



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

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
POR *Monascus ruber* CCT 3802 EM CULTIVO SUBMERSO**

RENATA ANSELMO DE SÁ

**FLORIANÓPOLIS/SC
AGOSTO/2005**

RENATA ANSELMO DE SÁ

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
POR *Monascus ruber* CCT 3802 EM CULTIVO SUBMERSO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow
Coorientadora: Dr^a. Denise Esteves Moritz

Florianópolis, Agosto, 2005

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

de Sá, Renata Anselmo

Estudo da Produção de Metabólitos Secundários por *monascus ruber*
CCT 3802 em Cultivo Submerso / Renata Anselmo de Sá; orientador, Jorge
Luiz Ninow – coorientadora; Denise Esteve Moritz – Florianópolis, SC;
2005.
.....138

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro
Tecnológico. Programade Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2 Pigmentos. 3. Lovastatina. 4. Amilase.
5. *Monascus ruber*.6. cultivo submerso. I. Ninow Jorge Luiz; Moritz Denise
Esteves. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química. III. Título.

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS POR *Monascus ruber* CCT 3802 EM CULTIVO
SUBMERSO**

Por

Renata Anselmo de Sá

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Química**, área de concentração **Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow
Orientador

Dr^a Denise Esteves Moritz
Coorientador

Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.
Coordenador

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow

Dr^a. Denise Esteves Moritz

Prof. Dr. Hugo Moreira Soares

Prof.^a Dr.^a Rita de Cassia Siqueira Curto Valle

Florianópolis, 01 de agosto de 2005

*Aos meus pais, Benigno e Salete,
Co-autores deste trabalho.*

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



UFSC



CTC



EQA

ENGEBIO

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me permitido chegar até aqui.

Ao namorado e hoje meu noivo Tiago que sempre esteve ao meu lado, por suas palavras carinhosas e de incentivo em todos os momentos, meu especial agradecimento.

Aos meus pais Salete e Benigno pela compreensão, carinho e confiança depositados ao longo do caminho e por me mostrarem desde cedo a importância do estudo, meu eterno agradecimento.

Aos meus irmãos Alexandre e Anselmo pela paciência que tiveram comigo e que sabem o quanto eu os amo.

Ao José e Iolita que não mediram esforços para me ajudar.

Ao professor e orientador Jorge pela orientação tão sábia e por nunca me negar sua ajuda demonstrando sempre sua boa vontade.

À professora e amiga Denise, pela dedicação, excelência e acima de tudo por acreditar em mim e no nosso trabalho. Muito Obrigada, por tudo!

A minha querida amiga e colega Fabiane que me ajudou nos momentos mais difíceis e com suas palavras macias me fez sempre prosseguir.

Aos meus colegas André e Zaira por prestarem contribuição tão valiosa, nesse momento.

Aos meus colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica e, especial ao bolsista Thiago por sua preciosa dedicação.

Aos professores Luiz e Pimentel da Universidade do Sul de Santa Catarina-UNISUL pela ajuda e por permitir a utilização das

dependências do Laboratório de Bioquímica e Química Farmacêutica, indispensável para o cumprimento desse trabalho.

Ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química e em especial aos professores Agenor, Selene e ao secretário Edevilson.

Aos meus familiares que sempre estiveram presentes e que sempre demonstraram apreço por mim.

““ Quando a gente anda sempre para frente, não pode mesmo ir longe...””

(Antoine De Saint-Exupéry em *O Pequeno Príncipe*)

RESUMO

O impacto visual é elemento de decisão na escolha de um alimento e a indústria alimentícia utiliza-se de corantes para deixar os alimentos potencialmente mais atrativos. Porém, como grande parte dos corantes alimentares é derivada da indústria petroquímica e possuem na maioria das vezes efeitos indesejáveis, segue a formulação de leis no mundo que regulamentam o uso destes corantes e que protegem a saúde do consumidor. Além da função original de nutrição, alguns alimentos ajudam na prevenção e tratamento de doenças, sendo denominados de alimentos funcionais ou nutracêuticos. Seguindo a nova tendência do mercado alimentício em consumir corantes naturais e com componentes biologicamente ativos, buscou-se estudar neste trabalho alguns metabólitos secundários do fungo filamentoso *Monascus ruber* CCT 3802, todos oriundos da via de biossíntese dos policetídeos. Este microrganismo é tradicionalmente utilizado em países da União Européia, Estados Unidos, China e Japão por produzirem biopigmentos como o Monascus, através de fermentação do arroz; sendo este usado em carnes, peixes, bebidas, sorvetes e confeitaria. Entre outras moléculas bioativas produzidas por espécies de *Monascus* está a enzima amilase, largamente utilizada nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e de cosméticos, e a mevinolina (lovastatina), que vem sendo utilizada como complemento dietético no tratamento da hipercolesterolemia por inibir a biossíntese do colesterol. O presente trabalho busca enunciar as características metabólicas do fungo filamentoso *Monascus ruber* CCT 3802 àquelas relacionadas à produção de pigmentos vermelhos, amilase e lovastatina em diferentes substratos: glicose, amido, farelo de arroz, milhocina em cultivo submerso. As maiores concentrações de pigmento *Monascus* e biomassa foram obtidas com o amido e glutamato monossódico como fonte de carbono e nitrogênio respectivamente ficando na ordem de 4,98 UDO₄₈₀ e 5,24 g/L enquanto que nos meios de cultivo estudados e técnicas utilizadas a lovastatina não foi detectada. Ainda no estudo, o *Monascus* produziu concentrações elevadas de amilase (35,22 UI).

Palavras-chave: Pigmentos, lovastatina, amilase, *Monascus ruber*, cultivo submerso.

ABSTRACT

The visual impact is element of decision in the choice of a food and the food industry used of colorants to leave the foods potentially more attractives. However, as great part of the alimentary colors they are derived of the industry petrochemical and they possess undesirable effects most of the time, it follows the formulation of laws in the world that regulate the use of these coloring and that protect the consumer's health. Besides the original function of nutrition, some foods help in the prevention and treatment of diseases, being denominated of functional foods or nutraceuticals. Following the new tendency of the nutritious market in consuming coloring natural and with components actives biologically, it was looked for to study in this work some secondary metabolites of the filamentous fungus *Monascus ruber* CCT 3802, all originating from the polyketides pathway. This microorganism is used traditionally at countries of the European Union, United States, China and Japan for they produce biopigments as Monascus, through fermentation of the rice; being this used in meats, fish, drunk, ice creams and sweet shop. Among other molecules bioactives produced by species of *Monascus* they are the enzyme amylase, largely used in the industries of foods, pharmaceuticals and of cosmetics, and the mevinolina (lovastatin), that has been used as dietary complement in the treatment of the hypercolesterolemia for inhibiting the biosynthesis of the cholesterol. The present work search to enunciate the metabolics characteristics of the filamentous fungus *Monascus ruber* CCT 3802 the those related to the production of red pigments, amylase and lovastatin in different substrates: glucose, starch, rice powder and corn steep liquor in cultivation submerged. The largest pigment concentrations Monascus and biomass were obtained with the starch and monosodium glutamate as source of carbon and nitrogen respectively being in the order of 4,98 UDO₄₈₀ and 5,24 g/L while in the cultivation means studied and used techniques the lovastatin was not detected. Still in the study, *Monascus* produced high concentrations of amylase (35,22 UI).

Keywords: Pigments, lovastatin, amylase, *Monascus ruber*, submerged medium.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mercado Mundial de corantes alimentícios, dados de 1992 Fonte: Kilikian (2002).....	43
Figura 2 – Forma estrutural do amido.....	45
Figura 3 - Micromorfologia (hifas e conídeos) e Macromorfologia do <i>Monascus ruber</i> Fonte: Moritz (2005).....	51
Figura 4 - Via Metabólica dos policetídeos (HAJJAJ et al., 1999a).....	52
Figura 5 – Processo de produção industrial do pigmento <i>Monascus</i> (ALLOK, 2001).....	55
Figura 6 - Estruturas dos seis pigmentos produzidos por espécies de <i>Monascus</i> - 1, monascina, 2, ankaflavina; 3, monascorubrina, 4, rubropunctatina; 5, monascorubramina, 6, rubropunctamina.....	56
Figura 7 - Esquema hipotético de formação de N- glutarilmonascorubramina por <i>Monascus ruber</i>	57
Figura 8 - Esquema de formação de citrinina e pigmento vermelho a partir da condensação de 1 molécula de acetil CoA e 3 moléculas de malonil CoA.....	59
Figura 9 - Reações químicas ocorridas para formação de citrinina e pigmento vermelho.....	61
Figura 10 – Processos de purificação e caracterização das estruturas envolvidas para formação dos pigmentos extracelulares bem como a ocorrência de complexos “EDA” destes pigmentos (<i>N</i> - glutarilrubropunctamina – GTR; <i>N</i> -glutarilmonascorubramina – GTM; <i>N</i> -glucosilmonascorubramina - GCM e <i>N</i> -glucosilrubropunctamina – GCR) Fonte: Hajjaj et al. (1997).....	62
Figura 11 - Biossíntese hipotética da lovastatina.....	67
Figura 12 – Estruturas de monacolininas em <i>red yeast rice</i>	69
Figura 13 – Conversão das formas da mevinolina.....	70
Figura 14 – <i>Shaker</i> orbital utilizado para os cultivos celulares de <i>Monascus ruber</i> CCT 3802.....	79
Figura 15 - Procedimento utilizado para determinação da enzima amilase.....	15
Figura 16– Evolução das concentrações de biomassa, absorbância do pigmento vermelho (UDO ₄₈₀), concentração de etanol (g/L), consumo de	

glicose e pH em meio de cultivo submerso contendo glicose (20 g/L) e glutamato monossódico (GMS) à temperatura de 30°C e 150 min⁻¹ de frequência de agitação. (Os dados encontram-se no Apêndice).....90

Figura 17- Esquema da fermentação alcoólica realizada pelos fungos..92

Figura 18 - Evolução das concentrações de biomassa, absorbância do pigmento vermelho (UDO₄₈₀), amilase e pH em meio de cultivo submerso contendo amido (3 g/L) e glutamato monossódico (GMS) à temperatura de 30°C e 150 min⁻¹ de frequência de agitação. (Os dados encontram-se no Apêndice).....94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pigmentos naturais usados no Japão em 1994.....	38
Tabela 2 - Pigmentos naturais aprovados para uso no Brasil.....	39
Tabela 3 - Aceitação dos Corantes Naturais nos Principais Mercados Internacionais.....	42
Tabela 4 - Concentrações dos constituintes do meio de cultivo para obtenção de lovastatina.....	76
Tabela 5 - Influência da fonte de aminoácidos, na concentração de 5 g/L, sobre a produção de pigmento vermelho, expresso em DO ₅₀₀ e citrinina.....	95

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

BDA – Batata Dextrose Ágar;

CDB – Caldo Dextrose Batata;

dL – decilitro (1×10^{-1} L);

GMS – Glutamato Monossódico;

HMG-CoA – 3 – hidroxí – 3 – metilglutaril coenzima A;

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

pH – Potencial hidrogeniônico;

PIB – Produto Interno Bruto;

P_{max} – Produtividade máxima;

rpm – rotações por minuto;

t – Tempo;

UDO₄₈₀ – Unidade de Densidade Óptica a 480 nm que representa a quantidade de pigmento vermelho (pigmento Monascus);

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

UI – Unidades Internacionais;

$Y_{M/S}$ = Fator de conversão de substrato S no componente M (pigmento Monascus), (UDO₄₈₀.g.L⁻¹) ou X, biomassa (g.g⁻¹);

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

μ_{max} = Velocidade específica máxima de crescimento.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	29
OBJETIVOS.....	33
1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	35
1.1 - Corantes Alimentares	35
1.1.1 - Definição.....	35
1.1.2 - Classificação	35
1.1.3 - Vantagens e Desvantagens de Corantes Naturais e Artificiais ..	36
1.1.4 - Pigmentos Naturais para Alimentos.....	37
1.1.5 - Legislação Nacional e Internacional de Corantes	40
1.1.5.1 - Corantes Permitidos para Alimentação no Brasil	41
1.1.5.2 - Corantes Naturais Permitidos na Alimentação Pelos Principais Mercados Internacionais	41
1.1.6 - Potencial de Mercado de Corantes Naturais	43
1.1.6.1 - Mercado Internacional	43
1.1.6.2 - Mercado Nacional.....	43
1.2 - Amido	45
1.3 - Amilases.....	46
1.4 - Alimentos Funcionais	47
1.5 - Aplicação Biotecnológica dos Fungos Filamentosos.....	48
1.6 - Gênero <i>Monascus</i>	50
1.7. - Metabolismo Secundário do Fungo Filamentoso <i>Monascus ruber</i>	51
1.7.1. - Policetídeos	51
1.7.2 - Metabolismo dos Policetídeos	52
1.8 – Produção de metabólitos de interesse industrial a partir do fungo filamentoso <i>Monascus ruber</i>	53
1.8.1 - Pigmentos <i>Monascus</i>	54
1.8.1.1 - Grupos de Pigmentos Produzidos por Espécies de <i>Monascus</i>	55

1.8.1.2 - Metabolismo de Formação dos Pigmentos e Citrinina	56
1.8.1.3 - Caracterização do Corante Produzido por <i>Monascus ruber</i> CCT 3802.....	61
1.8.2 - Produção de Enzimas por <i>Monascus ruber</i>	64
1.8.3 - Produção de Lovastatina por Espécies de <i>Monascus</i>	65
2 - MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1 - Procedimentos Experimentais.....	73
2.2 - Microrganismo.....	73
2.3 - Meios de Cultivo e Condições de Operação	74
2.3.1 - Manutenção da Cultura.....	74
2.3.2 - Preparo dos Meios de Cultivo.....	74
2.3.3 - Preparo da Solução de Nitrogênio-Milhocina.....	77
2.3.4 - Preparo do Pré-Inóculo	77
2.3.5 - Inoculação do Fungo.....	78
2.3.6 - Ensaio em Frascos Agitados e Condições de Operação.....	78
2.4 - Métodos Analíticos.....	79
2.4.1 - Tratamento das Amostras	79
2.4.2 - Determinação da Concentração Celular	80
2.4.3 - Determinação da Concentração de Pigmento Vermelho	80
2.4.4 - Dosagem de Glicose	80
2.4.5 - Determinação da Concentração de Etanol	81
2.4.6 - Dosagem de Amilase	82
2.4.7 - Determinação de Lovastatina.....	84
2.4.8 - Tratamento de Dados.....	84
2.5 - Estudo da Produção de pigmentos vermelhos	85
2.6 - Estudo da Produção de Amilase	86
2.7 - Estudo da Produção de Lovastatina.....	86
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89

3.1 - Estudo da Produção de Pigmentos Vermelhos Utilizando Glicose como Fonte de Carbono	89
3.2 - Estudo da Produção de Amilase Utilizando Amido como Fonte de Carbono	93
3.3 - Estudo da Produção de Lovastatina	97
4 - CONCLUSÕES	99
SUGESTÕES	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
ANEXO	119
APÊNDICE.....	131

1. INTRODUÇÃO

Atualmente os fungos filamentosos assumem um importante papel na vida e meio ambiente e têm sido encontrados para muitos usos. Seu potencial bioquímico pode ser traduzido na produção de moléculas bioativas como proteínas heterólogas, ácidos orgânicos, enzimas e policetídeos o que os tornam organismos promissores para as mais diversas indústrias (KOUTINAS et al., 2003; KUMAR et al., 2003a, 2003b; LIU et al., 2002).

Diante deste contexto, espécies do fungo *Monascus* se destacam por produzir pigmentos naturais, substâncias antibióticas, fármacos e enzimas (AKIHISA et al., 2004; FENICE et al., 2000; WANG; LEE; PAN, 2003). Estes fungos filamentosos não são patogênicos e seus produtos são freqüentemente usados como corantes em alimentos (JUZLOVA; MARTINKOVA; KREN, 1996). Os fungos *Monascus* têm sido utilizados em países do Oriente para fazer vinho vermelho de arroz, vinho vermelho *Shao-Hsing*, queijo vermelho de soja e *Ang-Khak* (arroz vermelho chinês) (LIN, 1973 apud LIN; DEMAINE, 1991). Novas aplicações em alimentos, como a coloração de carne processada (salsicha e presuntos), produtos de pesca como *Kamakoko* (pasta de peixe) e *Ketchup* têm sido descritos (SWEENEY et al., 1981 apud HAJJAJ et al., 1997).

Dentre os metabólitos de maior interesse industrial podem ser citados os pigmentos amarelo, laranja e vermelho, onde coram o vinho, peixe e produtos cárneos, sendo principalmente usados no sul da China, Taiwan, Japão e Indonésia. O corante do arroz vermelho chinês (*Ang-Khak* ou *Anka*) é produzido pelo crescimento de espécies de *Monascus* (GUNNARD; WASILESKI; ALAN, 1994; MACARIO; PALO; MACEDA, 1960). Estes microrganismos são tradicionalmente cultivados em meio sólido, grãos de arroz ou pão. Embora a fermentação em estado sólido não permita que os parâmetros de cultivo sejam controlados, os estudos nesse meio de cultura têm sido realizados com maior freqüência tanto no Brasil como em outros países (CARDENAS et al., 2001; HAJJAJ et al., 1999a; LIN; DEMAINE, 2000). Todavia, estudos em cultivo submerso em meio sintético ou complexo têm sido desenvolvidos recentemente (HAJJAJ et al., 2000a;

LIN, 1973 apud LIN; DEMAIN, 1991) tem demonstrado que a produção de pigmento em fermentação submersa é muito menor que na cultura sólida. Entretanto, estudos em cultivo submerso permitem um maior conhecimento metabólico/bioquímico, além da regulação metabólica da produção de importantes moléculas bioativas produzidas por espécies de *Monascus*.

A preocupação com a qualidade de vida é um dos pontos fortes da época atual. A busca por produtos que não agridam o meio ambiente e tragam benefícios ao ser humano é uma realidade no meio científico. Pelo fato de muitos pigmentos sintéticos estarem relacionados à carcinogenicidade, há uma busca incessante pelo uso de pigmentos naturais, entre eles o pigmento *Monascus*, sendo incluído portanto num dos grupos de pigmentos mais saudáveis à saúde humana, os pigmentos naturais.

A apresentação escrita do presente estudo foi dividida em quatro capítulos. A estrutura básica, com uma abordagem sucinta de cada capítulo, é apresentada a seguir.

CAPÍTULO 1 – Revisão Bibliográfica: explana conceitos relacionados a pigmentos naturais e sintéticos bem como produção e mercado de pigmentos, relacionando também os metabólitos secundários - pigmentos, enzima amilase e lovastatina produzidas pelo fungo *Monascus ruber* ressaltando as características metabólicas do fungo em questão.

CAPÍTULO 2 – Material e Métodos: neste capítulo são apresentados os materiais, equipamentos, microrganismo, meios de cultivo e procedimentos utilizados para a realização dos ensaios e bioprocessos.

CAPÍTULO 3 – Resultados e Discussão: aqui são apresentados os resultados obtidos na produção de pigmentos vermelhos pelo fungo filamentosso *Monascus ruber* CCT 3802. Dando continuidade, são expostos os resultados obtidos nos bioprocessos para a produção da enzima amilase, bem como, a verificação da lovastatina.

CAPÍTULO 4 – Conclusão: esse capítulo apresenta as conclusões obtidas a partir dos estudos realizados no trabalho, de modo

a fornecer dados e informações, que possam contribuir para ressaltar e/ou aprimorar estudos de fungos filamentosos em cultivo submerso.

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral o estudo da produção de pigmentos vermelhos, lovastatina e amilase por *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo submerso, utilizando meio sintético.

Os objetivos específicos foram:

1. Estudar a produção de pigmento vermelho utilizando a glicose como principal fonte de carbono.
2. Estudar a produção de pigmento vermelho utilizando o amido de arroz como principal fonte de carbono.
3. Estudar a produção de amilase utilizando o amido de arroz como principal fonte de carbono.
4. Estudar a produção de lovastatina utilizando glicose, amido de arroz e resíduos de interesse regional - farelo de arroz e milhocina.
5. Relacionar a importância das fontes de carbono na produção das moléculas bioativas por *Monascus ruber* CCT 3802 com os mecanismos de obtenção das mesmas.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 - Corantes Alimentares

1.1.1 - Definição

De acordo com a Secretaria de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde, (SVS/MS), portaria nº 540/97 corante é a substância que confere, intensifica ou restaura a cor de um alimento (BRASIL, 1997).

A importância dos corantes faz com que os produtos industrializados tenham uma aparência semelhante aos produtos naturais e, portanto, mais agradável aos olhos do consumidor, aumentando assim a aceitabilidade do produto. Os corantes são considerados essenciais nos processos industriais de alimentos, sendo utilizados em praticamente todos os produtos alimentícios industrializados e constituindo-se dessa forma um grande alvo da indústria alimentícia.

1.1.2 - Classificação

Os corantes alimentares podem ser naturais ou sintéticos e na maioria das vezes são desprovidos de qualquer valor nutricional.

Os corantes permitidos pela legislação brasileira para uso em alimentos estão divididos nos seguintes grupos (MAIMOM, 2000):

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

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

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

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

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

1.1.3 - Vantagens e Desvantagens de Corantes Naturais e Artificiais

Sob o ponto de vista técnico, os benefícios obtidos com o emprego dos corantes sintéticos nas indústrias de alimentos são muitos, pois os mesmos possuem baixo custo, melhor poder tintorial, boa estabilidade, maior pureza e disponibilidade; e fornecem grande faixa de coloração, proporcionando infinita variação de tons e garantindo aos processadores de alimentos a tonalidade adequada ao produto que se pretende colorir. O fato, porém, dos corantes sintéticos serem aprovados pelo *Codex Alimentarius*, órgão ligado à Organização Mundial da Saúde (OMS), não descarta a possibilidade destes produtos apresentarem efeitos adversos de toxicidade, mutagênese e potencial carcinogênico (ABRUNHOSA et al., 2001; ATROSHI et al., 2002; BAILLY et al., 2002; BEGUM; SAMAJPATI, 2000; BERNDT, 1998; BONDY; ARMSTRONG, 1998; DA LOZZO; OLIVEIRA; CARNIERI, 1998; EL-KADY; EL-MARAGHY; ZOHRI, 1994; HIPLER et al., 2000; JANARDHANA; RAVEESHA; SHETTY, 1999; JUNG et al., 2001; KREJCI; BRETZ; KOECHEL, 1996; MILLS et al., 1995; SABATER-VILAR; MAAS; FINK-GREMMELS, 1999; SCUDAMORE; HETMANSKI, 1995).

O número de corantes sintéticos permitidos pela legislação tem diminuído por isso o interesse das indústrias de alimentos está focado no desenvolvimento de pigmentos alimentares obtidos a partir de fontes naturais.

Os corantes naturais, obtidos através de diversos processos, além de serem reconhecidos com o rótulo de “naturais” e, portanto, tendo uma melhor aceitação pelo consumidor, apresentam ainda outras vantagens. A maioria dos pigmentos naturais são extraídos de plantas

ou vegetais e de microrganismos, tendo-se portanto uma vasta fonte de extração do produto (SAKUTA; KOMAMINE, 1987 apud JACOBSEN; WASILESKI, 1994).

Embora se tenha uma boa perspectiva com relação à maioria dos pigmentos naturais, estes também podem apresentar desvantagens como: maior dificuldade de aquisição (preço/disponibilidade), dificuldade na padronização da cor, menor estabilidade à luz e ao pH, menor solubilidade além de apresentarem poucos estudos toxicológicos (FRANCIS, 1989). Assim, na formulação do pigmento natural industrializado, são utilizadas moléculas que conferem maior solubilidade, estabilidade, poder de emulsificação, espessantes, de tal maneira que as propriedades dos corantes sejam mantidas.

Os corantes vermelhos produzidos por diversas espécies do gênero *Monascus* em culturas sólidas utilizados principalmente para colorir alimentos fermentados são muito bem estudados na Ásia (PASTRANA et al., 1995). Suas propriedades terapêuticas e sua relativa estabilidade com relação ao pH e temperatura (BLANC, 1998; HAJJAJ et al., 1998; KILIKIAN, 2002; KIM et al., 2002; LIN; DEMAIN, 1995), são aspectos importantes na substituição dos corantes naturais pelos sintéticos.

1.1.4 - Pigmentos Naturais para Alimentos

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

- porfirinas;
- betalainas;
- flavonóides;
 - antocianinas (cores azul e vermelho)
 - antoxantinas (cores nos tons amarelos)
 - leucoantocianidinas (incolores)
- carotenóides;
- taninos;

- outros pigmentos (quinonas – ácido carmínico, polifenóis, Monascus - Monascin, etc.) (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

-

Tabela 1 - Pigmentos naturais usados no Japão em 1994

Pigmento alimentar	Quantidade (kg)
Carotenóides	1230 000
Annatto	550 000
Paprika	250 000
Gardenia yellow	350 000
Extracted carotene	80 000
Antocianinas	385 000
Red cabbage	100 000
Grape skin	100 000
Berry	90 000
Purple corn	50 000
Grape juice	20 000
Red perilla	15 000
Purple sweet potato	10 000
Flavonóides	308 000
Kaoliang	26 000
Onion	50 000
Shea nut	2 000
Cacao	50 000
Safflower	180 000
Antraquinonas	133 000
Cochineal	120 000
Madder	10 000
Lac	3 000
Outros	1 195 000
Beet	230 000
Curcumin	150 000
Monascus	700 000
Gardênia blue	100 000
Óleo vegetal <i>Safflower</i>	180 000
Spirulina	15 000
TOTAL	3 251 000

Fonte: Watanabe et al. (1999)

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

Tabela 2 - Pigmentos naturais aprovados para uso no Brasil

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

			Beta-apo-8'-carotenal
161 b	-	-	Luteína
161g	40850	<i>Food Orange 8</i>	Cataxantina
162	-	-	Vermelho de beterraba, betanina
163 i	-	-	Antocianinas (de frutas e hortaliças)
163ii	-	-	Extrato de casca de uva

Fonte: Anvisa (2001)

INS*- Sistema Numérico Internacional

CI** – Número de Identificação

CI name*** – Nome específico do aditivo

Atualmente, há uma infinidade de novas fontes de corantes naturais na natureza com grande potencial para colorir os alimentos. Como exemplo das novas descobertas, há a cultura de células e a cultura de tecidos, usadas com sucesso para a produção comercial de pigmentos. Carotenóides, antocianinas e betalainas podem ser sintetizadas e cultivadas por este processo (HANAGATA et al., 1994; HARKER; PECKER; HIRSCHBERG, 2000; NEGRO; FERNANDEZ, 2000).

1.1.5 - Legislação Nacional e Internacional de Corantes

Nos últimos anos, observa-se uma nova tendência no consumo de corante que resulta em uma substituição dos corantes sintéticos pelos naturais. De acordo com Hallagan (1991 apud MAIMOM, 2000), o FDA (*Food and Drug Administration*) permite o uso de apenas sete corantes artificiais na indústria alimentícia e de cosméticos, enquanto anteriormente este número já chegou a oitenta.

No Brasil, a legislação de alimentos e cosméticos está a cargo do Ministério da Saúde, sendo que as normas brasileiras para corantes e aditivos são baseadas nas normas e regulamentações americanas.

1.1.5.1 - Corantes Permitidos para Alimentação no Brasil

A partir da Resolução n.º 4 de 24 de novembro de 1988, a qual revisou todas as tabelas referentes a aditivos dispostos no decreto n.º 55.871, ficaram definidos como Corantes Sintéticos: amarelo crepúsculo F.C.F., tartrazina, azul brilhante F.C.F., indigtina, bordeaux S ou amaranto, eritrosina, ponceau 4R e vermelho 40. O Brasil permite os seguintes corantes artificiais: Tartrazina, Amarelo Crepúsculo, Amaranto, Ponceau 4R, Vermelho 40, Eritrosina, Azul Indigotina e Azul Brilhante, Verde Rápido, Azul Patente V e Azorrubina (BRASIL, 1998 apud MAIMON, 2000). Dentre os corantes sintéticos, de maior uso, pode-se citar as xantinas (eritrosina), trifenilmetanos (azul-brilhante), os monoazos (vermelho-sólido E, escarlata GN, ponceau 4 R, vermelho 40, amarelo-crepúsculo e laranja GGN), a pirazolone (tartazina) e a indigóide (indigotina) (PRADO; GODOY, 2004).

1.1.5.2 - Corantes Naturais Permitidos na Alimentação Pelos Principais Mercados Internacionais

No mercado internacional há uma nítida preferência em liberar o uso de corantes naturais e restringir o uso dos sintéticos, seja no ramo de alimentos ou no de cosméticos. Entretanto, os limites de Ingestão Diária Aceitáveis (IDA) para os corantes naturais precisam ser estabelecidos para simplificar sua comercialização atual e expandir seu mercado futuro. De acordo com Maimom (2000) os carotenóides, carvão, clorofila simples, urzela, vermelho de beterraba e xantofilas, são exemplos de corantes naturais que não possuem tal atributo (Tabela 3).

Tabela 3 - Aceitação dos Corantes Naturais nos Principais Mercados Internacionais

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

Fonte: Mascarenhas (1995 apud MAIMOM 2000)

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

** Permitido apenas na Grã Bretanha

1.1.6 - Potencial de Mercado de Corantes Naturais

1.1.6.1 - Mercado Internacional

Segundo um estudo realizado por Maimom (2000): “*Observa-se a substituição dos corantes artificiais decorrentes da sensibilização ecológica que se traduz em uma exigência crescente dos consumidores e dos órgãos de saúde que questionam os efeitos colaterais dos aditivos químicos. Os consumidores entendem que quanto mais natural o alimento, mais saudável ele é.*”

O mercado mundial dos pigmentos, apresentado na Figura 1, é estimado em quase um bilhão de dólares americanos. Segundo Blanc (1999), o mercado de pigmentos naturais, é o que apresenta maior crescimento, a uma velocidade de 5 a 10% ao ano.

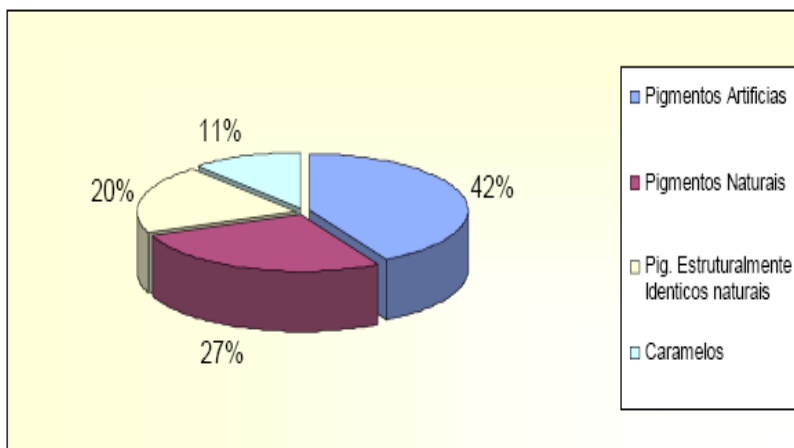


Figura 1 - Mercado Mundial de corantes alimentícios, dados de 1992
Fonte: Kilikian (2002)

1.1.6.2 - MERCADO NACIONAL

Dados de 2001 demonstraram que a indústria de alimentos, no Brasil, representava 4% do PIB e 30% do total das exportações e que o

setor contou com 38 mil empresas, 750 mil empregos diretos e faturamento anual de R\$ 58,1 bilhões. Considerando que a maioria dos alimentos processados leva corantes, o mercado destes pigmentos está em franca expansão (MAIMOM, 2000).

Embora a tecnologia disponível nas indústrias brasileiras nem sempre seja competitiva em nível de qualidade e de preços com a tecnologia existente no Japão, Estados Unidos e Europa, há no Brasil indústrias com capacidade técnica e produtos com excelente qualidade. A exemplo disso, tem-se as empresas que compõem o mercado de corantes naturais e que são diversificadas quanto à sua estrutura física e tecnológica. Considerando aquelas pertencentes a um mesmo patamar, podem ser citadas: CHR Hansen's Ind. e Com. Ltda.; Baculerê Agroindustrial Ltda.; Basf Brasileira S/A, SBI System Bio industries do Brasil Ltda.; Caal - Casa Americana de Artigos para Laboratórios Ltda.; IFF Essências Ltda.; Brastóquio, Roche, Star & Arty Indredientes alimentícios Ltda.; Duas Rodas industrial Ltda.; Cordianil; Condicor, Star e Arty; Corin; Sabor; Liotécnica; Penina; Corantec; Sanrisil; Adicon; Firance; Orgâna; Simexport; M. Cassab; Laboratório Exato; Dragogo; Quest; Ciesa; Mix; Gremafer; Kraki Lopesco; CAQ - Casa Química; Divital; Coveg; e Macalé (MAIMOM, 2000).

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

Como resposta aos riscos oferecidos pelos corantes sintéticos, o Brasil assim como outros países têm manifestado esforços nas pesquisas com corantes naturais, o que faz com que o interesse por produtos naturais esteja crescendo no Brasil e no mundo, embora a maioria das indústrias concorde que o custo para produzir os corantes naturais seja bastante elevado. Ainda assim, há forte tendência de utilização desses nos mercados interno e externo.

1.2 - Amido

O amido é um homopolissacarídeo constituído por dois tipos de polissacarídeos: amilose, de cadeia linear não ramificada, formada por unidades de glucose em ligação alfa-1,4 e por amilopectina, de cadeia ramificada, formada por unidades de glucose em ligação alfa-1,4 e alfa-1,6 (Figura 2). Em geral, o teor de amilose é menor do que o de amilopectina.

Segundo relatos bibliográficos (CARDENAS et al., 2001; SABATER-VILAR; MAAS; FINK-GREMMELS, 1999), espécies de *Monascus* são produtores de diversas enzimas, entre elas, α – amilase, β – amilase e glicoamilase (WONG et al., 1986) (ambas utilizadas na hidrólise total do amido à glucose).

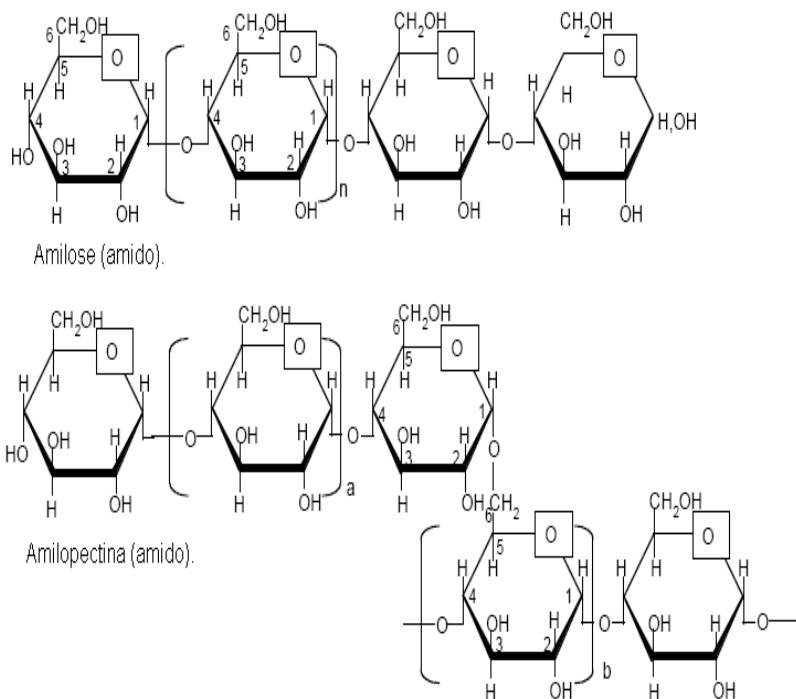


Figura 2 – Forma estrutural do amido

1.3 - AMILASES

A hidrólise ácida do amido foi desenvolvida no início do século XIX, pelo químico alemão Kirchhof. Este pesquisador observou que, quando o amido era fervido em uma solução ácida, transformava-se em uma solução de sabor doce. Os problemas e as limitações desta técnica, como a formação dos produtos secundários, que adicionam custos com separação e a falta de flexibilidade em relação aos produtos finais de reação, abriram espaço para estudos de hidrólise enzimática do amido na Europa e nos Estados Unidos, a partir de 1909 (BON; PEREIRA, 2002).

Atualmente, além da α -amilase e da glicamilase, utilizadas na hidrólise total do amido à glicose, outros tipos de amilases microbianas, como a β -amilase, a pululanase, a isoamilase e a ciclodextrina glicosiltransferases são usadas industrialmente na hidrólise seletiva do polissacarídeo. Os produtos obtidos apresentam características específicas e alguns com alto valor agregado, como as ciclodextrinas, são usados principalmente nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos. O uso destas enzimas possibilitou um avanço qualitativo e quantitativo considerável na indústria do amido nos últimos 40 anos pois, até então, este biopolímero era processado industrialmente por hidrólise ácida (YONGSMITH et al., 2000).

O Brasil importou, durante o ano de 1997, 2.300 toneladas da enzima amilase, correspondendo a US\$ 17.429.321,00; representando esse grupo 50% do total importado em enzimas. Seu uso, amplamente difundido na indústria alimentícia, é o responsável pelo grande volume negociado. Estados Unidos, Finlândia e Dinamarca, juntos respondem por 80% das importações. Quanto à exportação, foram comercializadas 30 toneladas, que correspondem a US\$ 574.415,00. Os principais compradores do produto brasileiro são os países da América do Sul, que receberam cerca de 80% do total exportado pelo país. Como não são divulgados os dados sobre a produção de amilases no Brasil, não é possível identificar a procedência das amilases exportadas (há a possibilidade do Brasil ter exportado para a América do Sul o excedente importado da Europa e Estados Unidos) (BON; PEREIRA, 2002).

No Brasil, o custo das enzimas industriais é alto, pois os biocatalisadores são majoritariamente importados ou produzidos no país em monopólios nacionais ou internacionais. Este fato limita, qualitativamente e quantitativamente, a expansão do uso industrial de enzimas no país, carente em desenvolvimento biotecnológico para a produção e uso de enzimas e para que este quadro se reverta são necessários investimentos expressivos nesta área (BON; PEREIRA, 2002).

Os microrganismos realizam a fermentação com o objetivo de produzir energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP) para as necessidades de crescimento celular e manutenção celular, daí a presença de um sistema enzimático natural num processo fermentativo por microrganismos.

1.4 - Alimentos Funcionais

Um alimento não deve simplesmente satisfazer as necessidades nutricionais de um ser humano, mas também contribuir para a prevenção e/ou tratamento de doenças. Com avanço dessas idéias surge então, os chamados alimentos funcionais ou nutracêuticos, denominações estas que diferem de um país para outro. As empresas de biotecnologia envolvidas na pesquisa e desenvolvimento de produtos nutracêuticos pertencem, principalmente, às indústrias alimentícias (55%) e farmacêuticas (35%) (AGRONET, 2005).

No Brasil, este seguimento de mercado ainda é pequeno, porém seguindo a tendência mundial o país apresenta um grande potencial de crescimento. Dessa maneira, em 30 de abril de 1999, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, com a intenção de regularizar este novo seguimento, publicou no Diário Oficial a Portaria nº 398, a qual tem por objetivo estabelecer as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos (BRASIL, 2000). A importância dessa portaria situa-se na promoção de um maior esclarecimento e segurança para a população. Em função disso, a indústria de alimentação, pesquisadores e consumidores estão atentos a esse novo conceito de alimentação. Japão

e países da Comunidade Européia sobressaíram, regulamentando com firmeza esse novo mercado, a fim de proteger o consumidor.

Sendo assim, o interesse e o destaque pelo fungo *Monascus* está cada vez maior, face ao número de patentes que podem ser encontradas em vários países e no final dos anos 70, algumas substâncias, chamadas monacolinas, que reduzem os níveis anormais de lipídeos sanguíneo foram isoladas e analisadas a partir de produtos fermentados (ENDO, 1980; ENDO et al., 1985; ENDO; HASUMI; NEGESHI, 1985; ENDO; KOMAGATA; SHIMADA, 1986). Em contrapartida, têm-se as regulamentações que precisam ser seguidas para se ter uma garantia na qualidade desses produtos, o que nem sempre acontece por estarem muitas vezes em desacordo com a legislação vigente.

1.5 - Aplicação Biotecnológica dos Fungos Filamentosos

O termo biotecnologia pode ser entendido como a obtenção de algum produto e/ou processo a partir da utilização de células vegetais, animais ou microbianas. Desta maneira, os interesses estão cada vez mais voltados em explorar as potencialidades dos fungos e de outros seres vivos de um modo geral.

Durante a fase logarítmica de crescimento os produtos produzidos são essenciais ao crescimento das células e incluem aminoácidos, nucleotídeos, proteínas, ácidos nucléicos, lipídeos, carboidratos e outros, sendo referidos como produtos do metabolismo primário. Seguindo os metabólitos primários, alguns tipos de microrganismos tendem a produzir durante as fases estacionária e de desaceleração os metabólitos secundários (SCRIBAN, 1985), porém, em concentrações menores. Os metabólitos secundários podem ser ainda uma conversão microbiana de um metabólito primário. Alternativamente, pode ser um produto metabólico do meio original de crescimento que o microrganismo produz somente depois que um número considerável de células e metabólitos primários tenham sido acumulados. O metabolismo secundário de microrganismos é parte do seu processo de maturação normal (SCRIBAN, 1985). A importância do metabolismo secundário na produção de células tem sido sujeito a

consideráveis debates, mas a aplicabilidade desses metabólitos na fermentação industrial é notável. Muitos metabólitos secundários têm atividade antimicrobiana, outros são inibidores de enzimas e muitos têm propriedades farmacológicas. Portanto, os produtos do metabolismo secundário têm formado a base de um número grande de bioprocessos, mas a sua produção é algo difícil e requer um conhecimento entre as interações e as condições do meio ambiente e microrganismo (SCRIBAN, 1985). A fermentação industrial é utilizada na biotecnologia para obter produtos úteis a partir de células vegetais, animais e especialmente de fungos filamentosos. Os fungos filamentosos assumem um papel importante nas indústrias de fermentação, sendo obtidos por processos de fermentação os seguintes produtos: ácido cítrico, fumárico, gálico, glucônico, propiônico, kójico, álcool etílico, enzimas, gorduras e manitol. Ainda são obtidas pelo mesmo processo as substâncias antibióticas, como a clavicina, citrinina, crisogenina, espinosilina, flavicina, notatina, penicilina, penatina e outras (FUTAMURA et al., 2001; MONTANI et al., 1988; SANKPAL; KULKALNI, 2002; WANG et al., 2002). Estes organismos são ainda bons candidatos para a produção industrial de pigmentos, enzimas e proteínas heterólogas como a monacolina (LÓPEZ et al., 2003; NAIDU; PANDA, 2003; OGIHARA et al., 2001). Entretanto, um conhecimento insuficiente da atividade metabólica, metabólitos intermediários e condições de cultivo desses organismos impede uma estratégia bioquímica para aumentar o seu desempenho.

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

1.6 - Gênero *Monascus*

O *Monascus* é um fungo da classe dos ascomicetos e é dividido em 7 espécies denominadas *M. ruber*, *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. floridans*, *M. pallens* e *M. sanguineus* (BLANC, 1998) e recentemente *M. mucoroides* (CARDENAS et al., 2001). Porém, as espécies de maior significância para a indústria alimentícia são: *M. ruber*, *M. purpureus* e *M. pilosus* (MARTINKOVA et al., 1999).

Recentemente, pesquisadores estudando fungos termoresistentes, descobriram que o fungo *Monascus ruber* também faz parte deste grupo, tendo sido isolado após processamento térmico de conservas de azeitonas verdes (PANAGO; KATSABOXAKIS; NYCHAS, 2002).

O fungo filamentosos ou fungo teleomórfico *Monascus ruber*, obedece à seguinte classificação:

- Filo: *Eumycota*
- Subfilo: *Ascomycotina*
- Classe: *Ascomycetes*
- Subclasse: *Plectomycetes*
- Ordem: *Eurotiales*
- Família: *Monascaceae*

Colônias de *Monascus ruber* (Figura 3) apresentam um crescimento relativamente rápido (5 dias) em meio BDA (Ágar Batata Dextrose), podendo crescer a diferentes temperaturas que podem variar entre 20°C e 80°C, porém para a produção de pigmentos, a temperatura ideal varia entre 27°C – 30°C. São saprófitas do solo, suas colônias apresentam topografia levemente rugosa, circular, flocosa, de coloração púrpura, reverso também púrpura opaca, apresentando-se micromorfológicamente so a forma de hifas e numerosos conídeos que podem apresentar-se de vários tamanhos (Figura 3).



Figura 3 - Micromorfologia (hifas e conídeos) e Macromorfologia do *Monascus ruber* Fonte: Moritz (2005)

1.7. - METABOLISMO SECUNDÁRIO DO FUNGO FILAMENTOSO *MONASCUS RUBER*

1.7.1. - POLICETÍDEOS

Os policetídeos são produtos estruturalmente complexos e têm historicamente demonstrado ser uma rica fonte de moléculas bioativas para as indústrias farmacêuticas e de alimentos. Nesse sentido, há um número de substâncias comercialmente importantes como antibióticos (penicilina, eritromicina), agentes anticancerígenos (adriamicina, taxol), imunossuppressores (ciclosporina, FK506), agentes redutores de colesterol (lovastatina, pravastatina), agentes veterinários (monensina, avermectina) e agroquímicos (espinosina, bialopos) (KUJUMDZIEVA et al., 1997). O potencial bioquímico e a capacidade de microrganismos sintetizarem moléculas bioativas se traduz na capacidade de assimilação de moléculas simples como a glicose, transformando moléculas como o acetil CoA e malonil CoA (principalmente na condensação destes dois compostos) em produtos altamente complexos (Figura 4).

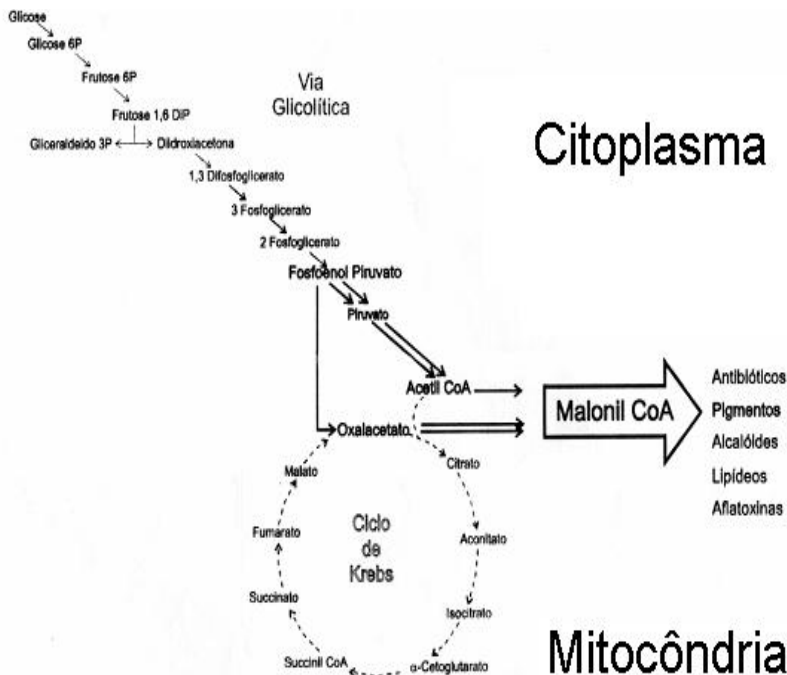


Figura 4 - Via Metabólica dos policetídeos (HAJJAJ et al., 1999a)

A via metabólica dos policetídeos em bactérias e fungos está relacionada ao metabolismo dos ácidos graxos mas difere em alguns deles nas reações de redução ou desidratação catalisadas por uma enzima chamada policetídeo sintase (PKS) (MONAGHAN, 1991 apud KENNEDY et al., 1999).

1.7.2 - METABOLISMO DOS POLICETÍDEOS

Os policetídeos são classificados de acordo com sua diversidade estrutural e rota metabólica, pela qual são sintetizados.

Lee e Papoutsakis (1999) relacionaram os ácidos graxos sintases e policetídeo sintases (PKSs) como sendo um conjunto de multienzimas que catalisam condensações descarboxilativas entre tioésteres coenzima A. Enquanto os ácidos graxos sintases catalisam tipicamente um ciclo completo compreendendo uma cetoredução, uma

desidratação, e uma enoilredução no grupo beta ceto no crescimento da cadeia de carbonos, PKSs exclui este ciclo, ora reduzindo ora equilibrando (regulando) todos os passos após a condensação. O controle da variação do comprimento da cadeia, escolha dos componentes, diferenças na redução dos ciclos, e estequiometria levam a uma imensa variação entre os policetídeos naturalmente produzidos.

1.8 – PRODUÇÃO DE METABÓLITOS DE INTERESSE INDUSTRIAL A PARTIR DO FUNGO FILAMENTOSO *MONASCUS RUBER*

Monascus é um fungo filamentoso que tem sido utilizado em países do Oriente como corante alimentar para preparar vinho vermelho de arroz, vinho vermelho *Shao-Hsing*, queijo vermelho de soja e *Ang-Khak* (arroz vermelho chinês) entre outros (LIN, 1973 apud LIN; DEMAIN, 1991).

Outro metabólito secundário de extrema importância tem sido obtido via fermentativa por espécies de *Monascus* - lovastatina (monacolina purificada) - sendo inclusive utilizada como agente redutor dos níveis de lipídeos sanguíneo (PAPPUN; ILLINGWORTH, 2002; RHYU et al., 2000). Assim, existem inúmeros resultados de investigações, declarações, seminários, patentes e outros, demonstrando que os alimentos fermentados a partir de *Monascus* não causam efeitos danosos aos consumidores (BLANC et al., 1994; FABRE et al., 1993; KUNS et al., 1992 apud CALVO; SALVADOR, 2002; WONG; KOEHLER, 1983). Baseado nas teorias da medicina chinesa tradicional e nas tecnologias modernas, a monacolina é comercializada mundialmente como fármaco com diferentes marcas registradas, por ser um agente redutor de lipídeos em pessoas idosas, pessoas que sofrem e que são susceptíveis à hiperlipidemia.

Muitas vezes, porém, associadas à produção de metabólitos de elevado valor agregado, estão outras substâncias que interferem diretamente no processo, como é o caso da citrinina (SABATER-VILAR; MAAS; FINK-GREMMELS, 1999; SATO et al., 1998; WANG; LEE; PAN, 2003; WANG; JU; ZHOU, 2005). Esta é uma micotoxina que é produzida paralelamente à produção de pigmentos por

alguns fungos filamentosos inclusive por *Monascus* e por essa razão, de acordo com Hendry e Houghton (1992) apud Calvo e Salvador (2002), o uso desses produtos fermentados ainda não foi aceito em alguns países da União Européia e Estados Unidos.

Paralelamente à sua capacidade de produção de biopigmentos e outros metabólitos em geral, o fungo *Monascus ruber* apresenta grande potencialidade para produção de enzimas.

1.8.1 - Pigmentos *Monascus*

Métodos de produção de pigmentos vermelhos obtidos por espécies de *Monascus*, bem como a seleção de novas linhagens têm sido alvo de diversas patentes no Japão, Taiwan, Estados Unidos e França. Embora os pigmentos de *M. purpureus* sejam autorizados como aditivos alimentares somente no Japão, seu uso é comum em vários países da Ásia e Europa, ainda que sem uma base legal (BLANC et al., 1994), substituindo os aditivos convencionais como E – 249 (sais de nitrito), E – 252 (nitrato de potássio) e E – 120 (cochineal) usado para melhorar a cor da carne. Finalmente, os pigmentos *Monascus* podem ser interessantes também em bebidas e indústrias confeitarias (FABRE et al., 1993; JUZLOVA; MARTINKOVA; KREN, 1996; LIN; YAKUSHIJIN; DEMAIN, 1992).

Os pigmentos produzidos por *Monascus* formam um grupo de metabólitos secundários, chamados azafilonas com estruturas moleculares e propriedades químicas definidas e podem ser divididos em: pigmentos laranja - monascorubrina e rubropunctatina, pigmentos vermelhos - monascorubramina e rubropunctamina e pigmentos amarelos - monascina e ankaflavina. Entre os pigmentos formados pelo *Monascus*, o pigmento vermelho merece maior atenção devido ao seu potencial valor comercial (FABRE; GOMA; BLANC, 1998).

Em um processo fermentativo tradicional, como ocorre nos países do oriente, *Monascus* é adicionado ao mosto de arroz (Figura 5). Após um período de 2 a 4 semanas, o produto é seco e armazenado na forma de grão ou pó. Estes pigmentos, produzidos por espécies de *M. ruber* e *M. purpureus*, estão sendo industrializados, desde a década de

oitenta, por grandes marcas, tais como, NESTLÉ[®], QUAKER OAT COMPANY[®] (Chicago Elisões), SHELL[®], empresa japonesa YAEGAKI Bioindustry Inc. et Riken Vitamine Co Ltda (BLANC, 1998) e empresa chinesa LUZHOU CHEMICAL – CHINA, 2003.

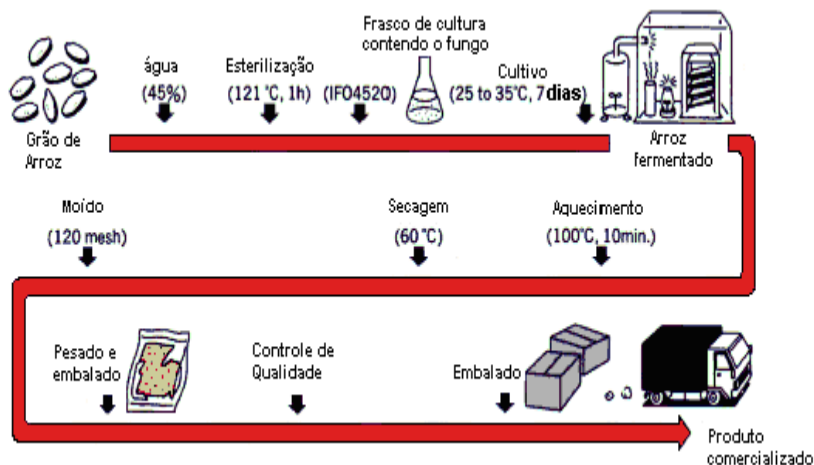


Figura 5 – Processo de produção industrial do pigmento Monascus (ALLOK, 2001)

1.8.1.1 - GRUPOS DE PIGMENTOS PRODUZIDOS POR ESPÉCIES DE *MONASCUS*

Alguns tipos de *Monascus* podem produzir pelo menos seis pigmentos divididos em três grupos. Estes pigmentos são: amarelo - monascina ($C_{21}H_{26}O_5$)⁽¹⁾ e ankaflavina ($C_{23}H_{30}O_5$)⁽²⁾, laranja - monascrubrina ($C_{23}H_{26}O_5$)⁽³⁾ e rubropunctatina ($C_{21}H_{22}O_5$)⁽⁴⁾ e vermelho - monascrubramina ($C_{23}H_{27}NO_4$)⁽⁵⁾ e rubropunctamina ($C_{21}H_{23}NO_4$)⁽⁶⁾ (Figura 6). Monascrubrina e rubropunctatina são pigmentos laranja com cadeias de lados diferentes no anel de ozolactona. Os dois pigmentos vermelhos correspondentes, monascrubramina e rubropunctamina, são análogos de nitrogênio dos pigmentos laranja. Os pigmentos amarelo, monascina (sinônimo, monascuflavina) e ankaflavina, são formas reduzidas dos dois pigmentos laranja (LIN; DEMAIN, 1991; SUH; SHIN, 2000b;

SWEENEY; DOBSON, 1998). Esses pigmentos são produzidos principalmente aderidos à célula, têm solubilidade baixa em água, são sensíveis ao calor, são instáveis em pH de 2 a 10 e perdem a cor quando expostos à luz (WONG; KOEHLER, 1983). Desse modo, patentes são focadas principalmente na solubilização, estabilidade e extração de pigmentos em solução (LIN; YAKUSHIJIN; DEMAIN, 1992). As características com relação às cores e estruturas desses pigmentos em cultivo de espécies de *Monascus* também foram investigadas (JUNG et al., 2003).

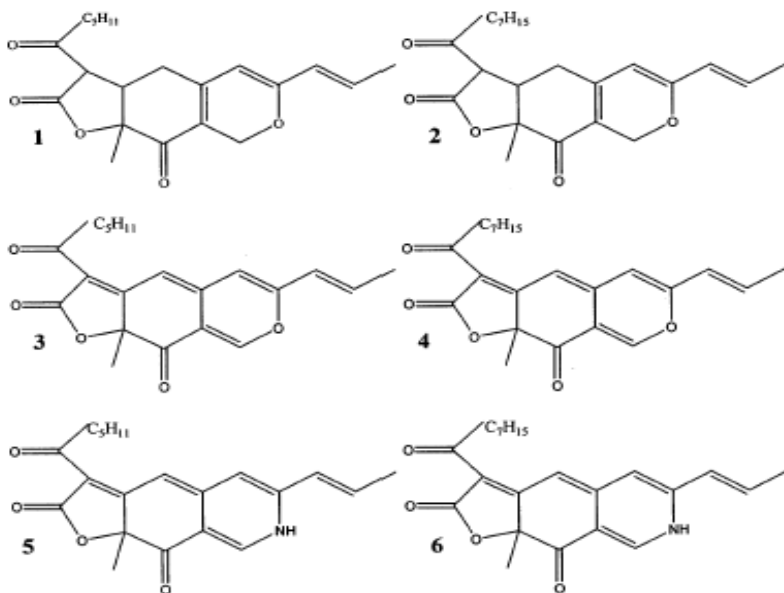


Figura 6 - Estruturas dos seis pigmentos produzidos por espécies de *Monascus* - 1, monascina, 2, ankaflavina; 3, monascorubrina, 4, rubropunctatina; 5, monascorubramina, 6, rubropunctamina

Fonte: Jung et al. (2003)

1.8.1.2 - Metabolismo de Formação dos Pigmentos e Citrinina

A biossíntese de policetídeos em bactérias e fungos está relacionada ao metabolismo dos ácidos graxos, mas difere em alguns

deles nas reações de redução ou desidratação catalisadas por uma enzima chamada poliketídeo sintase (PKS).

Nos fungos filamentosos, muitos metabólitos secundários com estruturas químicas complexas são sintetizados a partir da via metabólica dos poliketídeos catalisados por uma enzima chamada poliketídeo sintase (PKS) como descrito anteriormente. No caso do *Monascus ruber*, eles excretam os pigmentos por esta mesma via.

Um esquema da rota hipotética para a biossíntese desses pigmentos é descrito na Figura 7. Aqui a condensação de 1 mol de acetato com 5 moles de malonato levam à formação de um cromóforo hexacetídeo pela poliketídeo sintase. Em seguida, um ácido graxo de cadeia intermediária, como o ácido octanóico, provavelmente produzido pela via da síntese dos ácidos graxos, é deslocado para a estrutura cromófora por uma reação de trans-esterificação, gerando o pigmento laranja monascrubrina (ou rubropunctatina). A redução do pigmento laranja origina o pigmento amarelo ankaflavina a partir do monascrubrina (ou monascina a partir do rubropunctatina), enquanto o pigmento vermelho (monascrubramina e rubrupunctamina) é produzido por aminação do pigmento laranja com unidades NH_3 (HAJJAJ et al., 2000b).

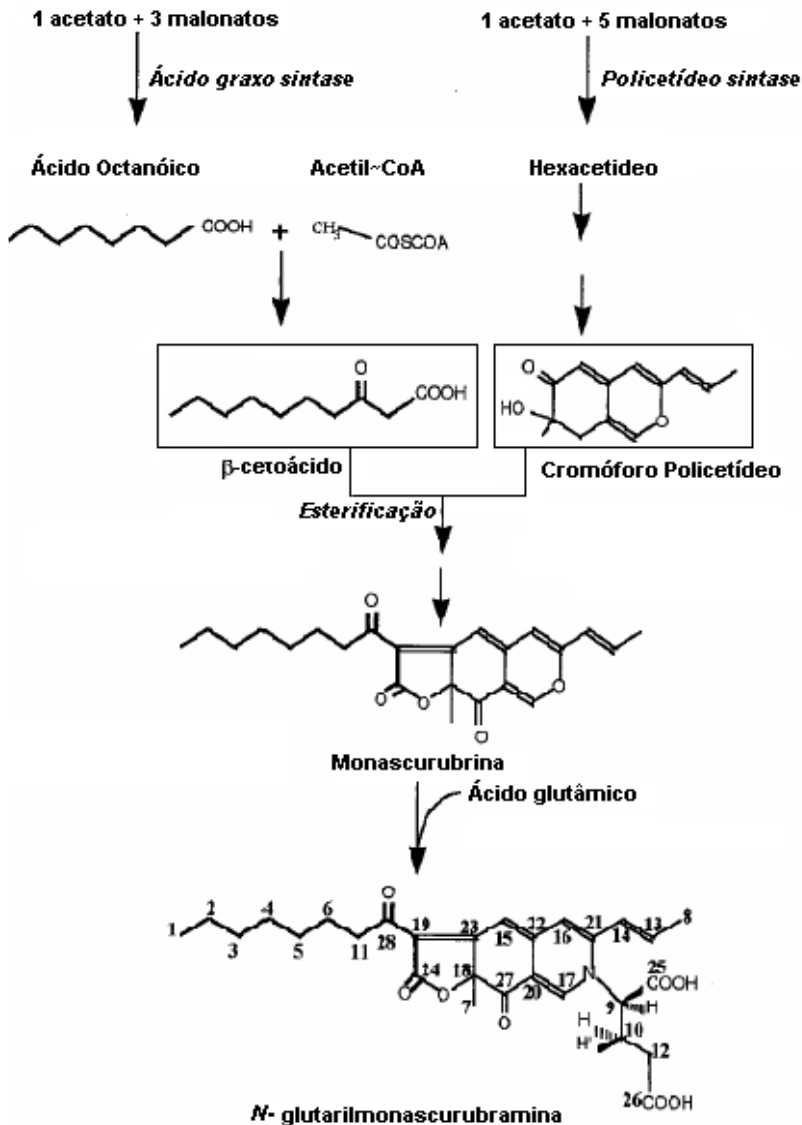


Figura 7 - Esquema hipotético de formação de N-glutarilmonascurubramina por *Monascus ruber*

Fonte: Hajjaj et al. (2000b)

Hajjaj et al. (1999b), utilizando ^{13}C por ressonância magnética nuclear (NMR) demonstrou que a síntese da citrinina é originada a partir de um tetracetídeo (condensação de 1 molécula de acetil-CoA e 3 moléculas de malonil-CoA) (Figura 8), ao invés de um pentacetídeo como foi encontrado em *Aspergillus terreus* e *Penicillium citrinum*. Uma vez que os pigmentos são produzidos a partir de um hexacetídeo, como foi citado anteriormente, Hajjaj et al. (1999a) sugere a existência de um ponto de ramificação no nível tetracetídeo justificando uma diferenciação na produção de pigmentos e citrinina no crescimento de *Monascus ruber*. Entretanto, as enzimas que catalisam as reações dessa junção não foram ainda caracterizadas.

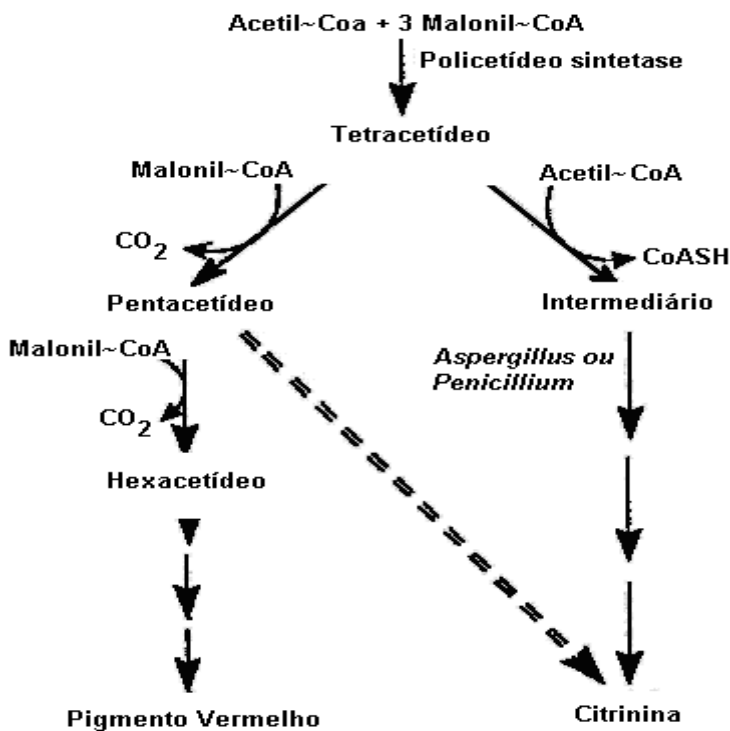


Figura 8 - Esquema de formação de citrinina e pigmento vermelho a partir da condensação de 1 molécula de acetil CoA e 3 moléculas de malonil CoA
Fonte: Hajjaj et al. (1999b)

Hajjaj et al. (2000b), investigando os efeitos de ácidos graxos de cadeia longa e intermediária na produção de pigmento e citrinina quando adicionados ao meio, demonstraram uma drástica diminuição na síntese de citrinina ao passo que os pigmentos não foram influenciados desde a formação desses compostos moleculares e síntese nova de ácido graxo de cadeia intermediária pela via de síntese dos ácidos graxos.

Quando uma molécula de acetil-CoA é adicionada a este tetracetídeo, um outro composto intermediário é formado (bovilactona ou gomfilactona); sugerindo que esta via metabólica possa ser regulada a nível destas enzimas responsáveis por este composto intermediário (Figura 9). Neste estudo, não ficou descartada a hipótese de formação de um pentacetídeo através da condensação de mais de uma molécula de malonil-CoA acompanhadas de uma descarboxilação. A ocorrência de um tetracetídeo como precursor tanto da citrinina como do pigmento vermelho pode ocorrer de diferentes modos na formação destas duas moléculas, que dependerão principalmente das substâncias adicionadas ao meio de cultivo e da variação dos parâmetros cinéticos durante o cultivo com *Monascus ruber* (HAJJAJ et al., 1999a).

1 Acetil-CoA + 3 Malonil-CoA

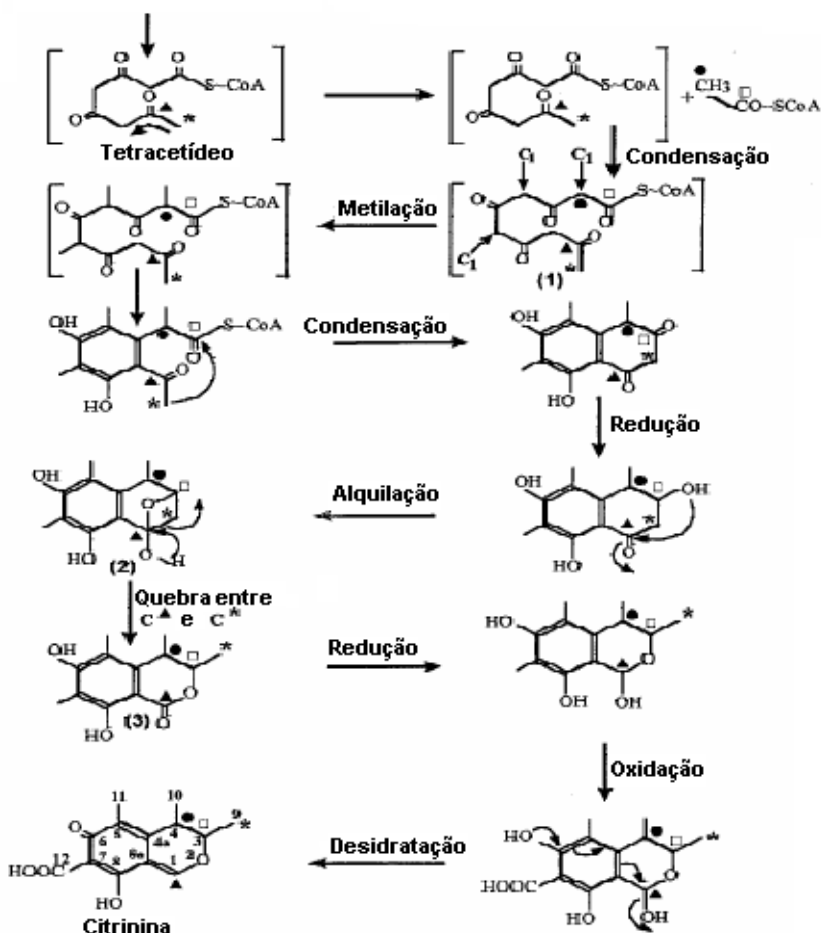


Figura 9 - Reações químicas ocorridas para formação de citrinina e pigmento vermelho

Fonte: Hajjaj et al. (1999a)

1.8.1.3 - Caracterização do Corante Produzido por *Monascus ruber* CCT 3802

Os pigmentos intracelulares e lipossolúveis produzidos por *Monascus* possuem baixa solubilidade na água, são sensíveis ao calor e instáveis a valores extremos de pH (2,0 e 10,0) e exposição à luz, porém

estes pigmentos reagem rapidamente com grupos amino contidos em proteínas, aminoácidos e ácidos nucleicos, formando complexos hidrossolúveis e são estáveis por diversos meses quando conservados em solventes orgânicos (butanol), enquanto que em solução aquosa ele é degradado em poucos dias. Sua estabilidade é favorecida por um complexo doador-aceptor de elétrons (EDA), demonstradas pelas moléculas extracelulares, quinona-amina conforme ilustra a Figura 10 (HAJJAJ et al., 1997).

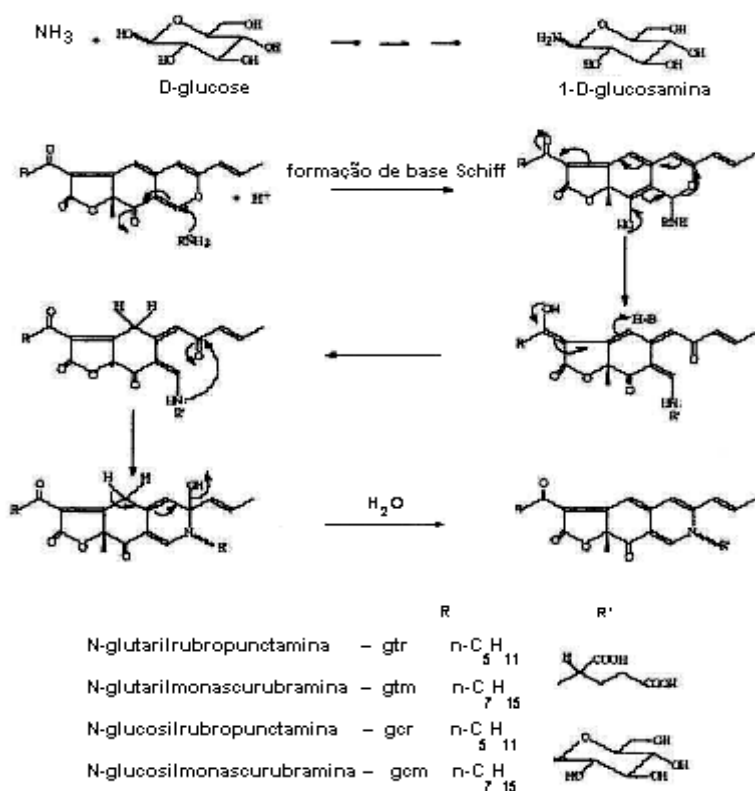


Figura 10 – Processos de purificação e caracterização das estruturas envolvidas para formação dos pigmentos extracelulares bem como a ocorrência de complexos “EDA” destes pigmentos (*N*-glutarilrubropunctamina – GTR; *N*-glutarilmonascurubramina – GTM; *N*-glucosilmonascurubramina - GCM e *N*-glucosilrubropunctamina – GCR)

Fonte: Hajjaj et al. (1997)

Estudos realizados por Hajjaj et al. (1997), demonstraram que em um processo fermentativo submerso de aproximadamente 120 horas, a perda da concentração de pigmento extracelular observada foi de aproximadamente 15% no final da cultura, esta perda foi explicada pela degradação fotoquímica (luz do dia). Segundo este mesmo autor, ficou comprovado que a degradação do pigmento é fotoquímica e contínua, porém não sofre nenhuma ação pelo oxigênio dissolvido.

Ensaio como efeito da temperatura, luz (incluindo UV) e associação com alguns aditivos alimentares foram estudados por (CHANGLING et al., 1998), comparando os pigmentos produzidos pelo *Monascus purpureus* aos pigmentos comerciais chineses e japoneses, após exposição a várias condições físico-químicas. Estes dados serviram para demonstrar as possíveis aplicações, com sucesso, do pigmento *Monascus* como, por exemplo, na lingüiça chinesa, no macarrão instantâneo e em produtos lácteos. Entretanto, os resultados de estudos de sua aplicabilidade como corante em doces e balas, que requerem altas temperaturas, foram desastrosos, impossibilitando seu uso na manufatura destes produtos, pois este corante não resiste a altas temperaturas ($> 150^{\circ}\text{C}$) (FABRE; GOMA; BLANC, 1998).

Tradicionalmente, o *Monascus* é cultivado em meio sólido nos países Asiáticos para produzir um corante vermelho chamado “*Anka*” necessário como ingrediente alimentar, principalmente em alimentos fermentados e bebidas no sul da China, Japão, Tailândia, Finlândia e Indonésia. Espécies de *Monascus* são muito empregados na produção de “*red rice yeast*” (CHANGLING et al., 1998; FABRE; GOMA; BLANC, 1998; FENICE et al., 2000; FRANCIS, 1989; HIPLER et al., 2000; LEE et al., 1998; SUH; SHIN, 2000a; TENG; FELDHEIM, 2001; WONG; KOEHLER, 1983). O pigmento vermelho do *Monascus* é formado por um hexacetídeo que se incorpora a uma cadeia de C_6 ou C_8 de ácidos graxos (BLANC, 1998).

O recente uso de ácido glutâmico como fonte de nitrogênio tem apontado resultados promissores, seja como estimulante do acúmulo extracelular dos pigmentos, seja contribuindo para o aumento da eficiência do processo de produção de pigmento vermelho (HAJJAJ et al., 2000a).

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

Segundo Fabre, Goma e Blanc (1998), o pigmento vermelho obtido a partir do cultivo do *Monascus*, serve como substituto de aditivos sintéticos tradicionais como sais nitrito (E249).

1.8.2 - Produção de Enzimas por *Monascus ruber*

Uma alternativa aos processos tradicionais da indústria química é o uso de processos tecnológicos que se baseiam em biotransformações, levadas a efeito por células vivas, e na biocatálise, efetuada por enzimas. Esses processos apresentam uma significativa interface com os processos biológicos e, por isso, exibem a característica prevalente da sustentabilidade. Neste contexto, as enzimas conhecidas há mais de 150 anos e, utilizadas industrialmente há 50 anos, vêm, de forma consistente, ultrapassando as barreiras do seu nicho tecnológico tradicional, a indústria de alimentos e bebidas, sendo usadas na formulação de biodetergentes, em química fina, na produção de fármacos, em diagnósticos clínicos, como agentes terapêuticos, em procedimentos de engenharia genética e no processamento de couros e fibras naturais. Essas aplicações suportam um mercado mundial de enzimas que é avaliado em cerca de 1,5 bilhão de consumo por ano (BON; PEREIRA, 2002).

As enzimas atuam, principalmente, em matérias-primas renováveis, sendo então os catalisadores dos processos relacionados ao desenvolvimento sustentável. Frutas, cereais, leite, óleos, carnes, algodão, couros, madeiras são as principais matérias-primas das indústrias que realizam conversões enzimáticas. Tanto os produtos como os rejeitos destas indústrias, geralmente, são atóxicos e biodegradáveis.

Adicionalmente, as enzimas são majoritariamente produzidas por processos fermentativos, cujos rejeitos podem ser utilizados como fertilizantes, uma vez que constituem, basicamente, de microrganismos. Embora alguns biocatalisadores sejam extraídos de tecidos animais e vegetais, as enzimas industriais geralmente são obtidas de microrganismos (bactérias, fungos filamentosos e leveduras). As enzimas são degradadas a aminoácidos e prontamente absorvidas pela natureza. Em contraposição a este fato, a maioria dos catalisadores químicos acumula-se na natureza, poluindo o meio ambiente (BON; PEREIRA, 2002).

Ainda que, um microrganismo seja capaz de produzir mais de 1000 enzimas distintas, é necessário um trabalho cuidadoso para o isolamento de espécies que produzam determinada enzima com as características desejadas. O trabalho não acaba com a identificação do microrganismo produtor que, em geral, deve ser modificado, através de engenharia genética, para que possa produzir o biocatalisador em grandes quantidades. Estes organismos são cultivados em fermentador, separados por filtração ou centrifugação, o sobrenadante rico em enzimas é separado do rejeito industrial (biomassa), que pode ser também aproveitado como fertilizante (BON; PEREIRA, 2002).

Espécies do fungo *Monascus* além de pigmentos, citrinina e mevinolina, produzem enzimas de interesse industrial tais como: α -amilase, glicoamilase (ambas utilizadas na hidrólise total do amido à glicose), β -amilase, α -galactosidase, polipeptases, proteases e lipases (CARDENAS et al., 2001; LIU et al., 2004; SABATER-VILAR; MAAS; FINK-GREMMELS, 1999; TSENG; CHEN; LIN, 2000).

1.8.3 - Produção de Lovastatina por Espécies de *Monascus*

Uma importante molécula associada ao pigmento *Monascus* é a monacolina, que exibe uma atividade hipocolesterolêmica por ser capaz de reduzir os níveis de colesterol sanguíneo em modelos de animais e humanos (WANG et al., 2000).

A mevinolina conhecida como monacolina K ou lovastatina é a mais ativa delas. Este metabólito secundário é produzido por

fermentação submersa a partir de *Aspergillus terreus*, espécies de *Penicillium* e de *Monascus* (CHANG et al., 2002b; ENDO; HASUMI; NEGISHI, 1985; SZAKÁCS; MOROVJÁN; TENERGY, 1998). O cultivo de *Monascus purpureus* na China dá origem ao “red rice yeast”, sendo este produto utilizado como suplemento nutracêutico por sua eficiente ação nas dislipidemias (WANG et al., 2000). A mevinolina é utilizada também como complemento dietético formulado nos Estados Unidos com o nome de Colestin[®] pela empresa *Pharmanex* (Califórnia) e *Wenstardin*[®] na China pela WBL (*Pekin University Biotechnology Company*) (DURAN et al., 2002; GAILING, 1998; RHYU et al., 2000). A lovastatina (Mevinolin, Monacolin, Mevacor[®]) foi o primeiro composto utilizado no tratamento de hipercolesterolemia, sendo esta um fator de risco para aterosclerose e isquemia do coração. A lovastatina inibe a síntese de colesterol por inibir a especificamente a conversão de Hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA) em mevalonato catalisado pela enzima HMG-CoA redutase (CHANG et al., 2002b; WANG et al., 2000).

Atualmente o cultivo de *Monascus ruber* para a produção de monacolinhas tem sido muito estudado. Este cultivo pode ser conseguido em ágar dextrose batata (BDA) e caldo dextrose batata (CDB) num meio complexo consistindo de glicerina, glicose, peptona, nitrato de sódio, nitrato de zinco, óleo de oliva, cloridrato de amônia (NEGISHI et al., 1986 apud CHANG et al., 2002a). Em geral, a produção de lovastatina pode ser influenciada pela composição do meio e de fatores físicos, especialmente pelo tipo de fonte de nitrogênio e temperatura (HAJJAJ; NIEDERBERGER; DUBOC, 2001). Em alguns experimentos, o efeito da produtividade da lovastatina foi avaliado em relação a alguns parâmetros: temperatura, pH, umidade, concentração de glicose, fonte de nitrogênio, fonte de carbono, traço de elementos e duração da fermentação, mostrando que estas variáveis bem como suas interações afetam o desempenho da cultura em termos de rendimento de lovastatina (CHANG et al., 2002a; KUMAR et al., 2000; WANG; LEE; PAN, 2003). A mevinolina (lovastatina) é uma molécula oriunda da via metabólica dos poliketídios, estando o sistema PKS envolvido na sua síntese e de seus intermediários (KENNEDY et al., 1999). No caminho

A monacolina K, um metabólito fúngico isolado a partir de culturas de *Monascus ruber* (ENDO, 1979 apud CHANG et al., 2002b) é idêntico a mevinolina isolada a partir de *Aspergillus terreus* (ENDO, 1985). A monacolina K (mevinolina) tem sido esteroespecificamente sintetizada a partir do intermediário empregado na síntese da compactina (ML-236B) (HIRAMA; IWASHITA, 1983).

As monacolinas J,L,M,e X e dihidromonacolina L foram isoladas a partir de *Monascus ruber* (ENDO et al., 1985; ENDO; KOMAGATA; SHIMADA, 1986) e dihidromevinolina a partir de *Aspergillus terreus* (ALBERS-SCHONBERG et al., 1981 apud ENDO, 1985).

Os vários tipos de monacolinas isoladas em “*red yeast rice*”, são referenciadas como monacolina K (mevinolina) e são comumente representadas na Figura 12.

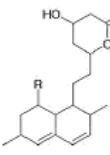



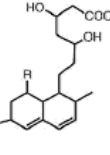



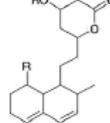

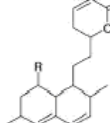

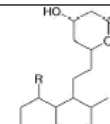
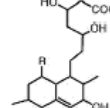
Estrutura	Nome	R	MW	UV (λ_{max})
	1. Monacolina K (MK)		404	230, 237, 246
	2. Monacolina J (MJ)	OH	320	230, 237, 247
	3. Monacolina L (ML)	H	304	230, 237, 247
	4. Monacolina X (MX)		418	230, 237, 247
	5. Monacolina M (MM)		406	
	1a. forma ácida MK (MKA)		422	
	2a. forma ácida MJ (MJA)	OH	338	
	3a. forma ácida ML (MLA)	H	322	
	4a. forma ácida MX (MXA)		436	
	5a. forma ácida MM (MMA)		424	
	6. Compactina (PI)		390	230, 237, 247
	7. Dehidromonacolina K (DMK)		386	
	8. Dihidromonacolina L (DML)	H	306	
	9. 3 α - hidroxi-3,5-dihidromonacolina L (HDML)	H	340	

Figura 12 – Estruturas de monacolinas em *red yeast rice*

Fonte: Li et al. (2004)

Linagens de *Monascus*, incluindo dezoito espécies e uma subespécie, foram estudadas para a produção de monacolina K (mevinolina), um inibidor específico da 3-Hidroxi-3-Metilglutaril HMG-CoA redutase, a enzima limitante na biossíntese do colesterol.

Desses tipos, cinco espécies (dezessete tipos) são ativos na produção de metabólitos, incluindo *Monascus ruber*, *Monascus purpureus*, *Monascus pilosus*, *Monascus vitreus* e *Monascus pubigerus* (NEGISHI et al., 1986 apud CHANG et al., 2002a).

A mevinolina produzida em caldo de fermentação pode estar presente na forma de lactona, mas a forma beta-hidroxycarboxilato (ácido mevinolínico) também pode ser largamente encontrada (Figura 13). Usando um tratamento ácido durante a preparação da amostra, na qual a mevinolina é formada a partir do ácido mevinolínico é possível estabelecer um equilíbrio entre a formação da lactona em solução aquosa e sua hidrólise (MOROVJÁN; SZAKÁCS; FEKETE, 1997).

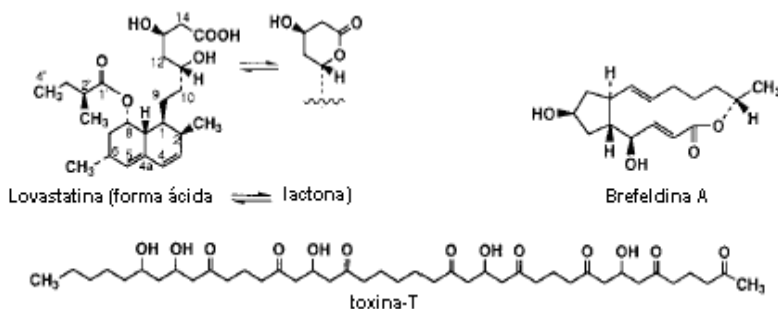


Figura 13 – Conversão das formas da mevinolina
Fonte: Kennedy et al. (1999)

A lovastatina produzida em fermentação semi-sólida, submersa e líquida pode ser quantificada por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) e *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC). De maneira geral, a lovastatina pode ser determinada diretamente nos caldos de fermentação sem a necessidade prévia de um tratamento (CHANG et al., 2002a; KYSILKA; KREN, 1993), tornando a análise mais rápida e fácil. Outros ensaios, porém, mostram a importância da conversão da forma inativa (lovastatina) para a forma ativa (ácido mevinolínico) uma vez que a forma ácida beta-hidroxycarboxílica é estável em solução e sua eluição pela coluna cromatográfica se dá mais facilmente que a eluição da lactona (LÓPEZ

et al., 2003; LAI; PAN; TZENG, 2003; MOROVJÁN; SZAKÁCS;
FEKETE, 1997).

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo descreve os materiais e equipamentos empregados, os procedimentos e métodos de análise utilizados ao longo do estudo.

2.1 - Procedimentos Experimentais

Os ensaios foram realizados de modo a verificar a produção de pigmentos vermelhos, amilase e lovastatina por *Monascus ruber* CCT 3802 em fermentação submersa (frascos agitados) utilizando-se glicose, amido e farelo de arroz como fontes de carbono e, glutamato monossódico e milhocina como fontes de nitrogênio.

Inicialmente, foram testados a glicose e o glutamato monossódico para a produção de pigmentos vermelhos no meio de cultivo em condições experimentais já citadas em literatura.

Posteriormente, ainda para a verificação da produção de pigmentos vermelhos e agora também da amilase, foi realizado o mesmo ensaio anterior utilizando, entretanto, o amido em substituição à glicose.

Na etapa final, objetivando verificar a produção da lovastatina pelo *Monascus*, foram testados diferentes meios de cultivo citados em literatura.

2.2 - MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado no presente estudo foi o fungo filamentosso *Monascus ruber* CCT 3802 obtido da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello, Campinas, SP (*Monascus ruber* van Tieghem alt. *Basipetospora rubra* Cole Kendrick).

A linhagem CCT 3802 foi utilizada no laboratório de Engenharia Bioquímica – UFSC por Mortitz (2005) para estudos relacionados à produção de pigmentos vermelhos, apresentando resultados promissores, motivo esse pelo qual foi dado continuidade ao estudo.

2.3 - Meios de Cultivo e Condições de Operação

2.3.1 - Manutenção da Cultura

Para a manutenção do fungo *Monascus ruber* CCT 3802 foram utilizados tubos de ágar inclinados contendo BDA (Batata Dextrose Ágar - DIFCO) 10%. O pH do meio foi ajustado em 5,5 com solução de ácido fosfórico (H_3PO_4) 30% e em seguida foi transferido para tubos de ensaio e esterelizado a 121°C por 15 minutos (OROZCO; PEREIRA; KILIKIAN, 2003).

A incubação das culturas foi por 7 dias a 30° C em estufa bacteriológica, e a conservação em refrigerador a 4°C. As culturas foram repicadas a cada dois meses (HAJJAJ et al., 2000a). Este meio foi usado no repique e na conservação da cepa.

2.3.2 - PREPARO DOS MEIOS DE CULTIVO

Os meios de cultivos utilizados nos experimentos foram baseados em estudos de Chang et al. (2002a), Orozco, Pereira e Kilikian (2003) e Pastrana et al. (1995). Os meios são compostos pelas substâncias e soluções apresentadas na seqüência, sendo que as soluções de fosfatos, sulfatos e magnésio foram preparadas separadamente em frascos *Erlenmeyer* distintos, para evitar a complexação durante tratamento térmico. O pH inicial foi ajustado para 6,5 com ácido fosfórico (H_3PO_4) 30%. Todos os meios foram autoclavados à temperatura de 121°C por 15 minutos.

Meio segundo Pastrana et al. (1995)

Meio contendo, em gramas por litro de água destilada: glicose (20), glutamato monossódico (5), K_2HPO_4 (5), KH_2PO_4 (5), $CaCl_2$ (0,1), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01) e $MnSO_4 \cdot H_2O$ (0,03).

Meio segundo Orozco, Pereira e Kilikian (2003)

Meio contendo, em gramas por litro de água destilada: glicose (5), glutamato monossódico (7,6), K_2HPO_4 (1,5), KH_2PO_4 (1,5), NaCl (0,4), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (4,8), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01) e extrato de levedura (1,0).

Meio segundo Chang et al. (2002a)

Meio contendo inicialmente em gramas por litro de água destilada: pó de arroz (34,4) peptona (10,8), glicerina (26,4), glicose (129,2), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (1,0) e KNO_3 (2,0), substituído posteriormente pelas variáveis testadas no planejamento fatorial por Chang et al. (2002a). As variáveis testadas foram: 24,4 - 44,4 g/L (pó de arroz); 5,8 - 15,8 g/L (peptona); 16,4 - 36,4 mL/L (glicerina) e 81,2 - 177,2 g/L (glicose).

No presente estudo, foram testados os seguintes substratos em substituição ao pó de arroz do meio acima descrito: milhocina, farelo de arroz e amido de arroz comercial nas seguintes concentrações em gramas por litro de água destilada, conforme descrito na Tabela 4. Para tanto, foram realizados quatro diferentes meios de cultivos num mesmo intervalo de tempo, sendo estes assim denominados: Meio 1, Meio 2, Meio 3 e Meio 4 (Anexo).

Tabela 4 - Concentrações dos constituintes do meio de cultivo para obtenção de lovastatina

Meio 1 (g/L)	Meio 2 (g/L)	Meio 3 (g/L)	Meio 4 (g/L)
farelo de arroz: 34,4 peptona: 10,8 glicerina: 26,4 glicose: 129,2 MgSO ₄ .7H ₂ O :1,0 KNO ₃ : 2,0	milhocina: 24,4 peptona: 5,8 glicerina: 16,4 glicose: 81,2 MgSO ₄ .7H ₂ O :1,0 KNO ₃ : 2,0	milhocina: 34,4 peptona: 10,8 glicerina: 26,4 glicose: 129,2 MgSO ₄ .7H ₂ O :1,0 KNO ₃ : 2,0	Arrozina [®] : 44,4 peptona: 15,8 glicerina: 36,4 glicose: 177,2 MgSO ₄ .7H ₂ O :1,0 KNO ₃ : 2,0

Fonte: Próprio autor

2.3.3 - Preparo da Solução de Nitrogênio-Milhocina

A milhocina, água de maceração de milho, foi fornecida pela Refinações de Milho Brasil e necessita de tratamento prévio à sua utilização.

Este resíduo é preparado seguindo-se os passos sugeridos por Marangoni (2000) e adaptados de acordo com a capacidade dos equipamentos disponíveis. A seqüência utilizada consiste em:

- centrifugação a 5000 min^{-1} por 20 minutos;
- elevação do pH do sobrenadante a 7,0 com NaOH 7M;
- centrifugação a 5000 min^{-1} por 20 minutos;
- esterilização do sobrenadante;
- congelamento.

2.3.4 - PREPARO DO PRÉ-INÓCULO

Aos tubos de ensaio contendo culturas de *Monascus ruber* CCT 3802 (7 dias a 30°C) foram adicionados 3 a 4 mL de meio de cultivo, sendo a superfície da cultura raspada com pipeta Pasteur. A suspensão assim obtida foi transferida para frasco de *Erlenmeyer* aletado com o meio a ser estudado. O meio foi incubado em *shaker* orbital (marca TECNAL[®]) a 30°C e 150 min^{-1} por 48 horas (OROZCO; PEREIRA; KILIKIAN, 2003).

O emprego de um inóculo vegetativo promoveu um crescimento isento da fase "lag", em contraste com o longo período de adaptação verificado, quando o inóculo é constituído por esporos (MORITZ, 2005; OROZCO; PEREIRA; KILIKIAN, 2003). Provavelmente, isto se deva ao fato de que não é necessária a adaptação aos meios de cultivo. Com efeito, durante o preparo do pré-inóculo nas condições diferentes daquelas estabelecidas nos tubos de repique, foi notado um crescimento mais lento do fungo.

2.3.5 - Inoculação do Fungo

A inoculação foi realizada a partir da adição de 20 mL do pré-inóculo do fungo *Monascus ruber* em frasco de *Erlenmeyer* aletado contendo 80 mL de meios de cultivo a serem estudados. Os meios de cultivo foram incubados em *shaker* orbital (marca TECNAL[®]) na temperatura de 30°C e frequência de agitação de 150 min⁻¹.

2.3.6 Ensaios em Frascos Agitados e Condições de Operação

Os ensaios foram realizados em frascos agitados nos meios de cultivo descritos no item 2.3.2 do presente capítulo, tendo seus pHs previamente ajustados com ácido fosfórico (H₃PO₄) em 6,5 e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos. Os frascos foram tamponados com algodão de modo a permitir a aeração adequada e colocados em *shaker* orbital (marca TECNAL[®]). O movimento giratório agita o líquido sem que umedeça o tampão de algodão e a força centrífuga do meio de fermentação desloca o fluido formando uma camada que é arejada por difusão através da superfície líquida (ROITMAN, 1988).

Para assegurar resultados com o mínimo de distorções, quer fosse por variação do volume do meio ou por contaminação, 2 alíquotas foram retiradas de cada frasco. O frasco que já tivesse sua alíquota retirada passava a ser então descartado.

Ao final dos ensaios fermentativos, foram retirados 3 mL de cada um dos frascos de *Erlenmeyer* aletado para avaliação de possível contaminação (em placa de Petri contendo o meio BDA) e do crescimento. Essa análise foi importante para excluir os eventuais erros, uma vez que de cada *Erlenmeyer* aletado foi retirado assepticamente amostras para determinação dos parâmetros avaliados. Os ensaios foram realizados em duplicata, e os resultados analisados pela média das concentrações.

Todos os ensaios se deram em *shaker* orbital (Marca TECNAL[®]) na temperatura de 30°C a uma rotação de 150 min⁻¹ (Figura 14).



Figura 14 – *Shaker* orbital utilizado para os cultivos celulares de *Monascus ruber* CCT 3802

2.4 - MÉTODOS ANALÍTICOS

2.4.1 - TRATAMENTO DAS AMOSTRAS

Durante os ensaios (cultivos), foram retiradas do *shaker* assepticamente em capela de fluxo laminar vertical, alíquotas de aproximadamente 5 mL. Após a medida de pH, em pHmetro digital, marca ANALION[®]; as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi utilizado para as análises de pigmentos, amilase, glicose, etanol e lovastatina.

2.4.2 - Determinação da Concentração Celular

Utilizou-se o método por gravimetria e secagem com microondas, conforme descrito por Pereira e Kilikian (2001). Cada amostra foi pesada em balança analítica (BEL ENGINEERING d = 0,1 mg, e = 1 mg) filtrada sob vácuo através de membrana de fibra de vidro de porosidade 1,2 µm (Milipore) previamente pesada, e o retido foi submetido à secagem em forno microondas durante 15 minutos em potência 2 (180 W). O conjunto foi resfriado em dessecador por 15 minutos e pesado para a determinação da biomassa seca retida na membrana.

2.4.3 - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PIGMENTO VERMELHO

As determinações das concentrações dos pigmentos contidos no sobrenadante, obtidos após centrifugação; foram realizadas em espectrofotômetro SPECTRONIC UNICAN-GENESYS 10 - VIS (zerado com água destilada). Para manter uma precisão adequada, a faixa de absorvância de densidade óptica (D.O.) utilizada foi de até 0,800 fazendo diluições 1:2; 1:4; 1:6; 1:8 e assim sucessivamente, para manter a linearidade do método quando necessário.

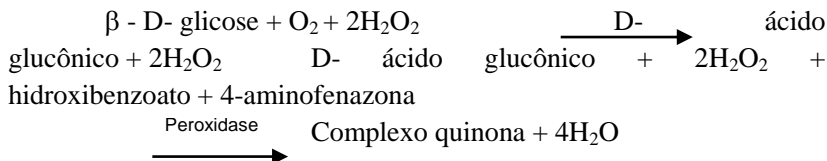
Uma alíquota de 2 mL foi utilizada para leitura em espectrofotômetro a um comprimento de onda na região de 480 nm, para a determinação da concentração dos pigmentos vermelhos. Após a leitura, o sobrenadante foi reservado para o congelamento aguardando assim as futuras dosagens.

2.4.4 - DOSAGEM DE GLICOSE

A determinação quantitativa da glicose foi feita através do método enzimático- colorimétrico da Gold Analisa Diagnóstica-Glicose-PP.

Princípio do método “glicose enz color”

glicose oxidase



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

Cálculo:

$$\text{mg de glicose/dL} = \frac{At}{Ap} \times 100, \text{ onde:}$$

- At = Absorbância do teste
- Ap = Absorbância do padrão (padrão de glicose = 100 mg/dL).

As amostras foram diluídas, de forma que a concentração se encontre na faixa da curva de calibração.

Limite detectável: O método é linear de 0,23 mg/dL até 500 mg/dL. Amostras com concentrações superiores devem ser diluídas com água destilada e retestadas.

2.4.5 - Determinação da Concentração de Etanol

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

Condições de operação:

- Gases de arraste: Nitrogênio com fluxo de 25 mL/min.
- Gases da chama: Hidrogênio e oxigênio com vazão de 35 mL/min e 300 mL/min respectivamente.
- Temperatura da coluna: 105°C.
- Temperatura do detector: 230°C.
- Temperatura do injetor: 185°C.
- Volume da amostra: 2,0 µL.

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

2.4.6 - Dosagem de Amilase

A determinação quantitativa de amilase foi realizada utilizando-se o Kit Analisa Diagnóstica, que possui o seguinte princípio: a amilase hidrolisa o amido liberando moléculas de açúcares e dextrina, e com a adição de iodo, ocorre a formação de cor azul com o amido não hidrolisado. A atividade da amilase é inversamente proporcional à intensidade de cor azul e é calculada em comparação com um controle de substrato.

Procedimento:

Ajustou-se o comprimento de onda do espectrofotômetro para 660 nm. Foi utilizado o branco com água destilada.

Rotulou-se os tubos de ensaio e seguiu-se o procedimento descrito na figura a seguir.

Identificar dois tubos de ensaio como: "C" - Controle e "T" - Teste e proceder:		
Reagentes	Controle	Teste
Substrato	0,50 mL	0,50 mL
Homogeneizar bem e incubar em banho maria a 37°C por 2 minutos. O nível da água no banho deve ser superior aos reagentes no tubo de ensaio.		
Amostra	----	0,01 mL
Homogeneizar bem e incubar em banho maria a 37°C por 7 minutos e 30 segundos (CRONOMETRAR)		
Reagente de cor	0,50 mL	0,50 mL
Água deionizada	4,00 mL	4,00 mL

Figura 15 - Procedimento utilizado para determinação da enzima

amilase

Após mistura, esperou-se 5 minutos.

O espectrofotômetro foi zerado com o tubo B (branco) e determinou-se a absorbância da solução padrão e das amostras, foram realizados os cálculos.

A reação é estável por 120 minutos.

Cálculo:

$$\text{Unidades de amilase/dL} = \frac{Ac - At}{Ac} \times 800, \text{ onde:}$$

- At = Absorbância do teste
- Ac = Absorbância do controle

Linearidade:

O resultado da medição é proporcional à atividade enzimática até 400 U/dL. Para valores superiores, as amostras foram diluídas com

NaCl 150 mmol (0,85%) e repetida a medição. O resultado obtido foi multiplicado pelo fator de diluição.

2.4.7 - Determinação de Lovastatina

Para a determinação da concentração de lovastatina utilizou-se a técnica da cromatografia em fase líquida (HPLC).

O sistema HPLC para análise da concentração da lovastatina foi da Shimadzu 10-A (formado por um controlador de distribuição), um detector Shimadzu SPD-10-A UV-VIS e uma coluna Cosmosil 5 C-18-MS-II gel 150 x 4,6 mm, 5 μ . O volume injetado foi 20 μ L. A amostra foi diluída com uma fase móvel contendo 65% de acetonitrila a um fluxo de 1,0 mL/min. O padrão de lovastatina obtido da Sygma, foi usado para construir uma curva de calibração para se verificar os ajustes dos dados e foi preparado a partir de 1 mg de lovastatina (peso= 3,0 mg) em 3,0 mL de água deionizada.

2.4.8 - Tratamento de Dados

a) Velocidades Específicas Máximas de Crescimento:

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

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

onde:

X = biomassa (g)

X₀ = biomassa inicial (g)

μ = velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})

t = tempo (h)

b) Produtividade Máxima:

Produtividade máxima ($\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$), de acordo com a equação abaixo:

$$P_X = (X_{\max}) / t \quad \text{onde:}$$

t = tempo de fermentação estimado quando o substrato é igual a zero (h) à X_{\max} ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$).

c) Fatores de Conversão:

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

$$Y_{M/S} = dM/dS \quad \text{onde:}$$

$Y_{M/S}$ = Fator de conversão de substrato S em componente M (pigmento, ($\text{UDO480} \cdot \text{g}^{-1}$) ou X, biomassa ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$).

M = componente que pode representar a biomassa (g), ou pigmento *Monascus* (UDO480).

S = substrato.

2.5 - ESTUDO DA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS VERMELHOS

Baseado em estudos de Moritz (2005), nos quais tiveram como objetivo a maximização da produção de corante vermelho e redução concomitante de micotoxina indesejável sintetizada pelo *Monascus ruber* CCT 3802; foram avaliados no presente estudo em cultivo submerso (frascos agitados), a produção de pigmentos vermelhos em meio de cultivo contendo glicose e glutamato monossódico como fonte de carbono e nitrogênio respectivamente, conforme Pastrana et al. (1995), descrito no item 2.3.2 do presente capítulo. Foram realizadas fermentações em frascos *Erlenmayer* de 500 mL, adicionando 20 mL do

pré-inóculo ao meio de cultivo contendo 80 mL de meio, tendo seu pH inicial ajustado para 6,5 com ácido fosfórico (H_3PO_4) 30% e temperatura de 30°C e 150 min⁻¹ de frequência de agitação.

Na seqüência, foi realizada uma curva de crescimento do fungo *Monascus* com o objetivo de analisar a evolução da concentração da biomassa (g/L), absorvância do pigmento vermelho (UDO₄₈₀), concentração de etanol (g/L), consumo de glicose (g/L) e pH.

2.6 - ESTUDO DA PRODUÇÃO DE AMILASE

Da mesma forma que o estudo anterior para a produção de pigmentos, estudou-se nesta etapa, a curva de crescimento do fungo *Monascus* para a produção de amilase, utilizando-se neste caso o amido como fonte de carbono em substituição à glicose proposto anteriormente por Pastrana et al. (1995). Da mesma forma anterior, foram realizadas fermentações em frascos agitados, adicionando 20 mL do pré-inóculo ao meio de cultivo contendo 80 mL de meio, tendo seu pH inicial ajustado para 6,5 com ácido fosfórico (H_3PO_4) 30% e temperatura de 30°C e 150 min⁻¹ de frequência de agitação.

Foi realizada uma curva de crescimento do fungo *Monascus* objetivando verificar a evolução da concentração da biomassa (g/L), absorvância do pigmento vermelho (UDO₄₈₀), concentração de amilase (U.I), consumo de glicose (g/L) e pH.

A escolha do amido baseou-se em dois fatores principais. O primeiro pela sua estrutura química (maltose - glicose). O segundo fator foi que, espécies de *Monascus* têm sido estudadas por serem produtores de diversas enzimas, inclusive amilases segundo relatos bibliográficos (CARDENAS et al., 2001; SABATER-VILAR; MAAS; FINK-GREMMELS, 1999).

2.7 - ESTUDO DA PRODUÇÃO DE LOVASTATINA

Neste estudo, foi avaliado se fontes de carbono e nitrogênio inicialmente capazes de aumentar a produção de pigmentos vermelhos por *Monascus ruber* CCT 3802, podem ser aplicadas também à

biossíntese da lovastatina. Para tanto, os substratos utilizados foram: glicose, amido de arroz comercial e substratos alternativos como farelo de arroz e milhocina (resíduos agroindustriais de interesse regional), conforme descrito no item 2.3.2 do presente capítulo. Foram realizadas fermentações em frascos *Erlenmayer* de 500 mL, adicionando 20 mL do pré-inóculo ao meio de cultivo contendo 80 mL de meio tendo seu pH inicial ajustado em 6,5 com ácido fosfórico (H_3PO_4) 30% e temperatura de 30°C e 150 min⁻¹ de frequência de agitação.

A ordem seqüencial do estudo baseou-se então:

1° - Partindo de um meio previamente descrito na literatura (PASTRANA et al., 1995), para a produção de pigmento vermelho, testou-se a capacidade do fungo filamentosos *Monascus ruber* CCT 3802 de produzir a lovastatina também nesse meio.

2° - Num segundo momento, a biossíntese da lovastatina foi novamente testada em presença do meio descrito por Orozco, Pereira e Kilikian (2003) onde descreviam a obtenção da mesma molécula por *Monascus purpureus*.

3° - Na etapa final testou-se a capacidade de produção da lovastatina por *Monascus ruber* CCT 3802 em meio de cultivo anteriormente descrito na literatura (CHANG et al., 2002a) para a produção da referida molécula.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta os resultados dos ensaios fermentativos para a obtenção das moléculas bioativas por *Monascus ruber* CCT 3802 – pigmentos vermelhos, amilase e lovastatina em diferentes fontes de carbono. Inicialmente, será discutida a produção de pigmentos vermelhos utilizando a glicose como fonte de carbono. Comparativamente ao ensaio anterior, serão apresentados os resultados da fermentação para a produção de amilase frente ao amido como fonte de carbono. Dando seqüência, são discutidas as formas de obtenção da lovastatina nos diferentes meios.

3.1 - Estudo da Produção de Pigmentos Vermelhos Utilizando Glicose como Fonte de Carbono

Foram avaliados em cultivo submerso (frascos agitados) a influência da glicose como fonte de carbono (concentração inicial de 20g/L) sobre a produção de pigmentos vermelhos pelo fungo *Monascus ruber* CCT 3802. Para tanto, foi realizada uma curva de crescimento do fungo nas seguintes condições: meio contendo, em gramas por litro de água destilada: glicose (20), glutamato monossódico (5), K_2HPO_4 (5), KH_2PO_4 (5), $CaCl_2$ (0,1), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01) e $MnSO_4 \cdot H_2O$ (0,03) a 30°C, pH inicial de 6,5 e frequência de agitação de 150 min^{-1} .

A figura 16 apresenta a curva de crescimento do fungo onde pode ser observado a evolução da concentração da biomassa (g/L), absorbância do pigmento vermelho (UDO₄₈₀), concentração de etanol (g/L), consumo de glicose (g/L) e pH.

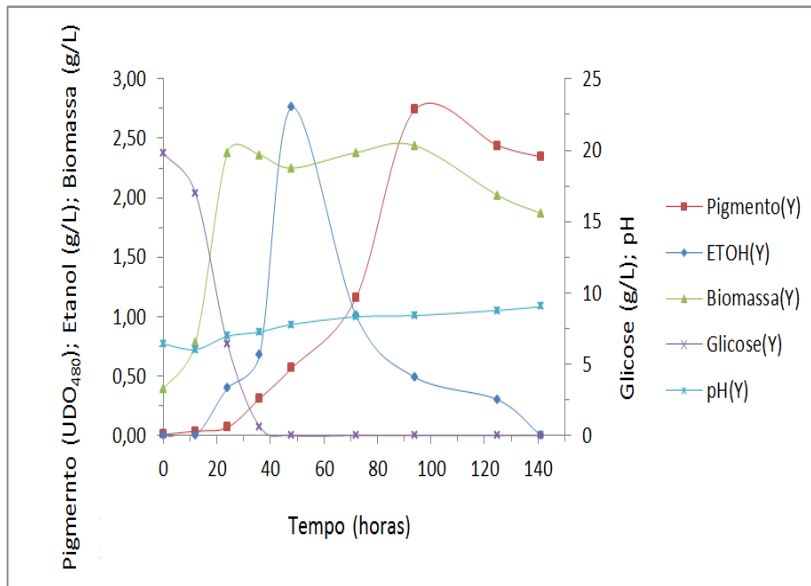


Figura 16– Evolução das concentrações de biomassa, absorvância do pigmento vermelho (UDO_{480}), concentração de etanol (g/L), consumo de glicose e pH em meio de cultivo submerso contendo glicose (20 g/L) e glutamato monossódico (GMS) à temperatura de 30°C e 150 min^{-1} de frequência de agitação. (Os dados encontram-se no Apêndice)

Conforme demonstra a figura 16, a produção de pigmentos vermelhos é detectada aproximadamente após 24 horas de fermentação, atingindo sua concentração máxima (2,74 UDO_{480}) após 94 horas do início do processo fermentativo. Observa-se que o crescimento acentuado da biomassa fúngica ocorre até 24 horas do processo, demonstrando predominância do metabolismo oxidativo. Após este período, começa a aumentar a formação de etanol, caracterizando o início do metabolismo fermentativo, até aproximadamente 48 horas, com redução ou estabilização da concentração celular. Após esse tempo, o microrganismo passa a consumir álcool, fase essa que coincide com a concentração máxima de pigmentos vermelhos. Estes resultados foram similares aos encontrados na literatura (HAMDI; BLANC; GOMA, 1996).

No momento em que a glicose já se encontra esgotada no meio, observa-se que o pigmento é produzido em maior quantidade e a produção de biomassa praticamente mantém-se estável, enquanto o etanol é consumido. A cerca de 48 horas a concentração máxima de etanol obtida ($2,76 \text{ g.L}^{-1}$) é similar aos resultados encontrados na literatura (HAJJAJ et al., 2000a; PASTRANA et al., 1995). O consumo de etanol observado no ensaio confirma resultados anteriores em que o mesmo tem sido utilizado como um substrato de carbono para a síntese de pigmentos vermelhos (BLANC et al., 1994; JUZLOVA et al., 1994).

A glicose quando consumida por *Monascus* é primeiro metabolizada a acetil- CoA, que integra a via dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e está relacionada com a produção de pigmentos quando se associa ao Malonil CoA para iniciar o ciclo dos tetracetídeos (via metabólica apresentada na Figura 4 – Capítulo 1). Este é um indicativo de que o pigmento *Monascus* pode servir como fonte de carbono por incorporação do átomo de carbono de sua molécula ao acetil-CoA quando a glicose é praticamente extinta do meio de cultivo (YONGSMITH et al., 2000).

Na ausência de respiração, as células microbianas dependem totalmente da fosforilação dos substratos para obtenção de energia: a geração de ATP deve ser acoplada ao rearranjo químico de compostos orgânicos. Muitos compostos podem atuar como substratos de crescimento por processo fermentativo, e muitas vias desenvolvem-se para regenerar coenzimas fundamentais para que a dinâmica metabólica continue acontecendo. Estas vias apresentam três estágios gerais: (1) conversão do composto passível de fermentação para doador de fosfato para a fosforilação de substrato. Este estágio quase sempre contém reações metabólicas na qual o NAD^+ é reduzido a NADH. (2) Fosforilação do ADP pelo doador de fosfato rico em energia. (3) Etapas metabólicas que colocam os produtos de fermentação em equilíbrio químico com os materiais iniciais. A necessidade mais freqüente neste último estágio consiste num mecanismo para a oxidação do NADH, gerado no primeiro estágio da fermentação, em NAD^+ (etanol, por exemplo), de modo que a fermentação possa prosseguir (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2000).

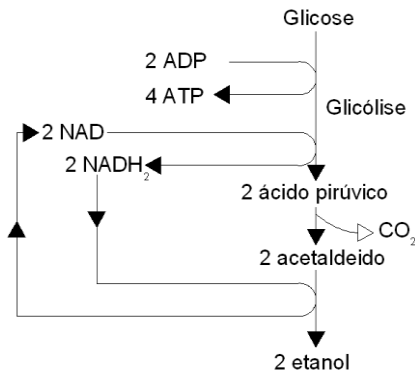


Figura 17- Esquema da fermentação alcoólica realizada pelos fungos

O esquema acima (Figura 17) caracteriza o que se pode chamar de “fermentação clássica”, ou seja: um processo independente do oxigênio, ou um artifício do metabolismo fúngico, no qual o NADH_2 que é produzido durante a glicólise (ou outra via de degradação) é utilizado para reduzir um aceptor de elétrons (etanol) produzido pela própria célula. Tal fato poderia explicar a formação de etanol antes que a glicose fosse completamente extinta do meio de cultivo, ou seja, o etanol foi formado para que o NADH_2 em excesso fosse regenerado a NAD e assim continuar a via glicolítica (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2000).

Nestas condições, observou-se que a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) do *Monascus ruber* foi igual a $0,0018 \text{ h}^{-1}$ quando o etanol é consumido, ao passo que quando o fungo utilizava glicose como substrato a μ_{\max} era $0,093 \text{ h}^{-1}$. Valores de 0,1006 e 0,0813 foram determinados para o fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) quando o substrato é glicose e etanol, respectivamente. Os valores para o fator de conversão substrato em produto ($Y_{P/S}$) foram de 0,8125 $\text{UDO}_{480} \cdot \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ para etanol e 0,0161 $\text{UDO}_{480} \cdot \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ para glicose. A produtividade máxima de células foi de $0,0547 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$, a de pigmento foi de $0,0291 \text{ UDO}_{480} \cdot \text{h}^{-1}$ e do etanol foi de $0,0575 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$. Em relação à produção máxima obtida nos ensaios, verificam-se os valores de $0,00547 \text{ g/h}$ para células, $0,00291 \text{ L/h}$ para pigmento e $0,00575 \text{ g/h}$ para etanol. Os resultados dos parâmetros cinéticos estão dispostos no

apêndice. A fase exponencial de crescimento celular termina em torno de 24 horas, enquanto o tempo de produção máxima de pigmento vermelho é em torno de 94 horas. Fica evidenciado assim que a produção de pigmento *Monascus* não está associada ao crescimento fúngico.

A concentração inicial da glicose como fonte de carbono é extinta do meio em 48 horas, período onde se atinge a concentração máxima de etanol e a maior velocidade específica máxima de crescimento do *Monascus*. O etanol verificado durante o metabolismo do *Monascus* parece ter sido usado como fonte de carbono para síntese do pigmento vermelho mantendo uma concentração estável de biomassa. A partir disso, observa-se o maior fator de conversão de substrato em pigmento, o que pode indicar que nessas condições ocorre a utilização de um metabólito secundário do *Monascus* atuando como fonte de carbono para o próprio microrganismo, quando da extinção do substrato inicial do meio. Tal situação pode ser encontrada em outros estudos, em que a produção de pigmento parece estar favorecida quando da existência do etanol no meio.

3.2 - Estudo da Produção de Amilase Utilizando Amido como Fonte de Carbono

No decorrer dos experimentos, notou-se que em alguns ensaios, os meios de cultivo ficavam viscosos sugerindo um acúmulo de outros metabólitos e biomassa fúngica. Seguindo essa idéia, foi realizada a substituição da fonte de carbono (glicose pelo amido) no meio citado por Pastrana et al. (1995) para verificação da produção de enzima amilase, envolvida durante a produção do pigmento, uma vez que existem relatos de que espécies de *Monascus* são produtoras da amilase como referenciado anteriormente.

Da mesma forma que o estudo anterior, foram avaliados em cultivo submerso (frascos agitados) a influência do amido como fonte de carbono (concentração inicial de 3 g/L) sobre a produção de pigmentos vermelhos e amilase pelo fungo *Monascus ruber* CCT 3802. Foi realizada uma curva de crescimento do fungo nas seguintes condições:

meio contendo, em gramas por litro de água destilada: amido (3), glutamato monossódico (5), K_2HPO_4 (5), KH_2PO_4 (5), $CaCl_2$ (0,1), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,5), $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,01) e $MnSO_4 \cdot H_2O$ (0,03) a $30^\circ C$, pH inicial de 6,5 e frequência de agitação de 150 min^{-1} .

A Figura 18 ilustra a evolução da cultura em meio sintético contendo 3 g/L de amido inicial como fonte de carbono. Observa-se que as concentrações de pigmento vermelho e biomassa atingiram valores de 4,98 UDO_{480} e 5,24 g/L respectivamente enquanto a produção de amilase foi de 35,22 UI. Estes resultados demonstram que a formação de pigmento está associada ao crescimento celular.

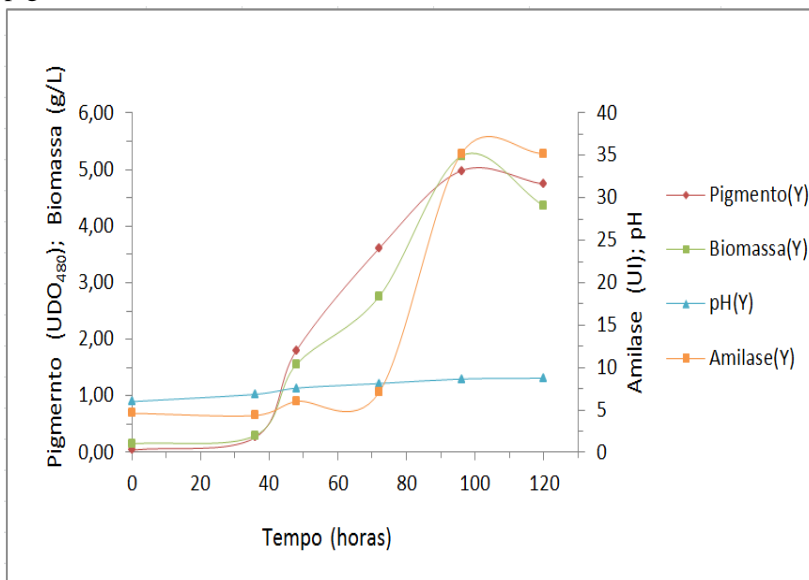


Figura 18 - Evolução das concentrações de biomassa, absorvância do pigmento vermelho (UDO_{480}), amilase e pH em meio de cultivo submerso contendo amido (3 g/L) e glutamato monossódico (GMS) à temperatura de $30^\circ C$ e 150 min^{-1} de frequência de agitação. (Os dados encontram-se no Apêndice)

Analisando-se os gráficos das Figuras 16 e 18 pode-se observar que a presença do amido (Figura 18) associado ao glutamato monossódico influencia positivamente na produção de pigmento vermelho e biomassa, por *Monascus ruber* CCT 3802, visto que as

concentrações obtidas para essas substâncias foram maiores neste experimento quando comparados ao estudo realizado com glicose associado ao glutamato (Figura 16), que atingiram valores de 2,74 UDO₄₈₀ e 2,44 g/L para pigmento vermelho e biomassa respectivamente.

De fato, a adição de aminoácidos tais como, glutamato e glicina, principalmente em cultivo submerso são fontes ricas para produção de corantes quando comparados ao nitrato de amônio e parecem favorecer a formação extracelular do pigmento *Monascus* (BLANC, 1999; BONDIOLI; MANFREDINI, 2000; HAJJAJ et al., 2000b; HAJJAJ et al., 2000a).

Blanc (1998) estudou a adição de diversos aminoácidos objetivando concomitantemente a maximização da produção de pigmento vermelho e a redução da citrinina em cultivo submerso conforme apresentado na Tabela 5, constatando-se assim, que a escolha do aminoácido adicionado ao meio de cultivo é de fundamental importância na produção de pigmento vermelho.

Tabela 5 - Influência da fonte de aminoácidos, na concentração de 5 g/L, sobre a produção de pigmento vermelho, expresso em DO₅₀₀ e citrinina

Aminoácidos	Biomassa (g/L)	DO ₅₀₀	Citrinina (mg/L)	Tempo de fermentação (h)
Glicina	7	26	58	287
Alanina	5,5	5	100	262
Valina	9	3	0	287
Leucina	9,5	2	0	161
Serina	8	12	57	161
Histamina	6,7	9	6	219
Tirosina	7	15	19	212
Glutamato	8	7	100	172
Triptofano	4	0,8	0	212
Histidina	8,3	40	0	320

Fonte: Blanc (1998)

Conforme os resultados obtidos, observa-se que a velocidade específica máxima de crescimento ao amido como substrato é de 0,0422 h⁻¹ contra 0,093 h⁻¹ à glicose. Assim pode-se dizer que o fungo apresentou a maior velocidade específica máxima de crescimento quando utiliza a glicose como substrato, coincidindo com uma menor fase de adaptação (fase *lag*). Porém quando se analisa os dados do gráfico pode-se verificar que a produção de pigmento vermelho quando o substrato é o amido é praticamente duas vezes maior de quando o substrato é a glicose, o que pode indicar que o amido é o substrato preferencial do *Monascus ruber*. Os valores de 0,9602 g.(UDO₄₈₀.L)⁻¹ e 0,18 g.(U.L)⁻¹ foram determinados para o fator de conversão de biomassa em pigmento vermelho e fator de conversão de biomassa em amilase respectivamente. A figura 18 mostra ainda uma associação da produção de pigmentos vermelhos com o crescimento celular. De fato, observa-se que a curva de formação do pigmento que se inicia aproximadamente em 36 horas após o início de fermentação, apresenta uma forma semelhante à curva de crescimento celular.

Sendo assim, observa-se que se tem a maior velocidade de crescimento de biomassa (0,093 h⁻¹) e maior fator de conversão de substrato em biomassa (0,1006) quando o substrato é glicose e o fator de conversão de substrato em pigmento vermelho é de 0,0161. Quando o substrato é o amido tem-se que os fatores de conversão de biomassa em metabólitos secundários é de 0,9602 g.(UDO₄₈₀.L)⁻¹ e 0,18g.(U.L)⁻¹ para pigmento vermelho e amilase respectivamente. A produtividade máxima de células foi de 0,053 g.(L.h⁻¹), a de pigmento foi de 0,0514 UDO₄₈₀.h⁻¹ e do amilase foi de 0,3189 g.(L.h⁻¹)

Cabe aqui, ressaltar que no ensaio contendo glicose, a produção de pigmento *Monascus* parece não estar associada ao crescimento fúngico. Já no ensaio contendo amido, o crescimento além de estar associado à produção de pigmento, parece estar também associado à amilase. De fato, isso pode ocorrer visto que as células utilizam a energia de oxidação do substrato, não somente para o crescimento mas também para finalidades de manutenção. Estes resultados sugerem que o substrato que mais favorece a produção do pigmento vermelho pelo fungo *Monascus ruber* é o amido de arroz embora a fase *lag* observada

tenha sido maior que no experimento com glicose. Uma explicação para tal fato, é que na fase *lag* ocorre a produção das enzimas amilolíticas pela célula, necessárias para a quebra de moléculas de amido contidas no meio de cultivo.

3.3 - ESTUDO DA PRODUÇÃO DE LOVASTATINA

Com o objetivo de testar a capacidade do fungo filamentososo *Monascus ruber* CCT 3802 em produzir lovastatina, foram testados os meios de cultivo previamente descritos na literatura (CHANG et al., 2002a; OROZCO; PEREIRA; KILIKIAN, 2003; PASTRANA et al., 1995).

Como pode ser observado nos gráficos das Figuras 16 e 18 que representam o experimento realizado com base no meio de Pastrana et al. (1995) e no ensaio com o meio de Chang et al. (2002a) descrito no anexo, a molécula de lovastatina não aparece. Em ensaio que teve como objetivo verificar a produção de lovastatina utilizando-se meio descrito por Orozco, Pereira e Kilikian (2003), também não foi detectada a presença do produto.

Uma hipótese para a inexistência da lovastatina quando testada principalmente com farelo de arroz, seria a inibição da formação dessa molécula por excesso de sais presentes no meio de cultivo. Como o farelo de arroz é parboilizado, os teores de Ca, P, Fe, SO₄, Na e K presentes neste, já poderiam ser satisfatórios para o crescimento do fungo, estabelecendo assim um limite de tolerância para essas substâncias e/ou um possível desvio de rota metabólica.

Parece importante uma adequação e controle do pH em cultivos de *Monascus* sp, uma vez que as enzimas participantes da via dos policetídeos assumem papel na ativação do metabolismo secundário dos fungos filamentosos. Além do mais, estudos têm demonstrado mecanismos genéticos e bioquímicos diretamente envolvidos na síntese de moléculas bioativas pela via dos policetídeos (ESPESO et al, 1993; SHAN et al, 1991).

Outra hipótese para a não detecção desta molécula nos meios de cultivo é o tipo de aminoácido utilizado, já que o processo de metilação

é uma etapa importante na biossíntese deste metabólito secundário (Figura 9), como demonstra Kimura et al. (1990) apud Lai, Pan e Tzeng (2003) ao propor que a metionina servia como um precursor importante na síntese da mevinolina em cultivo de *Monascus ruber*. De fato, a seleção e adequação do aminoácido parece favorecer a produção da lovastatina, uma vez que segundo Lai, Pan e Tzeng (2003), a adição de 0,1g/L D ou D,L-metionina nas 72 horas de fermentação aumentou em 20% a produção de lovastatina, sugerindo que a metionina provavelmente ativa as enzimas participantes da via do metabolismo dos policetídeos, sendo portanto uma importante precursora para a síntese da lovastatina. Ainda para a biossíntese da lovastatina, estudos de acordo com Kumar et al. (2000); relatam que a utilização da maltodextrina e solução saturada de milho como fonte de carbono e nitrogênio por *Aspergillus terreus* em cultura submersa fornece alto rendimento quanto à produção de lovastatina; na ordem de 1270 mg/L em 288 horas e produtividade de 4,4 mg (L.h)⁻¹.

Outro aspecto a ser considerado, é que pelo fato dos fungos secretarem a lovastatina na forma beta-hidroxicarboxílica, esta pudesse estar em grande quantidade no meio de fermentação interferindo na análise da forma lactona da molécula. A determinação, entretanto, da lovastatina tanto na sua forma lactona quanto ácida, é relatada nos experimentos conduzidos por Kysilka e Kren (1993).

4 – CONCLUSÕES

Com esse trabalho foi possível estudar algumas variáveis relevantes ao processo de obtenção do pigmento vermelho, amilase e lovastatina pelo fungo filamentoso *Monascus ruber* CCT 3802. Em função do conjunto de resultados obtidos foi possível chegar às seguintes conclusões:

- O etanol produzido durante o ensaio parece servir como substrato para a produção de pigmento.
- A fase exponencial de crescimento celular termina em torno de 24 horas e o tempo de produção máxima de pigmento vermelho é em torno de 94 horas.
- A produção de pigmento vermelho não está associada ao crescimento fúngico no ensaio contendo glicose como substrato.
- *Monascus ruber* apresenta, em termos de μ_{\max} e $Y_{X/S}$, valores maiores para glicose e $Y_{P/S}$ maior para etanol.
- Quando utilizado glicose como substrato a produtividade máxima de células foi de 0,0547 g.(L.h⁻¹) e a de pigmento foi de 0,0291 UDO₄₈₀.h⁻¹; quando utilizado amido a produtividade máxima de células foi de 0,053 g.(L.h⁻¹) e a de pigmento foi de 0,0514 UDO₄₈₀.h⁻¹.
- A capacidade do *Monascus sp.* para produzir etanol é bem conhecida na literatura, o que também foi observado nesse estudo.
- A produção de pigmento vermelho está associada ao crescimento fúngico no ensaio contendo amido como substrato.
- A produção do pigmento começa com o início da formação de etanol.
- A produção de biomassa mostrou-se inversamente proporcional à assimilação da glicose como substrato.
- As maiores concentrações de pigmentos vermelhos (4,98 UDO₄₈₀) e biomassa (5,24 g/L) foram obtidas com o amido e glutamato monossódico como fonte de carbono e nitrogênio respectivamente quando comparados aos estudos realizados com glicose: (2,74 UDO₄₈₀ e 2,44 g/L para pigmentos vermelhos e biomassa). Esses resultados sugerem que o substrato preferencial do *Monascus ruber* é o amido de arroz,

embora a fase *lag* tenha sido maior que no experimento contendo glicose como substrato.

- O *Monascus ruber* CCT 3802 além de produzir pigmento vermelho como metabólito secundário, é também um produtor da enzima amilase.
- Os ensaios contendo amido e glutamato como fonte de carbono e nitrogênio respectivamente, foram promissores para produção de pigmento vermelho e amilase (35,22 UI).
- Nas condições de trabalho e análise realizadas não foi verificada a produção de lovastatina.

SUGESTÕES

Para estudos futuros pode-se sugerir:

- Utilização de outras fontes de carbono e nitrogênio para síntese de pigmentos e/ou lovastatina.
- Dosagem da molécula de lovastatina na sua forma ácida.
- Utilização de outra técnica de separação qualitativa e quantitativa por *Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC), uma vez que pode haver presença de compostos interferentes no meio e outros metabólitos de forma geral como micotoxinas e ésteres.
- Utilização de novas linhagens de espécies de *Monascus* para testar a produção de lovastatina.
- Utilização de substratos alternativos como o farelo de arroz como fonte de carbono em substituição ao amido, viabilizando a produção da enzima amilase.
- Analisar os efeitos de parâmetros de processamento como temperatura, pH e estabilidade do corante *in vitro*; verificando-se que alterações ou associações com aditivos podem comprometer a coloração final do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRUNHOSA, L.; PATERSON, R.R.M.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N.; VENÂNCIO, A. **Mycotoxin production from fungi isolated from grapes**. Letters in Applied Microbiology, v. 32, n. 4, p. 240-242, apr. 2001.

AGRONET. **Brasil e França discutem os alimentos funcionais**. Disponível em : <<http://www.agronet.com.br/cgi-bin/artigos>>. Acesso em: 20 julho 2005.

AKIHISA, T.; MAFUNE, S.; UKIYA, M.; KIMURA, Y.; YASUKAWA, K.; SUZUKI, T.; TOKUDA, H.; TANABE N.; FUKUOKA. T. **(+)- and (-)-syn-2-isobutyl-4-methylazetidine-2,4-dicarboxylic acids from the extract of Monascus pilosus-fermented rice (red-mold rice)**. Journal of Natural Products, v. 67, p. 479-480, mar. 2004.

Allok, G. M. B. H.; Disponível em: <http://allok-e.mandt.de/egeschite.htm>; <http://allok-e.mandt.de/egeschite.htm>; Monascus - Scientific Statements and Findings; 2001; acesso em maio 2003.;

ANVISA Year: 2001 Title: Legislação/Alimentos. **Resolução nº 382, de 05 de agosto de 1999**. disponível em:<<http://www.anvisa.gov.br/alimentos.html>> Access Year: 2003 Access Date: acesso em 12 de abril.

ATROSHI, F.; RIZZO A.; WESTERMARCK, Tt.; ALI-VEHMAS, T. **Antioxidant nutrients and mycotoxins**. Toxicology, v. 180, n. 2, p.151-167, nov. 2002.

BAILLY, JD.; QUERIN, A.; LE BARS-BAILLY, S.; BENARD, G.; GUERRE, P. **Citrinin production and stability in cheese**. Journal of Food Protection, v. 65, n. 8, p. 1317-1321, aug. 2002.

BEGUM, F.; SAMAJPATI, N. **Mycotoxin production on rice, pulses and oilseeds**. *Naturwissenschaften*, v. 87, n. 6, p.275-277, jun. 2000.

BERNDT, WO. **The role of transport in chemical nephrotoxicity**. *Toxicologic pathology*, v. 26, n. 1, p.52-57, jan./feb. 1998.

BLANC, P. J. **Monascus' red pigments**. *Biofutur*, v. 185, p. 34-36, 1999.

_____. **Les Pigments Rouges de Monascus**. *Biofutur*, v. 184, p.13-17, 1998.

BLANC, P. J.; LORET, M. O.; SANTERRE, A. L.; PAREILLEUX, A.; PROMÉ, D.; PROMÉ, J. C.; LAUSSAC, J. P.; GOMA, G. **Pigments of Monascus**. *Journal of Food Science*, v. 59, n. 4, p. 862 – 865, 1994.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química** do processamento de alimentos. 3. ed. São Paulo: Liv. Varela, 2001. 143 p.

BON, E. P. S.; PEREIRA, N. J. **Tecnologia Enzimática**. UFSC. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos - Florianópolis, SC: 4-14 nov. 2002.

BONDIOLI, F.; MANFREDINI, T. **Search for new red pigments**. *American Ceramic Society Bulletin*, v. 79, p. 68-79, 2000.

BONDY, G. S.; ARMSTRONG, C. L. **Cytotoxicity of nephrotoxic fungal toxins to kidney-derived LLC-PK1 and OK cell lines**. *Cell Biol Toxicol*, v. 14, n. 5, p. 323-332, oct.1998.

BRASIL. Ministério de Estado da Saúde. **Institui a Rede Interagencial de Informações para a Saúde – RIPSAs**. Portaria n. 398, 12 de abril de 2000. Diário Oficial da União, Brasília, DF.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego.** Portaria n. 540, 27 de outubro de 1997. Diário Oficial da União, Brasília, DF.

CALVO, C.; SALVADOR. A. **Comparative study of the colorants Monascus and cochineal used in the preparation of gels made with various gelling agents.** Food Hydrocolloids, v. 16, n. 6, p. 523-526, 2002.

CARDENAS, F.; ALVAREZ, E.; ALVAREZ, M. S. C.; SANCHES-MONTERO, M.; SINISTERRA, J. V. **Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 14, p. 4-6, 2001.

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

CHANG, Y. N.; LIN, Y. C.; LEE, C. C.; LIU, B. L.; TZENG, Y. M. **Effect of rice-glycerol complex medium on the production of Lovastatin by Monascus ruber.** Folia Microbiology (Praha), v. 47, n. 6, p. 677-684, 2002b.

CHANGLING, L.; YAN, Z.; YINYE, W.; ZHU, J.; CHANG, J.; KRITCHEVSKY, D. **Monascus purpureus fermented rice (red yeast rice): a natural food product that lowers blood cholesterol in animal models of hypercholesterolemia.** Nutrition Research, v. 18, p. 71-81, 1998.

DA LOZZO, E. J.; OLIVEIRA, M. B.; CARNIERI, E. G. **Citrinin-induced mitochondrial permeability transition.** J Biochem Mol Toxicol, v. 12, n. 5, p. 291-297, 1998.

DURAN, N.; TEIXEIRA, M. F.; DE CONTI, R.; ESPÓSITO, E. **Ecological-friendly pigments from fungi**. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 42, n. 1, p. 53-66, jan. 2002.

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

ENDO, A. **Biological and pharmacological activity of inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase**. *Trends in Biochemical Sciences*, p. 10-13, 1981.

_____. **Drugs Inhibiting HMG-CoA Reductase**. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 31, p. 257-267, 1985.

_____. **Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase**, *J. Antibiotics* 33, 334-336, 1980.

ENDO, A.; HASUMI, K.; NAKAMURA, T.; KUNISHIMA, M.; MASUDA, M. **Dihydromonacolin L and monacolin X, new metabolites which inhibit cholesterol biosynthesis**. *The Journal of Antibiotics*, v. 38, n. 3, p. 321-327, mar. 1985.

ENDO, A.; HASUMI, K.; NEGISHI, S. **Monacolins J and L, new inhibitors of cholesterol biosynthesis produced by *Monascus ruber***. *The Journal of Antibiotics*, v. 38, n. 3, p. 420-422 mar. 1985.

ENDO, A.; KOMAGATA, D.; SHIMADA, H. **Monacolin M, a new inhibitor of cholesterol biosynthesis**. *The Journal of Antibiotics*, v. 39, n. 12, p. 1670-1673 dec. 1986.

ESPESO, E. A.; TILBURN, J.; ARST, H. N., Jr.; PENÁLVA, M. A. **pH regulation is a major determinant in expression of a fungal**

penicillin biosynthetic gene. The EMBO Journal, v. 12, p. 3947-3956, 1993.

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

FABRE, C. E.; SANTERRE, A. L.; LORET, M. O.; BABERIAN, A.; PAREILLEUX, A.; GOMA, G.; BLANC, P. J. **Production and food applications of the red pigments of Monascus ruber.** Journal of Food Science, v. 58, n. 5, p. 1099-1102, 1993.

FENICE M.; FEDERICI F.; SELBMANN L.; PETRUCCIOLI M. **Repeated-batch production of pigments by immobilised Monascus purpureus.** Journal of Biotechnology, v. 80, p. 271–276, 2000.

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

FUTAMURA, T.; OKABE, M.; TAMURA, T.; TODA, K.; MATSUNOBU, T.; PARK, Y.S. **Improvement of production of Kojic Acid by a mutant strain Aspergillus oryzae, MK 107-39.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 91, n. 3, p. 272-276, 2001.

GAILING, L. **The manufacturing of wenstarin capsule, a new registered and marketable drug based on red as raw material.** Symposia of Monascus-cultures and applications organized by "Institut National des Sciences Appliqués ". Toulouse: jul. 8-10, 1998.

GUNNARD, J.; WASILESKI, J.; ALAN, G. **Production of Food Colorants by fermentaion.** In: Bioprocess Production of Fragrance and Color Ingredients.: Sons, John Wiley & Series., p. 205-233 , 1994.

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

HAJJAJ, H.; BLANC, P. J.; GROUSSAC, E.; GOMA, G.; URIBELARREA, J. L.; LOUBIERE, P. **Improvement of red pigment citrinin production ratio as a function of environmental conditions by *Monascus ruber*.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 64, n. 4, p. 497-501, aug. 1999a.

HAJJAJ, H.; BLANC, P.; GROUSSAC, E.; URIBELARREA, J. L.; GOMA, G.; LOUBIERE, P. **Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, n. 8, p. 619-625, nov. 2000a.

HAJJAJ, H.; KLAEBE, A.; GOMA, G.; BLANC, P. J.; BARBIER, E.; FRANÇOIS, J. **Medium-chain fatty acids affect citrinin production in the filamentous fungus *Monascus ruber*.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 3, p. 1120-1125, mar. 2000b.

HAJJAJ, H.; KLAEBE, A.; LORET, M. O.; GOMA, G.; BLANC, P. J.; FRANÇOIS, J. **Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *monascus ruber* as revealed by ¹³C nuclear magnetic resonance.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n. 1, p. 311-314, jan. 1999b.

HAJJAJ, H.; KLAEBE, A.; LORET, M. O.; TZEDAKIS, T.; GOMA, G.; BLANC, P. J. **Production and identification of N-glucosylrubropunctamine and N-glucosylmonascorubramine from *Monascus ruber* and occurrence of electron donor-acceptor complexes in these red pigments.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 7, p. 2671-2678, jun. 1997.

HAJJAJ, H.; NIEDERBERGER, P.; DUBOC, P. **Lovastatin Biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a Chemically Defined Medium.** Applied and Environmental Microbiology, v. 67, n. 6, p. 2596–2602, jun. 2001.

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

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

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

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

HIRAMA, M.; IWASHITA, M. **Total Synthesis of (+) - Monacolin k (Mevinolin).** Tetrahedron Letters, v. 24, n. 17, p. 1811-1812, 1983.

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

JANARDHANA, G. R.; RAVEESHA, K. A.; SHETTY, H. S. **Mycotoxin contamination of maize grains grown in Karnataka (India).** Food Chem Toxicol, v. 37, n. 8, p. 863-868, aug. 1999.

JAWETZ, M.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Metabolismo Microbiano**. In: G. Koogan (Ed.). *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro - RJ, 2000. *Metabolismo Microbiano*, p.52-73.

JUNG, H.; KIM, C.; KIM, K.; SHIN, C. S. **Color characteristics of monascus pigments derived by fermentation with various amino acids**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 5, p. 1302-1306, feb. 2003.

JUNG, K. Y.; TAKEDA, M.; KIM, D. K.; TOJO, A.; NARIKAWA, S.; YOO, B. S.; HOSOYAMADA, M.; CHA, S. H.; SEKINE, T.; ENDOU, H. **Characterization of ochratoxin A transport by human organic anion transporters**. *Life Sci*, v. 69, n. 18, p. 2123-2135, sep. 2001.

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

KENNEDY, J.; AUCLAIR, K.; KENDREW, S. G.; PARK, C.; VEDERAS, J. C.; HUTCHINSON, C. R. **Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during Lovastatin Biosynthesis**. *Science*, v. 284, p. 1368-1372, 1999.

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

KIM, H. J.; KIM, J. H.; OH, H. J.; SHIN, C. S. **Morfology control of *Monascus* cells and scale-up of pigment fermentation**. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 5, p. 649-655, dec. 2002.

KOUTINAS, A. A.; WANG, I. K.; KOOKOS, I. K.; WEBB, C. **Kinetic parameters of *Aspergillus awamori* in submerged cultivations on whole wheat flour under oxygen limiting conditions**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 16, p. 23-34, 2003.

KREJCI, M. E.; BRETZ, N. S.; KOECHEL, D. A. **Citrinin produces acute adverse changes in renal function and ultrastructure in pentobarbital-anesthetized dogs without concomitant reductions in [potassium] plasma.** Toxicology, v. 106, n. 1-3, p. 167-177, jan. 1996.

KUJUMDZIEVA, A.V.; HALLET, J. N.; SAVOV, V.; RASHEVA, T. **Monascus urpureus strain producer of pigments and by-products.** Journal of Cleaner Production, v. 5, p. 115-123, 1997.

KUMAR, D.; JAIN, V. K.; SHANKER, G.; SRIVASTAVA, A. **Utilisation of fruits waste for citric acid production by solid state fermentation.** Process Biochemistry, v. 38, p. 1725-1729, 2003b.

_____. **Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse.** Process Biochemistry, v. 38, p. 1731-1738, 2003a.

KUMAR, M. S.; JANA, S. K.; SENTHIL, V.; SHASHANKA, S.; KUMAR, S. V.; SADHUKHAN, A. K. **Repeated fed- batch process for improving lovastatin production.** Process Biochemistry, v. 36, p. 363 -368, 2000.

KYSILKA, R; KREN, V. **Determination of Lovastatin (Mevinolin) and mevinoline acid in fermentation liquids.** Journal of Chromatography, v. 630, p. 415-417, 1993.

LAI, L.-S.T.; PAN, C.-C.; TZENG, B.-K. **The influence of medium design on lovastatin production and pellet formation with a high - producing mutant of Aspergillus terreus in submerged cultures.** Process Biochemistry, v. 38, n. 9, p.1317-1326, apr. 2003.

LEE, S. Y.; PAPOUTSAKIS, E. T. **Metabolic engineering.** New York: Marcel Dekker, 1999. 423 p.

LEE, Y.; CHEN, D.; CHAUVATCHARINS, S.; SEKI, T.; YOSHIDA, T. **Monascus Pigment Production in Submerged Fermentation**. Journal Fermented Bioengineering, v. 79, p. 516-518, 1998.

LI, Y.-G.; ZHANG, F.; WANG, Z.-T.; HUA, Z.-B. **Identification and chemical profiling of monacolins in red yeast rice using high-performance liquid chromatography with photodiode array detector and mass spectrometry**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 35, p. 1101-1112, 2004.

LIN, T. F.; DEMAIN, A. L. **Effect of nutrition of Monascus sp. on formation of red pigments**. Applied Microbiology Biotechnology, v. 36, p. 70-75, 1991.

_____. **Negative Effect of Ammonium Nitrate As Nitrogen Source On The Production of Water-soluble Red Pigments by Monascus sp.** Applied Microbiology and Biotechnology, v. 43, n. 4, p. 701-705, 1995.

LIN, T. F.; DEMAIN, A. L. **Leucine interference in the production of water-soluble Monascus pigments**. Archives of Microbiology, v. 162, p.114-119, 2000.

LIN, T. F.; YAKUSHIJIN, G. H.; DEMAIN, A.L. **Formation of water-soluble Monascus pigments red by biological and semi-synthetic process**. Journal Industrial Microbiology, v. 9, p. 173-179, 1992.

LIU, F.; TACHIBANA, S.; TAIRA, T.; ISHIHARA, M.; YASUDA, M. **Purification and characterization of a new type of serine carboxypeptidase from Monascus purpureus**. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 31, p. 23-28, 2004.

LIU, J.-Z.; WENG, L.-P.; ZHANG, Q.-L.; XU, H.; JI, L.-N. **A mathematical model for gluconic acid fermentation by Aspergillus niger**. Biochemical Engineering Journal, v. 14, p. 137-141, 2002.

LÓPEZ, J. L. C.; PÉREZ, J. M. S.; SEVILLA, J. M. F.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; GRIMA, E. M.; GRISTI, Y. **Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production.** Enzyme and microbial technology, v. 33, n. 2-3, p. 270-277, 2003.

MACARIO, A.; PALO, L. V. A.; MACEDA, L. M. M. **A study on angkak and its production.** The Philippine Journal of Science, v. 89, n. 1, p. 1-19, 1960.

MAIMOM, D. **Estudo de mercado de matéria-prima:** Corantes naturais (cosméticos, indústria de alimentos), conservantes e aromatizantes, bioinseticidas e óleos vegetais e essenciais (cosméticos e oleoquímica): PROJETO BRA/96/025 - Acordo SUDAM/PNUD, Rede Para Conservação e Uso Dos Recursos Genéticos - GENAMAZ. 2005 2000.

MARANGONI, C.; ARAGÃO, G. M. F.: Universidade Federal de Santa Catarina; FURIGO JUNIOR, A. **Estudo de estratégias de produção de poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) por *Ralstonia eutropha* utilizando substratos de baixo custo e ácido propiônico.** Florianópolis, 2000. 191f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina.

MARTINKOVA, L.; PATAKOVA-JUZLOVA, P.; KRENT, V.; KUCEROVA, Z.; HAVLICEK, V.; OLSOVSKY, P.; HOVORKA, O.; RIHOVA, B.; VESELY, D.; VESELA, D.; ULRICHOVA, J.; PRIKRYLOVA, V. **Biological activities of oligoketide pigments of *Monascus purpureus*.** Food Addit Contam, v. 16, n. 1, p. 15-24, jan. 1999.

MILLS, J. T.; SEIFERT, K. A.; FRISVAD, J. C.; ABRAMSON, D. **Nephrotoxic *Penicillium* species occurring on farm-stored cereal grains in western Canada.** Mycopathologia, v. 130, n. 1, p. 23-28, 1995.

MONTANI, M.; VAAMONDE, G.; RESNIK, S. L.; BUERA, P. **Temperature influence on *Penicillium citrinum* Thorn growth and citrinin accumulation kinetics.** International Journal of Food Microbiology, v. 7, p. 115-122, 1988.

MORITZ, D. E. **Estudo da produção de pigmento *Monascus* por *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo submerso.** (Doutorado). Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 143p. 2005.

MOROVJÁN, G.; SZAKÁCS, G.; FEKETE, J. **Monitoring of selected metabolites and biotransformation products from fermentation broths by high - performance liquid chromatography.** Journal of Chromatography A, v. 763, p. 165-172, 1997.

NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. **Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*.** Biochemical Engineering Journal, v. 16, p. 57-67, 2003.

NEGRO, J. J.; FERNANDEZ, J. G. **Astaxanthin is the major carotenoid in tissues of white storks (*Ciconia ciconia*) feeding in introduced crayfish (*Procambarus clarkii*).** Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v. 126, n. 3, p. 347-352, 2000.

OGIHARA, J.; KATO, J.; OISHI, K.; FUJIMOTO, Y. **PP-R, 7-(2-Hidroxyethyl)- Monascorubramine, a red pigment produced in the mycelia of *Penicillium* sp.** AZ. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 91, n. 1, p. 44-47, 2001.

OROZCO, S. F. B.; PEREIRA, D. G.; KILIKIAN, B. V. **Influência do pH na Produção de Pigmentos Vermelhos e na Micromorfologia de *Monascus purpureus* CCT 3802 em Cultivo Submerso.** SINAFERM

- XIV Simpósio Nacional de Fermentações. Florianópolis - SC: Anais - artigo 133 CD-room, 2003.

PANAGOOU, E. Z.; KATSABOXAKIS, C. Z.; NYCHAS, G. J. **Heat resistance of monascus ruber ascospores isolated from thermally processed green olives of the Conservolea variety.** International journal of food microbiology, v. 76, n. 1-2, p. 11-18, jun. 2002.

PAPPUN, A. S.; ILLINGWORTH, D. R. **The effects of lovastatin and simvastatin on the diurnal periodicity of plasma mevalonate concentrations in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia.** Atherosclerosis, v. 165, p.137-144, 2002.

PASTRANA, L.; BLANC, P. J.; SANTERRE, A. L.; LORET, M. O.; GOMA, G. **Production of Red Pigments by Monascus ruber in Synthetic Media with a Strictly Controlled Nitrogen Source.** Process Biochemistry, v. 30, n. 4, p. 333-341, 1995.

PEREIRA, D. G.; KILIKIAN, B. V. **Effect of yeast extract on growth kinetics of Monascus purpureus.** Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 91-93, p. 311-316, 2001.

PFEIFFER, E.; GROSS, K.; METZLER, M. **Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin.** Carcinogenesis, v. 19, n. 7, p. 1313-1318, jul. 1998.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. **Determinação de corantes artificiais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em pó para gelatina.** Quimica. Nova, 2004.

RHYU, M. R.; KIM, D. K.; KIM, H. Y.; KIM, B. K. **Nitric oxide-mediated endothelium-dependent relaxation of rat thoracic aorta induced by aqueous extract of red rice fermented with Monascus ruber.** Journal of Ethnopharmacology, v. 70, n. 1, p. 29-34, apr. 2000.

ROITMAN, I. **Tratado de microbiologia**. São Paulo: Ed. Manole, 1988. 186 p.

SABATER-VILAR, M.; MAAS, R. F.; FINK-GREMMELS, J. **Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination**. Mutation Research, v. 444, n. 1, p. 7-16, jul. 1999.

SANKPAL, N. V.; KULKALNI, B. D. **Optimization of fermentation conditions for gluconic acid production using *Aspergillus niger* immobilized on cellulose microfibrils**. Process Biochemistry, v. 37, p. 1343-1350, 2002.

SATO, K.; SASAKI, S. S.; KAWASAKI, S. Y.; MAITANI, T. **Analytical Method of Citrinin in *Monascus* Colour**. Jpn. J. Food Chem, v. 5, n. 1, 1998.

SCRIBAN, R. **Biotecnologia**. São Paulo: Manole, 1985. 489p.

SCUDAMORE, K. A.; HETMANSKI, M. T. **Natural occurrence of mycotoxins and mycotoxigenic fungi in cereals in the United Kingdom**. Food Addit Contam, v. 12, n. 3, p. 377-382, may-jun. 1995.

SHAN, A. J.; TILBURN, J.; ADLARD, M. W.; ARST, H. N., Jr., **pH regulation of penicillin production in *Aspergillus nidulans***. Microbiology Letters, v. 77, p. 209-212, 1991.

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

SUH, J. H.; SHIN, C. S. **Physiological analysis on novel coculture of *Monascus* sp. J101 with *Saccharomyces cerevisiae***. Fems Microbiology Letters, v. 190, n. 2, p. 241-245, sep. 2000b.

_____. **Analysis of the morphologic changes of *Monascus* sp. J101 cells cocultured with *Saccharomyces cerevisiae*.** Fems Microbiology Letters, v. 193, n. 1, p. 143-147, dec. 2000a.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. **Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species.** Int J Food Microbiol, v. 43, n. 3, p. 141-158, sep. 1998.

SZAKÁCS, G.; MOROVJÁN, G.; TENGERDY, R. P. **Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*.** Biotechnology Letters, v. 20, n. 4, p. 411-415, 1998.

TENG, S. S.; FELDHEIM, W. **Anka and anka pigment production.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 26, p. 280-282, 2001.

TSENG, Y. Y.; CHEN, M. T.; LIN, C. F. **Growth, pigment production and protease activity of *Monascus purpureus* as affected by salt, sodium nitrite, polyphosphate and various sugars.** Journal of Applied Microbiology, v. 88, p. 31-37, 2000.

VANDENPLAS, O.; CAROYER, J. M.; CANGH, F. B.; DELWICHE, J. P.; SYMOENS, F.; NOLARD, N. **Occupational asthma caused by a natural food colorant derived from *Monascus ruber*.** J Allergy Clin Immunol, v. 105, n. 6, p. 1241-1242, jun. 2000.

WANG, I. K.; LIN-SHIAU, S. Y.; CHEN, P. C.; LIN, J. K. **Hypotriglyceridemic effect of Anka (a fermented rice product of *monascus* sp.) in rats.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 48, n. 8, p. 3183-3189, aug. 2000.

WANG, J. J.; LEE, C. L.; PAN, T. M. **Improvement of monacolin K, γ -aminobutyric acid and citrinin production ratio as a function of environmental conditions of *Monascus purpureus* NTU 601.** Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, v. 30, p. 669-676, 2003.

WANG, S-L.; YEN, Y-H.; TSIAO, W-J.; CHANG, W-T.; WANG, C-L. **Production of antimicrobial compounds by *Monascus purpureus* CCRC31499 using shrimp and crab shell powder as a carbon source.** *Enzyme and microbial technology*, v. 31, p. 337-344, 2002.

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

WATANABE, T.; MAZUMDER, T. K.; YAMAMOTO, A.; NAGAI, S.; ARIMOTO-KOBAYASHI, S.; HAYATSU, H.; TERABE, S. **A simple and rapid method for analyzing the *Monascus* pigment-mediated degradation of mutagenic 3-hydroxyamino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole by in-capillary micellar electrokinetic chromatography.** *Mutation Research*, v. 444, n. 1, p. 75-83, jul. 1999.

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

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

WONG, H.-C.; HU, C.-A.; YEH, H.-L.; SU, W.; LU, H.-C.; LIN, C.-F. **Production, Purification, and Characterization of α -Galactosidase from *Monascus pilosus*.** *Applied and Environmental Microbiology*, v. 52, n. 5, p. 1147-1152, nov. 1986.

YONGSMITH, B.; KITPRECHAVANICH, V.; CHITRADON, L.; CHAISRISOOK, C.; BUDDA, N. **Color Mutants of *Monascus* sp KB9 and their Comparative Glucoamylases on Rice Solid Culture.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 10, p. 263-272, 2000.

ANEXO

ANEXO - ARTIGO APRESENTADO PARA O XV COBEQ, REALIZADO EM MARINGÁ (PR) EM 2004, INTITULADO “PRODUÇÃO DE LOVASTATINA E PIGMENTOS POR *MONASCUS RUBER* CCT 3802”.

PRODUÇÃO DE LOVASTATINA E PIGMENTOS POR *Monascus ruber* CCT 3802

R. A. de Sá¹, D. E. Moritz², S. P. Jesus³, L. A. Kanis⁴, J. L. Ninow⁵

1 – Depto. de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina – Campus Universitário – Caixa Postal 476 – 88040-900 – Florianópolis – SC – Brasil. Telefone: (0-XX-48) 331-9715 – Fax: (0-XX-48) 331-9687 – E-mails: ¹ renataanselmo@pop.com.br, ² denise@enq.ufsc.br, ³ susanapj@ig.com.br, ⁵ jorge@enq.ufsc.br .

4 – Centro de Ciências da Saúde – Universidade do Sul de Santa Catarina – Tubarão – SC – Brasil. Telefone: (0-XX-48) 621-3011 – E-mail: luizk@unisul.br

RESUMO – Espécies de *Monascus* são microrganismos filamentosos e não patogênicos, produtores de metabólitos de interesse comercial como biopigmentos e lovastatina, sendo estes oriundos da via dos policetídeos. Dentre estes produtos, os pigmentos são utilizados na indústria de alimentos como corantes, enquanto a Lovastatina é usada na indústria farmacêutica por ser uma substância hipocolesterolêmica. Neste trabalho estudou-se a produção de biopigmentos e lovastatina pelo fungo filamentoso *Monascus ruber* CCT 3802 em dois substratos agroindustriais, farelo de arroz e milhocina. O tempo de fermentação estudado para a biossíntese desses compostos, pelo microrganismo, foi de 12 dias a temperatura de 30°C e 150 rpm em cultivo submerso. Durante o processo, houve uma produção considerável de pigmentos atingindo uma concentração de 97,9 mg/L em farelo de arroz,

enquanto a produção de lovastatina não foi detectada pela técnica utilizada.

ABSTRACT – Species of *Monascus* are filamentous microorganisms and not pathogenic, which produce metabolites of commercial interest as biopigments and lovastatin, deriving from the polyketides pathway. Amongst these products, the pigments are used in the food industry as colorants, while the Lovastatin is used in the pharmaceutical industry as hypocholesterolemic substance. In this work we have studied the production of biopigments and lovastatin for filamentous fungus *Monascus ruber* CCT 3802 in two substrats agribusiness, rice powder and corn steep liquor. The time of fermentation studied for biosynthesis of these composites, for microorganism, was did 12 days at the 30°C of temperature and 150 rpm in submerged culture. During the process, had a considerable pigments production reaching concentration of 97,9 mg/L in rice powder, while the lovastatin production was not detected by technique utilized.

PALAVRAS-CHAVE: lovastatina; pigmentos; *Monascus ruber*; farelo de arroz; milhocina.

1. INTRODUÇÃO

A lovastatina (também conhecida como mevinolina, monacolina K, Mevacor[®]) é uma importante droga hipocolesterolêmica capaz de inibir a Hidroxi-Metil-Glutaril Coenzima A (HMG-CoA) redutase, a enzima limitante na biossíntese do colesterol. Esta substância é ativa não somente *in vitro* por inibir a biossíntese do colesterol, mas também *in vivo* por diminuir os níveis de colesterol no plasma em animais e humanos (Chang et al., 2002).

Segundo relato bibliográfico (Endo, 1985), algumas linhagens de *Monascus ruber* podem produzir lovastatina e seus homólogos a partir de fermentação submersa. Outras espécies de fungos filamentosos, tais como, *Aspergillus* (Hirama e Iwashita, 1983), *Monascus*, *Penicillium*, *Hipomicetos*, *Eupenicillium*, *Gimnoascus* e *Tricoderma* (Chang et al., 2002) também podem produzir lovastatina.

Espécies de *Monascus* são fungos filamentosos não patogênicos e seus produtos são frequentemente usados em alimentos (Juzlova et al., 1996). Dentre os metabólitos de interesse industrial podemos citar principalmente os pigmentos, amarelo, laranja e vermelho, onde coram vinho, peixe e produtos cárneos. Sua aplicação é observada principalmente no sul da China, Taiwan, Japão e Indonésia. Estes microrganismos são tradicionalmente cultivados em meio sólido, grãos de arroz ou pão. Ainda que a fermentação em estado sólido não permita que os parâmetros cinéticos sejam controlados os estudos nesse meio de cultivo têm sido realizados com maior frequência tanto no Brasil como em outros países. Todavia, estudos em culturas submersas em meio natural ou sintético, têm sido desenvolvidos recentemente (Hajjaj et al., 2000a).

O objetivo deste trabalho é determinar as condições de cultivo do fungo filamentoso *Monascus ruber* CCT 3802 para a produção de biopigmentos e lovastatina em cultivo submerso. Para tanto, estudou-se a utilização de substratos alternativos como farelo de arroz e milhocina (resíduos agroindustriais de interesse regional).

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1.Microrganismo

O microrganismo utilizado no presente estudo foi o fungo filamentosso *Monascus ruber* CCT 3802 obtido da fundação André Tosello, Campinas SP (*Monascus ruber* van Tieghem alt. *Basipetospora rubra* Cole Kendrick).

2.2.Meios de Cultivo

Tabela – Composição dos meios de cultivo nos quatro ensaios analisados.

<u>Meio 1</u> (g/L)	<u>Meio 2</u> (g/L)	<u>Meio 3</u> (g/L)	<u>Meio 4</u> (g/L)
farelo de arroz*: 34,4	farelo de arroz ** 44,4	milhocina : 24,4	milhocina: 34,4
peptona: 10,8	peptona: 15,8	peptona: 5,8	peptona: 10,8
glicerina: 26,4	glicerina: 36,4	glicerina: 16,4	glicerina: 26,4
glicose: 129,2	glicose: 177,2	glicose: 81,2	glicose: 129,2
glutamato de Na 5,0	glutamato de Na 5,0	glutamato de Na 5,0	glutamato de Na 5,0

* Farelo de arroz obtido da indústria catarinense (parboilizado).

** Farelo de arroz comercial (Arrozina[®]).

Os diferentes meios de cultivo testados foram baseados em estudos de Chang *et. al.* (2002), que partindo de um meio inicial composto de pó de arroz (3,0%), peptona (0,9%), glicerina (3,0%), glicose (11%), MgSO₄.7H₂O (0,1%), KNO₃ (0,2%); obteve através de técnicas de planejamento experimental o seguinte meio otimizado em gramas por litro de água destilada: pó de arroz: 34,4; peptona: 10,8;

glicerina: 26,4; glicose: 129,2. Neste trabalho o pó de arroz foi substituído por milhocina ou farelo de arroz com a adição de glutamato de sódio nas concentrações mostradas na Tabela.

2.3. Pré-Inóculo

Foi realizada a inoculação direta da fase vegetativa ao meio de saís de 1,77 cm² (medida através de um ponteira de pipeta previamente estéril, contendo 0,75 cm de raio) do meio de manutenção contendo a colônia do *Monascus*, com 10 dias de crescimento a 30°C em placas de Petri, com volume constante de 12 mL de meio (BDA).

2.4. Inóculo e Meio de Cultivo

Os frascos *Erlenmeyer* aletado de 500 mL contendo 150 mL de volume útil foram inoculados com 15 mL do pré-inóculo de *Monascus ruber* e incubados em *shaker* orbital (Marca TECNAL[®]) na temperatura de 30°C a uma rotação de 150 rpm.

Assim, foram preparados três pré-inóculos diferentes, variando o substrato de acordo com o citado na Tabela. Os meios de cultivo (Meios 1, 2, 3 e 4) foram mantidos em *shaker* por 12 dias.

2.5. Métodos Analíticos

As amostras foram retiradas do *shaker* assepticamente num volume de 5 mL com ponteira estéril e colocadas em tubos de ensaio. Estes foram centrifugadas a 8000 rpm durante 15 minutos para a separação do sobrenadante e realização das análises de pigmentos e lovastatina.

As leituras dos pigmentos contidos nos sobrenadantes, obtidos após centrifugação, foram realizadas em espectrofotômetro marca SPECTRONIC UNICAN-GENESYS 10 *vis* (zerado com água destilada) nos seguintes comprimentos de onda (γ): 480 nm para leitura

do pigmento vermelho, 420 *nm* para pigmento laranja e 380 *nm* para análise do pigmento amarelo.

Foi definido por (Hajjaj et al., 2000a) que 1 (uma) unidade absorvância DO_{nm} (A_{480}) corresponde a 15 mg/L de pigmento. O peso molecular do pigmento vermelho (pigmento de maior interesse industrial) é $498 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

A presença da lovastatina no sobrenadante foi investigada através de análise em HPLC após a retirada de cada amostra. Ao final do cultivo o caldo foi extraído com 50 mL de etanol (95%) durante 24 horas. O caldo foi filtrado por membrana de 0,45mm e então analisado por HPLC para quantificar a lovastatina intracelular como descrito por (Chang et al., 2002).

O sistema HPLC para análise da concentração da lovastatina foi da Shimadzu 10-A (formado por um controlador de distribuição), um detector Shimadzu SPD-10-A UV-VIS e uma coluna Cosmosil 5 C-18-MS-II gel 150 x 4,6 mm, 5 μ . O volume injetado foi 20 μ L. A amostra foi diluída com uma fase móvel contendo 65% de acetonitrila a um fluxo de 1,0 mL/min. O padrão de lovastatina obtido da Sygma, foi usado para construir uma curva de calibração para se verificar os ajustes dos dados.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificou-se que entre os ensaios realizados, o que teve melhores resultados em termos de produção de pigmentos vermelho e amarelo foi o ensaio utilizando farelo de arroz (industrial) (Meio 1) chegando a níveis de 97,9 mg/L e 107,9 mg/L respectivamente conforme mostra a Figura 1.

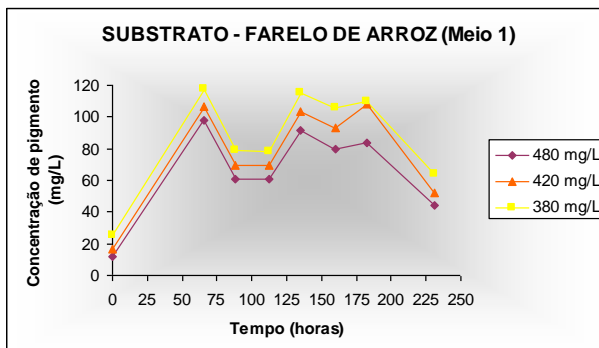


Figura 1 – Produção de pigmento em 12 dias de cultivo submerso utilizando farelo de arroz industrializado (Meio 1) a temperatura de 30°C e 150 rpm.

O cultivo em farelo de arroz parboilizado obtido da indústria catarinense (Figura 1) apresentou maiores concentrações de pigmentos que no cultivo realizado com farelo de arroz comercial (Figura 2). A hipótese sugerida, para tal fato, deve-se ao maior enriquecimento de vitaminas do complexo B e nutrientes (cálcio, fósforo, ferro e potássio) no farelo industrial em detrimento do farelo de arroz comercial (Arrozina[®]), também enriquecido, porém, sem complementação com vitaminas do complexo B.

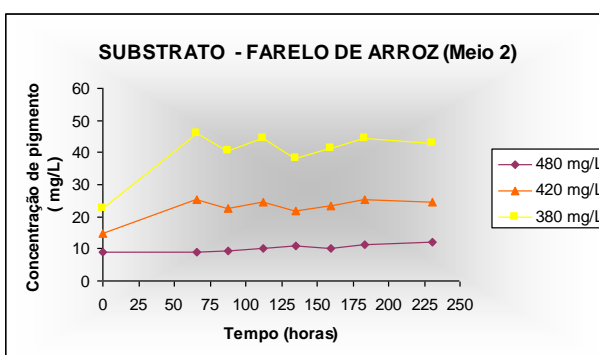


Figura 2 – Produção de pigmento em 12 dias de cultivo submerso utilizando farelo de arroz comercial (Meio 2) a temperatura de 30°C e 150 rpm.

No meio contendo a milhocina (24,4 mg/L) conforme mostra a Figura 3, a produção de pigmentos, vermelho, laranja e amarelo não foi significativa quando comparado ao meio contendo farelo de arroz industrializado (Figura 1).

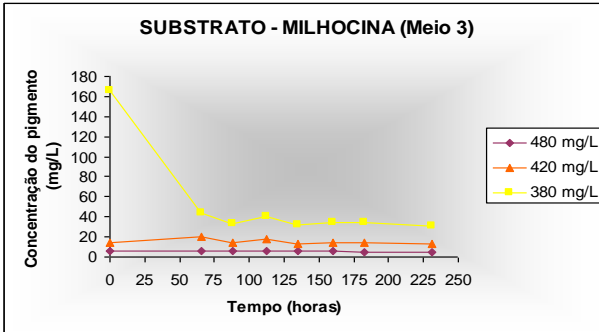


Figura 3 – Produção de pigmento em 12 dias de cultivo submerso utilizando milhocina (24,4 mg/L - Meio 3) a temperatura de 30°C e 150 rpm.

Da mesma forma, quando a concentração deste substrato (milhocina) foi aumentada, juntamente com outros nutrientes, houve um ligeiro aumento na produção dos três pigmentos (Figura 4), porém, também não foi significativamente importante, a ponto de substituir o farelo de arroz por este substrato.

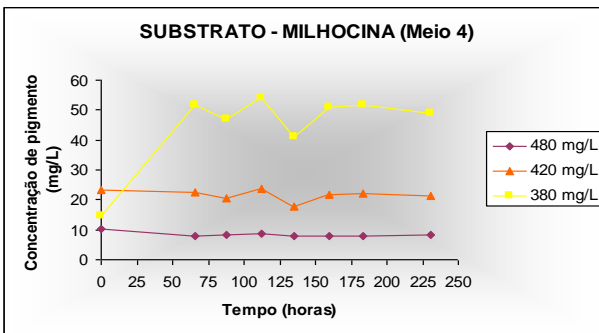


Figura 4 – Produção de pigmentos em 12 dias de cultivo submerso utilizando milhocina (34,4 mg/L - Meio 4) a temperatura de 30°C e 150 rpm.

O trabalho de (Moritz et al., 2003) compara a produção de pigmento monascus em diferentes fontes de carbono e nitrogênio, indicando que a maior produtividade de pigmentos é favorecida pela adição de farelo de arroz. Para a biossíntese da lovastatina, estudos também referenciam diferentes fontes e concentrações de nutrientes, buscando o aumento na produção desse metabólito por fungos filamentosos (Kumar et al., 2000; Hajjaj et al., 2001; Chang et al., 2002a; Casas López et al., 2003).

Nas condições dos experimentos realizados não houve detecção da molécula de lovastatina.

4.BIBLIOGRAFIA

- CHANG, Y. N.; HUANG, J. C.; LEE, C. C.; SHIH, I. L.; TZENG, Y. M. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lovastatin by *Monascus ruber*. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 30, p. 889-894, 2002.
- ENDO, A. Drugs inhibiting HMG-CoA reductase. *Pharmac. Ther.*, v.31, p. 257-267. 1985.
- HAJJAJ, H.; BLANC, P.; GROUSSAC, E.; URIBELARREA, J. L.; GOMA, G.; LOUBIERE, P. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 27. p. 619-625, 2000.
- HAJJAJ, H.; NIEDERBERGER P.; DUBOC, P. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 67, p. 2596-2602, 2001.
- HIRAMA, M.; IWASHITA, M. Total synthesis of (+) –monacolin K (mevinolin). *Tetrah. Lett.*, v. 24, n° 17, p. 1811-1812, 1983.

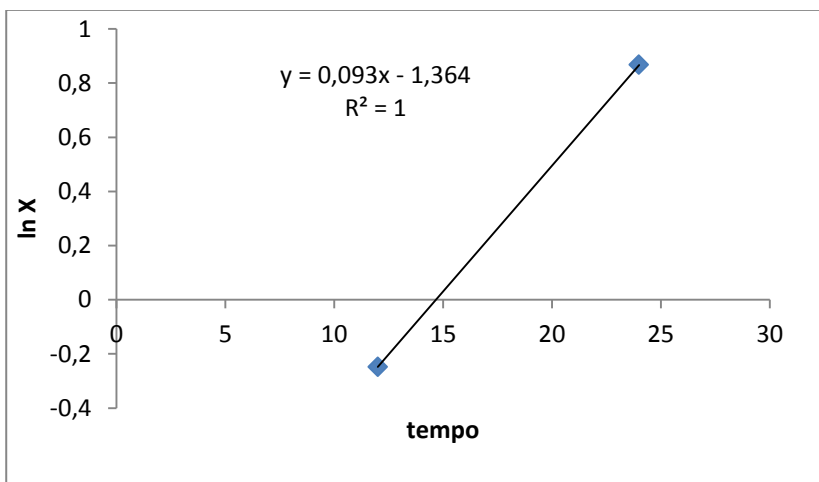
- JUSLOVA, P.; MARTINKOVA, L.; KREN, V. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. *J In Microbiol*, v. 16, p. 163-170, 1996.
- KUMAR, M. S.; JANA, S. K.; SENTHIL, V.; SHASHANKA, V.; KUMAR, S. V.; SADHUKHAN, A. K. Repeated fed-batch process for improving lovastatin production. *Process Biochem.*, v. 36, p. 363-368, 2000.
- LÓPEZ, J. L. C.; PÉREZ, J. A. S.; SEVILLA, J. M. F.; FERNÁNDEZ, F. G. A.; GRIMA, E. M.; CHISTI, Y. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. *Enzyme Microb. Technol.*, 2003.
- MORITZ, D. E.; PEREIRA, E. B.; NINOW, J. L. Avaliação da produção de lipase e pigmento monascus por *Monascus ruber* CCT 3802 variando a fonte de nitrogênio no meio de cultivo. XIV Sinaferm. 5-8 agosto. Florianópolis 2003.

APÊNDICE

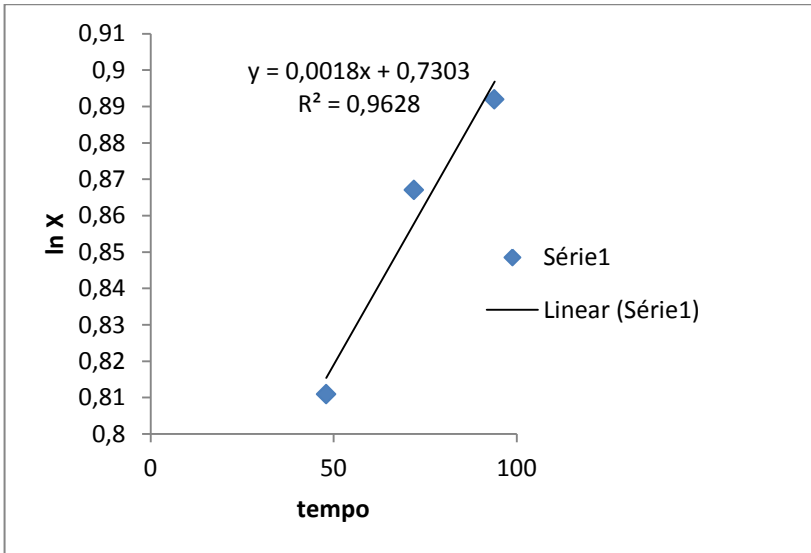
Dados da figura 16

Tempo.h.[X]	Pigmento[Y]	ETOH[Y]	Biomassa[Y]	Glicose[Y]	pH[Y]
0	0,007	0	0,39	19,8	6,42
12	0,036	0	0,78	17	6,02
24	0,068	0,4	2,38	6,4	6,96
36	0,31	0,68	2,36	0,62	7,25
48	0,567	2,76	2,25	0	7,78
72	1,158	1,01	2,38	0	8,32
94	2,74	0,49	2,44	-	8,41
125	2,44	0,3	2,02	-	8,77
141	2,344	0	1,87	-	9,03

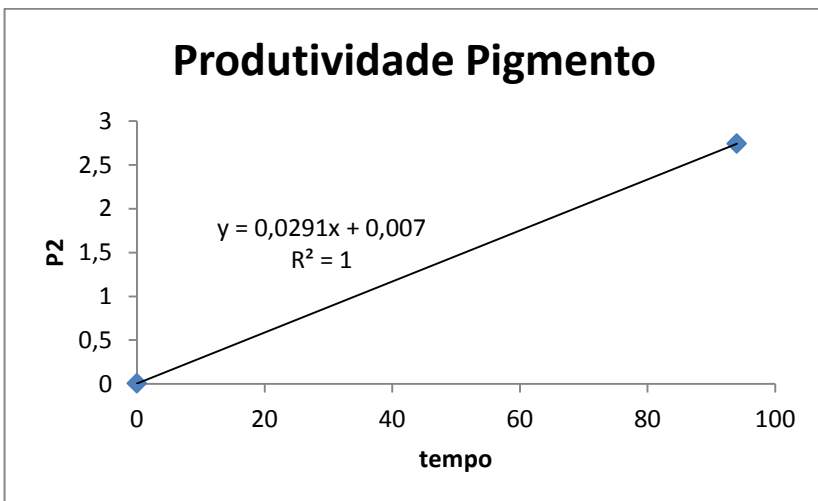
Evolução das concentrações de biomassa, absorvância do pigmento vermelho (UDO_{480}), concentração de etanol (g/L), consumo de glicose e pH em meio de cultivo submerso contendo glicose (20 g/L) e glutamato monossódico (GMS) à temperatura de 30° C e 150 min⁻¹ de frequência de agitação referente a figura 16.



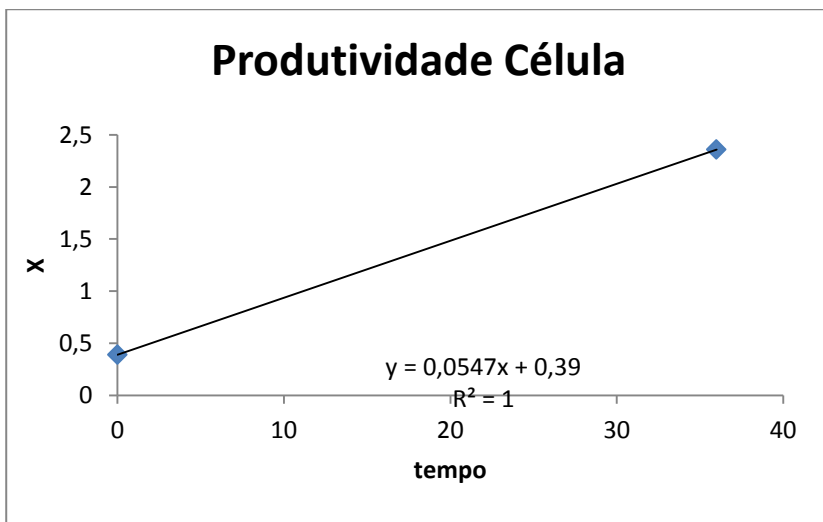
Velocidade específica máxima de crescimento no ensaio da figura 16 (glicose).



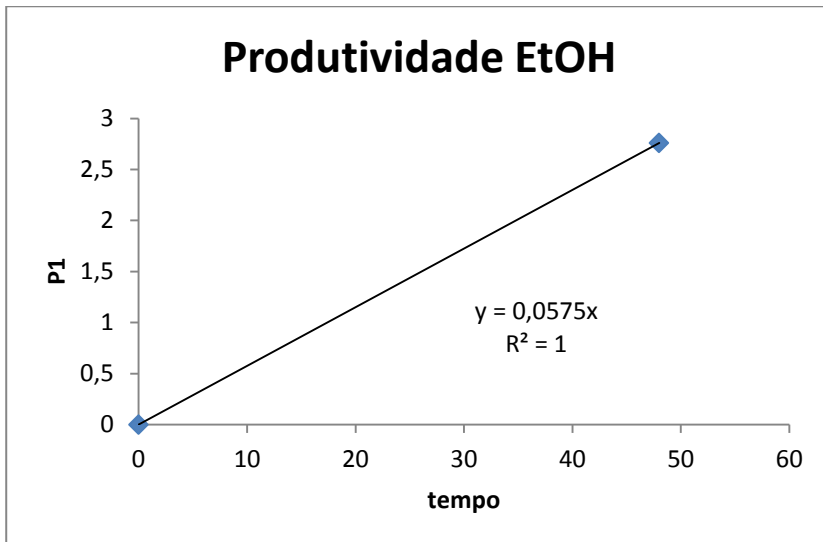
Velocidade específica máxima de crescimento no ensaio da figura 16 (etanol).



Produção pigmento	0,00291 L/h
Produtividade pigmento	0,0291 h^{-1}



Produção célula 0,00547 g/h
Produtividade célula 0,0547 g/(L*h)

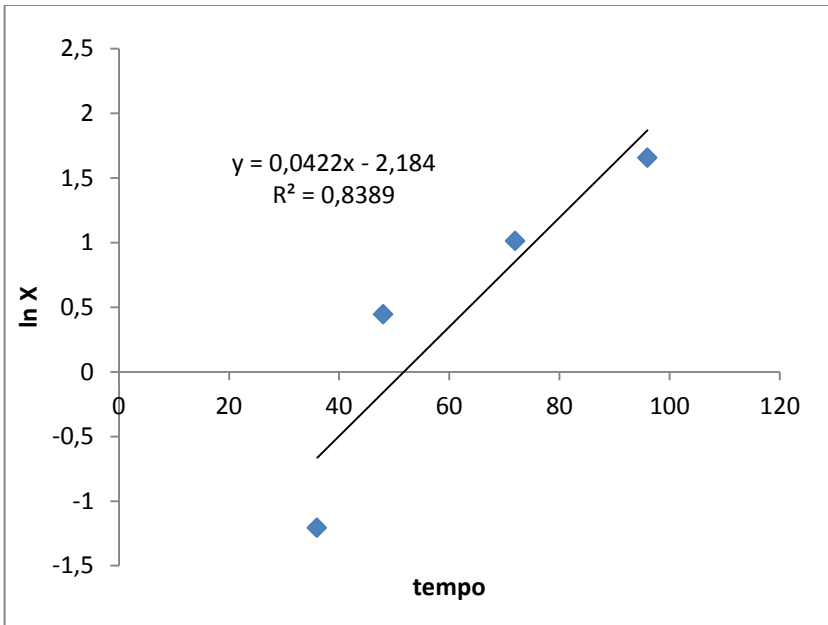


Produção EtOH 0,00575 g/h
Produtividade EtOH 0,0575 g/(L*h)

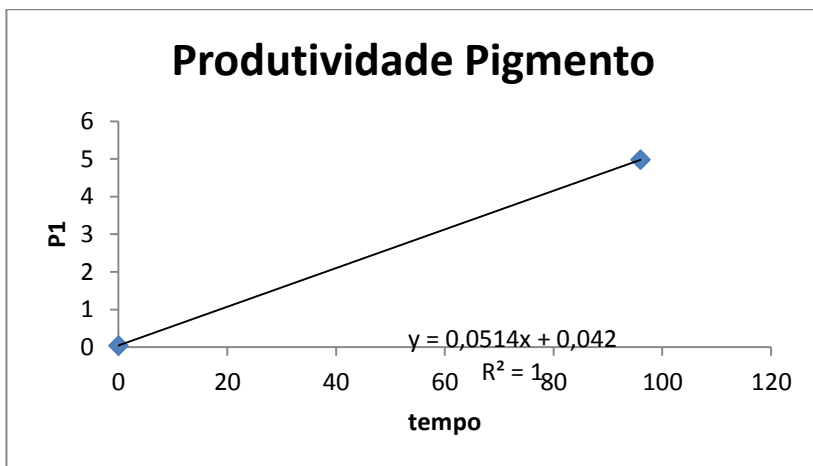
Dados da figura 18

Tempo.h.(X)	Pigmento(Y)	Biomassa(Y)	pH(Y)	Amilase(Y)
0	0,042	0,153	5,98	4,61
36	0,265	0,299	6,85	4,36
48	1,808	1,56	7,58	6,02
72	3,603	2,75	8,12	7,05
96	4,98	5,24	8,65	35,22
120	4,74	4,36	8,75	35,22

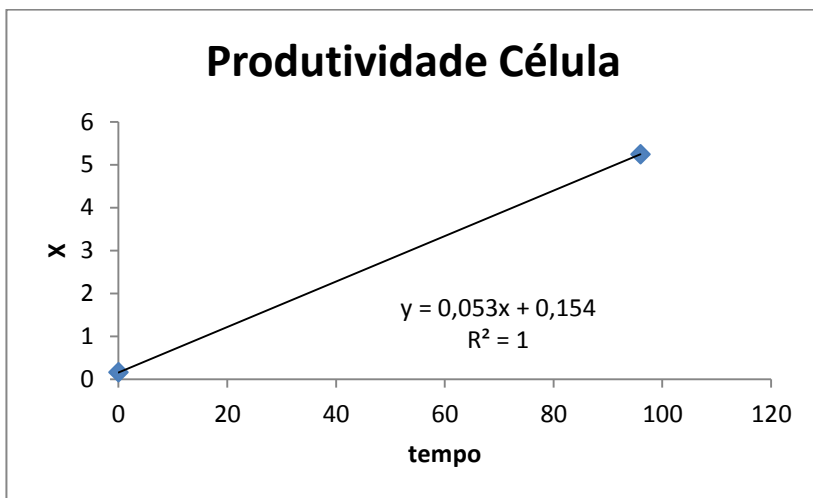
Evolução das concentrações de biomassa, absorvância do pigmento vermelho (UDO_{480}), amilase e pH em meio de cultivo submerso contendo amido (3 g/L) e glutamato monossódico (GMS) à temperatura de 30° C e 150 min^{-1} de frequência de agitação referente a figura 18.



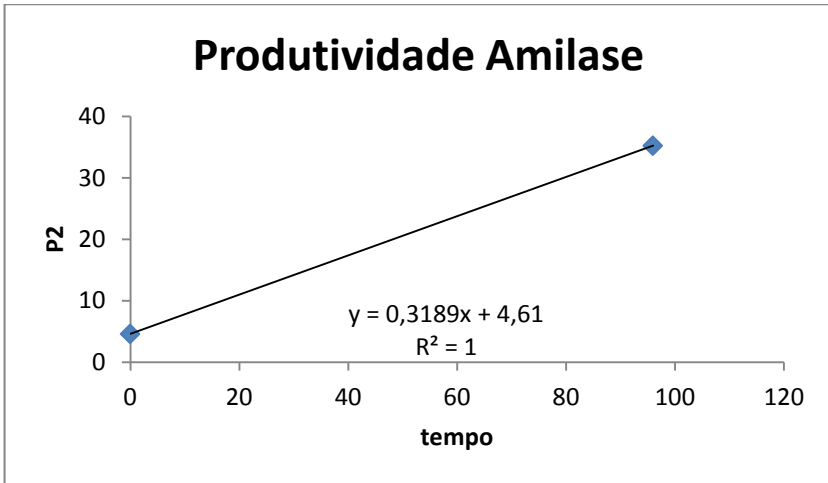
Velocidade específica máxima de crescimento no ensaio da figura 18 (amido).



Produção célula 0,00514 L/h
Produtividade célula 0,0514 h⁻¹



Produção célula 0,0053 g/h
Produtividade célula 0,053 g/(L*h)



Produção célula 0,03189 g/h

Produtividade célula 0,3189 g/(L*h)