

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

ROBSON LEANDRO SCHACKER

**ESTUDO DE VIABILIDADE DA EXTRAÇÃO E
MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NA AVALIAÇÃO DE
COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS MICROBIANOS
ASSOCIADOS AO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
PIGMENTOS POR FUNGO FILAMENTOSO (*Monascus*).**

Florianópolis – SC

2016

ROBSON LEANDRO SCHACKER

**ESTUDO DE VIABILIDADE DA EXTRAÇÃO E
MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NA AVALIAÇÃO DE
COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS MICROBIANOS
ASSOCIADOS AO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
PIGMENTOS POR FUNGO FILAMENTOSO (*Monascus*).**

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Eduardo Carasek da Rocha
Coorientadora: Denise Esteves Moritz
Coorientador: Miguel Soriano Balparda
Caro

Florianópolis – SC

2016

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

Schacker, Robson Leandro

Estudo de Viabilidade da Extração e Microextração em Fase Sólida na Avaliação de Compostos Orgânicos Voláteis Microbianos Associados ao Processo de Produção de Pigmentos por Fungo Filamentoso (*Monascus*) / Robson Leandro Schacker ; orientador, Eduardo Carasek da Rocha ; coorientadora, Denise Esteves Moritz ; coorientador, Miguel Soriano Balparda Caro - Florianópolis, SC, 2016.

162 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

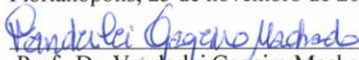
1. Química. 2. Voláteis microbianos. 3. Fungo *Monascus*. 4. Fermentações. 5. SPME. I. Da Rocha, Eduardo Carasek. II. Moritz, Denise Esteves. III. Caro, Miguel Soriano Balparda. IV. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. V. Título.

Robson Leandro Schacker


**ESTUDO DE VIABILIDADE DA EXTRAÇÃO E
MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA NA AVALIAÇÃO DE
COMPOSTOS ORGÂNICOS VOLÁTEIS MICROBIANOS
ASSOCIADOS AO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
PIGMENTOS POR FUNGO FILAMENTOSO (*Monascus*).**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de
Doutor em Química Analítica, e aprovada em sua forma final pelo
Programa de Pós-Graduação em Química.

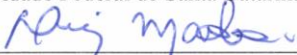
Florianópolis, 25 de novembro de 2016.



Prof., Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Curso


Banca Examinadora:



Prof., Dr. Eduardo Carasek da Rocha
Orientador


Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)


Prof., Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)


Prof.^a, Dr.^a Vera Lúcia Azzolin Frescura Bascuñan
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)


Prof., Dr. Alexandre Luis Parize
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)


Prof.^a, Dr.^a Sabrina Moro Villela Pacheco
Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC)


Prof., Dr. Fabio Augusto
Universidade Estadual de Campinas (UNICAM)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Denise Esteves Moritz pela coorientação e amizade;

Aos meus pais Pedro e Janete pelo amor, carinho e dedicação;

Aos familiares pelo apoio e incentivo;

Ao Professor Eduardo Carasek da Rocha pela aceitação do nosso projeto;

Ao Professor Luiz Augusto dos Santos Madureira pela colaboração e solidariedade;

Aos professores Agenor Furigo Jr., Gláucia Maria Falcão de Aragão e Jorge Luiz Ninow, pela permissão de utilização dos recursos do Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO);

Aos colegas da ENGEBIO pela participação no meu aprendizado;

Aos colegas do Laboratório de Cromatografia e espectrometria Atômica pelo apoio ao meu trabalho;

Aos amigos da Central de Análises da Química pela boa vontade;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

RESUMO

Pode-se produzir corantes naturais a partir de um processo fermentativo realizado por fungos com baixo custo ambiental, com grande eficiência e sem a necessidade de instrumentação de grande porte para o beneficiamento da matéria-prima. Fungos do gênero *Monascus* podem produzir pigmentos amarelo, laranja e vermelho, entre outros metabólitos provenientes da fermentação de determinados substratos. Estudar o processo fermentativo e os compostos secundários gerados é relevante para a compreensão das reações envolvidas e da significância dos resultados finais do processo. Durante o processo fermentativo industrial são produzidos gases de exaustão, contendo Compostos Orgânicos Voláteis (abreviação em inglês - VOC) que são oriundos de vários processos bioquímicos e químicos, entre os compostos de maior interesse podem ser encontrados os Compostos Orgânicos Voláteis Microbianos (abreviação em inglês - MVOC). Os MVOC estão presentes em vários processos de produção em biotecnologia. Nesse estudo é avaliada a utilização de dois métodos envolvendo SPME e SPE (*in vivo*), na extração de MVOC, associados com o processo de produção de pigmento, pelo fungo do gênero *Monascus*. Foram testadas duas espécies do fungo *Monascus* (*Monascus ruber* e *Monascus* sp.). O fungo *Monascus ruber* foi utilizado para produzir pigmento vermelho a partir da fermentação em biorreator, utilizando-se como meio de cultura submerso uma mistura de 20 g L⁻¹ de pó de arroz, 7 g L⁻¹ de glicina, 2 g L⁻¹ de glucose e água destilada. Os valores de biomassa e pigmento vermelho encontrados para uma fermentação de dez dias foram de 4,03 ± 0,21 g L⁻¹ e 3,96 ± 0,17 (UA₄₈₀), mostrando que o desempenho da fermentação é comparável com o que já foi descrito por outros autores, estudando a mesma espécie de fungo *Monascus*. Foram encontrados dezessete compostos associados com a presença do fungo, sendo os principais o etanol, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol, 2-metil-butanol e 2-fenil-etanol. Tais compostos foram estudados através de modelos empíricos, onde foram encontrados os valores máximos de 313,87 mg L⁻¹ para o etanol, 5,51 mg L⁻¹ para o 2-metil-propanol, 2,37 mg L⁻¹ para o 3-metil-butanol, 0,95 mg L⁻¹ para o 2-metil-butanol e 0,70 mg L⁻¹ para o 2-fenil-etanol. Esses valores foram obtidos com a extração (SPME), em espaço confinado (ou *headspace*), do caldo fermentativo após 102–120 horas de fermentação. Estudos online dos MVOC também foram avaliados por coleta dos gases de exaustão com cartuchos de Xad-2 (SPE), onde foram encontrados os valores máximos de 55,67 µg L⁻¹ para o etanol, 1,28 µg L⁻¹ para o 2-metil-propanol, 0,18 µg L⁻¹ para 3-metil-

butanol, $0,10 \mu\text{g L}^{-1}$ para o 2-metil-butanol, quando são coletados $28,03 \pm 0,04 \text{ L}$, em média, dos gases contendo os produtos da respiração celular e os MVOC identificados nesse trabalho.

Palavras-chave: Voláteis microbianos. Fungo *Monascus*. Fermentações. SPME.

ABSTRACT

Natural dyes can be produced from a fermentative process performed by fungi with low environmental cost with high efficiency and without large need for instrumentation to process raw material. The *Monascus* genus of fungi can produce yellow, orange and red pigments, and other metabolites from fermentation of certain substrates. Studying fermentation process and generated secondary compounds is relevant to understand reactions involved and the significance of the final results of this process. During industrial fermentation process, exhaust gases are produced, containing volatile organic compounds (VOC) derived from various biochemical and chemical processes; among most compounds of interest, it can be found microbial volatile organic compounds (MVOC). The MVOC are present in many biotechnology production processes. This study evaluates the use of two methods involving SPME and SPE (*in vivo*), for extraction of MVOC associated with pigment production process, by *Monascus* genus of fungus. Two species of *Monascus* fungus were tested (*Monascus ruber* and *Monascus* sp.). *Monascus ruber* fungus was used for producing red pigment from fermentation in bioreactor, using as submerged means of culture a mixture of 20 g L⁻¹ powder, 7 g L⁻¹ glycine, 2 g L⁻¹ glucose and distilled water. The values of biomass and red pigment found for fermentation for ten days were 4.03 ± 0.21 g L⁻¹ and 3.96 ± 0.17 (UA480), showing that the performance of the fermenting is comparable to that which has been described by other authors who studied the same species of *Monascus* fungus. Seventeen compounds were found associated with the presence of the fungus, the main being ethanol, 2-methyl-propanol, 3-methylbutanol, 2-methylbutanol and 2-phenylethanol. Such compounds have been studied by empirical models, which have found maximum values of 313.87 mg L⁻¹ for ethanol, 5.51 mg L⁻¹ for 2-methyl-propanol, 2.37 mg L⁻¹ for 3-methyl-butanol, 0.95 mg L⁻¹ to 2-methylbutanol and 0.70 mg L⁻¹ for 2-phenyl-ethanol. These values were obtained from the extraction (SPME) in confined space (or headspace) of the fermentation broth after 102-120 hours of fermentation. Online studies of MVOC were also evaluated by collecting the exhaustion gases with XAD-2 cartridges (SPE), where were found the maximum values of 55.67 µg L⁻¹ for ethanol, 1.28 µg L⁻¹ to 2-methyl-propanol, 0.18 µg L⁻¹ to 3-methylbutanol, 0.10 µg L⁻¹ to 2-methylbutanol, when collected 28.03 ± 0.04 L, on average, of the gases containing the cellular respiration products and MVOC identified in this work.

Keywords: Microbial volatiles. *Monascus* fungus. Fermentations. SPME.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Fluxograma dos distintos tópicos que fazem parte da organização estrutural e da logística aplicada na parte experimental para resumir e ilustrar a estrutura desse trabalho. | 34 |
| Figura 2: Estruturas dos principais componentes de cada pigmento produzido pelo fungo do gênero <i>Monascus</i> | 37 |
| Figura 3: Micrografias mostrando as hifas (esquerda) e micélios (direita) do fungo <i>Monascus ruber</i> , usado neste trabalho. | 39 |
| Figura 4: Reações da fermentação alcoólica, de piruvato para etanol; a) piruvato; b) acetaldeído; c) etanol. | 46 |
| Figura 5: Catabolismo da fenilalanina pela via de Ehrlich, um exemplo da formação de álcoois superiores por microrganismos; a) L-fenilalanina; b) fenilpiruvato; c) fenilacetaldeído; d) 2-feniletanol; e) fenilacetato. | 47 |
| Figura 6: Figura ilustrativa de um sistema para microextração em fase sólida; a) fibra retraída; b) fibra exposta; fibra exposta em extração. ... | 51 |
| Figura 7: Resumo da metodologia para a fermentação, extração e identificação dos MVOC..... | 57 |
| Figura 8: Micélios das culturas <i>Monascus</i> sp. (esquerda) e <i>Monascus ruber</i> (direita) que foram utilizadas para experimentos de Fermentação. | 59 |
| Figura 9: Esquema do biorreator; rotinas envolvidas no processo fermentativo realizado com fungo do gênero <i>Monascus</i> | 61 |
| Figura 10: Foto dos liofilizados dos caldos fermentativos; <i>Monascus</i> sp. (esquerda) e <i>Monascus ruber</i> (direita), fermentação em Erlenmeyer.... | 75 |
| Figura 11: Espectros dos extratos brutos sobrepostos, com solvente de extração acetonitrila:metanol – 1:1 (esquerda) e metanol puro (direita). | 76 |
| Figura 12: Foto da coluna (300 x 10 mm) utilizada na separação do pigmento produzido por fungo do gênero <i>Monascus</i> ; a) início da eluição; b) eluição do pigmento vermelho; c) eluição do pigmento laranja..... | 77 |
| Figura 13: Foto dos três tipos de pigmentos que compõem o pigmento vermelho <i>Monascus</i> , que foram separados em coluna de sílica gel. Pigmentos: amarelo, laranja e vermelho. | 78 |
| Figura 14: Foto dos pigmentos laranja (esquerda) e vermelho (direita), em solução aquosa..... | 79 |
| Figura 15: Foto do caldo fermentativo: bruto, centrifugado e filtrado em membrana de PVDF (0,22 µm). | 80 |
| Figura 16: Foto do biorreator utilizado para produção de pigmento, por | |

| | |
|---|-----|
| fungo <i>Monascus ruber</i> ; a) lavadores de gases; b) biorreator; c) resfriador de cartuchos (Xad-2)..... | 82 |
| Figura 17: Representação gráfica da curva suavizada para ilustrar a média da biomassa (mg) das duas últimas fermentações (02 e 03)..... | 85 |
| Figura 18: Gráfico de barras dos efeitos para o composto 3-metil-butanol, adotado como exemplo dos cálculos dos planejamentos realizados em GC-FID. A: pH; B: diluição; C: tempo de extração; D: temperatura de extração | 89 |
| Figura 19: Gráficos de efeito principal para o composto 3-metil-butanol, adotado como exemplo para os planejamentos fatoriais fracionários realizados em GC-FID. | 90 |
| Figura 20: Gráficos do efeito principal para o etanol; exemplo para ilustrar o efeito sobre a resposta para os álcoois. | 94 |
| Figura 21: Diagrama do cubo das médias por combinação dos níveis; exemplo para ilustrar a avaliação conjunta para os valores de médias dos níveis. A: pH; B: diluição; C: tempo de extração..... | 95 |
| Figura 22: Síntese para os cálculos realizados para o 2-metil-propanol; a) diagrama de contorno; b) superfície de resposta. Respostas: áreas dos picos divididas por 10^5 unidades. | 96 |
| Figura 23: Gráfico dos efeitos principais para o composto 2-metil-propanol, exemplo da aplicação do planejamento fatorial para compostos coletados dos gases de exaustão do biorreator. | 100 |
| Figura 24: Estruturas dos compostos MVOC com percentual acumulado maior que 2%, encontrados nas amostras do caldo fermentativo; códigos: a) c5; b) c8; c) c9; d) c14; e) c15; f) c20; g) c22; h) c24. | 107 |
| Figura 25: Espectros de massas dos isômeros 2-metil-butanol (c9), 3-metil-butanol (c8), obtidos a partir da análise dos cromatogramas de íons totais para as amostras do caldo fermentativo e extração por Xad-2 dos gases de exaustão do biorreator, durante a produção de pigmentos | 108 |
| Figura 26: Mecanismos característicos da fragmentação dos isômeros do composto pentanol, para um caso geral; a) desidratação; b) perda de etileno..... | 108 |
| Figura 27: Gráficos de setores com os valores de percentuais acumulados durante os períodos das fermentações (5, 8 e 10 dias). | 110 |
| Figura 28: Cromatograma de íons totais para exemplificar o tipo de resposta obtida em amostras do caldo fermentativo, por utilização de SPME em espaço confinado. | 111 |
| Figura 29: Gráficos de barras com os valores de áreas integradas dos picos para os compostos 3-metil-butanol (c8) e 2-nonanona (c20), dadas por dia de fermentação, para a fermentação de 8 dias. | 112 |

| | |
|---|-----|
| Figura 30: Curva resultante da regressão loess para o álcool 2-metil-butanol, usada como exemplo do algoritmo aplicado para os cinco MVOC mais relevantes. | 115 |
| Figura 31: Gráfico de barras para o composto 2-metil-propanol (c5), com os valores obtidos para as coletas por Xad-2 para as fermentações Ferm. 02 e Ferm. 03. | 122 |
| Figura 32: Cromatograma de íons totais tomado como exemplo de uma amostra dos gases de exaustão do biorreator, extraída com cartucho de Xad-2. | 123 |
| Figura 33: Gráfico de barras para o composto 2 - Metil - betanol, durante do o período da fermentação de dez dias. | 127 |
| Figura 34: Gráficos para avaliar os resíduos do modelo do composto 2-metil-propanol; a) gráfico de probabilidade normal dos resíduos; b) gráfico de auto-correlação cruzada. | 161 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1: Parâmetros e características do biorreator utilizado na fermentação com fungo do gênero <i>Monascus</i> | 62 |
| Tabela 2: Fatores e níveis para os planejamentos fatoriais fracionários (2^{4-1}), utilizando as frações do líquido fermentado por <i>Monascus ruber</i> , avaliados em GC-FID e GC-MS. | 68 |
| Tabela 3: Condições utilizadas para avaliação dos planejamentos e amostras do líquido fermentado por <i>Monascus ruber</i> , em GC-FID e GC-MS. | 68 |
| Tabela 4: Fatores e níveis para o Planejamento Completo (2^3) com pontos centrais, utilizando as frações do líquido fermentado por <i>Monascus ruber</i> , avaliados em GC-MS. | 69 |
| Tabela 5: Fatores e níveis para o planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}), usados no estudo dos compostos extraídos por coleta com cartuchos de Xad-2..... | 70 |
| Tabela 6: Desempenho da fermentação realizada em biorreator; médias e coeficientes de variação (C.V.) da biomassa e da absorbância do pigmento (densidade óptica em 480 nm; OD ₄₈₀), para as três fermentações. | 81 |
| Tabela 7: Valores das medidas de biomassa por gravimetria, obtidos das coletas de 12 horas, para as três fermentações; valores em miligramas de biomassa seca. | 84 |
| Tabela 8: Áreas dos picos do 3-metil-butanol (Respostas), obtidas diretamente pela integração dos picos dos cromatogramas, divididas por 10.000; para todas as corridas do planejamento fracionário 2^{4-1} (em GC-FID). | 88 |
| Tabela 9: Resultado dos testes de ANOVA para o modelo do composto 3-metil-butanol utilizando o software R..... | 91 |
| Tabela 10: Número de compostos do meio de cultura para as somas das frações (mf1, mf2 e mf3) e percentuais de coincidência frente a fermentação com maior número de compostos na soma das frações (Ferm. 02)..... | 102 |
| Tabela 11: Nomes, nº no CAS (% de coincidência), código e total acumulado (%) dos MVOC encontrados nas três fermentações por fungo <i>Monascus ruber</i> em biorreator. | 105 |
| Tabela 12: Faixa de concentração, coeficiente de determinação (R^2), limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para os alcoóis estudados. | 117 |
| Tabela 13: Resultados quantitativos para os álcoois; massa, concentração dos compostos, massa do composto por grama de | |

| | |
|---|-----|
| biomassa seca e coeficiente de correlação de Pearson entre as quantidades do composto e a biomassa..... | 118 |
| Tabela 14: Valores quantitativos máximos (massa em µg), coeficientes de variação dos máximos experimentais (C.V.), quantidades dos compostos pelo total de fluido que escoar pelo cartucho em 24 horas (M.V.H) e os valores dos períodos necessários para atingir os máximos experimentais (In. Máx)..... | 121 |
| Tabela 15: Valores quantitativos, médias e coeficiente de variação entre os pontos máximos, para a extração direta do caldo fermentativo e a coleta por Xad-2..... | 126 |
| Tabela 16: Teste de recuperação para as amostras do caldo fermentativo; valores de concentrações avaliadas, médias obtidas (%) e coeficientes de variação (C.V.) para os padrões de etanol, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol, 2-metil-butanol e 2-fenil-etanol. | 157 |
| Tabela 17: Teste de recuperação para as amostras da extração dos gases de exaustão (por Xad-2); valores de concentrações avaliadas, médias obtidas (%) e coeficientes de variação (C.V.) para os padrões de etanol, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol e 2-metil-butanol. | 159 |
| Tabela 18: Testes estatísticos para os resíduos do modelo do composto 2-metil-propanol; homocedasticidade e normalidade. | 161 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de variâncias
CAS - Chemical Abstract Service
Car - Carboxen
C.V. - Coeficiente de variação
DVB - Divinil benzeno
GC-FID - Cromatografia a gás com detector por ionização em chama
GC-MS - Cromatografia a gás com detector de massas
GNU – GNU is not Unix
HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência
ICH - Conselho Internacional de Harmonização
IR - Infravermelho
Loess - Regressão localmente ponderada
MS - Espectrometria de massas
MVOC - Compostos orgânicos voláteis microbianos
NAD - Dinucleótido de nicotinamida-adenina
NIST - Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia
NMR - Ressonância magnética nuclear
PDMS - Polidimetil siloxano
PVDS - Fluoreto de polivinilideno
SDBS - Banco de dados espectral para Compostos Orgânicos
SPE - Extração em fase sólida
SPME - Microextração em fase sólida
TIC - Cromatogramas de íons totais
UV - Ultravioleta
VOC - Compostos orgânicos voláteis

LISTA DE SÍMBOLOS

- UA₄₈₀ - Unidade de densidade óptica a 480 nm
L - Unidade de volume (litros)
M - Unidade de concentração molar
t - Teste estatístico de Student
F - Teste estatístico de Fisher
2³ - Planejamento fatorial com três variáveis e dois níveis
X - Variáveis independentes
Y - Variáveis dependentes
Ŷ - Variáveis dependentes ajustadas
β - Parâmetros ou coeficientes da regressão
ε - Erro aleatório ou experimental
p - Valor de probabilidade associado ao teste estatístico
Å - Unidade de medida de comprimento (10⁻¹⁰ m)
λ_{máx} - Comprimento de onda máximo
u.A. - Unidade de área integrada do pico no cromatograma
α - Probabilidade de cometer o erro do tipo I ao rejeitar H₀
H₀ - Hipótese nula (referente a igualdade)
R² - Coeficiente de Determinação
m/z - Razão entre massa e carga de um íon
LOD - Limite de detecção
LOQ - Limite de quantificação
r - Coeficiente de correlação de Pearson

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 27 |
| 1.1 OBJETIVOS GERAIS | 33 |
| 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 33 |
| 1.3 ESTRUTURA DE TÓPICOS..... | 34 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 35 |
| 2.1 ADITIVOS ALIMENTARES..... | 35 |
| 2.2 CORANTES NATURAIS..... | 36 |
| 2.3 PIGMENTOS PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS..... | 36 |
| 2.4 LINHAGENS USADAS PARA A PRODUÇÃO DE PIGMENTOS..... | 38 |
| 2.5 OS FUNGOS | 38 |
| 2.6 NUTRIÇÃO DE FUNGOS..... | 40 |
| 2.7 PROCESSOS FERMENTATIVOS..... | 41 |
| 2.8 METABÓLITOS PRODUZIDOS DURANTE A FERMENTAÇÃO POR FUNGOS DO GÊNERO <i>MONASCUS</i> ... | 42 |
| 2.9 COMPOSTOS VOLÁTEIS MICROBIANOS (MVOC)..... | 43 |
| 2.10 COMPOSTOS VOLÁTEIS MICROBIANOS E O METABOLISMO FERMENTATIVO | 44 |
| 2.11 PRODUÇÃO DE ETANOL E ÁLCOOIS SUPERIORES..... | 44 |
| 2.11.1 Etanol | 45 |
| 2.11.2 Álcoois superiores..... | 46 |
| 2.12 METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA ANÁLISE DOS METABÓLITOS DE FUNGOS DO GÊNERO <i>MONASCUS</i> | 48 |
| 2.13 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE) E MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)..... | 49 |
| 2.14 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS | 52 |
| 2.15 PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO..... | 53 |
| 2.16 PLANEJAMENTO COMPLETO COM PONTO CENTRAL..... | 53 |
| 2.17 MODELOS EMPÍRICOS..... | 54 |
| 2.18 MODELOS NÃO-PARAMÉTRICOS E REGRESSÃO POLINOMIAL LOCAL..... | 55 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 57 |
| 3.1 MICRORGANISMOS..... | 57 |
| 3.1.1 Manutenção das culturas..... | 58 |
| 3.1.2 Fermentação em Erlenmeyer | 59 |
| 3.2 FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR..... | 60 |
| 3.3 COLETA, PREPARO E ARMAZENAGEM DAS AMOSTRAS..... | 62 |
| 3.4 PROCEDIMENTO PARA AS AMOSTRAS DO CALDO | |

| | |
|---|------------|
| FERMENTATIVO..... | 62 |
| 3.5 BIOMASSA PRESENTE NAS AMOSTRAS DO CALDO..... | 63 |
| 3.6 PROCEDIMENTO EMPREGADO NOS CARTUCHOS DE XAD-2 (SPE), PARA COLETA DA FASE GASOSA..... | 64 |
| 3.7 DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DO EXTRATO CONTENDO OS PIGMENTOS PRODUZIDOS NA FERMENTAÇÃO SUBMERSA..... | 64 |
| 3.8 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE PIGMENTO VERMELHO PRODUZIDO NA FERMENTAÇÃO..... | 65 |
| 3.9 TESTE DE RECUPERAÇÃO DO PIGMENTO LARANJA..... | 66 |
| 3.10 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS..... | 67 |
| 3.10.1 Planejamento para avaliar amostras das coletas do caldo fermentativo e otimizar as condições para extração dos MVOC..... | 67 |
| 3.10.2 Planejamento para avaliar amostras das coletas por cartuchos de xad-2 e otimizar as condições para extração dos MVOC..... | 69 |
| 3.11 PREPARO DOS PADRÕES DE QUANTIFICAÇÃO..... | 70 |
| 3.12 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS COLETADAS DO CALDO FERMENTATIVO POR SPME E GC-MS..... | 70 |
| 3.13 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS COLETADAS POR CARTUCHOS DE XAD-2 POR SPME E GC-MS..... | 71 |
| 3.14 TESTES DE RECUPERAÇÃO PARA OS ÁLCOOIS EXTRAÍDOS DO CALDO FERMENTATIVO E DOS GASES DE EXAUSTÃO..... | 72 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 75 |
| 4.1 AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS EXTRAÍDOS DO CALDO FERMENTATIVO (PIGMENTOS E BIOMASSA)..... | 75 |
| 4.2 PIGMENTOS PRODUZIDOS PELO FUNGO <i>MONASCUS</i> | 76 |
| 4.3 BIOMASSA DO CALDO FERMENTATIVO..... | 83 |
| 4.4 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS PARA O CALDO FERMENTATIVO E COLETA POR CARTUCHOS DE XAD-2.... | 86 |
| 4.4.1 Planejamentos experimentais para avaliação do caldo fermentativo..... | 86 |
| 4.4.2 Planejamento experimental para avaliação da coleta por xad-2..... | 99 |
| 4.4.3 Relevância dos planejamentos experimentais..... | 100 |
| 4.5 AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS EXTRAÍDOS DO CALDO FERMENTATIVO POR SPME E POR CARTUCHOS DE XAD-2 (SPE)..... | 101 |
| 4.5.1 Frações dos meios de cultura (mf1, mf2 e mf3) | 101 |

| | |
|---|------------|
| 4.5.2 Avaliação dos compostos voláteis microbianos no caldo fermentativo..... | 103 |
| 4.5.3 Avaliação qualitativa dos compostos MVOC..... | 103 |
| 4.5.4 Avaliação dos percentuais dos compostos MVOC..... | 109 |
| 4.5.5 Estudo por modelagem não-paramétrica dos MVOC mais regulares..... | 112 |
| 4.5.6 Resultados dos testes de recuperação para os álcoois extraídos do caldo fermentativo e dos gases de exaustão..... | 116 |
| 4.6 OBTENÇÃO DOS VALORES MÁXIMOS QUANTITATIVOS PARA OS CINCO MVOC ESTUDADOS NO CALDO FERMENTATIVO..... | 117 |
| 4.7 OBTENÇÃO DOS VALORES QUANTITATIVOS PARA OS QUATRO MVOC ESTUDADOS POR COLETA COM CARTUCHOS DE XAD-2..... | 120 |
| 4.8 COMPARAÇÕES ENTRE OS VALORES ENCONTRADOS PARA OS MVOC PRESENTES NA EXTRAÇÃO DIRETA DO CALDO FERMENTATIVO E NA EXTRAÇÃO POR XAD-2..... | 124 |
| 5 CONCLUSÃO..... | 129 |
| 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 131 |
| APÊNDICE A – Cálculos e gráficos para a biomassa do caldo fermentativo referentes as fermentações 02 e 03; códigos para o software R..... | 147 |
| APÊNDICE B – Cálculos e gráficos para o 3-metil-butanol ; exemplo para demonstrar a análise realizada com o planejamento fracionário em GC-FID, dos álcoois ;códigos para o software R..... | 149 |
| APÊNDICE C (continuação de B) – Cálculos e gráficos para o 3-metil-butanol ; exemplo para demonstrar a análise realizada com o planejamento fracionário em GC-FID, dos álcoois; códigos para o software R..... | 151 |
| APÊNDICE D (continuação de B) – Cálculos e gráficos para o 3-metil-butanol ; exemplo para demonstrar a análise realizada com o planejamento fracionário em GC-FID, dos álcoois; códigos para o software R..... | 153 |
| APÊNDICE E (continuação de B) – Cálculos e gráficos para o 3-metil-butanol ; exemplo para demonstrar a análise realizada com o planejamento fracionário em GC-FID, dos álcoois; códigos para o software R..... | 155 |
| APÊNDICE F - Teste de recuperação para as amostras do caldo fermentativo..... | 157 |
| APÊNDICE G - Teste de recuperação para as amostras de extração dos gases de exaustão (por Xad-2)..... | 159 |

APÊNDICE H - Testes estatísticos e gráficos usados na avaliação dos
resíduos do modelo para o 2-metil-propanol; homocedásticidade,
correlação e normalidade.....161

1 INTRODUÇÃO

Aditivos químicos são utilizados há décadas por indústrias de diversos ramos e em grandes quantidades. A quantidade e qualidade desses aditivos sempre estiveram em debate nos meios de comunicação, gerando polêmicas. Informações pouco específicas acerca da natureza química desses aditivos e seus efeitos ao organismo tornam difíceis as pesquisas sobre sua utilização a longo prazo e o que isso pode acarretar à saúde das pessoas. Entre os aditivos mais criticados encontram-se os corantes, utilizados por diversas indústrias para atrair a atenção dos seus clientes, uma vez que o aspecto visual do produto, associado à qualidade, vai garantir o sucesso das vendas.

Os corantes artificiais adicionados aos alimentos, em parte para atrair a atenção e imitar o visual de uma fruta, legume ou carne, são certamente os mais questionados entre todos os aditivos. Na maioria dos casos os corantes não são funcionais e, apesar de serem controlados pela legislação, os corantes artificiais são utilizados na maioria dos produtos consumidos. Intuitivamente as pessoas têm consciência de que os corantes artificiais não fazem bem para a saúde; apesar de a legislação atual recomendar a utilização de corantes naturais, ainda existem poucas opções de produtos com corantes naturais ou até sem corantes. Embora existam esforços para se utilizar corantes naturais em alimentos, não é muito simples substituir totalmente os corantes artificiais. A produção de corantes naturais é complexa, sua degradação é rápida e as opções de cores são mínimas (BOO *et al.*, 2012; SHARMILA *et al.*, 2013).

Existem métodos bem elaborados de extração de corantes naturais. O corante urucum (*Bixa orellana* L.), por exemplo, é produzido industrialmente por aquecimento das sementes com óleo vegetal, seguido por extração com solventes. Esse processo de extração é demorado e requer purificação do corante e recuperação de solventes (COSTA; CHAVES, 2005).

Pode-se produzir corantes naturais a partir de outras fontes não vegetais como os fungos, por um processo fermentativo de baixo custo ambiental com grande eficiência, pouco espaço físico e sem utilização de solventes, pois não há necessidade de plantações e instrumentação de grande porte para o beneficiamento da matéria-prima e preparação do corante. O pigmento produzido por fungos e outros microrganismos não são apenas corantes de efeito estético, são produtos do metabolismo,

contendo em sua composição vários nutrientes funcionais como proteínas, aminoácidos, vitaminas, carboidratos e outros compostos que podem auxiliar na suplementação alimentar humana (HAMANO; OROZCO; KILIKIAN, 2005).

Comumente, um pigmento de cor vermelha é produzido por alguns fungos do gênero *Monascus*, porém as espécies de *Monascus* podem produzir também pigmentos amarelo e laranja, entre outros metabólitos provenientes da fermentação de determinados substratos. A utilização desse gênero de fungo na produção de pigmento vermelho é muito difundida no Japão, na China, na Indonésia, na Coreia e na Índia. A produção de pigmentos por espécies de *Monascus* normalmente é realizada pelo processo de fermentação em estado sólido, pois os fungos filamentosos, como os do gênero *Monascus*, colonizam substratos sólidos com facilidade e podem crescer em baixo conteúdo de umidade (MEINICKE *et al.*, 2012). Apesar da fermentação em estado sólido ser tradicionalmente empregada, pode-se produzir pigmento vermelho com fermentação por *Monascus* em meio submerso; esse meio possui algumas vantagens em relação ao meio sólido, como a possibilidade de controle de pH e nutrientes durante o processo fermentativo, porém existem implicações no uso em alimentos. A literatura existente gera algumas dúvidas a respeito do processo fermentativo em meio submerso e sua aplicação em alimentos, o que impede que outras formas de substratos sejam testadas, além de desestimular o estudo de novas metodologias para o controle do processo. Sendo assim, a fermentação em meio submerso é um processo novo e promissor, para fungos do gênero *Monascus*, necessitando de uma investigação científica mais aprofundada (MORITZ, 2005; MUKHERJEE; SINGH, 2011). O estudo de compostos orgânicos gerados durante o processo pode possibilitar a utilização de outros substratos na produção de pigmento.

Alguns compostos, como o etanol e o ácido málico, presentes nas fermentações com grão de arroz e outros, estão sendo avaliados por outros autores (SOUZA; MENEZES, 2004; CHAMPDORE *et al.*, 2009; GASHLAN, 2009). Existem vários compostos de origem microbiana que recebem pouca atenção quando se trabalha com produção de pigmentos por fungos, entre eles, uma série de álcoois, aldeídos, ésteres e cetonas. Apesar desses compostos serem produtos frequentes do metabolismo, apenas alguns poucos são medidos e estudados com frequência. Recentemente tem se estudado algumas dessas classes de

compostos microbianos, principalmente os mais voláteis, com o objetivo de entender as relações com a bioquímica dos processos, não apenas para a produção de pigmento mas em vários outros processos. O número de trabalhos com esses compostos, que hoje se conhece como MVOC, abreviação em inglês para Compostos Orgânicos Voláteis Microbianos, ainda é pequeno se comparado com os compostos bem conhecidos, como o etanol e a acetona. Esses dois compostos são produzidos em quantidades consideráveis nos processos fermentativos, porém vários outros voláteis microbianos de menor proporção não são avaliados, muitas vezes são até ignorados. Mais recentes ainda são os estudos envolvendo o sinergismo e o antagonismo provocado por vários compostos voláteis microbianos, quando interagem com outros seres vivos, normalmente microscópicos (TUNC *et al.*, 2007). Trata-se de uma série de interações pouco conhecidas entre espécies de microrganismos ou com células especializadas da própria espécie, promovendo reações de maturação ou inibição, por via do ar. No caso de produção biotecnológica de pigmentos naturais, esses compostos microbianos voláteis não são aproveitados, sendo rejeitados através da exaustão dos reatores juntamente com o dióxido de carbono da respiração celular. Existem vários métodos para análise de compostos voláteis, no entanto, medições feitas em tempo real necessitam de equipamentos de medidas *in loco*, que nem sempre possuem a sensibilidade analítica desejada pelo analista. Uma alternativa economicamente viável é a utilização da microextração em fase sólida (abreviação em inglês - SPME) para extrair com maior eficiência compostos voláteis microbianos *in vivo* quando se necessita de maior sensibilidade (WANG *et al.*, 2016).

Sendo assim, o presente trabalho avaliou alguns procedimentos de extração de compostos orgânicos voláteis MVOC associados com o processo de produção de pigmento, pelo fungo do gênero *Monascus*. Os compostos avaliados são os emitidos ou produzidos durante o processo fermentativo submerso e após o término do processo. Para a fermentação foram utilizadas duas espécies de fungos do gênero *Monascus*. Um deles, *Monascus ruber* CCT 3802, é proveniente de coleção de cultura e aparece em trabalhos onde se produz pigmento vermelho por fermentação de grãos de arroz (JOURNOUD; JONES, 2004). O outro, é um fungo selvagem, *Monascus* sp., cuja produção de pigmento vermelho se queria verificar. As duas espécies foram avaliadas

separadamente, nos mesmos tipos de meios de cultura, em fermentação submersa em Erlenmeyer.

O foco principal deste trabalho foi a avaliação e a otimização das metodologias de análise dos compostos orgânicos e metabólitos mais relevantes, encontrados no processo fermentativo citado acima. Foi utilizado um reator (biorreator) especialmente projetado para que se pudesse extrair os compostos orgânicos voláteis durante o processo fermentativo, assim como retirar alíquotas da fase líquida para que se pudesse avaliar os compostos presentes naquela, principalmente os pigmentos vermelho e laranja. O pigmento vermelho e a biomassa fúngica foram utilizados como referência para a comparação do desempenho da fermentação, como o descrito por outros autores (MEINICKE *et al.*, 2012).

A avaliação dos MVOC da fase de vapor foi realizada durante a fermentação (*online*), com o emprego de extração e microextração em fase sólida (SPE e SPME). Estas duas técnicas são bastante utilizadas em conjunto com técnicas de separação, como cromatografia a gás e cromatografia líquida. O estudo detalhado dos MVOC, do líquido (ou caldo) fermentativo, foi necessário porque foi utilizado meio de cultura complexo (pó de arroz), onde reações químicas podem ocorrer paralelamente devido às mudanças de pH do meio, provocadas pelas reações de degradação e síntese inerentes do processo fermentativo. Alguns trabalhos encontrados em periódicos utilizam microextração em fase sólida para avaliar compostos orgânicos voláteis de materiais biológicos, visando principalmente as áreas farmacológica e toxicológica (LAVINE *et al.*, 2012). Poucos trabalhos com ênfase na área biotecnológica e alimentícia são encontrados, onde se utiliza microextração em fase sólida para avaliar metabólitos durante o processo fermentativo. A extração em fase sólida (abreviação em inglês - SPE), aplicada a fluidos gasosos, recebe muita ênfase na área ambiental, sendo muito utilizada para a análise de ar e gases em ambientes urbanos, hospitalares e industriais (YURDAKUL *et al.*, 2013).

Para o produto final da fermentação, fase líquida onde está presente o pigmento vermelho, foram utilizados alguns métodos de separação e extração visando avaliar grupos de compostos como os componentes do pigmento que contribuem para a cor vermelha (CHEN *et al.*, 2013).

Por fim, os resultados foram utilizados para a montagem de um perfil do processo fermentativo, em termos de compostos orgânicos passíveis de extração pelas técnicas utilizadas nesse trabalho (SPE, SPME). Através desse perfil foi possível observar o comportamento da distribuição dos MVOC durante diferentes períodos de fermentação, separando-os dos demais compostos voláteis não associados com o microrganismo. Sabe-se, por trabalhos anteriores, que diferentes espécies de fungos e diferentes meios de cultura irão conter compostos bastante peculiares, mas, por falta de metodologias e referências, esses não são totalmente avaliados e alguns são, até mesmo, ignorados (POLIZZI *et al.*, 2011). Nesse trabalho, foi enfatizada a importância do planejamento experimental para obter uma maior eficiência, com menor número de análises e menor gasto de recursos, mesmo se tratando de uma fermentação de baixo custo operacional. Um grande volume de análises não é desejável, principalmente porque a geração de resíduos químicos e biológicos requerem grande consumo de energia para serem neutralizados; neste caso, a triagem realizada durante o planejamento experimental é essencial para reduzir custos e melhorar a exatidão dos resultados.

1.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a viabilidade de utilização de duas metodologias de extração, por SPME e SPE, frente à identificação e quantificação dos compostos orgânicos voláteis produzidos durante o processo de fermentação e produção de pigmento vermelho pelo fungo do gênero *Monascus*.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Produzir pigmento vermelho a partir da fermentação por fungo do gênero *Monascus*, em biorreator, utilizando cultivo submerso com meio de cultura de baixo custo e com produtividade comparável com a literatura.

b) Comparar o desempenho da fermentação, em biorreator com meio submerso, com outras referências, usando os parâmetros de biomassa e absorbância do pigmento vermelho extracelular.

c) Avaliar a viabilidade de utilização da SPME para extração de compostos orgânicos presentes no caldo fermentativo proveniente da produção de pigmento por fungo do gênero *Monascus*, durante o processo e após o término desse. Otimizar o processo de extração através de modelos empíricos e utilizar modelos não-paramétricos para descrever o comportamento e o acúmulo dos principais MVOC presentes durante o processo de produção de pigmento.

d) Identificar e selecionar os compostos orgânicos produzidos pela presença do fungo do gênero *Monascus* (MVOC) e separá-los dos demais compostos produzidos por processos degradativos (VOC) produzidos antes e durante o processo fermentativo e de produção de pigmento vermelho.

e) Avaliar a viabilidade de utilização da extração em fase sólida (SPE), com o uso de cartuchos de Xad-2, frente à extração de compostos voláteis presentes nos gases de exaustão do biorreator, durante a produção de pigmento por fungo do gênero *Monascus*. Otimizar o processo de extração através de modelos empíricos criados a partir de

2 REVISÃO DA LITERATURA

Os principais assuntos para a compreensão dos objetivos desse trabalho estão resumidos nos itens abaixo.

2.1 ADITIVOS ALIMENTARES

Nos últimos anos, o consumo de alimentos industrializados tornou-se um hábito frequente entre as pessoas. Tais alimentos são bastante atrativos porque oferecem diversas vantagens quanto a sua praticidade e aparência. Ficou inviável utilizar apenas alimentos *in natura*, pois a demanda por alimentos deste tipo, apesar de ser grande, requer alimentos de boa qualidade e com tempo de conservação razoável. É difícil conseguir essas duas qualidades em produtos *in natura*, daí a necessidade de alimentos industrializados que, inevitavelmente, deverão conter aditivos alimentares de todos os tipos. A utilização de alguns aditivos químicos pode contribuir para o empobrecimento da dieta e aparecimento de doenças crônicas que podem ser responsáveis pela diabetes, doenças circulatórias, entre outras (SOUZA; MENEZES, 2004; BARRETO *et al.* 2005).

Aditivos químicos são substâncias puras ou complexas que podem conter, ou não, valor nutricional. Não são substâncias naturais dos alimentos e necessitam ser adicionadas com a finalidade de impedir alterações diversas, conferir e intensificar a cor, aroma e sabor dos alimentos. Entre os aditivos químicos mais conhecidos e mais criticados estão os corantes artificiais, que, trivialmente, são os mais discutidos porque são os aditivos visíveis dos alimentos, diferente dos conservantes que normalmente não possuem cor. Os corantes artificiais são adicionados por questões estéticas, para realçar e colorir os alimentos. Eles não possuem uma funcionalidade nutricional, e sim um fim meramente comercial. Segundo estudos realizados por Husain *et al.* (2006), o uso de corantes artificiais pode ser prejudicial para a saúde, principalmente a infantil, pois os limites máximos de ingestão de corantes, normalmente, são estabelecidos para adultos. No entanto, a adição de corantes artificiais aos alimentos está longe de ser eliminada, o que traz prejuízos às pessoas que necessitam consumir alimentos industrializados.

2.2 CORANTES NATURAIS

Consideram-se como corantes naturais os pigmentos, substâncias coradas e inócuas, extraídas de fontes vegetais ou animais, considerados os devidos métodos de extração e beneficiamento. Alguns dos corantes naturais permitidos pela legislação brasileira são: açafrão, cochonilha (ácido carmínico), antocianinas, carotenóides, betalaínas, clorofilas, hemoglobina, páprica e urucum. Substâncias coradas de origem natural tem sido utilizadas há vários anos para conferir aspectos naturais aos produtos. Algumas delas possuem grande solubilidade em óleos, o que facilita sua utilização em alimentos com relativo teor de gorduras como os derivados do leite e óleos vegetais (DUFOSSE, 2006; ABEROUMAND, 2011). Como exemplo de pigmentos de origem vegetal e animal podem-se citar as antocianinas e o carmim. As antocianinas são as substâncias de maior abundância no reino vegetal, podem ser encontradas em grande abundância distribuídas pelas flores, frutos e demais vegetais superiores. Subprodutos da indústria do vinho são utilizados na preparação comercial de antocianinas. O Carmim é um termo usado para definir um complexo de alumínio e ácido carmínico, esse ácido é extraído de insetos desidratados da espécie *Dactylopius coccus*, e é empregado com bastante sucesso em produtos cárneos como salsichas, conservas e outros (TABAR, 2003; RAMOS, 2006).

2.3 PIGMENTOS PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS

Uma alternativa criativa para a produção de pigmentos é a utilização de microrganismos como microalgas, leveduras e fungos. Um caso bem-sucedido de produção biotecnológica é o do betacaroteno, citado por Downham e Collins (2000), onde as algas produzem misturas de isômeros que são benéficas à saúde se comparadas com o betacaroteno sintético.

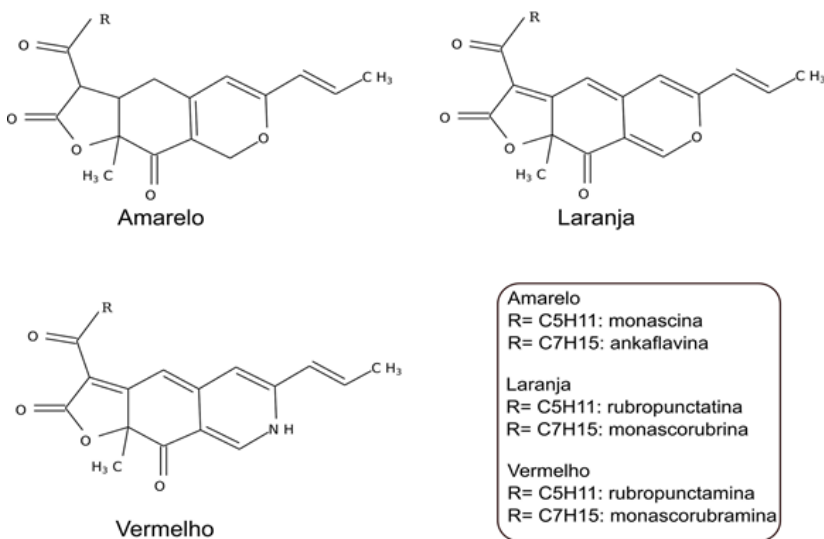
Produção de pigmentos naturais por microalgas e fungos filamentosos é bastante comum na natureza, em particular nos fungos. Eles têm importantes funções na reciclagem e reaproveitamento da matéria orgânica, possuem grande poder de adaptação, o que os torna potencialmente produtores de diversas moléculas e sugere a utilização para fins industriais (BABITHA; SOCCOL; PANDEY, 2006).

Os fungos do gênero *Monascus* são bem conhecidos em países

como Japão, China, Coréia, Indonésia e Taiwan. Nesses países, utiliza-se o pigmento produzido pela fermentação em estado sólido de materiais amiláceos derivados de arroz. Os fungos desse gênero, em especial a espécie *Monascus ruber*, produzem pigmentos vermelhos de interesse comercial, que são atualmente bem empregados nos países da Ásia para colorir arroz, algumas bebidas e carnes (VILAR *et al.*, 1999; LIM *et al.*, 2000).

Apesar do pigmento vermelho ser muito atrativo comercialmente, o fungo do gênero *Monascus* produz também pigmentos laranja e amarelo, cujos principais componentes são: monascorubrina e rubropunctatina, para o pigmento laranja; monascina e ankaflavina, para o pigmento amarelo; monascorubramina e rubropunctamina, para o pigmento vermelho (ZHENG *et al.*, 2009). A figura 2 (itens a, b e c) ilustra as estruturas dos principais componentes de cada pigmento, como citado acima.

Figura 2: Estruturas dos principais componentes de cada pigmento produzido pelo fungo do gênero *Monascus*.



Segundo Vendruscolo *et al.* (2013), o pigmento vermelho pode ser considerado como a conversão química do pigmento laranja, quando em elevados valores de pH e em presença de uma fonte apropriada de nitrogênio. Os pigmentos produzidos pelo fungo *Monascus* são sensíveis a valores extremos de pH (abaixo de 2 e acima de 10), exposição a luz e calor, são pouco solúveis em água, porém podem reagir rapidamente com grupamentos amino de proteínas e aminoácidos, formando compostos solúveis. Os pigmentos podem manter sua coloração estável por diversos meses quando conservados em solventes orgânicos como butanol (HAJJAJ *et al.*, 1997).

Os pigmentos produzidos pelo fungo do gênero *Monascus* tem grande destaque no Japão, mas encontram-se bem difundidos para outros países, existindo mais de cinquenta patentes referentes ao processo de produção e modificação dos pigmentos *Monascus* (WONG e KOEHLER, 1981; LIN *et al.*, 2008).

2.4 LINHAGENS USADAS PARA A PRODUÇÃO DE PIGMENTOS

As cepas utilizadas na produção de pigmentos *Monascus* são empregadas, principalmente, para fermentação em meio sólido, devido a sua adaptação nativa. As cepas isoladas e purificadas provêm de países que as utilizam com grande frequência, como a Coreia, China, Indonésia, Japão e Tailândia. As cepas possuem algumas características comuns, no entanto também há muitas peculiaridades quanto ao fator de crescimento, tonalidade e composição do pigmento, rendimento da transformação do substrato e composição dos metabólitos e produtos secundários. Devido a um interesse recente por produtos do metabolismo do fungo *Monascus*, que podem ser usados no controle de doenças e de crescimento microbiano, várias cepas estão se tornando mais populares em pesquisas na área médica e nutricional (WANG; JU; ZHOU, 2005; PISAREVA; KUJUMDZIEVA, 2006).

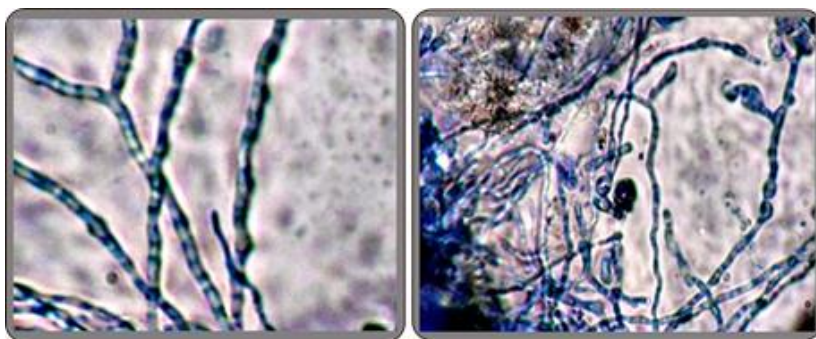
2.5 OS FUNGOS

O reino *fungi* é constituído pelos organismos denominados fungos, líquens e algas do gênero *Prototheca*. Entre suas características mais marcantes, encontram-se as células do tipo eucarióticas (núcleos com membranas), semelhantes às de outros organismos eucarióticos,

porém não formando tecidos verdadeiros, não armazenam amido como as células vegetais, mas glicogênio, semelhante às células animais. As células apresentam parede celular composta de quitina, um polissacarídeo estrutural formado por N-acetil-D-glicosamina, unidas por ligações $\beta(1,4)$ glicosídicas, sendo aquela considerada como o análogo da celulose nas plantas (LACAZ *et al.*, 2002).

Os fungos possuem estruturas especiais chamadas de “Aparelho vegetativo ou micélio”, que são formadas por uma célula ou um conjunto de células, cujas funções se relacionam com a vida vegetativa dos fungos. Quando o micélio é dividido em compartimentos, denominados de septos, é chamado de filamentosos. Os micélios (falsos tecidos) são formados por tramas de corpos vegetativos denominados de hifas, ilustrados na micrografia da figura 3, para o fungo *Monascus ruber*, corados com azul algodão (corante para micrografias). As hifas do micélio vegetativo liberam e absorvem substâncias, também são responsáveis por fixar o fungo ao substrato.

Figura 3: Micrografias mostrando as hifas (esquerda) e micélios (direita) do fungo *Monascus ruber*, usado neste trabalho.



Fonte: do autor

Os elementos envolvidos na reprodução dos fungos, como esporos, são formados no aparelho de frutificação, onde podem ocorrer dois modos de reprodução: sexuada ou assexuada. A reprodução assexuada dos fungos se caracteriza pela falta de união dos núcleos celulares ou conjugação, portanto, são células não-sexuadas. Entre as células não-sexuadas estão os conídios, que possuem grande importância na perpetuação de várias espécies de fungos. Embora a

forma mais simples de reprodução assexuada seja por esporos, tanto os conídios como os esporos germinam quando em contato com substratos naturais ou artificiais, formando micélios férteis. Diferente da reprodução assexuada, a reprodução sexuada produz células sexuais (gametas) por união, ou fusão, dos núcleos (LACAZ *et al.*, 2002; PAPAGIANNI, 2004, KRULL *et al.*, 2013).

Semelhante ao que ocorre com outros microrganismos, os fungos podem variar sua forma, mutações podem ocorrer espontaneamente ou serem induzidas por substâncias químicas, calor ou radiação. Para evitar mudanças de forma, os fungos são mantidos nos laboratórios em meios de culturas específicos, ricos em determinadas substâncias e pobre em outras, dependendo da sua espécie e função.

2.6 NUTRIÇÃO DE FUNGOS

Os fungos são heterótrofos, não possuem clorofila ou qualquer pigmento relacionado com a utilização da luz como fonte para obtenção direta de energia. Não armazenam amido e sim glicogênio, difuso em seu citoplasma. Não são capazes de sintetizar produtos orgânicos a partir de carbono inorgânico.

Para se alimentar, os fungos liberam enzimas no meio onde se encontram. Essas enzimas degradam os componentes acessíveis do meio em moléculas que podem ser assimiladas pelas células fúngicas para suprir suas necessidades metabólicas. Esse sistema complexo de alimentação demanda um grande consumo de energia que não pode ser desperdiçada pelos fungos; isso propicia um mecanismo de sobrevivência que necessita ser eficiente. Para tal, os fungos desenvolveram um sistema de defesa contra outros microrganismos. O sistema de defesa dos fungos é bastante complexo. Basicamente pode-se afirmar que os seguintes fatores contribuem para esse sistema: a produção de enzimas é controlada conforme os recursos disponíveis e utilizados; os fungos produzem supressores de outros microrganismos, como os antibióticos, toxinas e outras substâncias, que impedem a concorrência pelos seus substratos. Devido aos seus atributos de alimentação e defesa de território, juntamente com suas qualidades morfológicas que lhes conferem um forte poder de adaptação, os fungos podem sobreviver em vários ambientes e utilizar vários substratos como fonte de alimentação. Em ambos os casos, alimentação e defesa de

território, os fungos produzem uma grande quantidade de metabólito, que pode ser tanto extracelular como intracelular. A existência desses metabólitos depende de diversos fatores, como a composição do substrato, a linhagem do fungo, as condições de fermentação e outros (MORITZ, 2005; BERTRAND *et al.*, 2013).

2.7 PROCESSOS FERMENTATIVOS

A maneira mais simples de entender o processo fermentativo é considerá-lo como uma transformação da matéria orgânica por enzimas, utilizando microrganismos produtores em potencial. Vários processos fermentativos estão sendo aprimorados com o objetivo de produção de enzimas, no entanto, um determinado processo fermentativo só chega à escala industrial se for altamente compensatório, competitivo e inovador. Uma série de processos estão sendo empregados atualmente para aumentar a produtividade das fermentações industriais; seleção de microrganismos produtores, melhorias nos projetos dos reatores, utilização de algoritmos em softwares, pesquisas e desenvolvimentos em biologia molecular e genética estão promovendo inovações e ganhos de produtividade no aprimoramento dos processos fermentativos (CARVALHO *et al.*, 2005).

Várias espécies de fungos têm sido utilizadas na indústria para produzir diversos tipos de compostos através de processos fermentativos. Maior destaque pode ser dado às indústrias das áreas farmacêutica, alimentícia e de produção de materiais orgânicos. Produtos orgânicos como ácido cítrico, ácido láctico, ácido glucônico, ácido gálico, glicerina, penicilina, patulina e outros, têm sido obtidos por ação enzimática dos fungos de importância industrial (LACAZ *et al.*, 2002, KHAN *et al.*, 2014).

Os principais tipos de fermentação encontrados nos trabalhos realizados com microrganismos são: alcoólica, láctica e acetona-butanol. A fermentação alcoólica é um processo anaeróbio para produção de energia, onde ocorre produção de etanol e dióxido de carbono como produtos principais. Os subprodutos desta fermentação podem ser álcoois superiores, glicerol, ácido pirúvico e succínico. Na fermentação láctica, o produto principal é o ácido láctico, e como subprodutos podem ser encontrados voláteis como acetona, acetaldeído, acetoína e outros. Butanol e acetona são os subprodutos formados na fermentação acetona-

butanol, o principal produto é o ácido butírico (BORZANI *et al.*, 2001; MEYER *et al.*, 2013).

Nos fungos do gênero *Monascus*, a fermentação alcoólica ocorre através do consumo da glicose do meio de cultura produzindo etanol, que é consumido durante a produção do pigmento vermelho. A via metabólica para a formação do pigmento é bastante complexa, e os subprodutos não são totalmente conhecidos (VENDRUSCOLO, 2009).

2.8 METABÓLITOS PRODUZIDOS DURANTE A FERMENTAÇÃO POR FUNGOS DO GÊNERO *MONASCUS*

Os fungos do gênero *Monascus* pertencem à família *Monascaceae* e ao filo *Ascomycotina*, existem várias espécies desse gênero, porém, destacam-se as espécies *M. Ruber*, *M. pilosus* e *M. purpureus*. Apesar de ser facilmente encontrado e disseminado na Europa e na Ásia, o fungo *Monascus* também pode ser encontrado no Brasil. Recentemente, foi isolada uma linhagem de *Monascus ruber* van Tieghen em milho brasileiro processado (RIBEIRO *et al.*, 2003; CHAGAS, 2012).

Além da fermentação do fungo *Monascus* produzir pigmentos, também é possível que outros metabólitos sejam produzidos ou formados. Os dois mais estudados são: policetídeos, que possuem atividades bioativas, e citrinina (ou antimicina), uma micotoxina com atividade hepato nefrotóxica (CHELI *et al.*, 2013). A citrinina é um metabólito indesejável na produção de pigmentos por *Monascus*; vários estudos têm sido realizados com o propósito de minimizar a produção de citrinina. Apesar dos esforços para entender a via metabólica que leva à produção de citrinina pelo fungo *Monascus*, ainda não foram determinadas exatamente quais enzimas participam dessa via (PASTRE *et al.*, 2007; PANDA *et al.*, 2010).

Outro metabólito produzido por fungos do gênero *Monascus* é a lovastatina (ou monacolina- k). Segundo Panda *et al.* (2010), esse metabolito inibe a produção de colesterol e reduz seu nível no sangue. Outros metabólitos importantes são os ácidos orgânicos (málico e succínico). Segundo Vendruscolo (2009), esses ácidos mostram-se ligeiramente inibidores da produção de pigmento, sendo de fundamental importância no mecanismo de fermentação pelo fungo do gênero *Monascus*.

2.9 COMPOSTOS VOLÁTEIS MICROBIANOS (MVOC)

Pesquisas recentes têm avaliado uma série de compostos orgânicos voláteis produzidos por microrganismos com objetivo de entender as relações e interações destes compostos com as unidades da cultura e com outros microrganismos. Alguns desses compostos orgânicos têm inibido ou estimulado o crescimento de diversas outras espécies. Diferente dos metabólitos liberados em fase sólida ou aquosa, os compostos voláteis microbianos podem atuar em células dos micélios e esporos através do ar, o que possibilita um alcance mais efetivo em termos do mecanismo de estímulo ou inibição, considerando que muitos microrganismos possuem células expostas ao ar.

Alguns pesquisadores, como Mitchell *et al.* (2010), realizaram estudos com compostos voláteis microbianos sendo utilizados como inibidores de crescimento de micróbios causadores de doenças em plantas, um exemplo interessante de antagonismo. Outros autores, como Minerdi *et al.* (2009), constataram a presença de compostos sesquiterpenos, responsáveis por inibir o crescimento micelial e reprimir expressão de alguns genes relacionados a um tipo de virulência.

Rezende (2010) citou como exemplo o fungo *Muscodor albus*, sendo um reconhecido produtor de compostos orgânicos voláteis antimicrobianos, capaz de produzir cerca de trinta compostos pertencentes a cinco classes químicas (álcoois, ésteres, cetonas, ácidos e derivados de lipídios). Ainda, segundo Rezende (2010), pouco se conhece acerca da ação dos compostos voláteis sobre o controle microbiano; acredita-se que eles atuam na expressão de proteínas e enzimas.

A utilização dos MVOC para métodos de controle de pragas (antagonismo) em cultivo de produtos agrícolas foi estudada por Siva *et al.* (2015); nesse trabalho foram estudados por GC-MS cerca de vinte e sete compostos MVOC, que mostraram atividade antifúngica quando em testes *in vitro*.

Estudar as relações de antagonismo e sinergismo não é uma tarefa simples; em especial, as relações de sinergismo via MVOC são bastante complexas, envolvendo interações químicas que muitas vezes são desconhecidas. Os fungos ocupam uma grande parcela entre os microrganismos presentes em praticamente toda a terra; grande parte deles são originários de florestas, mas possuem adaptabilidade

extraordinária para vários ambientes. Gavin (2012) encontrou cerca de 150 compostos voláteis em 16 fungos isolados de filmes cinematográficos; nesse trabalho, os autores observaram alguns marcadores químicos comuns entre os fungos, o que proporcionou o desenvolvimento de uma metodologia, por SPME e GC-MS, para prever o crescimento dos fungos sem a utilização de microcultivo como é tradicional.

No trabalho de Bäck *et al.* (2010), foi medida a taxa de emissão de MVOC de oito fungos típicos da floresta boreal, seus resultados revelam que a emissão de compostos voláteis por fungos simbióticos e decompositores pode ser significativa na cobertura do solo em florestas, o que implica em grande efeito para o antagonismo e sinergismo entre as espécies naturais. No entanto, pesquisas como a de Bäck *et al.* (2010) ainda são raras, necessitando maior investimento em tecnologias para medidas *in loco*, uma vez que já foram realizadas medidas laboratoriais. Novas metodologias para melhorar a aplicabilidade de adsorventes para compostos voláteis também seriam de grande valia para pesquisas como esta.

2.10 COMPOSTOS VOLÁTEIS MICROBIANOS E O METABOLISMO FERMENTATIVO

Uma grande diversidade de compostos voláteis microbianos é produzida em pequena e grande escala por microrganismo, quando em seu ambiente natural. Em escala industrial a seleção de cepas, a recombinação genética e a indução da produção de enzimas faz com que grande quantidade de produtos microbianos seja altamente difundidos para vários setores comerciais. Os álcoois simples e superiores são um exemplo bem-sucedido de compostos voláteis microbianos que podem ser encontrados em uma gama de produtos comerciais. Entretanto, a produção daqueles por via de síntese química também se faz presente (SHEN; LIAO, 2008).

2.11 PRODUÇÃO DE ETANOL E ÁLCOOIS SUPERIORES

Vários microrganismos têm se destacado como produtores de insumos e produtos com alto valor comercial. No Brasil, o etanol recebe prestígio diante do cenário mundial, com um combustível renovável,

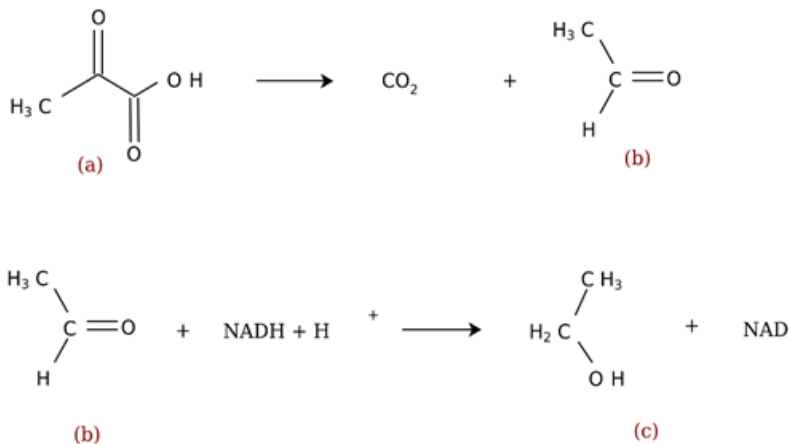
revelando o grande potencial da produção biotecnológica no crescimento do país (HIRA; OLIVEIRA, 2009).

2.11.1 Etanol

Desde muito tempo, as leveduras são utilizadas para produção de álcool por via fermentativa, principalmente para produzir o etanol. Em países com grandes reservas de petróleo, o etanol é produzido por via sintética a partir de hidrocarbonetos não saturados. No Brasil, a via fermentativa é a forma mais importante de obtenção de etanol; entre 2007 e 2008, representou 60% do álcool combustível produzido no país. A disponibilidade de matéria-prima é o que torna o Brasil um país com grande produção de álcool por via fermentativa. Outra característica importante, segundo Basso *et al.* (2008), é o fato de que 90% das células de leveduras são recicladas e reutilizadas em sucessivas fermentações, nos processos empregados no Brasil, contribuindo para a aceleração do processo de produção.

A fermentação alcoólica é um processo de transformação da glicose (para a produção de etanol e CO_2), que acontece no citoplasma da célula, onde são realizadas doze reações catalíticas envolvendo enzimas glicolíticas. O processo de produção de energia por glicólise, que é semelhante ao que acontece nos músculos dos animais, tem como produto final o composto conhecido como piruvato; esse composto dá origem ao etanol, sob a ação de duas enzimas (descarboxilase e desidrogenase). As reações da fermentação estão resumidas na figura 4.

Figura 4: Reações da fermentação alcoólica, de piruvato para etanol; a) piruvato; b) acetaldeído; c) etanol.



Vários fatores estão envolvidos na produção de metabólitos e na inibição das enzimas produzidas por microrganismos. Os mais conhecidos são: os nutrientes, temperatura, pH, substâncias inibidoras do próprio metabolismo, minerais e vitaminas.

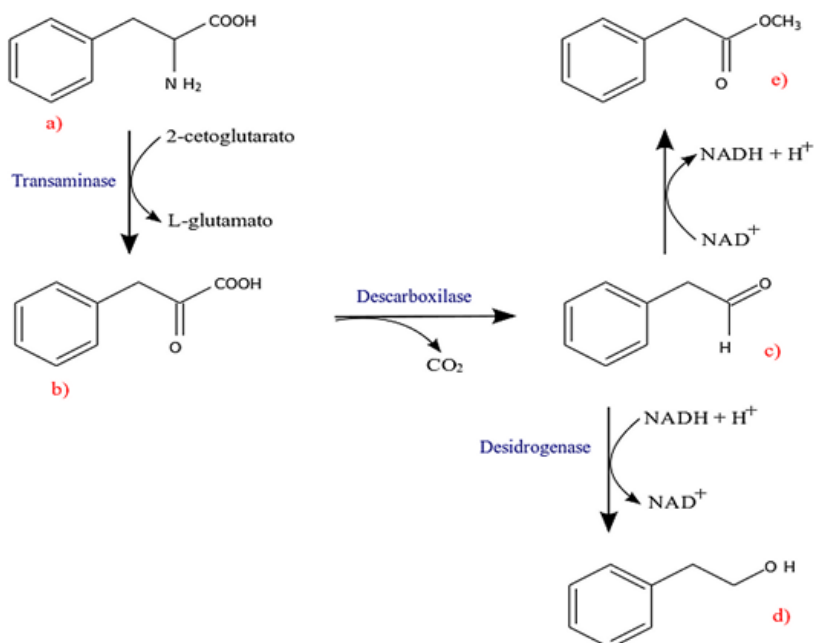
Dois efeitos bastante conhecidos e que podem ocorrer quando se trabalha com fermentações são o efeito Pasteur e Crabtree. O primeiro ocorre em meio anaeróbico, com o decréscimo na produção de etanol e redução do consumo de açúcar; o segundo acontece quando a concentração de açúcar é alta e inibe a atividade de enzimas respiratórias, ocorrendo produção de etanol mesmo em meio aeróbico (BORZANI *et al.*, 2001; PISKUR *et al.*, 2006). Para o caso do fungo *Monascus*, em processo de produção de pigmentos a partir de compostos amiláceos, pressupõe-se que o etanol é produzido em limitação de oxigênio ou por excesso de glicose, normalmente acima de 20 g L⁻¹ (CHEN; JOHNS, 1993).

2.11.2 Álcoois superiores

Assim com o etanol, os álcoois superiores podem ser formados a partir do metabolismo de carboidratos, com a formação de via

glicolíticas, cujo produto final é o piruvato. Estudos realizados com leveduras demonstram que esses microrganismos são capazes de formar álcoois superiores a partir do catabolismo de aminoácidos. A assimilação dos aminoácidos é realizada através da via de Ehrlich; esta via é a mais utilizada pela levedura para obter nitrogênio, quando esse se encontra em concentrações baixas. Um exemplo da via de Ehrlich é mostrado na figura 5, para o catabolismo do aminoácido fenil alanina, estudada por Vuralhan *et al.* (2003), para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 5: Catabolismo da fenilalanina pela via de Ehrlich, um exemplo da formação de álcoois superiores por microrganismos; a) L-fenilalanina; b) fenilpiruvato; c) fenilacetaldeído; d) 2-feniletanol; e) fenilacetato.



O tipo do aminoácido catabolizado irá determinar a espécie de álcool superior que será produzida: a partir da L-treonina obtém-se o n-propanol, o 2-metil-propanol é derivado da L-valina, o 3-metil-butanol é

derivado da L-leucina e o 2-metil-butanol é derivado da L-isoleucina. O aumento dos referidos álcoois pode se dar por adição dos respectivos aminoácidos ao meio de cultura. Uma vez formados, estes compostos são excretados da célula (HAZELWOOD *et al.*, 2008).

Mesmo em meios de cultura sem a presença de aminoácidos, os álcoois superiores podem ser formados a partir da concentração do ácido pirúvico, formado no interior das células do microrganismo. No entanto, o metabolismo dos carboidratos leva a pequenas quantidades de álcoois superiores para as cepas que não são específicas para produção desses álcoois. A importância natural dos álcoois superiores, em baixas concentrações, está no aroma das bebidas comercializadas por todo o mundo.

Segundo Garavaglia (2006), a formação dos álcoois superiores é mais propícia em pH ligeiramente ácido ($\approx 4,5$), temperaturas em torno de 20 °C, níveis altos de açúcar (quando em baixa concentração de nitrogênio). No entanto, em condições de aerobiose ou anaerobiose não há formação de quantidades equivalentes dos álcoois superiores, para a aerobiose a quantidade de álcool 2-metil propanol e 3-metil butanol pode ser superior em relação a anaerobiose.

2.12 METODOLOGIAS UTILIZADAS PARA ANÁLISE DOS METABÓLITOS DE FUNGOS DO GÊNERO *MONASCUS*

De acordo com Velmurugan (2011), para a análise dos pigmentos produzidos por *Monascus*, geralmente utilizam-se medidas de absorvância dos pigmentos entre 400 e 500 nm. Algumas vezes analisa-se a soma das absorvâncias do pigmento e meio de cultura (filtrados), considerando-se assim o total de pigmentos intra e extracelulares em solução alcoólica. Carvalho (2004) sugere que a presença dos componentes amarelo, laranja e vermelho afeta a análise por medidas de absorvância; sendo assim, seria mais adequada a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Outros autores caracterizam o pigmento vermelho do *Monascus* através de várias técnicas como: absorvância ultravioleta e visível (480 nm), infravermelho (IR), ressonância magnética nuclear (NMR) e espectrometria de massas (MS) (LIAN *et al.*, 2007). Normalmente, o pigmento é filtrado, centrifugado, liofilizado e solubilizado em solvente orgânico. Poucos trabalhos utilizam separação do pigmento com colunas

preparativas em cromatografia líquida ou outros métodos, pois geralmente é realizada apenas uma limpeza “*clean-up*” (VIDYALAKSHMI *et al.*, 2009).

Para os compostos orgânicos voláteis microbianos são utilizadas, basicamente, técnicas de análise do espaço confinado, acima do meio de cultura sólido. Os meios de cultura, contendo os micélios dos fungos, são aquecidos ou mantidos em temperatura constante em tubos fechados, e o espaço confinado acima dos micélios é exposto a uma fibra de microextração. Os compostos são avaliados através da dessorção dessa microfibras em um injetor de um cromatógrafo a gás (POLIZZI *et al.*, 2012).

Metabólitos como a citrinina normalmente são analisados utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), onde costuma-se empregar misturas de diferentes solventes, como metanol:água; metanol:acetonitrila:água e acetonitrila:água:isopropanol (WANG; JU; ZHOU, 2005; BLOOM *et al.*, 2007; JIA *et al.*, 2010). Qualitativamente, a citrinina costuma ser analisada através da cromatografia em camada delgada, porém, recomenda-se a utilização da espectrometria de massas ou ressonância magnética nuclear (NMR) pela possibilidade de obtenção dos espectros da citrinina (XU *et al.*, 2006; ZHENG *et al.*, 2009). Para a lovastatina (ou monacolina-k), alguns trabalhos costumam utilizar cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com fase móvel ácida (ácido fosfórico-pH 2,5:acetonitrila:isopropanol) (FRIEDRICH *et al.*, 1995; PATTANAGUL *et al.*, 2008). Recentemente, Cheng *et al.* (2012) estudaram metabólitos produzidos por *Monascus pilosus* utilizando uma série de experimentos de espectrometria de ressonância magnética nuclear por correlação homo e heteronuclear, em extratos alcoólicos de arroz fermentado.

No geral, os compostos citados acima são os que aparecem na maior parte das publicações relacionadas com o fungo *Monascus ruber*. Poucas publicações a respeito dos compostos voláteis podem ser encontradas para esse fungo e não são específicas para os MVOC.

2.13 TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE) E MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPME)

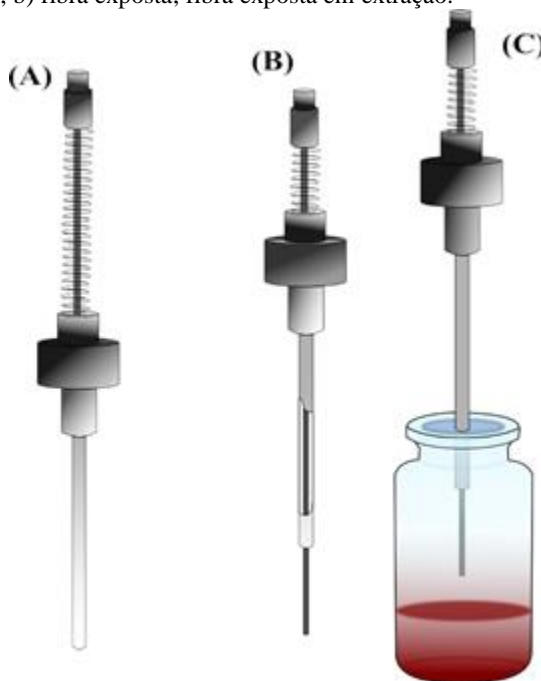
Existem diversas técnicas para extração, separação e concentração de analitos, algumas delas empregam materiais

poliméricos sólidos e minerais de diversos tipos. A técnica conhecida como extração em fase sólida (SPE) tem sua fundamentação nos princípios da separação líquido-sólido, semelhante à cromatografia líquida de baixa pressão, também conhecida como cromatografia em coluna. Existem sistemas de SPE comerciais, prontos para uso, que são geralmente empregados na concentração seletiva de alguns analitos. Muitas vezes esse procedimento de concentração é realizado para preparar ou limpar as amostras que serão analisadas por cromatografia líquida (FREIRE *et al.*, 2005; MARQUES *et al.*, 2007).

A técnica de extração em fase sólida tem sido largamente empregada em concentração de analitos como fármacos, pesticidas organoclorados, organofosforados e nitrogenados, clorofenóis, ftalatos, sulfonatos aromáticos, hidrocarbonetos aromáticos. De acordo com Silva e Collins (2011), a técnica de extração em fase sólida é a mais utilizada, atualmente, para concentração de analitos em águas superficiais e efluentes. Extração em fase sólida também pode ser utilizada para fluidos gasosos ou vapores de compostos voláteis, recebendo muitas vezes o nome de adsorção em sólido, entre outros. Na área ambiental, esta técnica é utilizada para capturar compostos como benzeno, tolueno, hidrocarbonetos aromáticos, dioxinas e outros. Na área de alimentos ou biotecnologia esta técnica não é comum, sendo poucos os trabalhos que a utilizam.

Diferente da extração em fase sólida (SPE), a microextração em fase sólida (SPME) tem largo emprego em concentração de analitos em fase gasosa e tem sua fundamentação nos princípios da separação gás-líquido, semelhante a cromatografia a gás com colunas capilares. A instrumentação de SPME consiste em uma fibra revestida com polímeros de Polidimetil siloxano, Poliacrilato ou outros, essa fibra é montada em um suporte (*holder*) que possui uma agulha (tipo embolo) para esconder ou expor a fibra. A figura 6 ilustra um sistema para microextração em fase sólida convencional.

Figura 6: Figura ilustrativa de um sistema para microextração em fase sólida; a) fibra retraída; b) fibra exposta; fibra exposta em extração.



A Microextração em fase sólida é aplicada em larga escala para concentrar e selecionar compostos, principalmente, de interesse farmacêutico e ambiental. A instrumentação é geralmente empregada em associação à cromatografia gasosa, porém, recentemente está sendo utilizada com cromatografia líquida (SILVA; COLLINS, 2011).

Na área biotecnológica, Marostica (2006) e Demyttenaere *et al.* (2001) utilizaram microextração em fase sólida para selecionar microrganismos biotransformadores de limoneno, utilizando o espaço confinado *headspace* para detectar os compostos voláteis juntamente com espectrometria de massas. Ainda nesta área, Jelen (2003) utilizou SPME para analisar os perfis de compostos voláteis isolados de fungos do gênero *Penicillium*, obtendo resultados satisfatórios.

Um trabalho bastante significativo na área de cromatografia a gás aplicada em ciências biológicas, foi realizado por Hantao *et al.*

(2013), onde foram estudados perfis cromatográficos de compostos voláteis para determinação de doenças em plantas provocadas por ataque de fungos patógenos. No trabalho desses autores foram utilizadas técnicas de microextração em fase sólida e de cromatografia a gás bidimensional abrangente com identificação de quarenta compostos por espectrometria de massas.

Para desenvolver métodos de SPME são necessários vários processos de seleção e otimização como: seleção do tipo de fibra, estudo dos perfis de extração, seleção do modo de extração (fibra submersa ou espaço confinado *headspace*), seleção das técnicas de agitação e efeito salino *salting out*, parâmetros da adsorção ou partição do analito, etc. (VALENTE; AUGUSTO, 1999; BRUNETTI *et al.*, 2015; DIAS *et al.*, 2015, MERIB, *et al.*, 2015).

Uma boa estratégia para avaliar interdependência de variáveis, em SPE e SPME, e seu efeito sobre uma determinada resposta, como a concentração de um determinado analito, é a utilização de planejamentos fatoriais. Tal estratégia faz parte de uma ferramenta útil e largamente empregada em ciências e tecnologia, conhecida como planejamento experimental.

2.14 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS

Consistem em séries programadas de experimentos, realizados previamente, para se obter informações a respeito de uma população ou amostra, na qual se quer inferir índices ou estabelecer relações causais. Tais planejamentos podem fornecer uma base sólida para projetar um experimento otimizado, com um número determinado de variáveis independentes (fatores) que possuam maior influência nas variáveis dependentes, ou respostas dos experimentos a serem realizados. Existem alguns procedimentos estatísticos muito conhecidos, como os Planejamentos Fatoriais e Superfície de Resposta; ambos são complementados com métodos de otimização matemática como o Simplex e o estudo de Máxima Inclinação Ascendente (HIBBERT, 2012).

A escolha dos procedimentos para o planejamento depende dos tipos de variáveis que se quer relacionar, e do nível de efeito que possuem sobre a variável resposta. Caso não se conheça essa relação, é necessário realizar um estudos de triagem de fatores, baseando-se nas

referências e conhecimentos empíricos acerca da população ou amostra em questão.

2.15 PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO

São procedimentos muito utilizados para triagem de variáveis que influenciam na resposta de um experimento, como por exemplo para dois níveis de temperatura (30 e 50 °C) e concentração de reagente (1M e 3M) que estão associados a um aumento da resposta de uma reação de síntese. O planejamento é chamado de Fracionário quando representa uma fração de um planejamento completo, sendo que em um planejamento completo é possível estimar os efeitos de interação entre os fatores com base no valor das respectivas respostas, observando as médias e seu significado estatístico obtido através dos testes convencionais (teste t e F). Costuma-se trabalhar com as variáveis codificadas para representar os níveis de um fator na forma discreta, como a representação da temperatura por “-1” para o nível mais baixo e “1” para o nível mais alto e etc. Dessa forma, obtêm-se uma combinação linear dos níveis discretos de dois ou mais fatores representados por suas respectivas codificações dos níveis e as respostas correspondentes. Quando há apenas dois fatores e uma resposta, são possíveis apenas interações de segunda ordem, ou seja, combinações do fator 1 com o fator 2 em seus níveis altos e baixos, diretamente (-1;-1 e 1;1) e alternadamente (-1;1 e 1;-1); quando o número de fatores aumenta para três ou mais, a quantidade de combinações e a ordem aumentam juntamente. Aumento de fatores e experimentos, para se obter as respostas recorrentes, implica em maior custo, consumo de recursos e serviços, não sendo desejável em trabalhos experimentais. Sendo assim, o emprego de planejamentos fatoriais pode diminuir o desperdício de experimentos e melhorar as condições nas quais se conduz os mesmos (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

2.16 PLANEJAMENTO COMPLETO COM PONTO CENTRAL

Planejamentos fatoriais completos são utilizados em conjunto com outros procedimentos de planejamento experimental, porém, para triagem de variáveis eles não são necessários, em muitos casos, uma vez que o número de experimentos para se obter as respostas (corridas) fica

maior conforme o número de fatores cresce. No entanto, os planejamentos completos fornecem informações a respeito das interações de segunda ordem, ou superior, que muitas vezes não são obtidos, de modo claro, com planejamentos fracionários. Neste sentido, os planejamentos completos são favoráveis quando se acredita que as interações são importantes. Para que se possa realizar um experimento completo são necessárias corridas, em número mínimo, para que se possa obter as combinações corretas de níveis. Para estudar o efeito de três fatores, com dois níveis, sobre uma variável dependente (Resposta) são necessárias oito corridas (2^3 experimentos) e suas réplicas. Para facilitar a realização de experimentos completos com poucas réplicas, pode-se realizar planejamentos com ponto central, de maneira que, não sejam necessárias réplicas nas diferentes combinações de níveis, e sim réplicas em um ponto médio entre os níveis altos e baixos de cada fator. O uso de réplicas no ponto central é essencial para estimar erros experimentais, explicar a variabilidade dos dados em torno da média e calcular falta de ajuste para o modelo empírico, que é obtido através da regressão dos fatores associados com resposta (SILVEIRA; DAROIT; BRANDELLI, 2008).

2.17 MODELOS EMPÍRICOS

Modelos estatísticos são formas simples de sintetizar dados obtidos com experimentos de diversas categorias, nas mais diversas áreas da ciência, tecnologia, saúde, computação e outras. Os modelos são aplicados para verificar a intensidade e a forma de associação entre características nas quais se supõe um efeito de causalidade. O principal objetivo de se construir modelos estatísticos, de forma empírica, consiste em determinar a relação entre as variáveis independentes (X) e as variáveis resposta (Y). A forma mais comum de construir modelos é através da aplicação de regressão, onde o interesse é modelar a expectativa condicional da variável resposta Y, de posse das variáveis preditoras.

O caso mais simples, e também o mais usado, de aplicação de modelagem é a regressão linear simples, onde o modelo paramétrico é dado com segue:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + \varepsilon_i \quad (1.1)$$

Onde os parâmetros β_0 e β_1 são constantes e ε_i é o erro aleatório associado à determinação experimental. Em sua forma mais tradicional, assume-se que o erro possui distribuição normal, esperança nula e variância constante. Os parâmetros β_0 e β_1 são estimados a partir de uma amostra por aplicação do método dos mínimos quadrados, que consiste em minimizar a soma dos quadrados das diferenças entre os valores observados e os valores ajustados (resíduos) (MUNDIM, 2010).

Na prática, o modelo deve ser testado assim como a distribuição da variável aleatória (X) através dos testes de aderência, homoscedasticidade e independência (ÖZTUNA, 2006; KOZMUS; POTOČNIK, 2015).

Os modelos paramétricos lineares e não-lineares correspondem a maior fatia da modelagem empregada em ciências; tanto para modelos de previsão, análise de variância quanto planejamentos experimentais, estes modelos são amplamente utilizados em diversas áreas.

2.18 MODELOS NÃO-PARAMÉTRICOS E REGRESSÃO POLINOMIAL LOCAL

Muitas vezes, após a obtenção dos dados, são realizadas as análises descritivas envolvendo a obtenção dos gráficos de dispersão. Por uma simples inspeção nos gráficos, pode-se concluir que não existe uma expressão matemática simples para resumir os dados em um modelo paramétrico convencional, neste caso existem modelos mais gerais como os modelos não-paramétricos. Esses modelos são menos conhecidos em muitas áreas da ciência e muito pouco usados na área da química, porém são modelos robustos e flexíveis, capazes de sintetizar com grande eficiência a maior parte dos resultados experimentais obtidos pelos químicos. O uso de um software matemático é indispensável, neste caso, devido à complexidade dos cálculos complementares ao modelo, como os referentes a adequação dos dados.

No caso univariado, deseja-se ajustar uma expressão que represente a relação entre y e x , tal que:

$$Y_i = m(x_i) + \varepsilon_i \quad \{i = 1, \dots, n.\} \quad (1.2)$$

No caso mais geral são assumidas as condições de que a função $m(x)$ é contínua e diferenciável um certo número de vezes e que o erro

possui esperança nula e variância constante, e que são independentes. Comumente a função $m(x)$ é restringida a modelos já conhecidos, no entanto é possível explorar funções para obter maior flexibilidade. Segundo Cortes (2010) o objetivo da regressão não-paramétrica é obter uma aproximação de $m(x)$, sendo a única restrição imposta de que seja uma função continuamente diferenciável até determinada ordem.

Dentro do contexto de flexibilidade e robustez dos modelos não-paramétricos, existe a regressão polinomial local, conhecida desde a década de 30, porém, pouco utilizadas devido à complexidade dos cálculos. Os estimadores da função de regressão local são obtidos através de um polinômio de ordem p , por um ajuste polinomial local, considerando a vizinhança do ponto y_i , cujo valor pretende-se estimar. Trabalhos pioneiros, como os de Stone (1977) e Cleveland (1979), revelam a matemática concisa por traz dos processos de estimação e ajustes por mínimos quadrados ponderados com auxílio da função núcleo (ou Kernel). Neste tipo de modelo a função $m(x)$ é obtida por regressão localmente ponderada pela vizinhança de cada ponto, seguida de adição usando uma expansão de Taylor (JACOBY, 2000; WALSH *et al.*, 2011).

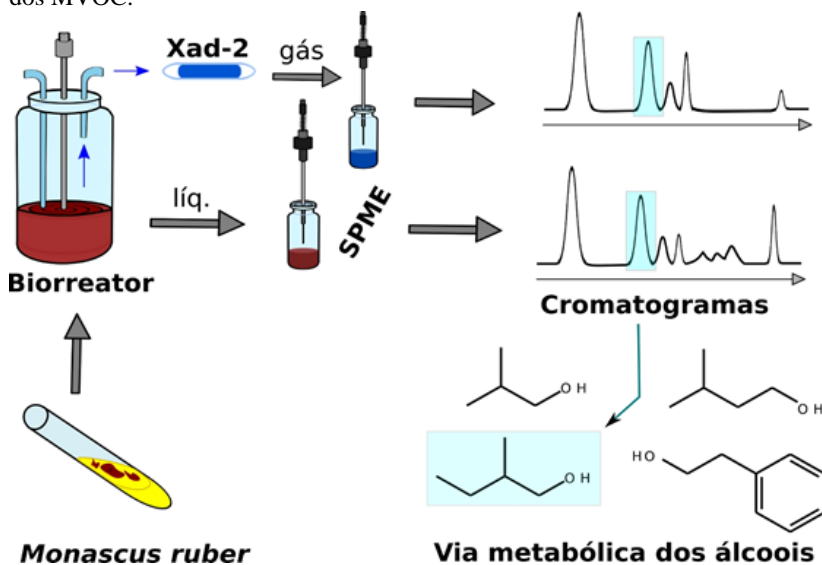
O uso de um algoritmo em software dinamiza consideravelmente os cálculos para modelos de regressão localmente ponderada (*loess* - Local Polynomial Regression Fitting). Basicamente, o processo consiste em determinar o parâmetro de suavização, que controla o tamanho da vizinhança de cada ponto, o grau do polinômio, para que o erro sistemático seja mínimo, e escolher a função peso, que normalmente é uma função gaussiana (ou normal). O controle destes parâmetros é feito de maneira empírica, por tentativas seguidas de análise do modelo, erros, variâncias, adequação das curvas e qualquer outro teste relacionado com adequação de modelos, como os utilizados em modelos paramétricos. Detalhes matemáticos podem ser encontrados nos artigos clássicos de Cleveland (1979) e em trabalhos de tese (Cortes, 2010).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho envolve conteúdos de microbiologia e química analítica, o mesmo foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) e Laboratório de Cromatografia e Espectrometria Atômica, pertencentes aos Departamentos de Engenharia Química e de Alimentos e ao Departamento de Química da UFSC, respectivamente.

O resumo da metodologia para a fermentação submersa, extração e identificação dos MVOC é dado na figura 7.

Figura 7: Resumo da metodologia para a fermentação, extração e identificação dos MVOC.



3.1 MICRORGANISMOS

Neste trabalho foram utilizadas duas espécies do fungo do gênero *Monascus*, são eles:

a) *Monascus ruber* CCT 3802, um fungo filamentoso obtido da

Fundação André Tosello, Campinas SP (*Monascus ruber* van Tieghem alt. *Basipetospora rubra* Cole & Kendrick). Taxonomia: Filo *Eumycota*, Sub-filo *Ascomycotina*, Classe *Plectomycetes*, Ordem *Eurotiales*, família *Monascaceae* (MORITZ, 2005).

b) *Monascus* sp., um fungo filamentosso obtido do Laboratório de Micologia Clínica da Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL) (CONTROL LAB, Rio de Janeiro, BRASIL).

3.1.1 Manutenção das culturas

As duas espécies do fungo *Monascus* foram mantidas em meios de cultura sólidos (inclinado). A espécie *Monascus ruber* foi mantida em ágar batata dextrose (MERCK, Kenilworth, EUA) e ágar com pó de arroz e a espécie *Monascus* sp. foi mantida em ágar batata dextrose (SILVA *et al.*, 2008). As culturas foram estocadas em geladeira (5 a 10 °C) por quatro meses, após esse período as culturas foram renovadas. Esse processo se chama repique, ele foi realizado nos mesmos tipos de meios de cultura (ágar batata dextrose e ágar com pó de arroz). Todas as recomendações de assepsia e segurança foram utilizadas para a manutenção e preparação dos materiais (BORZANI *et al.*, 2001). A figura 8 traz uma foto das culturas que foram utilizadas para experimentos, para evidenciar a diferença entre os micélios em relação à sua cor.

Figura 8: Micélios das culturas *Monascus* sp. (esquerda) e *Monascus ruber* (direita) que foram utilizadas para experimentos de Fermentação.



3.1.2 Fermentação em Erlenmeyer

A fermentação do fungo em Erlenmeyer, foi realizada em Erlenmeyers aletados de 1000 mL, contendo 250 mL do meio de cultura líquido (pH = 6,0). Os frascos foram tampados com uma rolha de algodão envolta em gaze. Antes da inoculação do microrganismo, este material foi autoclavado durante 15 min (121 °C), para esterilização. O meio de cultura utilizado foi o meio de arroz, que consiste em uma mistura de pó de arroz (20 g L⁻¹), glicina (7 g L⁻¹) e glucose (2 g L⁻¹) (os dois últimos: SIGMA-ALDRICH, St. Louis, EUA) e água destilada. A inoculação do microrganismo no meio de cultura foi realizada com a transferência de 5 mL do meio autoclavado para o tubo de ensaio contendo o meio de cultura sólido, sendo realizada uma raspagem da superfície sólida, com alça de platina, para descolar os esporos. Os tubos foram agitados em vórtex e seu conteúdo foi transferido de volta para o Erlenmeyer do meio de cultura. Todas as transferências foram realizadas em câmara de fluxo laminar, com flambagens consecutivas dos tubos, visando a assepsia. Após a inoculação, os Erlenmeyer aletados de 1000 mL foram incubados em agitador orbital sob agitação de 150 rpm e

temperatura 30 °C por sete dias. Após este período, o caldo fermentativo foi transferido para placas de Petri, congelado e liofilizado.

3.2 FERMENTAÇÃO EM BIORREATOR

O preparo e o inóculo para as fermentações utilizando biorreator foram semelhantes aos realizados em Erlenmeyer. O meio de cultura foi o mesmo, pó de arroz (20 g L⁻¹), glicina (7 g L⁻¹), glucose (2 g L⁻¹) e água destilada. Antes da inoculação do fungo foi realizado um pré-inóculo de 5 dias (a 30 °C), para minimizar o tempo da fase de adaptação (fase lag), em tubos de ensaio contendo ágar com pó de arroz, glicina e glucose, nas mesmas proporções citadas acima. A inoculação do microrganismo foi semelhante à realizada para Erlenmeyer, porém, a transferência não foi feita diretamente para o biorreator, mas sim para um Erlenmeyer (de 100 mL) adaptado com saída direta para o biorreator, via mangueira de silicone; isso permite a transferência dos esporos com maior assepsia, sem exposição do interior do biorreator, pois o inóculo entra através de uma mangueira conectada a um dos bocais superiores do biorreator (MORITZ, 2005).

Após definição dos parâmetros da fermentação, baseados nos experimentos em Erlenmeyer, foram iniciados os experimentos em biorreator (DIST, Florianópolis, BRASIL), com monitoramento de pH, controle de vazão de ar e controle de entrada de CO₂, controle e monitoramento de temperatura, controle de agitação e outros. Foram realizadas três fermentações (Ferm. 01, Ferm. 02 e Ferm. 03), nos períodos de cinco (5), oito (8) e dez (10) dias, respectivamente; todas com o mesmo biorreator e as mesmas condições. Um esquema do biorreator é mostrado na figura 9, onde é possível observar as rotinas envolvidas no processo fermentativo realizado com a espécie de fungo do gênero *Monascus*. O biorreator foi confeccionado em vidro (4 mm de espessura, em boro silicato), com um acoplamento na parte superior para encaixe de mangueiras e uma saída de ar direcionada para um cartucho coletor (SPE) com “Xad-2” (SKC, USA). Os demais parâmetros e características do biorreator podem ser vistos na tabela 1.

Figura 9: Esquema do biorreator; rotinas envolvidas no processo fermentativo realizado com fungo do gênero *Monascus*.

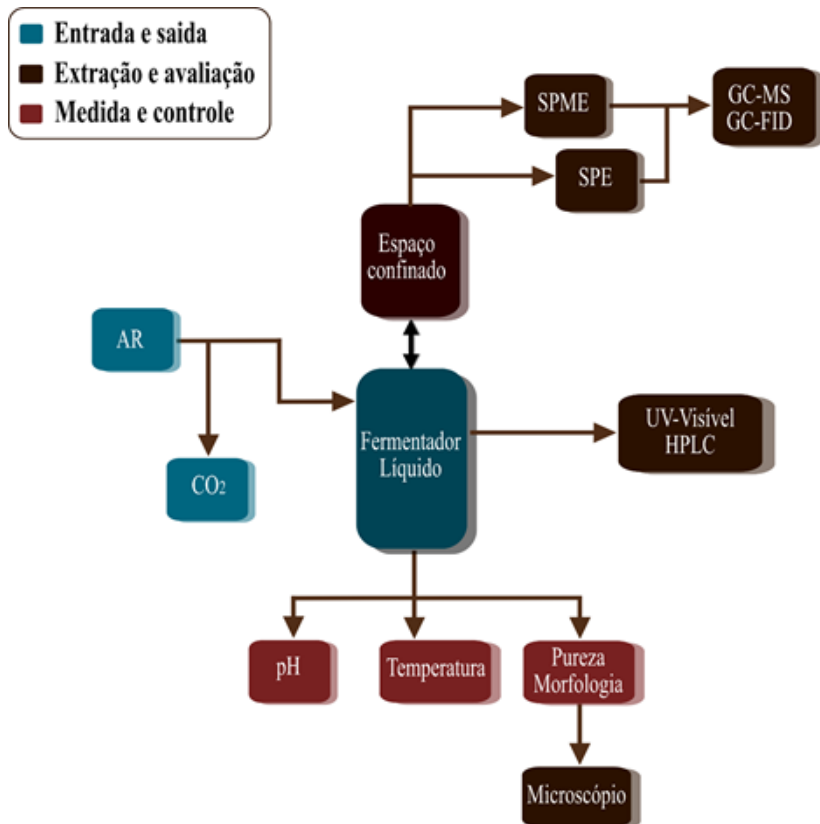


Tabela 1: Parâmetros e características do biorreator utilizado na fermentação com fungo do gênero *Monascus*.

| Parâmetros | Características |
|--------------------------|-------------------------------------|
| Volume total | 1320 cm ³ |
| Espaço confinado interno | 1/3 do volume |
| Mangueiras de conexão | Silicone (5 mm, interno) |
| Tubos | aço inox (4 mm, interno) |
| Alimentação de ar | Compressor (5 watts) |
| Filtragem do ar | lavador de gás e membrana (0,22 µm) |

3.3 COLETA, PREPARO E ARMAZENAGEM DAS AMOSTRAS

Aqui são descritos todos os procedimentos empregados para as amostras do caldo fermentativo, incluindo sua biomassa e as coletas da fase gasosa com uso de cartuchos de Xad-2 (SPE).

3.4 PROCEDIMENTO PARA AS AMOSTRAS DO CALDO FERMENTATIVO

O procedimento de coleta das amostras foi por retiradas de duas alíquotas de 2 mL, via sucção, com seringa de vidro esterilizada. O intervalo de coleta entre cada alíquota de 2 mL é de cinco minutos e as duas alíquotas são misturadas para formar uma amostra composta (4 mL), reduzindo assim o número de amostras e melhorando a homogeneidade. Apenas 10% do volume total do líquido fermentativo (ou caldo) pode ser retirado para análise, para que se mantenham os nutrientes e enzimas necessárias para o desenvolvimento do microrganismo. Todas as amostras são identificadas e armazenadas a -10 °C e todos os controles são realizados para manter as condições homogêneas da fermentação. A cada doze horas, a solução de hidróxido de bário, dos lavadores de gás, foi substituída por outra de mesma concentração (4 g L⁻¹), para melhor remoção de CO₂ e outros contaminantes do ar (MURPHY, 2012).

Após o término da fermentação, as amostras do líquido

fermentativo, armazenadas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, foram centrifugadas e o líquido foi separado do material sólido (restos do meio + biomassa) utilizando-se uma pipeta. O líquido foi submetido a uma microfiltração com filtros de membrana de PVDF com $0,22\text{ }\mu\text{m}$ de poro (CHROMAFIL, Düren, ALEMANHA), onde se adotou uma vazão média de $120 \pm 25\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$. O líquido filtrado foi mantido sob congelamento $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ até sua utilização em SPME. O material sólido foi mantido sob congelamento $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o processo seguinte da medida de biomassa, por gravimetria (OROZCO; KILIKIAN, 2008). O produto final da fermentação ($\approx 200\text{ mL}$) foi congelado ($-10\text{ }^{\circ}\text{C}$) em partes de 50 mL , até sua utilização para análises gerais como medidas de pH e biomassa, cromatografia em camada fina, espectroscopia UV-Visível (HITACHI, Tóquio, JAPÃO), HPLC e testes gerais; em especial, parte do produto final da primeira fermentação foi utilizado para o planejamento experimental, onde foram definidos todos os parâmetros para a avaliação das amostras do caldo fermentativo.

Para auxiliar na identificação dos compostos, foram utilizadas três frações do meio de cultura, uma fração (mf1) do meio antes da autoclavagem, uma fração (mf2) do meio logo após a autoclavagem, e uma fração (mf3) do meio autoclavado após o mesmo período de tempo da fermentação, mantido nas mesmas condições do fermentado (sob agitação a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, com aeração), em frasco de 250 mL , simulando o fermentador. Todas as frações foram submetidas a centrifugação e filtração, como descrito acima, para o líquido fermentativo.

3.5 BIOMASSA PRESENTE NAS AMOSTRAS DO CALDO

A biomassa, contendo material amiláceo foi suspensa em 4 mL de água ultrapura aquecida a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, imediatamente após agitação, o tubo contendo o sólido suspenso foi centrifugado por dois minutos a 2500 rpm . O líquido centrifugado foi testado com uma solução alcoólica de iodo e comparado com outras cinco soluções de diferentes proporções de amido em solução alcoólica de iodo (curva colorimétrica). Quando constatada a presença de material amiláceo (cor verde esmeralda), o processo de purificação era repetido até a cor verde esmeralda desaparecer e a solução adquirir cor marrom, característica do iodo, sem presença de amido. A biomassa purificada foi submetida a secagem (em estufa) por doze horas a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, seguindo para o

dessecador, onde permaneceu por 24 horas até a medida da massa por gravimetria. A medida da biomassa foi realizada em uma balança analítica (SARTORIUS, Goettingen, ALEMANHA), com precisão de 0,0001 mg. Para determinar o valor do erro experimental das medidas de biomassa, foram preparadas cinco suspensões de 4 mL, diluindo-se o meio de cultura autoclavado na proporção de (1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6), as suspensões foram submetidas aos mesmos procedimentos relatados acima, incluindo lavagem com água (Mili-Q) aquecida a 50 °C, secagem e pesagem.

3.6 PROCEDIMENTO EMPREGADO NOS CARTUCHOS DE XAD-2 (SPE), PARA COLETA DA FASE GASOSA

Durante o período de fermentação, todo o ar utilizado para respiração celular do fungo e os compostos gerados no caldo fermentativo são escoados para fora do biorreator passando através de um cartucho de vidro (8 x 110 mm), contendo 600 mg da resina Xad-2. O cartucho foi conectado em um dos bocais do biorreator, que serve de saída de ar e permaneceu durante 24 horas sob resfriamento à $15,2 \pm 0,2$ °C, com vazão média de $19,4 \pm 0,1$ mL min⁻¹. A cada 24 horas os cartuchos foram substituídos por cartuchos novos, para se obter o total de compostos acumulado durante um dia de fermentação. Os cartuchos retirados foram tampados e numerados, permanecendo sob refrigeração (-10 °C) durante uma semana, a tampa fornece vedação completa sem perda de pressão interna.

3.7 DETERMINAÇÃO QUALITATIVA DO EXTRATO CONTENDO OS PIGMENTOS PRODUZIDOS NA FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Foram realizadas extrações a partir do material liofilizado proveniente da fermentação das duas espécies do fungo *Monascus* nos meios de arroz (cultivo submerso). Cerca de 40 mg do material liofilizado foi introduzido em um tubo de ensaio (com tampa) e submetido a extração líquido-sólido, em ultrassom (20 minutos), com a mistura metanol:acetoneitrila (1:1), posteriormente os extratos foram submetidos a cromatografia líquida em coluna (300 por 10 mm) por pressão normal (atmosférica), sendo utilizado como fase estacionária sílica gel para cromatografia (70-230 mesh, 60 Å, marca SIGMA-

ALDRICH), empacotada por sedimentação com suspensão em hexano e condicionada com hexano:éter etílico (1:1). Foram utilizadas as misturas hexano:éter etílico (1:1), acetonitrila:metanol (9:1) e metanol puro como fases móveis, devido a seus valores de índices de polaridade para as fases móveis (SNYDER, 1974); para a eluição foi adotada a vazão de 12 gotas por minuto.

A extração e a separação das frações foram acompanhadas por cromatografia em placa delgada e espectrofotometria de ultravioleta e visível. O equipamento utilizado é da marca *Hitachi*, modelo U2900, com leitura de comprimento de onda entre 180 a 1100 nm. Também foram realizadas extrações com metanol e etanol, a título de comparação com outros trabalhos, que assim realizam as extrações do pigmento vermelho (HU *et al.*, 2012).

As três frações eluídas, separadas por cromatografia líquida em coluna, foram purificados em coluna de 30 por 5 mm com celite® 543 AW (SIGMA-ALDRICH) e submetidas a análise por UV-visível (180 a 1100 nm) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com coluna de fase reversa C18 (SHIMADZU, Tóquio, JAPÃO). O cromatógrafo utilizado foi o modelo LC20AT, com detector por arranjo de diodos SPD-M20A e válvula de injeção com loop de 20 µL (SHIMADZU). Como fase móvel foram utilizadas as misturas de metanol:água, metanol:acetonitrila e acetonitrila:ácido acético (pH=3), em modo de gradiente (0-100%), com vazões de 0,5 - 1,0 mL min⁻¹. Todos os solventes utilizados para extração e análise são de grau HPLC e UV (marcas: VETEC; TEDIA, Rio de Janeiro, Brasil).

3.8 DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE PIGMENTO VERMELHO PRODUZIDO NA FERMENTAÇÃO

Para determinar a quantidade de pigmento vermelho, extracelular, produzido na fermentação em biorreator, foram utilizadas alíquotas dos produtos finais das três fermentações. O caldo fermentativo foi filtrado em papel filtro quantitativo e posteriormente em membrana de nitrato de celulose, com 0,8 µm de poro (SARTORIUS). Foi utilizada para a filtração uma seringa de vidro de 15 mL e um suporte para membranas de 46 mm de diâmetro. Dez alíquotas do caldo fermentativo foram utilizadas nesse experimento, para cada fermentação (Ferm. 01, Ferm. 02 e Ferm. 03).

Medidas de absorvância do caldo filtrado foram realizadas em 400, 480 e 510 nm, em espectrofotômetro (HITACHI, modelo U2900). Diluições foram efetuadas conforme o aumento de absorvância dos caldos, sendo consideradas nos cálculos.

Para verificar a quantidade de pigmento laranja que interfere na absorvância do pigmento vermelho, foram realizadas separações e verificações das absorvâncias do pigmento laranja. Cinco alíquotas do caldo fermentativo filtrado foram submetidas a separação por cromatografia líquida em coluna (300 por 10 mm) por pressão normal, com fase estacionária de sílica gel (70-230 mesh, 60 Å, SIGMA-ALDRICH). Exatamente 3 mL do caldo filtrado foram misturados com 3 mL de acetonitrila, o volume da solução foi reduzido para 2 mL com fluxo de nitrogênio gasoso. Como fase móvel foram utilizados diclorometano:acetona (2:1), acetonitrila:metanol (9:1), e para eluição do composto laranja foi utilizado metanol puro. Os eluatos foram purificados em coluna de 30 por 5 mm com celite® 543 AW e submetidos a análise por UV-visível. Em particular, o composto laranja foi seco com fluxo de nitrogênio gasoso e solubilizado em 3 mL de água, com pH igual ao do caldo original, o valor da absorvância foi determinado em 480 nm. Os mesmos experimentos foram repetidos para as cinco alíquotas do caldo fermentativo das demais fermentações.

A sílica gel foi recuperada com etanol em banho de ultrassom por 20 minutos (3X), não sendo necessária a utilização de outro solvente orgânico; a secagem foi em estufa a 100 °C e a ativação foi em mufla a 250 °C.

3.9 TESTE DE RECUPERAÇÃO DO PIGMENTO LARANJA

Para calcular os valores de percentual de recuperação para o pigmento laranja, foram utilizados três dos cinco eluatos de cor laranja verificados anteriormente em 480 nm. Exatamente 3,0 mL de eluato laranja foram misturados com 3,0 mL do eluato vermelho que tinha sido eluído com acetonitrila: metanol (9:1); todo o processo de cromatografia e purificação foi repetido, como descrito acima. Novamente, o eluato laranja foi seco com fluxo de nitrogênio gasoso, e solubilizado em 3,0 mL de água; com pH igual ao do caldo original; o valor da absorvância foi determinado em 480 nm. A diferença de absorvância entre a primeira eluição e a segunda eluição foram consideradas para o cálculo da média,

obtida com os três eluatos laranja, que foram submetidos a esse experimento; o mesmo foi repetido para os três eluatos laranja das outras fermentações.

3.10 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS

Na sequência, são apresentados todos os detalhes dos planejamentos para as amostras do caldo fermentativo e dos gases de exaustão, coletados por Xad-2.

3.10.1 Planejamento para avaliar amostras das coletas do caldo fermentativo e otimizar as condições para extração dos MVOC

Com o objetivo de estudar as variáveis que influenciam na análise dos compostos orgânicos provenientes do processo de fermentação por fungo *Monascus ruber*, na fase de espaço confinado, foram realizados três tipos de planejamentos fatoriais distintos e complementares. Um planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}), com oito corridas e suas respectivas réplicas, foi realizado com dezesseis frações do líquido fermentado por *Monascus ruber* (final da fermentação de 5 dias), em dois valores (ou níveis) de pH, diluição, tempo de extração (exposição da fibra, em minutos) e temperatura de extração (em °C)(ver tabela 2). Esse planejamento (Planejamento 1) foi realizado em um cromatógrafo a gás (modelo: 7820), com detector por ionização em chama (AGILENT, Santa Clara, EUA) as condições de temperatura e vazão são dadas na tabela 3.

Tabela 2: Fatores e níveis para os planejamentos fatoriais fracionários (2^{4-1}), utilizando as frações do líquido fermentado por *Monascus ruber*, avaliados em GC-FID e GC-MS.

| Fatores | Planejamento 1 Níveis | | Planejamento 2 Níveis | |
|------------------------------------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|
| | baixa (-1) | alta (1) | baixa (-1) | alta (1) |
| A: pH | 2,5 | 5,3 | 5,0 | 8,2 |
| B: Diluição (proporção) | 0,5 | 1,0 | 0,5 | 1,0 |
| C: Tempo de extração (min) | 20 | 40 | 30 | 45 |
| D: Temperatura de extração (°C) | 30 | 40 | 30 | 45 |

Tabela 3: Condições utilizadas para avaliação dos planejamentos e amostras do líquido fermentado por *Monascus ruber*, em GC-FID e GC-MS.

| Condições | Planejamento 1 | Planejamento 2 |
|-----------------------------|---|---|
| Injetor | 250 °C | 250 °C |
| Divisor de vazão | Sem divisão | Proporção 1:10 |
| Forno | 35 °C (5 min) 5 °C min ⁻¹ até 200 °C 10 °C min ⁻¹ até 250 °C 5 minutos a 250 °C | 35 °C (5 min) 5 °C min ⁻¹ até 180 °C 8 °C min ⁻¹ até 250 °C 4 minutos a 250 °C |
| Coluna | Rtx®-5MS (RESTEK) | DB5-ms (J&W) |
| Vazão dos gás de arraste | 0,63 mL min ⁻¹ | 1,0 mL min ⁻¹ |
| Detector | 260 °C (FID) | 260 °C (MS) |
| Tempo de análise | 48 minutos | 47 minutos |

Com o objetivo de complementar o “planejamento 1” , selecionar níveis mais condizentes (mais próximos do ótimo) das variáveis (fatores) e adaptar o experimento para outro equipamento de análise, foi realizado um segundo planejamento fracionário (2^{4-1}), utilizando um cromatógrafo a gás com detector de Massas modelo GC-MS QP2010 Plus (SHIMADZU, Tóquio, JAPÃO); as condições desse planejamento (planejamento 2) encontram-se nas tabelas 2 e 3; para o mesmo, foram utilizadas oito frações do líquido fermentado por *Monascus ruber* (final da fermentação de 5 dias).

Na tentativa de avaliar as variáveis (fatores) em níveis mais próximos, com menor diferença dos valores discretos, e também, em valores mais próximos de um valor central, (que foi estimado pelos planejamentos anteriores), foi realizado um Planejamento Completo (2^3) com pontos centrais, com onze frações do líquido fermentado por *Monascus ruber* (final da fermentação de 5 dias). As condições de análise são as mesmas do planejamento 2 (dadas na tabela 3); os níveis dos fatores são dados na tabela 4.

Tabela 4: Fatores e níveis para o Planejamento Completo (2^3) com pontos centrais, utilizando as frações do líquido fermentado por *Monascus ruber*, avaliados em GC-MS.

| Fatores | Níveis | | |
|----------------------|------------|-----------|----------|
| | Baixo (-1) | Médio (0) | Alto (1) |
| A: pH | 5,6 | 6,5 | 7,4 |
| B: Temperatura (° C) | 36 | 45 | 54 |
| C: Tempo (min) | 39 | 45 | 51 |

3.10.2 Planejamento para avaliar amostras das coletas por cartuchos de xad-2 e otimizar as condições para extração dos MVOC

Com o objetivo de estudar as variáveis que influenciam na determinação dos compostos orgânicos emitidos durante o processo de fermentação por fungo *Monascus ruber*, provenientes da coleta por cartuchos de Xad-2, foram realizados planejamentos fatoriais

fracionários (2^{4-1}), com oito corridas e uma réplica de dois pontos escolhidos aleatoriamente. As variáveis (fatores) estudadas foram tempo de extração (exposição da fibra em minutos) e temperatura de extração (em °C), aquecimento da resina Xad-2 (dessorção; °C) e agitação (magnética) das partículas da resina (variável binária; sem agitação = -1, com agitação = 1). Na tabela 5 estão os valores dos níveis de cada variável estudada, os detalhes das variáveis encontram-se no item extração dos compostos voláteis (adiante).

Tabela 5: Fatores e níveis para o planejamento fatorial fracionário (2^{4-1}), usados no estudo dos compostos extraídos por coleta com cartuchos de Xad-2

| Fatores | Níveis | |
|---------------------------------|------------|----------|
| | baixa (-1) | alta (1) |
| A: Tempo de extração (min) | 45 | 60 |
| B: Aquecimento da resina (°C) | 45 | 70 |
| C: Temperatura de extração (°C) | 45 | 60 |
| D: Agitação das partículas | sim | não |

Uma mistura contendo os padrões de álcool etílico, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol, 2-metil-butanol e 2-fenil-etanol (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, USA) foi utilizada juntamente com a resina xad-2, para estabelecer os efeitos de cada fator e seus respectivos níveis sobre a variável resposta (massa de álcool adsorvida pela resina Xad-2). Para cada uma das dez corridas dos experimentos do planejamento foi utilizado um tubo de SPME, de 22 mL, contendo 600 mg da resina Xad-2 (nova, sem contaminantes). Sobre a resina foi introduzida uma porção de 30 µL de solução padrão dos álcoois, na forma de uma névoa, utilizando uma seringa de volume constante (Constant Rate Syringe; SUPELCO, Bellefonte, EUA). Após a introdução da solução padrão em todos os tubos, os mesmos foram congelados (-10 °C) por 48 horas.

3.11 PREPARO DOS PADRÕES DE QUANTIFICAÇÃO

Para avaliar as amostras coletadas diretamente do caldo

fermentativo e através da resina Xad-2, foram utilizados padrões dos álcoois: etílico (etanol), 2-metil-propanol, 3-metil-butanol, 2-metil-butanol e 2-fenil-etanol (álcool feniletílico); todos esses compostos foram identificados previamente como analitos, por avaliação dos cromatogramas de íons totais (GC-MS) de amostras coletadas das fermentações em Erlenmeyer. Todos os padrões possuem pureza acima de 98% (GC) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, EUA), a faixa de concentração utilizada para as curvas de calibração foram de: (20,0 – 400,0), (1,0 – 25,0), (1,0 – 25,0), (0,5 – 10,0) e (0,5 – 10,0) ($\mu\text{g L}^{-1}$), respectivamente. Para o etanol, proveniente da coleta por Xad-2, foi utilizado uma curva adicional com faixa de 160 – 800 ($\mu\text{g L}^{-1}$).

3.12 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS COLETADAS DO CALDO FERMENTATIVO POR SPME E GC-MS

A parte líquida, separada do caldo fermentativo, cujo objetivo foi estudar os MVOC por SPME, foi descongelada à temperatura ambiente (20 minutos); o pH foi medido e ajustado para $7,1 \pm 0,3$ com hidróxido de bário ou ácido clorídrico diluídos. Exatamente 3 mL do líquido foram transferidos para um tubo de 22 mL (tubo para SPME). A massa do líquido foi medida antes do procedimento de microextração, os frascos seguiram para um banho termostaticado, sendo mantidos a $36,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, com agitação por barra magnética a 120 rpm. A fibra de SPME foi introduzida 5 minutos após a termostatização do tubo, permanecendo durante 51 minutos em contato com o espaço confinado. As microfibras utilizadas são com recobrimento de PDMS/Car/DVB (SUPELCO), com 50/30 μm de espessura. Essa microfibra foi a que apresentou melhores resultados em relação as outras duas que foram testadas (PDMS e PDMS/Car). A distância da fibra a superfície do líquido foi mantida em dois centímetros, constante para todas as amostras. Decorrido o tempo de extração, a fibra foi recolhida, sendo novamente exposta durante a injeção no equipamento de GC-MS QP2010 Plus, segundo as condições dadas na tabela 3 (planejamento 2), otimizadas através dos resultados obtidos com os planejamentos experimentais.

A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros, obtidos experimentalmente, com dois bancos de dados, NIST (atualizado em 2014) e SDDBS (*on line*), e através de bibliografias (BIANCHI *et al.*, 2007; BABUSHOK, 2015), para confirmação. A

avaliação da robustez do método foi realizada segundo recomendação ICH (1996), estudando as variações (variância; teste F) e médias das áreas dos MVOC (teste t; 95% de confiança) sobre um conjunto de extrações realizadas em frações do líquido fermentativo, frente a mudança de colunas (J&W DB5-ms e RESTEK Rtx[®]-5MS), temperaturas (isoterma e rampa), vazão do gás de arraste (3 valores: 0,8; 1,0; 1,2 mL min⁻¹) e os planejamentos experimentais.

3.13 AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS COLETADAS POR CARTUCHOS DE XAD-2 POR SPME E GC-MS

Os cartuchos de Xad-2, provenientes das coletas dos gases de exaustão do biorreator, que se encontravam a -10 °C, foram descongelados e secos externamente com ar comprimido. A lâ de vidro das extremidades do cartucho foi removida e a resina Xad-2 foi transferida para um tubo para SPME de 22 mL, limpo e seco. O tubo foi aquecido a 70 °C por 20 minutos, transferido para um banho termostatizado à 50 °C, ficou sob estabilização por dez minutos, a fibra de SPME foi introduzida após a estabilização do tubo, permanecendo durante 60 minutos em contato com o espaço confinado, acima da resina Xad-2. O tipo de microfibras utilizada, o procedimento de injeção, as condições de análise e identificação dos compostos são idênticos ao do item anterior (avaliação das amostras coletadas do caldo fermentativo por SPME e GC-MS).

3.14 TESTES DE RECUPERAÇÃO PARA OS ÁLCOOIS EXTRAÍDOS DO CALDO FERMENTATIVO E DOS GASES DE EXAUSTÃO

Para avaliar a recuperação dos álcoois extraídos do caldo fermentativo foram utilizadas misturas dos mesmos padrões de etanol, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol, 2-metil-butanol e 2-fenil-etanol usados para a curva de calibração (padrões grau GC). Os padrões foram utilizados em três concentrações diferentes (1-20 µg L⁻¹) e introduzidos em três frações de 3 mL do meio de cultura autoclavado (triplicatas), diluídos na proporção de um para dois; o pH foi ajustado para 7,0 com hidróxido de bário diluído. Os valores das concentrações dos padrões podem ser visualizados na tabela 16, no apêndice F. Todas as alíquotas

seguiram os mesmos procedimentos de preparação, injeção e análises empregadas para as amostras do caldo fermentativo. As alíquotas do meio de cultura autoclavado foram utilizadas por apresentar uma melhor representatividade e similaridade com as amostras do caldo e por não apresentarem sinais interferentes nos cromatogramas de íons totais, nas regiões dos padrões, uma vez que, estas não possuem os referidos álcoois.

Para avaliar a recuperação nas amostras de extração dos gases de exaustão (por Xad-2), foram utilizadas misturas dos mesmos padrões de etanol, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol e 2-metil-butanol usados para a curva de calibração, em três concentrações diferentes ($5-20 \mu\text{g L}^{-1}$). Sobre 600 mg da resina (Xad-2) foi introduzida uma porção de 30 μL de solução padrão dos álcoois, na forma de uma névoa, utilizando uma seringa de volume constante (Constant Rate Syringe; SUPELCO, Bellefonte, EUA), os tubos contendo a resina foram congelados (-10°C) por 48 horas. Foram preparadas três replicas de cada uma das três concentrações avaliadas, os valores das concentrações são mostrados na tabela 17, no apêndice G. Todos os preparados seguiram os mesmos procedimentos de injeção e análises, empregados para as amostras de extração dos gases de exaustão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos itens seguintes, são discutidos todos os resultados obtidos para as amostras do caldo fermentativo e extração dos gases de exaustão, incluindo a avaliação realizada na parte líquida do caldo, onde se encontram os pigmentos produzidos pelo fungo *Monascus ruber*.

4.1 AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS EXTRAÍDOS DO CALDO FERMENTATIVO (PIGMENTOS E BIOMASSA).

O material liofilizado possui características peculiares de acordo com o crescimento e produção de metabólitos durante a fermentação. Na figura 10, é possível observar a cor característica do liofilizado dos caldos fermentativos, para os fungos das duas espécies de *Monascus*. Apenas o fungo *Monascus ruber* produziu pigmento vermelho (à direita) em meio de pó de arroz. O fungo *Monascus* sp. não produziu, especificamente, nesse meio e com as condições adotadas, quando cultivado em Erlenmeyer.

Figura 10: Foto dos liofilizados dos caldos fermentativos; *Monascus* sp. (esquerda) e *Monascus ruber* (direita), fermentação em Erlenmeyer.

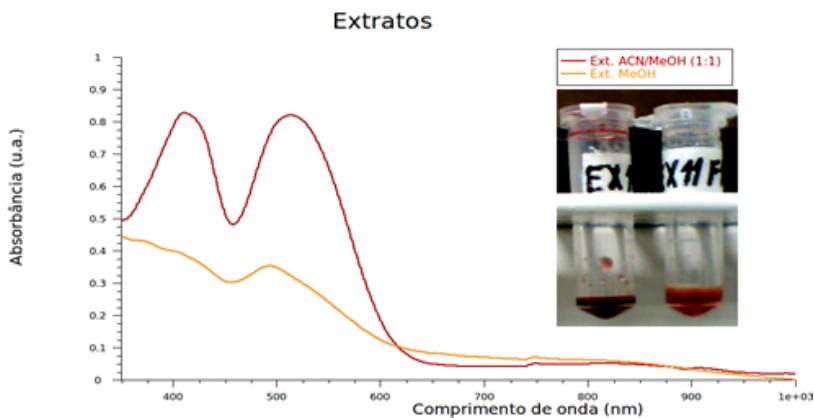


Por ser o único fungo que produziu pigmento vermelho, a espécie *Monascus ruber* foi utilizada para fermentação em biorreator.

4.2 PIGMENTOS PRODUZIDOS PELO FUNGO *Monascus*

Dois tipos de solventes foram utilizados na extração do material liofilizado (acetonitrila:metanol - 1:1 e metanol puro), ambas as extrações possuem espectros UV-Visível contendo bandas em comprimentos de onda muito semelhantes. Solventes de menor polaridade foram testados não apresentando significância na extração do pigmento vermelho. A figura 11 traz como exemplo dois espectros sobrepostos (350-1000 nm); aquele que está representado pela linha vermelha é referente ao extrato com a mistura de acetonitrila e metanol (1:1). O extrato concentrado correspondente está representado com a mesma cor na foto anexada (tubo de esquerda), ambos os tubos contêm o extrato bruto.

Figura 11: Espectros dos extratos brutos sobrepostos, com solvente de extração acetonitrila:metanol – 1:1 (esquerda) e metanol puro (direita).



Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura, pois são relatados os comprimentos de onda máximos ($\lambda_{\text{máx}}$) de 470 e 520 nm para os componentes laranja e vermelho, respectivamente, quando em água ou extraídos em etanol ou metanol (VENDRUSCOLO, 2009;

ZHENG *et al.*, 2009). Também pode ser observada, na figura 11, outra banda na região de 400 nm para o extrato bruto em acetonitrila:metanol (1:1). O extrato no qual foi utilizada a mistura proporciona uma melhor distinção entre as bandas em 411 e 512 nm; devido a esse fato, esse extrato foi preferido para as etapas seguintes de separação a avaliação. Também é possível observar que a banda próxima a 500 nm no espectro com acetonitrila:metanol (1:1), que se encontra exatamente em 512 nm, foi deslocada para comprimento de onda mais baixo, no extrato com metanol (494 nm).

Várias misturas de solventes foram testadas em colunas de 30 x 5 mm de sílica gel, os compostos eluídos eram submetidos a cromatografia em camada delgada para avaliar sua separação e purificação. Por fim, foi observado que três frações distintas, contendo pigmentos amarelo, laranja e vermelho puderam ser separadas efetivamente em sílica gel por hexano:éter etílico (1:1), acetonitrila:metanol (9:1) e metanol. A separação definitiva foi realizada em uma coluna de 300 por 10 mm de sílica gel, na figura 12 são mostradas as fotos desta separação.

Figura 12: Foto da coluna (300 x 10 mm) utilizada na separação do pigmento produzido por fungo do gênero *Monascus*; a) início da eluição; b) eluição do pigmento vermelho; c) eluição do pigmento laranja.

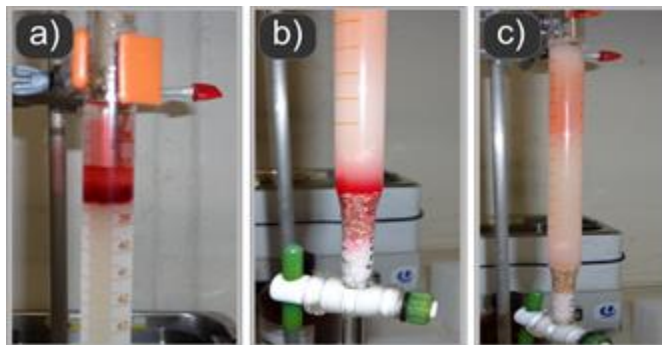


Figura 13: Foto dos três tipos de pigmentos que compõem o pigmento vermelho *Monascus*, que foram separados em coluna de sílica gel. Pigmentos: amarelo, laranja e vermelho.



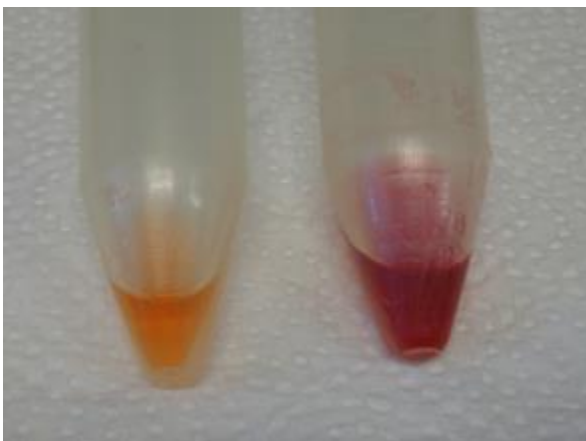
O pigmento de coloração amarela foi retirado antes, em hexano:éter etílico (1:1), comparações com extrações do meio de cultura mostraram que este pigmento se encontra no pó de arroz; ele é responsável pela maior parte da banda em 400 nm, observada no espectro. Esse pigmento não é produto da fermentação, ele está presente no meio de cultura.

A utilização da fase acetonitrila:metanol (9:1) foi eficaz para eluir o pigmento de coloração vermelha; esse é o pigmento de interesse comercial que está sendo produzido através da fermentação. A figura 13 ilustra com maior clareza os três tipos de pigmentos separados em coluna de sílica gel com as misturas hexano:éter etílico (1:1), acetonitrila:metanol (9:1) e com metanol puro. Todas as frações foram submetidas a avaliação por HPLC, em particular, a fração eluída com acetonitrila:metanol (9:1), que contém o pigmento vermelho, foi avaliada com o objetivo de confirmar que os resultados encontrados estão de acordo com Zheng *et al.* (2009), que avaliou o pigmento vermelho do fungo *Monascus* por HPLC, com vários tipos de detectores. Esses autores determinaram que os tempos de retenção para os pigmentos vermelhos rubropunctamina e monascorubramina são de 28,3 e 30,1 (minutos) quando utilizada a fase móvel de acetonitrila:ácido acético (10:1) e vazão de 1 mL min^{-1} , condições estas que foram testadas aqui, produzindo um sinal em 29,8 minutos, correspondente a monascorubramina. O espectro Visível (350-600 nm) é

muito semelhante ao encontrado para o extrato bruto em metanol:acetonitrila (1:1) (ver figura 10) e confere com os espectros apresentados por Zheng *et al.* (2009).

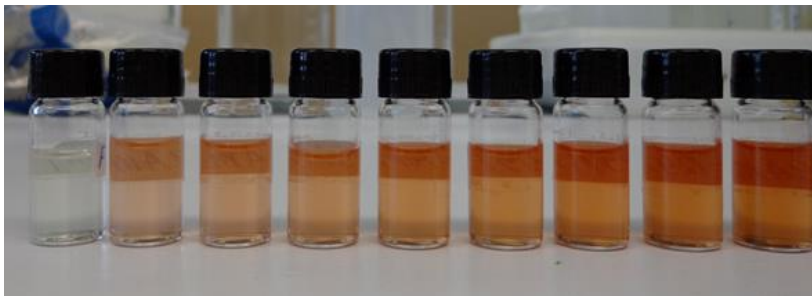
A figura 14 ilustra a diferença entre o laranja e o vermelho, ambos em solução aquosa (pH maior do que 6,0).

Figura 14: Foto dos pigmentos laranja (esquerda) e vermelho (direita), em solução aquosa.



Após o término da fermentação de dez dias, onde o solvente foi a água, o pH aumentou de 6,01 para 8,13, parte do pigmento vermelho encontra-se disperso (extracelular), porém a maior parte ainda se encontra intracelular. Quando centrifugado foi possível observar mais claramente a solução com predomínio do pigmento laranja; após ser filtrada em membrana de PVDF (0,22 μm), a solução adquiriu sua coloração definitiva, como pode ser observado na figura 15.

Figura 15: Foto do caldo fermentativo: bruto, centrifugado e filtrado em membrana de PVDF (0,22 μm).



O pigmento laranja possui certa influência sobre o espectro visível (banda em 470 nm) do pigmento vermelho, no entanto, foi possível separar com eficiência o pigmento laranja do vermelho, por cromatografia líquida com pressão normal, ou preparativa, como é conhecida, usando um procedimento simples de separação, com recuperação completa da fase estacionária ao final. A avaliação da quantidade de pigmento vermelho foi proposta por vários autores. Em particular, Hajjaj *et al.* (2000) possuem extenso trabalho com metabólitos do fungo *Monascus*, incluindo o pigmento vermelho. Esses autores desenvolveram uma relação quantitativa que serve para determinar a massa do pigmento vermelho utilizando a absorvância do caldo ou extrato em 480 nm. A maioria dos autores utiliza essa relação desenvolvida por Hajjaj *et al.* (2000) para comparar as quantidades e observar o desempenho da fermentação quanto à produção de pigmento.

A utilização do pigmento laranja, para verificar sua interferência sobre o pigmento vermelho, proposto aqui, foi estabelecida com base nos experimentos em cromatografia para o material liofilizado e para o caldo fermentativo. A quantidade do pigmento laranja é sempre superior à do pigmento vermelho extracelular no caldo. No entanto, esse pigmento laranja não possui banda intensa em 480 nm, sua maior interferência advém da banda forte na região do amarelo (400 nm), estendendo-se (por alargamento) para a região de 470 nm, porém com intensidade menor.

Os testes de recuperação para o pigmento laranja foram importantes para melhorar o nível de informações a respeito da

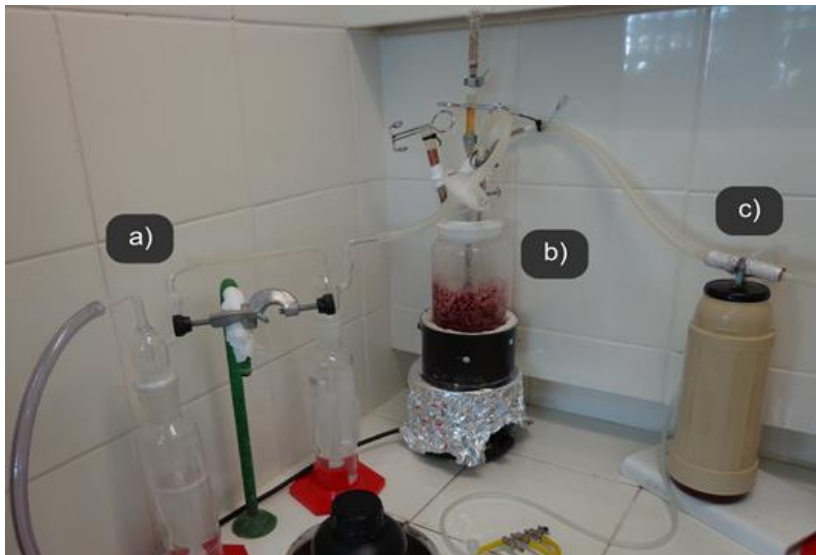
interferência sobre o pigmento vermelho, uma vez que os dois componentes estão presentes no produto comercial *in natura*. No total, foi nove o número de alíquotas utilizadas para o cálculo da média do percentual de recuperação, que teve como base a diferença entre a primeira separação (do caldo fermentativo) e uma segunda separação, com os eluatos da primeira (laranja e vermelho), unidos e separados novamente. Com os resultados de absorvância foi possível verificar que a recuperação ocorre com percentual médio de $76 \pm 6\%$ e amplitude (mínimo e máximo) de 67 a 82%.

Para verificar o desempenho da fermentação e a confiabilidade do biorreator, foram realizadas medidas da biomassa (em mg) e do valor do pigmento (absorvância em 480 nm), em 10 frações de 5 mL (do caldo fermentativo) para cada fermentação, considerando o produto final após os 5, 8 e 10 dias. Os resultados quantitativos são mostrados na tabela 6, para as três fermentações, e uma foto do biorreator é mostrada na figura 16.

Tabela 6: Desempenho da fermentação realizada em biorreator; médias e coeficientes de variação (C.V.) da biomassa e da absorvância do pigmento (densidade óptica em 480 nm; OD_{480}), para as três fermentações.

| Parâmetros | Fermentações | | |
|--------------------------------|--------------|---------|---------|
| | Ferm.01 | Ferm.02 | Ferm.03 |
| <i>Biomassa</i> | | | |
| <i>(g/L)</i> | | | |
| média | 2,85 | 3,94 | 4,03 |
| C.V. | 11,5 | 8,6 | 5,3 |
| <i>Pigmento</i> | | | |
| <i>(OD_{480})</i> | | | |
| média | 2,63 | 3,67 | 3,96 |
| C.V. | 5,8 | 6,2 | 4,2 |

Figura 16: Foto do biorreator utilizado para produção de pigmento, por fungo *Monascus ruber*; a) lavadores de gases; b) biorreator; c) resfriador de cartuchos (Xad-2).



Para comparar as médias mais semelhantes (Ferm. 02 e Ferm. 03) foi utilizado um teste de Student (teste t) para amostras emparelhadas; o teste visa a comparar as amostras das duas fermentações frente aos mesmos métodos aplicados para as duas (tabela 6). Pelo resultado do teste foi concluído que as médias da biomassa não possuem diferenças ($t_{\text{calc}} < t_{9;0,05}$) e as médias do pigmento sim ($t_{\text{calc}} > t_{9;0,05}$), em nível de 95 % de confiança. O resultado indica que a biomassa no final de 8 dias é semelhante à de 10 dias, mas o pigmento possui um leve aumento, o que já era esperado, porque, após o oitavo dia, o pH do caldo sobe (6,5 para 8,2), promovendo o rompimento da membrana celular e liberando parte do pigmento intracelular (MORITZ, 2005). Os números da tabela 6 estão de acordo com a cinética geral para esse tipo de fermentação, pois, quando o pH aumenta para 8,3 e acima, ocorre maior número de mortalidade e o material intracelular extravasa para o caldo (lise celular), aumentando a quantidade de pigmento

(VENDRUSCOLO, 2009). Os resultados para a biomassa e para o pigmento (UA₄₈₀) foram inferiores aos valores obtidos por Meinicke *et al.* (2012), que utilizou o glicerol como substrato e glutamato monossódico como fonte de nitrogênio orgânico, obtendo valores de 7,38 UA₄₈₀ e 8,44 g L⁻¹ para o pigmento e biomassa, respectivamente. Apesar dos maiores resultados a razão entre pigmento e biomassa ($7,38/8,44 = 0,87$) é muito próxima às razões obtidas nesse trabalho (0,92, 0,93 e 0,98), sendo apenas 8,6 % diferentes. Não é possível calcular com clareza a relação de pigmento e biomassa, mas é possível perceber a semelhança de resultados e verificar que a cinética que envolve o pigmento depende do crescimento celular e das condições envolvidas na fermentação. Um fator importante no trabalho de Meinicke *et al.* (2012) é que a cinética de fermentação foi otimizada para a produção de pigmento através de modelagem, o que resultou em valores altos.

4.3 BIOMASSA DO CALDO FERMENTATIVO

O líquido fermentativo, que constitui as amostras online (coletas de 12 horas), possui maior viscosidade no início da fermentação devido ao material amiláceo em suspensão. Cerca de vinte e quatro horas após a inoculação do fungo, a viscosidade se reduz consideravelmente, permanecendo baixa até o final da fermentação. As estruturas dos micélios do fungo estão dispersas e separadas, suficientemente, para não ocasionar alterações na viscosidade do líquido, uma vez centrifugadas, as partes líquidas são homogêneas e de fácil filtração. Antes de vinte e quatro horas, a dispersão do amido dificulta a centrifugação e filtração, sendo necessário corrigir o valor da biomassa (medida da massa; em mg) através da massa de amido residual. A correção para as primeiras 24 horas foi realizada por meio de uma curva de diluição dos meios de cultura autoclavados, preparada como descrito em medidas de biomassa; a mesma curva foi usada para determinar o erro experimental da média de biomassa (mg) por gravimetria. Os valores das medidas de biomassa são mostrados na tabela 7, para as três fermentações.

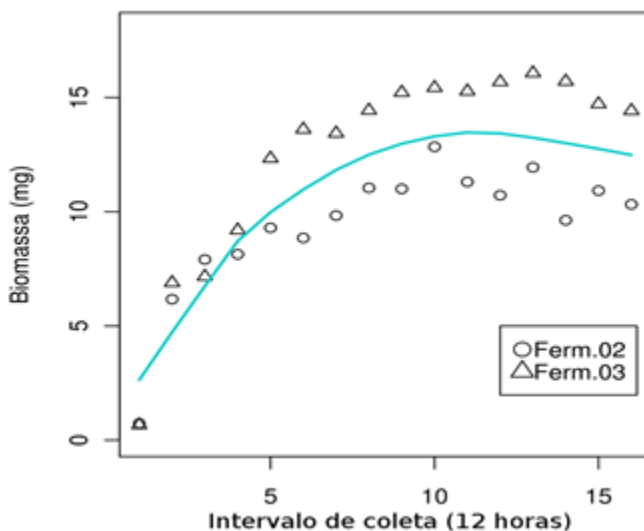
Tabela 7: Valores das medidas de biomassa por gravimetria, obtidos das coletas de 12 horas, para as três fermentações; valores em miligramas de biomassa seca.

| Amostras | Fermentações Biomassa (mg) | | |
|----------|-------------------------------|--------------|--------------|
| | Ferm. 01 | Ferm. 02 | Ferm. 03 |
| am1 | 0,68 | 0,73 | 0,66 |
| am2 | 3,23 | 6,17 | 6,89 |
| am3 | 4,68 | 7,91 | 7,16 |
| am4 | 5,15 | 8,14 | 9,19 |
| am5 | 6,22 | 9,30 | 12,33 |
| am6 | 8,37 | 8,85 | 13,61 |
| am7 | 8,96 | 9,84 | 13,44 |
| am8 | 8,17 | 11,05 | 14,44 |
| am9 | 8,27 | 11,00 | 15,22 |
| am10 | 9,55 | 12,85 | 15,43 |
| am11 | - | 11,31 | 15,28 |
| am12 | - | 10,72 | 15,69 |
| am13 | - | 11,95 | 16,07 |
| am14 | - | 9,63 | 15,71 |
| am15 | - | 10,92 | 14,72 |
| am16 | - | 10,32 | 14,42 |
| am17 | - | - | 12,32 |
| am18 | - | - | 11,13 |
| am19 | - | - | 11,80 |
| am20 | - | - | 10,20 |

am: coletas realizadas a cada 12 horas

Para ilustrar a distribuição média da biomassa ao longo do período das duas últimas fermentações (Ferm. 02 e 03), que são mais relevantes para o estudo dos MVOC, como será demonstrado ao longo da discussão, foi utilizada uma curva suavizada, que pode ser observada pela sua representação gráfica (figura 17), para os 16 valores (destacados) de biomassa (mg) das duas últimas fermentações; os quatro últimos valores de biomassa (mg) da Ferm. 03 não foram usados (ver tabela 7). Os códigos utilizados no software *R* encontram-se no apêndice A.

Figura 17: Representação gráfica da curva suavizada para ilustrar a média da biomassa (mg) das duas últimas fermentações (02 e 03).



A observação da curva mostra o perfil médio da distribuição da biomassa ao longo das duas fermentações, sendo possível observar os melhores intervalos de 12 horas para se obter um melhor rendimento do fungo, considerando o número de células viáveis. O uso das medidas de biomassa fazem parte da análise da cinética da fermentação, o que possui relação direta com a formação dos metabólitos em solução, como por exemplo os álcoois. Apesar de existirem evidências das relações da biomassa com a produção de álcoois superiores

(GARAVAGLIA, 2006), não é tão simples de se observar na prática, porque tais relações dependem de métodos precisos e robustos para verificar suas dependências. Todas as metodologias empregadas neste trabalho demonstram suficiente aplicabilidade para estudar as relações de dependência entre o fungo e os MVOC relacionados com a produção de pigmento. No entanto, apenas os cinco compostos que formam acúmulos puderam ser estudados estatisticamente e relacionados diretamente com o crescimento celular, detalhes a esse respeito são discutidos na sequência.

4.4 PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS PARA O CALDO FERMENTATIVO E COLETA POR CARTUCHOS DE XAD-2

A quantidade de compostos orgânicos voláteis é bastante extensa em todas as amostras analisadas, necessitando assim, uma filtragem para os mais relevantes em termos comparativos, de acordo com os objetivos centrais do presente trabalho. Por isso, foram escolhidos os cinco compostos relacionados diretamente com a presença do fungo, e produzidos por influência desse. São eles: álcool etílico (etanol), 2-metil-propanol, 3-metil-butanol, 2-metil-butanol e 2-feniletanol (álcool fenilético) (STOPPACHER *et al.*, 2010).

4.4.1 Planejamentos experimentais para avaliação do caldo fermentativo

Como foram realizados três planejamentos fatoriais distintos, cada um foi analisado separadamente. Os resultados foram reunidos e estudados de acordo com os critérios estatísticos mais convenientes para cada caso, pois, existem diferentes métodos para avaliar cada planejamento, de acordo com as distribuições e a significância de cada variável. A escolha dos níveis não foi ao acaso; experimentos anteriores realizados em agitador orbital, com o fungo *Monascus ruber* foram analisados e seus resultados de pH, tempo máximo de extração e temperatura máxima de extração foram levadas em consideração. Os resultados a seguir mostram como foram realizados os planejamentos para os compostos citados acima, trazendo alguns exemplos de cálculos e os principais resultados. Para os cálculos estatísticos foi utilizado o software *R* (<http://www.R-project.org>), para GNU/Linux, com uma

série de pacotes estatísticos diferentes, a entrada de dados e os cálculos foram realizados através da linha de comandos, porém, para facilitar a entrada de comandos, foram criados arquivos no formato de texto, com os algoritmos completos, incluindo os gráficos que são apresentados na sequência. A vantagem de se trabalhar com os códigos, em arquivos de texto (*script*), é que os leitores podem observar como são realizadas as operações, desde as mais simples, como médias e variâncias, até a montagem de um gráfico específico, que resume resultados específicos. Os arquivos de texto utilizados na discussão desse trabalho são apresentados nos apêndices (A, B, C, D e E), todas as funções pré-estabelecidas possuem documentação e referências, dadas no manual do respectivo pacote estatístico. Para maiores detalhes sobre cada pacote, pode-se consultar o site do projeto *R*. A descrição completa dos cálculos matemáticos envolvendo a álgebra linear e todos os cálculos estatísticos mais corriqueiros podem ser encontrados nas referências (NETO *et al.*, 2010; MINGOTI, 2013).

Para demonstrar a análise realizada com o planejamento fracionário em GC-FID, e o algoritmo que foi utilizado para todos os compostos da via metabólica dos alcoóis, foi elegido o composto 3-metil-butanol (c8), o mesmo vale para os demais; todos os códigos empregados no software *R* são dados nos apêndices B, C, D e E. Os dados das áreas dos picos desse composto são dados na tabela 8; as áreas utilizadas foram obtidas diretamente pela integração dos picos dos cromatogramas. Não foram realizados ajustes de normalização, pois, a intenção foi verificar a variabilidade bruta entre cada injeção.

Tabela 8: Áreas dos picos do 3-metil-butanol (Respostas), obtidas diretamente pela integração dos picos dos cromatogramas, divididas por 10.000; para todas as corridas do planejamento fracionário 2^{4-1} (em GC-FID).

| Corridas | A | B | C | D | Respostas |
|----------|----|----|----|----|-----------|
| 1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 14,363 |
| 2 | 1 | -1 | -1 | 1 | 22,195 |
| 3 | -1 | 1 | -1 | 1 | 27,314 |
| 4 | 1 | 1 | -1 | -1 | 23,501 |
| 5 | -1 | -1 | 1 | 1 | 21,148 |
| 6 | 1 | -1 | 1 | -1 | 21,918 |
| 7 | -1 | 1 | 1 | -1 | 28,602 |
| 8 | 1 | 1 | 1 | 1 | 31,463 |
| 9 | -1 | -1 | -1 | -1 | 15,147 |
| 10 | 1 | -1 | -1 | 1 | 23,205 |
| 11 | -1 | 1 | -1 | 1 | 29,436 |
| 12 | 1 | 1 | -1 | -1 | 26,901 |
| 13 | -1 | -1 | 1 | 1 | 22,589 |
| 14 | 1 | -1 | 1 | -1 | 25,184 |
| 15 | -1 | 1 | 1 | -1 | 32,120 |
| 16 | 1 | 1 | 1 | 1 | 31,902 |

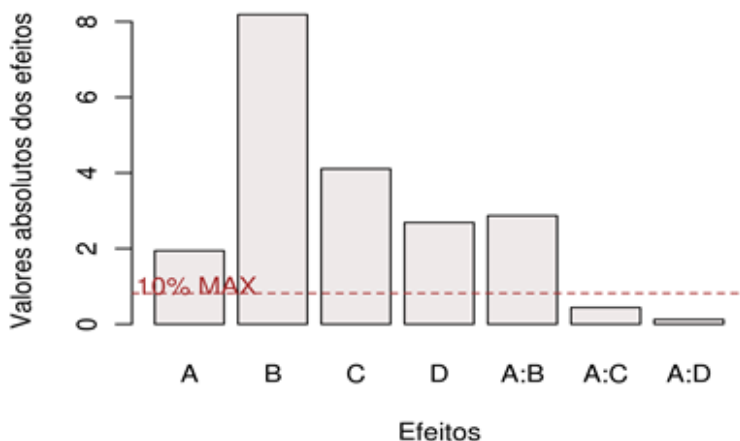
A: pH; B: diluição; C: tempo de extração; D: temperatura de extração

As corridas 1 até 8 representam o planejamento fracionário 2^{4-1} , e de 9 até 16 as réplicas. Os valores naturais das variáveis independentes foram dados na tabela 2, e as condições de análise foram dadas na tabela 3, para o referido planejamento (planejamento 1).

Inicialmente foi realizada uma regressão linear com todas as variáveis e interações, para se obter o modelo que serviu de base para cálculos de normalidade e homoscedasticidade dos resíduos. Também foi realizada uma análise de variâncias (ANOVA). Com esse primeiro

modelo, foi possível verificar os efeitos dos níveis de cada fator sobre a resposta. Um gráfico dos valores absolutos dos efeitos é mostrado na figura 18; ele resume os resultados desse primeiro modelo; a linha tracejada representa 10% do valor do maior efeito (B). Segundo Neto *et al.* (2010), abaixo de 10% do valor do maior efeito, todos os efeitos podem ser considerados como não significativos, o que foi confirmado através do “teste t” para a média dos níveis (com 95% de confiança).

Figura 18: Gráfico de barras dos efeitos para o composto 3-metil-butanol, adotado como exemplo dos cálculos dos planejamentos realizados em GC-FID. A: pH; B: diluição; C: tempo de extração; D: temperatura de extração

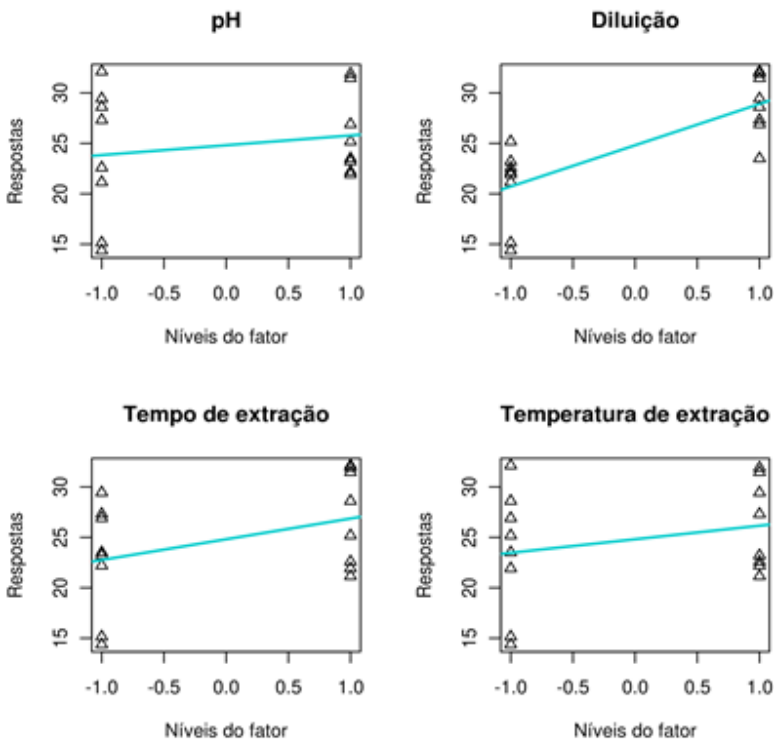


Pode-se observar que todos os efeitos de primeira ordem (A, B, C e D) são significativos e apenas uma interação de segunda ordem é significativa (A:B). Como se trata de um planejamento fatorial fracionário, de ordem IV (A:B está relacionado com C:D), essa interação dos fatores “A” com “B” tem seu efeito confundido com o da interação “C” com “D”, o que significa que não é possível afirmar qual interação, se “A:B” ou “C:D”, é a significativa, porém, seguindo o raciocínio proposto por Neto *et al.* (2010), nota-se que o efeito principal de “B” tem valor superior aos outros, então, supõe-se que a interação contendo “B” (A:B) seja a maior.

Para verificar o efeito de cada nível dos fatores e a variação das

respostas, são mostrados gráficos de efeito principal na figura 19. Pode-se observar que, em todos os casos, as médias das respostas (linha contínua) são maiores no nível alto (1); os valores individuais estão menos dispersos no nível alto (1), indicando que a variação das respostas neste nível é menor.

Figura 19: Gráficos de efeito principal para o composto 3-metil-butanol, adotado como exemplo para os planejamentos fatoriais fracionários realizados em GC-FID.



Após avaliarem-se todos os gráficos, foi formulado um segundo modelo, apenas com os fatores e interações, cujos valores absolutos são significativos; também foram levados em consideração valores dos testes “t” e “F” da regressão e da ANOVA, que não foram mencionados

anteriormente porque são repetidos para o segundo modelo, e serão comentados a seguir.

O segundo modelo adotado, em conformidade com o critério acima, forneceu como resultado a seguinte equação:

$$\hat{Y} = 24,81 + 0,97.A + 4,09.B + 2,05.C + 1,34.D - 1,43.A.B \quad (1.3)$$

Os resultados para o ANOVA e a falta de ajuste são dados na tabela 9. Esses testes são realizados em conformidade com a literatura estatística e foram revisados no software *Libreoffice calc 3.5* (<https://pt-br.libreoffice.org>).

Tabela 9: Resultado dos testes de ANOVA para o modelo do composto 3-metil-butanol utilizando o software *R*.

| | GL | Soma Quad. | Média Quad. | F | Pr(>F) |
|-----------|----|------------|-------------|-------|--------|
| A | 1 | 15,11 | 15,11 | 5,62 | 0,045 |
| B | 1 | 268,06 | 268,06 | 99,71 | 0,000 |
| C | 1 | 67,50 | 67,50 | 25,11 | 0,001 |
| D | 1 | 28,93 | 28,93 | 10,76 | 0,011 |
| A:B | 1 | 32,94 | 32,94 | 12,25 | 0,008 |
| Resíduo | 10 | 22,35 | 2,23 | | |
| F. Ajuste | 2 | 0,84 | 0,42 | 0,16 | 0,857 |
| Erro puro | 8 | 21,51 | 2,69 | | |

GL: grau de liberdade; Quad.: quadrática; F: valor de F; Pr(>F): *p-value*

Todos os valores de “*p*” (última coluna da tabela), para os fatores A, B, C e D, são menores do que o valor de α crítico (0,05), escolhido para o teste F; o valor da falta de ajuste ($p = 0,857$) é superior ao valor de α crítico (0,05). Esses resultados mostram que todos os fatores são significativos e que o modelo possui ajuste, uma vez que a hipótese (H_0) de falta de ajuste foi rejeitada pois $p > \alpha$ crítico (0,05). Esse segundo modelo foi avaliado através de testes de resíduo (Kolmogorov-Smirnov, Anderson-Darling, Shapiro-Wilk, Bartlett) e

gráficos de probabilidade normal, valor ajustado por valor predito e outros (HEO *et al.*, 2013).

Os mesmos cálculos e gráficos do planejamento fatorial fracionário, dados acima para o composto 3-metil-butanol, foram repetidos para os demais. Baseando-se nesses estudos, foi elaborado o seguinte resumo, que serve para todos os cinco compostos relacionados diretamente com a presença do fungo (álcool etílico, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol, 2-metil-butanol e 2-fenil-etanol): as maiores médias e as menores variações de resposta são encontradas no nível mais alto de pH (> 5,3), sugerindo uma menor variabilidade dos dados nesse nível; os fatores (pH, tempo de extração e temperatura de extração) são influentes para a variável de resposta e necessitaram ser melhorados e estudados em níveis mais altos, daí a necessidade de outro planejamento.

Uma vez que o modelo citado acima foi reproduzível, assim como os modelos criados para os demais compostos, foi realizado um segundo planejamento fatorial (planejamento 2, tabela 2), agora sem réplicas. Os planejamentos sem réplicas são avaliados de maneira semelhante aos com réplicas, mas confiar no seu ajuste é mais arriscado. No entanto, é possível decidir com segurança quais os efeitos são significativos. Um bom exemplo comparativo é o método da robustez de Youden, que foi utilizado em outros trabalhos (DEJAEGHER; HEYDEN, 2007).

O objetivo desse segundo planejamento foi modificar os níveis e estudar o efeito do aumento nas variáveis de extração, os experimentos foram realizados por cromatografia a gás com detector de massas (GC-MS). Os cálculos e gráficos estudados são semelhantes aos realizados para o planejamento 1, porém, não se utiliza o ANOVA para decidir sobre a significância dos fatores, mas utilizam-se os valores da regressão (teste t) e os métodos de Lenth (LENTH, 1989; KLUTZ *et al.*, 2015) e gráficos de probabilidade normal e half-normal (DANIEL, 1959). Para os cinco compostos estudados, os resultados podem ser resumidos como: as maiores médias das respostas se encontram em níveis de pH abaixo de 8,0 (e acima de 5,3) unidades de pH, indicando que níveis altos de pH prejudicam os valores das respostas; o gráfico do efeito principal, dado na figura 20, exemplifica o resultado em questão. As maiores médias para tempo de extração e temperatura de extração se encontram no nível mais alto (45 min.; 45°C). O efeito do tempo de

extração é maior do que o efeito da temperatura de extração, sendo que os dois fatores têm a mesma variação entre os níveis (15 min.; 15 ° C). Para exemplificar os resultados obtidos com esse planejamento, é mostrado, na figura 21, um diagrama com os três fatores mais influentes para o etanol, onde, nos vértices do cubo, estão os valores das médias das áreas dos picos (divididas por 100.000) referentes à combinação dos níveis que são indicados na figura. Pode-se observar que a maior resposta (119) se encontra no nível baixo de “A” e nos níveis altos de “B” e “C” (menor pH; menos diluído; maior tempo de extração). O estudo do efeito da diluição foi importante quando se suspeitou de uma interação com outro fator, como a temperatura de extração, o que poderia indicar uma menor (ou maior) proporção de saturação do analito em espaço confinado, ocasionando perda na linearidade entre a quantidade de analito coletada pela fibra e a concentração de equilíbrio entre fase líquida e fase de espaço confinado (*headspace*). Resumindo, a diluição da amostra não poderia causar aumento da quantidade de analito extraído, se a temperatura de extração fosse a mesma (ou fosse aumentada), pois diluição implica em menor quantidade de analito.

Figura 20: Gráficos do efeito principal para o etanol; exemplo para ilustrar o efeito sobre a resposta para os álcoois.

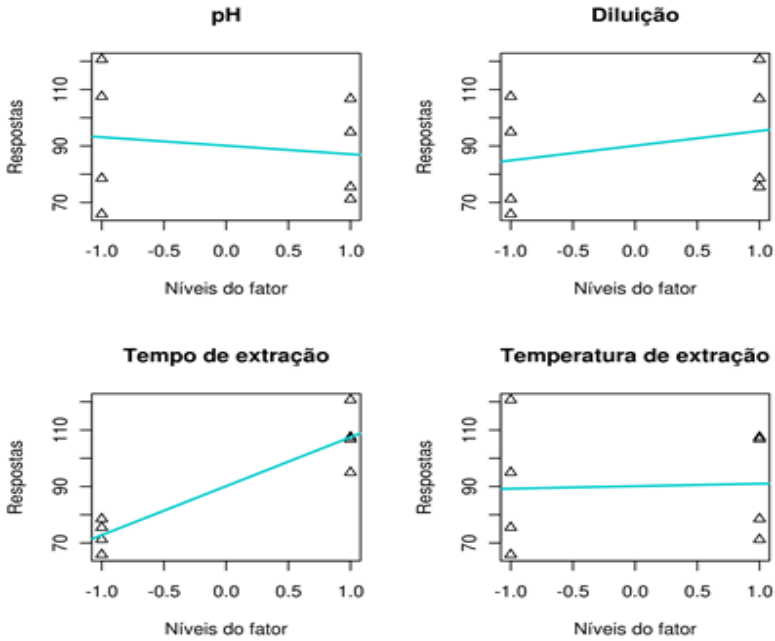
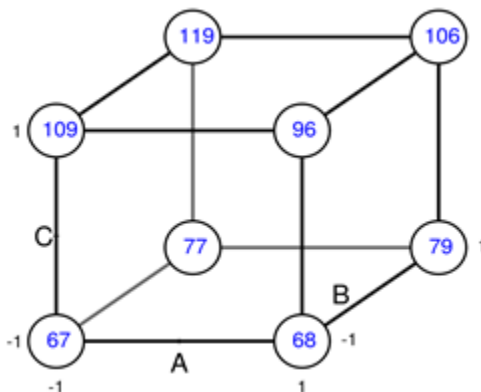


Figura 21: Diagrama do cubo das médias por combinação dos níveis; exemplo para ilustrar a avaliação conjunta para os valores de médias dos níveis. A: pH; B: diluição; C: tempo de extração.



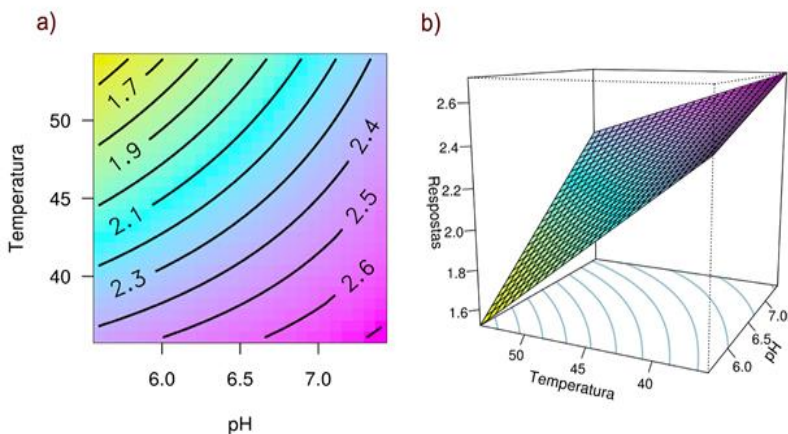
Apesar dos resultados dos dois planejamentos anteriores serem importantes para a tomada de decisão quanto a extração e avaliação das amostras do caldo fermentativo, e fornecerem uma base de informações fundamentada em critérios estatísticos, algumas dúvidas ainda persistiam; pode-se observar no gráfico do efeito principal (do pH) para o etanol (figura 20), que a maior média está no nível mais baixo, assim como a maior dispersão dos valores, isso indica que existe um ponto intermediário no qual a média e a dispersão são mais adequadas para se avaliar os resultados definitivos de uma extração desse gênero. Os dois planejamentos iniciais também convergiam para um valor central, semelhante aos valores ótimos que são encontrados quando se utiliza o método de inclinação ascendente. Como a proposta do trabalho era avaliar compostos voláteis, principalmente da via metabólica dos álcoois, foi necessário estudar mais a fundo um ponto intermediário que comportasse as melhores médias e as menores variações para todos os referidos compostos. Não foi possível optar pela forma mais tradicional de avaliação dos níveis, que seria o método da máxima inclinação ascendente, porque dois equipamentos diferentes foram utilizados devido a necessidade técnica (GC-FID e GC-MS); por isso, foi necessário um último e definitivo planejamento para se chegar a um modelo com os níveis otimizados, para os cinco compostos da via dos álcoois. O terceiro planejamento foi realizado sem maiores dificuldades,

pois os níveis das variáveis já haviam sido refinados nos dois planejamentos anteriores, independentes do detector acoplado ao cromatógrafo.

Tendo em vista todos os resultados anteriores, foi realizado um último planejamento completo 2^3 com três réplicas no ponto central. Os cálculos para esse planejamento são semelhantes aos apresentados anteriormente, por isso serão resumidos e apresentados somente para o composto 2-metil-propanol, porque esse composto apresentou as menores diferenças entre os níveis e o maior número de fatores significativos, possuindo o modelo mais abrangente para aplicação da otimização por método Simplex, que auxiliou na tomada de decisões acerca das restrições para otimização dos cinco compostos, concomitantemente.

A figura 22 sintetiza todos os cálculos realizados para o 2-metil-propanol, mostrando o diagrama de contornos e a superfície de resposta para os fatores estatisticamente significativos, que são o pH e a temperatura de extração. Para facilitar a visualização foram utilizados os valores naturais das variáveis, porém nos cálculos são utilizadas as variáveis codificada (-1, 0, 1); para facilitar os cálculos as áreas dos picos foram divididas por 10^5 unidades.

Figura 22: Síntese para os cálculos realizados para o 2-metil-propanol; a) diagrama de contorno; b) superfície de resposta. Respostas: áreas dos picos divididas por 10^5 unidades.



A equação obtida para o modelo final que representa os efeitos do pH (A) e da temperatura de extração (B) é mostrada abaixo (equação 1.4), para as variáveis codificadas, de acordo com os cálculos realizados no software *R*, semelhantes aos realizados para os fatoriais fracionários. Os códigos envolvidos são semelhantes aos mostrados nos apêndices B, C, D e E.

$$\hat{Y} = 2,25 + 0,27 \cdot A - 0,33 \cdot B + 0,13 \cdot A \cdot B \quad (1.4)$$

A escolha dos fatores significativos foi através de testes de hipóteses para grau de significância de 95%. Foram utilizados os valores de *t* (Student) e *F* (Fisher) para decidir pela aceitação da significância (*p-value* < 0,05). O valor da interação de pH com a Temperatura de extração (A.B) não é significativo, porém o valor de probabilidade (*p-value*) para o teste *F* é 0,10, isso caracteriza uma interação não nula (não desconsiderável) seu valor entra na equação para equilibra os valores estimados pela equação de regressão. A média e o coeficiente de variação para as três réplicas do ponto central foram de 2,21 10⁵ e 8,99%, respectivamente. O valor de *R*² foi de 0,87 e o valor de probabilidade (*p-value*) de *F* (Fisher) para falta de ajuste é de 0,70 (> $\alpha_{0,05}$ crítico). Esses valores mostram que a equação pode explicar 87% da variabilidade dos dados e possui ajuste significativo. O valor de *R*², proporção de variabilidade de *Y* que é explicada pelo modelo, é completamente influenciado pelo número de parâmetros; como nesse caso são quatro (β_0 , β_1 , β_2 e β_3 ; da equação), o valor de 0,87 não reflete o ajuste do modelo, por isso a necessidade de se fazer o teste de falta de ajuste.

Testes sobre os resíduos do modelo mostram que os resíduos são homocedásticos (Teste de Breusch - Pagan), têm distribuição normal (Testes de Shapiro - Wilk, Anderson - Darling e Kolmogorov - Smirnov) e são independentes (auto - correlação cruzada), critérios esses, usados para avaliar o modelo de acordo com referências (NETO *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2014). Os resultados são dados no apêndice H.

Pela observação da figura 21, pode-se concluir que, em temperaturas mais baixas (-1) e pH mais próximo a 7.4 (1), obtêm-se valores maiores na resposta (Unidades de Área/10⁵). As mesmas conclusões foram obtidas quando observados os planejamentos para os compostos 3-metil-butanol, 2-metil-butanol e 2-fenil-etanol. Os quatro

compostos acima, incluindo o 2-metil-propanol, são importantes porque fazem parte da via metabólica dos álcoois citados por Nozzi *et al.* (2014). A equação obtida através do planejamento para o 2-metil-propanol foi otimizada com o método simplex, para maximização, usando o algoritmo linear padrão da função solver, do programa *Libreoffice 3.5 Calc*. O simplex é muito útil porque, além de fornecer o valor máximo, também fornece os níveis ótimos para a obtenção do mesmo.

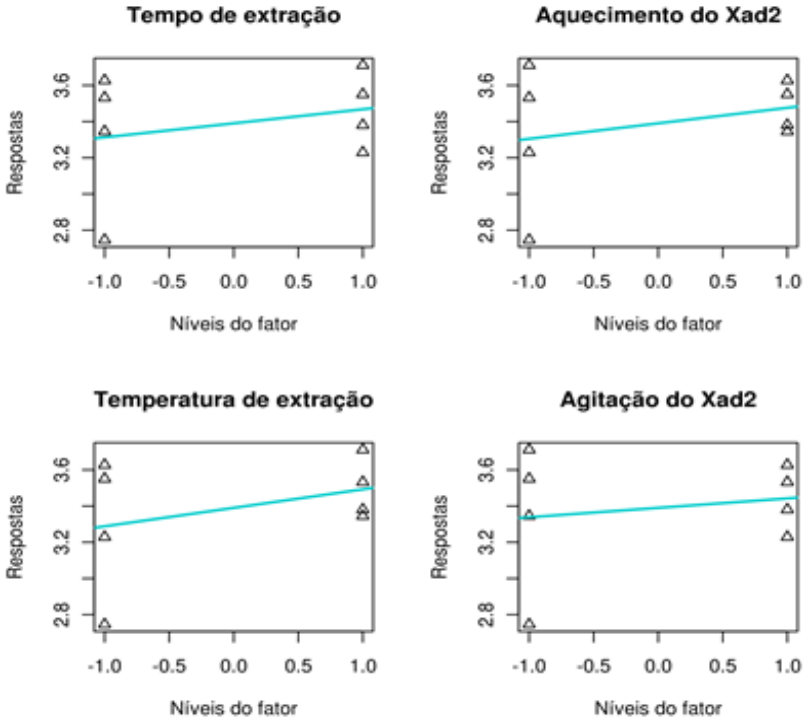
As restrições para a aplicação do algoritmo simplex foram retiradas das soluções e do estudo dos modelos obtidos para o etanol, 3-metil-butanol, 2-metil-butanol e 2-fenil-etanol; dessa forma, foi possível testar valores de níveis acima e abaixo, fazendo quatro experimentos adicionais e comprovando as restrições. As restrições são as seguintes: pH (valor > 6,5 e < 7,4); temperatura de extração (valor > 36,1 e < 45,0); tempo de extração (valor > 45,0 e < 50,9). Tais restrições (ou limitações experimentais verificadas durante os planejamentos) garantem que todos os cinco álcoois estudados sejam incluídos na otimização, considerando os limites experimentais conjuntamente. O valor máximo estimado, de acordo com a resposta do algoritmo da função solver foi de $2,71 \cdot 10^5$, muito próximo do valor experimental obtido para a maior resposta ($2,87 \cdot 10^5$), quando os níveis possuem os valores de 7,4(1), 36,1(-1) e 50,9(1), para os fatores pH, temperatura de extração e tempo de extração. De fato, o valor máximo estimado pelo simplex foi 5,6% menor do que o máximo valor experimental, porém, é menor do que o coeficiente de variação do ponto central (9,0%), ou seja, são valores máximos muito próximos, e sua diferença é menor do que a variabilidade das réplicas em um mesmo valor. Reunindo todos os resultados, foi possível concluir que os valores máximos, para as áreas dos compostos da via metabólica, são obtidos quando o pH está próximo de 7,0 (neutro), a temperatura de extração está próxima de 36,0 °C e o melhor tempo para a extração é próximo a 51,0 minutos. Temperaturas mais altas mostram uma possível interferência na partição e adsorção dos compostos voláteis, como os pertencentes aos meios de cultura, sobre os compostos da via metabólica, isso foi observado pela queda na resposta do 3-metil-butanol e 2-metil-butanol, quando foram testadas temperaturas acima de 45 °C. Portanto, as condições otimizadas acima foram utilizadas para analisar todas as amostras do caldo fermentativo de todas as fermentações, juntamente com os meios de cultura, por se

tratarem das melhores condições para avaliação dos compostos MVOC, com a menor variabilidade possível em torno das médias estimadas.

4.4.2 Planejamento experimental para avaliação da coleta por Xad-2

O planejamento realizado para os compostos coletados dos gases de exaustão do biorreator, através da resina Xad-2, foi substancialmente simplificado devido ao baixo nível de interferentes, quando foram combinados com extração por SPME. Nesse caso, foi possível desconsiderar o efeito da matriz porque a resina foi aquecida, liberando os compostos facilmente e sem a presença de concomitantes que são característicos no caldo fermentativo. Um resumo dos cálculos aplicados para os álcoois etílico (c2), 2-metil-propanol (c5), 3-metil-butanol (c8) e 2-metil-butanol (c9) é apresentado na figura 23, para o composto 2-metil-propanol.

Figura 23: Gráfico dos efeitos principais para o composto 2-metil-propanol, exemplo da aplicação do planejamento fatorial para compostos coletados dos gases de exaustão do biorreator.



Todas as variáveis possuem efeito principal significativo, exceto agitação das partículas do Xad-2. Novamente, foram verificadas todas as informações referentes aos modelos empíricos; os resultados para o 2-metil-propanol podem ser conferidos no apêndice. Os resultados otimizados pelo mesmo método dado anteriormente conduziu as variáveis para os níveis de aquecimento prévio à 70 °C (temperatura da manta que aquece o tubo com Xad-2) por 20 minutos, temperatura de extração de 50 °C e tempo de extração de 60 minutos.

4.4.3 Relevância dos planejamentos experimentais

Os cálculos e todas as análises referentes aos planejamentos

experimentais são bastante extensos, principalmente no que concerne aos algoritmos e códigos para o programa de análise. Alguns dos métodos estatísticos, como Lenth (LENTH, 1989), não são facilmente encontrados em outros programas, principalmente os de código aberto e gratuitos. A possibilidade de se realizar cálculos diferenciados, além dos que são encontrados nos programas tradicionais com algoritmos padrão, tornaram o uso do software R uma ferramenta de grande valor na tomada de decisões experimentais desse trabalho. Como será observado no decorrer da discussão, os compostos foram avaliados concomitantemente, em diferentes concentrações, e em sua maioria eles são produzidos no caldo fermentativo a partir de reações envolvendo vias metabólicas e reações secundárias. Nas primeiras horas da fermentação, a concentração dos álcoois ficou abaixo do limite de detecção; sem os resultados dos planejamentos teria sido praticamente impossível combinar, ao acaso, os níveis dos fatores pH, tempo de extração e temperatura de extração para que pudessem ser observados resultados com menos efeito de matriz e menor variabilidade, principalmente para o caso do caldo fermentativo por SPME. Portanto, todos os planejamentos experimentais são considerados como parte do resultado final, tendo extrema influência sobre o mesmo.

Embora toda a metodologia usada na realização dos planejamentos tenha sido resumida em poucas páginas, podem ser encontradas em vários livros e inúmeros artigos; alguns foram citados nas referências desse trabalho.

4.5 AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS EXTRAÍDOS DO CALDO FERMENTATIVO POR SPME E POR CARTUCHOS DE XAD-2 (SPE)

Na sequência, são discutidos todos os procedimentos empregados para avaliar os compostos orgânicos voláteis, tanto os atribuídos direta e indiretamente à presença do fungo (MVOC) como os atribuídos a processos degradativos (hidrólise por exemplo) que ocorrem concomitantemente ao processo fermentativo (VOC).

4.5.1 Frações dos meios de cultura (mf1, mf2 e mf3)

As três frações do meio de cultura (mf1, mf2 e mf3) foram analisadas em GC-FID e GC-MS com o propósito de identificar os

compostos orgânicos (VOC) pertencentes somente ao meio de cultura, tanto antes, quanto depois da fermentação, pois, como poderá ser observado adiante, a quantidade e a natureza dos compostos não são as mesmas depois da autoclavagem e do tempo transcorrido para a fermentação. O processo de autoclavagem e o tempo de fermentação promovem a degradação e a recombinação dos compostos do meio de cultura, sob ação das moléculas restantes ou do equilíbrio químico característico. Foram observados os totais de 18 a 23 compostos pertencentes ao meio de cultura quando somados todos os compostos encontrados nas três frações (mf1, mf2 e mf3), para cada fermentação individualmente. A tabela 10 sintetiza os resultados para estas frações e as respectivas fermentações, mostrando os percentuais de coincidência frente a fermentação com maior número de compostos na soma das frações (mf1, mf2 e mf3), que foi identificada como sendo a segunda fermentação (Ferm. 02).

Tabela 10: Número de compostos do meio de cultura para as somas das frações (mf1, mf2 e mf3) e percentuais de coincidência frente a fermentação com maior número de compostos na soma das frações (Ferm. 02).

| Observações | Ferm. 01 | Ferm. 02 | Ferm. 03 |
|--|----------|----------|----------|
| Total de compostos encontrados | 21 | 23 | 18 |
| Compostos coincidentes | 19 | 23 | 18 |
| Percentual de coincidência (%) ^{a)} | 82,6 | 100 | 78,3 |

a) proporção em relação a referência (23 = 100%)

Os compostos coincidentes encontrados nas três frações, que representam a soma de todos os compostos encontrados nas frações mf1, mf2 e mf3, foram identificados como sendo: hexano, acetato de etila, 3-metil-butanal, pentanal, tolueno, pentanol, hexanal, 2-heptanona, octanal, D-limoneno, 2-etil-hexanol, octanol, heptanoato de etila, nonanal, naftaleno, caprilato de etila, decanal, undecanal, 2-undecenal, caprolato de etila, dodecanal, benzoato de isoamila, dodecanol. A identificação foi realizada por comparação dos espectros, obtidos experimentalmente, com dois banco de dados, NIST (atualizado em 2014), para uma faixa de probabilidade de coincidência de 91-98% e SDBS (URL <http://sdb.sdb.aist.go.jp>). Alguns compostos coincidem

com os estudados por Ghiasvand *et al.* (2007) para o arroz, usando SPME e um espectrômetro de massas com analisador por tempo de voo, ou seja, um analisador de massas diferente do utilizado nesse trabalho, com espectros próprios para aquele. Além dos 23 compostos regulares citados acima, foram encontrados alguns hidrocarbonetos alifáticos, semelhantes aos encontrados por Ghiasvand *et al.* (2007), porém, sua concentração é pequena e não aparecem em todas as amostras. Embora todos os compostos das somas das frações sejam importantes na comparação e identificação dos MVOC, o objetivo central foi apenas de identificá-los, marcá-los e subtraí-los dos cromatogramas das amostras como um branco. Nenhum tipo de inferência estatística foi aplicada aos 23 compostos encontrados, apenas estudos por gráficos e cálculos de percentuais para verificar suas distribuições em cada fração.

4.5.2 Avaliação dos compostos voláteis microbianos no caldo fermentativo

Todos os procedimentos discutidos nos itens seguintes são baseados na extração do caldo fermentativo; a avaliação qualitativa foi a mesma empregada para as amostras dos gases de exaustão, por se tratar dos mesmos álcoois identificados.

4.5.3 Avaliação qualitativa dos compostos MVOC

Quando analisadas, as amostras do caldo fermentativo apresentam um total de 42 compostos, incluindo os 23 compostos do meio de cultura, comentados acima. Entre os quarenta e dois compostos totais, encontram-se dezessete (17) compostos que não pertencem ao meio de cultura, nem modificado pela autoclavagem, nem degradados (ou formados) durante o período da fermentação. Esses compostos estão relacionados direta ou indiretamente com a presença do microrganismo (*Monascus ruber*), seja pela presença de enzimas, mudanças no equilíbrio químico (por aumento do pH) ou reações entre produtos secundários. A distribuição desses compostos ao longo dos diferentes períodos de fermentação não é exatamente a mesma, devido ao fato de se tratar de um estudo cujos analitos são produzidos por consequência da estrutura bioquímica *in vivo* e de sua influência extracelular, sendo essa bastante complexa. No entanto, foi possível observar uma

distribuição regular de alguns compostos, formando padrões distintos dos compostos dos meios de cultura. A tabela 11 traz os nomes dos dezessete compostos (MVOC) relacionados com a presença do fungo *Monascus ruber* e suas proporções em relação a cada uma das três fermentações estudadas, considerando a soma total das áreas dos picos referentes a cada composto, durante o tempo total da fermentação (total acumulado). Também são mostrados os valores de probabilidade de coincidência entre os espectros experimentais e os da base de dados (NIST), assim como os números dos compostos de referência utilizados na comparação (CAS). O código refere-se à sequência crescente de tempo de retenção para os compostos e será usado para facilitar a discussão.

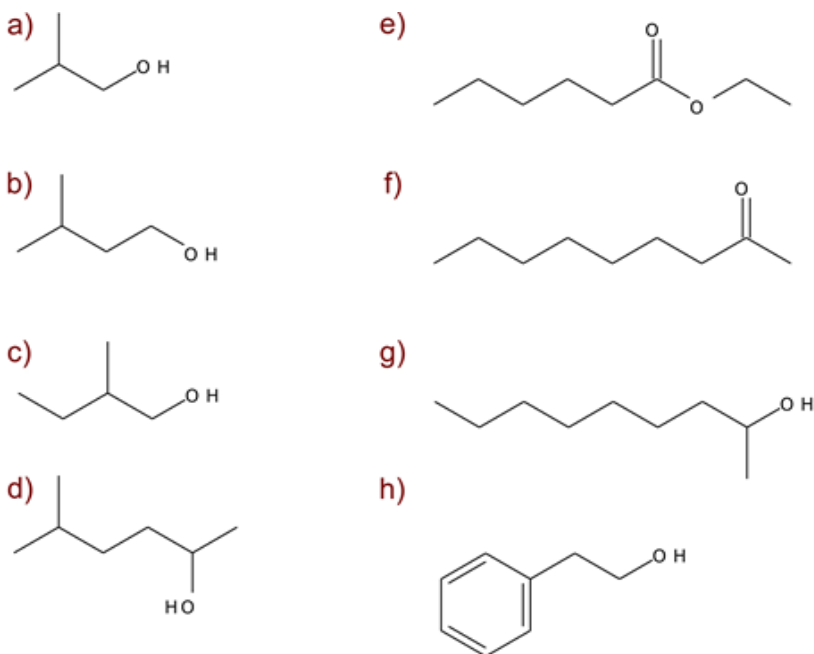
Tabela 11: Nomes, nº no CAS (% de coincidência), código e total acumulado (%) dos MVOC encontrados nas três fermentações por fungo *Monascus ruber* em biorreator.

| Composto | CAS (% coincidência) | Código | Ferm. 01 | Ferm. 02 | Ferm. 03 |
|---------------------------|----------------------|--------|--------------|--------------|-------------|
| Etanol | 64-17-5 (98) | c2 | 58.88 | 40.41 | 46.09 |
| 2-Metil-propanol | 78-83-1 (97) | c5 | 7.38 | 3.37 | 3.83 |
| 3-Metil-butanol | 123-51-3 (96) | c8 | 8.27 | 7.11 | 6.74 |
| 2-Metil-butanol | 137-32-6 (97) | c9 | 3.00 | 2.44 | 3.26 |
| 5-Metil-2-hexanol | 111768-09-3 (96) | c14 | 3.99 | 5.02 | 2.80 |
| Etil caproato | 123-66-0 (96) | c15 | 1.61 | 0.88 | 0.93 |
| 2-Nonanona | 821-55-6 (96) | c20 | 0.89 | 10.92 | 14.85 |
| 2-Nonanol | 628-99-9 (96) | c22 | 5.24 | 13.87 | 8.37 |
| 2-fenil-etanol | 60-12-8 (98) | c24 | 8.80 | 13.19 | 11.97 |
| Butanodioato de dietila | 123-25-1 (96) | c25 | 0.69 | 0.17 | 0.23 |
| Laurato de etila | 106-33-2 (95) | c36 | 0.08 | 0.24 | 0.11 |
| 9-tetradecenoato de etila | 24880-50-0 (93) | c37 | 0.05 | 0.07 | 0.03 |
| Miristato de etila | 124-06-1 (96) | c38 | 0.41 | 0.77 | 0.24 |

| | | | | | |
|--------------------------|-----------------|-----|------|------|------|
| 9-hexadecenoato de etila | 54546-22-4 (93) | c39 | 0.08 | 0.11 | 0.03 |
| Palmitato de etila | 628-97-7 (94) | c40 | 0.14 | 0.14 | 0.06 |
| Oleato de etila | 111-62-6 (95) | c41 | 0.09 | 0.15 | 0.08 |
| Estearado de etila | 111-61-5 (96) | c42 | 0.40 | 1.14 | 0.37 |

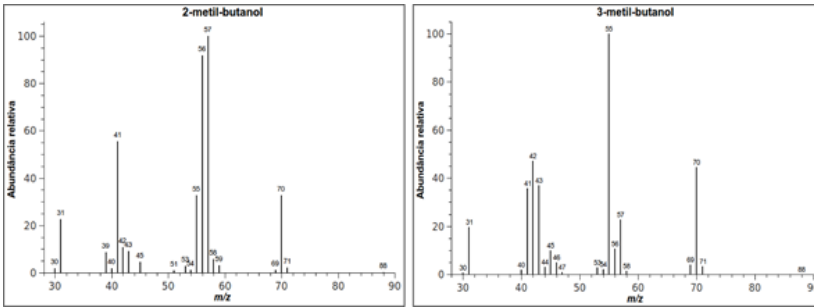
Na figura 24 são apresentadas as estruturas dos compostos MVOC (com percentual acumulado maior que 2%), encontrados nas amostras do caldo fermentativo, na fase de espaço confinado, utilizando a técnica de SPME e análise por GC-MS.

Figura 24: Estruturas dos compostos MVOC com percentual acumulado maior que 2%, encontrados nas amostras do caldo fermentativo; códigos: a) c5; b) c8; c) c9; d) c14; e) c15; f) c20; g) c22; h) c24.



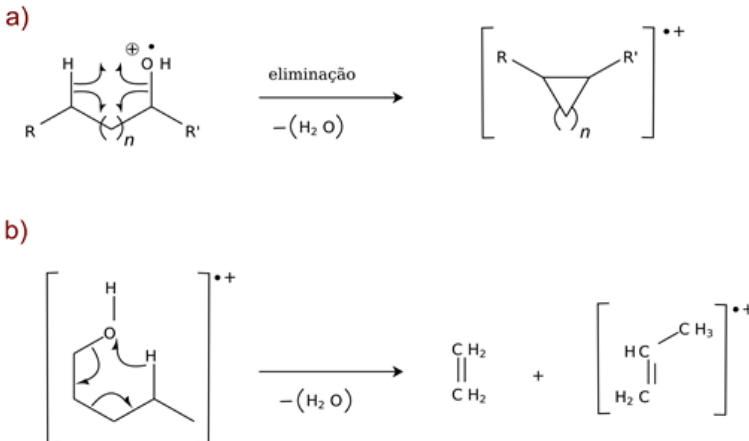
Sabe-se que a intensidade dos íons moleculares dos álcoois alifáticos é, no geral, bastante baixa, quando não ausente. Tomando como exemplo os isômeros do álcool pentanol, que são o 3-metil-butanol (c8), 2-metil-butanol (c9), cujas massas são $88,15 \text{ g mol}^{-1}$, pode-se observar distintas diferenças entre os fragmentos nos espectros desses, como é mostrado na figura 25.

Figura 25: Espectros de massas dos isômeros 2-metil-butanol (c9), 3-metil-butanol (c8), obtidos a partir da análise dos cromatogramas de íons totais para as amostras do caldo fermentativo e extração por Xad-2 dos gases de exaustão do biorreator, durante a produção de pigmentos



Segundo Pavia *et al.* (2010) dois tipos de fragmentações são característicos para os isômeros do pentanol, a desidratação (ou eliminação) e a perda de etileno. Os dois tipos de fragmentação citados por Pavia *et al.* (2010), são demonstrados na figura 26 para um caso geral.

Figura 26: Mecanismos característicos da fragmentação dos isômeros do composto pentanol, para um caso geral; a) desidratação; b) perda de etileno.



Os dois mecanismos citados explicam a presença dos fragmentos em m/z 70 (desidratação) e m/z 42 (perda de etileno) para o 3-metil-butanol (c8), o fragmento intenso em m/z 55 é proveniente da desidratação seguida de perda do radical metila ($\bullet\text{CH}_3$) formando o íon C_4H_7^+ , também característico. Para o isômero 2-metil-butanol (c9), o mecanismo de desidratação explica o fragmento em m/z 70, a desidratação seguida de perda do radical etila ($\bullet\text{CH}_2\text{CH}_3$) explica o fragmento em m/z 41 (íon C_3H_5^+) e o fragmento em m/z 57 é proveniente da quebra em carbono alfa ao átomo de oxigênio, restando o íon butila (C_4H_9^+) sem o heteroátomo.

A avaliação dos espectros para todos os demais compostos MVOC seguiu a mesma lógica de estudo das fragmentações de acordo com seus respectivos homólogos e os mecanismos de fragmentação mais típicos. Também foram muito úteis no estudo os bancos de dados NIST (webBook: <http://webbook.nist.gov/chemistry>).

4.5.4 Avaliação dos percentuais dos compostos MVOC

Como se pode observar, na tabela 11 o percentual acumulado é muito variado, existem valores que não chegam a 1%; ainda assim, são valores mensuráveis que se encontram muito acima do limite de quantificação ($\ll 0,1\%$). Para ilustrar com maior clareza a significância dos compostos de maior percentual acumulado, são mostrados abaixo três gráficos de setores (figura 27) com os valores de percentuais atingidos pelos mesmos; foram levados em consideração os valores acima de 2% do acumulado, por se tratar dos valores mais representativos. Os gráficos são baseados nos valores das áreas integradas nos cromatogramas das amostras do caldo fermentativo; eles representam todo o acumulado durante os períodos da fermentação (5, 8 e 10 dias). São gráficos muito úteis para representar a resposta obtida utilizando SPME com GC-MS, pois se torna contraproduativo mostrar 46 cromatogramas onde o etanol representa a maior proporção entre as áreas, e cada cromatograma possui aproximadamente 42 picos integrados. Na figura 28 é mostrado um cromatograma de íons totais para exemplificar o tipo de resposta obtida em uma das amostras do caldo fermentativo por utilização de SPME (ver código na tabela 11).

Figura 27: Gráficos de setores com os valores de percentuais acumulados durante os períodos das fermentações (5, 8 e 10 dias).

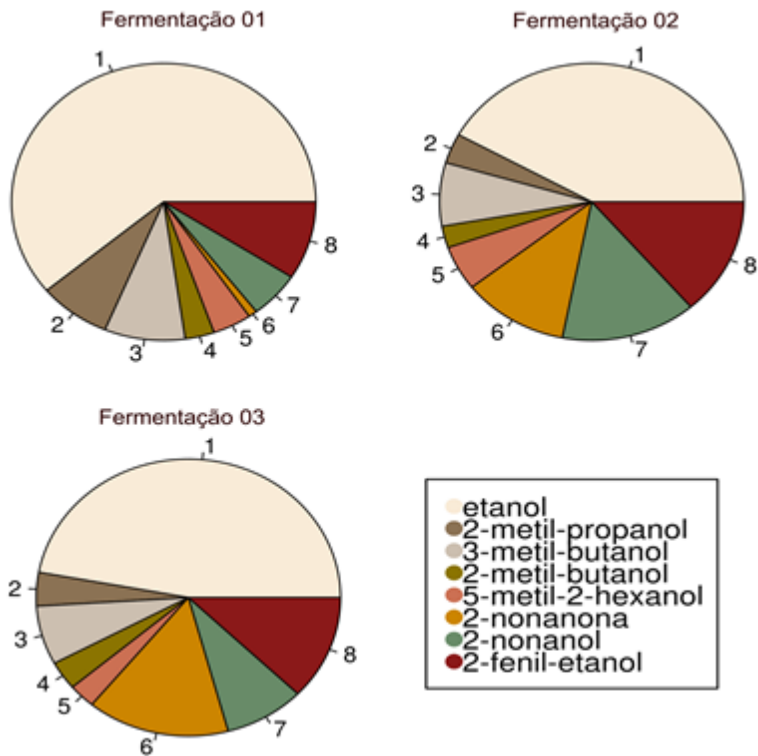
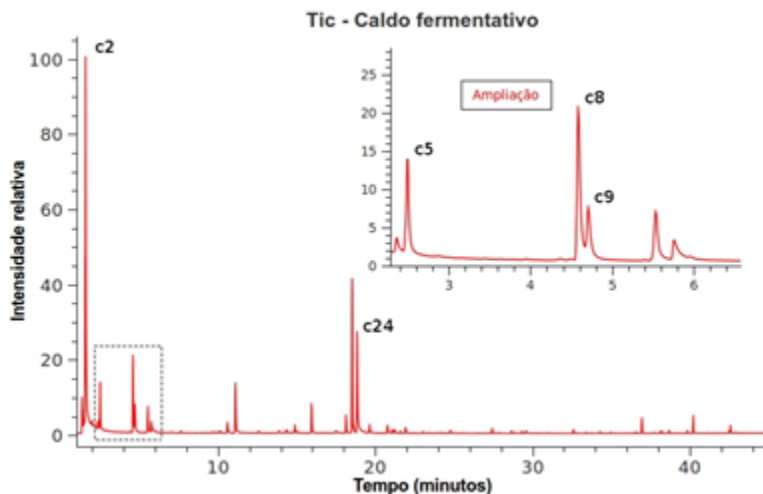
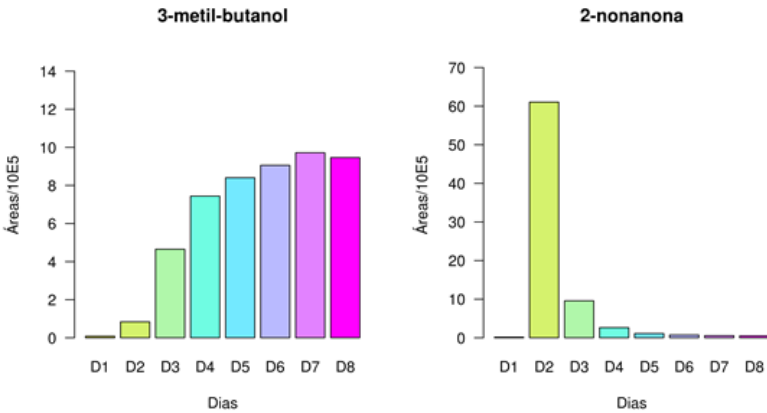


Figura 28: Cromatograma de íons totais para exemplificar o tipo de resposta obtida em amostras do caldo fermentativo, por utilização de SPME em espaço confinado.



Através da tabela e dos gráficos de setor é possível observar que os valores de percentual acumulado para o etanol (c2), 2-metil-propanol (c5) e 3-metil-butanol (c8) são maiores na primeira fermentação pois se trata da fermentação de cinco dias; o acúmulo desses compostos são maiores em relação aos compostos que são produzidos mais lentamente, como o 2-fenil-etanol (c24), cujos valores máximos aparecem após quatro dias de fermentação. Naturalmente, os compostos que apresentam maior percentual acumulado são aqueles que persistem em equilíbrio no líquido fermentativo por mais tempo e, precisamente por isso, é possível distinguir duas classes naturais de compostos, os que produzem acúmulos e os que se formam e se dissipam rapidamente. Para exemplificar as duas diferentes classes, são mostrados, na figura 29, dois gráficos de barras com todos os pontos referentes ao período de fermentação (em dias) para os compostos 3-metil-butanol (c8) e 2-nonanona (c20).

Figura 29: Gráficos de barras com os valores de áreas integradas dos picos para os compostos 3-metil-butanol (c8) e 2-nonanona (c20), dadas por dia de fermentação, para a fermentação de 8 dias.



A construção dos gráficos teve como base os dados da segunda fermentação, no entanto o mesmo perfil é observado nas demais. Com exceção dos compostos etanol (c2), 2-metil-propanol (c5), 3-metil-butanol (c8), 2-metil-butanol (c9) e 2-fenil-etanol (c24), todos os outros que são relacionados com a presença do fungo apresentam perfil de formação e dissipação rápida, permanecendo de 2 a 3 dias nos seus valores mais altos, diminuindo exponencialmente em seguida.

4.5.5 Estudo por modelagem não-paramétrica dos MVOC mais regulares

Os compostos que formaram acúmulos ao longo da fermentação foram: etanol (c2), 2-metil-propanol (c5), 3-metil-butanol (c8), 2-metil-butanol (c9) e 2-fenil-etanol (c24); esses são os compostos estudados e otimizados através dos planejamentos. Para o caso desses compostos, devido a sua distribuição regular durante a fermentação, é possível criar modelos ou sintetizar as informações do conjunto de amostras através do estudo de regressão, que pode fornecer parâmetros importantes, como o erro experimental, a variância em torno dos valores estimados, além dos estudos sobre os resíduos gerados pelas diferenças entre

valores reais e valores ajustados. O uso de um modelo simplifica todas as variações que ocorrem durante o processo fermentativo, sendo possível, ainda, efetuar previsões para futuros experimentos ou repetições dos mesmos.

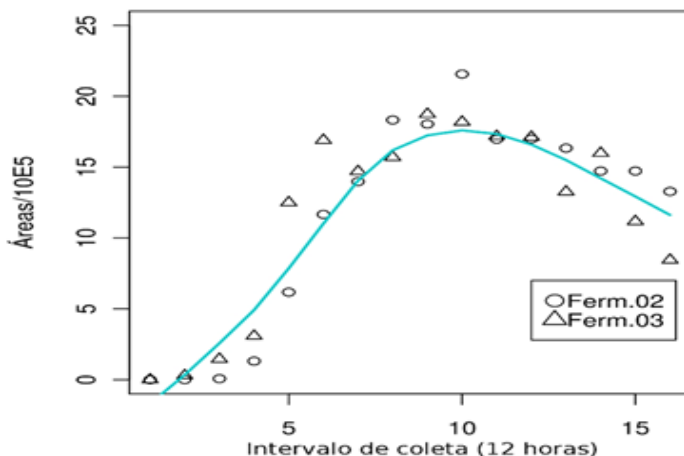
Poucos trabalhos trazem informações detalhadas sobre esses compostos, no sentido de produção microbiológica, um trabalho que pode ser citado é o de Nozzi *et al.* (2014), que explora a via metabólica dos álcoois, visando melhorar sua produção. Dos álcoois explorados por Nozzi *et al.* (2014), quatro deles coincidem com os encontrados e estudados no presente trabalho com o fungo *Monascus ruber*; a via de síntese pode envolver duas enzimas, cetoácido descarboxilase e álcool desidrogenase atuando em metabólitos relacionados com a glicose. No caso de Nozzi *et al.* (2014) o estudo foi realizado com base em microrganismos e meios de cultura propícios para formação de álcoois; no caso desse trabalho com o fungo *Monascus ruber*, os álcoois são produzidos devido a características naturais, em um meio com baixas quantidades de nutrientes, para induzir a produção de pigmento e não a produção de álcoois.

Visto que o potencial dos compostos 2-metil-propanol (c5), 3-metil-butanol (c8), 2-metil-butanol (c9) e 2-fenil-etanol (c24) é promissor para o estudo das relações de sinergismo e antagonismo (fazem parte de uma via metabólica), além de ser possível estudá-los por regressão, foi dada maior ênfase a esses, juntamente com o etanol (c2), que compreende o maior percentual entre os MVOC.

Conforme os percentuais acumulados, dados na tabela 11, pode-se observar que as diferenças entre as fermentações Ferm. 01 e Ferm. 02, para os compostos etanol, 2-metil-propanol (c5), 3-metil-butanol (c8), 2-metil-butanol (c9) e 2-fenil-etanol (c24), são menores do que as diferenças entre Ferm. 02 e Ferm. 03, isso acontece porque a produção de etanol e álcoois superiores decresce consideravelmente durante o estágio de morte celular, o que ocorre após oito dias. O decaimento da quantidade de álcool devido a morte celular pode ser observado na figura 29, para o álcool 3-metil-butanol (c8), a barra correspondente ao oitavo dia (D8) é menor do que a barra correspondente ao sétimo dia (D7), ou seja, a partir de oito dias a morte celular aumenta, e a quantidade dos principais álcoois diminui consideravelmente, chegando a níveis muito baixos em dez dias, o que é completamente perceptível na fermentação de dez dias (Ferm. 03).

Levado em consideração que, após o período de morte celular, os principais álcoois deixam de ser produzidos, pois são necessárias células vivas e viáveis para produzi-los, foram considerados apenas os oito dias da fermentação “Ferm. 03” para comparações com os oito dias da fermentação “Ferm. 02”. Para avaliar todos os valores obtidos durante os oito dias da fermentação Ferm. 02 e os oito dias da Ferm. 03, retirando os dois últimos dias dessa última por apresentar morte celular elevada, foi realizado um estudo de regressão dos valores, que, nesse caso, foram valores de áreas dos picos integrados diretamente a partir dos cromatogramas de íons totais (TIC); para facilitar a representação gráfica, as áreas foram divididas por cem mil (10^5). O modelo de regressão adotado foi o *loess* (Local Polynomial Regression Fitting); por apresentar maior adequação aos dados experimentais, o mesmo tipo de modelo foi aplicado aos cinco principais álcoois mencionados anteriormente, individualmente. As curvas resultantes da regressão *loess* têm o mesmo perfil, para os cinco álcoois, portanto, apenas um exemplo foi apresentado (figura 30) com maiores detalhes para o álcool 2-metil-butanol (c9). Essas curvas descrevem o perfil mais aproximado do natural, levando em consideração todos os dados de áreas, obtidos com os dezesseis pontos (192 horas; coletas a cada 12 horas), correspondentes aos períodos de 8 dias estudados para as duas últimas fermentações.

Figura 30: Curva resultante da regressão loess para o álcool 2-metil-butanol, usada como exemplo do algoritmo aplicado para os cinco MVOC mais relevantes.



A curva dada como exemplo é proveniente de regressão polinomial local entre dois pares de dados, os pontos de “Ferm. 02” e “Ferm. 03”, retirados a cada doze horas, durante oito dias (192 horas). A regressão *loess* forneceu um valor de R^2 de 0,945 (94,5%), e um erro padrão de regressão de 1,929 (intervalo de confiança: $\pm 3,858$), para o composto 2-metil-butanol (c9); esse resultado foi suficiente para estimar, com segurança, um valor de máximo entre as duas fermentações (Ferm. 02 e Ferm. 03), o que não seria possível fazendo a média dos dois valores de área máxima (picos) observados experimentalmente em cada fermentação. Todos os testes para homoscedasticidade e normalidade para resíduos foram realizados da mesma forma que para os modelos do planejamento experimental.

O modelo não-paramétrico foi escolhido por apresentar maior flexibilidade na obtenção de uma regressão que conseguiu resumir as relações entre as áreas dos picos de cada composto e o tempo de fermentação. Observando o gráfico de dispersão que contém a curva de regressão que representa a aplicação da função para o modelo *loess*, é possível verificar que a utilização de um modelo paramétrico mais tradicional como uma reta, ou mesmo um modelo baseado em uma

função exponencial, não teriam um ajuste que englobasse todos dos dados. Não foram encontrados na literatura modelos do tipo *loess* para os álcoois estudados nesse trabalho, porém existem modelos do tipo exponencial que apresentam resultados satisfatórios, dependendo da pesquisa e dos resultados que se espera com a aplicação dos modelos (MU; WANG; YU, 2006). Aqui foi apresentada uma alternativa que pode ser viável para outros pesquisadores com interesse na modelagem, principalmente com séries temporais, envolvendo medidas analíticas.

O uso de um modelo de regressão no qual os dados são ponderados localmente foi crucial para resolver um problema bastante trivial, que é a dispersão dos resultados. Embora as duas fermentações que estão sendo utilizadas tenham o mesmo perfil quanto à distribuição dos compostos pelo tempo de fermentação, o período exato em que o valor máximo se encontra não pode ser encontrado com precisão, pois a coleta é realizada a cada doze horas, portanto, o valor máximo observado para as fermentações Ferm. 02 e Ferm. 03 não se encontra no mesmo período. De posse das estimativas do modelo *loess* foi possível estimar onde se encontra o valor máximo para as duas fermentações concomitantemente, para isso foi utilizada a função de predição (*predict*), que é capaz de obter o valor máximo da curva de regressão sem a necessidade de ajuste manual dos dados ou interpolação usando a equação de regressão, como é de praxe. Os valores máximos estimados foram utilizados para a quantificação e serão discutidos mais adiante. Todos os códigos utilizados no software *R* são dados no apêndice, incluindo todos os parâmetros escolhidos para a aplicação da regressão.

4.5.6 Resultados dos testes de recuperação para os álcoois extraídos do caldo fermentativo e dos gases de exaustão

Os testes de recuperação para os álcoois extraídos do caldo fermentativo e dos gases de exaustão mostram valores bastante satisfatórios para as recuperações. Quando realizados os cálculos de média global para as médias das três concentrações empregadas, foram obtidos os valores de 88,4% para a média dos cinco álcoois do caldo fermentativo e 70,8% para a média dos quatro álcoois das coletas dos gases de exaustão, com coeficientes de variação (C.V.) de 11,6 e 18,2 respectivamente. A maior variação para a recuperação dos gases de exaustão já era esperada, em função do tipo de preparo necessário para a

extração via resina. Todos os resultados para as médias e coeficientes de variação (C.V.) individuais podem ser observados nas tabelas 16 e 17, nos apêndices F e G.

4.6 OBTENÇÃO DOS VALORES MÁXIMOS QUANTITATIVOS PARA OS CINCO MVOC ESTUDADOS NO CALDO FERMENTATIVO.

Através do uso de padrões dos álcoois etanol, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol, 2-metil-butanol e 2-fenil-etanol, foi possível obter as curvas de calibração em solução aquosa, com objetivo de quantificar os valores máximos estimados para as duas fermentações (Ferm. 02 e Ferm. 03) em conjunto. No caso das amostras do caldo fermentativo, foi possível obter esses valores porque foram obtidos modelos que possibilitam a verificação dos pontos máximos usando uma função de previsão para a curva de regressão obtida. Os detalhes paramétricos obtidos com os modelos das curvas de calibração (regressão linear) e os valores de limite de detecção e quantificação são dados na tabela 12.

Tabela 12: Faixa de concentração, coeficiente de determinação (R^2), limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para os álcoois estudados.

| Composto | Faixa de conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) | R^2 | LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$) | LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) |
|------------------|--|--------|---------------------------------|---------------------------------|
| Etanol | 20 - 400 | 0,9988 | 0,530 | 1,644 |
| 2-Metil-propanol | 1 - 25 | 0,9983 | 0,130 | 0,403 |
| 3-Metil-butanol | 1 - 25 | 0,9981 | 0,058 | 0,178 |
| 2-Metil-butanol | 0,5 - 10 | 0,9982 | 0,055 | 0,170 |
| 2-fenil-etanol | 0,5 - 10 | 0,9994 | 0,010 | 0,032 |

De posse das curvas de calibração para os referidos álcoois, foi possível obter os valores referentes aos máximos (em massa), estimados com os modelos *loess* para as duas fermentações (Ferm. 02 e Ferm. 03),

por interpolação usando os modelos para os padrões (retas), como é de praxe. O fato de ter sido usado um valor estimado de área para as duas fermentações conjuntas (com uso da *loess*) produziu um resultado mais realístico do que se fossem considerados os valores experimentais diretamente nas curvas de calibração, o que nesse caso não seria possível devido a não coincidência do período dos máximos experimentais, que possuem diferenças entre doze horas. Este resultado pode ser generalizado para futuras fermentações usando as mesmas metodologias empregadas aqui, porque o perfil das curvas de regressão *loess* devem ser aproximadamente os mesmos.

Os resultados quantitativos encontram-se resumidos na tabela 13, onde são dados os resultados de massa (μg), concentração do composto no caldo fermentativo (mg L^{-1}), massa do composto por grama de biomassa seca e coeficiente de correlação de Pearson entre as quantidades do composto e a biomassa, para cada ponto do caldo fermentativo das duas fermentações.

Tabela 13: Resultados quantitativos para os álcoois; massa, concentração dos compostos, massa do composto por grama de biomassa seca e coeficiente de correlação de Pearson entre as quantidades do composto e a biomassa.

| Composto | Massa (μg) | Conc. (mg L^{-1}) | Comp/bio (mg g^{-1}) | r-Pearson |
|------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------------|-----------|
| Etanol | 1225,50 | 313,87 | 88,77 | 0,82867 |
| 2-Metil-propanol | 22,06 | 5,51 | 1,71 | 0,84871 |
| 3-Metil-butanol | 9,47 | 2,37 | 0,69 | 0,94184 |
| 2-Metil-butanol | 3,80 | 0,95 | 0,27 | 0,92765 |
| 2-fenil-etanol | 2,79 | 0,70 | 0,22 | 0,84756 |

Os valores dos coeficientes de correlação de Pearson foram submetidos ao teste t (Student); todos mostram valores significativos para um nível de significância de 95%, sendo assim, é possível aceitar que existe uma correlação positiva entre a quantidade produzida dos cinco compostos estudados com a produção de biomassa. Portanto, um aumento na produção de células ocasiona um aumento nas quantidades dos compostos que produzem acúmulos, como o etanol, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol, 2-metil-butanol e 2-fenil-etanol. Pode-se

observar na tabela que os valores de correlação, em sua maioria, estão acima de 0,8; esse valor sugere que a correlação é forte e o teste de hipóteses para estes coeficientes confirma que existem relações positivas para todos.

Os compostos que não produzem acúmulos, como a 2-nonanona, não possuem relação direta com a biomassa; apesar de serem relacionados com a presença do fungo, não é possível avaliar estatisticamente esta correlação de maneira simples. Observando os valores de tempo para alcançar o valor máximo, dados na tabela 13, pode-se concluir que todos os máximos dos compostos se encontram próximos a 5 dias (120 horas), o que coincide com os valores máximos encontrados para a biomassa, que se encontram entre 5 e 6 dias. Esta diferença de um dia é pouco perceptível quando se utiliza um método de mediada de biomassa por gravimetria, embora a balança seja analítica e as amostras tenham sido coletadas com toda a homogeneidade possível.

Em termos de produção de álcoois, quando são utilizados os meios de culturas adequados e os fungos produtores de etanol, quantidades significativas podem ser atingidas, como as relatadas por Nair *et al.* (2015), que observou uma produção de etanol de 10.1 g L^{-1} com rendimento de 135 mg g^{-1} de biomassa seca. Os resultados para os fungos com adaptabilidade aos meios produtores de etanol são maiores do que o apresentado para o fungo *Monascus ruber*; nesse trabalho (ver tabela 13). No entanto, estudos com SPME em espaço confinado poderiam ser utilizados para melhorar a produção dos álcoois através da otimização e adaptação de outras condições de cultivo.

Estudos por SPME realizados por Mejías *et al.* (2002), mostraram que a repetibilidade para os álcoois 2-metil-propanol e 3-metil-butanol fornece os valores de coeficiente de variação de 12,15 e 9,37%, respectivamente. Marín *et al.* (2002) encontrou valores de coeficiente de variação de 11,9, 8,4, 10,2 e 13,7% para os álcoois 2-metil-propanol, 2-metil-butanol, 3-metil-butanol e 2-fenil-etanol (respectivamente) quando utilizado SPME. Ambos estudos foram realizados com amostras de vinagre e com fibras de Car-PDMS (Carboxen e polidimetil siloxano). No presente trabalho, os valores de coeficiente de variação para os álcoois etanol, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol, 2-metil-butanol e 2-fenil-etanol são: 5,7, 9,0, 7,1, 9,7 e 12,5 (respectivamente). Pode-se afirmar que os valores encontrados aqui estão próximos aos valores das duas referências citadas e demonstram a

mesma repetibilidade; isso confere com os valores que são normalmente esperados para a extração por SPME de padrões que estão entre 5 a 15% de coeficiente de variação para estes álcoois.

4.7 OBTENÇÃO DOS VALORES QUANTITATIVOS PARA OS QUATRO MVOC ESTUDADOS POR COLETA COM CARTUCHOS DE XAD-2

A quantificação dos máximos valores para os compostos adsorvidos em Xad-2, seguida por extração com SPME, foi realizada através das mesmas soluções dos padrões aquosos que foram utilizadas para os extratos do caldo fermentativo, com exceção do etanol. A quantidade de etanol adsorvida em Xad-2 excede a que está presente nas amostras dos caldos fermentativos, indicando que ocorre um acúmulo de etanol durante as 24 horas de exposição, quando comparadas as médias dos valores máximos. No entanto, o acúmulo de etanol é pequeno, representando apenas 21,2% a mais do valor da média nos pontos máximos. Para o entendimento desse resultado, deve ser levado em consideração que a vazão de escoamento do fluido gasoso (ar + compostos) não é ajustada para obtenção de uma maior concentração dos compostos mais voláteis em Xad-2, o que implicaria em uma vazão menor do que a utilizada; a vazão empregada é consequência da necessidade de aeração do meio de cultura, para garantir a sobrevivência do microrganismo. O fungo utilizado é um organismo aeróbio, não aquático, diferente das microalgas, no entanto, devido a heranças oriundas de seus ancestrais aquáticos, essa espécie possui uma boa adaptabilidade no meio de cultura submerso, porém a aeração deve ser adequada às necessidades básicas das células, o que foi estudado anteriormente por Moritz (2005) e Vendruscollo (2009). Segundo Vendruscollo esse microrganismo pode sobreviver em meio anaeróbio, no qual não haverá produção de pigmento, o que entra em conflito com o objetivo desse trabalho, que é verificar os compostos MVOC oriundos do processo de produção de pigmento. A baixa aeração também pode favorecer o aumento na produção de álcoois, que seriam eliminados das células para o meio, não sendo utilizados novamente para a produção de energia mas favorecendo o acúmulo no meio exterior.

Para os demais compostos não foram encontradas diferenças que possam sugerir acúmulos, nem mesmo a utilização de temperaturas

mais baixas poderiam favorecer a adsorção, sendo a vazão o principal responsável pelas perdas. Tudo isso foi constatado durante a preparação e realização dos experimentos para o planejamento experimental. Na tabela 14, encontram-se os valores quantitativos para os máximos, os coeficientes de variação dos máximos experimentais para as duas fermentações, as quantidades dos compostos pelo total de fluido que escoou no cartucho em 24 horas e os valores dos períodos necessários para atingir os máximos experimentais.

Tabela 14: Valores quantitativos máximos (massa em μg), coeficientes de variação dos máximos experimentais (C.V.), quantidades dos compostos pelo total de fluido que escoou pelo cartucho em 24 horas (M.V.H) e os valores dos períodos necessários para atingir os máximos experimentais (In. Máx).

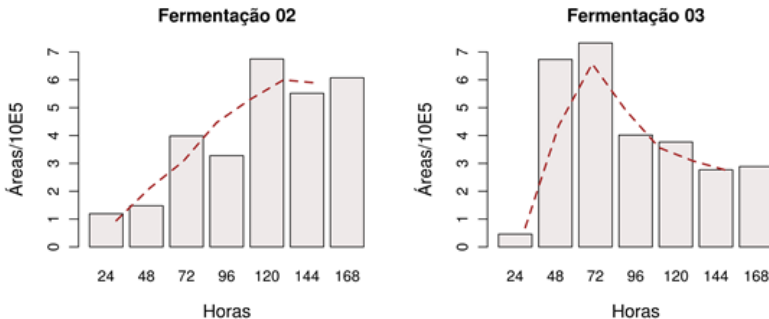
| Composto | Massa (μg) | C.V. | M.V.H ($\mu\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) | In. Máx (horas) |
|------------------|-------------------------|------|--|-----------------|
| Etanol | 1556,4 | 23,4 | 2,319 | 48 – 96 |
| 2-Metil-propanol | 36 | 5,8 | 0,053 | 72 – 120 |
| 3-Metil-butanol | 5,1 | 40,8 | 0,008 | 72 – 120 |
| 2-Metil-butanol | 2,7 | 4,3 | 0,004 | 72 – 120 |

Os valores quantitativos para os máximos foram obtidos através da média dos valores máximos encontrados experimentalmente para as duas fermentações, no caso do etanol, para a segunda fermentação o máximo ocorreu em 48 horas e para a terceira em 96 horas. Não foi possível aplicar um modelo não-paramétrico, como foi aplicado para as amostras diretas do caldo nos compostos extraídos com Xad-2. Mesmo quando os resultados para o planejamento experimental são satisfatórios, pode ocorrer diferenças na utilização da metodologia, que, nesse caso, ocorreram na parte de extração por Xad-2 durante o processo de produção de pigmento. Não foi possível prever as mudanças no fluido de escoamento porque cada cartucho recebeu $28,03 \pm 0,04$ litros de fluido, em média, durante as 24 horas de coleta. A cada doze horas, a vazão era verificada, para se obter uma média da vazão de escoamento, no entanto, pequenas variações de vazão podem ocorrer em períodos intermediários, contribuindo para as diferenças encontradas.

Todos os testes estatísticos para verificar a associação e

correlação entre os valores de cada composto, durante os oito dias de interesse das fermentações (Ferm. 02 e Ferm. 03), mostraram baixa associação. Como é possível observar na tabela 14, os valores de coeficiente de variação são significativamente elevados para o etanol e para o 3-metil-butanol; a ausência de um modelo, nesse caso, prejudica consideravelmente a verificação da precisão, pois não se tem um valor ajustado como referência para comparação de nenhum índice, e a quantidade de graus de liberdade para estimar a média é muito menor. Em contrapartida, os valores dos coeficientes de variação para os compostos 2-metil-propanol e 2-metil-butanol foram abaixo de 10%, o que seria comparativo em termos de valor de média, além disso o erro não demonstra ser sistemático e os períodos dos máximos são condizentes com os máximos valores de biomassa. Para ilustrar um exemplo dos valores divergentes entre cada coleta e entre as duas fermentações, é apresentado um gráfico de barras para o composto 2-metil-propanol (figura 31). É possível observar que o valor máximo para a fermentação Ferm. 02 está em 120 horas e para a fermentação Ferm. 03 está em 72 horas.

Figura 31: Gráfico de barras para o composto 2-metil-propanol (c5), com os valores obtidos para as coletas por Xad-2 para as fermentações Ferm. 02 e Ferm. 03.

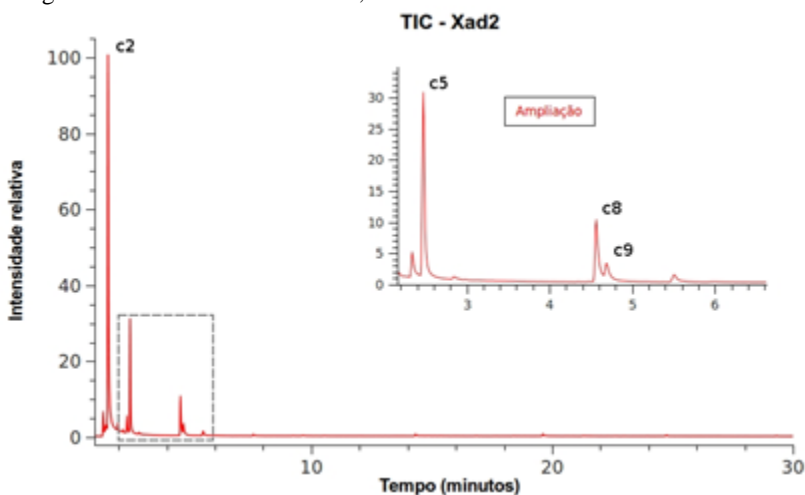


Os valores de quantidades dos compostos pelo total de fluido que escoou pelo cartucho em 24 horas são medidas de capacidade de adsorção (mg do composto) por volume total de fluido que passa pelo cartucho (em litros), de maneira contínua, estando o cartucho resfriado

todo o tempo. Diferentes temperaturas de resfriamento foram testadas, a diminuição da temperatura não influencia na taxa de acúmulo do composto por hora, mas sim na permanência do composto já adsorvido, mantendo o composto em equilíbrio entre as duas fases (adsorvente - fluido escoado). Adsorções em resinas como Tenax são muito comuns em coletas de ar ambiente, também aparecem em trabalhos com MVOC, porém a resina Tenax possui custo bem mais elevado do que a resina Xad-2, e existem poucas metodologias para gases de exaustão para que se possa comparar os resultados em termos de eficiência com Xad-2 (RAEPPPEL; APPENZELLER; MILLET, 2015).

Para ilustrar a diferença em termos de resposta obtida com as amostras dos gases de exaustão e as do caldo fermentativo, é mostrado na figura 32 um cromatograma de íons totais para uma amostra proveniente da extração com Xad-2 (ver código na tabela 11).

Figura 32: Cromatograma de íons totais tomado como exemplo de uma amostra dos gases de exaustão do biorreator, extraída com cartucho de Xad-2.



Pode-se observar na figura 31 que o número de compostos extraídos é menor do que para as amostras do caldo fermentativo, exemplificadas pelo cromatograma dado anteriormente.

Algumas considerações foram feitas quanto ao desempenho do Xad-2 para os MVOC estudados aqui, e o item a seguir trata das

comparações entre as técnicas empregadas.

4.8 COMPARAÇÕES ENTRE OS VALORES ENCONTRADOS PARA OS MVOC PRESENTES NA EXTRAÇÃO DIRETA DO CALDO FERMENTATIVO E NA EXTRAÇÃO POR XAD-2

A extração direta dos MVOC no caldo fermentativo, utilizando-se a técnica de SPME em espaço confinado, proporciona uma melhor representatividade em termos qualitativos, como foi visto anteriormente (tabela 11); são no total dezessete compostos MVOC, dos quais cinco deles podem ser associados positivamente com parte da cinética de fermentação, que, nesse caso, foi representada pela biomassa. Essa associação entre etanol e biomassa pode ser encontrada em alguns trabalhos, no entanto, nem sempre ela pode ser demonstrada, depende da precisão na qual a medida pode ser realizada e da otimização dos fatores para uma menor variabilidade. Já os demais álcoois, como o 2-metil-propanol, 2-metil-butanol, 3-metil-butanol e 2-fenil-etanol, são pouco estudados em termos de relação com a cinética de produção, devido às baixas concentrações que aparecem no fermentado, porém eles fazem parte das vias metabólicas e seu estudo constitui em uma fonte importante de informações a respeito do ambiente químico em que as células do microrganismo se encontram. Dentro deste contexto, pode ser considerado o exemplo do 2-fenil-etanol, que possui a menor solubilidade (16 g L^{-1} em água) entre os cinco álcoois selecionados para estudo quantitativo contra o 2-metil-propanol, que é completamente solúvel em água. O composto 2-fenil-etanol possui maior percentual acumulado em área integrada (tabela 11); em alguns pontos ao longo da fermentação a área integrada desse composto supera a do 2-metil-propanol, no entanto, sua influência real (quantidade) no ambiente aquoso é menor devido à baixa solubilidade que apresenta. Do contrário, o 2-metil-propanol possui influência maior em meio líquido, permanecendo por tempo maior em contato com as células, e em maior quantidade. De acordo com Bastian *et al.* (2011), o 2-metil-propanol é um forte candidato para complementar os biocombustíveis, sua produção biotecnológica atual está baseada na via aeróbica, no entanto, através de recombinação genética é possível modificar a produção deste álcool para uma via anaeróbia mais eficiente em produção, aumentando assim o interesse por esse. Foi relatado por Garavaglia (2006) e

referências que os álcoois 2-metil-propanol e 3-metil-butanol podem ser encontrados em concentração mais elevada quando um processo de aerobiose está envolvido, diferente do que acontece quando ocorrem efeitos que provocam anaerobiose, como a baixa oxigenação do meio submerso.

Nas primeiras vinte e quatro horas de fermentação, o meio de cultura produz pequena quantidade de espuma, o que prejudica sensivelmente a aeração no biorreator; após esse período, a viscosidade do meio diminui e a aeração torna-se eficiente. Esse período onde a espuma diminui também é quando se observa o aparecimento repentino do etanol e dos demais álcoois. Embora o aparecimento do etanol esteja também associado ao efeito Crabtree, onde alta concentração de açúcar inibe enzimas respiratórias, mesmo com suficiente oxigenação não se pode afirmar com certeza quais as causas do aparecimento do etanol apenas medindo sua quantidade. A verificação do aparecimento de álcoois superiores pode ser de extrema importância na elucidação de questões como essa, apresentada para o aparecimento do etanol. No entanto, como se pode observar nos resultados apresentados aqui, para as duas estratégias de avaliação as quantidades dos álcoois superiores são relativamente pequenas e necessitam de métodos com sensibilidade suficiente para promover sua detecção, seja qual for o equipamento de análise que se pretenda usar. Neste sentido, as duas formas de extração por SPME e Xad-2 demonstraram-se suficientemente efetivas para que fosse possível avaliar as quantidades da maioria dos álcoois superiores observados para essa fermentação, no entanto, algumas particularidades foram observadas e serão discutidas na sequência.

Para o caso dos compostos coletados com Xad-2, seguidos de extração por SPME, apenas oito compostos foram extraídos no total, quatro deles são o etanol, 2-metil-propanol, 2-metil-butanol, 3-metil-butanol, que podem ser comparados com os extraídos diretamente do fermentado. Para ilustrar mais claramente a diferença são mostrados na tabela 15 os valores encontrados, as médias, aos pares, os desvios padrão e o coeficiente de variação entre os pontos máximos, para a extração direta no fermentado e a coleta por Xad-2; os avaliados são apenas os compostos comuns para as duas metodologias.

Tabela 15: Valores quantitativos, médias e coeficiente de variação entre os pontos máximos, para a extração direta do caldo fermentativo e a coleta por Xad-2.

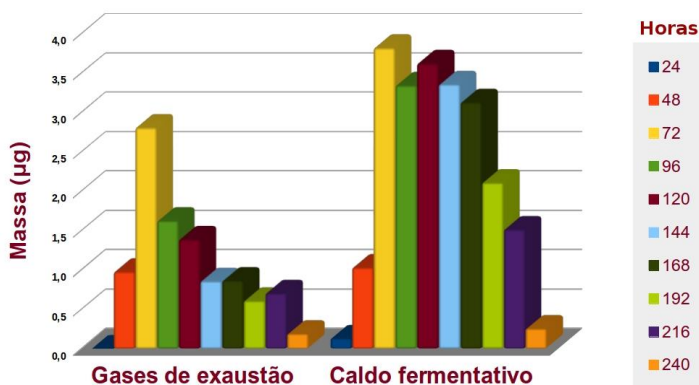
| Composto | Caldo | Exaustão | Média (μg) | C.V. |
|------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|------|
| | Massa (μg) | Massa (μg) | | |
| Etanol | 1225,5 | 1556,4 | 1391,0 | 16,8 |
| 2-Metil-propanol | 22,1 | 36,0 | 29,0 | 34,0 |
| 3-Metil-butanol | 9,5 | 5,1 | 7,3 | 42,4 |
| 2-Metil-butanol | 3,8 | 2,7 | 3,2 | 23,9 |

Observando os valores de coeficiente de variação, percebe-se que o maior valor é o do composto 3-metil-butanol; esse composto também apresentou o maior coeficiente de variação quando comparadas as médias dos pontos máximos, na tabela 14, para as duas fermentações (Ferm. 02 e Ferm. 03) nas amostras das coletas por Xad-2. O significado desse valor relativamente alto de coeficiente de variação está no valor da média de 5,1 μg , que contém a maior variação (40,8%). Para o caso do etanol e do 2-metil-propanol, pode-se concluir que os valores quantitativos apresentam pesos comparativos, ou seja, não são valores diferentes em ordem de magnitude. A utilização do Xad-2, seguida de extração por SPME, apesar de apresentar uma maior variabilidade, pode alcançar os valores máximos da extração direta do caldo fermentativo. A possibilidade de se utilizar uma metodologia que não interfira com o processo fermentativo, para determinar valores máximos de etanol e do 2-metil-propanol é bastante promissora, evita possíveis contaminações biológicas causadas por retirada de alíquotas, evita retiradas de nutrientes e biomassa do meio de cultura e reduz o material biológico a ser inertizado.

Para ilustrar com maior clareza as semelhanças entre caldo fermentativo e gases da exaustão (coleta por Xad-2) são mostrados na figura 33 os gráficos de barras para o composto 2-Metil-butanol, durante todo o período da fermentação de dez dias. Os valores de massas (em μg) foram obtidos através da conversão utilizando a curva de calibração para o álcool, portanto, os valores são referentes as massas que se

encontram no líquido fermentativo.

Figura 33: Gráficos de barras para o composto 2-Metil-butanol, durante todo o período da fermentação de dez dias.



O biorreator utilizado nesse trabalho foi um fermentador experimental, onde as vazões são controladas manualmente, a utilização de um fermentador profissional, como o utilizado por Vendruscollo (2009), poderia produzir resultados mais estáveis, devido ao controle de vazão automatizado que pode ser empregado. Outra possibilidade que um fermentador profissional oferece é a de utilização de oxigênio, em vazões mais baixas e mais regulares, o que poderia melhorar muito a variabilidade dos resultados da coleta por Xad-2. O fato de não ser possível estudar as amostras de Xad-2 através de um modelo prejudicou a precisão das comparações entre as duas fermentações, mas os valores de máximos para os dois casos são satisfatoriamente comparáveis para uma verificação de desempenho de extração, sendo que a extração direta do caldo fermentativo mostrou ser mais precisa, com maior possibilidade frente à modelagem matemática e previsão de resultados. No entanto, a possibilidade de aperfeiçoamento e menor interferência no processo fermentativo faz com que a utilização do Xad-2 seja bastante promissora. A possibilidade de utilização de outros adsorventes, combinados com Xad-2, também é viável, pois, os adsorventes sólidos (Tenax, Carbotrap e etc) não necessitam de controle de pH em

biorreatores, normalmente são seletivos e proporcionam uma ótima relação entre os sinais (dos VOC), que pode ser medida através da razão entre sinal e ruído, nos cromatogramas correspondentes.

Outro fator que merece destaque é o fato da resina Xad-2 ter proporcionado valores comparativos para os álcoois etanol e 2-metil-propanol, mostrando que a quantidade do último é superior à dos outros dois álcoois superiores. Como foi citado por Garavaglia (2006), o 2-metil-propanol pode estar presente em maiores quantidades quando os processos aeróbios estão envolvidos; além disso, a formação de etanol foi detectada logo nas primeiras 24 horas de fermentação, quando a glicose ainda está presente; isso foi possível porque a sensibilidade da extração com Xad-2 foi equivalente a extração por SPME do caldo fermentativo, considerando os devidos tempos de extração. As duas observações citadas acima, para o etanol e 2-metil-propanol, podem corroborar com o que foi discutido e apresentado por Moritz (2005), onde a presença do etanol é explicada por um processo de fermentação clássica, que é independente do oxigênio ou um artifício do metabolismo fúngico, onde o etanol é formado para que o NADH_2 em excesso possa gerar NAD e assim continuar com a via glicolítica, sendo que essas são as formas de obtenção de energia por parte das células. Os detalhes para a fermentação foram ilustrados na figura 4, entretanto, não se pode descartar a influência do oxigênio, pois, segundo Hamdi *et al.* (1996) a pressão parcial do oxigênio influencia o consumo de açúcar, formação de etanol e produção de pigmento vermelho. Melhorias no sistema de controle e aeração poderiam ser feitas ou a metodologia de coleta por Xad-2 poderia ser adaptada aos fermentadores profissionais, para que estas questões envolvendo as vias metabólicas fossem elucidadas por completo.

5 CONCLUSÃO

De acordo com o presente estudo, foi possível constatar que o fungo do gênero *Monascus*, nesse caso a linhagem *Monascus ruber* CCT 3802, produziu quantidades aceitáveis de pigmentos (comparáveis com as referências estudadas), quando foi utilizado um biorreator preparado especialmente para avaliação de compostos voláteis microbianos, no caldo fermentativo e nos gases de exaustão do biorreator. Foram encontrados valores significativos para a biomassa e pigmento vermelho, mostrando que o desempenho da fermentação é comparável com o que já foi descrito por outros autores para a mesma espécie de fungo *Monascus*. O pigmento de cor laranja, predominante no líquido fermentativo filtrado, pode ser separado dos dois outros pigmentos (vermelho e amarelo) pela aplicação de um processo de separação simples. Através da separação por cromatografia preparativa foi possível estimar uma recuperação média para o pigmento laranja, e foi observado que esse pigmento possui pouca influência sobre as medidas de espectrofotometria realizadas para a verificação do desempenho do biorreator, por medidas de absorvância do pigmento vermelho extracelular.

Por meio da utilização de planejamentos experimentais e de modelagem, foi possível obter estudos detalhados dos compostos voláteis microbianos, oriundos do processo de produção de pigmentos pelo fungo *Monascus ruber*, utilizando uma fermentação em biorreator. A utilização de SPME em espaço confinado foi eficaz diante do estudo dos principais compostos voláteis microbianos pertencentes a família dos álcoois superiores, que foram identificados como sendo o 2-metil-propanol, 3-metil-butanol, 2-metil-butanol e 2-fenil-etanol. A avaliação do etanol, por SPME, também se mostrou eficaz e robusta quando avaliadas as amostras do caldo fermentativo, coletadas durante o período da produção de pigmentos. A utilização de SPME para identificação e quantificação dos MVOC, e separação dos demais VOC, produzidos durante o processo de produção de pigmentos, superou as expectativas quanto a regularidade do perfil e dos percentuais dos compostos, principalmente aqueles que desenvolvem acúmulos, como os álcoois superiores, que são importantes em todos os processos fermentativos.

Resultados bastante positivos foram encontrados quando analisadas as amostras dos gases de exaustão, coletadas por cartuchos de

Xad-2. Embora não tenha sido possível estudar os compostos coletados através de um modelo, como foi realizado para as amostras do caldo fermentativo, foi possível obter os valores dos máximos experimentais para os álcoois: etanol, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol, 2-metil-butanol. Em termos de massas (mg), os valores são muito semelhantes aos encontrados para o caldo fermentativo, possibilitando assim, calcular as quantidades dos quatro compostos por tempo de exposição dos cartuchos aos gases de exaustão, considerando períodos de vinte e quatro horas. Os resultados demonstraram que a coleta por cartuchos de Xad-2, seguida de extração por SPME, é seletiva para os quatro álcoois, e produz uma série de cromatogramas (GC-MS) com baixo efeito de matriz (menor quantidade de picos interferentes próximos aos analitos), se comparada com a extração direta do caldo fermentativo. A potencialidade dessa coleta, por Xad-2, dos gases de exaustão de fermentadores de bancada e profissionais, quanto ao estudo e controle de processos biotecnológicos, torna a metodologia bastante promissora. Não são necessários ajustes sofisticados para a implementação e melhora dessa metodologia, apenas pequenas melhorias para estabilizar as vazões de escoamento dos gases, nada com custo muito elevado, dependendo das quantidades de metabólitos a serem produzidos. Conclui-se, portanto, que uma investigação mais elaborada sobre as potencialidades da coleta de gases de exaustão, por cartuchos de Xad-2 combinado com extração por SPME, poderia ser de grande valia para o estudo do metabolismo de fungos produtores de insumos, iguarias ou qualquer outro produto de interesse comercial.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEROUMAND, A. A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 6, n. 1, p. 71-78, 2011.

BABITHA, S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Jackfruit Seed – A Novel Substrate for the Production of *Monascus* Pigments through Solid-State Fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 465-471, 2006.

BABUSHOK, V. I. Chromatographic retention indices in identification of chemical compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 69, p. 98-104, 2015.

BÄCK, J. et al. Variable emissions of microbial volatile organic compounds (MVOCs) from root-associated fungi isolated from Scots pine. **Atmospheric Environment**, v. 44, p. 3651-3659, 2010.

BARRETO, S. M. et al. Análise da Estratégia Global para Alimentação, Atividade Física e Saúde, da Organização Mundial da Saúde. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 14, p. 41-68, 2005.

BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1155-1163, 2008.

BASTIAN, S. et al. Engineered ketol-acid reductoisomerase and alcohol dehydrogenase enable anaerobic 2-methylpropan-1-ol production at theoretical yield in *Escherichia coli*. **Metabolic Engineering**, v. 13, p. 345-352, 2011.

BERTRAND, S. et al. Detection of metabolite induction in fungal co-cultures on solid media by high-throughput differential ultra-high pressure liquid chromatography–time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. **Journal of Chromatography A**, v. 1292, p. 219-228, 2013.

BIANCHI, F. et al. Retention indices in the analysis of food aroma

volatile compounds in temperature-programmed gas chromatography: Database creation and evaluation of precision and robustness. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 563-572, 2007.

BLOOM, E. et al. Mass Spectrometry-Based Strategy for Direct Detection and Quantification of Some Mycotoxins Produced by *Stachybotrys* and *Aspergillus* spp. in Indoor Environments. **Applied and Environmental Microbiology** , v. 13, n. 73, p. 4211-4217, 2007.

BOO, H. O. et al . Extraction and characterization of some natural plant pigments. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 129-135, 2012.

BORZANI, W. et al. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. 33-60, 177-196 p.

BRUNETTI, A. E. et al. Frog Volatile Compounds: Application of *in vivo* SPME for the Characterization of the Odorous Secretions from Two Species of *Hypsiboas* Treefrogs. **Journal of Chemical Ecology**, v. 41, p. 360-372, 2015.

CARVALHO, J. C. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de pigmentos a partir de *Monascus* por fermentação em substrato sólido**. 2004. 101 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) – Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

CARVALHO, W. et al. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa. **Revista Analytica**, n. 18, p. 70-76, 2005.

CHAGAS, F. O. **Utilização de culturas mistas como estratégia para estimular a biossíntese de produtos naturais por fungos endofíticos**. 2010. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

CHAMPDORE, M. et al. Two-dimensional thin-layer chromatography in the analysis of secondary plant metabolites, **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 1035-1052, 2009.

CHELI, F.; CAMPAGNOLI, A.; DELL'ORTO, V. Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. **Animal Feed Science and Technology**, v. 183, p. 1-16, 2013.

CHEN, C.H. et al. Improved dissolution rate and oral bioavailability of lovastatin in red yeast rice products. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 444, p. 18-24, 2013.

CHEN, M. H.; JOHNS, M. R. Effect of pH and nitrogen source on pigment production by *Monascus purpureus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 40, p. 132-138, 1993.

CHENG, M. J. et al. Secondary metabolites produced by the fungus *Monascus pilosus* and their anti-inflammatory activity. **Phytochemistry Letters**, v. 5, p. 567-571, 2012.

CLEVELAND, W. S. Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots. **Journal of the American Statistical Association**, v. 74, n. 368, p. 829-836, 1979.

CORTES, R. X. **Um estudo comparativo de estimadores de regressões não-paramétricas aditivas: Performance em Amostras Finitas**. 2010. 71 f. Monografia (Bacharelado em Estatística) – Instituto de Matemática, Dep. de Estatística, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

COSTA, C. L. S.; CHAVES, M. H. Extração de pigmentos das sementes de *bixa orellana* l.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 149-152, 2005.

DANIEL, C. Use of half-normal plots in interpreting factorial two-level experiments. **Technometrics**, v. 1, p. 311-340, 1959.

DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. V. Ruggedness and robustness testing. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 2, p. 138-157, 2007.

DEMYTTENAERE, J. C. R.; BELLEGHEM, K. V.; KIMPE, N. Biotransformation of (R)-(+)- and (S)-(À)-limonene by fungi and the

use of solid phase microextraction for screening. **Phytochemistry**, v. 57, p. 199-208, 2001.

DIAS, A. N. et al. Use of green coating (cork) in solid-phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in water by gas chromatography-electron capture detection . **Talanta**, v. 134, p. 409-414, 2015.

DING Y. et al. Analytical method of free and conjugated neutral aroma components in tobacco by solvent extraction coupled with comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1280, p. 122-127, 2013.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 35, p. 5-22, 2000.

DUFOSSÉ, L. Microbial Production of Food Grade Pigments. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 313-321, 2006.

FREIRE, E. F. et al. Diazepam e nordiazepam em plasma: métodos de extração líquido-líquido e em fase sólida no pré-tratamento de amostras para análise cromatográfica em fase líquida. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 773-776, 2005.

FRIEDRICH, J. et al. High-performance liquid chromatographic analysis of mevinolin as mevinolinic acid in fermentation broths. **Journal of Chromatography A**, v. 704, p. 363-367, 1995.

GARAVAGLIA, J. **Bioconversão de l-fenilalanina em 2-feniletanol por *kluveromyces marxianus* em mosto de uva**. 2006. 104 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, 2006.

GASHLAN, H. M. High performance liquid chromatographic

determination of patulin in apple juice: Investigation of its contamination levels in Saudi Arabia. **Scientific Research and Essay**, v. 4, p. 69-72, 2009.

GAVIN, D. Identification of microbial volatile organic compounds (MVOCs) emitted from fungal isolates found on cinematographic film. **Analytical Methods**, v. 4, p. 1265-1271, 2012.

GHIASVAND, A. R.; SETKOVA, L.; PAWLISZYN, J. Determination of flavour profile in Iranian fragrant rice samples using cold-fibre SPME–GC–TOF–MS . **Flavour and Fragrance Journal** , v. 22, p. 377-391, 2007.

HAJJAJ, H. 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, p. 619-625, 2000.

HAJJAJ, H. et al. Production and identification of N-glucosylrubropunctamine and N-glucosylmonascubramine from *Monascus ruber* and occurrence of electron donor-acceptor complexes in these red pigments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 7, p. 2671-2678, 1997.

HAMANO, P. S.; OROZCO, S. F. B. M.; KILIKIAN, B. V. Concentration determination of extracellular and intracellular red pigments produced by *Monascus* spp. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 43-49, 2005.

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

HANTAO L.W. et al. Determination of disease biomarkers in Eucalyptus by comprehensive two-dimensional gas chromatography and multivariate data analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1279, p. 86-91, 2013.

HAZELWOOD, L. A. et al. The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 8, p. 2259-2266, 2008.

HEO, J. H. et al. Approximation of modified Anderson–Darling test statistics for extreme value distributions with unknown shape parameter. **Journal of Hydrology**, v. 499, p. 41-49, 2013.

HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. **Journal of Chromatography B**, v. 910, p. 2-13, 2012.

HIRA, A.; OLIVEIRA, L. G. No substitute for oil? How Brazil developed its ethanol industry. **Energy Policy**, v. 37, p. 2450-2456, 2009.

HU, Z. et al. Export of intracellular *Monascus* pigments by two-stage microbial fermentation in nonionic surfactant micelle aqueous. **Journal of Biotechnology**, v. 162, p. 202-209, 2012.

HUSAIN, A. et al. Estimates of dietary exposure of children to artificial food colours in Kuwait. **Food Addit Contam**, v. 23, p. 245-251, 2006.

International Conference on Harmonization (ICH); **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, Q2B, Step 4, Consensus Guideline, 6 November 1996.

JACOBY, W. J. Loess: a nonparametric, graphical tool for depicting relationships between variables. **Electoral Studies**, v. 19, p. 577-613, 2000.

JELLEN, H. H. Use of solid phase microextraction (SPME) for profiling fungal volatile metabolites. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, p. 263-267, 2003.

JIA, X. Q. et al. Elimination of the mycotoxin citrinin production in the industrial important strain *Monascus purpureus* SM001. **Metabolic Engineering**, v. 12, p. 1-7, 2010.

JOURNOUD, M; JONES, P. J. H. Red yeast rice: a new hypolipidemic drug. **Life Sciences**, v. 74, p. 2675-2683, 2004.

KHAN, A. A. et al. Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 11, p. 859-870, 2014.

KLUTZ, S. et al. Narrow residence time distribution in tubular reactor concept for Reynolds number range of 10–100. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 95, p. 22-33, 2015.

KOZMUS, C. E. P.; POTOČNIK, U. Reference genes for real-time qPCR in leukocytes from asthmatic patients before and after anti-asthma treatment. **Gene**, v. 570, p. 71-77, 2015.

KRULL, R. et al. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 163, p. 112-123, 2013.

LACAZ, et al. **Tratado de Micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 44-76 p.

LAVINE, B. K. et al. Prediction of mold contamination from microbial volatile organic compound profiles using solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 103, p. 37-41, 2012.

LENTH R. V. Quick and easy analysis of unreplicated factorial. **Technometrics**, v. 31, p. 469-473, 1989.

LIAN, X.; WANG, C.; GUO, K. Identification of new red pigments produced by *Monascus ruber*. **Dyes and Pigments**, v. 73, p. 121-125, 2007.

LIM, H. S. et al. *Monascus* Red Pigment Overproduction by Coculture with Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Secreting Glucoamylase. **The Journal of Microbiology**, v. 38, p. 48-51, 2000.

LIN, Y. L. et al. Biologically active components and nutraceuticals in the *Monascus*-fermented rice: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 77, p. 965-973, 2008.

LUYTS, A. et al. Low resolution ^1H NMR assignment of proton populations in pound cake and its polymeric ingredients. **Food Chemistry**, v. 139, p. 120-128, 2013.

MARÍN, R. N. et al. Headspace solid-phase microextraction analysis of aroma compounds in vinegar validation study. **Journal of Chromatography A**, v. 967, p. 261-267, 2002.

MARQUES, M. N.; COTRIM, M. B.; PIRES, M. A. F. Avaliação do impacto da agricultura em áreas de proteção ambiental, pertencentes à bacia hidrográfica do rio ribeira de iguaape, são paulo. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1171-1178, 2007.

MATYSIK, S.; HERBARTH, O.; MUELLER, A. Determination of microbial volatile organic compounds (MVOCs) by passive sampling onto charcoal sorbents. **Chemosphere**, v. 76, p. 114-119, 2009.

MAVEL, S. et al. ^1H - ^{13}C NMR-based urine metabolic profiling in autism spectrum disorders. **Talanta**, v. 114, p. 95-102, 2013.

MEINICKE, R. M. et al. Potential use of glycerol as substrate for the production of red pigments by *Monascus ruber* in submerged fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 238-242, 2012.

MEJÍAS, R. C. et al. Optimisation of headspace solid-phase microextraction for analysis of aromatic compounds in vinegar. **Journal of Chromatography A**, v. 953, p. 7-15, 2002.

MEYER, P. A. et al. Techno-economic analysis of corn stover fungal fermentation to ethanol. **Applied Energy**, v. 111, p. 657-668, 2013.

MERIB, J. et al. Simultaneous Determination of Environmental Contaminants with Different Volatilities in Tap Water Samples Using a

New Approach to Single-Drop Microextraction Procedure. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 8, p. 1674-1683, 2015.

MINERDI, D. et al. Volatile organic compounds: a potential direct long-distance mechanism for antagonistic action of *Fusarium oxysporum* strain MSA 35. **Environmental Microbiology**, v. 11, p. 844-854, 2009.

MINGOTI, A. M. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada**. Belo horizonte: Editora UFMG, 2013, 27-56 e 99-138 p.

MITCHELL, A. M. et al. Volatile antimicrobials from *Muscodora crispans*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 156, p. 270-277, 2010.

MORITZ, D. E. **Produção do pigmento *Monascus* por *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo submerso**. 2005. 150 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Pós-Graduação em Engenharia de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

MU, Y.; WANG, G.; YU, H. Q. Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1302-1307, 2006.

MUKHERJEE, G.; SINGH, S. K. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, n. 46, p. 188-192, 2011.

MUNDIM, M. J. **Estatística com BrOffice**. Rio de Janeiro: Editora Ciência Moderna Ltda, 2010. 331-360 p.

MURPHY, J. Respiration and Carbon Dioxide Accumulation in Soil Microcosms. **Pursuit: Journal of Undergraduate Research at the University of Tennessee**, v. 4, p. 55-62, 2012.

NAIR, R. B. et al. Dilute phosphoric acid pretreatment of wheat bran for enzymatic hydrolysis and subsequent ethanol production by edible fungi *Neurospora intermedia*. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 314-

323, 2015.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como Fazer Experimentos**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010, 265-298 p.

NOZZI, N. E. et al. Metabolic engineering for higher alcohol production . **Metabolic Engineering**, v. 25, p. 174-182, 2014.

OROZCO, S. F. B.; KILIKIAN, B. V. Effect of pH on citrinin and red pigments production by *Monascus purpureus* CCT 3802. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, n. 24, p. 263-268, 2008.

ÖZTUNA, D.; ELHAN, A. H.; TÜCCAR. E. Investigation of Four Different Normality Tests in Terms of Type 1 Error Rate and Power under Different Distributions. **Journal of Medicine Cincinnati**, v. 36, n. 3, p. 171-176, 2006.

PANDA, B. P.; JAVED, S.; ALI, M. Production of angkak through co-culture of *Monascus purpureus* and *Monascus ruber*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 757-764, 2010.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 189-259, 2004.

PASTRE, R. et al. Diversidade de policetídeos produzidos por espécies de *Penicillium* isoladas de *Melia azedarach* e *Murraya paniculata*, **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1867-1871, 2007.

PATTANAGUL, P. et al. Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus* sp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 20-23, 2008.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Editora Cengage Learning, 2010, 400-498 p.

PIMPHAN, et al. Techno-economic analysis of corn stover fungal fermentation to ethanol. **Applied Energy**, v. 111, p. 657-668, 2013.

PISAREVA, E.; KUJUMDZIEVA, A. Taxonomic investigation and growth characteristics of citrinin free *Monascus pilosus* C₁ strain. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 20, n. 1, p. 88-96, 2006.

PISKUR, J. et al. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer?. **Trends in Genetics**, v. 22, n. 4, p. 184-186, 2006.

POLIZZI, V. et al. Identification of volatile markers for indoor fungal growth and chemotaxonomic classification of *Aspergillus* species. **Fungal Biology**, v. 116, p. 941-953, 2012.

POLIZZI, V. et al. Influence of environmental conditions on production of volatiles by *Trichoderma atroviride* in relation with the sick building syndrome. **Building and Environment**, v. 46, p. 945-954, 2011.

RAEPPEL, C.; APPENZELLER, B. M.; MILLET, M. Determination of seven pyrethroids biocides and their synergist in indoor air by thermal-desorption gas chromatography/mass spectrometry after sampling on Tenax TA® passive tubes. **Talanta**, v. 131, p. 309-314, 2015.

RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CAVALHEIRO, E. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1114-1120, 2006.

REZENDE, D. C. **Efeito de compostos orgânicos voláteis identificados a partir de *Saccharomyces cerevisiae* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum* e no controle da antracnose em goiaba.** 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

RIBEIRO, S. A. L. et al. Fungos filamentosos isolados de produtos derivados de milho comercializados em Recife, Pernambuco. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 2, p. 223-229, 2003.

RUXTON, G. D.; WILKINSON, D. M.; NEUHÄUSER, M. Advice on

testing the null hypothesis that a sample is drawn from a normal distribution. **Animal Behaviour**, v. 107, p. 249-252, 2015.

SAHLBERG, B. et al. Airborne molds and bacteria, microbial volatile organic compounds (MVOC), plasticizers and formaldehyde in dwellings in three North European cities in relation to sick building syndrome (SBS). **Science of the Total Environment**, v. 444, p. 433-440, 2013.

SHARMILA, G.; NIDHI, B.; MUTHUKUMARAN, C. Sequential statistical optimization of red pigment production by *Monascus purpureus* (MTCC 369) using potato powder. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 158-164, 2013.

SHEN, C. R.; LIAO, J. C. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol and 1-propanol production via the keto-acid pathways. **Metabolic Engineering**, v. 10, p. 312-320, 2008.

SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665-676, 2011.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; RECHE, S. H. C. Manutenção de leveduras por congelamento a - 20°C. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, São Paulo, v. 40, n. 1, p. 73-74, 2008.

SILVEIRA, S. T.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Pigment production by *Monascus purpureus* in grape waste using factorial design. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 170-174, 2008.

SIVA, L. S. et al. Identification of mVOCs from Andean Rhizobacteria and Field Evaluation of Bacterial and Mycorrhizal Inoculants on Growth of Potato in its Center of Origin. **Microbial Ecology**, v. 69, p. 652-667, 2015.

SNYDER, L. R. Classification Of The Solvent Properties Of Common Liquids. **Journal of Chromatography**, v. 92, p. 223-230, 1974.

SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. Processamentos de amêndoa e torta de castanha-do-brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, p. 120-128, 2004.

STONE , C. J. Consistent nonparametric regression (with discussion). **The Annals of Statistics**, v. 5, n. 4, p. 595-620, 1977.

STOPPACHER, N. et al. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, p. 187-193, 2010.

TABAR, A. I. et al. Asma y alergia por el colorante carmín. **Anales del Sistema Sanitario de Navarra**, v. 26, p. 65-73, 2003.

TAN, M.; ZOU, Y.; ZHOU, C. A new inversion method for (T2, D) 2D NMR logging and fluid typing. **Computers & Geosciences**, v. 51, p. 366-380, 2013.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas Eletrônicas Para Cálculos De Planejamentos Experimentais, Um Tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

TUNC, S. et al. Combined effect of volatile antimicrobial agents on the growth of *Penicillium notatum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 263-270, 2007.

VALENTE L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química nova**, v. 23, n. 4, 2000.

VELMURUGAN, P. et al. *Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 6, p. 590-594, 2011.

VENDRUSCOLO, F. et al. Isoelectric point of amino acid: Importance for *Monascus* pigment production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 179-185, 2016.

VENDRUSCOLO, F. **Produção de pigmento vermelho a partir de pigmento laranja produzido por *Monascus ruber* cct 3802**. 2009. 245 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimento) - Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

VIDYALAKSHMI, R. et al. Stimulation of *Monascus* Pigments by Intervention of Different Nitrogen Sources. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 4, p. 25-28, 2009.

VILAR, M. S. et al. Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. **Mutation Research**, v. 444, p. 7-16, 1999.

VURALHAN, Z. et al. Identification and characterization of phenylpyruvato decarboxilase genes in *S. Cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4534-4541, 2003.

WALSH, J. et al. The loess regression relationship between age and BMI for both Sydney World Masters Games athletes and the Australian national population. **International Journal of Biological and Medical Sciences**, v.1, n.1, p. 33-36, 2011.

WANG, W. et al. Microbial volatile organic compounds and their application in microorganism identification in foodstuff. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 78, p. 1-16, 2016.

WANG, Y. Z.; JU, X. L.; ZHOU, U. G. The variability of citrinin production in *Monascus* type cultures. **Food Microbiology**, v. 22, p. 145-148, 2005.

WONG, H. C.; KOEHLER, P. Production and isolation of an antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production. **Journal of Food Science**, v. 46, p. 589-592, 1981.

XU, B. J. et al. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. **Food Control**, v. 17, p. 271-285, 2006.

YURDAKUL, S.; CIVAN, M.; TUNCEL, G. Volatile organic compounds in suburban Ankara atmosphere, Turkey: Sources and variability. **Atmospheric Research**, v. 121, p. 298-311, 2013.

ZHENG, Y.; XIN, Y.; GUO, Y. Study on the fingerprint profile of *Monascus* products with HPLC-FD, PAD and MS. **Food Chemistry**, v. 113, p. 705-711, 2009.

APÊNDICE A – Cálculos e gráficos para a biomassa do caldo fermentativo referentes as fermentações 02 e 03; códigos para o software R.

```
#####
#####
##                               Curva                               Loess
#####
# Biomassa - Fermentações 02 e 03, cálculos estatísticos e gráficos
#####
#####
#####

dad<-read.table(file.choose(),header=T) # leitura dos dados da tabela 7
(16 amostras)
attach(dad)

cor.test(fe02,fe03) # teste de correlação de Pearson entre as 16 amostras
corrid<-c(seq(1:16),seq(1:16)) # numeração dos dados (amostras)

ari<-c(fe02,fe03) # coluna com os dados (amostras)
dad1<-cbind(corrid,ari) # tabela - números e amostras (2 colunas)

loess <- loess(ari~corrid) # aplicação da regressão (modelo padrão)
summary(loess) # sumário da aplicação da regressão

pred <- predict(loess) # valores preditos baseados no modelo padrão
(r_sq_loess <- cor(ari, pred)^2) # R quadrado da regressão

cor.test(ari, pred) # teste de correlação entre valores observados e
preditos

plot(loess$fitted, loess$residuals, main="LOESS", ylab="Resíduos",
xlab="Valores preditos")
# gráfico de resíduos vs. valores ajustados para o modelo padrão

qqnorm(loess$residuals,main="Gráfico de probabilidade
normal",ylab="Quantil amostral",
```

```
xlab="quantil teórico") # gráfico de probabilidade normal para os
resíduos
qqline(loess$residuals) # linha normal quantil-quantil
```

```
predict <- data.frame(corrid=c(7.6,8.5,9,9.5,10,10.5,11,11.5,12)) #
valores preditos próximos
# dos valores máximos
predict$loess <- predict(loess, predict) # valores ajustados para os dados
acima
predict # mostra os valores ajustados
max(predict) # valor máximo entre os ajustados
```

```
## Gráficos de dispersão
```

```
par(mfrow=c(1,2)) # posição dos graficos de dispersão
plot(fe02,main="Fermentação 02",ylab="Biomassa (mg)", xlab="Dias")
plot(fe03,main="Fermentação 03", ylab="Biomassa (mg)",
xlab="Dias",pch=16)
# gráficos fermentação 02 e 03
```

```
## Imprime o gráfico loess da figura 17
```

```
par(mfrow=c(1,1))
tiff("Plot_bio23.tiff", width = 6, height = 6, units = 'in', res = 300)
par(mar=c(3,3,3,3)+3)
plot(fe02,ylim=c(0,18),ylab="Biomassa (mg)",xlab="Dias")
par(new=TRUE)
plot(fe03,ylim=c(0,18),axes=F, ann=F, pch=2)
lines(lowess(dad1,f=0.5),lwd=2,col="cyan3")
legend(12,5,legend=c("Ferm.02", "Ferm.03"),pch=c(1,2),x.intersp=0.5,y.
intersp=0.9,pt.cex=1.5)
dev.off()
"-----"
"-----"
```

APÊNDICE B – Cálculos e gráficos para o 3-metil-butanol ; exemplo para demonstrar a análise realizada com o planejamento fracionário em GC-FID, dos álcoois ;códigos para o software R.

```
#####
##### #####
##                               Fatorial                               fracionário
##
#####
##### #####
```

```
## EXPERIMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO - FRAÇÃO MEIA
## Composto: 3-metil-butanol
```

```
## Criando fatores do planejamento fracionário 24-1
require(AlgDesign) # carregando pacote
dat<-gen.factorial(levels=2,nVars=3,varNames=c("A","B","C"))
dat$D<-dat$A*dat$B*dat$C # Adiciona o fator D
dat # tabela das variáveis codificadas
dad2<-rbind(dat,dad) # duplicando os fatores (replica)
```

```
## Dados correspondentes aos níveis
y<-scan(n=16) # entrada dos dados da tabela (entra com Respostas)
```

```
dados<-data.frame(dad2,y) # inserindo respostas
dados # tabela completa
attach(dados) # ativando o nome das variáveis
```

```
mod1<-lm(y~A*B*C*D,data=dados) # primeiro modelo
mod1<-lm(y~(.)^2, data=dados) # só os valores estimáveis
summary(mod1) # resumo do modelo 1
```

```
tt<-c(seq(1:8),seq(1:8)) # numeração das corridas
tt<-factor(tt) # declaração da variável
```

```
## Análise de resíduos
resmod1<-residuals(mod1) # Resíduos do modelo 1
```

```

## Teste de Kolmogorov-Smirnov (normalidade dos resíduos)
ks.test(resmod1, "pnorm", mean=0, sd = sd(resmod1)) # normalidade
"-----"
# se p-valor > 0,05 - não se rejeita a hipótese de normalidade
"-----"
## Teste de Bartlett (Homocedasticidade dos resíduos)
bartlett.test(resmod1,tt) # Homocedasticidade
"-----"
# se p-valor > 0,05 resíduos têm variâncias homogêneas
"-----"

## Gráficos dos resíduos
par(mfrow=c(1,2)) # duas janelas
resord<-sort(resmod1)
nr<-length(y)
quantis<-qnorm((1:nr-0.5)/nr)

## Gráfico de probabilidade normal - (normalidade)
plot(resord,quantis,main="Gráfico de probabilidade normal" ,
xlab="Resíduos", ylab="Quantis teóricos",pch=2)
abline(0,1,col="cyan3" )

## Gráfico dos valores preditos vs. resíduos (homocedasticidade)
vpred<-predict(mod1)
plot(vpred,resmod1,main="Gráfico dos valores preditos x resíduos ",
xlab="Valores preditos",
ylab="Resíduos",pch=2)
abline(h=0,lty=2,col="cyan3")

```

APÊNDICE C (continuação de B) – Cálculos e gráficos para o 3-metil-butanol ; exemplo para demonstrar a análise realizada com o planejamento fracionário em GC-FID, dos álcoois; códigos para o software R.

```
## Análise de variâncias para modelo 1
```

```
anova(mod1)
```

```
contrastes<-coef(mod1)[2:8]*2 # valores dos contrastes
```

```
## Gráfico de barras dos contrastes (valor absoluto)
```

```
par(mfrow=c(1,1)) # uma janela
```

```
barplot(sqrt(contrastes^2),ylab="Valores absolutos dos efeitos",
```

```
main="Gráfico de barras dos efeitos",col="snow2")
```

```
abline(h=max(contrastes)*0.10,lty=2,col="brown");
```

```
text(0.8,max(contrastes)*0.10+0.2, "10% MAX", col = "brown")
```

```
# linha correspondente a 10% do valor do maior contraste
```

```
ef<-sort(contrastes) # ordena os efeitos
```

```
m1<-data.frame(ef) # ordem dos pontos (arranjo)
```

```
## Gráfico de probabilidade normal dos efeitos
```

```
par(mfrow=c(1,2))
```

```
qqnorm(contrastes,pch=2,datax = T,
```

```
main="Gráfico de probabilidade normal", xlab="Quantil amostral",
```

```
ylab="Quantil Teórico")
```

```
qqline(contrastes,col="cyan3",datax = T)
```

```
library(FrF2) # gráfico de Daniel (para efeitos)
```

```
DP<-DanielPlot(mod1,pch=2,col="blue",autolab=F,main="Gráfico de
```

```
Daniel")
```

```
## Gráfico de Daniel half-normal
```

```
par(mfrow=c(1,1)) # uma janela
```

```
DanielPlot(mod1,pch=2,col="blue",half=T,autolab=F,main="Daniel -
```

```
Half normal")
```

```
abline(0,0.5,col="cyan3") # linha da distribuição
```

```
## Função para plotagem (gráficos de efeito principal)
```

```
ploteff<-function(f)
```

```
{
  F<-factor(f)
  reg<-lm(y~f)
  plot(y~f, xlab="Níveis do fator", ylab="Respostas", pch=2)
  abline(reg, col="cyan3", lwd=2)
}
```

Imprime os gráficos de efeito principal

```
tiff("Plot_efeito_princC8.tiff", width = 6, height = 6, units = 'in', res =
300)
par(mfrow=c(2,2)) # em pares
ploteff(A)
title(main="pH")
ploteff(B)
title(main="Diluição")
ploteff(C)
title(main="Tempo de extração")
ploteff(D)
title(main="Temperatura de extração")
dev.off()
```

Gráficos de interação

```
par(mfrow=c(1,1))
interaction.plot(A, B, y, legend=T, ylab=" Médias das
respostas", pch=2, col="cyan3")
"-----"
```

```
# OBS: apenas as interações não nulas p-valor < 0,1
```

```
"-----"
```


APÊNDICE D (continuação de B) – Cálculos e gráficos para o 3-metil-butanol ; exemplo para demonstrar a análise realizada com o planejamento fracionário em GC-FID, dos álcoois; códigos para o software R.

Diagrama com as médias por combinações dos níveis (dois fatores)

```
digquad<-function(x,z,y,n1,n2){
  "-----"
  # x e z são os fatores
  # y são as respostas
  # n1 nome do fator x (entre "...")
  # n2 nome do fator z (entre "...")
  "-----"

  ym1<-mean(y[x== -1 & z== -1]);ym1<-round(ym1,digits=1)
  ym2<-mean(y[x== 1 & z== -1]);ym2<-round(ym2,digits=1)
  ym3<-mean(y[x== -1 & z== 1]);ym3<-round(ym3,digits=1)
  ym4<-mean(y[x== 1 & z== 1]);ym4<-round(ym4,digits=1)
  yms<-c(ym1,ym2,ym3,ym4) # médias por combinações dos níveis

  nx<-n1
  ny<-n2
  plot(c(1, 4), c(1, 4), type= "n",axes=F, xlab ="" , ylab = "",
       main="Diagrama com as médias por combinações dos níveis")
  rect(2,2,3 , 3, col="lightgray", border="blue")
  text(1.95,1.95,labels =ym1)
  text(3.05,1.95,labels =ym2)
  text(1.95,3.05,labels =ym3)
  text(3.05,3.05,labels =ym4)
  text(1.40,2.5,labels=ny,cex=1.5)
  text(2.5,1.30,labels=nx,cex=1.5)
  arrows(1.5,1.5,1.5,3.50);arrows(1.5,1.5,3.50,1.5)
  points(1.5,2.0,pch=20);text(1.45,2.0, labels="-1")
  points(1.5,3.0,pch=20);text(1.45,3.0, labels="1")
  points(2.0,1.5,pch=20);text(2.0,1.40, labels="-1")
  points(3.0,1.5,pch=20);text(3.0,1.40, labels="1")
}
```

```
digquad(A,B,y,"A","B") # aplicação da função (plota gráfico)
"-----"
## Modelo 2 – fatores significativos
"-----"

mod2<-lm(y~A+B+C+D+A*B) # modelo com os fatores significativos
summary(mod2) # sumário do modelo 2

## Análise de variâncias para modelo 2
anova(mod2) # ANOVA

## Teste de falta de ajuste para o modelo 2
library(alr3) # carregando pacote
pureErrorAnova(mod2) # falta de ajuste (modelo 2)
resmod2<-residuals(mod2) # resíduos do modelo

par(mfrow=c(1,2)) # duas janelas
plot(mod2, which=c(1,2)) # gráficos para análise de resíduos (idem ao
modelo 1)
```

APÊNDICE E (continuação de B) – Cálculos e gráficos para o 3-metil-butanol ; exemplo para demonstrar a análise realizada com o planejamento fracionário em GC-FID, dos álcoois; códigos para o software R.

```
## Análise de resíduos
resmod2<-residuals(mod2) # resíduos do modelo 2

## Teste de Kolmogorov-Smirnov (normalidade dos resíduos)
ks.test(resmod2, "pnorm", mean=0, sd = sd(resmod2)) # normalidade
## Teste de Bartlett (homocedasticidade dos resíduos)
bartlett.test(resmod2,tt) # homocedasticidade
"-----"
# se p-valor > 0,05 resíduos tem distribuição normal e variâncias
homogêneas
"-----"

## Gráfico de probabilidade normal - (normalidade)
par(mfrow=c(1,2))
resord2<-sort(resmod2)
nr<-length(y)
quantis<-qnorm((1:nr-0.5)/nr)
plot(resord2,quantis,main="Gráfico de probabilidade normal",
      xlab="Resíduos", ylab="Quantis teóricos",pch=2)
abline(0,1,col="cyan3" )

# Gráfico dos valores preditos vs. resíduos (homocedasticidade)
vpred2<-predict(mod2)
plot(vpred2,resmod2,main="Gráfico dos valores preditos x resíduos",
      xlab="Valores preditos",ylab="Resíduos",pch=2)
abline(h=0,lty=2,col="cyan3")

## Imprime o gráfico - Valores absolutos dos efeitos
tiff("Plot_efeitoC8.tiff", width = 5, height = 4, units = 'in', res = 300)
par(mfrow=c(1,1))
## Gráfico de barras dos contrastes (valor absoluto)
barplot(sqrt(contrastess^2),ylab="Valores absolutos dos efeitos",
        xlab="Efeitos",col="snow2")
```

```
abline(h=max(contrastes)*0.10,lty=2,col="brown");
text(0.8,max(contrastes)*0.10+0.2, "10% MAX", col = "brown")
# linha correspondente a 10% do valor do maior contraste
dev.off()
"-----"
```

APÊNDICE F - Teste de recuperação para as amostras do caldo fermentativo

Tabela 16: Teste de recuperação para as amostras do caldo fermentativo; valores de concentrações avaliadas, médias obtidas (%) e coeficientes de variação (C.V.) para os padrões de etanol, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol, 2-metil-butanol e 2-fenil-etanol.

| Compostos | Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Média (%) | C.V. |
|------------------|--|-----------|------|
| Etanol | 5 | 95,3 | 7,4 |
| | 8 | 90,3 | 14,3 |
| | 20 | 88,6 | 17,6 |
| 2-Metil-propanol | 2 | 100,1 | 9,8 |
| | 3 | 77,0 | 11,7 |
| | 5 | 92,7 | 14,7 |
| 3-Metil-butanol | 2 | 94,3 | 15,4 |
| | 3 | 76,0 | 13,9 |
| | 5 | 96,7 | 8,9 |
| 2-Metil-butanol | 1 | 84,7 | 9,6 |
| | 2 | 73,3 | 13,7 |
| | 5 | 78,6 | 8,5 |
| 2-fenil-etanol | 1 | 104,6 | 4,7 |
| | 2 | 82,7 | 11,7 |
| | 5 | 91,0 | 12,2 |
| Média das médias | | 88,4 | 11,6 |

APÊNDICE G - Teste de recuperação para as amostras de extração dos gases de exaustão (por Xad-2)

Tabela 17: Teste de recuperação para as amostras da extração dos gases de exaustão (por Xad-2); valores de concentrações avaliadas, médias obtidas (%) e coeficientes de variação (C.V.) para os padrões de etanol, 2-metil-propanol, 3-metil-butanol e 2-metil-butanol.

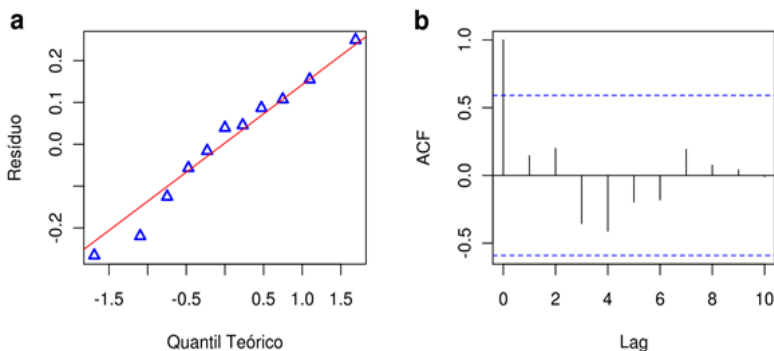
| Compostos | Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Média (%) | C.V. |
|------------------|---------------------------------------|-----------|------|
| Etanol | 5 | 68,0 | 18,8 |
| | 8 | 71,3 | 8,0 |
| | 20 | 75,0 | 31,4 |
| 2-Metil-propanol | 8 | 68,6 | 21,8 |
| | 13 | 69,3 | 18,3 |
| | 15 | 83,5 | 12,7 |
| 3-Metil-butanol | 8 | 85,3 | 28,2 |
| | 13 | 56,4 | 6,7 |
| | 15 | 67,4 | 27,0 |
| 2-Metil-butanol | 5 | 63,1 | 17,8 |
| | 6 | 76,2 | 8,0 |
| | 8 | 66,0 | 19,5 |
| Média das médias | | 70,8 | 18,2 |

APÊNDICE H - Testes estatísticos e gráficos usados na avaliação dos resíduos do modelo para o 2-metil-propanol; homocedasticidade, correlação e normalidade.

Tabela 18: Testes estatísticos para os resíduos do modelo do composto 2-metil-propanol; homocedasticidade e normalidade.

| Testes estatísticos | Valor de $p_{(calc)}$ | Interpretação |
|-----------------------|-----------------------|---|
| Breusch – Pagan (ncv) | 0,132 | $(p_{(calc)} > 0,05)$ Variâncias são constantes |
| Shapiro - Wilk | 0,914 | $(p_{(calc)} > 0,05)$ Aceita a normalidade |
| Anderson - Darling | 0,891 | $(p_{(calc)} > 0,05)$ Aceita a normalidade |
| Kolmogorov - Smirnov | 0,952 | $(p_{(calc)} > 0,05)$ Aceita a normalidade |

Figura 34: Gráficos para avaliar os resíduos do modelo do composto 2-metil-propanol; a) gráfico de probabilidade normal dos resíduos; b) gráfico de auto-correlação cruzada.



Interpretação dos gráficos:

a) pontos próximos da reta normal indicam que não ocorre fuga da assimetria ou da distribuição (curtose). Portanto, os resíduos do modelo tem distribuição normal.

b) as barras (lag) não ultrapassam as linhas pontilhadas, isso indica que não ocorre correlação entre os valores dos resíduos (lag = 0 é a referência para correlação =1).