

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTO
AGROINDUSTRIAL (FARELO DE MILHO) PARA
OBTENÇÃO DE PIGMENTOS NATURAIS ATRAVÉS DA
FERMENTAÇÃO SUBMERSA E SÓLIDA COM *Monascus*
purpureus

Autora: Adrielle Borges de Almeida
Orientadora: Dr^a. Mariana Buranelo Egea
Coorientador: Dr. Fabiano Guimarães Silva

Rio Verde - GO
Fevereiro - 2019

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTO
AGROINDUSTRIAL (FARELO DE MILHO) PARA
OBTENÇÃO DE PIGMENTOS NATURAIS ATRAVÉS DA
FERMENTAÇÃO SUBMERSA E SÓLIDA COM *Monascus*
purpureus

Autora: Adrielle Borges de Almeida
Orientadora: Dr^a. Mariana Buranelo Egea
Coorientador: Dr. Fabiano Guimarães Silva

Dissertação apresentada, como exigência para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA no programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Agroquímica Orgânica.

Rio Verde - GO
Fevereiro – 2019

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

AAL447

a

Almeida, Adrielle Borges
APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTO AGROINDUSTRIAL
(FARELO DE MILHO) PARA OBTENÇÃO DE PIGMENTOS
NATURAIS ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA E SÓLIDA
COM

Monascus purpureus / Adrielle Borges Almeida;
orientadora Mariana Buranelo Egea; coorientador
Fabiano Guimarães Silva. -- Rio Verde, 2019.
63 p.

Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Instituto
Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2019.

1. Ascomicetos. 2. Corante. 3. Zea mays. I. Egea,
Mariana Buranelo, orient. II. Silva, Fabiano
Guimarães, co-orient. III. Título.

Responsável: Johnathan Pereira Alves Diniz - Bibliotecário-Documentalista CRB-1 nº2376

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTO
AGROINDUSTRIAL (FARELO DE MILHO) PARA
OBTENÇÃO DE PIGMENTOS NATURAIS ATRAVÉS
DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA E SÓLIDA COM O
FUNGO *Monascus purpureus***

Autora: Adrielle Borges de Almeida
Orientadora: Mariana Buranelo Egea

TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica – Área de concentração
Agroquímica.

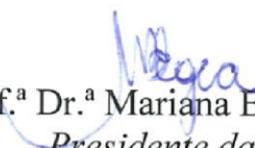
APROVADA em 27 de fevereiro de 2019.



Prof. Dr. Ailton César Lemes
Avaliador externo
IF Goiano/Morrinhos



Prof. Dr. Leandro Pereira Cappato
Avaliador externo
IF Goiano/RV



Prof.^a Dr.^a Mariana Buranelo Egea
Presidente da banca
IF Goiano/RV

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus, que é meu refúgio, meu guia, inspiração e companhia de todos os momentos. Quem Nele crê tudo pode!

Em especial agradeço minha mãe Marcilene, que é uma guerreira, gentilmente me acolhia nos dias mais difíceis e partilhava das minhas maiores alegrias, te amo mãe, obrigada por tudo.

A minha irmã, Anna Caroline que sempre me apoiou, cuidou, carregou e me ouviu. Que Deus continue lhe abençoando grandemente.

A todos os meus familiares, pai, tias, tios, primos e primas, obrigada por servirem de incentivo e motivação

Ao meu namorado Jean, por entender todas as vezes que não pude ou não tinha disposição por ir a algum evento familiar.

As minhas amigas, Thyanara (quem segurou minha mão e não me deixou desistir, por inúmeras vezes), Ariadne, Silvelly (que pesou farelo, e me fazia sorrir nas horas difíceis), Daiane (obrigada por me deixar usar sua bomba a vácuo por meses), Railany, Josemar (que tanto me ajudou a dar os primeiros passos com meu fungo), Tainara, Corina, Daniele, que fazem parte dessa caminhada e sempre estiveram ao meu lado.

A equipe LaBBio, obrigada a cada uma de vocês meninas. A Nathalia por ter topado compartilhar executar esse trabalho tornando meus dias mais alegres.

A Mariana (carinhosamente apelidada de mãe, pois quem tem a oportunidade de trabalhar com ela sabe que é assim que ela age), por sempre ter acreditado em mim, por sorrir e chorar junto comigo, por ser minha amiga.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Adrielle Borges de Almeida, filha de Marcilene Ferreira Borges de Almeida e Marcos Antonio de Almeida, nasceu em 11 de novembro de 1994, na cidade de Rio Verde, Goiás.

Em março de 2012, ingressou no curso de Engenharia de Alimentos pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Goiás, graduando-se em março de 2017. Durante a graduação foi bolsista CNPq por dois anos e meio na área de compostos bioativos em alimentos.

Em março de 2017, iniciou no Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, sob a orientação da Professora Dr.^a Mariana Buranelo Egea.

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução.....	1
2. Referências	3
3. Objetivos.....	6
3.1 Geral	6
3.2 Específicos – Capítulo I.....	6
3.3 Específicos – Capítulo II	6
Capítulo I – Fermentação em estado sólido de farelo de milho utilizando <i>Monascus purpureus</i>	8
1. Introdução.....	10
2. Materiais e métodos.....	10
2.1 Substrato e processo fermentativo	10
2.2 Composição proximal e propriedades tecnológicas	11
2.3 Análise estatística	12
3. Resultados e discussão	13

3.1 Condições de fermentação.....	13
3.2 Composição proximal e propriedades tecnológicas	16
4. Conclusão	17
5. Agradecimentos.....	17
6. Referências	18
Capítulo II - Otimização da fermentação submersa utilizando <i>Monascus purpureus</i> para produção de pigmentos.....	21
1. Introdução.....	23
2. Materiais e métodos.....	23
2.1.1 Micro-organismo	23
2.1.2 Manutenção de células viáveis	24
2.1.3 Conservação da cepa	24
2.1.4 Preparo do inóculo.....	24
2.2 Farelo de milho.....	25
2.2.2 Determinação do ph e sólidos solúveis	27
2.2.3 Capacidade antioxidante.....	27
2.2.4 Compostos bioativos	28
2.3 Fermentação submersa	30
2.3.2 Delineamento experimental.....	30
2.3.4 Cinética da produção de pigmentos.....	31
2.3.5 Caracterização dos pigmentos	31
2.3.6 Análises estatísticas	32
3. Resultados e discussão	32
3.1 Caracterização química do farelo de milho.....	32
3.2 Maximização da fermentação submersa para produção de pigmentos vermelho	33
3.3 Cinética da produção de pigmentos.....	38
3.4 Estabilidade dos pigmentos	38

3.5 Identificação dos compostos.....	39
3.6 Atividade antioxidante.....	40
4. Conclusão	40
5. Agradecimentos	41
6. Referências	41
4. Anexos	45

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Reprodução assexuada e sexuada do <i>Monascus purpureus</i>	14
-----------------------------------------------------------------------------	----

CAPÍTULO II

Figura 1. <i>Slants</i> com cepa de <i>Monascus purpureus</i>	24
Figura 2. Repique para conservação da cepa	24
Figura 3. Regiões de contagem utilizadas na câmara de Neubauer	25
Figura 4. Superfície de resposta da produção de pigmentos por <i>Monascus purpureus</i> no ensaio 1	36
Figura 5. Superfície de resposta da produção de pigmentos por <i>Monascus purpureus</i> no ensaio 2	38
Figura 6. Maximização de múltipla resposta dos tratamentos no ensaio 2	39
Figura 7. Cinética de produção de pigmentos	40
Figura 8. Espectro IV dos pigmentos	41

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I:

Tabela 1. Valores médios dos parâmetros de cor dos pigmentos produzidos por <i>Monascus purpureus</i> ATCC 36928 a temperatura de 16°C	13
Tabela 2. Valores médios dos parâmetros de cor dos pigmentos produzidos por <i>Monascus purpureus</i> ATCC 36928 a temperatura de 24°C	14
Tabela 3. Valores médios dos parâmetros de cor dos pigmentos produzidos por <i>Monascus purpureus</i> ATCC 36928 a temperatura de 32°C	15
Tabela 4. Composição proximal e propriedades tecnológicas do farelo de milho e farelo de milho fermentado	16

CAPÍTULO II:

Tabela 1. Delineamento experimental utilizado para produção de pigmentos no Ensaio 1	31
Tabela 2. Delineamento experimental utilizado para produção de pigmentos no Ensaio 2	32
Tabela 3. Caracterização química do FM	34
Tabela 4. Pigmentos produzidos na fermentação submersa com <i>Monascus purpureus</i> durante os dois ensaios	35
Tabela 5. ANOVA para produção de pigmentos no ensaio 1	36

Tabela 6. Coeficiente de regressão para a resposta produção de pigmentos vermelhos no ensaio 1	36
Tabela 7. Coeficiente de regressão para a resposta produção de pigmentos 500 nm	37
Tabela 8. Estabilidade dos pigmentos em diferentes pH em função do tempo	40
Tabela 9. Atividade antioxidante do FM e pigmentos produzidos por <i>Monascus purpureus</i>	42

LISTA DE ABREVIACOES

- ABTS - (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico))
- AOAC - Official Methods of Analysis
- BDA – Batata Dextrose gar
- DPPH - (2,2-difenil-1picril-hidrazila)
- EAF – Equivalente de ácido ferúlico
- EAG – Equivalente de ácido gálico
- ESF – Equivalente de sulfato ferroso
- FES – Fermentaco em estado sólido.
- FM – Farelo de milho
- FMF – Farelo de milho fermentado.
- FRAP – Reduco do ferro
- HMG-CoA redutase - 3-hidroxi-3-metil glutaril coenzima A
- IAL – Instituto Adolfo Lutz
- M. purpureus* – *Monascus purpureus*
- TPTZ - (2,4,6-Tris(2-piridil) -s-triazina)
- TROLOX - (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico)

RESUMO

ALMEIDA, A.B. **Aproveitamento de subproduto agroindustrial (farelo de milho) para obtenção de pigmentos naturais através da fermentação submersa e sólida com *Monascus purpureus***. 2019. Dissertação apresentada ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, como parte das exigências da Pós-Graduação – Mestrado em Agroquímica.

O *Monascus purpureus* tem sido utilizado há décadas para a produção de metabólitos secundários, como pigmentos e a lovastatina, por causa da procura por produtos naturais para a substituição de compostos sintéticos. A produção dos pigmentos se dá por processo fermentativo. O objetivo do presente estudo foi produzir pigmentos por fermentação sólida e líquida utilizando como substrato o farelo de milho (FM). Após a inoculação foi realizado estudo para obtenção dos parâmetros ideais de fermentação. O FM foi analisado quanto a cor, composição proximal (umidade, cinzas, proteínas, carboidratos e lipídeos), disponibilidade de compostos bioativos (carotenoides totais, ácido ascórbico, compostos fenólicos totais) e potencial antioxidantes pelos métodos de DPPH, FRAP e ABTS. A produção de pigmentos foi monitorada em espectrofotômetro UV-vis para escolha do tratamento maximizado. Na fermentação em estado sólido, os resultados de cor obtidos evidenciam que durante a reprodução assexuada houve inibição dos pigmentos. Comparando o FM e o farelo de milho fermentado (FMF) quanto a composição centesimal houve aumento na quantidade de lipídeos e diminuição dos carboidratos, elucidando como ocorre o metabolismo primário do *M. purpureus*. O FM caracterizado como compostos majoritários lipídeos e carboidratos. A maximização da fermentação

submersa resultou no tratamento com +1,41 de [peptona] e +1,41 [FM]. Durante a cinética, após o 6º dia de produção de pigmentos houve estabilidade. Os pigmentos extraídos apresentaram estabilidade térmica e a $\text{pH} > 5,0$. Os pigmentos demonstraram maior atividade antioxidante que o substrato utilizado.

PALAVRAS-CHAVE: Ascomiceto; Corante; *Zea Mays*

ABSTRACT

ALMEIDA, A.B. Use of agro-industrial by-products (maize) to obtain natural pigments by submerge and solid fermentation with *Monascus purpureus*. 2019. Dissertation presented to the Goiano Federal Institute - Rio Verde Campus - GO, as part of the requirements of the Postgraduate - Master's degree in Agrochemistry.

Monascus purpureus has been used for decades to produce secondary metabolites, such as pigments and lovastatin, due to the search for natural products to replace synthetic compounds. The pigments production is by fermentative process. The objective of the present study was to produce pigments by solid and liquid fermentation using corn meal (CM) as substrate. After inoculation, a study was carried out to obtain the ideal fermentation parameters. The CM was analyzed for color, proximal composition (moisture, ashes, proteins, carbohydrates and lipids), bioactive compounds availability (total carotenoids, ascorbic acid, total phenolic compounds) and potential antioxidants by DPPH, FRAP and ABTS methods. The pigment production was monitored in a UV-vis spectrophotometer for the choice of the maximized treatment. In the solid state fermentation the obtained color results evidences that during the asexual reproduction there was inhibition of the pigments. Comparing CM and fermented corn meal (FCM) with centesimal composition, there was an increase in the lipids and a decrease in carbohydrates amounts, explaining how the primary metabolism of *M. purpureus* occurs. CM presented as major lipid compounds and carbohydrates. Maximization of submerged fermentation resulted in treatment with +1.41 [peptone] and +1.41 [CB]. During the kinetics the 6th day of pigment production was already equal to the 20th day. The

pigments extracted showed thermal stability and $\text{pH} > 5.0$. The pigments showed higher antioxidant activity than the substrate used.

KEYWORDS: Ascomycete; Dye; Zea Mays

1. INTRODUÇÃO

Os fungos filamentosos entre eles os ascomicetos, são um grupo de interesse biológico capaz de produzir ampla gama de metabólitos, como enzimas, pigmentos, vitaminas, antibióticos e compostos bioativos e por isso, são aplicados na indústria alimentícia, têxtil e farmacêutica (SCHOBERLE et al., 2013). São conhecidos como produtores prolíficos de metabólitos secundários, um recurso importante para descobrir pequenas moléculas de produtos fármacos (como penicilina, ciclosporina, etc.), ou aditivos como pigmentos alimentares (DUFOSSE et al., 2014).

O gênero *Monascus* é comercialmente conhecido por sua capacidade de produção de pigmentos. Estes pigmentos são obtidos por processos biotecnológicos e configuram-se como promissores aditivos de cor (BÜHLER, 2013). A busca por produtos naturais para a substituição de compostos adicionados em alimentos de origem sintética tem despertado o interesse de pesquisadores. Vários pigmentos naturais aplicados em alimentos, além de conferir cor, podem promover benefícios à saúde (VOLP et al., 2009). Dentre as substâncias relacionadas à promoção do bem-estar e efeitos funcionais nos alimentos destacam-se pigmentos produzidos por *Monascus*.

Os pigmentos de cor laranja, monascorubrina e rubropunctatina, são sintetizados no citosol, a partir da acetilcoenzima A, por meio do complexo multienzimático policetídeo sintase. Estes pigmentos têm a estrutura responsável pela sua alta afinidade a compostos contendo grupos amino primários. As reações com aminoácidos levam a formações de pigmentos vermelhos solúveis, como monascorubramina e rubropunctamina (CARVALHO et al., 2003).

Dentre estes pigmentos, o vermelho (monascorubramina e rubropunctamina) apresenta maior valor comercial, pela sua aplicação em alimentos (YOSHIZAKI et al., 2010). O alto interesse biotecnológico deste corante está, também, associado com a sua estabilidade ao calor e a faixa de pH de 2 a 10 (MAPARI et al., 2005), que inclui a maioria dos alimentos. Em comparação com os pigmentos extraídos de plantas e animais, os micro-organismos são fontes de pigmentos mais atraentes, uma vez que não apresentam impedimentos sazonais e podem ser produzidos com alto rendimento (CARVALHO et al., 2006).

Além dos pigmentos, esses micro-organismos produzem outros metabolitos de interesse comercial como, por exemplo, a lovastatina. Este composto pertencente ao grupo das estatinas, são inibidores da 3-hidroxi-3-metil glutaril coenzima A (HMG-CoA redutase), e por isso, são utilizados no tratamento de pacientes que sofrem de hipercolesterolemia e que apresentam pré-disposição em ter doenças cardiovasculares (ANGARITA et al., 2012).

Lin e colaboradores (2005), avaliaram o efeito de redução de lipídios e a segurança do consumo de *M. purpureus*, em pacientes com hiperlipidemia. Houve redução significativa nas concentrações do colesterol lipoproteico de baixa densidade em 27,7%, colesterol total em 21,5%, triglicerídeos em 15,8% e apolipoproteína B (apo-B) em 26%. Zheng et al. (2010) sugeriram que os pigmentos *Monascus* são citotóxicos para células cancerosas humanas. No entanto, eles também podem produzir citrinina (micotoxina), o que demonstrou exercer efeito tóxico no fígado e nos rins, mostrando que a quantidade ingerida deverá ser dosada. Em estudo realizado por Chen e colaboradores (2011), compostos isolados de *Monascus purpureus* apresentaram efeitos antifúngicos contra *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*. Razak et al. (2015), avaliaram o efeito da fermentação em estado sólido (FES) utilizando dois tipos de fungos, entre eles os *Monascus*, sobre o teor de ácido fenólico e a atividade antioxidante e foi observado aumento da atividade antioxidante geral e o conteúdo de ácido fenólico no farelo de arroz.

A produção desses metabólitos é relacionada a vários fatores, como o tipo de fermentação (sólida ou submersa) a espécie de micro-organismos, pH, fontes de carbono, nitrogênio, nutrientes, oxigênio dissolvido e aeração. De acordo com Ya-Jie e Jian-Jiang (2003), o oxigênio afeta o crescimento celular, a morfologia, a absorção de nutrientes e a biossíntese de metabólitos.

A utilização de resíduos agroindustriais como substratos em processos de fermentação fornece uma alternativa de adição e valor agregado a esses resíduos, que

algumas vezes são subutilizados ou não utilizados para fins específicos (PANDEY, 2003). O farelo de milho (FM) é o subproduto mais abundante e de menor valor agregado ao processo industrial de moagem de milho, apesar de conter grandes quantidades de conteúdo de polissacarídeo com quantidades marginais de lignina (YADAV et al., 2016).

O farelo é a camada externa dos cereais, é muitas vezes descartado durante o processo de moagem, em vez de ser usado como aplicação alimentar, por causa das expectativas sensoriais dos consumidores e das desvantagens tecnológicas na indústria de alimentos (CODA et al., 2015). O descarte do farelo é uma das principais preocupações das indústrias de alimentos no cumprimento das regulamentações ambientais (ELMEKAWY et al., 2013).

Tem sido amplamente utilizado na alimentação animal pelo seu custo relativamente baixo. O FM consiste principalmente de fibra insolúvel celulose e hemicelulose. Este farelo de milho parcialmente indigerível contém muitos componentes bioativos, como a goma de fibra de milho, o gel de fibra celulósica e os xilooligosacarídeos (ROSE et al., 2010).

A maioria dos polissacarídeos vegetais como o FM não pode ser digerido diretamente por enzimas em humanos e animais monogástricos, mas eles podem ser degradados por comunidades bacterianas do cólon (SONNENBURG; SONNENBURG, 2014). Por isso, quando se realiza a adição deste subproduto na alimentação, ela deve ser previamente estudada. Diversas tecnologias de processamento, como a fermentação em estado sólido, têm sido aplicadas ao FM como esforço para melhorar o valor nutritivo e aumentar a sua utilização (LIU et al., 2017).

2. REFERÊNCIAS

ANGARITA, C. C.; RAMIREZ, I. J. N.; ATEHORTÚA, L.; SEPÚLVEDA, L. J. Las estatinas: actividad biológica y producción biotecnológica. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 14, p. 157-178, 2012.

BÜHLER, R. M. M. **Produção de pigmentos por *Monascus ruber* utilizando co-produtos da produção do biodiesel**. 183f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

CARVALHO, J. C., PANDEY, A., BABITHA, S., SOCCOL, C. R., 2003. Production of *Monascus* biopigments: An Overview. **Agro Food Industry Hi-tech**, Milão, v. 14, p. 37–42. 2003.

CARVALHO, J. C., PANDEY, A., OISHI, B. O., BRAND, D., RODRIGUEZ-LÉON, J. A., & SOCCOL, C. R. Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 29, p. 262–269, 2006.

DUFOSSÉ L., FOUILLAUD M., CARO Y., MAPARI S. A., SUTTHIWONG N. Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Curr. Opin. Biotechnol.** v. 26, p.56–61, 2014.

ELMEKAWY, A.; DIELS, L.; WEVER, H. DE; PANT, D. Valorization of cereal based biorefinery byproducts: reality and expectations. **Environ. Sci. Technol.**, v. 47, p. 9014-9027, 2013.

LIN C.C, LI TC, LAI MM. Efficacy and safety of *Monascus purpureus* Went rice in subjects with hyperlipidemia. **Eur J Endocrinol.** v.153, p.679–686, 2005.

LIU, P.; ZHAO, J.; GUO, P.; LU, W.; GENG, Z.; LEVESQUE, C. L.; Dietary corn bran fermented by *Bacillus subtilis* ma139 decreased gut cellulolytic bacteria and microbiota diversity in finishing pigs. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v.7, p. 256, 2017.

MAPARI, S. A. S.; NIELSEN, K. F.; LARSSSEN, T. O. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current Opinion Biotechnololy**, Cambridge, v. 16, p. 231–238, 2005.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p.81-84, 2003.

RAZAK, D. L. A.; RASHID, N Y. A.; JAMALUDDIN, A.; SHARIFUDIN, S. A.; LONG, K. Enhancement of phenolic acid content and antioxidant activity of rice bran fermented with *Rhizopus oligosporus* and *Monascus purpureus*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnolog**, v.4, p.33-38, 2015.

ROSE, D. J.; INGLETT, G. E.; AND LIU, S. X. Utilisation of corn (*Zea mays*) bran and corn fiber in the production of food components. **J. Sci. Food Agric.** v. 90, p. 915–924, 2010.

SCHOBERLE, T. J.; NGUYEN-COLEMAN, C. K.; GREGORY, S. May Plasmids for increased efficiency of vector construction and genetic engineering in filamentous fungi.

Fungal Genetics na Biology, v. 58-59, p. 1-9, 2013.

SONNENBURG, E. D., SONNENBURG, J. L. Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. **Cell Metab**, v. 20, p. 779–786, 2014.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos.

Alimentos e Nutrição, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

YADAV, M. P.; HICKS, K. B.; JOHNSTON, D. B.; HOTCHKISS, A.; CHAU, H. K.; HANAH, K. Production of bio-based fiber gums from the waste streams resulting from the commercial processing of corn bran and oat hulls. **Food Hydrocolloids**, v. 53

p. 125-133, 2016.

YA-JIE, T.; JIAN-JIANG, Z. Role of oxygen supply in submerged fermentation of *Ganoderma lucidum* for production of *Ganoderma* polysaccharide and ganoderic acid.

Enzyme and Microbial Technology, v.32, p. 478-484, 2003.

YOSHIZAKI, Y.; SUSUKI, T.; TAKAMINE, H.; ITO, K.; SAMESHIMA, Y. Characterization of glucoamylase and α -amilase from *Monascus anka*: Enhanced production of α -amilase in red koji. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.110,

n. 6, p. 670-674, 2010.

ZHENG, Y.; XIN, Y.; SHI, X.; GUO, Y. Cytotoxicity of *Monascus* pigments and their derivatives to human cancer cells. **J. Agric. Food Chem.** v.58, p.9523–9528, 2010.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Aproveitar o subproduto agroindustrial (farelo de milho), para obtenção de pigmentos naturais através da fermentação sólida e submersa com o fungo *Monascus purpureus*.

3.2 ESPECÍFICOS – CAPÍTULO I

- Avaliar a influência da temperatura, tempo e quantidade de inóculo na produção dos pigmentos.
- Verificar a produção de pigmentos através de análise de cor (L^* , a^* , b^* , croma e hue) em espectrofotômetro de cor.
- Comparar a composição proximal do farelo de milho antes e após a fermentação.

3.3 ESPECÍFICOS – CAPÍTULO II

- Caracterizar o farelo de milho quanto a composição proximal (cinzas, proteínas, teor de água, carboidratos e lipídeos).
- Quantificar os compostos bioativos (fenólicos totais, carotenoides, ácido ascórbico) e a capacidade antioxidante (DPPH, FRAP e ABTS) do farelo de milho.

- Utilizar o delineamento experimental fatorial utilizando duas variáveis independentes (farelo de milho e peptona) e três pontos centrais na modelagem de superfície de resposta.

- Quantificar os pigmentos produzidos durante a fermentação submersa.
- Definir o melhor tratamento para produção de pigmentos.
- Utilizar o tratamento otimizado para realizar a cinética de produção de pigmentos.
- Caracterização dos pigmentos em diferentes valores de pH e temperaturas.

CAPÍTULO I – FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO DE FARELO DE MILHO UTILIZANDO *Monascus purpureus*

RESUMO: A fermentação em estado sólido é uma alternativa para o aproveitamento dos resíduos agroindustriais, conferindo a eles o aumento das funcionalidades biológicas. O objetivo foi avaliar a influência da reprodução do *Monascus purpureus* durante o processo fermentativo para obter pigmentos. Foram realizadas as análises de cor em espectrofotômetro (L^* , a^* , b^*) e calculados croma e hue durante a cinética que considerou o tempo, proporção de inóculo e temperatura. A composição proximal do farelo de milho (FM) e farelo de milho fermentado (FMF) foi avaliada através das análises de: lipídeos, carboidratos, teor de água, cinzas e proteínas, posteriormente sendo calculado o valor calórico. Foram avaliadas as propriedades tecnológicas: capacidade de absorção em água, atividade emulsificante e solubilidade em água. Os resultados de cor obtidos evidenciam que durante a reprodução assexuada houve inibição dos pigmentos. Comparando o FM e o FMF quanto a composição centesimal houve aumento na quantidade de lipídeos e diminuição dos carboidratos, elucidando como ocorre o metabolismo primário do *M. purpureus*. Não houve diferença estatística entre a atividade emulsificante e solubilidade em água do FMF.

PALAVRAS-CHAVE: corante natural, assexuada, sexuada, Ascomicetos.

FERMENTATION IN SOLID STATE OF CORN BRAIN USING
Monascus purpureus

ABSTRACT: Solid-state fermentation is an alternative to use agroindustrial residues, giving them an increase in biological functionalities. The objective was to evaluate the influence of *Monascus purpureus* reproduction during the fermentation process to obtain pigments. Color spectrophotometer (L *, a *, b *) analyzes were performed and chroma and hue were calculated during kinetics, considering time, inoculum ratio and temperature. The proximal composition of corn meal (CM) and fermented corn meal (FCM) was evaluated by analyzing: lipids, carbohydrates, water content, ashes and proteins, after which the caloric value was calculated. The following properties were evaluated: water absorption capacity, emulsifying activity and water solubility. The obtained color results show that during asexual reproduction there was inhibition of the pigments. Comparing CM and FCM for the centesimal composition, there was an increase in the lipids and a decrease in carbohydrates amounts, thus elucidating how the primary metabolism of *M. purpureus* occurs. There was no statistical difference between the emulsifying activity and water solubility of FCM.

KEY WORDS: natural dye, asexual, sexual, Ascomycetes.

1. Introdução

A fermentação, particularmente em estado sólido (FES), é um processo biotecnológico que pode ser utilizado como método alternativo para melhorar as funcionalidades biológicas de resíduos agrícolas (RAZAK et al., 2015). Estudos como este já foram conduzidos por Lateef et al. (2008) que relataram que a FES aumentou a qualidade nutricional e as atividades antioxidantes de diferentes resíduos sólidos, como a torta de dendê, casca de cacau e casca de mandioca.

O farelo de milho (FM) é o subproduto mais abundante e de menor valor agregado do processo industrial de moagem de milho para obtenção de *grits* cervejeiro ou após a extração de óleo (YADAV et al., 2016). O FM é constituído da camada externa dos cereais, já que o endosperma é usado para a produção do *grits*, e é muitas vezes ele é descartado ou usado para alimentação animal pelo seu baixo valor comercial, quando na verdade poderia ser utilizado na alimentação humana (CODA et al., 2015; GUIMARÃES et al., 2019; SOUSA et al., 2019).

A FES utilizando o fungo filamentosso *Monascus purpureus* vem sendo utilizada há décadas, para a produção de pigmentos, como os vermelhos (denominados de monascorubramina e rubropunctamina) que apresentam valor comercial, pela sua aplicação em alimentos (YOSHIZAKI et al., 2010). Além disso, esses micro-organismos produzem outros metabólitos de interesse comercial como, por exemplo, a lovastatina. Este composto pertencente ao grupo das estatinas, são inibidores da 3-hidroxi-3-metil glutaril coenzima A (HMG-CoA redutase), a enzima determinante da síntese de colesterol (ANGARITA et al., 2012; CHILDRESS et al., 2013).

Com este trabalho objetivou-se o aproveitamento do FM na FES utilizando fungo *Monascus*.

2. Materiais e métodos

2.1 Substrato e processo fermentativo

O fungo *Monascus purpureus* ATCC 36928 foi adquirido do Centro de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisas “André Tosello” (Campinas, São Paulo – Brasil). O repique da cepa foi realizado em meio ágar batata dextrose (BDA), o crescimento em BOD a 30°C por 7 dias e a preservação da cepa a 4°C por 30 dias.

O FM foi cedido por uma agroindústria produtora de *grits*, fubá, canjica situada em Rio Verde – Goiás, e armazenado a 7°C.

Testes preliminares identificaram que um teor de água menor que 12% no FM dificultaria o crescimento e produção dos pigmentos e, por isso a proporção 1:1 foi escolhida para o acompanhamento da FES.

Com o objetivo de determinar os parâmetros fermentativos que proporcionariam a melhor atividade do *M. purpureus*, testou-se o tempo (4, 8, 12 e 16 dias), a temperatura (16, 24 e 32°C) e quantidade de esporos (10^5 , 10^6 e 10^7 mL⁻¹). Para isso, o FM foi submetido a estas condições e o farelo de milho fermentado (FMF) foi avaliado quanto a cor em espectrofotômetro (L*, a*, b*, croma e ângulo hue).

Os parâmetros de cor L*, a*, b*, Croma (C*) e hue (h°) do FM e FMF foram determinados segundo Blandino et al. (2013), em espectrofotômetro de cor (ColorFlex EZ, HunterLab).

O microscópio eletrônico (Olympus, DP73) foi utilizado para obter as imagens do *Monascus purpureus* com a lente aumento em 40 vezes.

2.2 Composição proximal e propriedades tecnológicas

A composição proximal, valor calórico foram realizadas de acordo com os métodos descrito pela AOAC (1995). O teor de água (método 012/IV, IAL 2008) foi determinado por gravimetria, em que 3 g de farelo foram secos em estufa a 105°C até atingir peso constante. O resíduo mineral fixo (método 900.02) foi quantificado por incineração em mufla a 550°C, e 3 g de farelo foram colocados em cadinhos de porcelana até obter cinzas de cores claras. A determinação do conteúdo proteico foi realizada pelo método de micro Kjeldahl (método 991.20), utilizando normalidade do HCl de 0,1 e como fator de conversão de nitrogênio em proteína 5,9. O teor de lipídeos foi extraído por método de Soxhlet (método 920.39 C), utilizando como solvente o éter de petróleo, por 8 horas. O teor de carboidratos foi determinado por diferença utilizando 100% menos a quantidade de água, cinzas, proteínas, lipídeos da amostra. O valor calórico total foi calculado aplicando-se os valores de conversão para carboidratos (4,0 kcal), lipídios (9,0 kcal) e proteína (4,0 kcal). Após a cinética e definição do melhor tratamento para fermentação, foi realizada a inoculação de *M. purpureus* no substrato e após este processo, realizou-se a caracterização tecnológica do FMF.

Para a determinação da capacidade de absorção de água (CA), 0,5 g de FMF foi adicionado de 25 mL de água em tubos Falcon, agitados por 1 minuto e centrifugados a 5300 rpm por 20 min. O sobrenadante foi utilizado para a determinação da solubilidade em água (SA) e a CA calculada de acordo com Equação 1. O líquido sobrenadante foi colocado em placa de Petri e submetido a secagem até peso constante e o resultado calculado pela Equação 2 (OKEZIE e BELLO, 1988).

$$\text{Capacidade de absorção de água (CAA)} = \frac{\text{água absorvida pela amostra (g)}}{\text{peso da amostra (g)base seca}} \quad (1)$$

$$\text{Solubilidade em água (SA)} = \frac{\text{resíduo da evaporação (g)}}{\text{peso da amostra (g)}} \quad (2)$$

A atividade emulsificante foi realizada pesando 1 g de amostra, 10 mL de água e 10 mL de óleo de soja e a mistura foi agitada e distribuída em tubos Falcon graduados de 15 ml. Após isso, centrifugou-se a 3000 rpm por 5min, e a atividade emulsificante foi calculada a partir da Equação 3 (OGUNWOLU et al., 2009).

$$\text{Atividade Emulsificante (AE)} = \frac{\text{camada emulsificada (mL)}}{\text{volume total no tubo (mL)}} \quad (3)$$

O pH foi mensurado pelo método 017/IV, conforme o IAL (2008). Dessa forma, 10 g de FM foram pesados em béquer e adicionados de 100 mL de água destilada. Após a agitação foi feita leitura direta em medidor de pH (HI 2223, Hanna).

2.3 Análise estatística

Os resultados obtidos durante a cinética de fermentação e composição proximal foram submetidos a análise de variância, seguidos pelo teste t ($p < 0,05$), comparando as diferentes condições de fermentação com a amostra controle utilizando o programa Sisvar 5.6.

3. Resultados e discussão

3.1 Condições de fermentação

Os resultados da análise colorimétrica durante os dezesseis dias de fermentação utilizando o 10^5 , 10^6 , 10^7 esporos mL^{-1} a 16°C estão apresentados na Tabela 1. Nenhuma diferença significativa foi encontrada para o parâmetro a^* entre o tratamento controle e demais tratamentos. Isso indicou que durante este período não houve produção de pigmentos pelo fungo *M. purpureus* em FM, demonstrado pela variação da cor branca (maior valor de L^*) e b^* (tonalidade amarela, característica do farelo). Isso pode ter acontecido pela característica bissexuada do fungo e quando reprodução assexuada (anamórfico) acontece a inibição da produção de pigmentos diferente do que acontece no estágio sexuado (teleomórfico) (TAKAHASHI et al., 2017) como demonstrado na Figura 1A e 1 B, respectivamente.

Tabela 1. Valores médios dos parâmetros de cor dos pigmentos produzidos por *Monascus purpureus* ATCC 36928 a temperatura de 16°C

Tratamentos	Dias	L^*	a^*	b^*	Croma	Hue
Controle	4	56,21	7,65	34,21	35,05	77,40
	8	53,36	6,50	30,09	30,79	77,75
	12	63,64	6,70	34,57	35,21	79,03
	16	52,39	8,55	32,68	33,81	75,48
10^5	4	50,96*	6,89	30,84*	31,60*	77,39
	8	58,84	7,65	35,91*	36,72*	77,96
	12	55,31*	7,49	27,70*	28,72*	74,63
	16	61,48	12,13	20,17*	24,14*	58,11
10^6	4	54,59	7,63	33,22	34,09	77,06
	8	58,62	7,59	36,77*	37,55*	78,32
	12	56,80*	8,64	26,78*	28,22*	71,90
	16	60,78*	10,72	17,81	21,44	54,81
10^7	4	52,53	6,71	31,53	32,24	77,99
	8	57,66	8,36*	36,39*	37,34*	77,07
	12	52,04*	6,38	23,50*	24,40*	74,57
	16	68,87*	3,39	18,39	18,71	81,08

L^* : luminosidade (branco ao preto); a^* : intensidade de verde (-) e vermelho (+); b^* : intensidade de azul (-) e amarelo (+); Croma: cromaticidade; hue*: ângulo de tonalidade.

(*) demonstra diferença significativa pelo Teste de T ($p < 0,05$), entre o controle e tratamento.

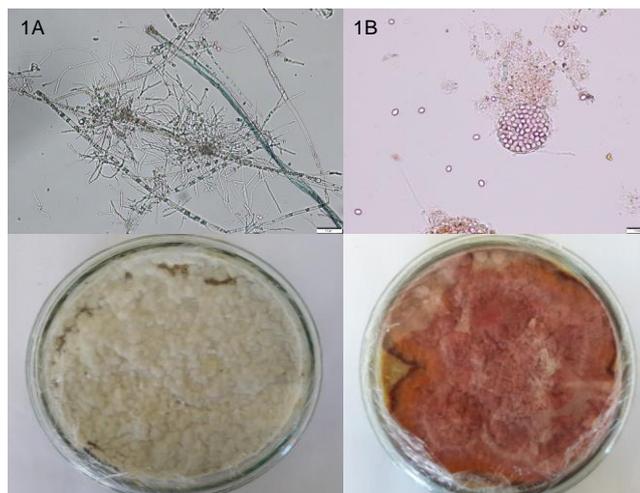


Figura 1. Reprodução assexuada e sexuada do *Monascus purpureus*

Os resultados de cor durante os dezesseis dias de fermentação utilizando o 10^5 , 10^6 , 10^7 esporos mL^{-1} a 24°C estão apresentados na Tabela 2. No entanto, diferenças pontuais foram encontradas entre os parâmetros de cor do tratamento controle e do FMF.

Tabela 2. Valores médios dos parâmetros de cor dos pigmentos produzidos por *Monascus purpureus* ATCC 36928 a temperatura de 24°C

Tratamentos	Dias	L*	a*	b*	Croma	Hue
Controle	4	60,22	6,43	32,62	6,78	78,85
	8	55,39	5,92	31,06	31,63	79,14
	12	64,07	6,08	34,17	34,71	79,90
	16	60,46	5,17	29,05	29,51	79,91
10^5	4	58,01	6,41	32,10	32,74*	78,69
	8	55,03	7,42	32,44	33,28	77,13
	12	57,32*	7,90	32,54	33,51	76,24
	16	52,68	9,74	28,31	30,28	69,63
10^6	4	59,42	6,86	33,29	33,99*	78,52
	8	50,00	9,64	27,66	29,45	70,27
	12	48,54	10,52	23,65	26,72	63,56
	16	40,93	14,98	20,61	27,03	48,78
10^7	4	60,96	6,57	32,74	33,40*	78,61
	8	61,41	5,73	30,42	30,96	79,34
	12	57,99*	7,17*	34,65	35,38	78,30
	16	47,89	10,19	25,69	28,02	66,91

(*) demonstra diferença significativa pelo Teste de T ($p < 0,05$), entre o controle e tratamento.

Segundo Blanc et al. (1998), a presença de aminoácidos no substrato pode influenciar diretamente na produção de pigmentos, entre os listados estão a histidina,

leucina. Estes mesmo aminoácidos foram encontrados por Rodrigues et al. (2001) em milho e subprodutos. O que pode explicar, juntamente com o tipo de reprodução a ausência de pigmentos demonstrada na Tabela 2.

Os resultados de cor durante os dezesseis dias de fermentação utilizando o 10^5 , 10^6 , 10^7 esporos mL^{-1} a 32°C estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores médios dos parâmetros de cor dos pigmentos produzidos por *Monascus purpureus* ATCC 36928 a temperatura de 32°C

Tratamentos	Dias	L*	a*	b*	Croma	Hue
Controle	4	57,76	7,14	32,62	33,4	77,56
	8	55,11	6,54	30,79	31,48	77,95
	12	56,93	6,63	31,48	32,18	78,10
	16	54,32	6,69	30,70	31,42	77,71
10^5	4	55,09	6,90	32,10	32,84	77,43
	8	51,15	9,54	29,05	30,74	71,44
	12	54,51	7,61*	32,05	32,94	76,64
	16	51,89	10,23*	28,40	30,27	70,02
10^6	4	54,41	7,40	33,29	34,11	77,18
	8	50,00	10,48	26,92	29,78	66,63
	12	54,72	7,09	30,70	31,51	77,00
	16	52,85	7,57	32,06	32,94	76,71
10^7	4	60,26	7,01	32,74	33,49	77,18
	8	59,76	6,52	35,14	35,74	79,83
	12	56,60	6,67	34,07*	34,71*	78,93
	16	46,86	6,47	22,61	28,34	76,42

(*) demonstra diferença significativa pelo Teste de T ($p < 0,05$), entre o controle e tratamento.

Considerando os resultados obtidos (Tabela 3) apenas o 12º e 16º dias com 10^5 esporos mL^{-1} produziram pigmentos, em que o parâmetro a* (+vermelho) aumentou significativamente passando 6,63 para 7,61 e 10,23, respectivamente. Assim, para a produção do FMF utilizou-se 10^5 esporos mL^{-1} , 32°C por 16 dias.

Dikshit e Tallapragada et al. (2011), encontrou produção máxima de pigmentos vermelhos a 30°C e observou redução na produção de pigmentos a 37°C , em estudo que avaliou o efeito da temperatura no crescimento micelial e na produção de pigmento, com *M. purpureus* e incubado a diferentes temperaturas 16°C , 30°C , 37°C e 50°C por 15 dias em condição estática.

3.2 Composição proximal e propriedades tecnológicas

Na Tabela 4 estão apresentados os valores para composição proximal do FM e do FMF. O teor de água do FMF (69,14 g 100g⁻¹) foi a cerca de 5 vezes maior que o FM (12,36 g 100g⁻¹), devido a adição inicial de água no processo fermentativo. Desta forma, para comparar os resultados foram expressos em base seca (BS) para o teor de proteínas, cinzas, lipídeos e carboidratos.

Tabela 4. Composição proximal e propriedades tecnológicas do farelo de milho e farelo de milho fermentado

Análises	FM	FMF
Teor de água (g 100g ⁻¹)	12,36±0,14 ^b	69,14±0,98 ^a
Cinzas (g 100g ⁻¹)	3,54±0,03 ^a	2,72±0,01 ^b
Lipídeos (g 100g ⁻¹)	59,56±3,83 ^b	81,79±0,53 ^a
Proteínas (g100g ⁻¹)	9,27±0,42 ^a	8,53±0,50 ^a
Carboidratos (g 100g ⁻¹)	27,61±3,43 ^a	6,95±0,52 ^b
Valor calórico (Kcal 100 g ⁻¹)	683,63±19,12 ^b	798,09±2,69 ^a
Capacidade de Absorção (g g ⁻¹)	3,51±0,10 ^a	2,68±0,06 ^b
Solubilidade em Água (g g ⁻¹)	0,09±0,01 ^a	0,10±0,01 ^a
Atividade Emulsificante (g g ⁻¹)	0,52±0,01 ^a	0,50±0,01 ^a
pH	6,4±0,00 ^a	5,67±0,03 ^b

*Médias seguidas pela mesma letra na linha não difere estatisticamente entre si, pelo teste T, a nível de ($\leq 0,05$) de significância.

O teor de água do FMF (69,14 g 100g⁻¹) foi a cerca de 5 vezes maior que o FM (12,36 g 100g⁻¹), devido a adição inicial de água no processo fermentativo. Houve aumento no teor de lipídeos durante a fermentação, passando de 59,56 g 100g⁻¹ para 81,79 g 100g⁻¹, comportamento explicado pelo metabolismo dos fungos, por meio da produção de enzimas hidrolíticas, que degrada moléculas de carboidratos complexos como fonte de energia para o seu crescimento, com consequente formação de lipídeos estruturais (CARLILE et al., 2001). A degradação desses carboidratos pode ser observada durante a fermentação, com inicial de 27,61 g 100g⁻¹ no FM e 6,95 g 100g⁻¹ no FMF. O valor calórico aumentou em 114,45 Kcal devido a formação dos lipídeos.

Li (2006) e Wang (2005), destacam a importância da produção de lipídeos microbianos, pois podem ser usados na produção de biodiesel, e em comparação com outros óleos vegetais e gorduras animais, a produção de óleo microbiano tem muitas vantagens como ciclo de vida curto, menor necessidade de mão de obra, menor afeição pelo local, estação e clima, e maior facilidade de ser produzido em escala industrial.

O teor de proteínas se manteve igual após a fermentação (9,27 g 100 g⁻¹ e 8,53 g 100 g⁻¹) sem diferença estatística. Shukla e Cheryan (2001) haviam relatado valor próximo a este trabalho (7,8 g 100 g⁻¹) para grãos de milho.

Os valores de solubilidade em água e atividade emulsificante não apresentaram diferença significativa (Tabela 4). Diferente disso, a capacidade de absorção de água do farelo de milho fermentado (2,68 g g⁻¹) mostrou-se menor comparado ao farelo de milho antes da fermentação (3,51 g g⁻¹). Os resultados obtidos da CAA neste trabalho foram próximos aos encontrados por Figueiredo et al. (2018) (3,86 a 2,23 g g⁻¹), em estudo que avaliou diferentes frações do FM.

Houve queda no pH inicial do FM (6,4) para 5,67 após a fermentação. Segundo Vendruscolo et al. (2016) o pH é de extrema importância para síntese dos pigmentos, em que pH <4,0 favorece a formação dos pigmentos vermelhos, em relação ao amarelo e laranja.

4. Conclusão

Este trabalho avaliou a influência do tipo de reprodução durante a fermentação e verificou-se que a reprodução assexuada do *Monascus purpureus* inibe a produção de pigmentos. Apenas o tratamento com 10⁵ esporos.mL⁻¹ nos 12º e 16º dias a 32°C produziu pigmentos.

Comparando o FM e o FMF quanto a composição centesimal houve aumento na quantidade de lipídeos e diminuição dos carboidratos, elucidando como ocorre o metabolismo primário do *M. purpureus*.

As análises tecnológicas demonstraram que a fermentação não influenciou na solubilidade em água e atividade emulsificante. Quanto a capacidade de absorção de água foi menor no FMF.

5. Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), por meio de concessão de bolsa a nível de mestrado (Edital 003/2017).

6. Referências

- ANGARITA, C. C.; RAMIREZ, I. J. N.; ATEHORTÚA, L.; SEPÚLVEDA, L. J. Las estatinas: actividad biológica y producción biotecnológica. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v.14, p.157-178, 2012.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, chapter 33. Arlington: A.O.A.C., 1995.
- BLANC, P. J.; HAJJAJ, H.; LORER, M. O.; GOMA, G. Control of the production of citrinin by *Monascus*. **Scientific Statements and Findings – Meetings/Symposia**, v.7, n.3, p.564- 342, 1998.
- BLANDINO, M.; SOVRANI, V.; MARINACCIO, F.; REYNERI, A.; ROLLE, L.; GIOCOSA, S.; LOCATELLI, M.; BORDIGA, M.; TRAVAGLIA, F.; COISSON, J. D. Nutritional and technological quality of bread enriched with an intermediated pearled wheat fraction. **Food Chemistry**, Barking, v.141, p.2549-2557, 2013.
- CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. *The fungi*. 2nd ed. New York: Academic Press, p. 608, 2001.
- CHILDRESS, L.; GAY, A.; ZARGAR, A.; MARRHEW, K.; Review of red yeast rice content and current Food and Drug Administration oversight. **Journal of Clinical Lipidology**, v.7, n. 2, p.117-122, 2013.
- CODA, R.; KATINA, K.; RIZZELLO, C.G. Bran bioprocessing for enhanced functional properties. **Curr. Opin. Food Sci.**, v.1, p.50-55, 2015.
- DIKSHIT, R.; TALLAPRAGADA, P. *Monascus purpureus*: A potential source for natural pigment production. **J. Microbiol. Biotech. Res.**, v. 4, p. 164-174, 2011.
- GUIMARÃES, R. M.; PIMENTEL, T. C.; DE REZENDE, T. A. M.; SILVA, J. S.; FALCÃO, H. G.; IDA, E. I.; EGEA, M. B. Gluten-free bread: effect of soy and corn co-products on the quality parameters. **European Food Research and Technology**, v. 246, p. 1-12, 2019.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, IV. ed. São Paulo: IMESP, 2008.

LATEEF, J. K.; OLEKE, K. E. B.; GUEGUIM, S. O.; OYENIYI, O. R.; ONIFADE, A. O.; OYELEYE, O. C.; OLADOSU, A. O.; OYELAMI. Improving the quality of agro-wastes by solid-state fermentation: enhanced antioxidant activities and nutritional qualities. **World J. Microbiol. Biotechnology**, v. 24, p. 2369-2374, 2008.

LI J., LIU H.J.; ZHANG J.A.; LIU J. Progress in and prospect of microbial lipid production by fermentation. **Mod Chem Indust**, v.27, n.2, p.133–136, 2007.

OGUNWOLU, S. O.; HENSHAW, F. O.; MOCK, H. P.; ANDREA SANTROS, A.; AWONORIN, S. O. Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut. **Food Chemistry**, Ibadan, v. 115, n. 3, p. 852–858, 2009.

OKEZIE, B. O.; BELLO, A. B. Physicochemical and Functional Properties of Winged Bean Flour and Isolate Compared with Soy Isolate. **Journal of Food Science**, v.53, n 2, p. 450-454, 1998.

RAZAK, D. L. A.; RASHID N. Y. A.; JAMALUDDIN, A.; SHARIFUDIN, S. A.; LONG, K. Enhancement of phenolic acid content and antioxidant activity of rice bran fermented with *Rhizopus oligosporus* and *Monascus purpureus*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.4, p.33-38, 2015.

RODRIGUES, P. B.; ROSTAGNO, S. H.; ALBINO L. F. T.; GOMES, P. C.; BARBOZA, W. A.; NUNES, R. V. Aminoácidos Digestíveis Verdadeiros do Milheto, do Milho e Subprodutos do Milho, Determinados com Galos Adultos Cecectomizados. **Rev. bras. zootec.**, v. 30, p. 2046-2058, 2001.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v.13, n.3, p.171-192, 2001.

SOUSA, M. F; GUIMARÃES, R. M.; ARAÚJO, M. O.; BARCELOS, K. R.; CARNEIRO, N. S.; LIMA, D. S.; SANTOS, D. C; BATISTA, K. A.; FERNANDES, K. F.; LIMA, M. C. P. M.; EGEEA, M. B. Characterization of corn (*Zea mays* L.) bran as a

new food ingredient for snack bars. **LWT-Food Science and Technology**, v. 101, p. 812-818, 2019.

SRIANTA, I.; ZUBAIDAH, E.; ESTIASIH, T.; YAMADA, M. HARIJONO. Comparison of *Monascus purpureus* growth, pigment production and composition on diferente cereal subtrates with state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.7, p. 181-186, 2016.

TAKAHASHI, J. A., LIMA, G. S.; DOS SANTOS, G. F., LYRA, F.H.; DA SILVA-HUGHES, A. F., GONÇALVES, F.A. G. Fungos Filamentosos e Química: Velhos Conhecidos Novos Aliados. **Revista Virtual de Química**, v.9, n.6, p.2351-2382, 2017.

VENDRUSCOLO, F.; SCHMIDELL, W.; MORITZ, D. E.; ROSE, M. M. B.; OLIVEIRA, D.; NINOW, J. L. Isoelectric point of amino acid: Importance for *Monascus* pigment production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 179-185, 2016.

WANG L, SUN YM, WANG PZ, ZHAO ZB. Effects of metal ions on lipid production by fermentation with *Trichosporon fermentans*. **J Dalian Institute Light Indust**, v.24, n.4, p.259–262, 2005.

YADAV, M. P.; HICKS, K. B.; JOHNSTON, D. B.; HOTCHKISS, A.; CHAU, H. K.; HANAH, K. Production of bio-based fiber gums from the waste streams resulting from the commercial processing of corn bran and oat hulls. **Food Hydrocolloids**, v.53, p.125-133, 2016.

YOSHIZAKI, Y.; SUSUKI, T.; TAKAMINE, H.; ITO, K.; SAMESHIMA, Y. Characterization of glucoamylase and α -amilase from *Monascus anka*: Enhanced production of α -amilase in red koji. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.110, n.6, p.670-674, 2010.

CAPÍTULO II - OTIMIZAÇÃO DA FERMENTAÇÃO SUBMERSA UTILIZANDO *Monascus purpureus* PARA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS

RESUMO: O *Monascus purpureus* é um ascomiceto conhecido há décadas por produzir diversos metabólitos de interesse comercial, entre eles os pigmentos (monascorubramina e rubropunctamina). O objetivo foi realizar a fermentação submersa utilizando *Monascus purpureus* para produção de pigmentos tendo como substrato o resíduo agroindustrial (farelo de milho, FM). Inicialmente o FM foi caracterizado quanto ao teor de água, lipídeos, carboidratos, proteínas, cinzas, pH, acidez titulável, carotenoides e compostos fenólicos. A determinação da melhor condição de fermentação foi realizada em delineamento experimental com 11 tratamentos e diferentes proporções de FM e peptona. A extração dos pigmentos foi realizada com auxílio vortex e bomba a vácuo e quantificados em espectrofotômetro, submetidos ao infravermelho e estabilidade em diferentes pHs. O substrato FM e os pigmentos foram avaliados também quanto a capacidade antioxidante (DPPH, FRAP e ABTS). O FM apresentou como compostos majoritários lipídeos e carboidratos. O delineamento resultou no tratamento com +1,41 de [peptona] e +1,41 [FM]. Durante a cinética no sexto dia a produção de pigmentos já era igual ao vigésimo dia. Os pigmentos extraídos apresentaram estabilidade térmica e a $\text{pH} > 5,0$. Os pigmentos extraídos apresentaram maior atividade antioxidante que o substrato utilizado.

PALAVRAS-CHAVE: ascomiceto, corante natural, resíduo agroindustrial.

OPTIMIZATION OF SUBMERGED FERMENTATION USING *Monascus purpureus* FOR PIGMENT PRODUCTION

ABSTRACT: *Monascus purpureus* is an ascomycete known for decades for producing several metabolites of commercial interest, among them the pigments (monascorubramine and rubropunctamine). The objective was to perform the submerged fermentation using *Monascus purpureus* for pigments production having as substrate the agroindustrial residue (corn meal, CM). Initially CM was characterized as water content, lipids, carbohydrates, proteins, ashes, pH, titratable acidity, carotenoids and phenolic compounds. The determination of the best fermentation condition was performed in an experimental design with 11 treatments and different ratios of CM and peptone. The pigments extraction was performed with vortex and vacuum pump and quantified in spectrophotometer, submitted to infrared and stability at different pHs. The CM substrate and the pigments were also evaluated for antioxidant capacity (DPPH, FRAP and ABTS). CM presented as major compounds lipids and carbohydrates. The design resulted in the treatment with +1.41 of [peptone] and +1.41 [CM]. During the kinetics on the sixth day the pigment production was already equal to the twentieth day. The pigments extracted showed thermal stability and pH > 5.0. The extracted pigments had higher antioxidant activity than the substrate used.

KEY WORDS: ascomycete, natural pigment, agroindustrial residue.

1. Introdução

O fungo filamentosso *Monascus* tem sido usado há décadas na Ásia como fonte natural de pigmento. Sendo alvo de constantes estudos, principalmente pelo crescente interesse por pigmentos naturais a serem utilizados na indústria alimentícia (HAQUE et al., 2016).

Os pigmentos são importantes metabólitos secundários produzidos durante o crescimento dos *Monascus*, especialmente os pigmentos vermelhos, que podem ser amplamente utilizados pela sua boa segurança e estabilidade (SRIVASTAV et al., 2015). Estes compostos pertencem ao grupo das azafilonas, que reagem com as aminas de proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos substituindo o oxigênio pelo nitrogênio (STURDIKOVA et al., 2000; OSMANOVA et al., 2010).

O milho (*Zea mays*) é um cereal amplamente difundido no Brasil sendo matéria-prima para a produção de diversos produtos destinados a alimentação humana (*grits*, canjica, fubá, óleo entre outros) podendo ser consumido também *in natura*. O farelo é a camada externa dos grãos, é muitas vezes descartado durante o processo de moagem, subproduto das principais linhas de processamento do milho para consumo humano, sendo destinado principalmente a ração animal.

Uma alternativa economicamente viável para a produção destes pigmentos é o aproveitamento de resíduos e subprodutos agroindústrias. De acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018), serão produzidas 86,9 milhões de toneladas de milho, na safra 2018/2019. Diante desse cenário toneladas de resíduos e subprodutos serão gerados, que poderiam ser destinados aos bioprocessos adequados.

O objetivo deste trabalho foi a otimização da fermentação submersa utilizando *Monascus purpureus* para produção de pigmentos, tendo como substrato o farelo de milho.

2. Materiais e métodos

2.1.1 Micro-organismo

A cepa de *Monascus purpureus* ATCC 36928, foi adquirida do Centro de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisas “André Tosello” (Campinas, São Paulo – Brasil) (Figura 1).



Figura 1. *Slants* com cepa de *Monascus purpureus*

2.1.2 Manutenção de células viáveis

As culturas foram mantidas em placas contendo Ágar Batata Dextrose (BDA) a 28-30°C por 7 dias e subcultivadas. O BDA foi preparado adicionando extrato de batata (4 g.L⁻¹), dextrose (20 g.L⁻¹) e ágar (15 g.L⁻¹) em água destilada (1000 mL). Após a esterilização (121°C por 30 min), o meio de cultivo foi distribuído em placas de Petri estéreis.

2.1.3 Conservação da cepa

O repique da cultura foi realizado a cada 30 dias em placa de Petri com meio de BDA. Um quadrado de micélio com aproximadamente 1,0 cm de comprimento foi colocado no centro da placa a ser colonizada (Figura 2). Após o inóculo das placas, estas foram incubadas a 30°C por 7 dias e preservadas a 4°C.



Figura 2. Repique para conservação da cepa

2.1.4 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo iniciou-se com a adição de 20 mL de solução salina (NaCl 0,85%) na placa de Petri contendo *Monascus*, seguida da raspagem, e uma alíquota de 1 mL dessa suspensão foi diluído em 9 mL de solução salina. Para a contagem de esporos 50 µL de suspensão (1:10) foram pipetados em câmara de Neubauer. A contagem foi

realizada das regiões A, B, C e D exemplificada na Figura 3, iniciando da esquerda para direita em microscópio (Zeiss, Primo Star, Alemanha), utilizando a lente de aumento em 40x. Para o cálculo do número de células viáveis por mL foi utilizada a Equação 1, e o fator de correção da câmara é 10^4 .

$$\text{Número de esporos mL}^{-1} = \frac{\text{Número de células}}{\text{Número de quadrantes}} \times \text{diluição} \times \text{fator de correção} \quad (1)$$

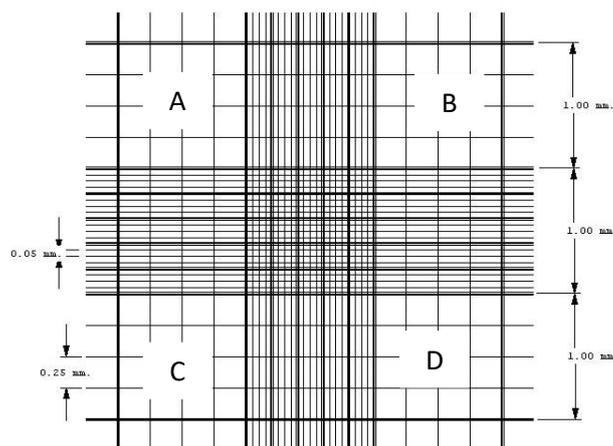


Figura 3. Regiões de contagem utilizadas na câmara de Neubauer

2.2 Farelo de milho

O farelo de milho (FM) foi obtido por doação de agroindústria, situada em Rio Verde – Goiás, acondicionado em sacos plásticos de polipropileno e armazenado a 7°C.

2.2.1 Composição proximal do farelo de milho

O teor de água foi determinado segundo a metodologia da AOAC (1995), em que 3 g de farelo foram secos em estufa a 105°C até atingir peso constante e calculado de acordo com a Equação 2.

$$\% \text{ teor de água} = \frac{(P \text{ amostra úmida} + \text{cadinho}) - (P \text{ amostra seca} + \text{cadinho})}{P \text{ amostra úmida}} \times 100 \quad (2)$$

O resíduo mineral fixo foi determinado por incineração em mufla a 550°C, e 3 g de farelo foram colocados em cadinhos de porcelana até obter cinzas de cores claras, segundo descrito pela AOAC (1995), e a Equação 3 foi utilizada para o cálculo.

$$\% \text{ cinzas} = \frac{\text{cinzas}}{\text{amostra úmida}} \times 100 \quad (3)$$

A determinação do conteúdo proteico foi realizada através do método de micro Kjeldahl como descrito na AOAC (1995). Esse método é dividido em três partes: digestão, destilação e titulação. Na digestão, pesou-se 0,2 gramas de farelo em tubo, adicionou-se 2,5 gramas de mistura catalítica (100 g de K₂SO₄, 10 g de CuSO₄ e 0,8 g de selênio metálico em pó) e 7 mL de ácido sulfúrico concentrado. Digeriu-se a quente até total destruição da matéria orgânica (aproximadamente 2 horas a 400°C). Depois de ser resfriado, foi adicionado 10 mL de água destilada. Na destilação, utilizou-se 30 mL de solução de NaOH 40% (até atingir cor escura) e 20 mL de ácido bórico como indicador até que 125 mL de destilado fosse atingido. Por último, a titulação foi realizada com HCl 0,1 N até a mudança de coloração verde para rosa. A percentagem de proteína presente na amostra foi calculada de acordo com a Equação 4.

$$\% \text{ Proteína bruta} = \frac{\text{mL de HCl} \times F \times N \times 0,014 \times f}{\text{g de amostra}} \times 100 \quad (4)$$

Em que mL de HCl é o que foi gasto na titulação, N é a normalidade do HCl (0,1), F é o fator de correção da normalidade do ácido, e f é o fator de conversão de nitrogênio em proteína (tabelado), sendo 5,9 para farelo de milho.

Os lipídeos foram extraídos por método de Soxhlet (AOAC, 1995), e foi pesado 3 g de farelo em papel filtro amarrado com fio de lã. O extrator foi acoplado ao balão de fundo chato previamente tarado e seco a 105°C e adicionado éter de petróleo em quantidade suficiente para um Soxhlet e meio. Sob o aquecimento em chapa elétrica a extração foi contínua por 8 horas (quatro a cinco gotas por segundo). O papel filtro amarrado foi retirado, o destilado contendo éter e o resíduo extraído acoplados em rotaevaporador para separação e depois pesado. O percentual de lipídeos foi calculado utilizando a Equação 5.

$$\% \text{ lipídeos} = \frac{N}{P} \times 100 \quad (5)$$

Em que N é o número de gramas de lipídeos e P é o número de gramas de amostra.

A determinação da quantidade total de carboidratos em um alimento (ou extrato livre de nitrogênio – NIFEXT é realizada geralmente por diferença. Para isso, foram determinados a quantidade de água, cinzas, proteínas, lipídeos da amostra e, por diferença, calculou a quantidade de carboidratos, utilizando a Equação 6.

$$\text{Carboidratos (\%)} = 100 - (\% \text{ teor de água} + \% \text{ cinzas} + \% \text{ proteínas} + \% \text{ gorduras}) \quad (6)$$

O valor calórico total foi calculado aplicando-se os valores de conversão para carboidratos (4,0 kcal), lipídeos (9,0 kcal) e proteína (4,0 kcal) (AOAC,1985).

2.2.2 Determinação do pH e sólidos solúveis

O pH foi mensurado pelo método potenciométrico, conforme AOAC (1995). Dessa forma, 10 g de FM foram pesados em béquer e adicionados de 100 mL de água destilada. Após a agitação foi feita leitura direta em medidor de pH (HI 2223, Hanna, Índia). O teor de sólidos solúveis foi determinado em refratômetro digital (Digital Def-Chek, Reichert) e expresso em ° Brix.

2.2.3 Capacidade antioxidante

O preparo do extrato foi realizado segundo a metodologia de Larrauri *et al.*, (1997) com algumas modificações, e 2 g de farelo foram adicionados de 40 mL de metanol 50% homogeneizado e após 60 minutos foi realizada a filtração. O sobrenadante foi transferido para balão (100 mL). Ao resíduo da primeira extração adicionou-se 40 mL de acetona 70% e após 60 min, transferiu-se o sobrenadante o balão contendo o primeiro sobrenadante e o volume completado para 100 mL com água destilada.

Método DPPH

O sequestro do radical DPPH• (2,2-difenil-1picril-hidrazila) foi determinado conforme proposto por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com modificações. Alíquotas de 0,1 mL dos extratos foram adicionados a 3,9 mL de solução metanoica de DPPH (25 mg.L⁻¹), e mantidas à temperatura ambiente, com luminosidade controlada, por 30 minutos. A absorbância das amostras foi determinada a 515 nm, em espectrofotômetro UV/Visível (UV-5100 Spectrophotometer, Metash,) e percentual de descoloração calculado pela Equação 7.

$$\% \text{ descoloração} = \left[1 - \left(\frac{\text{absorbância amostra}}{\text{absorbância controle}} \right) \right] \times 100 \quad (7)$$

Método ABTS

A capacidade de capturar o radical ABTS⁺ foi determinada de acordo com o proposto por Miller *et al.* (1993), com modificação de Rufino *et al.* (2010). O radical ABTS⁺ foi preparado a partir da reação de 7 mM de solução aquosa de ABTS com 145 mM de persulfato de potássio, deixando a mistura em repouso de 12-16 horas, na ausência de luz e temperatura ambiente. Em seguida, a solução de ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) foi diluída em etanol para obter uma absorvância de 0,70 ± 0,05 a 734 nM (comprimento de onda de absorção máxima). Aliquotas de 30 µL dos extratos foram adicionados a 3 mL de solução diluída de radical ABTS⁺, e as absorvâncias das misturas foram registradas ao final de seis minutos. A capacidade antioxidante foi calculada utilizando curva padrão de Trolox e suas respectivas porcentagens de inibição, e os resultados do ensaio foram expressos de acordo com a Equação 8.

$$\% \text{ de eliminação do radical ABTS} = \left(\frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \right) \times 100 \quad (8)$$

Método FRAP

O método de redução de ferro (FRAP) descrito por Benzie e Strain (1996) e modificado por Pulido *et al.* (2000) foi utilizado. A solução de FRAP foi preparada misturando tampão de acetato (25 mL), solução de TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) (2,5 mL) e solução de FeCl₃ (2,5 mL). 90 µL de extrato foi adicionado de 270 µL de água destilada e 2,7 mL solução FRAP e ficou de repouso durante 30 min no escuro a 37°C. A absorvância foi medida a 595 nm utilizando um espectrofotômetro UV-Vis. Uma curva padrão foi preparada usando diferentes concentrações de sulfato ferroso. Os resultados foram expressos como microgramas de equivalente de sulfato ferroso (ESF) por grama de amostra (µg ESF.g⁻¹).

2.2.4 Compostos bioativos

Compostos fenólicos

Para a quantificação de compostos fenólicos totais, 200 µL do extrato de FM foi adicionado de 1,9 mL do reagente Follin-Ciocalteau 1:9 em água destilada recém-preparada. O mesmo volume (1,9 mL) da solução aquosa de carbonato de sódio (60 g.L⁻¹) foi usada para neutralizar a mistura. Após 120 minutos da reação na ausência de luz e temperatura ambiente, a absorvância foi medida em 725 nm. O cálculo foi realizado

utilizando a curva padrão e os resultados expressos em g equivalentes de ácido ferúlico (EAF) por 100 g de farelo de milho (LI et al., 2009).

Ácido ascórbico

A metodologia utilizada para a determinação de ácido ascórbico foi a descrita na AOAC (1994), modificada por Benassi e Antunes (1998), que substituíram a solução de ácido metafosfórico por uma de ácido oxálico.

Aproximadamente 5 g de farelo foi pesado e homogeneizado com 50 mL de solução de ácido oxálico 2% utilizado com solvente. Deste extrato, uma alíquota de 20 g foi retirada, o volume acertado para 50 mL e filtrado. 10 mL desta mistura foi titulada com solução de 2,6-diclorolindofenol 0,01% padronizada com ácido ascórbico. O teor de vitamina C foi calculado utilizando a Equação 9.

$$\frac{\text{mg VitC}}{100 \text{ g}} = \frac{\text{DCFI (amostra)}}{\text{DCFL (padrão)}} \times \frac{100 \text{ g}}{\text{g (amostra)}} \times \frac{\text{m(solvente) + m(amostra)}}{\text{m (alíquota)}} \times \frac{\text{V (50 mL)}}{\text{V alíquota (mL)}} \quad (9)$$

Carotenoides totais

O teor de carotenoides foi calculado segundo Talcott e Howard (1999), e 2 g de FM foi pesado e adicionado de 25 mL de uma solução acetona: etanol (1:1, v/v) e 250 µL de BHT (2,6-ditert-butil-4-metil fenol), diluído a uma mistura dos solventes a na concentração de 20 mg.mL⁻¹. A mistura foi homogeneizada e filtrada em papel filtro (Whatman 150 mm). O procedimento foi repetido até obter a descoloração do FM, em média 4 extrações. O volume do extrato foi completado com o solvente acetona: etanol até 100 mL e a leitura realizada em espectrofotômetro a 470 nm. O teor de carotenoides foi calculado pela equação de Gross (1991) (Equação 10).

$$\text{Carotenoides totais } (\mu\text{g g}^{-1}) = (A_{470} \times V \times 10^6) / (A_{1\%} \times 100 \times g) \quad (10)$$

Em que A₄₇₀ é absorvância medida a 470 nm, V é o volume total do extrato (100 mL), A_{1%} é o coeficiente de extinção para a mistura de solventes (2500) e g é o peso da amostra em gramas.

2.3 Fermentação submersa

Para a fermentação submersa, o farelo de milho foi seco em estufa 60°C por 3 horas, triturado em moinho de facas (Start FT 50, Fortinox, Brasília, Brasil) e homogeneizado em peneira de 50 mesh.

Os meios de cultura preparados continham fontes de carbono e nitrogênio (g.L⁻¹) K₂HPO₄ (5,0), KH₂PO₄ (5,0), MgSO₄.7H₂O (0,01), CaCl₂ (0,01) e ZnSO₄.7H₂O (0,01). O pH inicial do meio foi ajustado para 6,0±0,2 (HCl 1:10). Frascos de Erlenmeyer (125 mL) contendo 25 mL de meio foram inoculados com 250 µL de uma suspensão de micélio ou esporos (NaCl, 0,85%) sendo os frascos incubados a 30 ± 3°C durante 9 dias em shaker a 100 rpm (SILVEIRA et al., 2008).

2.3.2 Delineamento experimental

A preparação dos diferentes meios de cultivo baseou-se em um delineamento experimental fatorial (2²), com replicatas e três pontos centrais, totalizando onze tratamentos (MYERS & MONTGOMERY, 2002). O modelo estatístico utilizou variáveis codificadas: FM (X₁) e peptona (X₂); e, a variável dependente foi a produção de pigmentos (Y). A determinação dos valores máximos e mínimos inicialmente, foi baseada no trabalho de Silveira et al. (2008), e está descrito na Tabela 1. O segundo ensaio 2 foi realizado alterando as [FM] e [peptona], (Tabela 2).

Tabela 1. Delineamento experimental utilizado para produção de pigmentos no Ensaio 1

Tratamentos	X ₁	X ₂	(X ₁)	(X ₂)
1	-1	-1	8,60	10,00
2	1	-1	8,60	10,00
3	-1	1	26,40	35,00
4	1	1	26,40	35,00
5	-1,41	0	5,00	22,50
6	1,41	0	30,00	22,50
7	0	-1,41	17,50	5,00
8	0	1,41	17,50	40,00
9	0	0	17,50	22,50
10	0	0	17,50	22,50
11	0	0	17,50	22,50

Farelo de milho (X₁) em g.L⁻¹, Peptona (X₂) em g.L⁻¹.

Tabela 2. Delineamento experimental utilizado para produção de pigmentos no Ensaio 2

Tratamentos	X ₁	X ₂	(X ₁)	(X ₂)
-------------	----------------	----------------	-------------------	-------------------

1	-1	-1	21,10	5,00
2	1	-1	38,90	5,00
3	-1	1	21,10	30,00
4	1	1	38,90	30,00
5	-1,41	0	17,50	17,50
6	1,41	0	42,50	17,50
7	0	-1,41	30,00	0,00
8	0	1,41	30,00	35,00
9	0	0	30,00	17,50
10	0	0	30,00	17,50
11	0	0	30,00	17,50

Farelo de milho (X_1) em g L⁻¹, Peptona (X_2) em g L⁻¹.

2.3.3 Quantificação de pigmentos e infravermelho

A concentração extracelular de pigmento foi estimada pela metodologia adaptada de SILVEIRA et al. (2008). Os fermentados foram transferidos para tubos Falcon, de 50 mL, homogeneizados em vortex (K40-1020, Kasvi, São José do Pinhais – PR, Brasil) por 1 min, e filtrados a vácuo (5CFM, Suryha). O volume do extrato foi acertado para 50 mL com água destilada e a leitura da absorbância realizada em espectrofotômetro a 500 nm.

As análises de espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram realizadas em um equipamento PerkinElmer modelo (FT-IR /NIR Spectrometer, Frontier), seguindo as seguintes condições de operação: região 650-400cm⁻¹, com 8 varreduras e resolução de 2 cm⁻¹.

2.3.4 Cinética da produção de pigmentos

Utilizando o tratamento maximizado foram preparados em triplicata Erlenmeyers contendo 10⁶ esporos.mL⁻¹ incubados em mesa agitadora (Modelo 183, Solab), por 20 dias a 30°C. O tempo máximo foi estabelecido baseado na literatura que utiliza de 7 a 18 dias (Vedruscolo et al, 2017; Zhang et al, 2015). A extração dos pigmentos foi realizada diariamente em triplicata de acordo com item 2.3.3.

2.3.5 Caracterização dos pigmentos

Em estudos de estabilidade para o pH, os pigmentos foram testados nos valores (4,0-7,0) foram incubados a 80°C, de 0 a 180 min. A estabilidade do pigmento foi avaliada também após tratamento em autoclave (121 °C por 15 min). As soluções tampões

utilizadas foram citrato de sódio-fosfato 0,2 M (4,0, 5,0, 6,0) e 0,2 mol/L de fosfato de sódio (pH 7,0 e 8,0). Em todos esses testes, a mensuração do pigmento foi realizada conforme descrito na seção 2.3.3 e expresso em percentagem da absorbância observada em tempo zero (controle – 100%) (CORRADINI, PELEG, 2004).

2.3.6 Análises estatísticas

A análise estatística do delineamento experimental fatorial (2^2) foi realizada no software Statistica versão 5.0 (Statsoft Inc., USA), através da regressão dos dados obtidos experimentalmente. A qualidade da equação do modelo de segunda ordem do ajuste foi expressa pelo coeficiente de determinação r^2 , e sua significância estatística foi determinada pelo teste F- teste. Três repetições nos pontos centrais foram usadas para estimar o erro experimental e para permitir a verificação da adequação do modelo de primeira ordem (SILVEIRA et al., 2008).

A análise estatística da cinética fermentativa foi realizada aplicando Teste de Tukey ($>0,05$) e o experimento foi conduzido em duplicata. Os dados obtidos nas avaliações de difusão em ágar foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo as médias das medidas dos halos comparadas pelo teste Tukey, ambos a 5% de significância.

3. Resultados e discussão

O FM foi caracterizado quanto a sua composição proximal e submetido ao delineamento experimental permitindo que houvesse a maximização da produção de pigmentos. As demais análises foram conduzidas a fim de obter a caracterização desses pigmentos quanto a estabilidade, capacidade de atuar como antioxidante e antibacteriano.

3.1 Caracterização química do farelo de milho

Na Tabela 3 são apresentados os valores obtidos para a composição proximal e compostos bioativos do FM.

Tabela 3. Caracterização química do FM

Análises	FM
Cinzas ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$)	$3,10 \pm 0,03^e$
Lipídeos ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$)	$52,20 \pm 3,28^b$
Teor de água ($\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$)	$12,36 \pm 0,15^c$

Carboidratos (g.100g ⁻¹)	26,77±2,01 ^c
Proteínas (g.100g ⁻¹)	8,13±0,38 ^d
Valor calórico (Kcal.100g ⁻¹)	609,40±33,10 ^a
pH	6,4±0,00
Sólidos solúveis (°Brix)	1,13±0,32
Compostos fenólicos (mg.mL ⁻¹)	175,84±1,41
Carotenoides (µg.g ⁻¹)	10,71±0,20
Ácido ascórbico (mg.100g ⁻¹)	2,59±0,30

Os lipídeos (52,20%) se apresentaram como composto majoritário do FM, seguido por carboidratos (26,77%), explicando o alto valor calórico (609,40 Kcal.100g⁻¹). O teor de água obtido (12,36%) está abaixo de 13% que é recomendado e, aliado as boas condições de armazenagem, proteção contra roedores e expurgo, são fatores considerados ideais para controlar as perdas de matéria seca durante o armazenamento (SANTOS et al., 2015).

O valor encontrado de proteínas (8,13%) do FM é maior que o descrito por Cantarelli et al. (2007) (7,69%) que avaliaram a composição química, vitreosidade e valores nutricionais de híbridos de milhos com alto teor de óleo e menor que o descrito por Ferrarini (2004), analisou 132 amostras de milho por espectroscopia no infravermelho e verificou valores de proteínas entre 7,66% e 13,12%.

O teor de carotenoides encontrado no FM (10,71 µg.g⁻¹) foi próximo ao descrito por Cardoso et al. (2007), na cultivar de milho 540845-2 (10,83 µg.g⁻¹). Segundo Pfeiffer e McClafferty (2007) a coloração visual do grão de milho é dominada por carotenoides que não possuem atividade provitamina A, luteína e zeaxantina (xantofilas di-hidroxiadas).

3.2 Maximização da fermentação submersa para produção de pigmentos vermelho

A Tabela 4, expõe os resultados da produção de pigmentos (500 nm) nos dois delineamentos experimentais (ensaios). A Tabela 5, expõe os resultados da ANOVA durante o primeiro ensaio.

Tabela 4. Pigmentos produzidos na fermentação submersa com *Monascus purpureus* durante os dois ensaios.

Tratamentos	Ensaio 1			Ensaio 2		
	X ₁	X ₂	Y	X ₁	X ₂	Y
1	8,60	10,00	0,800	21,10	5,00	3,065

2	8,60	10,00	0,939	38,90	5,00	2,567
3	26,40	35,00	3,549	21,10	30,00	1,969
4	26,40	35,00	2,398	38,90	30,00	3,814
5	5,00	22,50	1,112	17,50	17,50	2,759
6	30,00	22,50	2,884	42,50	17,50	3,321
7	17,50	5,00	1,973	30,00	0,00	2,425
8	17,50	40,00	1,613	30,00	35,00	2,082
9	17,50	22,50	1,605	30,00	17,50	2,953
10	17,50	22,50	2,587	30,00	17,50	3,702
11	17,50	22,50	2,079	30,00	17,50	3,275

* FM (X₁) e peptona (X₂) variáveis independentes, pigmentos (Y) variável dependente

Através dos resultados (Tabela 5) não foi possível avaliar um modelo matemático para a produção de pigmentos. Como o F_{calc} para a regressão não foi significativo e a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo foi baixa (34,42%), foi possível concluir que esse modelo não se ajustou bem aos dados experimentais.

Tabela 5. ANOVA para produção de pigmentos no ensaio 1

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{calc}	Valor p
FM (L)	0,277	1	0,277	0,288	0,614
FM (Q)	0,009	1	0,009	0,009	0,928
Peptona (L)	1,717	1	1,717	1,785	0,239
Peptona (Q)	0,114	1	0,114	0,119	0,745
Peptona x Farelo	0,416	1	0,416	0,433	0,540
Resíduo	4,808	5	0,962		
Total	7,332	10			

% variação explicada (R^2) = 34,42; $F_{\text{tab}, 6} = 1,635$

A Tabela 6, apresenta o coeficiente de regressão obtido no primeiro ensaio evidenciando que não houve interação significativa.

Tabela 6. Coeficiente de regressão para a resposta produção de pigmentos vermelhos no ensaio 1

Fatores	Efeito	Erro Padrão	T (5)	Valor p	Limite de confiança -90%	Limite de confiança +90%

Média	2,090	0,566	3,692	0,014	0,635	3,546
FM (L)	0,373	0,694	0,537	0,614	-1,412	2,158
FM (Q)	-0,079	0,829	-0,095	0,928	-2,209	2,051
Peptona (L)	0,928	0,694	1,336	0,239	-0,857	2,713
Peptona (Q)	-0,285	0,829	-0,344	0,745	-2,415	1,845
Interação	-0,645	0,981	-0,658	0,540	-3,166	1,876

Na Tabela 6, nos coeficientes de regressão os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos com à letra Q. Considerando a inerente variabilidade de bioprocessos que utilizam micro-organismos, foram desconsiderados os parâmetros com valores de p (significância) maiores que 10% ($p < 0,1$).

A Figura 4 apresenta a superfície de resposta do ensaio 1. É possível verificar que maiores quantidades de pigmentos são alcançadas quando a quantidade de FM e peptona são elevadas no processo de fermentativo (região vermelha). Assim, foi possível realizar o descolamento do delineamento experimental fatorial de modo a obter maior produção de pigmentos por *M. purpureus*.

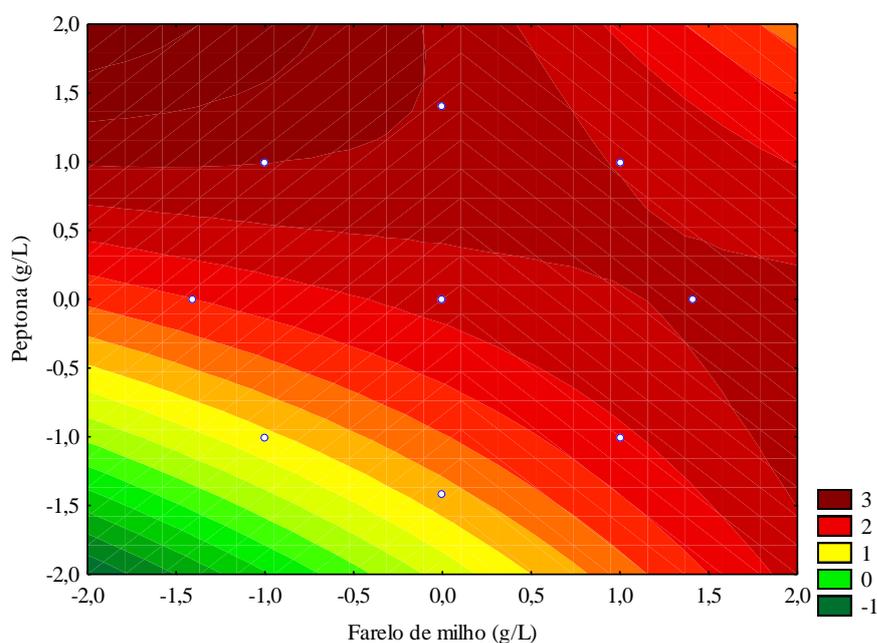


Figura 4. Superfície de resposta da produção de pigmentos por *Monascus purpureus* no ensaio 1

Os resultados obtidos para o ensaio 2 estão descritos nas Tabelas 4 e 7 e Figuras 6 e 7.

Tabela 7. Coeficiente de regressão para a resposta produção de pigmentos 500 nm

Fatores	Coeficiente de regressão	Erro Padrão	Valor P	Limite de confiança -90%	Limite de confiança +90%
Média	3,309	0,175	0,000	2,859	3,759
Farelo de milho (L)	0,268	0,215	0,055	-0,015	1,088
Farelo de milho (Q)	-0,082	0,256	0,549	-0,823	0,494
Peptona (L)	-0,042	0,215	0,714	-0,635	0,468
Peptona (Q)	-0,478	0,256	0,014	-1,614	-0,298
FM x Peptona	0,586	0,303	0,012	0,393	1,950
R ²	0,876				

* FM- Farelo de milho

A variação explicada (R²) encontrada foi de 87,65, e houve interação entre os fatores avaliados (concentração de FM e peptona), podendo assim estabelecer um modelo matemático (Equação 11).

$$\text{Produção de pigmentos (g. L}^{-1}\text{)} = 3,309 + 0,268 \text{ FM} - 0,478 \text{ peptona}^2 \quad (11)$$

A partir deste modelo, observou-se que tanto o aumento do FM quanto de peptona, aumentam a produção de pigmentos, como havia sido demonstrado pelo ensaio 1. Foram desconsiderados os parâmetros com valores de p (significância) maiores que 10% ($p < 0,1$).

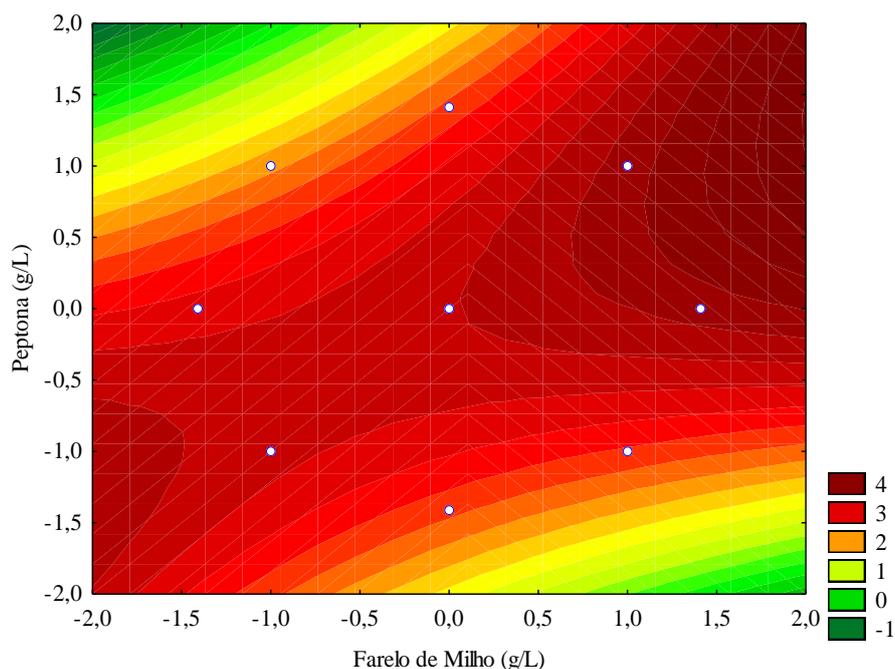


Figura 5. Superfície de resposta da produção de pigmentos por *Monascus purpureus* no ensaio 2

Considerando a superfície de resposta fornecida pelo modelo ajustado (Figura 5), observou-se as concentrações de FM e peptona que resultam em maior produção de pigmentos. O tratamento +1,41 peptona (30 g.L⁻¹) e +1,41 FM (42,5 g.L⁻¹) propiciou a atividade ótima do *Monascus* demonstrado pela Figura 6.

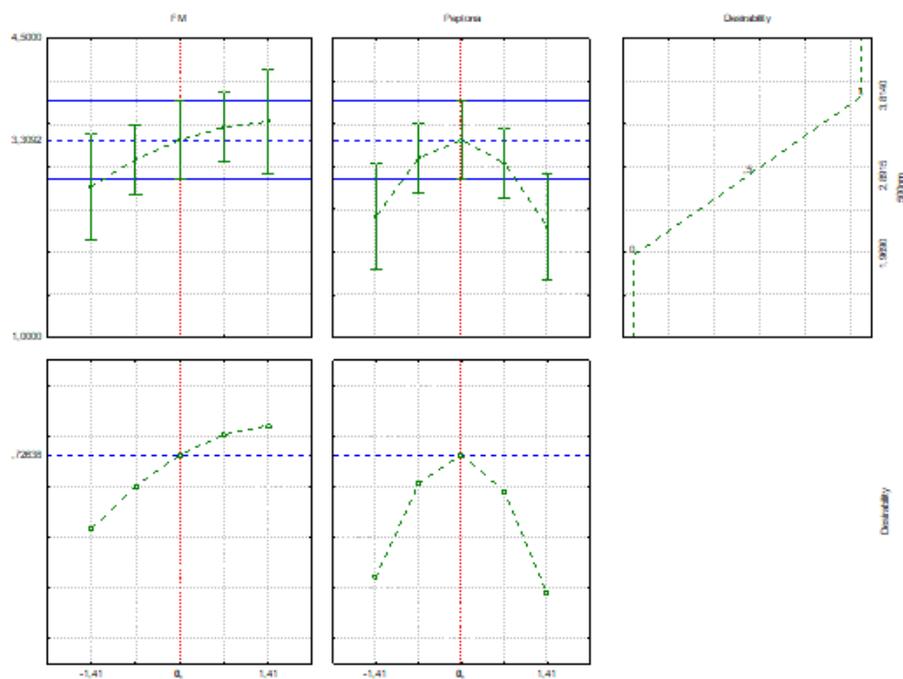


Figura 6. Maximização de múltipla resposta dos tratamentos no ensaio 2

A fim de validar maximização da produção de pigmentos, a fermentação foi realizada com o tratamento escolhido. Foi obtido $3,013 \pm 0,33$ de pigmentos que corresponde a 91,05 % do valor esperado que é 3,3092.

Assim, para a produção de pigmentos utilizando *M. purpureus* o tratamento maximizado utiliza 42,5 g.L⁻¹ de farelo de milho, enquanto a literatura relatou 30,0 g.L⁻¹ de bagaço de uva (SILVEIRA et al, 2008), mostrando que a maior consumo desse subproduto durante o processo fermentativo, evitando o descarte inadequado no ambiente.

3.3 Cinética da produção de pigmentos

A cinética foi realizada utilizando o tratamento para maior produção de pigmentos, peptona (30 g.L⁻¹) e FM (42,5 g.L⁻¹) em shaker (Figura 7) e percebeu-se que após 6 dias não houve diferença significativa na leitura da absorbância e, conseqüentemente, na produção de pigmentos por *M. purpureus*, mostrando o maior valor encontrado.

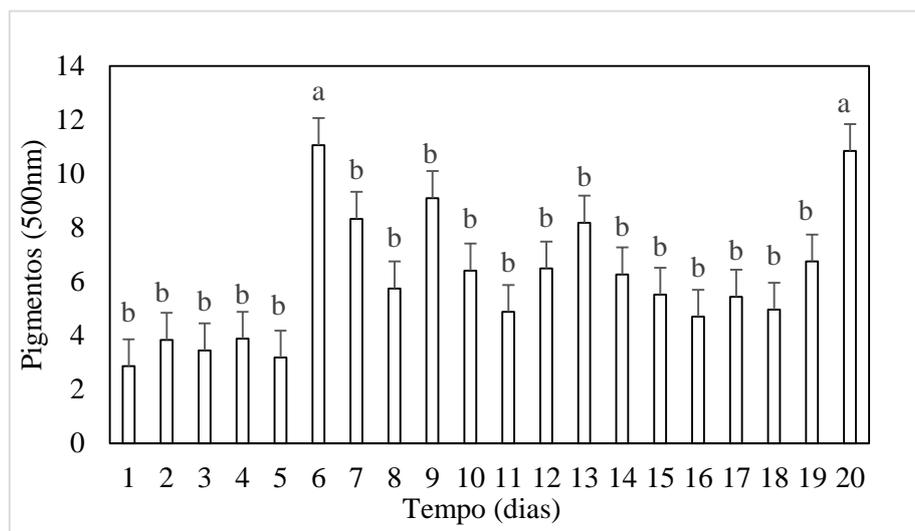


Figura 7. Cinética de produção de pigmentos

3.4 Estabilidade dos pigmentos

A Tabela 8 apresenta os resultados de estabilidade dos pigmentos em diferentes pH (4,5,6 e 7) em função do tempo (0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min).

Tabela 8. Estabilidade dos pigmentos em diferentes pH em função do tempo

Tempo (min)	pH			
	4,0	5,0	6,0	7,0
0	100,00 ^a	100,00 ^a	100,00 ^a	100,00 ^a
30	48,59 ^c	92,71 ^a	94,52 ^b	93,62 ^a
60	83,16 ^b	95,97 ^a	95,65 ^b	93,92 ^a
90	79,79 ^b	95,53 ^a	95,77 ^b	93,81 ^a
120	81,64 ^b	96,16 ^a	95,49 ^b	94,27 ^a
150	82,04 ^b	96,22 ^a	95,53 ^b	93,75 ^a
180	83,00 ^b	96,17 ^a	95,23 ^b	94,14 ^a
CV	6,17	5,30	1,27	3,41

* Estabilidade (%), Teste Tukey a (5%); CV: Coeficiente de variação.

Inicialmente, em pH 4,0 a estabilidade manteve-se em torno de 48,59% podendo ser observado formação de precipitado com posterior suspensão. A partir de 60 min, não houve diferença significativa para este pH. Em pH 5,0, os pigmentos se mantiveram estáveis durante os 180 min em que foram monitorados. Com relação ao pH 6,0, houve degradação da cor nos primeiros 30 min (94,52%), mantendo-se até os 180 min. Em pH 7,0, a estabilidade se manteve durante os 180 min. Desta forma, foi possível observar estabilidade do extrato de pigmentos de *M. purpureus* acima de pH 5. Nesta faixa de pH são incluídos grande parte dos alimentos industrializados mostrando que este pigmento pode ser mais interessante que compostos antocianinas, por exemplo, que possuem baixa estabilidade a pH (SHIOZER e BARATA, 2007).

Durante o tratamento em autoclave, houve degradação dos pigmentos de 4,24 passando este para o valor de 4,19 e representa 98,876% de estabilidade, sem diferença significativa. O que é interessante, já que este processo de alta temperatura é utilizado na indústria de alimentos em produtos submetidos a tratamentos térmicos agressivos, como esterilização.

3.5 Identificação dos compostos

O espectro no infravermelho (IV) (Figura 8) apresentou picos característicos de compostos aromáticos (1589, C=C), compostos alifáticos (2933, C-H), ligação de éster (1044, C-O) e ácido carboxílico (1405, C-O). Essas bandas indicam compostos presentes na estrutura dos pigmentos vermelhos: monascorubramina ($C_{23}H_{27}NO_4$) e rubropuntamina ($C_{21}H_{23}NO_4$) (PATTANAGUL et al., 2007).

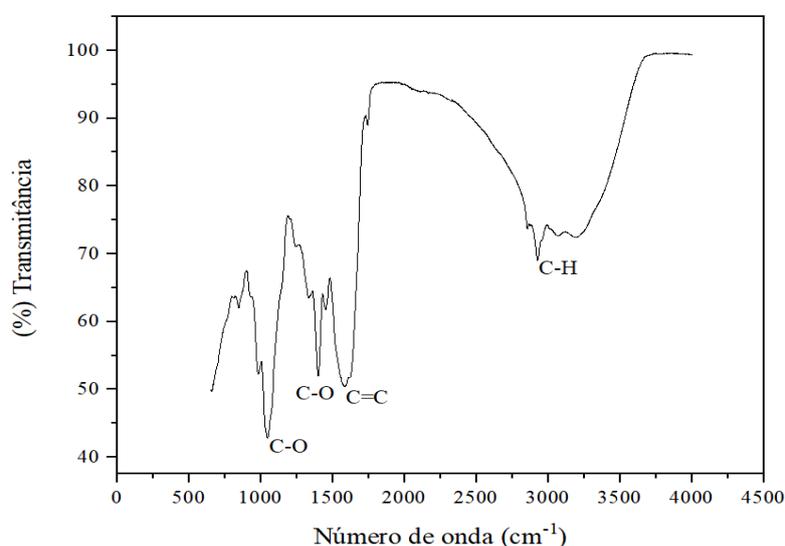


Figura 8. Espectro IV dos pigmentos

3.6 Atividade antioxidante

Muitos compostos naturais possuem atividades antioxidantes entre eles os pigmentos obtidos através de fermentação. A capacidade de atuar como antioxidante foi testada no FM e pigmentos por três métodos: ABTS, DPPH e FRAP (Tabela 9).

Tabela 9. Atividade antioxidante do FM e pigmentos produzidos por *Monascus purpureus*

Análises	FM	Pigmentos
ABTS (% descoloração)	32,27±0,85 ^b	73,4±0,77 ^a
DPPH (% descoloração)	41,31±1,03 ^b	75,63±0,46 ^a
FRAP (µg. de sulfato ferroso.g ⁻¹)	34,77±2,47 ^b	121,9±1,05 ^a

*Letras diferentes significa diferença estatística aplicando Teste T (p<0,5)

Os pigmentos apresentaram maior atividade que o FM em todos os métodos. Os resultados demonstram que a capacidade de capturar o radical ABTS⁺ foi 2 vezes maior nos pigmentos comparado ao FM, comportamento semelhante foi encontrado na análise de DPPH e FRAP. O aumento da atividade está diretamente relacionado a estrutura molecular dos pigmentos que possuem oxigênios com elétrons livres, capaz de se ligarem aos radicais tornando-os parte da molécula.

Huang et al. (2013), também observou o aumento significativo da atividade antioxidante dos pigmentos produzidos a partir dos resíduos de licor de sorgo através do método de ABTS. Lee et al. (2008), relatou valor próximo ao descrito nesse trabalho, em que a capacidade de captura do radical DPPH foi de 76,8 para pigmentos produzidos por fermentação da soja com *M. purpureus*.

4. Conclusão

No presente trabalho foi realizado a caracterização do FM que apresentou caráter lipídico com 52,20% desse composto e 26,77% de carboidratos, sendo utilizado como substrato para a fermentação submersa. A maximização da fermentação utilizando

onze tratamentos resultou no tratamento com +1,41 de [peptona, 30 g.L⁻¹] e +1,41 [FM, 42,5 g.L⁻¹].

Utilizando o tratamento otimizado a cinética foi realizada e o no 6º dia a produção de pigmentos já era igual ao 20º dia. Os pigmentos extraídos apresentaram estabilidade térmica e a pH>5,0. Os pigmentos extraídos apresentaram maior atividade antioxidante que o substrato utilizado.

5. Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), por meio de concessão de bolsa a nível de mestrado (Edital 003/2017).

6. Referências

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods Association Of Official Analytical Chemists. 15^a ed. Washington, 1994.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, chapter 33. Arlington: A.O.A.C., 1995.

BENASSI, M. T.; ANTUNES, A. J. A comparison of meta-phosphoric and oxalic acids as extractant solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 31, n.4, p. 507-513, 1988.

BENZIE I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma as a measure of “antioxidant potential.” **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p. 25-30, 1995.

CANTARELLI VS, FIALHO ET, SOUSA RV, FREITAS RT, LIMA JAF. Composição química, vitreosidade, composição química e digestibilidade de diferentes híbridos de milho para suínos. **Ciência e Agro**, v.31, p.860-864, 2007.

CELLI, G. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; BETA, T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties

of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. **Food Research International**, v. 44, n.8, p. 2442–2451, 2011.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard-Tenth Edition. Wayne, CLSI document M02-A10, 2009.

CORRADINI, M. G., & PELEG, M. (2004). A model of non-isothermal degradation of nutrients, pigments and enzymes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.84, p. 217–226, 2004.

FERRARINI H. Determinação de teores nutricionais do milho por espectroscopia no infravermelho e calibração multivariada. [Dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2004.

GROSS, J. Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 351, 1991.

HAQUE, M. A.; KACHRIMANIDOU, V.; KOUTINAS, A.; LIN, C. S. K. Valorization of bakery waste for biocolorant and enzyme production by *Monascus purpureus*. **Journal of Biotechnology**. v. 231, p. 55-64, 2016.

HUANG, C. S.; HU, H. TSAI, Y.; CHANG, W. *In vitro* effects of *Monascus purpureus* on antioxidation activity during fermentation of Kinmen sorghum liquor waste. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.115, p.418-423, 2013.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2018. Disponível em <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-denoticias/releases/23359-ibge-preve-safra-de-graos-1-7-maior-em-2019>>. Acesso 05/02/2018.

KIM, C.; JUNG, H.; KIM Y. O.; SHIN, C. S. Antimicrobial activities of amino acid derivatives of monascus pigments, **FEMS Microbiology Letters**, v. 264, p. 117-124, 2006.

LARRAURI, J. A.; RUPÉREZ, P.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.45, p. 1390-1393, 1997.

LEE, Y.-L., YANG, J.-H., & MAU, J.-L. Antioxidant properties of water extracts from *Monascus* fermented soybeans. **Food Chemistry**, v. 106, n.3, p. 1128–1137, 2008.

LI, W.; HYDAMAKA, A.W.; LOWRY, L.; BETA, T. Comparison of antioxidant capacity and phenolic compounds of berries, chokecherry and seabuckthorn. **Central European Journal of Biology**, v.4, n. 4, p. 499–506, 2009.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.

OSMANOVA, N.; SCHULTZE, W.; AYOUB, N. Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 2, p. 315–342, 2010.

PATTANAGUL, P., PINTHONG, R., PHIANMONGKOL, A., & LEKSAWASDI, N. Review of angkak production (*Monascus purpureus*). **Journal of Science**, v. 34, p. 319–328, 2007.

PFEIFFER, W.H.; MCCLAFFERTY, B. HarvestPlus: breeding crops for better nutrition. **Crop Science**, v.47, p.88-105, 2007.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

RAZAK, D. L. A.; RASHID N. Y. A.; JAMALUDDIN, A.; SHARIFUDIN, S. A.; LONG, K. Enhancement of phenolic acid content and antioxidant activity of rice bran fermented with *Rhizopus oligosporus* and *Monascus purpureus*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, p. 33-38, 2015.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002, 2010.

SANTOS, S. C. Características nutricionais e físicas do milho com diferentes texturas e tempos de armazenamento. [Tese, 115f]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2015.

SRIANTA, I.; ZUBAIDAH, E.; ESTIASIH, T.; YAMADA, M. HARIJONO. Comparison of *Monascus purpureus* growth, pigment production and composition on diferente cereal subtrates with state fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.7, p. 181-186, 2016.

SRIVASTAV, V. K.; YADAV, S. GOVINDASAMY, M. CHANDRASEKARAN. Red pigment production by *Monascus purpureus* using sweet potato-based medium in submerged fermentation. **Nutrafoods**, v. 14, p.1-9, 2015.

STURDIKOVA, M.; SLUGEN, D.; LESOVA, K.; ROSENBERG, M. Mikrobiálna produkcia farbnych azaphilonovych metabolitov. **Chem Listy**, v. 94, p. 105–110, 2000.

TALCOTT, T.S.; HOWARD, R. L. Phenolic autoxidation is responsible for color degradation in processed carrot puree. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 47, p. 2109-2115, 1999.

4. ANEXOS

Ensaio 2 – Produção de pigmentos vermelhos por *Monascus purpureus* utilizando delineamento experimental (2^2) em 9 dias de fermentação



Tratamento 1

Tratamento 2



Tratamento 3

Tratamento 4



Tratamento 5

Tratamento 6



Tratamento 7

Tratamento 8



Tratamento 9

Tratamento 10



Tratamento 11