta molécula também foi testada.

#### **V.4.2 – Metodologia**

Neste estudo, em frascos agitados, foram testadas como principais fontes de carbono, glicose (meio sintético) contendo sais, segundo Pastrana (1995), nas seguintes proporções em gramas por litro: glicose, 20; glutamato monossódico (GMS), 5;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5;  $\text{CaCl}_2$ , 0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01 e  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,03 e farelo de arroz parboilizado (meio complexo), 3 g/L, glicose (sem adição de sais).

Como fontes de nitrogênio foram testadas nitrato de amônio; glutamato monossódico, histidina e glicina, capazes de aumentar a produção de pigmentos vermelhos no meio de cultivo sintéticos. Para o meio de cultivo complexo (farelo de arroz parboilizado), foi testado o glutamato monossódico e a glicina.

Em todos os ensaios o pré-inóculo e inóculo foram tratados de acordo com o item III.3.2 (Capítulo III – Material e Métodos).

O pH inicial foi ajustado com ácido fosfórico 30% ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) em 6,5. Os ensaios foram realizados em frascos de Erlenmeyer aletados de 500 mL, com 100 mL de meio, incubados à temperatura de  $30^\circ\text{C}$  em *shaker* orbital a  $160 \text{ min}^{-1}$  de frequência de agitação.

### V.4.3 - Resultados e discussão

As Figuras V.31, V.32, V.33 e V.34 ilustram a evolução da cultura em meio sintético contendo 20 g/L de glicose inicial e complementados com  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (Figura V.31), glutamato monossódico (GMS) (Figura V.32), glicina (Figura V.33) e histidina (Figura V.34) como fontes de nitrogênio (5 g/L). Nestes ensaios, foi utilizada a glicose como principal fonte de carbono com intuito de comparar com os estudos de BLANC et al, (1998).

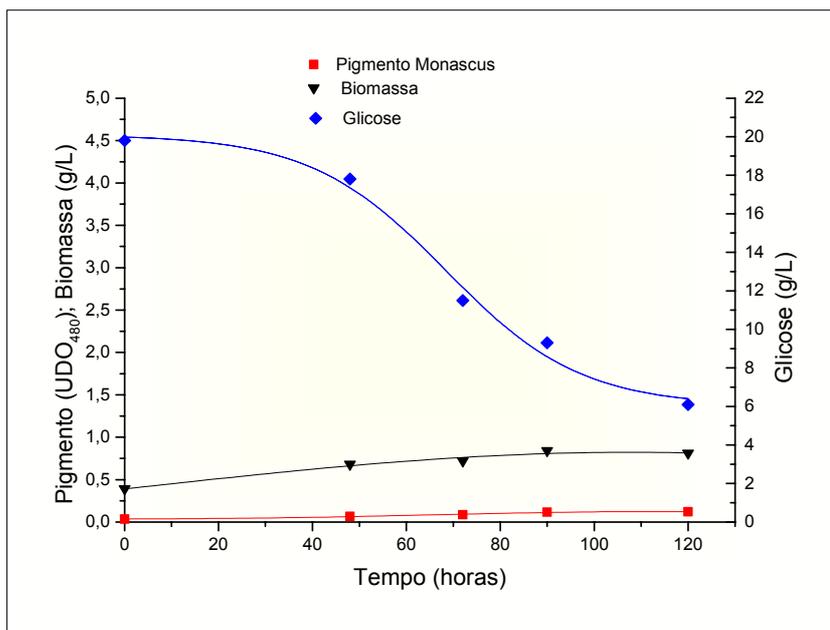


Figura V.31 - Evolução de fermentação submersa em meio de cultivo sintético contendo 20 g/L de glicose e 5 g/L de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , em meio de sais à temperatura  $30^\circ\text{C}$  e a  $160\text{ min}^{-1}$  de frequência agitação.

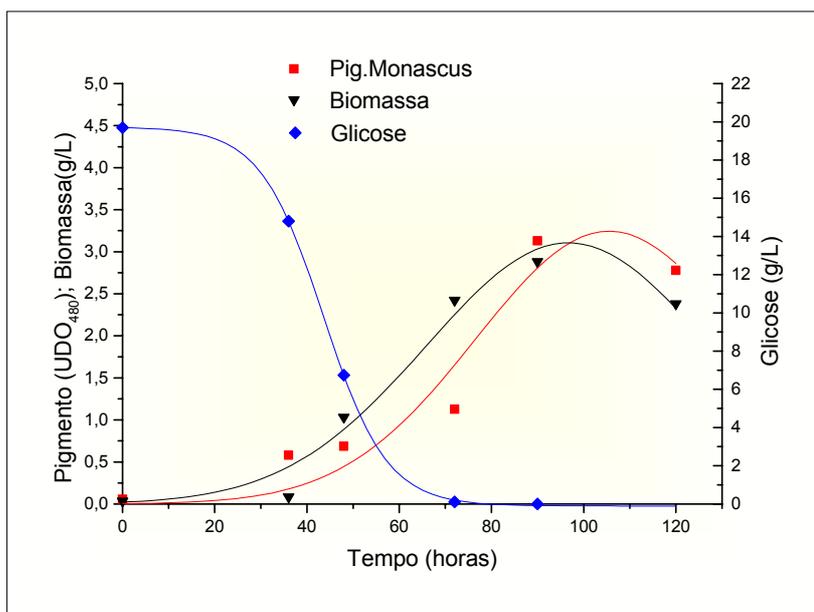


Figura V.32 - Evolução de fermentação submersa em meio de cultivo sintético contendo 20 g/L de glicose e 5 g/L de glutamato monossódico (GMS) em meio de sais à temperatura  $30^\circ\text{C}$  e a  $160\text{ min}^{-1}$  de frequência agitação.

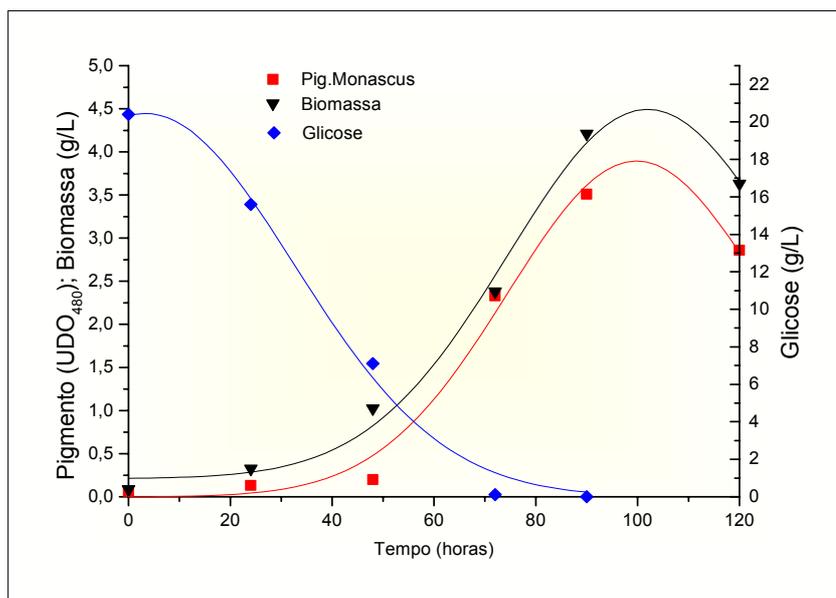


Figura V.33 - Evolução de fermentação submersa em meio de cultivo sintético contendo 20 g/L de glicose e 5 g/L de glicina em meio de sais à temperatura 30°C e a 160 min<sup>-1</sup> de freqüência agitação.

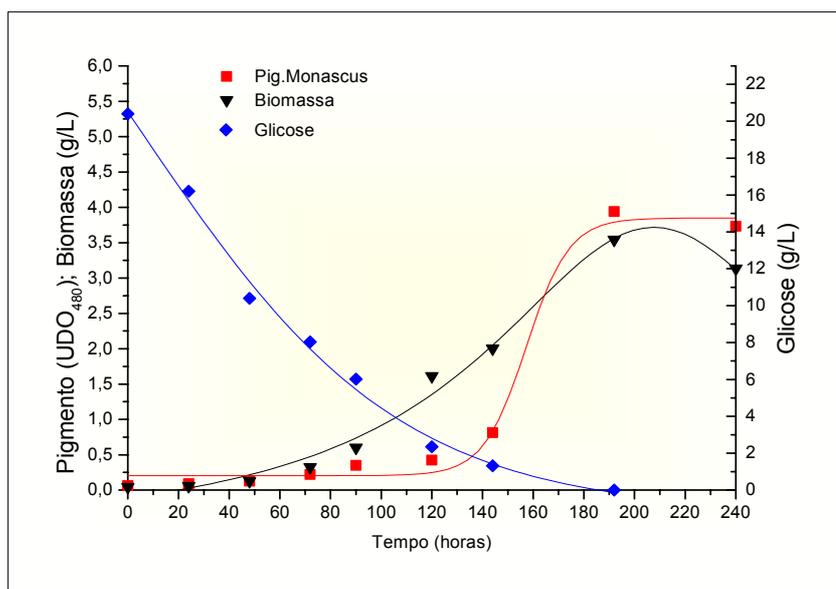


Figura V.34 - Evolução de fermentação submersa em meio de cultivo sintético contendo 20 g/L de glicose e 5 g/L de histidina em meio de sais à temperatura 30°C e a 160 min<sup>-1</sup> de freqüência agitação.

Comparando-se os resultados apresentados nas Figuras V.32, V.33 e V.34, observa-se que a formação de pigmentos vermelhos em meio contendo glutamato monossódico, glicina e histidina foi aproximadamente 30 vezes maior que no ensaio contendo a mesma concentração de glicose (20 g/L) e adicionando NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.(Figura V.31).

Como pode ser observada, na Figura V.33, a glicina favoreceu também a formação extracelular do pigmento Monascus ( $3,51 \text{ UDO}_{480}$ ) com resultados semelhantes aos ensaios que utilizaram o glutamato monossódico ( $3,13 \text{ UDO}_{480}$ ) nas mesmas condições de cultivo.

A Figura V.34 mostra que o pigmento vermelho começa a ser formado após 144 horas de cultivo, atingindo uma concentração de  $3,94 \text{ UDO}_{480}$  após 192 horas. Nestas condições, a concentração de pigmentos vermelhos foi superior aos ensaios contendo glutamato e glicina com fontes de nitrogênio (Figura V.32 e Figura V.33). Porém, se for levado em conta a produtividade média do processo, verifica-se que este aminoácido não seria adequado ao processo industrial.

Cabe ressaltar também, que o valor comercial da histidina é muitas vezes superior ao da glicina ou glutamato monossódico.

Observando os gráficos apresentados (Figuras V.31, V.32 e V.33), sugere-se que a produção de biopigmentos vermelhos por cultivo submerso esteja associada ao crescimento. Relatos bibliográficos confirmam tal fato (HAJJAJ, BLANC, GOMA et al., 1998).

A Figura V.35 apresenta a produtividade média de pigmentos vermelhos em função dos três aminoácidos estudados (glutamato monossódico, glicina, histidina) e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

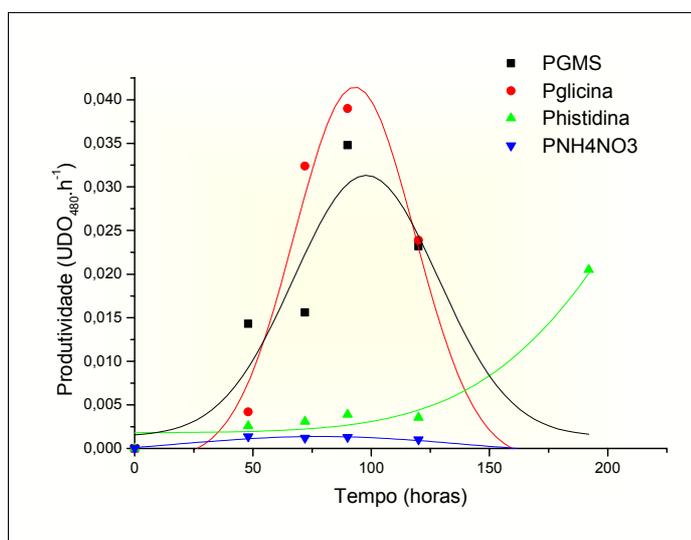


Figura V.35 – Produtividade média expressa em  $\text{UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$  para os aminoácidos estudados e  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

Os valores de produtividade média obtidos durante a fase de produção para os meios de cultivo contendo  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , glutamato monossódico (GMS), glicina e histidina foram respectivamente de  $0,0013 \text{ UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$ ;  $0,0348 \text{ UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$ ;  $0,039 \text{ UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$  e  $0,0039 \text{ UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$ , bem inferiores aos estudos de BLANC et al. (1998) com 5 g/L de glicose.

A concentração mais elevada e a menor produtividade de pigmentos vermelhos utilizando a histidina como fonte de nitrogênio, comprovou os estudos de BLANC et al, (1998) (Tabela V.10).

O maior valor da produtividade média foi obtida com a glicina como fonte de nitrogênio. Porém, mesmo a glicina tendo demonstrado melhores resultados nos estudos anteriores, deve-se testar este aminoácido frente ao farelo de arroz como fonte de nitrogênio.

A Figura V.36 apresenta o efeito da glicina sobre o crescimento do *Monascus ruber* em meio de cultivo contendo farelo de arroz parboilizado.

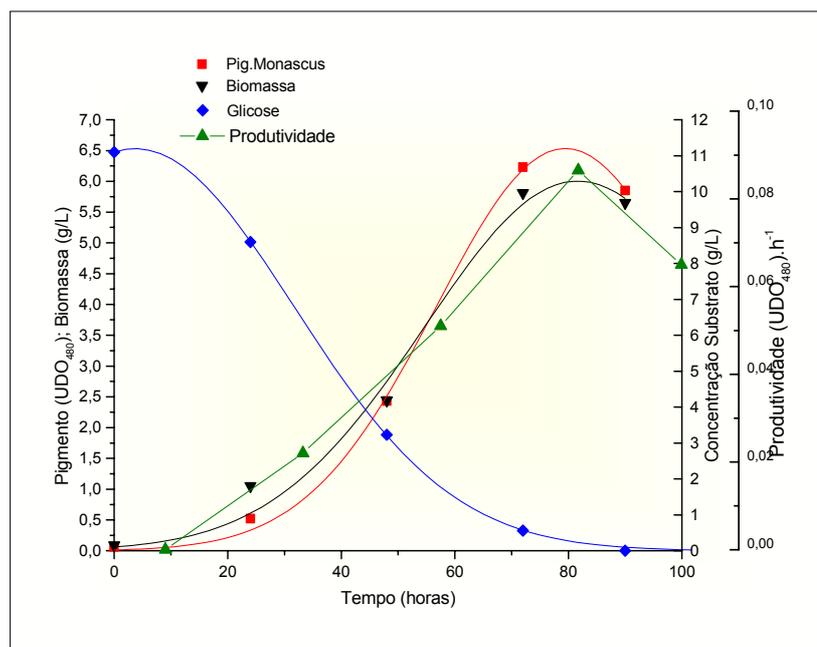


Figura V.36 - Evolução de fermentação submersa em meio de cultivo sintético contendo 3 g/L de farelo de arroz, 5 g/L de glicose, 5 g/L de glicina e sais (Pastrana, 1995) à temperatura de 30°C e a 160 min<sup>-1</sup> de frequência agitação.

Os resultados apresentados demonstraram que o farelo de arroz e a glicina podem ser utilizados para a produção de pigmentos vermelhos por *Monascus ruber*. Este estudo conclui que a glicina favorece a formação de pigmentos (6,23 UDO<sub>480</sub>) também para o meio contendo como fonte de carbono o farelo de arroz. A biomassa também foi favorecida, atingindo concentração máxima de 5,81 g/L. Cabe ressaltar que, neste estudo, não foi utilizado o meio sintético (suplementado com sais inorgânicos) e sim o meio complexo, sem adição de sais. Além disso, pode-se notar que a maior produtividade média em pigmentos foi obtida em farelo de arroz e glicina (0,087 UDO<sub>480</sub>.h<sup>-1</sup>) se comparado aos estudos utilizando glicose com o mesmo aminoácido (0,039 UDO<sub>480</sub>.h<sup>-1</sup>) (Figura V.33).

Os pigmentos lipofílicos produzidos por espécies *Monascus*, são intracelulares, entretanto, podem reagir com grupamentos amina de proteínas, aminoácidos, ácidos nucléicos e aminoaçúcares formando complexos de pigmentos extracelulares solúveis em água. O uso de aminoácidos como fonte de nitrogênio, por diversos autores, tem apresentado resultados promissores, seja como estimulante do acúmulo extracelular dos

pigmentos, seja contribuindo para o aumento da eficiência do processo de produção de pigmentos vermelhos (YOSHIMURA, YAMANADA, MITSUGI et al., 1975; WONG e KOEHLER, 1983; PASTRANA, BLANC, SANTERRE et al., 1995; HAJJAJ, KLAEBE, LORET et al., 1997; HAJJAJ, BLANC, GOMA et al., 1998; BLANC, 1999). Neste estudo, foi verificado que a glicina em substituição do glutamato monossódico favoreceu ainda mais a formação do complexo *N-glutarilmonascorubramina*.

#### **V.4.4 – Considerações finais**

As maiores concentrações de pigmento *Monascus* e biomassa (6,23mg/L e 5,81 g/, respectivamente) foram obtidas com o farelo de arroz como fonte de carbono e glicina como fonte de nitrogênio.

Os resultados obtidos com a adição de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , não foram satisfatórios para produção de pigmentos vermelhos em cultivo submerso confirmando os relatos bibliográficos (HAJAJ, BLANC, GROUSSAC et al., 1999a).

A produtividade média atingida  $0,087 \text{ UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$ , obtida com 5 g/L de farelo de arroz, 5 g/L de glicose e 5 g/L de glicina à temperatura  $30^\circ\text{C}$  e  $160 \text{ min}^{-1}$  de frequência de agitação em frascos agitados, foi duas vezes maior que nos ensaios contendo glicose (20 g/L) e glicina (5 g/L), nas mesmas condições de temperatura e agitação.

É importante salientar que, não é possível comparar estes dois ensaios devido a diferentes concentrações das fontes de carbono. Nos ensaios utilizando o farelo de arroz, a glicose inicial foi de aproximadamente 11 g/L contra 20 g/L dos ensaios contendo apenas glicose. Porém, a produtividade alcançada neste ensaio ( $0,087 \text{ UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$ ) pode ser comparada aos ensaios de BLANC et al, (1998), com a mesma fonte de nitrogênio e glicose ( $0,091 \text{ UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$ ), sugerindo que, concentrações maiores de farelo de arroz possam melhorar a produtividade em pigmentos vermelhos.

Baseado na análise destes resultados optou-se por utilizar a glicina como fonte de nitrogênio e farelo de arroz parboilizado sem suplementação de sais e acrescido de 5 g/L de glicose. Entretanto, foi necessário ainda otimizar a concentração de farelo de arroz.

### **V.5– ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE FARELO DE ARROZ E GLICINA SOBRE A PRODUÇÃO DE PIGMENTOS VERMELHOS**

O objetivo deste estudo foi encontrar a concentração ótima de farelo de arroz capaz de aumentar a concentração de pigmentos vermelhos no meio de cultivo. Para tanto foram testadas as seguintes concentrações de farelo de arroz: 3, 5, 10, 15, 25 e 30 e 100 g/L em meios de cultivo contendo, além destas concentrações de fonte de carbono, 5 g/L de glicina e 5 g/L de glicose. A Tabela V.11 resume os resultados obtidos neste estudo.

A concentração de biomassa nos ensaios contendo 100 g/L de farelo de arroz adicionados diretamente ao meio de cultivo não pode ser medida pela metodologia proposta (peso seco). Tal fato deve-se ao excesso de sólidos em suspensão contidos nas amostras tratadas obtidas. Por esta razão, o farelo de arroz foi cozido por 10 minutos em água destilada fervente e filtrado em gaze obtendo-se assim o “extrato de farelo de arroz”. Esta metodologia reduziu consideravelmente os sólidos em suspensão, favorecendo assim, a medida do peso seco de massa fúngica. (\*\*).

Tabela V.11 – Resultados obtidos nos ensaios contendo diferentes concentrações de farelo de arroz parboilizado a 30°C de temperatura, 160 min<sup>-1</sup> de frequência agitação em *shaker* e pH inicial 5,5.

Concentração Farelo de Arroz	Pigmento UDO <sub>480</sub>	Biomassa (g/L)	Y <sub>X/UDO480</sub> (g.UDO <sub>480</sub> <sup>-1</sup> )	Produtividade média (UDO <sub>480</sub> .h <sup>-1</sup> )
3 g/L	5,46	5,21	0,95	0,0758
5 g/L	6,23	5,81	0,93	0,0865
10 g/L	0,86	2,23	2,59	0,0119
15 g/L	0,78	2,04	3,32	0,0108
25 g/L	7,65	6,64	0,87	0,1062
30 g/L	9,35	8,54	0,91	0,1298
100 g/L**	22,7	19,74	0,87	0,3152

\*\* 100 g/L de extrato de farelo de arroz parboilizado cozido.

Pode-se notar pela Tabela V.11 que a concentração ótima de farelo de arroz, visando a produção de pigmentos vermelhos (entre as concentrações testadas) foi de 100 g/L de extrato de farelo de arroz, obtendo-se 22,7 UDO<sub>480</sub>, de pigmento *Monascus*. O tratamento à quente da fonte de carbono pode ter favorecido o metabolismo fúngico, pela hidrólise parcial do amido.

Foi notado também que, em meios de cultivo contendo concentrações de 10 g/L e 15g/L de farelo de arroz as concentrações de pigmentos vermelhos foram muito mais baixas (0,86 UDO<sub>480</sub> e 0,78 UDO<sub>480</sub>, respectivamente). Uma das hipóteses sugeridas é que, como o pigmento formado é um metabólito secundário, e que, como tal, é formado em condições de limitação, e por economia de energia (energia gasta para síntese protéica), a produção de pigmentos vermelhos tenha sido reduzida.

A produtividade média (0,315 UDO<sub>480</sub>.h<sup>-1</sup>) foi obtida nos ensaios contendo extrato de farelo de arroz (100 g/L) e glicina (5 g/L) cultivados à temperatura de 30°C e 160 rpm de agitação rotatória.

Este estudo concluiu a fase de estudos em agitador rotatório (shaker) e foram importantes para a determinação das condições de cultivo em biorreator.

## **V.6 - CONSIDERAÇÕES FINAIS DO CAPÍTULO V**

Pode-se observar neste estudo que, as características e as condições de formação de pigmento, relatadas na literatura, muitas vezes são baseadas nos estudos de linhagens específicas, isto é, não podem ser aplicadas para todas as espécies de *Monascus*. Tal afirmação, foi baseada nos estudos comparativos de diversos autores (BLANC, 1998; PEREIRA e KILIKIAN, 2001; KILIKIAN, 2002; KIM, J.H.KIM e HYUCK, 2002; OROZCO, PEREIRA e KILIKIAN, 2003; PEREIRA, OROZCO, TONSO et al., 2003).

Neste capítulo, foi possível identificar um substrato capaz de produzir concentrações elevadas de pigmentos vermelhos (farelo de arroz), sendo economicamente satisfatórios, sob o ponto de vista industrial.

A maior concentração de pigmentos vermelhos (22,4 UDO<sub>480</sub>) foi obtida nas seguintes condições: extrato de farelo de arroz (100 g/L), glicose (5 g/L) e glicina (5 g/L) à temperatura de 30 °C e 160 min<sup>-1</sup> de frequência agitação em frascos agitados.

Os resultados adquiridos nos ensaios em frascos agitados permitiram identificar as estratégias necessárias para orientar estudos posteriores de aumento da produção de pigmentos vermelhos pelo fungo *Monascus ruber* nos estudos posteriores.

"Você é o motivo de quase tudo que lhe acontece"  
Nikki Lauda

## **CAPÍTULO VI – INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS AO MEIO DE CULTIVO NA PRODUÇÃO DE PIGMENTO MONASCUS**

---

Neste capítulo são apresentados os resultados referentes à adição de ácidos graxos ao meio sintético, utilizado para produção de pigmentos vermelhos. O objetivo deste estudo é a redução da concentração de citrinina, toxina formada concomitantemente com o corante alimentar.

## VI.1 - INTRODUÇÃO

Análises das moléculas  $^{13}\text{C}$ -pigmento a partir do cultivo do micélio de *Monascus ruber* contendo acetato [ $1\text{-}^{13}\text{C}$ ], [ $2\text{-}^{13}\text{C}$ ] ou [ $1,2\text{-}^{13}\text{C}$ ] marcados com carbono  $^{13}\text{C}$  por ressonância magnética, realizadas por HAJJAJ et al. (2000), indicaram que a biossíntese do pigmento vermelho realiza-se pela mesma via dos policetídeos para gerar a estrutura cromófora e ácidos graxos, e ocorre no citoplasma da célula (Figura VI.36). Tal fato levou os autores a estudos mais aprofundados, adicionando diversos ácidos graxos ao meio de cultivo, conforme apresentado na Tabela VI.12. Os resultados mostraram também que a adição de ácido octanóico no meio de cultivo levou a um estímulo de 30 – 50% na produção de pigmento vermelho por um mecanismo nada esperado e não envolvido diretamente na transesterificação do esqueleto cromóforo. Tal mecanismo está relacionado com a formação de suas metilcetonas (especificamente – 2-tridecanolona) correspondentes, causando uma grande redução, até mesmo inibição da síntese de citrinina por *Monascus ruber*.

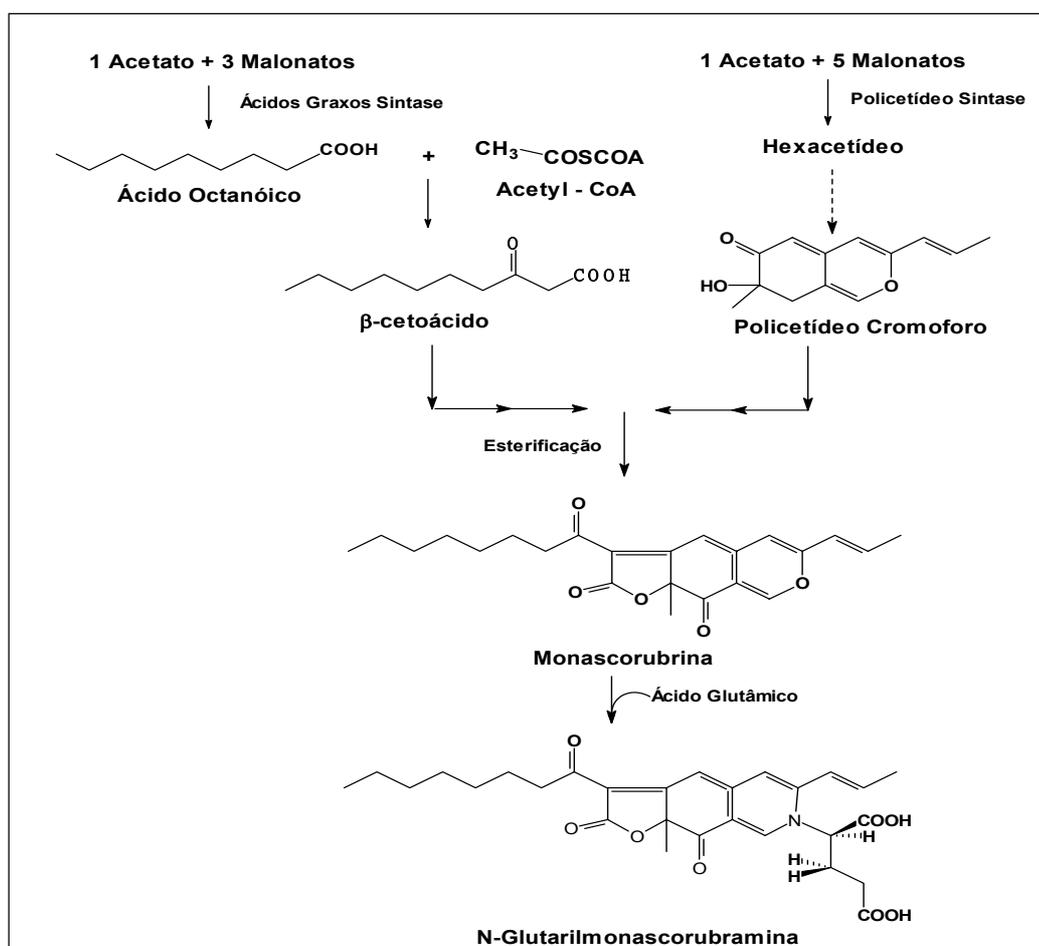


Figura VI.37 - Formação hipotética de N-glutarilmonascorubramina por *Monascus ruber*. Fonte: HAJJAJ, 2000.

Quando um ácido graxo é adicionado ao meio de cultivo (como o ácido octanóico, por exemplo – Figura VI.37), a estrutura cromófora sofre uma reação de transesterificação e gera o pigmento laranja. A redução do pigmento laranja gera o amarelo, enquanto que o pigmento vermelho é produzido por aminação do pigmento laranja com unidades de  $\text{NH}_3$ .

Estes pigmentos permanecem intracelulares por causa de sua elevada hidrofobicidade. Eles são eventualmente excretados no meio de cultivo quando reagem com o grupo  $\text{NH}_2$  dos aminoácidos. Por esta razão, o glutamato tem sido utilizado, não só como fonte de carbono, mas também como fonte de nitrogênio (HAJJAJ, KLAEBE, GOMA et al., 2000b).

O ácido caprílico (Ácido octílico ou ácido n-octanóico) é um ácido carboxílico, pois possuir um grupo funcional  $\text{COOH}$ . É um ácido graxo de cadeia média possuindo oito carbonos na sua estrutura. Por não possuir nenhuma dupla ligação ele é chamado de ácido graxo saturado (GUTIERREZ, 1993).

O ácido caprílico é um ácido proveniente do carbono oito, pode ser produzido no corpo em quantidades pequenas, no suor do ser humano, é encontrado no óleo do coco, no óleo da palma, na gordura de manteiga e de outras fontes vegetais e animais. Pode ser chamado também de ácido decanóico, ácido octanóico. Apresenta a seguinte formulação:  $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2$ .

Relatos bibliográficos realizados em testes “*in vitro*”, indicam que o ácido caprílico possui ação fungicida em apenas 60 minutos com 100% das células de leveduriformes (GUTIERREZ, 1993).

Nos estudos realizados por Hajjaj et al (2000b), tanto a citrinina quanto a ocratoxina foram sensíveis ao peróxido de hidrogênio. O tratamento de 100 mg de citrinina e pigmento em presença de 0,05% de peróxido de hidrogênio por 30 minutos à temperatura ambiente resulta numa destruição completa da toxina, enquanto que o pigmento permanece intacto. As enzimas presentes nos peroxissomas podem ser estimuladas pelos ácidos graxos e seu estímulo é caracterizado pelo aumento da atividade das enzimas peroxissomais e glioxissomais. A isocitrato liase aumentou de 5,33 para 30,50 mU/mg de proteínas em cultivo de *Monascus ruber* em presença de 2 mM de octanoato de sódio (HAJJAJ, KLAEBE, GOMA et al., 2000b).

A adição de ácidos graxos ao meio de cultivo, além de não interferir na formação de pigmento vermelho, diminui a concentração de citrinina por aumentar a formação de peróxido de hidrogênio (Tabela VI.12). Tal fato deve ser relevado também em outros estudos que envolvam a formação de outras toxinas, tais como aflatoxina, patulina e ocratoxina (HAJJAJ, KLAEBE, GOMA et al., 2000b).

Tabela VI.12 - Efeito da adição dos ácidos graxos (1 mM) sobre a produção de pigmentos e citrinina durante a fermentação submersa do *Monascus ruber* em presença de glicose e glutamato monossódico. Fonte: (HAJJAJ, KLAEBE, GOMA et al., 2000b).

<b>Tipo de ácido graxo</b>	<b>Pigmentos vermelhos (mg/L*)</b>	<b>Citrinina (mg.g<sup>-1</sup>)</b>
Controle	54	14
Ácido Hexanóico	43,5	10
Ácido octanóico	114	7,4
Ácido decanóico	52,5	9
Ácido duodecanóico	51	3,6
Ácido mirístico	54	14,6
Ácido esteárico	51	11,6
Ácido oléico	55,5	13

\* HAJJAJ et al, (2000b) determinaram, em seus estudos, que 1 UDO<sub>480</sub> equivale a 15 mg/L.

As concentrações de citrinina encontradas em cultivo submerso variam com o tipo de substrato, fonte de nitrogênio, adição de extrato de levedura, aeração e agitação. HAJJAJ et al, (2000), estudando a produção de citrinina por *Monascus ruber* após adição de ácidos graxos, encontrou valores que variam entre 15 mg.g<sup>-1</sup> (ácido mirístico) e 3,6 mg.g<sup>-1</sup> (ácido decanóico). Entretanto, a adição de ácido duodecanóico apresentou concentrações mais baixas de pigmento vermelho (menos que a metade em comparação com o ácido octanóico). KILIKIAN et al, (2002) utilizando também a espécie *Monascus* em meio de cultura contendo extrato de levedura, sem adição de ácidos graxos, encontraram valores de citrinina na ordem de 47 mg.L<sup>-1</sup>. HAJAJ et al, (2000) considera que a adição, 1 mM de clofibrato (estimulador da proliferação de células peroxisomais em células animais) também possa reduzir ou anular a formação deste composto.

## **VI.2 – CITRININA**

Os pigmentos vermelhos não são autorizados nos países da União Européia nem nos Estados Unidos por causa dos estudos toxicológicos realizados, comprovando a presença de citrinina em doses variáveis em alguns alimentos comercializados nestes países.

A citrinina [IUPAC (3R, 4S) – ácido carboxílico 4,6 dihidro-8-hidroxi-3.4.5 – trimetil – 6 – oxo – eH – 2 benzopirano – 7] (Figura VI.37) é um metabólito fúngico, seu peso molecular é de 250,25 e o seu ponto de fusão de 170 °C. É uma toxina típica, isolada primeiramente do fungo *Penicillium citrinum* em 1931, e mais tarde por várias outras espécies de *Aspergillus* e *Monascus sp.* Esta toxina exibe atividade bacteriana contra bactérias gram

positivas. Porém apresenta propriedades nefrotóxicas, altera as funções mitocondriais e inibe a proliferação de microtúbulos, impedindo assim, seu uso como droga terapêutica (LIU BH, 2005). Em células hepáticas de ratos, a citrinina possui um efeito comparável ao ácido lacaico, um agente mutagênico (MARTLBAUER, 1995; FRANCO, FENTE, VAZQUEZ et al., 1996; BLANC, 1998; LEISTNER, 1998; RIBEIRO, CAMPELLO, CHAGAS et al., 1998; MARTINKOVA, PATAKOVA-JUZLOVA, KRENT et al., 1999; SABATER-VILAR, MAAS e FINK-GREMMELS, 1999; MALMSTROM, CHRISTOPHERSEN e FRISVAD, 2000).

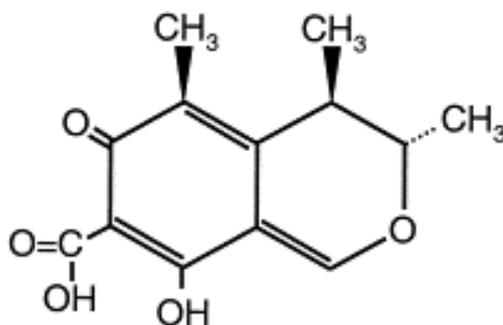


Figura VI.38 – Fórmula estrutural da molécula de citrinina (Fonte: FRANCO et al., 1996).

A produção de citrinina juntamente com os pigmentos vermelhos por espécies de *Monascus* e a produção da mesma molécula tóxica por outras espécies não formadoras de pigmentos sugere a possibilidade de uma variação da via metabólica da citrinina pelo *Monascus ruber*. Presumia-se que esta molécula era formada pela condensação de 1 molécula de acetil-CoA com 4 moléculas de malonil-CoA, seguido pela adição de 3 unidades metil. Em estudos realizados por HAJJAJ et al., em 2000b, utilizando  $^{13}\text{C}$  ficou comprovado que a citrinina é formada por um tetracetídeo (condensação de 1 molécula de acetil-CoA e 3 moléculas de malonil-CoA e não de 4 moléculas como era anteriormente previsto (CARELS e SHEPHERD, 1978) (Figura VI.39).

Quando uma molécula de acetil-CoA é adicionada a este tetracetídeo, um outro composto intermediário é formado (bovilactona ou gomfilactona); sugerindo que esta via metabólica possa ser regulada a nível destas enzimas responsáveis por este composto intermediário (Figura VI.40). Neste estudo, não ficou descartada a hipótese de formação de um pentacetídeo através da condensação de mais de uma molécula de malonil-CoA acompanhadas de uma descarboxilação. A ocorrência de um tetracetídeo como precursor tanto da citrinina como do pigmento vermelho pode ocorrer de diferentes modos na formação destas duas moléculas, que dependerão principalmente das substâncias adicionadas ao meio de cultivo e da variação dos parâmetros cinéticos durante o cultivo com *Monascus ruber* (HAJJAJ, BLANC, GROUSSAC et al., 1999a).

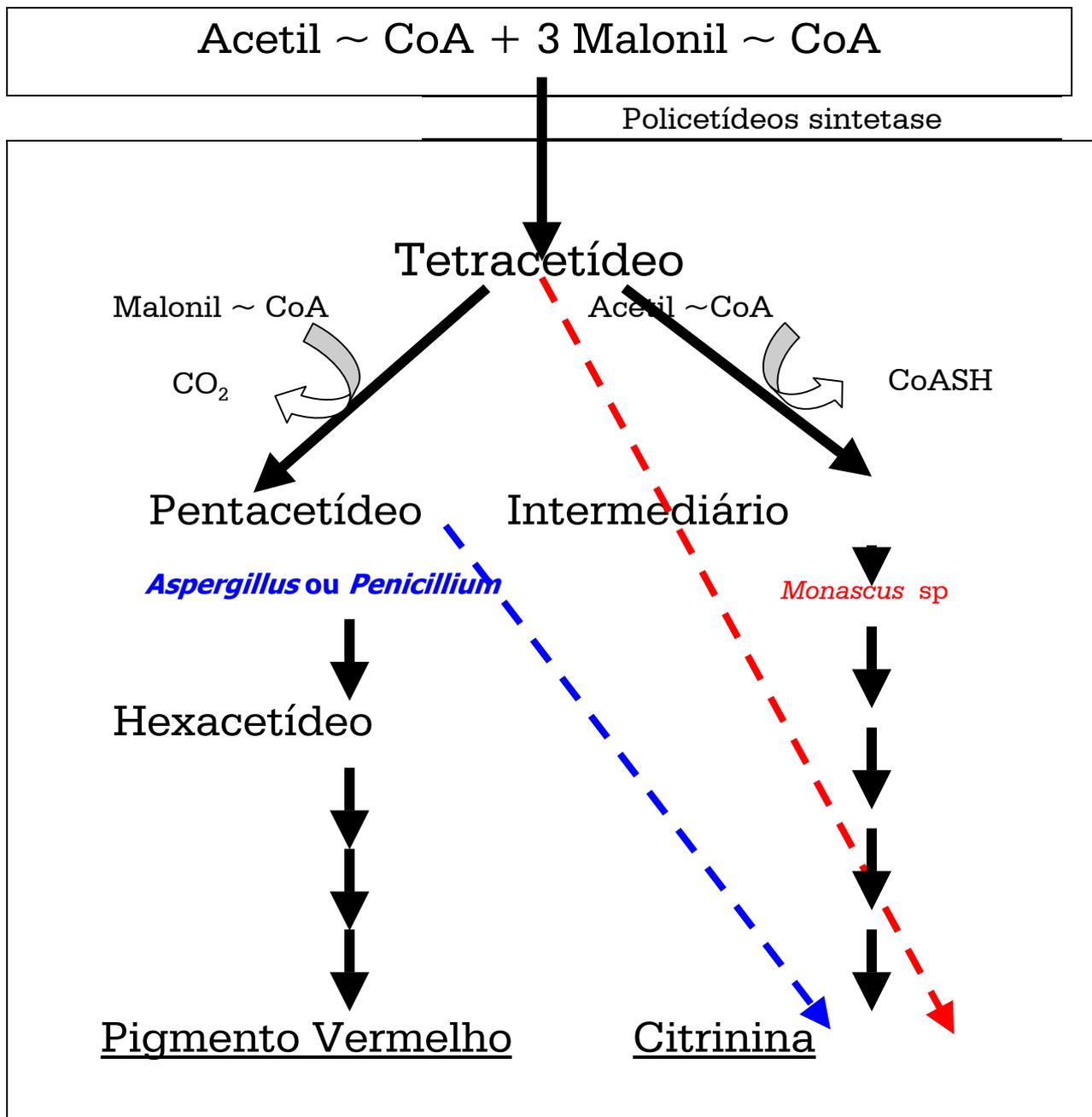


Figura VI.39 - Esquema de formação de citrinina e pigmentos vermelhos a partir da condensação de 1 molécula de acetil CoA e 3 moléculas de malonil CoA (Fonte: HAJJAJ, 1999a).

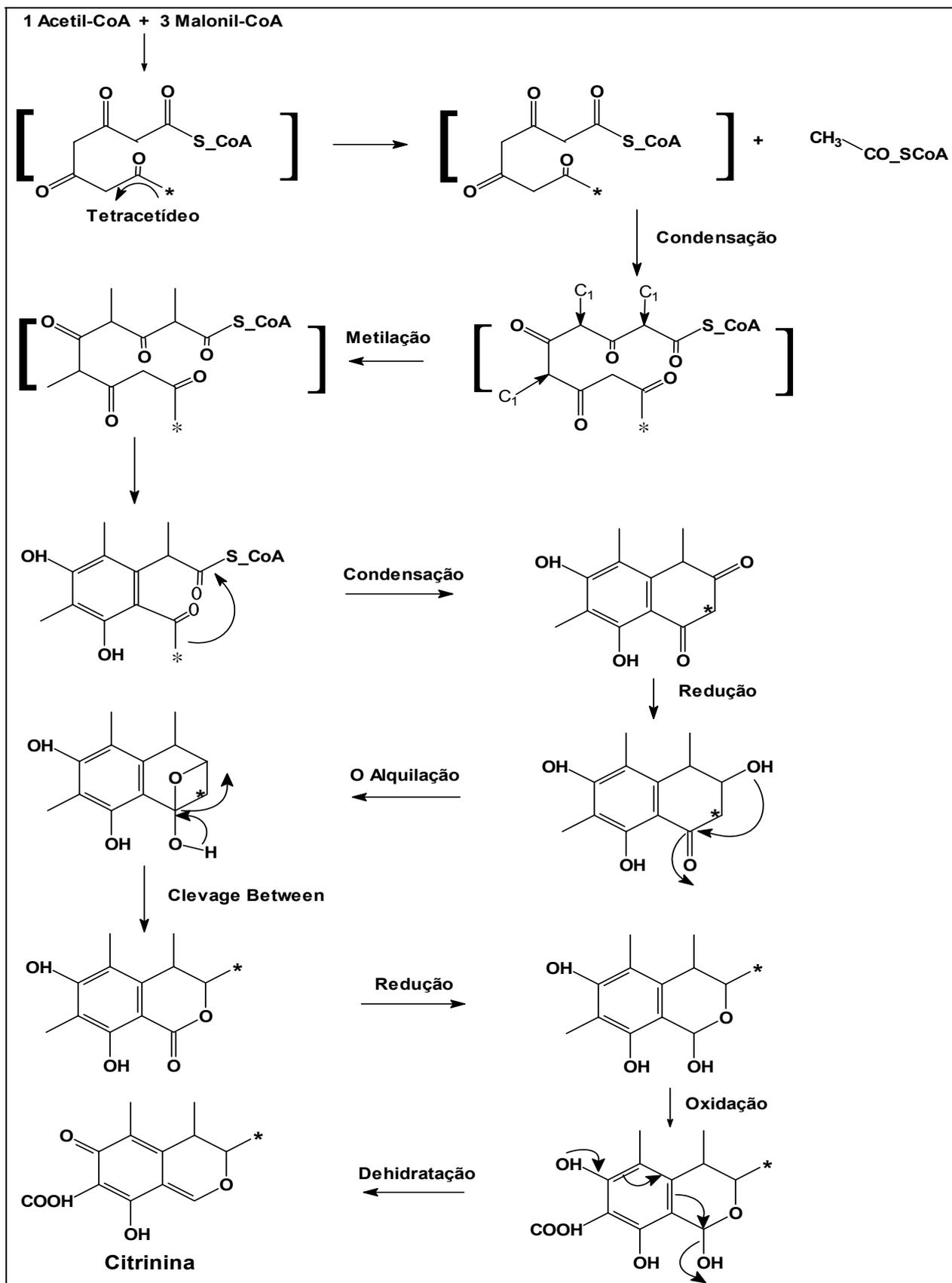


Figura VI.40 - Reações químicas ocorridas para formação de citrinina (HAJJAJ, 1999a).

Foi verificado por HAJJAJ et al. (1999a) que, para que ocorra a síntese de unidades cromóforas pelos fungos *Aspergillus* e *Monascus*, é preciso que uma molécula de um policetídeo (hexacetídeo) se ligue a um ácido graxo. O ácido graxo, quando é adicionado ao meio de cultivo, impede que novas moléculas de ácidos graxos sejam formadas pela via dos policetídeos, isto ocorre naturalmente para que os fungos economizem energia. Assim, a formação de pigmentos vermelhos é beneficiada e a produção de citrinina diminuída. Além do mais, como resultado da degradação do ácido graxo, há formação de peróxido de hidrogênio, que inibe a formação de citrinina (HAJJAJ, BLANC, GROUSSAC et al., 1999a).

A ausência de citrinina em produtos industrializados pode ser explicada por fenômenos de detoxificação pós-produção, indispensável para se conseguir uma maneira de se evitar a síntese deste composto tóxico (HWANG e HSEU, 1980; BLANC, 1998; MA, LI, YE et al., 2000; ZOCHLING, MURKOVIC e PFANNHAUSER, 2002). São consideradas doses letais valores entre 10 e 100 mg/kg de massa corporal, determinadas em camundongos e ratos. Embora tais doses letais dificilmente possam ser atingidas no uso de extratos de *Monascus*, é importante selecionar cepas e condições de cultivo que minimizem a formação deste metabólito (LIU BH, 2005).

A citrinina possui atividades fungicidas e bactericidas (Tabela VI.13), e é testada atualmente sua aplicação no controle biológico como alternativa atrativa ou complementar para o controle das doenças de plantas, sem o impacto negativo imposto pelo controle químico (SHIRAKAWA, GAYLARDE, GAYLARDE et al., 2002; WANG, DOMINGUEZ-ESPINOSA, LEONARD et al., 2002; WANG, HSIAO e CHANG, 2002).

Tabela V.13 - Bactérias sensíveis à ação antimicrobiana produzida por *Monascus purpureus* CCRC 31499 Fonte: (SABATER-VILAR, MAAS e FINK-GREMMELS, 1999).

Cepas	Zona de inibição (cm) +/- S.E.M (n=3)
<i>B. subtilis</i> CCRC10255	1,0 ± 0,1
<i>B. subtilis</i> W-113	1,5 ± 0,3
<i>B. cereus</i> CCRC10603	1,2 ± 0,2
<i>B. cereus</i> CCRC15323	1,4 ± 0,2
<i>E. coli</i> CCRC13086	0,5 ± 0,1
<i>E. coli</i> CCRC13095	0,3 ± 0,1
<i>P. aeruginosa</i> M=1001	1,6 ± 0,2
<i>P. aeruginosa</i> K-187	0,5 ± 0,1
<i>S. aureus</i> CCRC10780	0,8 ± 0,2
<i>S. aureus</i> CCRC10777	0,2 ± 0,1
<i>S. griseus</i> CCRC11480	0
<i>S. hygroscopicus</i> CCRC12209	0,3 ± 0,1
<i>A. niger</i> CCRC30201	0,4 ± 0,1
<i>F. oxysporum</i>	3,4 ± 0,4
<i>F. solani</i>	2,9 ± 0,3
<i>M. pilosus</i> CCRC31527	0,4 ± 0,1
<i>M. purpureus</i> CCRC31499	0,3 ± 0,1
<i>P. crysogenum</i> CCRC30298	0,6 ± 0,2
<i>S. cerevisiae</i> CCRC20577	0,5 ± 0,1

Com objetivo de estudar a produção de citrinina formada concomitantemente com o pigmento *Monascus*, foi verificada a influência da adição de ácidos graxos de cadeia curta (octanoato de sódio) ao meio de cultivo em biorreator.

### **VI.3 – METODOLOGIA**

**Pré-inóculo:** aos tubos de ensaio contendo culturas de *Monascus ruber* CCT 3802 (7 dias a 30 °C) foram adicionados 3 a 4 ml de meio de fermentação, e a superfície da cultura foi raspada com pipeta Pasteur. A suspensão da cultura assim obtida foi transferida para frascos de Erlenmeyer aletados de 500 mL com o meio a ser estudado. A incubação foi realizada por 48 horas, sob frequência de agitação de 160 min<sup>-1</sup> e temperatura de 30°C (OROZCO et al., 2003).

**Inóculo:** 400 mL de pré-inóculo foi adicionado diretamente ao biorreator contendo 4L de meio de cultivo.

**Meio de Cultivo A (glicose e sais)** – Meio segundo Pastrana:(PASTRANA, BLANC, SANTERRE et al., 1995). Meio contendo, em gramas por litro de água destilada: glicose, 20; glutamato monossódico (GMS), 5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5; CaCl<sub>2</sub>, 0,1; MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 0,5; FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 0,01; ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 0,01 e MnSO<sub>4</sub>. H<sub>2</sub>O, 0,03.

**Meio de Cultivo B - Meio farelo de arroz parboilizado e glicose**

Meio contendo em gramas por litro de água destilada: glutamato monossódico (GMS), 5; farelo de arroz parboilizado, 25; e glicose, 5. O pH foi ajustado em 5,5 com ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>).

**Octanoato de sódio**

Foram testadas quatro concentrações de octanoato de sódio (1,0 mM, 1,5mM, 2,0 mM e 4 mM, baseado em estudos de Hajjaj et al (2004b).

A temperatura foi mantida constante em todos os experimentos a 30<sup>0</sup>C. A vazão específica de ar foi de 0,4 vvm (PEREIRA, OROZCO, TONSO et al., 2003). A frequência de agitação utilizada foi de 300, baseado em estudos de PEREIRA et al., 2003. O controle de formação de espuma foi realizado com antiespumante polipropileno glicol (AVERAGE M<sub>n</sub> ca.2.000 - ALDRICH CHEMICAL COMPANY, INC.).

Foram realizados oito experimentos, sendo quatro em meio de cultivo A (glicose) variando as concentrações de octanoato de sódio (1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 mM) e quatro em meio de cultivo B (farelo de arroz e glicose) nas mesmas concentrações utilizadas no meio A.

Cabe ressaltar que, a adição do octanoato de sódio foi feita após 24 h de cultivo, para evitar um efeito inibitório no crescimento do *Monascus ruber*. Pois, segundo relatos da bibliografia o octanoato de sódio possui ação fungicida contra leveduras *in vitro* em apenas 60 minutos com 100% das células de leveduriformes (GUTIERREZ, 1993).

## VI.4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura VI.41 demonstra o efeito da concentração de octanoato de sódio na produção de pigmentos vermelhos hidrossolúveis em meio com glicose a 20 g/L e farelo de arroz a 25 g/L.

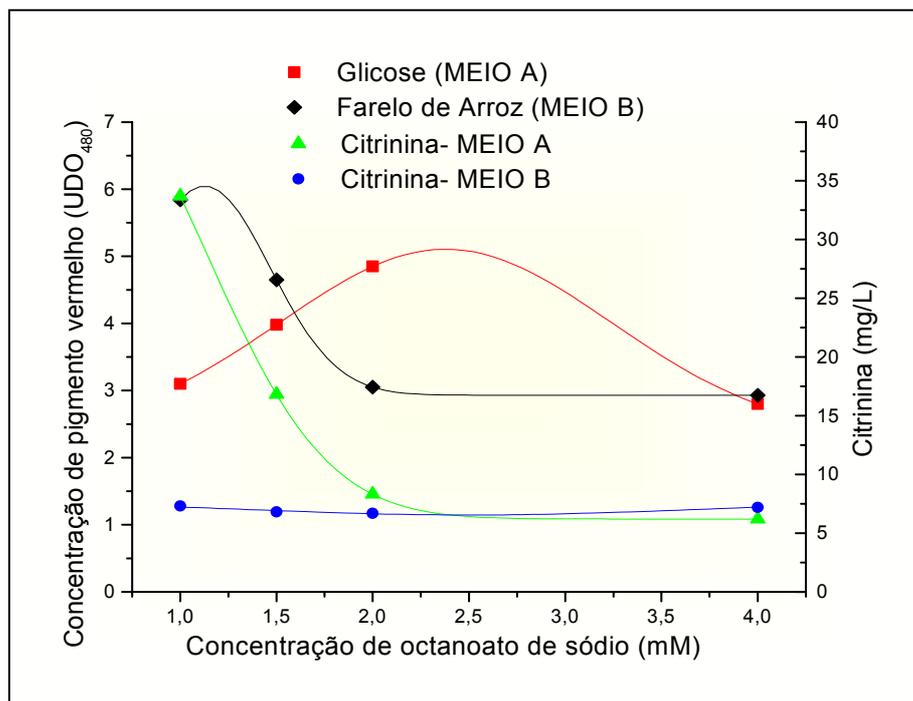


Figura VI.41 - Efeito da concentração de octanoato de sódio sobre a produção de pigmentos vermelhos e citrinina no cultivo de *Monascus ruber* em presença de glicose (MEIO A - meio sintético contendo glicose (20 g/L), glicina (5 g/L) e sais) e farelo de arroz (MEIO B - meio complexo contendo farelo de arroz (25 g/L), glicose (5 g/L) e glicina (5 g/L)). Em ambos os experimentos o volume útil foi de 4L em biorreator. O pH inicial foi 5,5, não sendo controlado durante o processo em 76 horas de cultivo.

Observa-se um aumento da produção de pigmentos vermelhos com 2,0 mM de octanoato de sódio (4,85 UDO<sub>480</sub>), e a redução da concentração de citrinina nos meios de cultivo contendo 20 g/L de glicose. Com 4 mM de octanoato de sódio ocorreu um efeito inibitório da formação de pigmentos vermelhos (2,8 UDO<sub>480</sub>) nas mesmas condições. Nos cultivos contendo farelo de arroz, observa-se um efeito inibitório do octanoato de sódio sobre a produção de pigmentos vermelhos, por outro lado, não houve alteração da concentração de citrinina, permanecendo inalterada em valores aproximados de 7,0 mg/L.

Foi realizada a cinética de produção de pigmento vermelho e citrinina durante o cultivo submerso do *Monascus ruber* em fermentador (BIOFLO III), cultivando-o na ausência (Figura VI.42) e na presença de 2 mM de octanoato de sódio (Figura VI.43). A adição de

octanoato de sódio foi feita baseada na análise morfológica do fungo. No período em que o número de cleistotécios observados ao microscópio óptico aumentou, foi considerado como “fase de produção de pigmento *Monascus*”. Os meios de cultivo utilizados foram o meio sintético contendo glicose (20 g/L), glicina (5 g/L) e sais, com e sem adição de octanoato de sódio, e o meio contendo farelo de arroz (25 g/L), glicose (5 g/L) e glicina (5 g/L), com e sem adição de octanoato de sódio, respectivamente, num volume útil de 4L. O pH inicial foi 5,5, não sendo controlado durante os ensaios e a vazão específica de ar foi de 0,4 vvm à temperatura de 30°C.

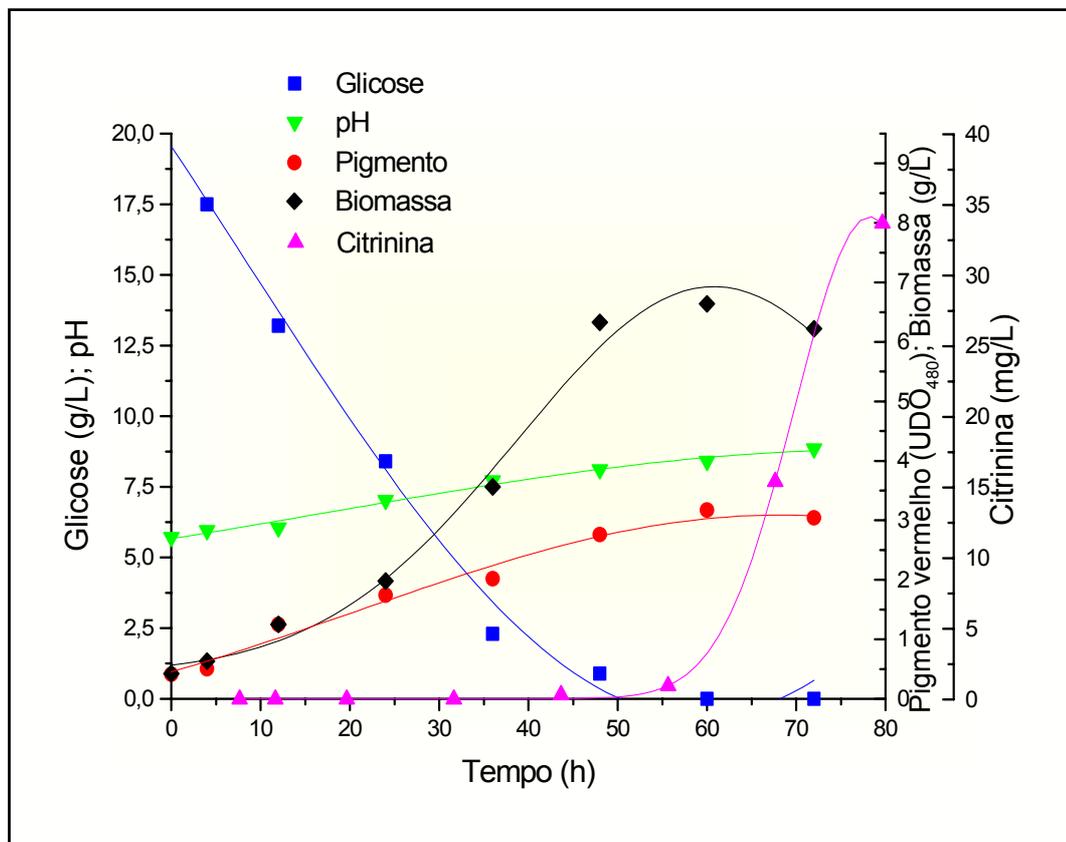


Figura VI.42 - Cinética de produção de pigmentos vermelhos durante cultivo descontínuo em biorreator do *Monascus ruber* em meio sintético contendo glicose (20 g/L), glicina (5 g/L) e sais, na **ausência** de octanoato de sódio. O pH inicial foi de 5,5, não sendo controlado durante o processo.

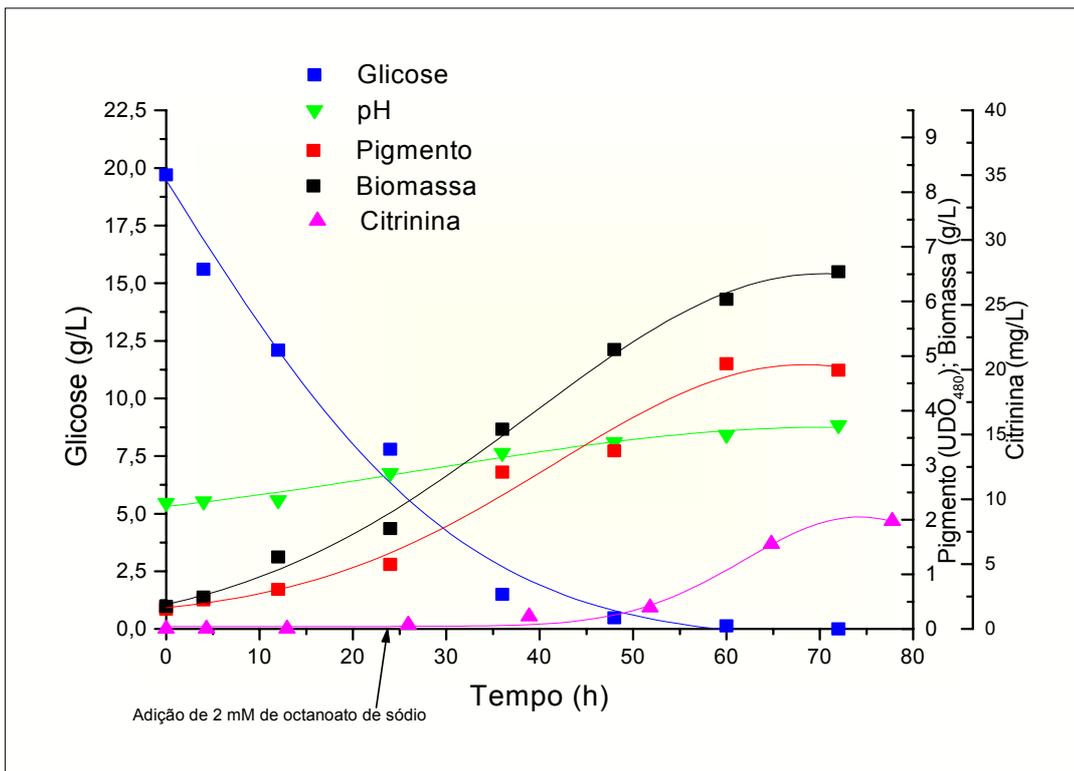


Figura VI.43 - Cinética de produção de pigmentos vermelhos durante cultivo des

contínuo em biorreator do *Monascus ruber* em meio sintético contendo glicose (20 g/L), glicina (5 g/L) e sais, na **presença** de de octanoato de sódio (2 mM). O pH inicial foi de 5,5, não sendo controlado durante o processo.

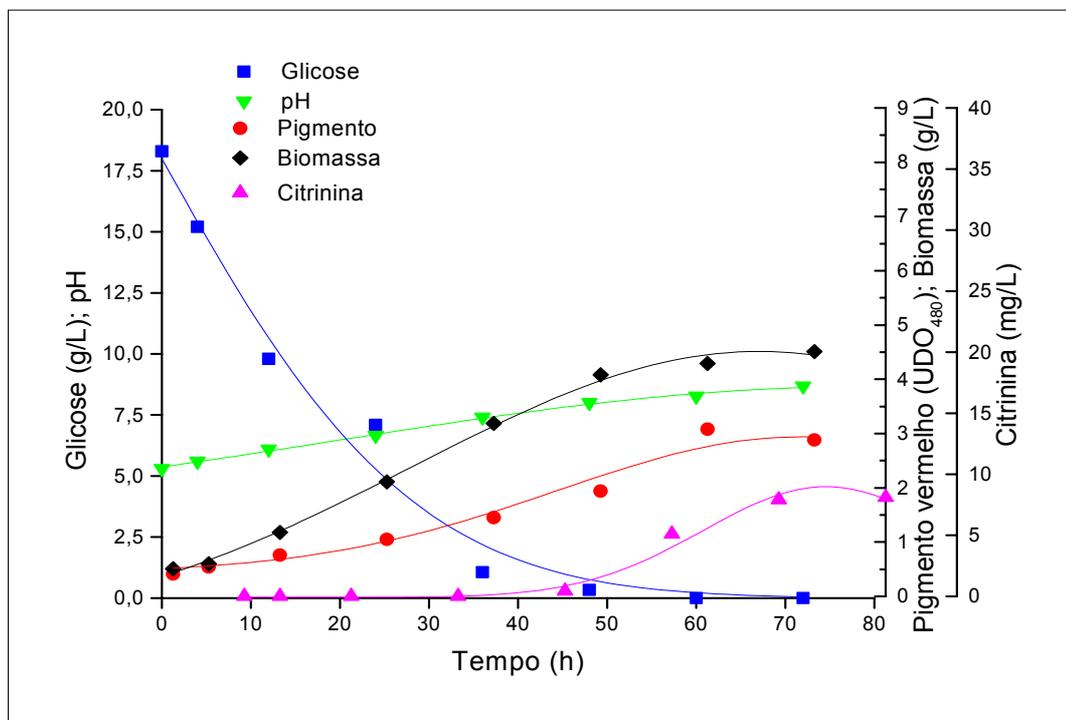


Figura VI.44 - Cinética de produção de pigmento vermelho durante cultivo descontinuo em biorreator do *Monascus ruber* em meio complexo contendo farelo de arroz (25 g/L), glicose (5 g/L) e glicina (5 g/L), na **ausência** de de octanoato de sódio. O pH inicial foi de 5,5, não sendo controlado durante o processo e a vazão específica de ar foi de 0,4 vvm à temperatura de 30°C.

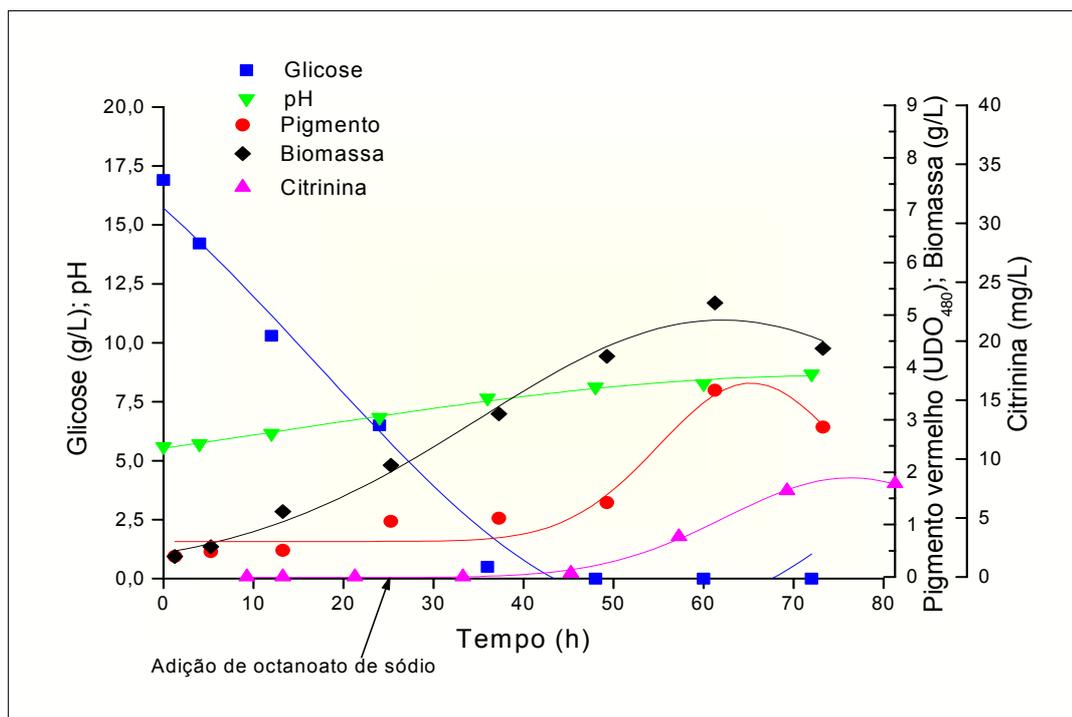


Figura VI.45 - Cinética de produção de pigmento vermelho durante cultivo descontínuo em biorreator do *Monascus ruber* em meio complexo contendo farelo de arroz (25 g/L), glicose (5 g/L) e glicina (5 g/L), na **presença** de octanoato de sódio (2 mM). O pH inicial foi de 5,5, não sendo controlado durante o processo e a vazão específica de ar foi de 0,4 vvm à temperatura de 30°C.

Observa-se pela Figura VI.45 que em meio de cultivo complexo contendo farelo de arroz (25 g/L), ocorreu uma diminuição da formação de pigmento vermelho (quando comparado ao ensaio representado pela Figura VI.44) e a concentração de citrinina não foi alterada, nas condições de cultivo contendo octanoato de sódio.

HAJJAJ et al. (2000b) encontraram resultados semelhantes com relação à influência da adição de octanoato de sódio (2 mM) sobre a produção de pigmentos vermelhos e citrinina. Porém, a produção de pigmentos foi favorecida apenas para a glicose (Figura VI.43) como fonte de carbono, não para o farelo de arroz (Figura VI.45) como principal substrato. Relatos bibliográficos, de estudos contendo arroz cozido como principal fonte de carbono, afirmam que este substrato produz concentrações reduzidas de citrinina independentemente da adição ou não de ácidos graxos. No entanto, está relacionado com o tipo de fonte de nitrogênio adicionado ao meio. Neste trabalho, os autores encontraram concentrações de citrinina que variaram entre 900 e 1190 ppm (BAIPONG e PINTHONG, 2001).

Nos estudos relatados por KILLIKIAN (2002) utilizando diversas cepas de *Monascus*, a autora encontrou valores de citrinina que variaram entre 0,47 e 47,71 mg/L em estudos utilizando também biorreator tipo Bioflo III nas seguintes condições: frequência de agitação

300 rpm, pH inicial 5,5, temperatura de crescimento 30°C e 0,4 L/min de aeração e 4 litros de volume útil.

Comparando-se as concentrações de citrinina (8,3 mg/L e 7,9 mg/L respectivamente) encontradas neste estudo (tanto com glicose e octanoato de sódio (2 mM), quanto em farelo de arroz sem octanoato de sódio) com os ensaios realizados por BLANC et al, (1998) (54 mg/L) (Tabela VI.9), podemos observar que estudos realizados com *Monascus ruber* CCT 3802 nas condições apresentadas, tanto em glicose quanto em farelo de arroz, são muito mais promissores para o processo industrial.

É observado nos diversos relatos bibliográficos que não existe uma padronização nos métodos de dosagem de citrinina (TLC, HPLC e solventes utilizados) além das diferentes unidades de concentração desta micotoxina (g/gps; mg/L, ppm) encontrados nos ensaios de cultivos das várias espécies de *Monascus*, dificultando assim estudos comparativos (BLANC, LORET e GOMA, 1995; HAMDI, BLANC e GOMA, 1996; ABRAMSON, USLEBER e MARTLBAUER, 1999; BAEDYANONDA, PHOOLPHUNDH e WONGWICHARN, 2000; BEGUM e SAMAJPATI, 2000; HAJJAJ, BLANC, GROUSSAC et al., 2000a; BAIPONG e PINTHONG, 2001; BAILLY, QUERIN, LE BARS-BAILLY et al., 2002; PEREIRA, OROZCO, TONSO et al., 2003).

## **VI.5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A adição do ácido graxo exógeno no cultivo de *Monascus ruber* em meio contendo 20 g/L de glicose, além de promover um aumento da produção de pigmentos vermelhos em cultivo submerso, reduziu a concentração de citrinina, comprovando assim os relatos bibliográficos (HAJJAJ et al., 2000b). Porém, não influenciou os meios de cultivos contendo farelo de arroz como principal fonte de carbono.

Este estudo comprova que a redução da produção de citrinina por adição de ácido graxo (octanoato de sódio) depende do tipo de substrato utilizado no processo fermentativo.

A concentração máxima de citrinina nos meios de cultivo contendo farelo de arroz parboilizado, na concentração de 25 g/L, foi de 7,3 mg/L, concentração muito baixa se comparada com estudos de BLANC et al.(1998).

"Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar, se não fosse o medo de tentar".  
William Shakespeare

## **CAPÍTULO VII – INFLUÊNCIA DO PH E DA FREQUÊNCIA DE AGITAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BIOPIGMENTOS EM BIORREATOR**

---

Neste capítulo, foi fundamentada a importância das etapas realizadas em frascos agitados, para aumento da escala de produção de pigmentos vermelhos em fermentador, estudando-se o pH e a frequência de agitação com o objetivo de aumentar a concentração de pigmentos vermelhos e minimizar a produção de citrinina.

## **VII.1 –VARIACÃO DA FREQUÊNCIA DE AGITAÇÃO SOB A FORMAÇÃO DE PIGMENTOS**

### **VII.1.1 - Introdução**

Os estudos realizados em reator do tipo BIOFLO III foram baseados nos estudos de PEREIRA (2003) e OROZCO (2003) que utilizaram glicose (20 g/L) como principal fonte de carbono. Neste estudo, aqui apresentado, foi utilizado extrato de farelo de arroz como principal fonte de carbono em um reator também do tipo BIOFLO III.

Segundo PEREIRA et al.(2003) foi observado um efeito significativo da frequência de agitação sobre a produção de pigmentos e produção de citrinina.

O aumento da frequência de agitação pode melhorar a transferência de oxigênio, contudo essa variável é diretamente proporcional à força de cisalhamento e está estritamente relacionada à morfologia de fungos filamentosos (AMANULLAH, BLAIR, NIENOW et al., 1999).

### **VII.1.2 – Resultados e Discussão**

Neste estudo foram testadas duas frequências de agitação, 300 e 500 min<sup>-1</sup> em biorreator do tipo BIOFLO III (Tabela VII.14). Manteve-se constante a vazão específica de ar em 0,4 vvm. O volume de meio foi de 4L, contendo como constituintes extrato de farelo de arroz (EFAP) (100 g/L), glicina (5 g/L) e glicose (5 g/L) em pH inicial 5.5 ou pH 8,0 com e sem controle (ácido fosfórico 30% ou NAOH 30%). Os perfis de crescimento, produção de pigmentos, produção de citrinina para cada ensaio são apresentados nas Figuras VII.46, VII.47 e VII.48. Nestes estudos foram avaliadas também as características morfológicas do fungo, levando-se em conta o número de cleistotécios presentes em cada amostra como controle da fase de produção de pigmentos (Capítulo IV.1.7).

Tabela VII.14 – Descrição dos ensaios realizados.

<b>Ensaio</b>	<b>Fase Crescimento (min<sup>-1</sup>)</b>	<b>Fase Produção (min<sup>-1</sup>)</b>
EFAP500	500	500
EFAP300	300	300
EFAP500-300	500	300

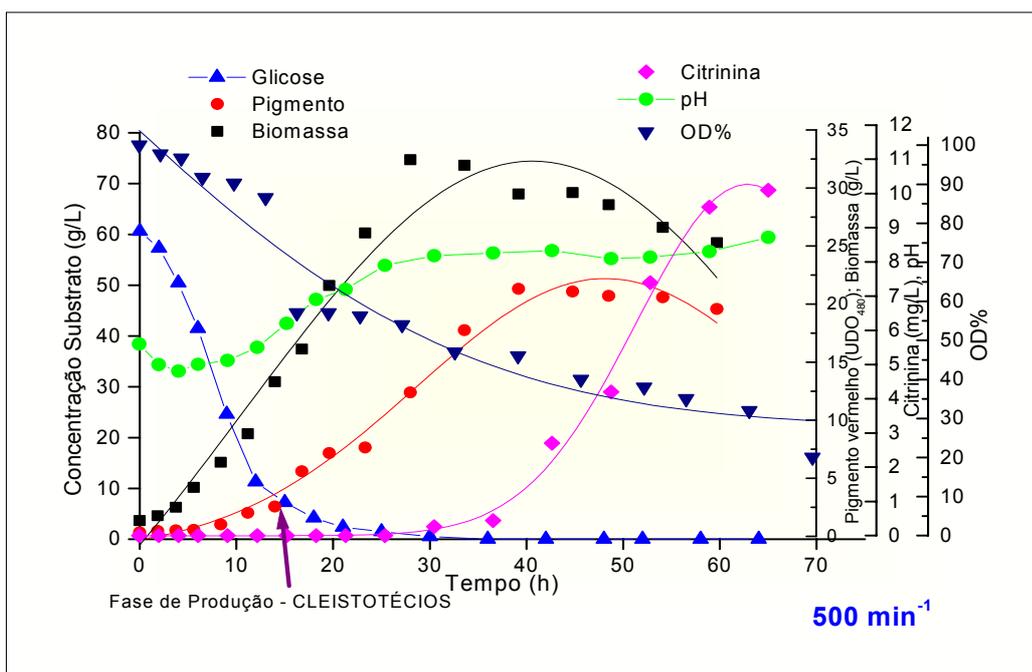


Figura VII.46 – Cinética da formação de pigmentos vermelhos, citrinina, biomassa, pH, consumo de substrato e percentual de saturação de oxigênio para o cultivo conduzido em farelo de arroz (100 g/L), glicina (5 g/L) e glicose (5 g/L) em pH inicial 5.5 sem controle, à frequência de agitação de 500 min<sup>-1</sup>, vazão específica de ar 0,4 vvm e 30°C.

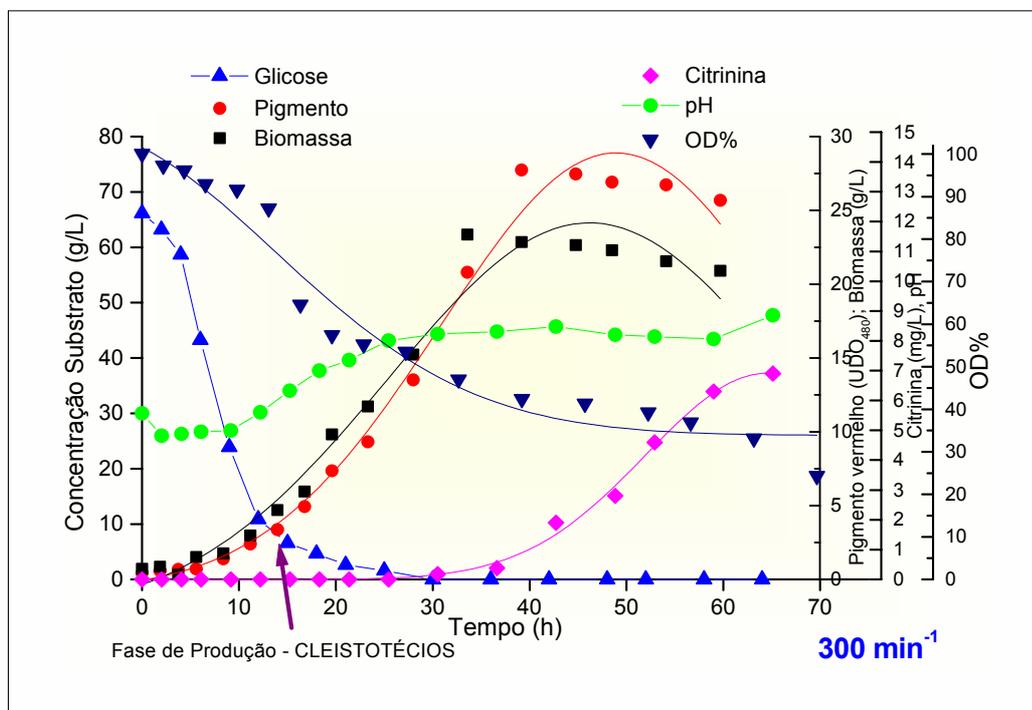


Figura VII.47 - Cinética da formação de pigmentos vermelhos, citrinina, biomassa, pH, consumo de substrato e percentual de saturação de oxigênio para o cultivo conduzido em farelo de arroz (100 g/L), glicina (5 g/L) e glicose (5 g/L) em pH inicial 5.5 sem controle, à frequência de agitação de 300 min<sup>-1</sup>, vazão específica de ar 0,4 vvm e 30°C.

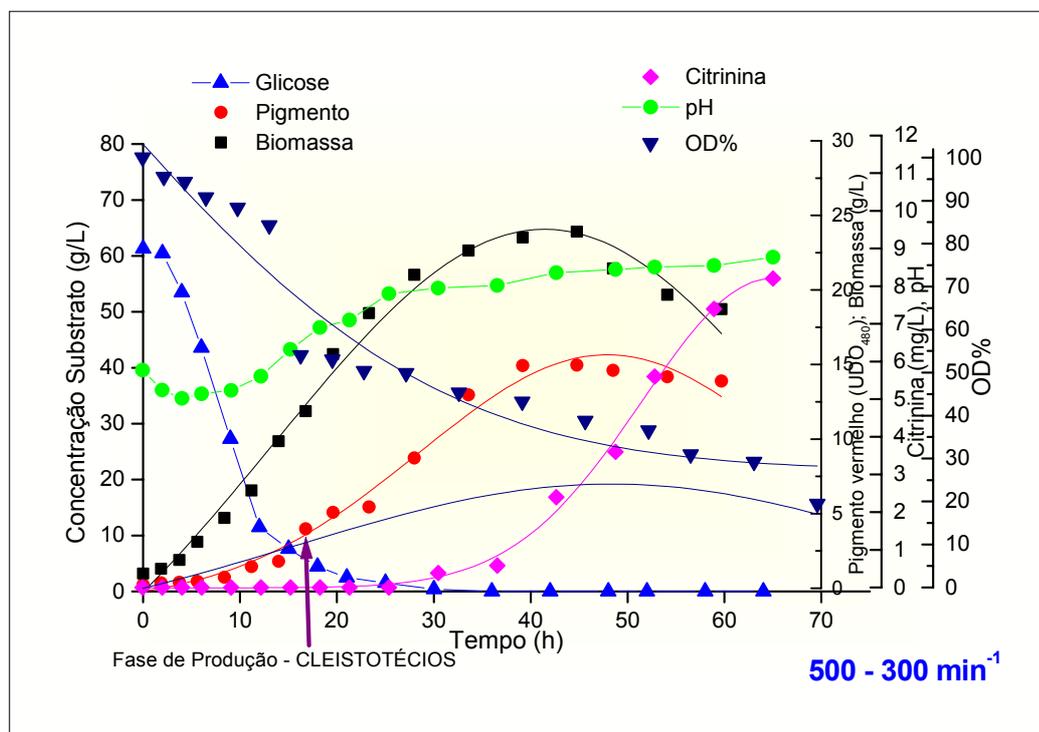


Figura VII.48 - Cinética da formação de pigmentos vermelhos, citrinina, biomassa, pH, consumo de substrato e percentual de saturação de oxigênio para o cultivo conduzido em farelo de arroz (100 g/L), glicina (5 g/L) e glicose (5 g/L) em pH inicial 5.5 sem controle, à frequência de agitação de 500 min<sup>-1</sup> (fase de crescimento) e 300 min<sup>-1</sup> (fase de produção), vazão específica de ar 0,4 vvm e 30°C.

A Tabela VII.15 apresenta um resumo dos parâmetros cinéticos máximos encontrados nos ensaios das figuras VII.46, VII.47 e VII.48, respectivamente.

Tabela VII.15 – Parâmetros cinéticos máximos para produção de pigmentos vermelhos.

Parâmetros	500 min <sup>-1</sup>	300 min <sup>-1</sup>	500-300 min <sup>-1</sup>
$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )*	0,124*	0,121*	0,152*
$Y_{X/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )	0,513	0,343	0,373
$P_{UD0480}$ (UD0480.h <sup>-1</sup> )	0,51	0,66	0,31
[Citrinina <sub>Max</sub> ] (mg/L)	10,1	6,9	8,2

\* Os cálculos encontram-se no Apêndice.

Analisando-se a cinética de crescimento para as três variações de frequência de agitação, fica evidenciada a importância deste parâmetro para que ocorra uma máxima da produção de pigmentos vermelhos e redução da concentração de citrinina. Embora 500 min<sup>-1</sup> de agitação proporcione a maior velocidade específica de crescimento celular e o maior fator de conversão de substrato em células (em relação ao ensaio 500-300 min<sup>-1</sup>), a produtividade média em pigmentos foi menor que à frequência de agitação de 300 min<sup>-1</sup>.

Neste ensaio ( $300 \text{ min}^{-1}$ ) foi encontrada a produtividade média de  $0,66 \text{ UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$  e a menor concentração de citrinina.

A variação da frequência de agitação conduziu a uma maior velocidade de crescimento celular. Porém, além da produtividade em pigmentos ter sido reduzida pela metade, favoreceu a produção de citrinina.

É notado também, que nos três ensaios realizados, a concentração máxima de pigmentos coincidiu com uma saturação máxima de oxigênio de aproximadamente 40%, indicando que um maior controle da frequência de agitação e vazão dos gases possa proporcionar um melhor rendimento no processo para produção de pigmentos.

## **VII.2 – ESTUDOS DO CONTROLE DO PH PARA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS**

### **VII.2.1 - Introdução**

O objetivo principal deste estudo foi investigar a influência do controle (ou não) do pH do meio de cultivo sobre a produção de pigmentos vermelhos produzidos por *Monascus ruber* em cultivo submerso, utilizando extrato farelo de arroz parboilizado na concentração de 100 g/L, verificando a influência do controle (ou não) do pH no meio de cultivo. Os parâmetros de cultivo para a produção deste corante também foram investigados.

O pH de cultivo provavelmente assume uma importância fundamental para a ativação de enzimas que participam de pontos-chave do metabolismo secundário em fungos filamentosos. Conseqüentemente, parece claro que a adequação e o controle do valor do pH em cultivos de *Monascus* sp. são fatores importantes para favorecer a obtenção de concentrações maiores de pigmentos vermelhos, provavelmente de uma maneira similar à verificada em *A. nidulans* para a produção de penicilina (EL-KADY, EL-MARAGHY e ZOHRI, 1994). Em se tratando do gênero *Monascus* sp., sabe-se que variações no pH do meio de cultivo também alteram a proporção entre os diversos pigmentos produzidos, bem como a sua liberação ao meio extracelular (principalmente dos pigmentos vermelhos) (OROZCO, PEREIRA e KILIKIAN, 2003).

Foi observado em todos os ensaios fermentativos realizados neste estudo que a produção de pigmentos vermelhos ocorreu em valores de pH alcalinos. Os estudos foram realizados em biorreator utilizando como referência o ensaio com  $300 \text{ min}^{-1}$  de frequência de agitação. O pH foi controlado em 5,5 com ácido fosfórico 30% ou 8,0 com hidróxido de sódio 30%.

## VII.2.2 – Resultados e Discussão

Foram realizados quatro ensaios em biorreator (BIOFLO III) tendo como estudo: o controle do pH em 5,5 ou 8,0 e a evolução do cultivo sem controle de pH. Em um dos ensaios (EFAPZn) foi verificado o efeito da adição de sulfato de zinco sobre a produção de pigmentos vermelhos. A Tabela VII.16 apresenta a descrição dos ensaios realizados.

Tabela VII.16 - Descrição dos ensaios realizados.

Ensaio	Ph inicial	pH Controlado	Zn (0,01 g/L)
EFAP	5,5	NÃO	-
EFAP5,5	5,5	SIM	-
EFAP8,0	8,0	SIM	
EFAPZn	5,5	NÃO	0,01

Em todos os ensaios foram mantidas as seguintes condições: temperatura, 30 °C; frequência de agitação, 300 min<sup>-1</sup>; vazão dos gases e 0,4 vvm. O volume de meio foi de 4L.

A Tabela VII.17 apresenta o resumo dos parâmetros de cultivo máximos encontrados nos quatro ensaios representados pelas Figuras 47, 49, 50 e 51 respectivamente (Obs.a Figura VII.46 trata-se da mesma figura apresentada no item anterior).

Tabela VII.17 – Parâmetros cinéticos máximos para produção de pigmentos vermelhos.

Parâmetros	EFAP (s/ controle de pH) (Fig 47)*	EFAP 5,5 c/ controle de pH (Fig 49)*	EFAP 8,0 c/ controle de pH (Fig 50)	EFAP Zn (Fig 51)*
$\mu_{max}$ (h <sup>-1</sup> )*	0,121	0,148	0,124	0,148 h <sup>-1</sup>
$Y_{X/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )	0,34	0,31	0,18	0,46
$P_{UDO480}$ (UDO <sub>480</sub> .h <sup>-1</sup> )	0,66	0,18	0,17	0,84
[Citrinina <sub>Max</sub> ](mg/L)	6,9	7,5	7,4	7,0
Pigmentos (UDO <sub>480</sub> )	27,73	9,36	6,32	35.40

\* Cálculos no Apêndice.

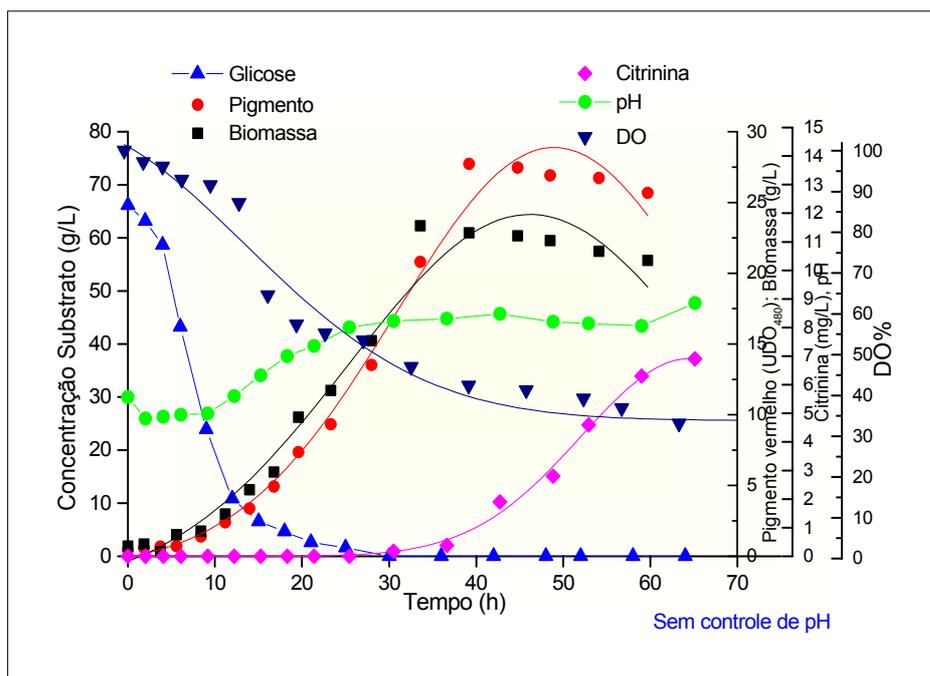


Figura VII.47 - Cinética da formação de pigmentos vermelhos, citrinina, biomassa, pH, consumo de substrato e percentual de saturação de oxigênio para o cultivo conduzido em farelo de arroz (100 g/L), glicina (5 g/L) e glicose (5 g/L) em pH inicial 5.5 **sem controle**, à frequência de agitação de  $300 \text{ min}^{-1}$ , vazão específica de ar  $0,4 \text{ vvm}$  e  $30^\circ\text{C}$ .

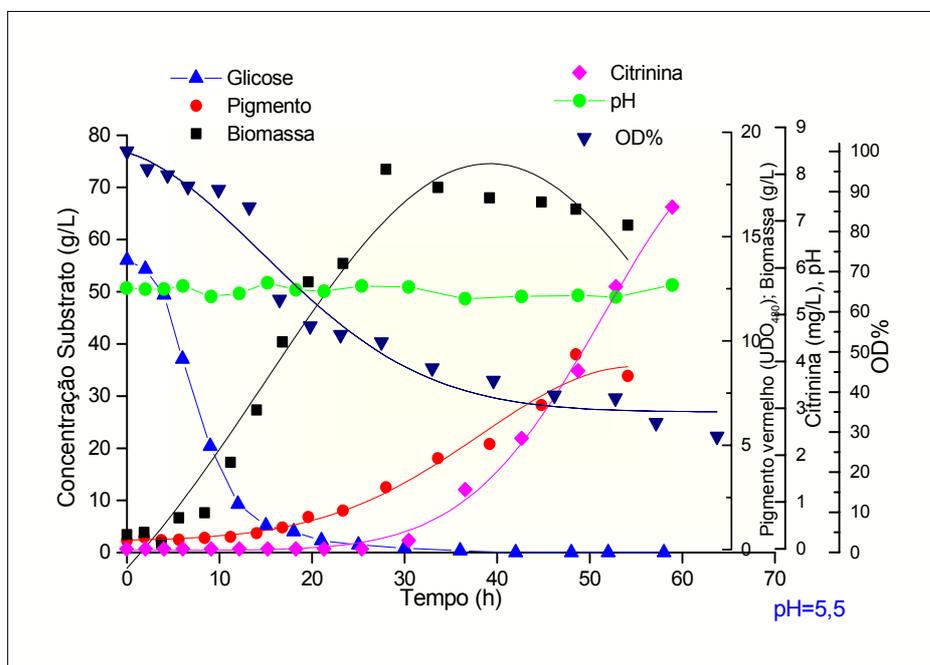


Figura VII.49 - Cinética da formação de pigmentos vermelhos, citrinina, biomassa, pH, consumo de substrato e percentual de saturação de oxigênio para o cultivo conduzido em farelo de arroz (100 g/L), glicina (5 g/L) e glicose (5 g/L), **com controle de pH (5,5)** e à frequência de agitação de  $300 \text{ min}^{-1}$ , vazão específica de ar  $0,4 \text{ vvm}$  e  $30^\circ\text{C}$ .

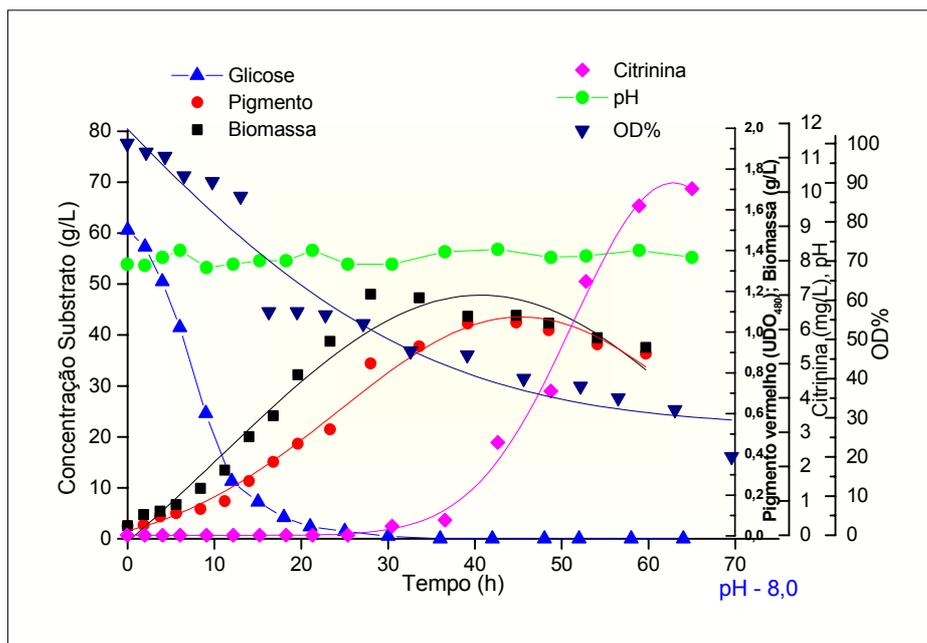


Figura VII.50 - Cinética da formação de pigmentos vermelhos, citrinina, biomassa, pH, consumo de substrato e percentual de saturação de oxigênio para o cultivo conduzido em farelo de arroz (100 g/L), glicina (5 g/L) e glicose (5 g/L), **com controle de pH (8,0)** e à frequência de agitação de  $300 \text{ min}^{-1}$ , vazão específica de ar  $0,4 \text{ vvm}$  e  $30^\circ\text{C}$ .

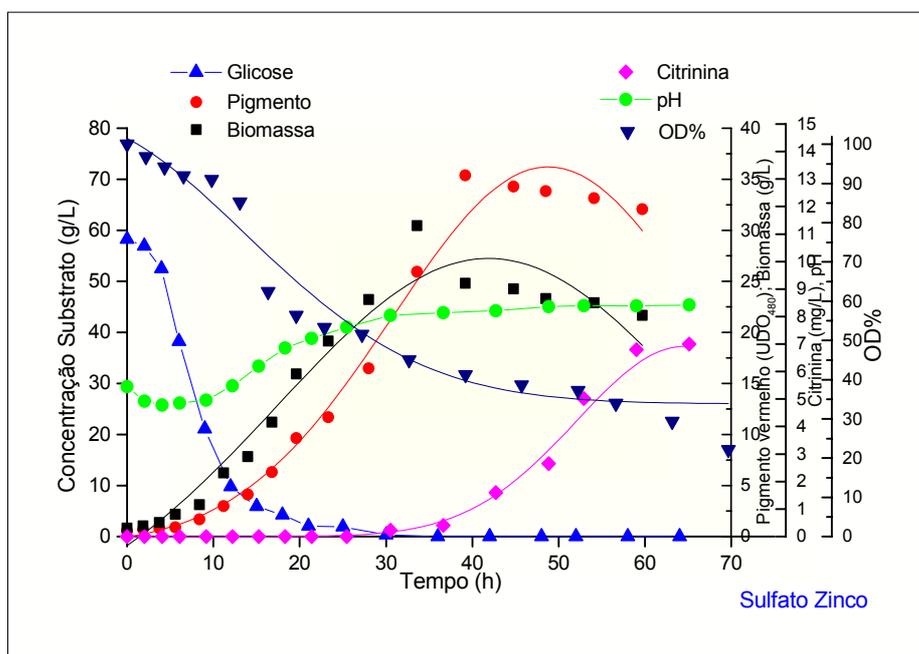


Figura VII.51 - Cinética da formação de pigmentos vermelhos, citrinina, biomassa, pH, consumo de substrato e percentual de saturação de oxigênio para o cultivo conduzido em farelo de arroz (100 g/L), glicina (5 g/L) e glicose (5 g/L), pH inicial de 5,5, sem controle e à frequência de agitação de  $300 \text{ min}^{-1}$ , vazão específica de ar  $0,4 \text{ vvm}$  e  $30^\circ\text{C}$ ., suplementado com sulfato de zinco.

Analisando-se a cinética de crescimento ilustrado pelos quatro gráficos, fica evidenciada a importância do pH no meio de cultivo para que ocorra maior produção de pigmentos vermelhos e aumento do crescimento celular.

Nos estudos de ORZOCO, PEREIRA et al. (2003) ficou também evidenciado que o melhor valor de pH para a fase de crescimento é em torno de 5,5, e para a fase de produção de pigmentos é em torno de 8,0. Os ensaios foram realizados utilizando *Monascus purpureus* sob condições controladas de pH. Nestes ensaios os valores encontrados de absorvância máxima de pigmentos vermelhos, ocorreram também em pH alcalino. Apesar do pH 5,5 ter favorecido o crescimento fúngico ( $\mu_{\max}$  0,148 h<sup>-1</sup>), a produtividade média em pigmentos vermelhos foi menor que nos ensaios sem controle de pH (0,18 g.h<sup>-1</sup>).

É importante salientar que, em pH ácidos, ocorre inibição da produção de pigmentos vermelhos (SLUGEN, D. M. E S.; ROSENBERG, M., 2002). Uma das hipóteses é que a liberação dos pigmentos intracelulares só se dê em valores de pH alcalinos, favorecendo ou o aumento da permeabilidade celular ou mesmo a lise celular. O mesmo já não acontece para o crescimento celular, o pH alcalinino desfavorece o crescimento fúngico.

Para melhorar a produção de pigmentos vermelhos, testou-se a suplementação do meio de cultivo com a adição de sulfato de zinco. Relatos bibliográficos em cultivo sólido com este fungo relatam que a suplementação com este metal favorece a produção de pigmentos vermelhos, principalmente por favorecer a atividade enzimática do fungo (SOUSA et al., 2001). Para tanto, foram considerados como condições de cultivo, a frequência de agitação 300 min<sup>-1</sup>, 0,4 vvm de vazão específica de ar, 100 g/L de extrato de farelo de arroz, 30°C de temperatura. Foi adicionado ao meio de cultivo 0,01 g/L de sulfato de zinco. O pH não foi controlado (Figura VII.51).

Confirmando relatos bibliográficos, a suplementação com sulfato de zinco não só favoreceu a produção de pigmentos vermelhos (35.4 UDO<sub>480</sub>) como também a velocidade específica de crescimento ( $\mu_{\max}$  0,148 h<sup>-1</sup>). O fator de conversão substrato em células neste ensaio também foi favorecido ( $Y_{X/S}$  = 0,46).

## **VII.2 – CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Embora 500 min<sup>-1</sup> de agitação proporcione a maior velocidade específica de crescimento celular e o maior fator de conversão de substrato em células, a produtividade em pigmentos foi menor que a frequência de agitação de 300 min<sup>-1</sup>.

A produtividade média em pigmentos vermelhos e a menor concentração de citrinina foram encontradas com a frequência de agitação de 300 min<sup>-1</sup>.

A variação da frequência de agitação conduziu uma maior velocidade de crescimento celular. Porém, além da produtividade em pigmentos ter sido reduzida pela metade, favoreceu a produção de citrinina.

Neste estudo ficou evidenciada a importância do pH no meio de cultivo para o aumento da produção de pigmentos vermelhos e favorecimento do crescimento celular. A adequação e o controle do valor do pH em cultivos de *Monascus ruber* são importantes para favorecer não só o crescimento celular como também a obtenção pigmentos vermelhos.

Em valores de pH ácidos ocorre inibição da produção de pigmentos vermelhos. Porém, o crescimento celular é favorecido nestes valores de pH.

A suplementação do meio de cultivo (extrato de farelo de arroz e glicina) com sulfato de zinco, aumentou o número de células e conseqüentemente a velocidade específica de crescimento ( $\mu_{\max}$  0,148 h<sup>-1</sup>). O fator de conversão substrato em células neste ensaio também foi favorecido ( $Y_{X/S}$  = 0,46).

"Não existe grandes talentos sem grande vontade".  
Honoré de Balzac

## **CAPÍTULO VIII - Considerações Finais do Trabalho, Conclusão e Perspectivas Para Novos Estudos**

---

Este trabalho inicia uma linha de pesquisa que tem como objetivo desenvolver o cultivo submerso de fungos filamentosos em biorreator. Para tanto, foi utilizado o fungo filamentoso *Monascus ruber*, com a finalidade de produção de pigmentos vermelhos. Cabe ressaltar que, os estudos com este fungo no Brasil, por técnicas de cultivo submerso, vêm sendo iniciados há pouco tempo. O pigmento *Monascus* é um produto de alto valor agregado, e apresenta grande interesse para a indústria alimentícia.

## **VIII. 1 – CONSIDERAÇÕES FINAIS DO TRABALHO**

Neste trabalho foi possível desenvolver algumas estratégias importantes para o aumento da produção de pigmentos vermelhos por *Monascus ruber* (CCT 3802), em cultivo submerso, a partir de substratos de baixo custo como o farelo de arroz parboilizado. Os principais resultados são detalhados abaixo.

1. Foi observado que é possível determinar as condições ótimas de crescimento e produção de pigmentos pelo fungo *Monascus*, monitorando-se as estruturas de frutificação e de conidiação. Foram observadas estruturas de reprodução sexuada (cleistotécios) em condições de limitação (fase de produção de pigmentos) e estruturas de reprodução assexuada (conídios) em não-limitação.
2. Os testes auxanográficos de produção de corante, utilizando diversos substratos, mostraram que o pigmento vermelho foi produzido, em quantidades expressivas, apenas nos meios contendo glicose, maltose, frutose e amido de arroz.
3. Foi possível identificar um substrato, de baixo custo, em que o fungo é capaz de produzir concentrações elevadas de pigmentos vermelhos, o farelo de arroz parboilizado, acrescido de glicose (que tem como função a redução da fase lag). Este meio, proporcionou, também, baixas concentrações de citrinina (aproximadamente 7,0 mg/L), muito mais baixas que as encontradas na literatura, sendo economicamente satisfatório, sob o ponto de vista industrial.
4. A glicina, em substituição do glutamato monossódico, favoreceu muito mais a formação do complexo *N-glutarilmonascorubramina* (complexos de pigmentos extracelulares solúveis em água), reduzindo assim, as etapas de extração do produto final.
5. A redução da produção de citrinina por adição de ácido graxo (octanoato de sódio) ocorreu em meio contendo glicose e não foi observada em meio contendo farelo de arroz.
6. Foi verificada a importância do pH no meio de cultivo, sendo o crescimento fúngico favorecido em pH ácido (5,5) e a produção de pigmento vermelho em pH alcalino (8,0). É importante salientar que esta variação é realizada fisiologicamente pelo próprio fungo (*Monascus ruber*), portanto, não havendo necessidade de controle.
7. A suplementação do meio de cultivo (extrato de farelo de arroz e glicina) com sulfato de zinco, aumentou o número de células e conseqüentemente a velocidade específica de crescimento ( $\mu_{\max}$  0,148 h<sup>-1</sup>). O fator de conversão substrato em células neste ensaio também foi favorecido ( $Y_{X/S}$  = 0,46).

## **VIII. 2 – CONCLUSÃO**

Os resultados encontrados neste trabalho são importantes, tanto para o emprego do cultivo submerso, como para fornecer dados bastante úteis para novos estudos em cultivos em meio sólido, permitindo concluir que é possível otimizar a produção de *Monascus* formada por *Monascus ruber*, com baixos teores de citrinina, em cultivo submerso, utilizando um substrato de baixo custo.

## **VIII. 2 – PERSPECTIVAS PARA NOVOS ESTUDOS**

1. Estudar novos substratos de baixo custo como, por exemplo, glicerol, resíduo da produção de biodiesel.
2. Estudar a produção de pigmentos vermelhos por *Monascus ruber* em reator do tipo *airlift*, comparando com os resultados encontrados em biorreator convencional (Tipo Bioflo III).
3. Estudar e controlar os parâmetros de agitação e aeração nos cultivos de *Monascus ruber* em meio submerso.
4. Fazer um *screening* de novas linhagens de *Monascus* produtoras de pigmentos vermelhos.
5. Verificar a viabilidade de produção de lovastatina e/ou outras moléculas bioativas formadas por *Monascus ruber* CCT 3802.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS

ABRAMSON, D., E. USLEBER e E. MARTLBAUER. Rapid determination of citrinin in corn by fluorescence liquid chromatography and enzyme immunoassay. Journal of AOAC International, v.82, n.6, Nov-Dec, p.1353-1356. 1999.

ABRUNHOSA, L., R. R. PATERSON, Z. KOZAKIEWICZ, et al. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. Letters Applied Microbiology, v.32, n.4, Apr, p.240-242. 2001.

ALEXOUPoulos, C. J., C. W. MIMS e M. BLACKWELL. Introductory Mycology. New York. EUA: John Wiley and Sons. 1996. 868 p.

ALLOK, G. M. B. H. *Monascus*: Disponível em: [http://www.allok.com/deutsch/pdf/monascus\\_monograph.pdf](http://www.allok.com/deutsch/pdf/monascus_monograph.pdf). 2004 1998.

\_\_\_\_\_. *Monascus* - Scientific Statements and Findings: Disponível em: <http://allok-e.mandt.de/egeschite.htm> 2001.

AMANULLAH, A., R. BLAIR, A. W. NIENOW, et al. Effects of agitation intensity on mycelial morphology and protein production in chemostat cultures of recombinant *Aspergillus oryzae*. Biotechnology and bioengineering, v.v. 62, p.p.434-446. 1999.

ANVISA. Legislação/Alimentos. Resolução nº 382, de 05 de agosto de 1999. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos.html>>. 2003 2001.

\_\_\_\_\_. Legislação/Alimentos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos.html>>. 2003 2003.

ATROSHI, F., A. RIZZO, T. WESTERMARCK, et al. Antioxidant nutrients and mycotoxins. Toxicology, v.180, n.2, Nov 15, p.151-167. 2002.

AZEREDO, V. B. D., M.M.; LOBO, F.P.; BOAVENTURA, G.T.; SOUZA, C.F.M. MULTIMISTURA: UMA ALTERNATIVA ALIMENTAR ? Livro de Resumos do VI Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva. VI Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva: (ISSN 1413-8123). 2000. p. 526. nº 1989. p.

BAEDYANONDA, S., S. PHOOLPHUNDH e A. WONGWICHARN. Production Of Monascus Red Pigment From Agro-Industrial Wastewaters. The International Conference Tropical Agriculture Technology for Better Health and Environment Nakhon. Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus - Pathom, Thailand. November 29-December 2, 2000, 2000. 47-52 p.

BAILLY, J. D., A. QUERIN, S. LE BARS-BAILLY, et al. Citrinin production and stability in cheese. Journal of food protection, v.65, n.8, Aug, p.1317-1321. 2002.

BAIPONG, S. e R. PINTHONG. Red Pigment and Citrinin Produced by *Monascus purpureus*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v.26 :, 2001, p.280-282. 2001.

- BAKOSOVA, A. M., D.; LACIAKOVA, A. AND PIPOVA, M. Utilization of *Monascus purpureus* in the production of food of animal origin. Bull Yet. Inst. Pulawy, v.45, p.111-116. 2001.
- BEGUM, F. e N. SAMAJPATI. Mycotoxin production on rice, pulses and oilseeds. Naturwissenschaften, v.87, n.6, Jun, p.275-277. 2000.
- BERNDT, W. O. The role of transport in chemical nephrotoxicity. Toxicologic pathology, v.26, n.1, Jan-Feb, p.52-57. 1998.
- BLANC, P. J. Les Pigments Rouges de *Monascus*. Biofutur, v.184, p.13-17. 1998.
- \_\_\_\_\_. *Monascus'* red pigments. Biofutur, v.185, p.34-36. 1999.
- BLANC, P. J., J. P. LAUSSAC, J. LE BARS, et al. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. Journal Food Microbiology, v.27, n.2-3, Oct, p.201-213. 1995.
- BLANC, P. J., M. O. LORET e G. GOMA. Production of citrinin by various species of *Monascus*. Biotechnology Letters, v.vol. 17, n.3, p.291-294. 1995.
- BOBBIO, P. A. e F. O. BOBBIO. Química do Processamento de alimentos. São Paulo: Livraria Varela Ltda. 1995. 151 p.
- BON, E. P. S. e N. J. PEREIRA. Tecnologia Enzimática. UFSC. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos - Florianópolis, SC: 4-14 novembro, 2002. p.
- BONDIOLI, F. e T. MANFREDINI. Search for new red pigments. American Ceramic Society Bulletin, v.79, n.2, p.68 - 79. 2000.
- BONDY, G. S. e C. L. ARMSTRONG. Cytotoxicity of nephrotoxic fungal toxins to kidney-derived LLC-PK1 and OK cell lines. Cell biology and toxicology, v.14, n.5, Oct, p.323-332. 1998.
- BRESLER, G., S. B. BRIZZIO e G. VAAMONDE. Mycotoxin-producing potential of fungi isolated from amaranth seeds in Argentina. International Journal of Food Microbiology, v.25, n.1, Mar, p.101-108. 1995.
- BROOKS, G. F., J. S. BUTEL e S. A. MORSE. Jawetz, Melnick & Adelberg - Microbiologia Médica. 2000. 611 p.
- CALVO, C. e A. SALVADOR. Comparative study of the colorants *Monascus* and cochineal used in the preparation of gels made with variuos gelling agents. Food Hydrocolloids, n.16(6), p. 523-526. 2002.
- CARDENAS, F., E. ALVAREZ, M. S. C. ALVAREZ, et al. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.14, p.4-6. 2001.
- CARELS, M. e D. SHEPHERD. Sexual reproductive cycle of *Monascus* in submerged shaken culture. Journal Bacteriology, v.122, n.1, Apr, p.288-294. 1975.

\_\_\_\_\_. The effect of different nitrogen sources on pigment production and sporulation of *Monascus* species in submerged, shaken culture. Canadian Journal of Microbiology, v.23, n.10, Oct, p.1360-1372. 1977.

\_\_\_\_\_. The effect of pH and amino acids on conidiation and pigment production of *Monascus major* ATCC 16362 and *Monascus rubiginosus* ATCC 16367 in submerged shaken culture. Canadian Journal of Microbiology, v.24, n.11, Nov, p.1346-1357. 1978.

\_\_\_\_\_. The effect of changes in pH on phosphate and potassium uptake by *Monascus rubiginosus* ATCC 16367 in submerged shaken culture. Canadian Journal of Microbiology, v.25, n.12, Dec, p.1484-1488. 1979.

CHAGAS, G. M., A. P. CAMPELLO, M. L. KLUPPEL, et al. Citrinin affects the oxidative metabolism of BHK-21 cells. Cell biochemistry and function, v.13, n.4, Dec, p.267-271. 1995.

CHANG, Y. N., J. C. HUANG, C. C. LEE, et al. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lovastatin by *Monascus ruber*. Enzyme and Microbial Technology, v.30, p.889-894. 2002a.

COX, P. W., G. C. PAUL e C. R. THOMAS. Image analyses of the morphology of filamentous microorganisms. Microbiology, v.144, p.817-827. 1998.

DA LOZZO, E. J., M. B. OLIVEIRA e E. G. CARNIERI. Citrinin-induced mitochondrial permeability transition. Journal of biochemical and molecular toxicology, v.12, n.5, p.291-297. 1998.

DATAFUNGI. Atlas de Micologia em Software. Governador Valadares-MG: Biosoftware Sistemas Didáticos Ltda 2002.

DEVLIN, T. M. Manual de Bioquímica. São Paulo - Brasil. 1998

DURAN, N., M. F. TEIXEIRA, R. DE CONTI, et al. Ecological-friendly pigments from fungi. Journal of biochemical and molecular toxicology, v.42, n.1, Jan, p.53-66. 2002.

EL-KADY, I., S. EL-MARAGHY e A. N. ZOHRI. Mycotoxin producing potential of some isolates of *Aspergillus flavus* and *Eurotium* groups from meat products. Microbiological research, v.149, n.3, Sep, p.297-307. 1994.

ESPOSITO, E. e J. L. D. AZEVEDO. Fungos - Uma Introdução à Biologia, Bioquímica e Biotecnologia. Caxias do Sul: Educ. 2004. 510 p.

FABRE, C. E., G. GOMA e P. J. BLANC. Production and Food Applications of the red pigment material. Symposia of *Monascus*-cultures and applications organized by "Institut National des Sciences Appliqués ". Toulouse. July 8-10, 1998. p.

FENICE, M., F. FEDERICI, L. SELBMANN, et al. Repeated-batch production of pigments by immobilised *Monascus purpureus*. Journal of biotechnology, v.80, n.3, Jul 14, p.271-276. 2000b.

FINK-GREMMELS, J., J. DRESEL e L. LEISTNER. Use of *Monascus* extracts as an alternative to nitrite in meat products. Fleischwirtsch, v.71:1184-1186, p.1184-1186. 1991.

FISHER, F. e N. B. COOK. Micologia - Fundamentos e Diagnóstico. Rio de Janeiro. 2001. 337 p.

FRANCIS, F. J. Food colorants: anthocyanins. Critical reviews in food science and nutrition, v.28, n.4, p.273-314. 1989.

FRANCO, C. M., C. A. FENTE, B. VAZQUEZ, et al. Simple and sensitive high-performance liquid chromatography--fluorescence method for the determination of citrinin application to the analysis of fungal cultures and cheese extracts. Journal of chromatography. A, v.723, n.1, Feb 2, p.69-75. 1996.

GOLDANALISA. Diagnóstico Clínico, 2003.

GUNNARD, J., J. WASILESKI e G. ALAN. Production of Food Colorants by Fermentation. EUA, v.Cap. 7. 1994. 205-233 p. (Bioprocess Production of Fragrance and Color Ingredients.)

GUTIERREZ, L. E. CHANGES IN TREHALOSE CONTENT OF BAKER'S YEAST AS AFFECTED BY OCTANOIC ACID. Agic, Piracicaba, v.50, n.3, p.460-463. 1993.

HAJJAJ, H., P. BLANC, E. GROUSSAC, et al. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. Enzyme and Microbial Technology, v.27, n.8, NOV, p.619-625. 2000a.

HAJJAJ, H., P. J. BLANC, G. GOMA, et al. Sampling techniques and comparative extraction procedures for quantitative determination of intra- and extracellular metabolites in filamentous fungi. Fems Microbiology Letters, v.164, n.1, JUL 1, p.195-200. 1998.

HAJJAJ, H., P. J. BLANC, E. GROUSSAC, et al. Improvement of red pigment citrinin production ratio as a function of environmental conditions by *Monascus ruber*. Biotechnology and Bioengineering, v.64, n.4, AUG 20, p.497-501. 1999a.

HAJJAJ, H., A. KLAEBE, G. GOMA, et al. Medium-chain fatty acids affect citrinin production in the filamentous fungus *Monascus ruber*. Applied and Environmental Microbiology, v.66, n.3, MAR, p.1120-1125. 2000b.

HAJJAJ, H., A. KLAEBE, M. O. LORET, et al. Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *monascus ruber* as revealed by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance. Applied and environmental microbiology, v.65, n.1, Jan, p.311-314. 1999b.

\_\_\_\_\_. Production and identification of N-glucosylrubropunctamine and N-glucosylmonascorubramine from *Monascus ruber* and occurrence of electron donor-acceptor complexes in these red pigments. Applied and Environmental Microbiology, v.63, n.7, JUL, p.2671-2678. 1997.

HAMDI, M., P. J. BLANC e G. GOMA. Effect of Aeration Conditions on the production of red pigments by *Monascus purpureus* growth pear juice. Process Biochemistry, v.31, n.6, p.543-547. 1996.

HANAGATA, N., H. UEHARA, A. ITO, et al. Elicitor for red pigment formation in *Carthamus tinctorius* cultured cells. Journal of Biotechnology, v.34, n.1, p.71-77. 1994.

HARKER, M. V., M. PECKER e I. HIRSCHBERG. Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers. Nature Biotechnology, v.18, n.8, p.888-892. 2000.

HIPLER, U. C., W. WIGGER-ALBERTI, A. BAUER, et al. *Monascus purpureus*: a new fungus of allergenic relevance. Mycoses, v.43 Suppl 2, p.29-31. 2000.

\_\_\_\_\_. Case report. *Monascus purpureus*--a new fungus of allergologic relevance. Mycoses, v.45, n.1-2, Feb, p.58-60. 2002.

HWANG, J. e T. H. HSEU. Specificity of the acid protease from *Monascus kaoliang* towards the B-chain of oxidized insulin. Biochimica et biophysica acta, v.614, n.2, Aug 7, p.607-612. 1980.

JACOBSEN, G. e J. WASILESKI. Production of Food Colorants by Fermentation. In: A. Gabelman (Ed.). Bioprocess Production of Flavor, Fragrance, and Color Ingredients.: John Wiley & Sons. Inc., 1994. Production of Food Colorants by Fermentation., p.205-234

JANARDHANA, G. R., K. A. RAVEESHA e H. S. SHETTY. Mycotoxin contamination of maize grains grown in Karnataka (India). Food and chemical toxicology, v.37, n.8, Aug, p.863-868. 1999.

JAWETZ, M., ADELBERG, G. F. BROOKS, et al. Metabolismo Microbiano. In: G. Koogan (Ed.). Microbiologia Médica. Rio de Janeiro - RJ, 2000. Metabolismo Microbiano, p.52-73

JOHNSON, G. T. e F. MCHAN. Some effects of zinc on the utilization of carbon sources by *Monascus purpureus*. Mycologia, v.67, n.4, Jul-Aug, p.806-816. 1975.

JUNG, H., C. KIM, K. KIM, et al. Color characteristics of monascus pigments derived by fermentation with various amino acids. Journal of agricultural and food chemistry, v.51, n.5, Feb 26, p.1302-1306. 2003.

JUNG, K. Y., M. TAKEDA, D. K. KIM, et al. Characterization of ochratoxin A transport by human organic anion transporters. Life Science, v.69, n.18, Sep 21, p.2123-2135. 2001.

JUZLOVA, P. L., L. MARTINKOVA e V. KREN. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*. Journal Industrial Microbiology, v.16, p.163-170. 1996.

KILIKIAN, B. V. Produção de Enzimas e Pigmentos por Processos Fermentativos. Fermentation Technology - Modulo IV 4-14 novembro. UFSC - Florianópolis - SC, 2002. p.

KIM, H. J., J.H.KIM e J. O. HYUCK. Morfology control of *Monascus* cells and scale-up pf pigment fermentation. Process Biochemistry, v.38, n.5, p.649-655. 2002.

- KREJCI, M. E., N. S. BRETZ e D. A. KOECHEL. Citrinin produces acute adverse changes in renal function and ultrastructure in pentobarbital-anesthetized dogs without concomitant reductions in [potassium]plasma. Toxicology, v.106, n.1-3, Jan 8, p.167-177. 1996.
- KUJUMDZIEVA, A. V., J. N. HALLET, V. SAVOV, et al. *Monascus purpureus* strain producer of pigments and by-products. Journal of Cleaner Production, v.5, p.115-123. 1997.
- LACAZ, C. S., E. PORTO, J.E.C.MARTINS, et al. Tratado de Micologia Médica LACAZ. São Paulo. 2002. 1104 p.
- LEE, Y., D. CHEN, S. CHAUVATCHARINS, et al. Production of *Monascus* pigments by a solid-liquid state culture method. Journal Fermented Bioengineering, v.79, p.516-518. 1995.
- LEISTNER, L. Use of Red-Mould Rice and Monascus-Extracts for Meat Products. Symposia of *Monascus*-cultures and applications. July 8<sup>th</sup> to 10<sup>th</sup>. Toulouse - França: Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 1998. p.
- LIN, C. F. Isolation and Cultural Conditions of *Monascus* sp. for Production of Pigment in Submerged Culture. Journal Fermentation Technology, v.51, p.407-414. 1973.
- \_\_\_\_\_. Studies on the *Monascus* isolated from the startor of Kaoliang Brandy. Zhonghua Min Guo Wei Sheng Wu Xue Za Zhi, v.8, n.2, Jun, p.152-160. 1975.
- LIN, T. F. e A. L. DEMAINE. Negative Effect of Ammonium Nitrate As Nitrogen Source On The Production of Water-soluble Red Pigments by *Monascus* sp. Applied Microbiology and Biotechnology, v.43, n.4, p.701-705. 1995.
- LIN, T. F. e A. L. DEMAINE. Leucine interference in the production of water-soluble *Monascus* pigments. Archives of microbiology, v.162, p.114-119. 2000.
- LIN, T. F., G. H. YAKUSHIJIN e A. L. DEMAINE. Formation of water-soluble *Monascus* pigments red by biological and semi-synthetic process. Journal Industrial Microbiology, v.9, p.173-179. 1992.
- LIU BH, W. T., SU MC, CHUNG CP, YU FY. Evaluation of citrinin occurrence and cytotoxicity in monascus fermentation products. J Agric Food Chem., v.53, n.1, p.170-175. 2005.
- MA, J., Y. LI, Q. YE, et al. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. Journal of agricultural and food chemistry, v.48, n.11, Nov, p.5220-5225. 2000.
- MACARIO, A., L. V. A. PALO e L. M. M. MACEDA. A study on ang-kak and its production. The Philippine Journal of Science, v.89, n.1, p.1-19. 1960.
- MAIMOM, D. Estudo de mercado de matéria-prima: Corantes naturais (cosméticos, indústria de alimentos), conservantes e aromatizantes, bio-inseticidas e óleos vegetais e essenciais (cosméticos e oleoquímica): PROJETO BRA/96/025 - Acordo SUDAM/PNUD, Rede Para Conservação e Uso Dos Recursos Genéticos - GENAMAZ. 2005 2000.

- MALMSTROM, J., C. CHRISTOPHERSEN e J. C. FRISVAD. Secondary metabolites characteristic of *Penicillium citrinum*, *Penicillium steckii* and related species. Phytochemistry, v.54, n.3, Jun, p.301-309. 2000.
- MANDT, N., U. BLUME-PEYTAVI, C. PFROMMER, et al. Phakomatosis pigmentovascularis type IIa. J Am Acad Dermatol, v.40, n.2 Pt 2, Feb, p.318-321. 1999.
- MARANGONI, C. Estudo de Estratégias de Produção de Poli(3-hidroxitirato-co-3hidroxivalerato) por *Ralstonia eutropha* Utilizando Substratos de Baixo Custo e Ácido Propiônico. Engenharia Química, UFSC, Florianópolis - SC, 2000. 191 p.
- MARTINKOVA, L., P. PATAKOVA-JUZLOVA, V. KRENT, et al. Biological activities of oligoketide pigments of *Monascus purpureus*. Food additives and contaminants, v.16, n.1, Jan, p.15-24. 1999.
- MARTLBAUER, E. An indirect enzyme immunoassay for the mycotoxin citrinin. Applied and environmental microbiology, v.61, n.5, May, p.2007-2009. 1995.
- MASCARENHAS, J. M. O. Corantes em alimentos: perspectivas, uso e restrições. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Ciências Exatas, UFV, Viçosa, MG, 1998. 131 p.
- MASCARENHAS, J. M. O., STRINGHETA, P.C. Corantes naturais. Revista Nacional de Carne, n.256, p.32-33. 1998.
- MASCARENHAS, J. M. O. S., P.C.; LARA, J.E.; REIS, F.P. O perfil das indústrias produtoras de corantes. Revista Brasileira de Corantes Naturais. Vitória da Conquista, v.3, n.1, p.1-9. 1999.
- MIYASHIRA, G., R. RODRIGUES e B. V. KILIKIAN. Deleção de Linhagens de *Monascus* sp. para Cultivo em Meio Semi-sólido. SINAIFERM - XIV Simpósio Nacional de Fermentações. Florianópolis - SC: Anais - artigo 133 CD-room, 2003. p.
- MOLINA, A., B. V. KILIKIAN e G. Y. MIYASHIRA. Formulação de um meio de baixo custo para o cultivo de *Monascus* sp: Universidade de São Paulo - USP. 2004 2003.
- NEGRO, J. J. e J. G. FERNANDEZ. Astaxanthin is the major carotenoid in tissues of white storks (*Ciconia ciconia*) feeding in introduced crayfish (*Procambarus clarkii*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v.126, n.3, p.347-352. 2000.
- OROZCO, S. F. B., D. G. PEREIRA e B. V. KILIKIAN. Influência do pH na Produção de Pigmentos Vermelhos e na Micromorfologia de *Monascus purpureus* CCT 3802 em Cultivo Submerso. SINAIFERM - XIV Simpósio Nacional de Fermentações. Florianópolis - SC: Anais - artigo 133 CD-room, 2003. 7 p.
- PAIVA, V. L. G. Fermentação Alcoólica: Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas - Ministério da Ciência e Tecnologia - CETEC. 2005 2004.

- PAMBOUKIAN, C. R. D., M. C. R. FACCIOTTI e W. SCHMIDELL-NETO. Relationship between morphology, rheology and glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in submerged cultures. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v.15, n.3, p.265-272. 1998.
- PANAGOUE, E. Z., P. N. SKANDAMIS e G. J. NYCHAS. Modelling the combined effect of temperature, pH and aw on the growth rate of *Monascus ruber*, a heat-resistant fungus isolated from green table olives. Journal of applied microbiology, v.94, n.1, p.146-156. 2003.
- PANDEY, A., C. R. SOCCOL e D. MITCHELL. New developments in Solid State Fermentation: I-Bioprocesses and Products. Process Biochemistry, v.35, p.1153-1169. 2000.
- PASTRANA, L., P. J. BLANC, A. L. SANTERRE, et al. Production of Red Pigments by *Monascus ruber* in Synthetic Media with a Strictly Controlled Nitrogen Source. Process Biochemistry, v.30, n.4, p.333-341. 1995.
- PEPELJNJAK, S., M. SEGVIC e L. OZEGOVIC. Citrininotoxinogenicity of *Penicillium* spp. isolated from decaying apples. Brazilian Journal of Microbiology, v.33, n.2, p.1-8. 2002.
- PEREIRA, D. G. e B. V. KILIKIAN. Effect of yeast extract on growth kinetics of *Monascus purpureus*. Applied biochemistry and biotechnology, v.91-93, Spring, p.311-6. 2001.
- PEREIRA, D. G., S. B. OROZCO, A. TONSO, et al. Efeito das condições de agitação e aeração na síntese de metabólitos secundários por *Monascus purpureus* CCT 3802. SINAIFERM - XIV Simpósio Nacional de Fermentações. Florianópolis - SC: Anais - artigo 102 CD-room, 2003. 7 p.
- PFEIFFER, E., K. GROSS e M. METZLER. Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin. Carcinogenesis, v.19, n.7, Jul, p.1313-1318. 1998.
- RIBEIRO, E. P. e E. A. G. SERAVALLI. Química de Alimentos. São Paulo: Edgard Blücher: Instituto Mauá de Tecnologia. 2004. 184 p.
- RIBEIRO, S. M., A. P. CAMPELLO, G. M. CHAGAS, et al. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. VI. Effect on iron-induced lipid peroxidation of rat liver mitochondria and microsomes. Cell biochemistry and function, v.16, n.1, Mar, p.15-20. 1998.
- SABATER-VILAR, M., R. F. MAAS e J. FINK-GREMMELS. Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. Mutation research, v.444, n.1, Jul 21, p.7-16. 1999.
- SAKO, F., N. KOBAYASHI, H. WATABE, et al. Induction of gamma-glutamyl transpeptidase and glutathione S-transferase in cultured fetal rat hepatocytes by laccic acid and monascus pigments. Chemico-biological interactions, v.44, n.1-2, Apr-May, p.17-26. 1983.
- SCHNEWEIS, I., K. MEYER, S. HORMANSDORFER, et al. Metabolites of *Monascus ruber* in silages. Journal of animal physiology and animal nutrition, v.85, n.1-2, Feb, p.38-44. 2001.

SCUDAMORE, K. A. e M. T. HETMANSKI. Natural occurrence of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in cereals in the United Kingdom. Food additives and contaminants, v.12, n.3, May-Jun, p.377-382. 1995.

SHIRAKAWA, M. A., C. C. GAYLARDE, P. M. GAYLARDE, et al. Fungal colonization and succession on newly painted buildings and effect of biocide. Fems Microbiology Ecology, v.39, p.165-173. 2002.

SIDRIM, J. J. C. e J. L. B. MOREIRA. Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1999. 287 p.

SILVEIRA, V. D. Micologia. Rio de Janeiro -RJ: Âmbito Cultural Edições Ltda. 332p. 1996. 332 p.

SINDARROZ-SC. Disponível em:

<http://www.mundoregional.com.br/agricultura/reportagem.htm>: Conectsul Soluções em Internet. acesso em 14 de outubro 2004.

STORMER, F. C. e E. A. HOIBY. Citrinin, ochratoxin A and iron. Possible implications for their biological function and induction of nephropathy. Mycopathologia, v.134, n.2, p.103-107. 1996.

STRANDI, R., J. HUDON, G. CELENTANO, et al. Carotenoids in bird plumage: the complement of yellow and red pigments in true woodpeckers (Picinae). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v.120, n.2, p.223-230. 1998.

SUH, J. H. e C. S. SHIN. Physiological analysis on novel coculture of *Monascus* sp. J101 with *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS microbiology letters, v.190, n.2, Sep 15, p.241-245. 2000.

SWEENEY, M. J. e A. D. DOBSON. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. International journal of food microbiology, v.43, n.3, Sep 8, p.141-158. 1998.

TENG, S. S. e W. FELDHEIM. Anka and anka pigment production. Journal of industrial microbiology & biotechnology, v.26, n.5, May, p.280-282. 2001.

VANDENPLAS, O., J. M. CAROYER, F. B. CANGH, et al. Occupational asthma caused by a natural food colorant derived from *Monascus ruber*. The Journal of allergy and clinical immunology, v.105, n.6 Pt 1, Jun, p.1241-1242. 2000.

VASCONCELLOS, A. M. D. H. E. e A. B. F. VALLE. Glicídios. In: I. D. Q.-. Ufrj (Ed.). Cursos Práticos em Bioquímica. Rio de Janeiro, 1997. Glicídios, p.73-76

WANG, R., R. M. DOMINGUEZ-ESPINOSA, K. LEONARD, et al. The application of a generic feedstock from wheat for microbial fermentations. Biotechnology progress, v.18, n.5, Sep-Oct, p.1033-1038. 2002.

WANG, S. L., W. J. HSIAO e W. T. CHANG. Purification and characterization of an antimicrobial chitinase extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCRC31499 in a shrimp and crab shell powder medium. Journal of agricultural and food chemistry, v.50, n.8, Apr 10, p.2249-2255. 2002.

WIGGER-ALBERTI, W., A. BAUER, U. C. HIPLER, et al. Anaphylaxis due to *Monascus purpureus*-fermented rice (red yeast rice). Allergy, v.54, n.12, Dec, p.1330-1331. 1999.

WONG, H. e P. E. KOEHLER. Production of red water-soluble *Monascus* pigments. Journal Food Science, v.48, p.1200-1203. 1983.

WONGWICHARN, A., B. MCNEIL e L. M. HARVEY. Effect of Oxygen Enrichment on Morphology, Growth, and Heterologous Protein Production in Chemostat Cultures of *Aspergillus niger* B1-D. Biotechnology and Bioengineering, v.65, n.4, p.416-424. 1999.

YONGSMITH, B., V. KITPRECHAVANICH, L. CHITRADON, et al. Color Mutants of *Monascus* sp KB9 and their Comparative Glucoamylases on Rice Solid Culture. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v.10, p.263-272. 1997.

YOSHIMURA, M., S. YAMANADA, K. MITSUGI, et al. Production of *Monascus*-Pigment in a Submerged Culture. Agricultural Biology and Chemistry, v.39, p.1789-1795. 1975.

ZOCHLING, S., M. MURKOVIC e W. PFANNHAUSER. Effects of industrially produced flavours with pro- and antioxidative properties on the formation of the heterocyclic amine PhIP in a model system. Journal of biochemical and biophysical methods, v.53, n.1-3, Oct, p.37-44. 2002.

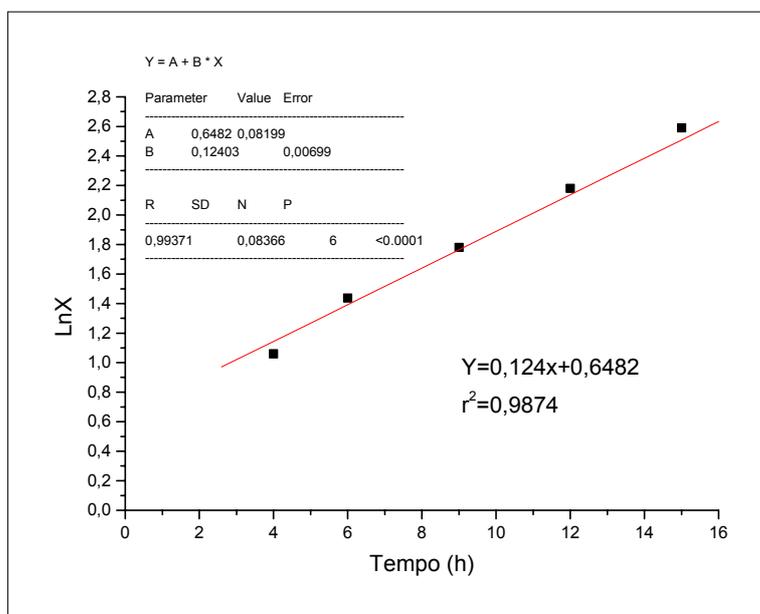
"O homem sábio cria mais oportunidades do que as encontra".  
Francis Bacon

## APÊNDICE

---

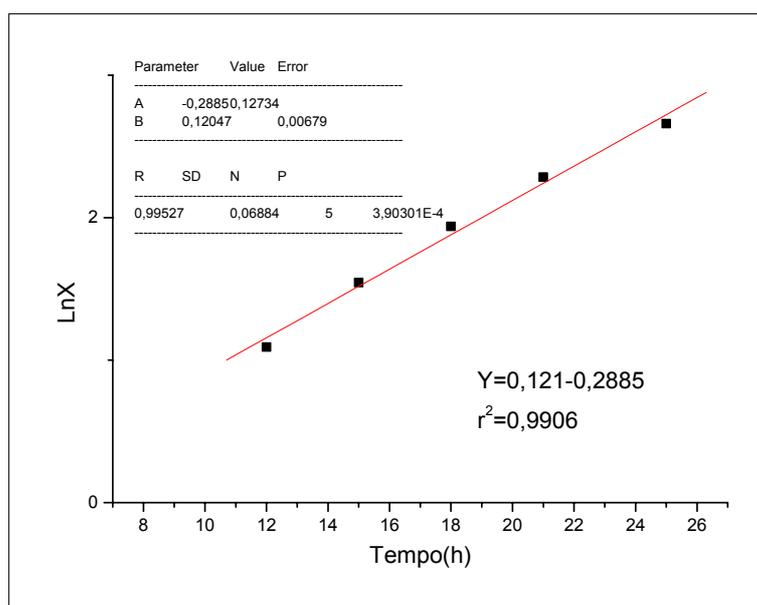
Velocidade específica máxima de crescimento no ensaio da figura 46.

$\mu_{max} = 0,124 - Y_{X/S} = 0,513 \text{ g.g}^{-1}$



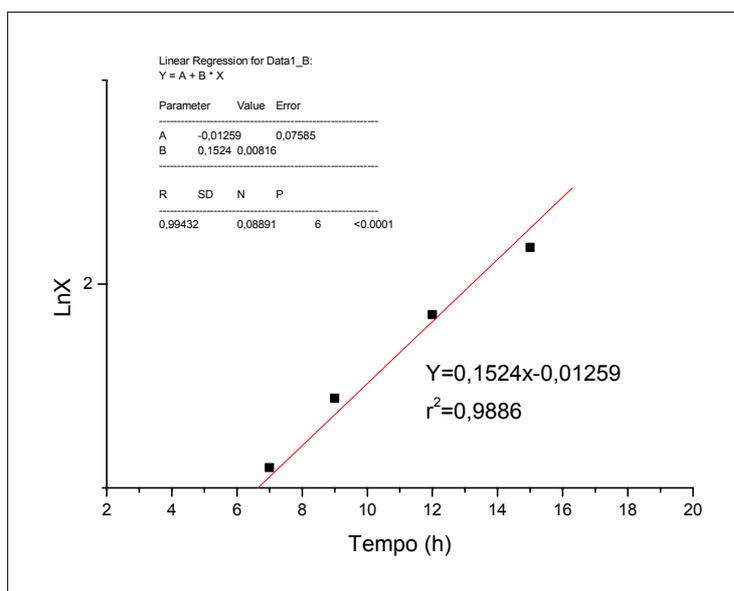
Velocidade específica máxima de crescimento no ensaio da figura 47.

$\mu_{max} = 0,121 - Y_{X/S} = 0,343 \text{ g.g}^{-1}$



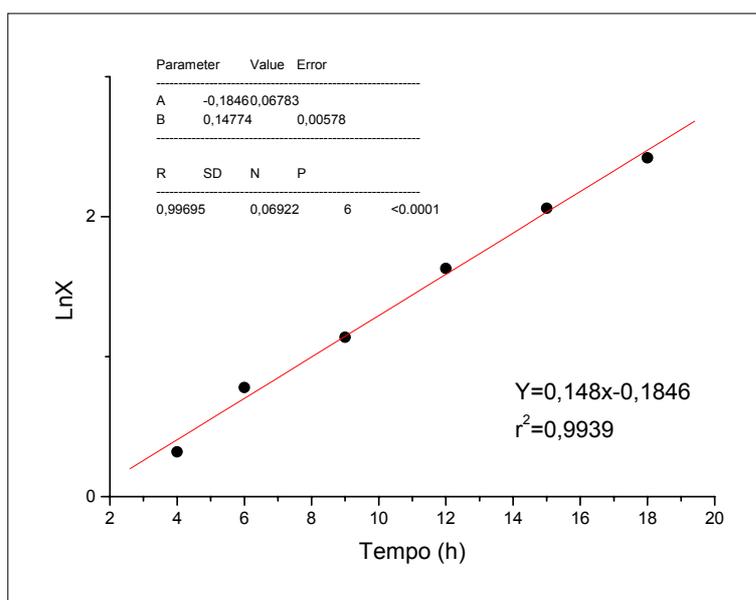
**Velocidade específica máxima de crescimento no ensaio da figura 48.**

$\mu_{max} = 0,152 - Y_{X/S} = 0,373 \text{ g.g}^{-1}$



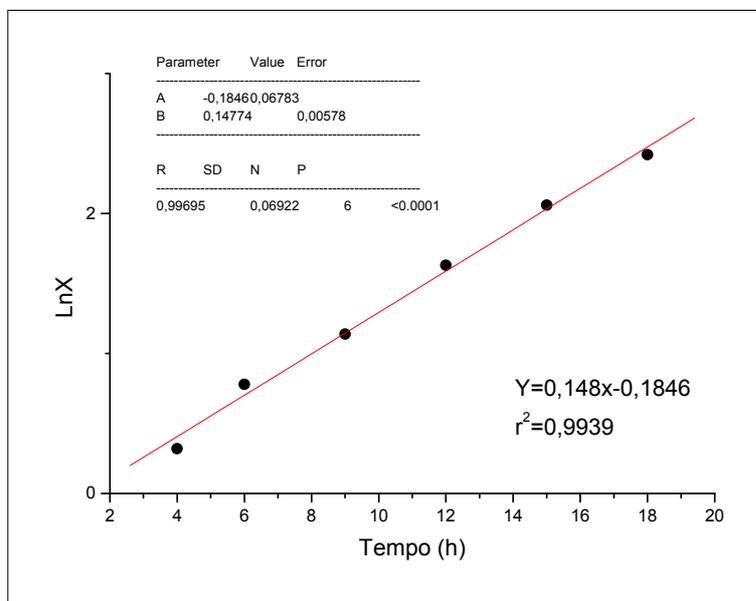
**‘Velocidade específica máxima de crescimento no ensaio da figura Figura 49:**

$\mu_{max} = 0,148 - Y_{X/S} = 0,31 \text{ g.g}^{-1}$



Velocidade específica máxima de crescimento no ensaio da Figura 51:

$\mu_{max} = 0,148 - Y_{X/S} = 0,457 \text{ g.g}^{-1}$



## **ANEXO**

---

## Legislação Consultada:

BRASIL. Decreto nº. 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 09 abr. 1965. Seção I.

BRASIL. Decreto - Lei nº. 986, de 21 de outubro de 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 21out 1969. Seção I.

BRASIL. Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988. Aprova revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a Aditivos Intencionais, bem como os anexos I, II, III e VII, todos do Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 19 dez. 1988. Seção I.

BRASIL. Código de Defesa do Consumidor - Lei nº. 8.078, de 11 de setembro de 1990. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 12 set 1990. Suplemento.

BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 1.428, de 26 de novembro de 1993. Regulamento Técnico para Inspeção Sanitária de Alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 02 dez 1993. Seção I.

BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 326, de 30 de julho de 1997. Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 01 de ago. de 1997. Seção I.

BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 27, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico Referente à Informação Nutricional Complementar. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 16 jan. 1998. Seção I.

BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 29, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico referente a Alimentos para Fins Especiais. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 15 jan. 1998. Seção I.

BRASIL. Portaria SVS/MS nº. 685, de 27 de agosto de 1998. Regulamento Técnico de Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos e seu Anexo: Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 28 ago. 1998. Seção I.

BRASIL. Resolução ANVISA/MS nº. 17, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para a Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 03 maio 2004 Seção I.

BRASIL. Resolução ANVISA/MS nº. 383, de 05 de agosto de 1999. Regulamento técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo sua Funções e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 7- Produtos de Panificação e Biscoitos". Diário Oficial da União. Brasília, DF, 09 ago. 1999, Seção 1, pt. 1.

BRASIL. Resolução ANVISA/MS nº 385, de 05 de agosto de 1999. Aprova o "Regulamento técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo suas Funções e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 6 - Cereais e Produtos de ou a Base de Cereais". Diário Oficial da União. Brasília, DF, 09 ago. 1999, Seção 1, pt. 1.

BRASIL. Resolução ANVISA/MS nº. 386 de 05 de agosto de 1999. Regulamento Técnico que aprova o uso de Aditivos Alimentares segundo as Boas Práticas de Fabricação e suas funções. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 09 ago. 1999, Seção 1, pt.1.

BRASIL. Resolução ANVS/MS nº. 22, de 15 de março de 2000. Dispõe sobre os Procedimentos de Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Importados Pertinentes à Área de Alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 16 mar 2000. Seção 1, pt.

BRASIL. Resolução ANVS/MS nº. 23, de 15 de março de 2000. Dispõe sobre o Manual de Procedimentos Básicos para Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Pertinentes à Área de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 16 mar 2000. Seção 1, pt. 1.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 10 jan 2001. Seção I.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 234, de 19 de agosto de 2002. Regulamento Técnico sobre aditivos utilizados segundo as Boas Práticas de Fabricação e suas Funções. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 21 de ago. 2002. Seção I.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 259, de 20 de setembro de 2002. Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos Embalados. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 23 set 2002. Seção I.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 275, de 21 de outubro de 2002. Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 06 nov. 2002. Seção I.

BRASIL. Lei nº 10.674, de 16 de maio de 2003. Obrigação a que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 19 mai. 2003. Seção 1.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 175, de 08 de julho de 2003. Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 09 jul. 2003. Seção I.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 359, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 26 dez 2003. Seção I.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 26 dez. 2003. Seção I.