



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO TECNOLÓGICO

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**PRODUÇÃO DE PIGMENTO VERMELHO POR *Monascus ruber* EM  
ESCALA PILOTO: PROJETO CONCEITUAL E ESPECIFICAÇÕES DE  
PROCESSO**

Silvia Salvan da Rosa

Florianópolis

2020

SILVIA SALVAN DA ROSA

**PRODUÇÃO DE PIGMENTO VERMELHO POR *Monascus ruber* EM  
ESCALA PILOTO: PROJETO CONCEITUAL E ESPECIFICAÇÕES DE  
PROCESSO**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina apresentado como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadores: Profa. Dra. Jaciane Lutz Ienczak

Dr. Felipe André Pavan

Florianópolis

2020

*Dedico este trabalho, aos meus pais e às minhas irmãs.*

*Obrigada. Amo vocês.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por ter colocado pessoas especiais ao meu redor, sem as quais certamente não teria conseguido conquistar meus objetivos.

Aos meus amados pais, Valdemir e Varlei, por sempre acreditarem em mim. Por serem meu amparo e minha maior inspiração.

Às minhas irmãs, Julia e Claudia, que sempre foram grandes exemplos para mim, pela amizade e atenção dedicadas quando sempre precisei.

Às amigas Francine Pagnan da Boit, Heloisa Vanderlinde, Liamara Bidinha e Manoela Bernardes Terrazas pela amizade, parceria e apoio em todos os momentos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Jaciane Lutz Ienczak e ao Dr. Felipe André Pavan por toda sabedoria, paciência, dedicação e confiança neste trabalho.

Ao professor Bruno Augusto Carciofi por ceder a chave de acesso ao *software*.

Aos colegas que fiz na UFSC, por todo carinho e troca de experiências durante a graduação.

À Universidade Federal de Santa Catarina, seus servidores e seu corpo docente do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos pelo ensino de qualidade e por realizar meu crescimento pessoal e profissional.

Aos membros da banca examinadora, prof. Dr. Acácio Antonio Ferreira Zielinski e Profa. Dra. Denise Moritz por aceitarem o convite

Por fim, agradeço a todos que participaram, direta ou indiretamente, do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

## RESUMO

A cor é uma das principais características na escolha de um alimento, isto porque influencia na sensação de características como aroma, sabor e textura. A fim de ressaltar a coloração dos alimentos, indústrias buscam por corantes ou pigmentos, tendo origem tanto natural quanto sintética. O uso de corantes artificiais, devido à sua estabilidade e baixo custo de produção, ainda prevalece no cenário fabril, porém a busca por substâncias naturais nos últimos anos vem crescendo, em paralelo com a percepção dos consumidores para o consumo de alimentos mais seguros e saudáveis. Desta forma, uma alternativa interessante para a indústria de alimentos é o uso de pigmentos naturais produzidos por microrganismos, também chamados de biopigmentos. O fungo *Monascus* é usado para produção de pigmentos inclusive o pigmento vermelho, tendo em vista a alta segurança, a facilidade de produção, boa solubilidade e, sendo assim, uma rota alternativa de produção de corantes naturais. Neste sentido, este trabalho teve por objetivo utilizar de dados disponíveis na literatura para desenhar um projeto conceitual em escala piloto para a produção industrial deste biopigmento a partir de resíduos da indústria de produção de arroz, além de apresentar o detalhamento do processo. Dois cenários de *downstream* foram avaliados para o processo: secagem do caldo fermentado com o fungo por *spray dryer* e separação e purificação do corante. Foram realizadas simulações utilizando o *software* SuperPro Designer® para as duas situações avaliadas. Os resultados foram obtidos por meio do balanço de massa em um biorreator de 1000 L em uma escala piloto e, assim, possibilitou conhecer o consumo de matérias-primas e utilidades de uma produção de biopigmento. Neste sentido, utilizando como fontes de alimentação a biomassa, glicose e glicina no biorretator principal, durante 96 h, à 30 °C, os resultados indicaram que para o cenário 1 a produção de foi de 9,77 kg/batelada de uma mistura em pó contendo 0,11 kg de pigmento e para o cenário 2 a produção foi de 289,14 kg/batelada de uma suspensão apresentando 0,07 kg de pigmento. Concluiu-se que o processo produtivo de pigmento vermelho a partir de *Monascus ruber* e farelo de arroz apresentou resultados satisfatórios quando comparados a dados da literatura. Porém, mais estudos precisam ser realizados a fim de comprovar sua viabilidade econômica.

Palavras-chave: *Monascus ruber*; pigmento vermelho; análise técnica; simulação

## ABSTRACT

Color is one of the main characteristics when choosing a food, because it influences the sensation of characteristics such as aroma, flavor and texture. In order to emphasize the coloring of foods, industries look for dyes or pigments, having both natural and synthetic origin. The use of artificial colors, due to their stability and low production cost still prevails in the manufacturing scenario, however the search for natural substances in recent years has been growing, in parallel with the perception of consumers for the consumption of safer and healthier foods. Thus, an interesting alternative for the food industry is the use of natural pigments produced by microorganisms, also called biopigments. The *Monascus* fungus is used for the production of pigments including red pigment, in view of the high safety, ease of production, good solubility and, therefore, an alternative route for the production of natural dyes. In this sense, this work aimed to use data available in the literature to design a pilot scale conceptual project for the industrial production of this biopigment from residues from the rice production industry, in addition to presenting the details of the process. Two downstream were evaluated for the process: drying of the fermented broth with the fungus by spray dryer and separation and purification of the dye. Simulations were performed using the SuperPro Designer® software for the two situations evaluated. The results were obtained through the mass balance in a 1000 L bioreactor on a pilot scale and, thus, made it possible to know the consumption of raw materials and utilities, as well as the equipment of a biopigment production. In this sense, using biomass, glucose and glycine in the main bioreactor for 96 h, at 30 ° C, the results indicated that for scenario 1 the production was 9.77 kg / batch of a mixture in powder containing 0.11 kg of pigment and for scenario 2 the production was 289.14 kg / batch of a solution containing 0.07 kg of liquid pigment. It was concluded that the production process of red pigment from *Monascus ruber* and rice bran presented satisfactory results when compared to literature data. However, more studies need to be carried out in order to prove its economic viability.

Keywords: *Monascus ruber*; red pigment; technical analysis; simulation

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Publicações com os temas <i>Monascus ruber</i> , produção de pigmentos por <i>Monascus ruber</i> e Produção de pigmentos por <i>Monascus</i> sp. entre 2010 e 2020 (AUTORA, 2020).....	13
Figura 2 - Pigmento (1) e corante (2) (MORITZ, 2009) .....	16
Figura 3 - Relação biossintética entre seis pigmentos clássicos de <i>Monascus</i> (JIA et al., 2019) .....	22
Figura 4 - Macromorfologia do <i>Monascus ruber</i> em BDA (SOUZA JUNIOR, 2018) .....	25
Figura 5 - Via metabólica de <i>M. ruber</i> para formação de pigmentos de glicose (Adaptado de Bühler, 2013).....	25
Figura 6 - Via biossintética de pigmentos por <i>Monascus</i> sp (Adaptado de AGBOYIBOR et.al, 2018). .....	27
Figura 7 - Fluxograma da produção de pigmento, cenário 1 (AUTORA, 2020) .....	33
Figura 8 - Fluxograma da produção de pigmento, cenário 2 (AUTORA, 2020) .....	33
Figura 9 - Linhas de produção de inóculo (AUTORA, 2020).....	41
Figura 10 - Composição da produção de inóculo 1 e 2 (AUTORA, 2020) .....	42
Figura 11 - Consumo de substrato e formação de pigmento em 96 horas de processo (AUTORA, 2020).....	43
Figura 12 - Fluxograma - <i>downstream</i> 1 (AUTORA, 2020).....	45
Figura 13 - Fluxograma – <i>downstream</i> 2 (AUTORA, 2020) .....	47

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Características e parâmetros dos equipamentos e processos de produção de pigmento vermelho (AUTORA, 2020).....	34
Quadro 2 - Característica dos downstreams avaliados (AUTORA, 2020).....	36
Quadro 3 - Equipamentos, capacidade, dimensões e vazões mássicas de cada operação unitária (AUTORA, 2020).....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Patentes que abordam o título ‘ <i>Monascus</i> ’ (INPI, 2020). .....	12
Tabela 2 - Classificação e origem do gênero <i>Monascus</i> sp. (DUFOSSÉ et al.,2005).....	22
Tabela 3 - Condição de cultura e meio utilizado para produção de pigmento (AUTORA, 2020) .....	23
Tabela 4 - Parâmetros cinéticos e condições do cultivo contendo glicose como substrato.....	31
Tabela 5 - Insumos necessários para a produção de inóculo 1 e 2 (AUTORA, 2020).....	35
Tabela 6 - Especificação dos componentes envolvidos no processo (AUTORA, 2020) .....	38
Tabela 7 - Parâmetros cinéticos obtidos a partir do ajuste do Modelo Cinético de Monod aos dados experimentais obtidos por Costa e Vendruscolo (2017) (AUTORA, 2020). .....	39
Tabela 8 - Coeficientes estequiométricos obtidos para a produção de células e produção de pigmento (AUTORA, 2020).....	40
Tabela 9 - Composição das correntes de entrada e saída do biorreator principal de 1000 L (AUTORA,2020).....	44
Tabela 10 - Dados de entrada e saída na operação de secagem no <i>spray dryer</i> (AUTORA, 2020). .....	44
Tabela 11 - Consumo de nutrientes para produção de pigmento para o cenário 1 (AUTORA, 2020).....	46
Tabela 12 - Consumo de nutrientes para produção de pigmento para o cenário 2 (AUTORA, 2020).....	48
Tabela 13 - Dados de entrada na centrífuga e os resultados de saída na operação de centrifugação, extração e filtração (AUTORA, 2020). .....	49

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	15
<b>2.1.1</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
3.1	PIGMENTOS NATURAIS <i>versus</i> PIGMENTOS SINTÉTICOS .....	16
3.2	OBTENÇÃO DE PIGMENTOS VIA PROCESSO BIOTECNOLÓGICO .....	19
3.3	PRODUÇÃO DE PIGMENTOS POR FUNGOS DO GÊNERO <i>Monascus</i> sp. ....	20
<b>3.1.1</b>	<b><i>Monascus ruber</i></b> .....	<b>24</b>
3.4	SIMULAÇÃO DE PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE PIGMENTO .....	29
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
4.1	MICROORGANISMO, SUBSTRATO, MODO DE OPERAÇÃO E DADOS CINÉTICOS DE UM PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PIGMENTO POR <i>M. RUBER</i> . ....	31
4.2	CENÁRIOS AVALIADOS .....	32
4.3	PRODUÇÃO DE INÓCULO .....	34
4.4	BIORREATOR PRINCIPAL .....	36
4.5	TANQUE DE RESFRIAMENTO .....	36
4.6	<i>DOWNSTREAM</i> .....	36
<b>4.6.1</b>	<b>Cenário 1</b> .....	<b>37</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Cenário 2</b> .....	<b>37</b>
4.7	MODELAGEM E SIMULAÇÃO DO PROCESSO .....	37
<b>4.7.1</b>	<b>Modelagem do processo e balanço de massa</b> .....	<b>37</b>
<b>4.7.2</b>	<b>Dados de entrada no simulador</b> .....	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
5.1	ESTEQUIOMETRIA .....	40
5.2	PRODUÇÃO DE INÓCULO .....	41
5.3	BIORREATOR .....	42

5.4	CENÁRIO 1 .....	44
5.5	CENÁRIO 2.....	46
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>52</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cor é um dos primeiros atributos sensoriais utilizados na escolha e compra de alimentos, isto porque influencia na sensação de características como aroma, sabor e textura (COSTA; VENDRUSCOLO, 2017). Ainda, a adição de cores aos produtos alimentícios restaura a aparência original afetada durante as etapas de processamento, armazenamento, embalagem e distribuição (OLIVEIRA et al., 2019). Neste contexto, a produção de corantes ou pigmentos por indústrias ganha destaque. Na indústria de alimentos, eles são usados como aditivos, intensificadores de cor e antioxidantes (AGBOYIBOR et al., 2018). Estes pigmentos podem ser obtidos de origem sintética ou natural. Porém, a tendência global em direção à produção de pigmentos usando substâncias naturais nos últimos anos, bem como o aumento da percepção dos consumidores de que os corantes naturais são mais seguros e com menos efeitos nocivos, compele os fabricantes de alimentos a usarem pigmentos naturais em suas preparações (SEYEDIN et al., 2015; COSTA; VENDRUSCOLO, 2017; OLIVEIRA et al., 2019). Os corantes naturais não são apenas benéficos para a saúde dos seres humanos, mas aumentam a preservação da biodiversidade, isto porque reduzem a liberação de substâncias químicas prejudiciais ao meio ambiente (AGBOYIBOR et al., 2018).

Desta forma, o uso de pigmentos naturais produzidos por microrganismos, também chamados de biopigmentos, destaca-se como uma alternativa de interesse para a indústria de alimentos (COSTA; VENDRUSCOLO, 2017). Os microrganismos tornaram-se uma fonte substancial para a produção de pigmentos devido à alta velocidade de crescimento, meio de cultura de baixo custo e maior facilidade de extração (SEYEDIN et al., 2015; COSTA; VENDRUSCOLO, 2017). Alguns fungos produzem pigmentos como metabólitos secundários, que é o caso dos pigmentos naturais produzidos por *Monascus purpureus* e *Monascus ruber*, *Blakeslea trispora*, *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. (LONG et al., 2019).

Neste estudo, destaque é dado ao uso de *Monascus* sp para a produção de pigmento vermelho. Os pigmentos *Monascus* sp. compreendem uma mistura de compostos e são classificados como pigmentos amarelos, laranjas e vermelhos (LONG et al., 2019).

Visando compreender a importância e inovação do uso de *Monascus* na produção de biopigmentos, a Tabela 1 apresenta a base de dados do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) para patentes que abordam esse tema.

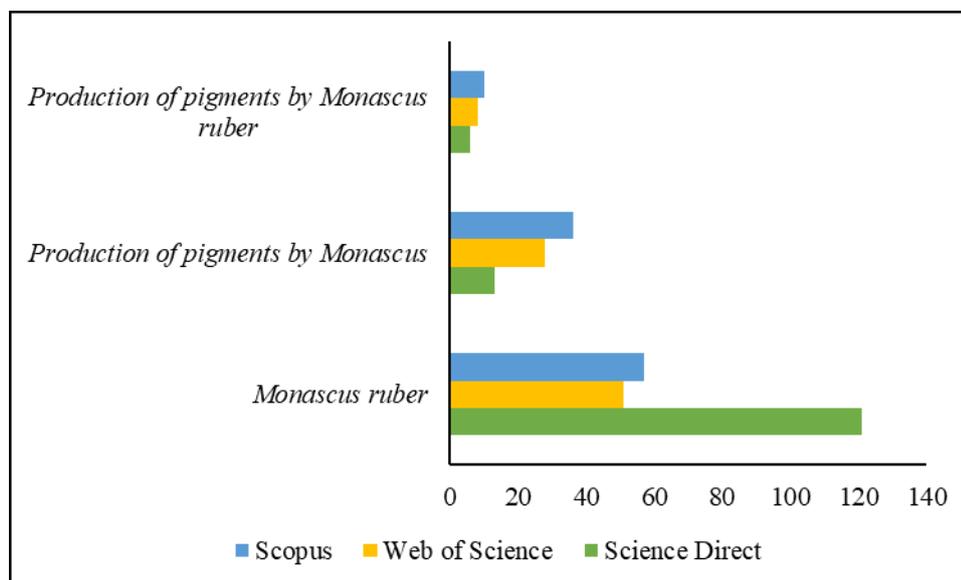
Tabela 1 - Patentes que abordam o título ‘*Monascus*’ (INPI, 2020).

Ano	Número	País	Depositante	Espécie	Substrato	Patente
2003	PI 0206001-9 A8	Brasil	USP	<i>Monascus</i> sp.	Raiz de mandioca	Processo de produção de pigmentos por <i>Monascus</i> sp. em fermentação semi-sólida. Produção de corante vermelho com o fungo <i>Monascus</i> <i>purpureus</i> em fermentação submersa.
2011	PI 1000262-6 A2	Brasil	Carlos A. Coelho de Souza Neto	<i>Monascus</i> <i>purpureus</i>	Amiláceo	Uso de <i>Monascus</i> na produção de ácido orgânico. Processo para a produção de ácido poliláctico usando <i>Monascus</i> .
2016	EP2011068971	França	Raffinage Marketing	<i>Monascus</i> <i>ruber</i>	Glicose ou xilose	
2016	EP2011068969	Bélgica	Research & Technology Felury			

Ainda na busca pela relevância do estudo em produção de pigmentos por *Monascus*, as bases de dados *Science Direct*, *Scopus* e *Web of Science* foram consultadas referente aos trabalhos publicados nos últimos 10 anos (Figura 1). Vale ressaltar que o número de publicações acerca deste tema pode ser menor uma vez que não foi feito a análise de duplicidade das publicações. As palavras-chave para a busca incluíram também: *technical analysis of*

*Monascus*, *process simulation Monascus* e *Monascus conceptual*, no entanto, não foi encontrado relato desses títulos na literatura.

Figura 1 - Publicações com os temas *Monascus ruber*, produção de pigmentos por *Monascus ruber* e Produção de pigmentos por *Monascus* sp. entre 2010 e 2020 (AUTORA, 2020).



Os países orientais apresentam maior número de pesquisas quando o assunto é *Monascus ruber*, uma vez que esse fungo foi usado originalmente na China, Tailândia, Coreia, Japão e sudeste asiático, para a preparação de *angkak*, um arroz de cor vermelho escura, que confere cor à outros produtos como alimentos, conservador cárneo ou até uso medicinal (MEINICKE, 2008; LIU et al., 2020a). Espécies de *Monascus* também são tradicionalmente usadas para produzir corantes alimentares, alimentos fermentados, bebidas alcoólicas, arroz, salsichas, carne e vegetais (OLIVEIRA et al., 2019). Os pigmentos naturais de *Monascus* sp. possuem propriedades tais como, segurança (quando comparados aos pigmentos sintéticos – que são derivados de petroquímicos e apresentam características mutagênicas e cancerígenas), fácil produção, boa solubilidade e podem substituir pigmentos sintéticos usados na indústria alimentícia. Além disso, atividades antitumoral, antimicrobiana, anti-inflamatória e antidiabética dos pigmentos *Monascus* também foram relatadas (NING et al., 2017).

Estima-se que a produção anual de corantes produzidos por *Monascus* seja maior que três milhões de toneladas e, que mais de um bilhão de pessoas consumam produtos fermentados por *Monascus* diariamente (YANG et al., 2015). Desde a década de 80, grandes marcas, tais como, Nestlé®, Quaker Oat Company®, Shell®, Yaegaki Bioindustry Inc. et Riken Vitamine Co Ltda® e Luzhou Chemical vêm produzindo corantes a partir de *Monascus* (MORITZ, 2005).

A fim de aumentar a a produção para escala industrial se faz necessário projetar a instalação e execução do bioprocesso e para isso executa-se o projeto conceitual (BENAVIDES et al., 2020). O projeto conceitual é visto como a mais importante fase do processo de projeto, pois decisões ali tomadas terão grande influência nas fases seguintes do processo de projeto e, além disso, o projeto conceitual é uma atividade voltada para a elaboração de uma concepção para um produto onde permite uma melhor compreensão física e otimização do processo (FERREIRA, 1997; MILLER; BLOCK, 2020).

A objeção do aumento de escala é a escolha dos critérios, isto é: quais parâmetros e condições devem ser mantidos constantes, quais devem variar e como devemos variá-los, para reproduzir em grande escala processos realizados em laboratório (PRADO, 2009).

A expansão de processos industriais exige tempo e investimentos no desenvolvimento de equipamentos, processos e produtos. Pensando nisso, existem inúmeras vantagens de se utilizar *softwares* de simulação para o desenvolvimento de novos processos. Simular um processo, proporciona resultados mais significativos para a análise das possíveis tecnologias, comparação entre as demais alternativas de processos, assim como uma diminuição no tempo de desenvolvimento do processo e o estudo das interações existentes entre as correntes de entrada e saída dos equipamentos (PRADO, 2009; ALBARELLI, 2013).

Então, o uso de ferramentas de engenharia, como os simuladores de processos, pode propor melhores caminhos a serem seguidos por novas instalações industriais. Dentre os simuladores de processos comerciais o SuperPro Designer<sup>®</sup> se destaca devido à sua facilidade de uso e à qualidade do banco de dados. Este *software* possui um conjunto de aparatos capazes de estimar parâmetros econômicos e de processo, realizar balanços de massa e energia, determinar o tamanho de equipamentos, entre outros cálculos para processos integrados (PRADO, 2009; ALBARELLI, 2013).

Neste contexto, o presente estudo visou a utilização de dados cinéticos obtidos da literatura para a construção de um projeto conceitual para a produção de corante vermelho a partir de *Monascus ruber* utilizando farelo de arroz como substrato. Além disso, as operações unitárias e equipamentos usados para a produção biotecnológica foram especificados.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver um projeto conceitual em escala piloto visando o processo de produção de pigmento vermelho natural obtido pelo processo fermentativo do farelo de arroz a partir do fungo filamentoso *Monascus ruber* com base em resultados obtidos da literatura para escala de bancada.

#### 2.1.1 Objetivos específicos

Para que o objetivo geral fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- Levantar dados cinéticos da produção de pigmento vermelho por *M. ruber* na literatura;
- Especificar equipamentos e utilidades para o desenvolvimento do processo;
- Realizar o balanço de massa do sistema;
- Avaliar dois cenários para a recuperação de pigmento vermelho por *M. ruber* por meio de análise *in silico*: i) secagem do produto final da fermentação (fungo + pigmento + substrato residual) por *spray dryer* e ii) separação e purificação do pigmento vermelho.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 PIGMENTOS NATURAIS *versus* PIGMENTOS SINTÉTICOS

A coloração é a primeira qualidade sensorial pelo qual os alimentos são julgados, pois influencia diretamente no sabor, na aceitabilidade, na qualidade e, conseqüentemente, na preferência dos consumidores. A indústria alimentícia utiliza os pigmentos na forma de corantes para restituir a aparência original, tornar o alimento visualmente mais atraente, conferir coloração aos desprovidos de cor e reforçar as cores presentes nos alimentos (PRADO, GODOY, 2003; CONSTANT, STRINGHETA, SANDI, 2002; WIBOWO et al., 2015).

Há duas classes distintas de corantes, os sintéticos e os naturais, os quais estão disponíveis para uso em alimentos, cosméticos e medicamentos. A utilização de corantes em alimentos e bebidas é regida pela resolução CNNPA nº 44 de 1977 a qual define corante como a substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimentos e bebidas (ANVISA, 2020). Mas, muitas vezes os termos pigmentos e corantes são usados incorretamente como sinônimos. Os pigmentos são geralmente dispersos em veículos ou substratos para a aplicação e normalmente são insolúveis em meio ou substrato no qual eles estão incorporados. Já os corantes, que são solúveis, são substâncias orgânicas fortemente coloridos ou fluorescentes que conferem cor, a um substrato por absorção seletiva de luz (MORITZ, 2019). A diferença aparente entre pigmento e corante é apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Pigmento (1) e corante (2) (MORITZ, 2009)



Nos Estados Unidos, o número de pigmentos aprovados para uso em alimentos é de apenas doze corantes sintetizados quimicamente contra trinte e seis corantes naturais certificados pela *Food and Drug Administration* (FDA). As restrições por derivados

petroquímicos tendem a eliminar alguns corantes que são utilizados atualmente e, conseqüentemente, novas alternativas de corantes para uso em alimentos devem ser encontradas (FDA, 2020; MORITZ, 2005).

O mercado de corantes, no entanto, está em constante esforço para melhorar as propriedades técnicas e físicas de seu portfólio a fim de que as indústrias alimentícias consigam atender às demandas dos consumidores em qualidade e preço (DOWNHAM, A.; COLLINS, P.; 2001). O comércio global de corantes e pigmentos foi avaliado em US\$ 33,2 bilhões em 2019 e espera-se que atinja US\$ 37,49 bilhões até 2025, de acordo com *Grand View Research, Inc* (2020). A crescente demanda de corantes e pigmentos pelo consumidor indica que segmentos de plásticos, têxteis, alimentos e tintas atuem como um importante fator de crescimento para o mercado global nos próximos anos. Segundo *Research Nester* (2020), o mercado mundial de corantes naturais, foi estimado em 1,3 bilhão de dólares em 2016 e calcula-se que em 2023 seja de 2,1 bilhões de dólares, devido à procura por alimentos naturais e à rápida expansão do setor de alimentos e bebidas em todo o mundo.

Os pigmentos naturais apresentam um crescimento anual de 5 a 10 %, uma tendência promissora quando comparados ao mercado de sintéticos (3 a 5 % ao ano) (STRINGHETA, 2007). Esse direcionamento na procura por corantes naturais deve-se às propriedades funcionais atribuídas a esses pigmentos e, também, ao apelo mercadológico que estimula cada vez mais o desenvolvimento de novos estudos com o intuito de superar as limitações tecnológicas existentes. Os líderes internacionais de corantes naturais são CHr. Hansen (Dinamarca), Warner-Jenkinson Europe Ltda (Reino Unido), Kalsec Inc. (EUA) e Quest International (Países Baixos) (CONSTANT, STRINGHETA e SANDI, 2002; MEINICK, 2008).

Durante séculos as fontes naturais como, animais, vegetais e minerais eram as principais fornecedoras dos corantes, como o corante azul índigo, da planta *Indigofera tinctoria* e *Isatis tinctoria*, um dos mais antigos e importante na indústria têxtil. Utilizada para tingir roupas e como tinta para escrever, a brasilina, corante vermelho extraído da árvore pau-brasil (*Cesalpinia echinata*) foi um dos primeiros produtos de valor exportado pelo Brasil nos primeiros anos de colonização (MEINICKE, 2008; SCHIOZER, BARATA, 2007).

Muito usado nos processamentos alimentícios, os sintéticos continuam sendo os corantes mais utilizados pelas indústrias quando comparados com os naturais, uma vez que os naturais apresentam um custo de produção maior e são menos estáveis quando expostos à luz, ar, mudanças de pH e calor. Porém, o seguimento de pigmentos naturais vem crescendo nos últimos anos devido à percepção dos consumidores aos benefícios de certos compostos naturais, as mudanças sociais e aos avanços tecnológicos. Contudo, a substituição de compostos

sintéticos por naturais ainda é discreta, já que a indústria de alimentos enfrenta dificuldades principalmente, nas condições de processamento e armazenamento dos alimentos devido à instabilidade dos pigmentos naturais quando comparados os sintéticos (SCHIOZER, BARATA, 2007; MEINICKE, 2008; SOUZA, 2012).

Os pigmentos naturais com aplicação nos alimentos, são agrupados pela forma que os grupos funcionais estão dispostos nas moléculas, sendo estes (MORITZ, 2005):

- a) Porfirinas;
- b) Betalaínas;
- c) Flavonóides
  - Antocianinas (azul e vermelho)
  - Antoxantinas (cores nos tons amarelos)
  - Leucoantocianidinas (incolores)
- d) Carotenóides;
- e) Taninos;
- f) Outros pigmentos (quinonas – ácido carmínico, polifenóis, *Monascus* - *Monascin*, etc.).

Uma maneira promissora de obtenção de pigmentos via fonte biotecnológica, denominados biopigmentos, e são obtidos por meio do cultivo de algas unicelulares e/ou fungos (MORITZ, 2005; BÜHLER, 2013). Sabe-se que algumas classes de fungos produzem pigmentos solúveis em água e com os avanços da biologia sintética, os pigmentos poderão ser produzidos em quantidades suficientes para uso industrial a um custo baixo, aumentando sua aplicabilidade (VENIL, ZAKARIA, AHMAD, 2013; MAPARI et al., 2005).

A produção de pigmentos naturais por via biotecnológica é favorável frente aos pigmentos naturais obtidos de fontes convencionais (vegetais e animais), uma vez que não estão sujeitos à sazonalidade, podem ser produzidos ininterruptamente em condições controladas e com rendimentos previsíveis e otimizáveis (SILVA, 2013). Alguns fungos do gênero *Monascus* podem sintetizar metabólitos secundários, que abrangem pelo menos seis pigmentos: dois laranjas (rubropunctatina e monascorubrina), dois amarelos (monascina e ankaflavina) e dois vermelhos (rubropunctamina e monascorubramina) (AGBOYIBOR et al., 2018; COSTA, VENDRUSCOLO, 2017; BÜHLER, 2013) e sua produção será avaliada com maior profundidade nos capítulos subseqüentes deste trabalho.

### 3.2 OBTENÇÃO DE PIGMENTOS VIA PROCESSO BIOTECNOLÓGICO

Produzir corantes naturais por meio de processos biotecnológicos utilizando microrganismos é uma alternativa para atender os consumidores e o mercado mundial, principalmente na indústria de alimentos (MAPARI, 2005; SAINI; PABBI; SHUKLA, 2018) e de cosméticos.

O processo biotecnológico, envolve microrganismos, especialmente bactérias, fungos e leveduras, pelo qual os substratos são convertidos em produtos de valor agregado, como enzimas, ácidos orgânicos, álcoois e polímeros (BHOWMIK; PATIL, 2018). Os pigmentos oriundos de bioprocessos apresentam vantagem produtiva em relação aos seus similares extraídos de vegetais ou animais uma vez que os processos de produção podem ser operados em modo contínuo e apresentar rápido crescimento celular (RANGELYAGUI et al., 2004; SILVA, 2008).

A produção de biopigmentos envolve o cultivo de microrganismos (bactérias, fungos, microalgas) e etapas posteriores para recuperação, extração e purificação do produto principal (SILVA, 2008) quando necessário.

A maioria dos processos biotecnológicos industriais possui duas cadeias principais de processo, *upstream* e *downstream*. As operações de *upstream* envolvem os processos de tratamento de insumos para a fermentação, além do próprio cultivo dos microrganismos para sintetizar o produto de interesse. Já o *downstream* é relativo aos processos de extração e purificação do produto (GULDEN; RIEDELE; KOPF; NIRSCHL, 2020).

Há duas vias para se produzir pigmentos, a primeira por fermentação em estado sólido (FES) e, a segunda, por fermentação submersa (FSm). Aspectos, como a composição do meio de cultura (fontes de carbono e nitrogênio), disponibilidade de oxigênio, luz, pH e temperatura interferem no crescimento celular e, conseqüentemente, na produção de pigmentos (COSTA; VENDRUSCOLO, 2017). A escolha do fermentador (biorreator) e a influência da velocidade de agitação na produtividade de biopigmentos, necessitam de atenção especial, já que os biorreatores devem atender às necessidades específicas de cada microrganismo. A aeração é realizada principalmente para suprir oxigênio aos microrganismos aeróbicos, mas também favorece a agitação do meio. A agitação do meio de cultivo e a força mecânica dos impelidores causa a ruptura das bolhas de ar, diminuindo seu tamanho e aumentando a área interfacial, de modo que favorece a transferência de oxigênio para a fase líquida e, conseqüentemente, às células (SALMON et al., 2016). Ainda de acordo com Salmon et al. (2016), o biorreator agitado mecanicamente é muito utilizado em processos biotecnológicos, como cultivos aeróbicos para a produção de produtos de interesse. Em um cultivo microbiano,

as condições de fornecidas pelo biorreator precisam atender às necessidades específicas dos microrganismos para que se obtenha alta produtividade dos compostos desejados. A biotecnologia microbiana no setor de processamento de alimentos visa a seleção e aprimoramento de microrganismos com o objetivo de melhorar o controle, rendimento e eficiência do processo, bem como a qualidade, segurança, e consistência de produtos bioprocessados (BHOWMIK; PATIL, 2018).

Os fungos filamentosos são capazes de produzir uma variedade de pigmentos que englobam diversas classes químicas, como os já citados carotenoides, melaninas, flavinas, entre outros. Dentre a gama de fungos existentes na natureza, se destacam os fungos ascomicetos como, por exemplo, *Monascus* (DUFOSSÉ, 2018; MAPARI, 2005). Além de serem utilizados para produzir produtos fermentados, *Monascus*, pode sintetizar metabólitos secundários, como pigmentos vermelho e amarelo. Visto a estabilidade ao calor e ao pH durante o ciclo de processamento dos alimentos e por ser uma matéria-prima de fácil acesso, os fungos são uma rota alternativa de produção de corantes naturais (MAPARI, 2005; AGBOYIBOR et al., 2018).

### 3.3 PRODUÇÃO DE PIGMENTOS POR FUNGOS DO GÊNERO *Monascus* sp.

O fungo filamentoso *Monascus* pertence à família *Monascaceae*, classe *Ascomycetes* e filo *Ascomycota*, sendo dividido em sete espécies: *M. ruber*, *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. floridans*, *M. pallens*, *M. sanguineus* e *M. mucoroides*. Seu habitat foi registrado em solo, material vegetal, conteúdo de rúmen de herbívoros, rejeitos industriais, dentre outros (PAN; HSU, 2014; MELO, 2015). Segundo Carvalho (2004), os fungos deste gênero são incapazes de se desenvolver em meio estritamente anaeróbico usando glicose como substrato, mas podem crescer em condições de limitação de oxigênio. Nestas condições, há menor produção de pigmento, enquanto que, em condição de maior aeração, a produção de pigmento é favorecida. Além disso, *Monascus* apresenta uma faixa de temperatura ótima de 28 °C a 32 °C. O crescimento e a produção de pigmentos são observados em uma ampla faixa de pH, de 2,5 a 8,0, com intervalo ideal entre 4,0 e 7,0.

O fungo *Monascus* se reproduz de forma assexuada formando conídeos e por via sexuada com a formação de esporos (ascósporos). Os esporos, em contato com um substrato adequado e em condições ideais de temperatura, umidade, pH e luminosidade, se desenvolvem gerando um ou mais tubos germinativos (MORITZ, 2005; OLIVEIRA, 2017). O crescimento destes tubos forma as hifas, e o conjunto de hifas chama-se micélio. O micélio vegetativo, aquele que está em contato com o substrato, tem sua função envolvida principalmente com a nutrição do fungo, já o micélio reprodutor é responsável pela produção de esporos nas mais

variadas formas e apresenta alterações morfológicas de acordo com o fungo e a fase de reprodução considerada, e essa diversificação morfológica é que permite a identificação e classificação dos fungos. As células de *Monascus* são tipicamente constituídas por uma parede tubular de quitina e  $\beta$ -glicanos e são divididas por septos que dão estabilidade às hifas, já que evitam a possibilidade de perda de citoplasma no caso de haver algum dano ou ruptura da membrana celular (MORITZ, 2005; BÜHLER, 2013).

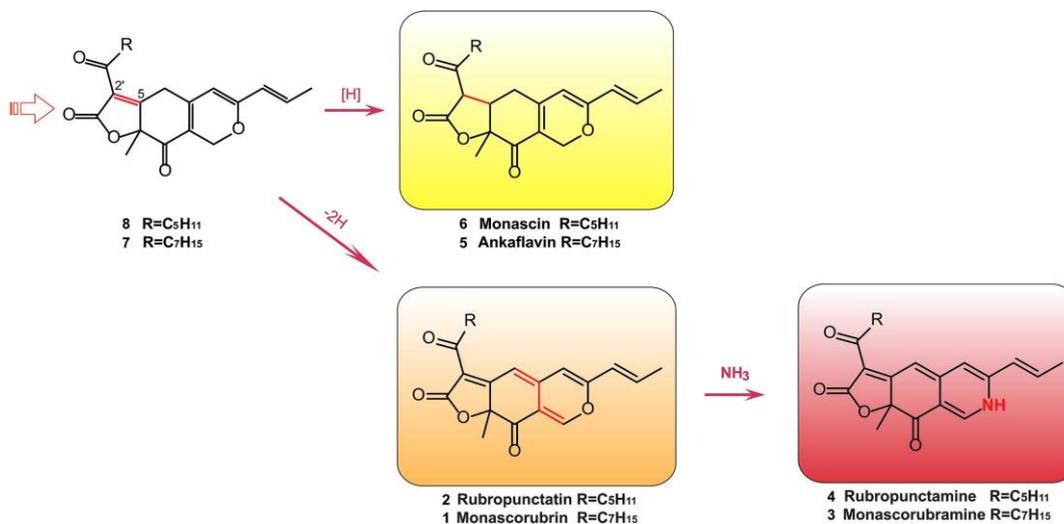
Espécies de *Monascus* são usadas na produção de corantes alimentares, alimentos fermentados, bebidas alcoólicas, carne e vegetais em países como China, Taiwan, Tailândia, Japão, Indonésia e Filipinas sendo as espécies de maior significância para a indústria alimentícia: *M. ruber*, *M. purpureus* e *M. pilosus* (Tabela 2). A maioria dos substratos para o cultivo de *Monascus* são ricos em carboidratos e proteínas e, de acordo com sua origem, nota-se a presença de substratos originários da Ásia, principalmente China. A característica mais importante destas três espécies é a habilidade de produzir metabólitos secundários com estrutura policetídica, principalmente pigmentos e, *M. ruber* se destaca como um bom produtor de pigmento rubropunctamina e monascorubramina. Mostrando que menores concentrações de substrato favorecem maiores quantidades de pigmento vermelho (OLIVEIRA, 2017).

Os pigmentos obtidos do fungo *Monascus* formam um grupo de metabólitos fúngicos secundários chamados azafilonas, que possuem estruturas moleculares e propriedades químicas semelhantes. A relação química entre os seis pigmentos clássicos de *Monascus* é apresentada na Figura 3. Ankaflavina e monascina são pigmentos amarelos, monascorubrina e rubropunctatina são laranja e monascorubramina e rubropunctamina são vermelhos. Os intermediários (7) e (8) na Figura 3 são os últimos compostos a seres formados na via biossintética. Em um ramo da via, a ankaflavina (5) e a monascina (6) são produzidas pela redução das ligações duplas C5 (2') dos compostos 7 e 8. O outro ramo produz os pigmentos laranja monascorubrina (1) e rubropunctatina (2), restaurando as ligações duplas C6 (7) de 7 e 8. Posteriormente, a aminação de 1 e 2 leva à monascorubramina (3) e à rubropunctamina (4) (JIA et al., 2019).

É sabido que vários derivados de pigmentos com propriedades funcionais na faixa de cores vermelho-alaranjado a vermelho-violeta podem ser produzidos por fermentações de *Monascus* na presença de diferentes aminoácidos, porém, a produção da micotoxina citrinina juntamente com os pigmentos vermelhos produzidos durante os cultivos em meio sólido ou submerso limita o uso de *Monascus* como produtor de corantes naturais de alimentos (MAPARI, 2005; COSTA, VENDRUSCOLO, 2017).

Tabela 2 - Classificação e origem do gênero *Monascus* sp. (DUFOSSÉ et al., 2005).

Origem	Espécies
tofu	<i>M. purpureus</i>
tofu	<i>M. purpureus</i>
anka	<i>M. purpureus</i>
anka	<i>M. purpureus</i>
farelo mofado	<i>M. purpureus</i>
koji vermelho	<i>M. ruber</i>
farelo mofado	<i>M. ruber</i>
anka	<i>M. purpureus</i>
anka	<i>M. purpureus</i>
plantar	<i>ruber</i>
farelo mofado	<i>M. pilosus</i>
farelo mofado	<i>M. pilosus</i>
anka	<i>M. purpureus</i>
plantar	<i>M. ruber</i>
anka	<i>M. purpureus</i>
farelo mofado	<i>M. pilosus</i>
tofu	<i>M. pilosus</i>
tofu	<i>M. ruber</i>

Figura 3 - Relação biossintética entre seis pigmentos clássicos de *Monascus* (JIA et al., 2019)

Estudos sobre a toxicidade de frações purificadas dos pigmentos mostraram que há atividade biológica para os pigmentos de *Monascus*. Algumas ações podem evitar ou minorar a produção de micotoxinas: o controle da fonte de nitrogênio (fontes de nitrogênio orgânico favorecem a produção de pigmentos vermelhos e desfavorecem a produção de citrinina); o controle das condições de cultivo (aeração, pH, fermentação sólida ou submersa); a extração em condições de baixa solubilidade de citrinina, o que pode ser feito controlando-se o pH, já que a citrinina apresenta caráter fortemente ácido (CARVALHO, 2004) e, ainda, a seleção ou modificação de linhagens para evitar a produção desta micotoxina. Ainda não há limites máximos toleráveis estabelecidos por nenhum órgão de legislação para citrinina em alimentos. Entre outras razões seria pela pequena disponibilidade de método analítico, levantamento de ocorrência e sua instabilidade nos gêneros alimentícios (HACKBART et al., 2012).

Na literatura é possível encontrar alguns estudos abordando a produção de pigmentos a partir de *Monascus* com uso de diversos substratos, como visto na Tabela 3. No entanto, o uso de pigmentos a partir de *Monascus* como aditivo intencional de cor não está previsto pela legislação vigente nos EUA, EU e Brasil. Porém, há uma série de patentes registradas nos últimos anos no Japão, Estados Unidos, França e Alemanha relatando a obtenção e uso de *Monascus* como pigmento alimentar (SILVEIRA et al., 2008).

Tabela 3 - Condição de cultura e meio utilizado para produção de pigmento (AUTORA, 2020)

<b>Microrganismo</b>	<b>Condições</b>	<b>Substrato/concentração inicial (g/L)</b>	<b>Rendimento</b>	<b>Referência</b>
<i>M. ruber</i> CCT 3802	30 °C 7 a 10 dias	Lactose / 20 g/L	3,08 UA <sub>510</sub>	(COSTA; VENDRUSCOLO, 2017)
<i>M. ruber</i> CCT 3802	30° C 7 a 10 dias	Glicose / 20 g/L	7,32 UA <sub>510</sub>	(COSTA; VENDRUSCOLO, 2017)
<i>M. ruber</i> CCT 3802	30 °C 7 dias	Glicerol / 40 g/L	7,38 UA <sub>480</sub>	(MEINICKE et al., 2008)
<i>M. purpureus</i> NRRL1992	25 °C 9 dias	Resíduo de uva / 50 g/L	5 UA <sub>480</sub>	(SILVEIRA et al., 2008)
<i>M. purpureus</i> KACC 42430	30 °C 7 dias	Sabugo de milho	25,42 UA <sub>500</sub> .gds <sup>-1</sup> *	(VELMURUGAN et al., 2011)

<i>M. purpureus</i> LPB 97	30 °C 7 dias	Sementes de Jaca	12,113 UA <sub>500</sub> .gds <sup>-1</sup> *	(BABITHA et al., 2007)
<i>M. purpureus</i> M 2018600	30 °C 7 dias	Hidrolisado de palha de arroz	8,61 UA	(LIU et al., 2020b)
<i>M. purpureus</i> ATCC 16365	5 dias	Resíduos de processamento de laranja	0,58 UA <sub>470</sub>	(KANTIFEDAKI et al., 2018)
<i>M. ruber</i> IOC 2225	30° 7 dias.	Hidrolisado de bagaço de cana / 20 g/L de glicose, 12,5 g/L de xilose, 1,38 g/L de arabinose e 10 g/L de celobiose.	18,71 UA <sub>490</sub>	(HILARES et al., 2018)

\*grama de substrato seco.

Com a capacidade de metabolizar celulose, amido, maltose, frutose e glicose, *M. ruber* produz pigmentos vermelhos para serem usados nas indústrias de alimentos, cosméticos e medicamentos. *M. ruber* ganha destaque uma vez que suas colônias crescem rápido em relação as demais espécies estudadas até o momento (BÜHLER, 2013).

### 3.1.1 *Monascus ruber*

Fungo ascomiceto filamentosos não patogênico, *M. ruber* tem sido usado para produzir alimentos fermentados, corantes de alimentos e remédios, principalmente no continente asiático (BONARDI; GRATTERI; NOCENTINI, 2019).

Suas colônias apresentam um crescimento relativamente rápido em meio BDA (Batata, Dextrose, Ágar) à temperatura ambiente. Ainda, as colônias apresentam formas levemente rugosas, circulares, flocosas, de coloração púrpura e de coloração reversa também púrpura, mas com maior intensidade. Como visto na Figura 4, as colônias são planas, com textura superficial flocosa e, o micélio de cor vermelho pardo (que nos primeiros dias apresenta coloração branca). Passados sete dias, as colônias apresentam um diâmetro de 20 a 30mm em BDA (MORITZ, 2005; SOUZA JUNIOR, 2018).

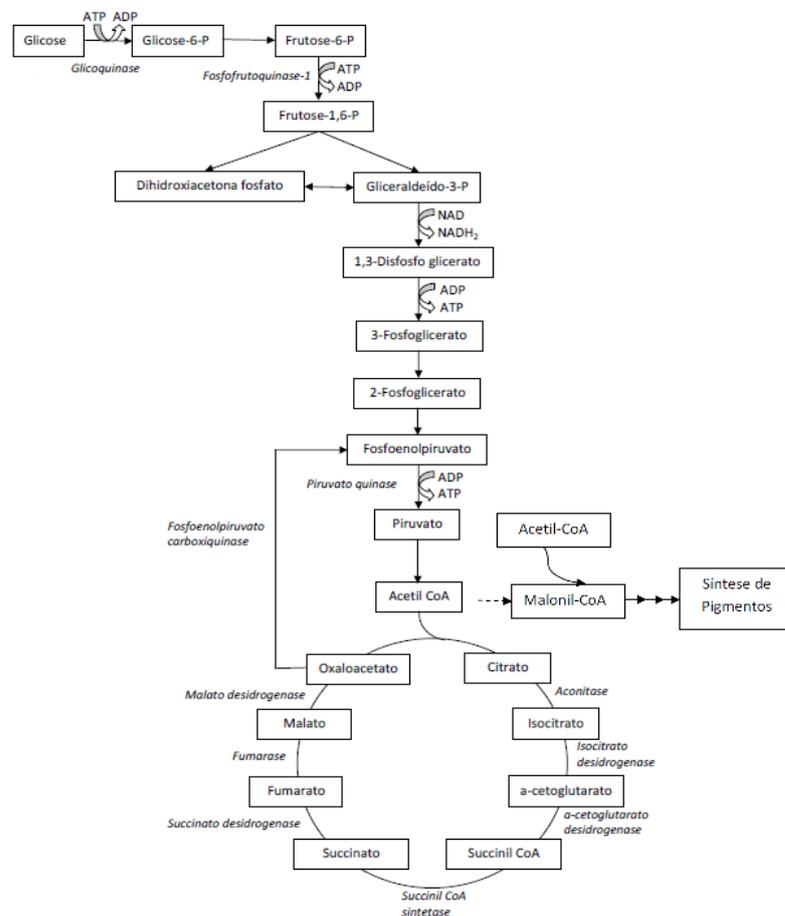
*Monascus ruber* se difere de *M. pilosus* pela coloração mais amarronzada das colônias e pela formação de conídios em cadeia na fase assexuada e distingue-se de *M. purpureus* pelo comprimento dos ascósporos, mais curtos (MELO, 2015).

Figura 4 - Macromorfologia do *Monascus ruber* em BDA (SOUZA JUNIOR, 2018)



Os principais metabólitos produzidos pelo *M. ruber* são os policetídeos, formados pela condensação de uma molécula de acetil Coenzima A com uma ou mais moléculas de malonil Coenzima A que como mostra a Figura 5, a partir do substrato glicose, pigmentos alimentares podem ser formados (DUFOSSE et al., 2005; MORITZ, 2005).

Figura 5 - Via metabólica de *M. ruber* para formação de pigmentos de glicose (Adaptado de Bühler, 2013).



Segundo o estudo de Moritz (2005), a produção de pigmento vermelho em quantidades expressivas ocorre em meios contendo glicose, maltose, frutose e amido de arroz. Em seus resultados utilizando farelo de arroz parboilizado na produção de pigmentos vermelhos por *M. ruber*, encontrou 0,802 UA<sub>480</sub> partindo de 3 g.L<sup>-1</sup> de substrato, o qual obteve um resultado insatisfatório. A autora então adicionou glicose ao meio de cultivo e conseguiu 5,46 UA<sub>480</sub> de pigmento com uma produtividade de 0,0758 UA<sub>480</sub>.h<sup>-1</sup> (Moritz, 2005).

Meinicke (2008) utilizou glicerol (concentração inicial de 40 g.L<sup>-1</sup>), resíduo da produção de biodiesel, como fonte de carbono para a produção de pigmento *Monascus* e observou a produção de 7,38 UA<sub>480</sub> de pigmento vermelho com uma produtividade de 0,058 UA<sub>480</sub>.h<sup>-1</sup>.

Bühler (2013) encontrou 7,03 UA<sub>510</sub> de máxima produção de pigmento vermelho usando glicerina bruta na concentração inicial de 20 g.L<sup>-1</sup>, e obteve uma produtividade de 0,117 UA<sub>510</sub>.h<sup>-1</sup>. A autora testou também o uso de glicose (concentração inicial de 20 g.L<sup>-1</sup>) e atingiu 0,211 UA<sub>510</sub>.h<sup>-1</sup> com 11,82 UA<sub>510</sub> de pigmentos vermelhos a partir de *M. ruber*.

Oliveira (2017), partindo de uma concentração 10 g.L<sup>-1</sup> e 20 g.L<sup>-1</sup> de xarope de maltose, obteve-se em seus resultados 14,54 e 12,47 UA, respectivamente.

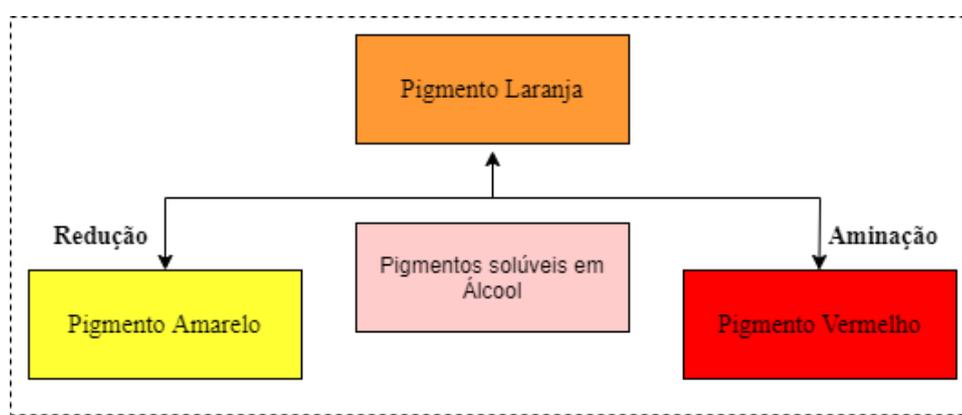
Utilizando meio de cultivo contendo sacarose como fonte de carbono, Hamano e Kilikian (2006), não obtiveram resultado satisfatório para produção de pigmento. No meio contendo sacarose (10 g.L<sup>-1</sup>) e licor de maceração de milho (5 g.L<sup>-1</sup>), a máxima produção de pigmento foi 4,6 UA com uma produtividade de 0,05 UA.h<sup>-1</sup>, enquanto que no meio em que foi utilizado glicose (10 g.L<sup>-1</sup>) e licor (5 g.L<sup>-1</sup>) obteve-se 14,7 UA e 0,09 UA.h<sup>-1</sup>. Com isso, relata-se que o licor de maceração de milho é uma fonte adequada de nitrogênio e sais para a produção de pigmento vermelho por *M. ruber*, substituindo assim vários sais e extrato de levedura em paralelo com o uso de glicose como fonte de carbono.

Em outro trabalho encontrado na literatura com o uso de *M. ruber* na produção de pigmento vermelho, Silva (2019) testou os seguintes meios de cultivo: farinha de arroz, melaço de cana-de-açúcar e a mistura de farinha arroz com melaço de cana-de-açúcar. Dentre esses três meios, a maior produção de pigmento foi no meio contendo farinha de arroz + melaço com 16,38 UA<sub>510</sub>, fato que pode ser explicado por o melaço ser rico em nutrientes, potencializando o crescimento celular.

Como o pigmento vermelho provido do *M. ruber* é hidrossolúvel, por conseguinte, é também solúvel no meio de cultivo com níveis de água superiores a 95 %. Para que a produção de pigmento vermelho via cultivo submerso seja economicamente atrativa se deve atingir concentrações elevadas deste produto, devido aos custos das operações de *downstream*. Porém,

vale ressaltar que os pigmentos produzidos por espécies *Monascus*, são intracelulares, entretanto, podem reagir com grupamentos amina de proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos e amino açúcares formando complexos de pigmentos extracelulares solúveis em água. Ou seja, os pigmentos vermelhos são eventualmente excretados no meio de cultivo quando reagem com o grupo  $\text{NH}_2$  dos aminoácidos, como é visto na Figura 6 (MORITZ, 2005; VENDRUSCOLO, 2009).

Figura 6 - Via biossintética de pigmentos por *Monascus* sp (Adaptado de AGBOYIBOR et.al, 2018).



### 3.3.1.1 Substratos para a produção de pigmento vermelho por *M. ruber*: ênfase para o uso de resíduos da produção de arroz

O uso de subprodutos da indústria como meio de cultura em processos de fermentação de produtos de valor agregado, se mostra eficaz em termos de custo e redução da poluição ambiental, uma vez que os componentes do meio podem representar de 38 a 73 % do custo total de produção (VIDYALAKSHMI et al., 2009).

Resíduos agroindustriais como o farelo de trigo, farelo de arroz, feno, melação de cana-de-açúcar, resíduos de frutas e vegetais, bagaços, entre outros, são exemplos de substratos que podem ser utilizados para a produção de metabólitos microbianos de uma maneira barata e que pode ser aplicado a produtos alimentícios. Neste contexto, destaca-se o uso subprodutos do arroz como substrato na produção de pigmentos a partir do fungo *M. ruber* (PANESAR; KAUR; PANESAR, 2015).

O arroz é um dos cereais mais produzidos e consumidos no mundo, caracterizando-se como principal alimento para mais da metade da população mundial. Sua importância é destacada principalmente em países em desenvolvimento, como o Brasil, desempenhando papel estratégico em níveis econômico e social. Após o processo de beneficiamento, pode-se obter o

arroz branco polido clássico, que consiste na retirada da casca (cerca de 22 %) e do farelo (cerca de 10 %). (SINDARROZ-SC, 2007).

O arroz polido representa cerca de 75 % do arroz consumido, tanto no Brasil como no mundo. O farelo de arroz, se destaca como importante subproduto do polimento do arroz descascado para produzir arroz branco sendo usualmente utilizado como alimento animal (EMBRAPA, 2004; SINDARROZ-SC, 2007).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2020) a produção nacional de arroz para safra 2019/2020 será de 10,5 milhões de toneladas tendo sua maior concentração na Região Sul, responsável por mais de 80 % da oferta nacional. Em 2019, foram beneficiados no Brasil 7,48 milhões de toneladas de arroz.

O estado de Santa Catarina é o segundo maior produtor nacional do grão e uma safra de 1,1 milhão de toneladas é prevista para 2020 (Secretaria de Agricultura e Pesca de Santa Catarina, 2019).

Considerando que 75 % do arroz seja beneficiado, e tenha aproximadamente 10 % de farelo como subproduto, a quantidade de farelo de arroz resultante da produção catarinense é de cerca de 82,5 mil toneladas por ano.

De acordo com Moritz (2005) o subproduto do processamento do arroz (farelo) é abundante em amido, proteínas, sais minerais e vitaminas (principalmente do complexo B) e é altamente solúvel, portanto, apresenta-se como uma alternativa interessante em cultivo submerso para a produção de pigmento a partir de *Monascus*.

Para Vidyalakshmi et al. (2009) a utilização de carboidratos de arroz por *M. ruber* na produção de pigmento, resultou em um aumento no teor de proteína do arroz fermentado vermelho, aumentando de 12 % no substrato bruto para 17,16 % após fermentado. Enquanto que, quando milho e permeado de leite foram usados como substrato, o teor de proteína foi 10 % e 12 %, respectivamente.

Sá (2005) analisou a produção de pigmento vermelho a partir de meios de cultura contendo amido de arroz e farelo de arroz como substratos. A maior concentração de pigmento e biomassa foi encontrado no meio contendo amido de arroz e glutamato monossódico como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente, em torno de 4,98 UA<sub>480</sub> e 5,24 g.L<sup>-1</sup>. Alcançando uma produtividade máxima de células de 0,053 g.(L.h)<sup>-1</sup> e de pigmento de 0,0514 UA<sub>480</sub>.h<sup>-1</sup>.

### 3.4 SIMULAÇÃO DE PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE PIGMENTO

A modelagem matemática de processos fermentativos pode ser definida como a tentativa de representar, através de equações matemáticas, os balanços de massa para cada componente do biorreator associados às complexas transformações bioquímicas que ocorrem nos processos e às velocidades com que estas reações se processam (BUENO, 2006).

A combinação do balanço de massa com as equações cinéticas das reações bioquímicas constitui uma descrição matemática adequada do processo fermentativo, no qual o modelo cinético pode ser utilizado para simular, até certo ponto, como as variáveis de saída podem ser influenciadas pelo o conjunto de variáveis de entrada (MORAIS, 2019).

Ainda de acordo com Morais (2019), para analisar o comportamento de um processo químico, ferramentas computacionais podem ser usadas, como é o caso do *software* SuperPro Designer® (Intelligen). Neste programa, o processo fermentativo conduzido em um biorreator pode ser avaliado, analisando o comportamento dinâmico de variáveis como concentração de produto, biomassa e substrato. No projeto e operação de plantas industriais, são utilizados modelos matemáticos e *softwares* computacionais para se ter um controle e previsão do processo, ou seja, simulação de vários cenários de comportamento dentro dos sistemas.

Para iniciar uma simulação de um determinado bioprocessos é necessário: obter, a partir de experimentos práticos, dados relacionados à cinética microbiana e ajustar adequadamente um modelo matemático aos valores gerados; definir o regime de condução do processo; determinar a capacidade produtiva do sistema simulado; identificar as entradas e saídas do processo; definir e projetar a estrutura geral das operações de separação, se necessário; definir como o preparo do inóculo se dará nesta nova escala de produção, além de projetar o biorreator principal. Este último item é muito importante pois corresponde a produção de biomassa microbiana do processo (FORTUNATO, 2012).

Mabrouki et al. (2015), utilizando o *software* SuperPro Designer®, realizaram a simulação e modelagem da produção de biocombustíveis via pirólise rápida de resíduos de óleo de palma, de forma a analisar os três diferentes resíduos e a otimização do processo. Verificaram que os diferentes resíduos de óleo de palma apresentaram rendimentos coerentes com os já encontrados na literatura, sendo assim, o modelo desenvolvido foi útil para a otimização da pirólise rápida sem realizar investigações experimentais longas.

Rakicka-Pustułka et al. (2020), usaram o *software* a fim simular o aumento da produção de eritritol a partir do glicerol usando a cepa de levedura *Y. lipolytica*. Modelaram uma instalação industrial para produção e constataram que o aumento da escala não afetou

negativamente os parâmetros de biossíntese de eritritol, bem como a produtividade e o rendimento atingiram uma taxa mais alta e muito satisfatória mostrando que a cepa de levedura de *Y. lipolytica* é um ponto de partida para o desenvolvimento de um modelo de produção na indústria.

Oliveira et al. (2020), determinaram os custos de produção do fungo *Metarhizium anisopliae* via fermentação em estado sólido e estudaram a otimização do processo desde a recepção da matéria prima até a distribuição do produto, estimando o processo em uma escala de produção maior.

O *software* de simulação de processos SuperPro Designer® vem sendo amplamente utilizado por cientistas e diversas companhias do mundo como a Bayer Technology Services, Monsanto, Petrobras, Pfizer, entre outros (INTELLIGEN INC., 2020).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de produção de pigmento vermelho foi elaborado com base nos dados cinéticos, operações unitárias e matérias-primas obtidos a partir de dados da literatura. Para isso, foi fundamental a simulação do processo completo, desde a produção de inóculo necessário para o cultivo celular até as etapas de *downstream*. Foram utilizados o *software* SuperPro Designer versão 10.0 (Intelligen, Inc) e planilhas eletrônicas em Excel (Microsoft) para determinação dos balanços de massa.

### 4.1 MICRORGANISMO, SUBSTRATO, MODO DE OPERAÇÃO E DADOS CINÉTICOS DE UM PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PIGMENTO POR *M. RUBER*.

Os dados referentes ao cultivo do microrganismo foram extraídos do estudo de Costa e Franciolo (2017). O microrganismo selecionado para o escalonamento da produção de pigmento e construção do projeto conceitual foi o *M. ruber* CCT 3802, utilizando farelo de arroz como fonte de carbono.

Os cultivos, tanto nos experimentos nos quais este estudo se baseia quanto na simulação realizada, foram operados em modo batelada, ou seja, iniciou-se a operação com o tanque em sua capacidade máxima contendo o microrganismo e os nutrientes necessários ao crescimento celular. O volume de reação dos cultivos experimentais foi de 176 mL já na simulação proposta, o cultivo principal foi simulado em um biorreator com 1.000 litros.

A Tabela 4 apresenta os parâmetros cinéticos do cultivo de *M. ruber* obtidos no trabalho de Costa e Vendruscolo (2017) considerando 17,04 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 5 g.L<sup>-1</sup> de glutamato monossódico como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente.

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos e condições do cultivo contendo glicose como substrato

Temperatura de cultivo	30 °C
pH	6,5
Fatores de conversão	
Substrato em células ( $Y_{X/S}$ )	0,34 g <sub>cél.</sub> .g <sub>subs.</sub> <sup>-1</sup>
Substrato em produto ( $Y_{P/S}$ )	0,27 UA <sub>510</sub> .L.g <sup>-1</sup>
Células em produto ( $Y_{P/X}$ )	0,96 UA <sub>510</sub> .L.g <sup>-1</sup>
Velocidade específica máxima de crescimento	0,042 h <sup>-1</sup>
Produtividade média de células	0,048 g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup>
Concentração final de biomassa	20 g.L <sup>-1</sup>
Tempo de cultivo	60 h

## 4.2 CENÁRIOS AVALIADOS

Dois cenários diferentes foram elaborados de modo a representar caminhos para produção de pigmento vermelho a partir de farelo de arroz. Em ambos cenários, a formação de pigmento vermelho se deu em um biorreator agitado e aerado (volume = 1000 L), seguindo para a etapa de resfriamento do caldo fermentado contendo fungo e pigmento. Após resfriado (temperatura de resfriamento = 15°C), o caldo seguiu para secagem em secador do tipo *spray dryer*, obtendo o produto final (cenário 1) ou, para separação por centrifugação e posterior extração do pigmento e filtração, obtendo o produto final (cenário 2).

Em ambos os cenários as etapas de cultivo do fungo foram idênticas, diferenciando apenas nas operações de *downstream*. As figuras 7 e 8, representam os fluxogramas do processo de produção de pigmento vermelho. Nestas figuras é possível observar que inicialmente foi estabelecida uma etapa de preparado dos nutrientes, na sequência dois inóculos foram realizados para se atingir a concentração inicial de células no biorreator principal de acordo com o estabelecido por Costa e Vendruscolo (2017). Em seguida, as células de *Monascus* foram transferidas para o biorreator principal em que ocorreu a produção de pigmento e, para o cenário 1 todo o caldo produzido contendo fungo+produtos+farelo de arroz residual foi resfriado a 15°C e, na sequência, submetido a secagem por *spray dryer* (Figura 7). Para o cenário 2 (Figura 8) as etapas até o resfriamento foram similares, no entanto, se avaliou a separação do pigmento vermelho produzido por meio da retirada das células e farelo de arroz residual por centrifugação. Na sequência, o caldo foi submetido a extração do pigmento vermelho produzido.

Foram obtidos como produto final dos processos modelados, pigmentos naturais vermelhos em pó (cenário 1) e na forma líquida (cenário 2).

Figura 7 - Fluxograma da produção de pigmento, cenário 1 (AUTORA, 2020)

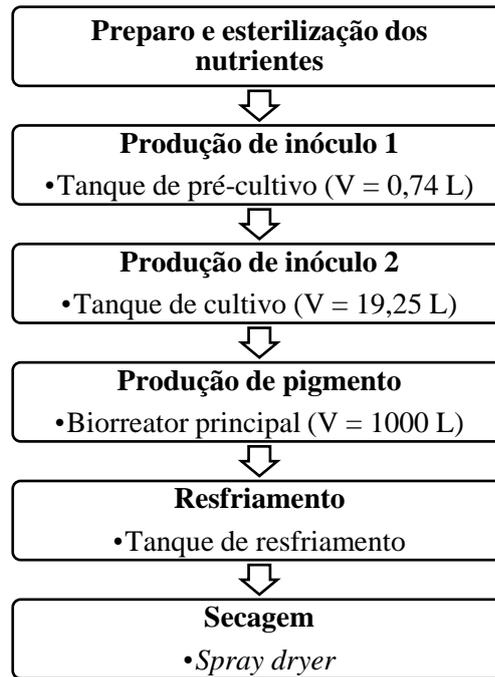
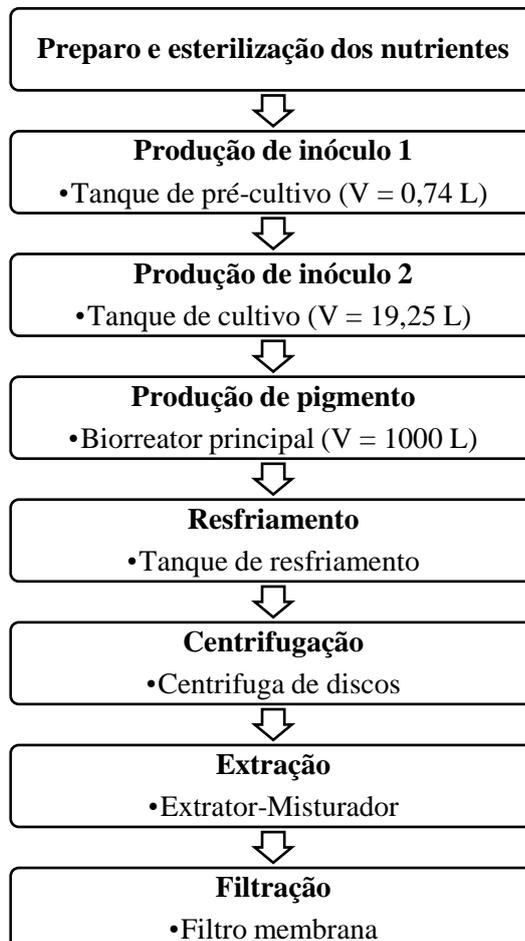


Figura 8 - Fluxograma da produção de pigmento, cenário 2 (AUTORA, 2020)



As principais características dos equipamentos projetados para os cenários avaliados no processo estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1 - Características e parâmetros dos equipamentos e processos de produção de pigmento vermelho (AUTORA, 2020)

<b>Etapas</b>	<b>Cenário 1</b>	<b>Cenário 2</b>
Produção de inóculo 1 (Tanque de pré-cultivo)	Produção do inóculo por 77,5 h, a 30 °C e 1 atm atingindo uma concentração celular final de 20 g.L <sup>-1</sup> . Em ambos os cenários, a produção de inóculo se difere um pouco do estudo realizado por Costa e Vendruscolo (2017). A diferença esteve na fonte de nitrogênio (5,92 g/L), no tempo de cultivo (77,5 h) e na concentração final de biomassa (19,96 g/L), baseado nos fatores de conversão encontrados pelos autores.	
Produção de inóculo 2 (Tanque de cultivo)	Produção do inóculo por 77,5 h, a 30 °C e 1 atm atingindo uma concentração celular final de 20g.L <sup>-1</sup> .	
Produção de pigmento (Biorreator principal)	Produção de pigmento natural vermelho, por 96 h, 30 °C e 1 atm.	
Resfriamento	Resfriamento do caldo fermentado até 15 °C, por 5 min	
Secagem	Secagem a 152 °C, até atingir um produto em pó com 1 % de umidade em base seca.	N/A*
Centrifugação	N/A*	Separação da biomassa e sobrenadante com 84% de umidade em base seca, por 2,5 horas.
Extração	N/A*	Lavagem da biomassa com álcool etílico 95 °GL durante 45 minutos. Com um rendimento operacional de 1291 L.h <sup>-1</sup> .
Filtração	N/A*	Filtração em membrana com fluxo de 0,3 m <sup>3</sup> .(m <sup>2</sup> .h) <sup>-1</sup> . Sobrenadante com 86% de umidade em base seca, por 240 minutos.

\*N/A = não se aplica

#### 4.3 PRODUÇÃO DE INÓCULO

De acordo com Costa e Vendrusculo (2017), a concentração de biomassa inicial no biorreator principal é de 0,77 g.L<sup>-1</sup>, então para alimentar o biorreator principal e atingir a concentração de biomassa inicial desejada, duas linhas de produção de inóculo (1 e 2) foram

simuladas no presente estudo, conforme citado anteriormente. O dimensionamento da capacidade dos reatores anteriores ao principal, foi baseado na premissa de se ter uma concentração celular final de  $20 \text{ g.L}^{-1}$ , em cada um dos tanques, para que quando transferido para o reator principal de 1.000 litros, resultasse em uma concentração celular de  $0,77 \text{ g.L}^{-1}$ , como mostrado abaixo:

I) Tanque de pré-cultivo na produção de inóculo 1:

$$V = \frac{38,5 \text{ L} * 0,77 \text{ g.L}^{-1}}{20 \text{ g.L}^{-1}} \rightarrow V = \frac{1,48 \text{ L}}{2} \rightarrow V = 0,74 \text{ L}$$

II) Tanque de cultivo na produção de inóculo 2:

$$V = \frac{(1000 \text{ L} * 0,77 \text{ g.L}^{-1})}{20 \text{ g.L}^{-1}} \rightarrow V = \frac{38,5 \text{ L}}{2} \rightarrow V = 19,25 \text{ L}$$

Para a alimentação do biorreator principal, duas linhas de produção de inóculo foram modeladas, visando uma maior produção de biomassa. Neste sentido, para cada linha, obteve-se dois tanques: um deles contendo 0,74 L e o outro com 19,25 L, para as produções de inóculo 1 e 2, respectivamente. O conteúdo presente no tanque de 0,74 L alimenta o tanque de 19,25 L e, posteriormente, o fluxo mássico segue para o biorreator principal (1000L), onde é alimentado pelo tanque de 19,25 L. A capacidade volumétrica do biorreator principal foi baseada em uma capacidade razoável de uma escala piloto com base nos experimentos que este estudo se baseia, que neste estudo foi de 1000 L. Os insumos necessários para o crescimento da biomassa durante a produção de inóculo 1 e 2 foram determinados com base na capacidade produtiva e são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Insumos necessários para a produção de inóculo 1 e 2 (AUTORA, 2020)

	<b>Composto</b>	<b>Início do cultivo</b>
<b>Produção de inóculo 1</b>	Biomassa	0,57 g.batelada <sup>-1</sup>
	Glicose	44,14 g.batelada <sup>-1</sup>
	Glicina	4,38 g.batelada <sup>-1</sup>
	Água	695,00 g.batelada <sup>-1</sup>
<b>Produção de inóculo 2</b>	Glicose	1146,50 g.batelada <sup>-1</sup>
	Glicina	113,76 g.batelada <sup>-1</sup>
	Água	18000,00 g.batelada <sup>-1</sup>

Os dados apresentados acima, descrevem cada linha de produção, ou seja, alimentação de cada tanque (reator).

#### 4.4 BIORREATOR PRINCIPAL

A simulação do biorreator principal foi projetada para o uso de um biorreator encamisado agitado e aerado produzido em aço inoxidável, equipado com dois agitadores contendo seis pás planas e posicionados no mesmo eixo. O biorreator projetado continha ainda quatro chicanas diametralmente opostas.

No biorreator principal, foi considerado um tempo adicional de 5 % do tempo de cultivo para limpeza, carga e descarga do tanque. Foram consideradas os seguintes dados para a simulação: operação de 24 h por dia, 330 dias por ano e 96 h.batelada<sup>-1</sup>, portanto com o tempo adicional de 5 % uma batelada teve a duração de 100,8 h e 78 bateladas foram executada em 1 ano por biorreator.

#### 4.5 TANQUE DE RESFRIAMENTO

A fim de resfriar e equalizar o caldo fermentado que sai do fermentador e reduzir os processos metabólitos celulares, foi simulada a utilização de um tanque encamisado com tempo de retenção de 5 min.

#### 4.6 DOWNSTREAM

Como visto anteriormente, dois cenários foram avaliados sob diferentes processos de *downstream* a fim de obter pigmento natural vermelho de diferentes formas e purezas. As operações do processo se diferenciam e a obtenção do produto é detalhada no Quadro 2.

Quadro 2 - Característica dos downstreams avaliados (AUTORA, 2020)

<b><i>Downstream</i></b>	<b>Processo</b>
Cenário 1	Biomassa, pigmento e substrato residual em um único produto foram secos por atomização em equipamento tipo <i>spray dryer</i> ;
Cenário 2	O caldo foi concentrado em uma centrífuga de discos. A biomassa foi descartada e o sobrenadante seguiu para o processo de extração com álcool etílico. E, por fim, o pigmento concentrado seguiu para microfiltração.

#### 4.6.1 Cenário 1

Todo o caldo fermentado contendo biomassa, pigmento vermelho e substrato residual foram secos com o uso de um secador tipo *spray dryer*. Foi simulado um processo contínuo, de uma única etapa, obtendo um produto em pó.

#### 4.6.2 Cenário 2

As seguintes operações unitárias que compõe o *downstream* do cenário 2:

Centrifugação: o caldo fermentado foi centrifugado em uma centrífuga de discos a fim de separar o meio de cultivo contendo pigmento das células.

Extração: ao sobrenadante foi adicionado de 6,04 kg álcool etílico na proporção de  $105 \text{ g}_{\text{células}} \cdot \text{L}_{\text{solvente}}^{-1}$  com o intuito de extrair os pigmentos (PAVAN, 2015).

Microfiltração: a solução de pigmento foi filtrada em membrana de fluxo transversal de polipropileno com tamanho de poro de  $0,22 \mu\text{m}$ , obtendo um produto concentrado de pigmento vermelho.

### 4.7 MODELAGEM E SIMULAÇÃO DO PROCESSO

#### 4.7.1 Modelagem do processo e balanço de massa

O estudo nesta simulação englobou as etapas: produção de inóculo, produção de pigmento (fermentação), resfriamento, centrifugação, extração, filtração e secagem do processo de produção de pigmento vermelho abordando duas vias de obtenção do produto. Como já citado anteriormente, foram determinadas as quantidades de utilidades e matérias-primas envolvidas em cada caso.

O consumo de matérias-primas e utilidades, bem como a produção de pigmento vermelho foi determinado considerando uma operação contínua da planta.

#### 4.7.2 Dados de entrada no simulador

Visto que o farelo de arroz é composto majoritariamente por amido, enzimas quebram as moléculas de amido convertendo-o em glicose. Logo, para simulação, foram alimentados os dados considerando a completa hidrólise do amido contido no farelo de arroz em glicose.

Nos cenários estudados, parte das correntes é composta por líquidos e sólidos (ex. farelo de arroz, água, biomassa). A Tabela 6 mostra a especificação dos componentes envolvidos no processo, apresentando os compostos químicos que foram utilizados.

Tabela 6 - Especificação dos componentes envolvidos no processo (AUTORA, 2020)

	<b>Componente</b>	<b>Fórmula química</b>
Correntes de entrada dos tanques de pré-cultivo, cultivo e biorreator.	Biomassa (PASTRANA E GOMA,1995)	$CH_{1,92}O_{0,63}N_{0,09}$
	Glicose	$C_6H_{12}O_6$
	Glicina	$C_2H_5NO_2$
	Água	$H_2O$
Gases de escape dos tanques de pré-cultivo, cultivo e biorreator.	Dióxido de carbono	$CO_2$
	Nitrogênio	$N_2$
	Oxigênio	$O_2$
Produto da fermentação	Pigmento vermelho (PATTANAGUL, 2007)	$C_{21}H_{23}NO_4$
Componente de extração	Álcool etílico	$C_2H_5OH$

A maioria dos componentes utilizados na simulação faz parte da base de dados do *software*. Apenas os componentes “biomassa” e “pigmento”, foram especificados no simulador segundo as propriedades disponíveis, como a fórmula química geral e massa molecular em Pastrana e Goma (1995) e Pattanagul 2007), respectivamente.

#### 4.7.2.1 Cultivo

Para modelagem do estudo, foi necessário converter a unidade expressa na quantidade de produto formado. Hajjaj et al. (2000) determinou que 1 unidade  $UA_{480}$  correspondente a  $15 \text{ mg.L}^{-1}$  de pigmento vermelho e, usa-se essa equivalência para conversão de medidas de absorvância em massa de pigmentos.

Na Tabela 7 são apresentados os parâmetros cinéticos obtidos a partir dos dados experimentais gerados por Costa e Vendruscolo (2017) ajustando o modelo cinético de Monod. Ressalta-se que no trabalho de Costa e Vendruscolo (2017) a glicose foi utilizada como fonte de carbono principal e, no presente estudo, se considerou farelo de arroz (resíduo do processamento de arroz) como fonte de substrato principal. Cabe ressaltar ainda que, a partir da hidrólise enzimática (enzimas alfa e beta amilases presentes em *M. ruber*) do amido contido no arroz se obtém glicose como fonte principal de carboidrato no cultivo.

Tabela 7 - Parâmetros cinéticos obtidos a partir do ajuste do Modelo Cinético de Monod aos dados experimentais obtidos por Costa e Vendruscolo (2017) (AUTORA, 2020).

Parâmetro	<i>M. ruber</i>	Pigmento
$K_s$ (mg.L <sup>-1</sup> )*	11.500,00	19.500,00
$\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> )**	0,0420	0,0014

\* $K_s$  = constante de Monod

\*\* $\mu_{\text{máx}}$  = velocidade específica máxima de crescimento

#### 4.7.2.2 Estequiometria

De acordo com Patrana e Goma (1994) a fórmula geral para células de *M. ruber* é  $\text{CH}_{1,92}\text{O}_{0,63}\text{N}_{0,09}$  e, Pattanagul (2007),  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{NO}_4$  descreve a fórmula química do pigmento vermelho.

Para estabelecer a equação estequiométrica da produção de biomassa (1) considerou-se o fator de conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ) obtido por Costa e Vendruscolo (2017) no balanço de elementos, afim de se ter mais uma equação. Com isso, realizou-se a inversão de matrizes dos componentes, encontrando os coeficientes estequiométricos da equação.

Onde:

$$Y_{\frac{x}{s}} = \frac{a * X}{b * S}$$

$a$  é coeficiente estequiométrico da biomassa

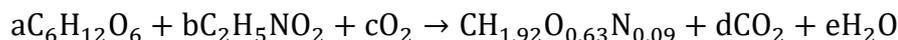
$b$  é coeficiente estequiométrico da glicose

$X$  é a massa molar da biomassa (g.mol<sup>-1</sup>)

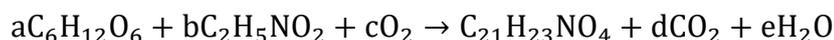
$S$  é a massa molar da glicose (g.mol<sup>-1</sup>)

Já, na equação para produção de pigmento (2), foi utilizado além das 4 equações de balanço de elementos (carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio) o balanço de carbono para molécula de pigmento e, na sequência, a inversão de matrizes dos componentes encontrando os coeficientes da equação.

(1)Produção de células



(2)Produção de pigmento vermelho



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de pigmento a partir do fungo *M. ruber* com aplicabilidade em alimentos, cosméticos e fármacos vem junto ao apelo dos consumidores por um uso de produtos mais naturais e com menos efeitos nocivos. Neste cenário, o uso da simulação auxilia no entendimento e análise da viabilidade técnica da produção de pigmentos naturais em escala piloto e/ou comercial.

A seguir são apresentados os dados da simulação da produção de pigmento *Monascus* a partir de farelo de arroz e glicina em escala piloto de 1.000 L e diferentes cenários de recuperação do produto final, conforme descrito em “Material e Métodos”.

### 5.1 ESTEQUIOMETRIA

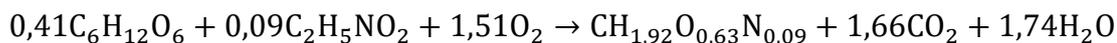
A Tabela 8 apresenta os coeficientes estequiométricos das equações de produção de biomassa e de produção de pigmento.

Tabela 8 - Coeficientes estequiométricos obtidos para a produção de células e produção de pigmento (AUTORA, 2020).

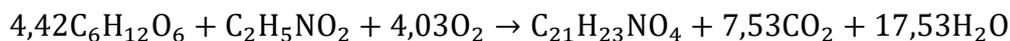
Reação Estequiométrica	Coefficientes	Valores
Biomassa	a	0,41
	b	0,09
	c	1,51
	d	1,66
	e	1,74
Pigmento	a	4,42
	b	1,00
	c	4,03
	d	7,53
	e	17,53

Para simulação da reação cinética de formação de pigmentos, os coeficientes estequiométricos foram determinados de uma reação simplificada de crescimento celular usando glicose como substrato e gerou as seguintes equações químicas para produção de células (3) e para produção de pigmento (4):

(3) Produção de células



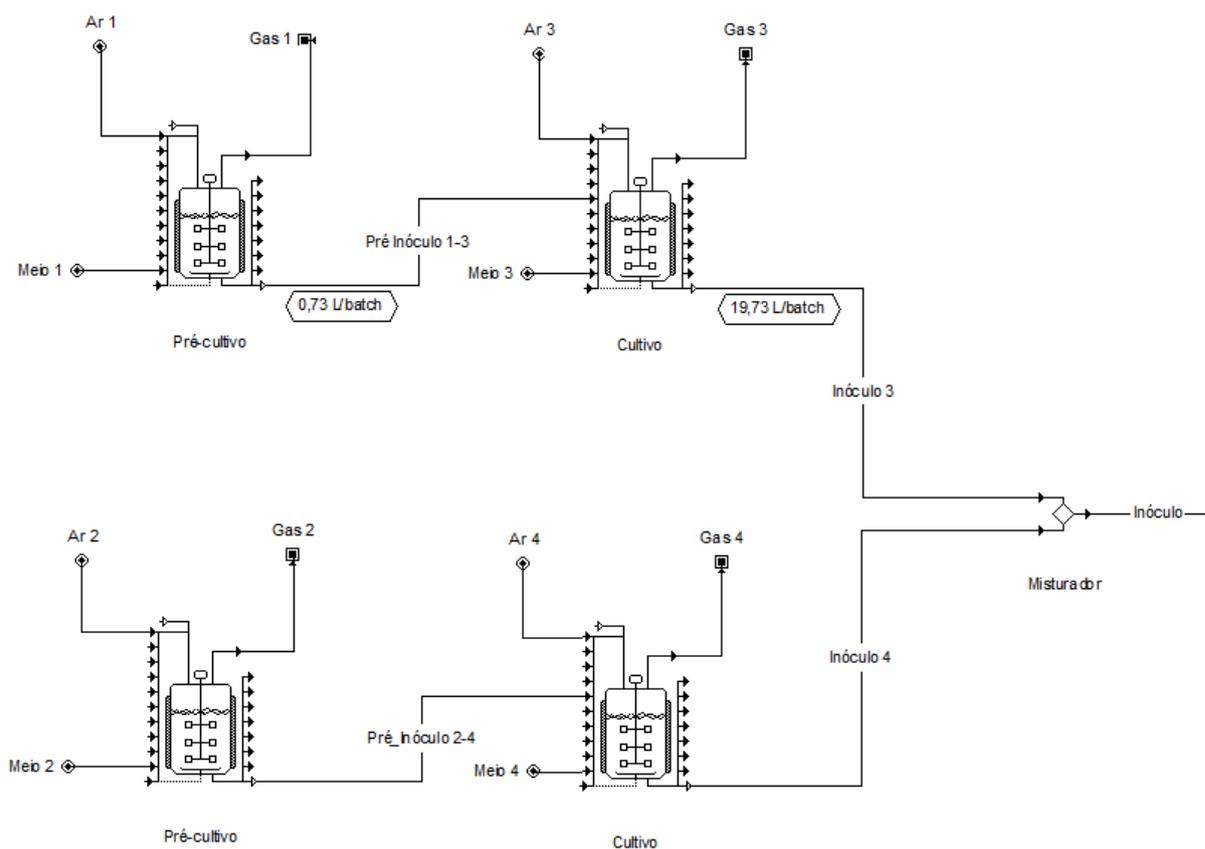
(4) Produção de pigmento vermelho



## 5.2 PRODUÇÃO DE INÓCULO

As linhas de produção de inóculo 1 e 2, bem como os tanques e as correntes do processo são apresentados na Figura 9.

Figura 9 - Linhas de produção de inóculo (AUTORA, 2020).

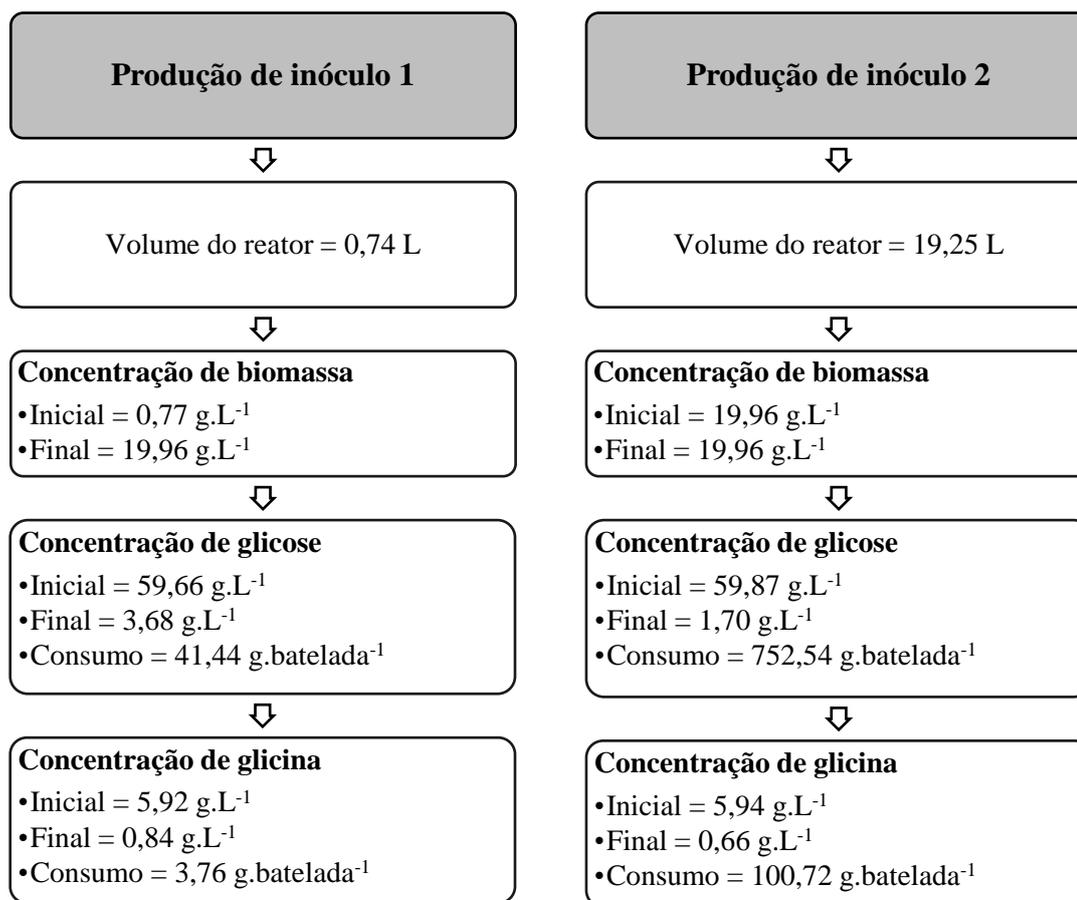


O crescimento do inóculo depende da quantidade de nutrientes empregados no processo e da capacidade do tanque de cultivo. O tanque de cultivo do inóculo 2, além de receber a corrente de inóculo 1, necessitou de uma adição de nutrientes a fim de suprir as necessidades do cultivo. Para atingir a concentração de biomassa final,  $20 \text{ g.L}^{-1}$ , foi anexado mais uma corrente ao tanque de cultivo com substrato e água a fim de evitar a redução da velocidade de crescimento celular. Uma vez que o crescimento da biomassa é dependente da disponibilidade dos nutrientes quando em condições de limitação do nutriente a velocidade

máxima de crescimento celular ( $\mu_{\text{máx}}$ ) reduz-se até cessar completamente o crescimento, em condições de exaustão do nutriente.

Os tanques de produção de inóculo 1 e 2 contém, de forma simplificada para esta simulação, apenas o meio de cultivo contendo substrato, biomassa e água, como é mostrado na Figura 10.

Figura 10 - Composição da produção de inóculo 1 e 2 (AUTORA, 2020)



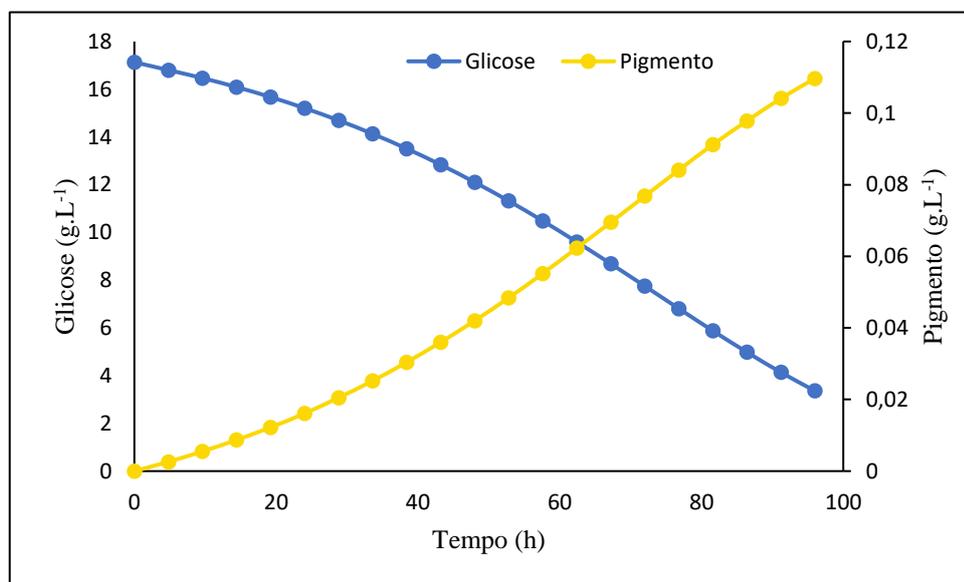
Os tanques de cultivo (produção de inóculo 1) alimentam os tanques de cultivo (produção de inóculo 2), que alimentam o biorreator principal. O caldo de cultivo chega ao biorreator com uma vazão volumétrica e mássica de 39,46 L.batelada<sup>-1</sup> e 39,25 kg. batelada<sup>-1</sup>, respectivamente. Vale ressaltar que para alimentar o biorreator principal foram consideradas 2 correntes (Figura 9) com o trem de inoculação “produção de inóculo 1 e 2” idênticas.

### 5.3 BIORREATOR

A produção de biopigmento vermelho ocorreu em um biorreator agitado e aerado com capacidade de 1000 L, em um processo operado em modo batelada com tempo total de

96 h e consumo de 991,93 kg de caldo fermentado. A Figura 11 mostra o consumo do substrato glicose e o início da formação de pigmento no decorrer do processo de produção.

Figura 11 - Consumo de substrato e formação de pigmento em 96 horas de processo (AUTORA, 2020).



Como mostrado na figura acima, a produção de pigmento vermelho respeitou a cinética de formação de produto. Os dados encontrados neste estudo, mostram que o consumo de substrato e a produção de pigmento vermelho pelo *M. ruber*, durante o processo de fermentação a 30 °C por 96 h, está em acordo com os resultados experimentais obtidos por Costa e Vendruscolo (2017).

O modelo cinético de Monod foi utilizado na simulação tanto para reação de formação de biomassa quanto para formação de pigmento. A constante de Monod ( $k_s$ ), que descreve a concentração do substrato limitante para a qual a velocidade específica de crescimento é metade da velocidade específica de crescimento máxima, foi implementada no *software* nos valores de: 11500,00 mg.L<sup>-1</sup> para reação de biomassa e 19500,00 mg.L<sup>-1</sup> para produção de pigmento, a fim de garantir resultados que corroboram com os dados da literatura nos quais este trabalho se baseou (COSTA; VENDRUSCOLO, 2017). Nesta análise, foi verificado que os valores de  $k_s$  foram elevados, isto pode ser devido a biomassa ser formada por um fungo filamentoso (*M. ruber*) de difícil quantificação.

A composição da corrente de entrada e saída do biorreator principal é apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 - Composição das correntes de entrada e saída do biorreator principal de 1000 L (AUTORA,2020).

	<b>Entrada</b> <b>(kg.batelada<sup>-1</sup>)</b>	<b>Saída</b> <b>(kg.batelada<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração</b> <b>na saída (g.L<sup>-1</sup>)</b>
Biomassa	0,79	5,38	5,39
Glicose	17,04	3,35	3,35
Glicina	2,15	0,92	0,92
Água	938,00	982,16	984,19
Pigmento	-	0,11	0,11
Transferido dos tanques de cultivo (biomassa, glicose, glicina e água)	39,24		
Corrente de saída do biorreator		991,93	

Para melhor avaliar o processo de produção de pigmento vermelho, a partir dos resultados de formação no biorreator principal, desenhou-se dois cenários de produção.

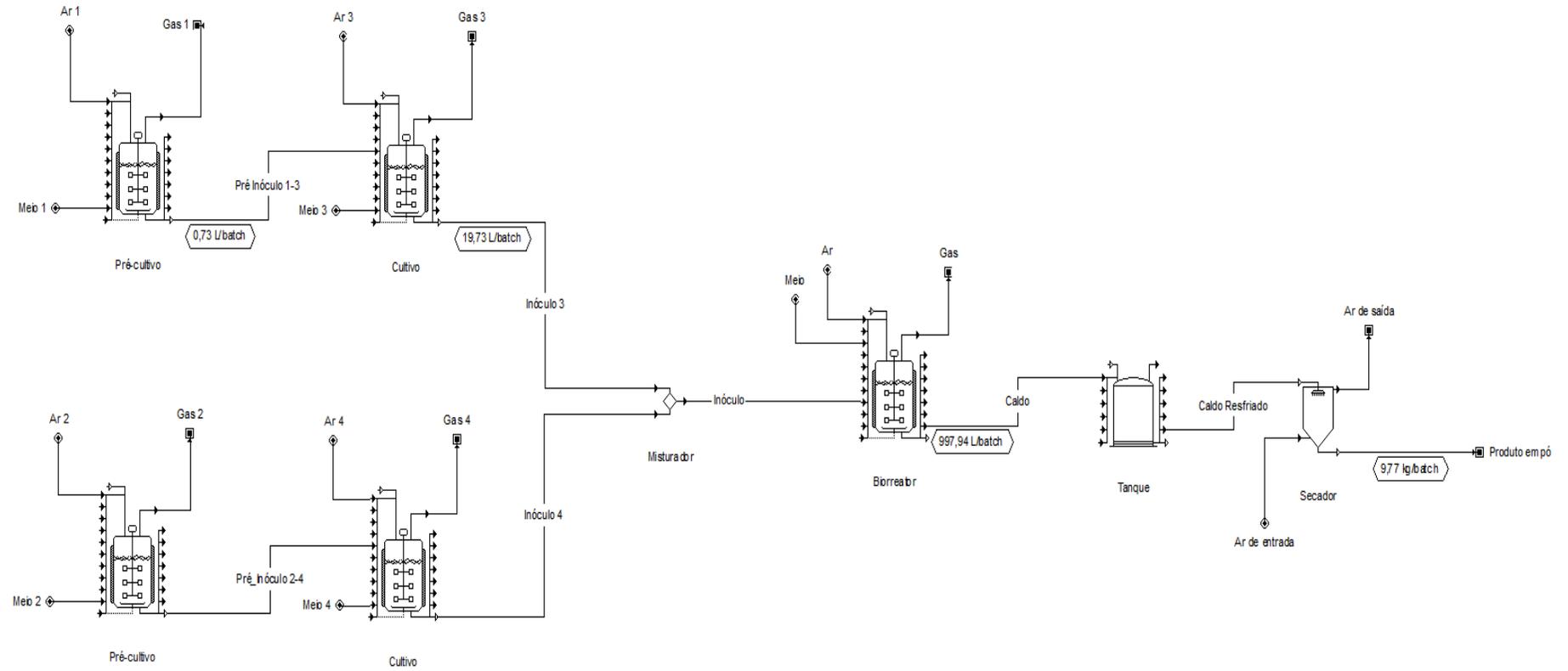
#### 5.4 CENÁRIO 1

Para o primeiro cenário de *downstream* utilizou-se apenas um secador tipo *spray dryer*. A Figura 12 mostra toda a linha de produção para o cenário 1 do processo produtivo de pigmento vermelho. Ao final da etapa de secagem e térmico no processo, obteve-se uma mistura em pó formada por pigmento vermelho, biomassa, glicose e glicina como é apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 - Dados de entrada e saída na operação de secagem no *spray dryer* (AUTORA, 2020).

<b>Componente</b>	<b>Dados de entrada</b>		<b>Resultados de saída</b>	
	<b>Massa</b> <b>(kg.batelada<sup>-1</sup>)</b>	<b>Massa</b> <b>(kg.batelada<sup>-1</sup>)</b>	<b>Massa</b> <b>(kg.batelada<sup>-1</sup>)</b>	<b>Fração Mássica (%)</b>
Biomassa	5,38	5,38	5,38	54,53
Glicose	3,35	3,35	3,32	33,97
Glicina	0,93	0,93	0,92	9,38
Pigmento	0,11	0,11	0,11	1,11
Água	982,16	982,16	0,09	1,01

Figura 12 - Fluxograma - *downstream 1* (AUTORA, 2020).



Ainda neste cenário, a Tabela 11 mostra o consumo das matérias primas para produção de pigmento vermelho.

Tabela 11 - Consumo de nutrientes para produção de pigmento para o cenário 1 (AUTORA, 2020).

Componente	Consumidos		
	(kg.batelada <sup>-1</sup> )	(kg.ano <sup>-1</sup> )	(kg.kg produto <sup>-1</sup> )
Glicose	16,10	1256,07	148,61
Glicina	1,47	114,63	13,56
Água	975,29	76072,76	9000,50

Uma batelada, neste primeiro cenário, resultou em uma produção de 9,77 kg de uma mistura em pó contendo o pigmento natural vermelho e fungo que, anualmente reflete numa produção de 762,06 kg. Destes 9,77 kg de produto em pó, 110 g são de pigmento, o que representa 1,11 % de rendimento.

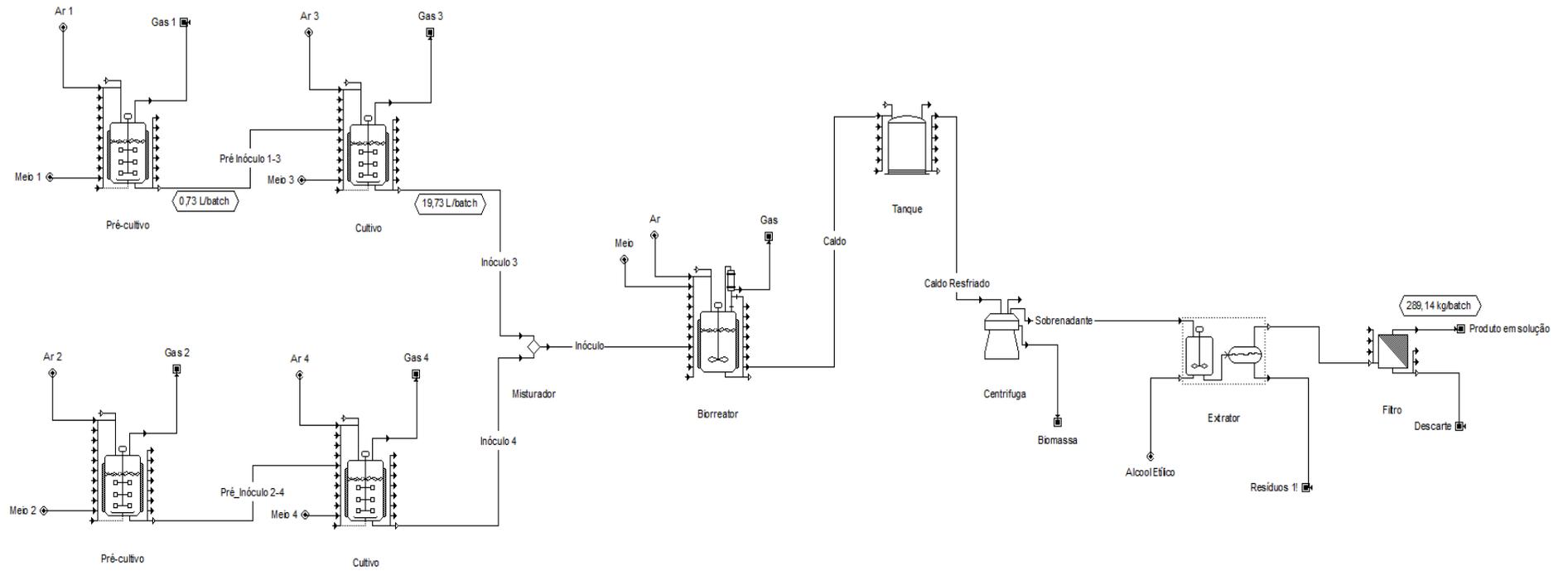
No entanto, não foram encontrados outros estudos na literatura com produção de pigmento vermelho em pó a partir de *Monascus* sp que possibilitasse a comparação deste resultado, dificultando a discussão sobre a viabilidade técnica este cenário. Porém, acredita-se que a formação deste produto apresentaria vantagens tais como: maior estabilidade e viabilidade do bioproduto.

Ainda assim, quando comparados os dados de formação de pigmento reportados por Liu et al. (2020b), utilizando *M. purpureus* em palha de arroz hidrolisada e fermentação submersa, foi verificado que a quantidade de pigmento vermelho formado em um mesmo tipo de substrato foi semelhante (129,15 g), mesmo não realizando o processo de secagem. Desta forma é possível verificar que o processo de secagem por meio de *spray dryer* mostrou-se eficaz uma vez que não houve perda significativa na massa de pigmento vermelho. Porém, mais estudos precisariam ser realizados para verificar se esta metodologia que emprega calor não comprometeria as propriedades terapêuticas e funcionais deste pigmento, bem como sua viabilidade econômica.

## 5.5 CENÁRIO 2

A Figura 13 mostra toda a linha de produção para o cenário 2 do processo produtivo de pigmento vermelho.

Figura 13 - Fluxograma – *downstream 2* (AUTORA, 2020)



No segundo cenário, visando a obtenção do pigmento vermelho mais concentrado fez-se o uso dos seguintes equipamentos após o cultivo: tanque encamisado, centrífuga de discos, extrator e filtro. Após a operação de centrifugação, o caldo seguiu para um extrator onde foi a biomassa foi solubilizada com álcool etílico e por fim, passou por um filtro para obtenção do pigmento vermelho em solução. A Tabela 12 apresenta o consumo das matérias primas para produção de pigmento vermelho no cenário 2.

Tabela 12 - Consumo de nutrientes para produção de pigmento para o cenário 2 (AUTORA, 2020).

Componente	Consumidos		
	(kg.batelada <sup>-1</sup> )	(kg.ano <sup>-1</sup> )	(kg.kg produto <sup>-1</sup> )
Glicose	18,58	1449,04	273,60
Glicina	2,15	167,94	31,71
Água	689,88	53.810,73	10.160,25

A Tabela 13, descreve os valores de entrada da etapa de centrifugação e as correntes de saída da centrifugação, extração e filtração, uma vez que, a corrente de saída de uma etapa é a corrente de entrada na próxima etapa.

Tabela 13 - Dados de entrada na centrífuga e os resultados de saída na operação de centrifugação, extração e filtração (AUTORA, 2020).

Componente	Dados de entrada	Resultados de saída		Resultados de saída		Resultados de saída	
		CENTRIFUGAÇÃO		EXTRAÇÃO		FILTRAÇÃO	
	Massa (kg.batelada <sup>-1</sup> )	Massa (kg.batelada <sup>-1</sup> )	Fração Mássica (%)	Massa (kg.batelada <sup>-1</sup> )	Fração Mássica (%)	Massa (kg.batelada <sup>-1</sup> )	Fração Mássica (%)
Biomassa	5,38	0,86	0,09	0,34	0,09	0,07	0,02
Glicose	3,35	2,81	0,29	1,12	0,29	0,84	0,29
Glicina	0,93	0,78	0,08	0,31	0,08	0,23	0,08
Pigmento	0,11	0,09	0,01	0,09	0,02	0,07	0,02
Água	982,16	952,39	99,53	380,95	98,89	285,50	98,75
Álcool etílico	-	-	-	2,42	0,63	2,41	0,83

Uma batelada, no cenário 2, resultou em uma produção de 289,14 kg de uma solução contendo o pigmento natural vermelho e, anualmente reflete numa produção de 22,55 toneladas. Destes 289,14 kg de solução, 70 g são de pigmento, o que representa 0,02 % de rendimento.

A adição do solvente álcool etílico foi de 6,04 kg por batelada, resultando em uma proporção de 53,37 kg de solvente por kg de pigmento vermelho. O fluxograma com todas as etapas do cenário 2 é visto na Figura 13.

Os resultados apresentados para este cenário corroboram com os encontrados experimentalmente por Silva (2019), que utilizou farinha de arroz como fonte de carbono e *M. ruber* como biomassa, obtendo 105 g de pigmento vermelho em 1000 L (7,06 UA<sub>510</sub>). As pequenas diferenças encontradas podem ser justificadas por etapas diferentes no processo.

Ainda, um outro estudo realizado por Silveira e colaboradores (2008) demonstrou que a produção de pigmento vermelho pelo *M. purpureus* a partir de resíduo de uva como substrato, teve rendimento de 75 g/1000 L (5 UA<sub>480</sub>). Estes dados estão em acordo com os obtidos neste presente estudo, mostrando que o farelo de arroz também pode ser utilizado como fonte de carbono para a produção do pigmento.

Como já citado, tanto no cenário 1 quanto no cenário 2, após o caldo sair do tanque de resfriamento (capacidade de 1.000 L), segue para diferentes operações unitárias. Como visto, no cenário 1 apenas uma operação foi realizada: a secagem. Já no segundo cenário, outras 3 operações foram realizadas. O Quadro 3 apresenta o tipo, a capacidade e as dimensões do equipamento bem como as vazões mássicas da corrente de interesse (onde contém maior quantidade de produto) da operação unitária.

Por fim, quando há comparação entre os dois cenários modelados neste estudo, verifica-se uma diferença no rendimento de pigmento vermelho e no número de operações unitárias (mais operações, maior gasto energético, maior custo). Isto se deve principalmente pelas diferenças existentes entre as técnicas de processo. No cenário 2, o qual tinha o objetivo de aumentar a pureza do produto, foram adicionadas operações unitárias tais como centrifugação, extração e filtração, que ao invés de concentrar o pigmento vermelho, acabaram por diminuir seu rendimento. Este fato deve-se, provavelmente porque parte do pigmento ficou retido intracelularmente, porém, não existem cálculos que permitem quantificar a concentração de pigmento retido na biomassa.

Quadro 3 - Equipamentos, capacidade, dimensões e vazões mássicas de cada operação unitária (AUTORA, 2020)

Cenário	Operação Unitária	Equipamento	Capacidade (L)	Dimensões (m)		Vazões Mássicas (kg.h <sup>-1</sup> )	
				Diâmetro	Altura	Entrada	Saída
1	Secagem	<i>Spray dryer</i>	102,13	10,00	1,05	10,31	0,10
2	Centrifugação	Centrífuga de discos	-	-	-	10,31	9,95
	Extração	Extrator	43 (mistura) 215 (assento)	-	-	9,95	4,00
	Filtração	Membrana	-	0,49	0,49	4,00	3,00

## 6 CONCLUSÃO

A produção de pigmentos *Monascus* sp. é uma importante alternativa na substituição de pigmentos sintéticos na indústria de alimentos, farmacêutica e de cosméticos. A partir dos resultados obtidos das simulações efetuadas no *software* SuperPro Designer<sup>®</sup> e, de acordo com as análises realizadas para o processo de produção de pigmento vermelho a partir de *Monascus ruber*, foi possível concluir que:

- Em escala piloto de 1000 L a produção de pigmento vermelho natural a partir de farelo de arroz e *M. ruber* foi satisfatório quando comparados a outros estudos na literatura;
- Por meio dos balanços de massas realizados, foi possível identificar as correntes de entrada e saída de cada operação unitária, visando obter os dados necessários de matéria-prima para a produção do pigmento vermelho nos dois diferentes cenários;
- Na realização do escalonamento de processos, modificações em relação ao proposto em escala de laboratório foram necessárias para adequar o processo à realidade industrial;
- Ainda, foi possível, através das simulações e das análises, comparar os dois cenários avaliados com relação operações unitárias propostas e equipamentos que acarretaram em concentrações diferentes de produto final (pigmento vermelho).
- Por fim, mais estudos devem ser realizados a fim de comprovar a viabilidade econômica este processo produtivo.

## REFERÊNCIAS

- AGBOYIBOR, C. et al. *Monascus* pigments production, composition, bioactivity and its application: A review. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 433-447, 2018.
- ALBARELLI, J. Q. **Produção de açúcar e etanol de primeira e segunda geração: simulação, integração energética e análise econômica**. 2013. 244 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.
- ANVISA (Brasil). **Resolução CNNPA nº 44, 01 de janeiro de 1977**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 01 jan 1977.
- ANVISA (Brasil). **Resolução RDC nº 259, 20 de setembro de 2002**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 20 set 2002.
- ANVISA (Brasil). **Decreto nº 55.871, 26 de março de 1965**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 26 mar 1965.
- AZEREDO, L. S; MARCELINO, L. B; PORRECA, P. P; SILVA, P.F; BASTOS, S. F; PEREIRA, W. L; DOMINGUES, S. J. S; FILHO, R. V. G. Corantes Naturais, v. 6, 2016. Disponível em: <http://revista.universo.edu.br/index.php?journal=1CAMPOSDOSGOYTACAZES2&page=article&op=viewFile&path%5B%5D=3453&path%5B%5D=2337>>. Acesso em 10 jan 2020.
- BABITHA, S.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. **Bioresource Technology**, [S.L.], v. 98, n. 8, p. 1554-1560, maio 2007
- BENAVIDES, L.S.; OVIEDO, R.J.; LÓPEZ, T.J.D.; MARTÍNEZ, M.A.; VÁSQUEZ, R.A.; HOYOS, S.R.; OROZCO, S.F. Bioprocess plant design and economic analysis of an environmentally friendly insect controller agent produced with *Azadirachta indica* cell culture. **Biochemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 159, p. 107579-107585, jul. 2020
- BOBBIO, P. A. e F. O. BOBBIO. Química do Processamento de alimentos. São Paulo: Livraria Varela Ltda. 1995. 151 p.
- BONARDI, Alessandro; GRATTEI, Paola; NOCENTINI, Alessio. Carbonic anhydrases from pathogens. **Carbonic Anhydrases**, [S.L.], p. 419-448, 2019
- BOYLES, C.; SOBECK, S. J. Schmidtke. Photostability of organic red food dyes. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 315, p.126249-126567, jun. 2020.
- BHOWMIK, Subrata N.; PATIL, Ramabhau T.. Application of Microbial Biotechnology in Food Processing. **Crop Improvement Through Microbial Biotechnology**, [S.L.], p. 73-106, 2018.
- BRASIL. **Ministério da Economia**. Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

BUENO, T. **Modelagem, simulação e controle de bioprocessos uma abordagem introdutória**. Curso de Engenharia de Bioprocessos e Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

BÜHLER, R. M. M. et al. Produção de pigmentos por *monascus ruber* utilizando co-produtos da produção do biodiesel. 2013.

CARVALHO, J.C. **Desenvolvimento de bioprocessos para produção de pigmento a partir de *monascus* por fermentação em substrato sólido**. 2004. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Universidade Federal do Paraná, 2004.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acomp. safra bras. grãos, v. 7 Safra 2019/20 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-104, janeiro 2020.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes Alimentícios. B.CEPPA, v. 20, n. 2, 2002.

COSTA, J. P. V.; VENDRUSCOLO, F. Production of red pigments by *Monascus ruber* CCT 3802 using lactose as a substrate. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 50-55, 2017.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal Of Food Science & Technology**, [s.l.], v. 35, n. 1, p.5-22, fev. 2001.

DUFOSSÉ, L. Red colourants from filamentous fungi: Are they ready for the food industry? **Journal Of Food Composition And Analysis**, [s.l.], v. 69, p.156-161, jun. 2018.

DUFOSSÉ, L.; GALAUP, P.; YARON, A.; ARAD, S. M.; BLANC, P.; MURTHY, K. N. C.; RAVISHANKAR, G. A. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?. **Trends In Food Science & Technology**, [s.l.], v. 16, n. 9, p.389-406, set. 2005

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Color Additive Status List**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/industry/color-additive-inventories/color-additive-status-list>>. Acesso em 20 nov 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Overview food ingredients additives colors**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/industry/color-additive-inventories/color-additive-status-list>>. Acesso em 20 nov 2019.

GARCÍA-GARCÍA, J.A.; ENRÍQUEZ, J.G.; RUIZ, M.; ARÉVALO, C.; JIMÉNEZ-RAMÍREZ, A. Software Process Simulation Modeling: systematic literature review. **Computer Standards & Interfaces**, [S.L.], v. 70, p. 103425, jun. 2020

GRAND VIEW RESEARCH. **Tamanho do mercado de corantes vale US \$ 37,49 bilhões até 2025 | CAGR: 4,2%**. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-colorants-market>. Acesso em: 10 jul. 2020

GULDEN, S.J.; RIEDELE, C.; KOPF, M.-H.; NIRSCHL, H. Potential of flotation as alternative separation process in biotechnology with focus on cost and energy efficiency. **Chemical Engineering Science**, [S.L.], v. 218, p. 115117, jun. 2020.

HACKBART, H. C. S.; SOUZA, M. M.; SCAGLIONI, P. T.; PRIMEL, E. G.; GARDABUFFON, J.; BADIÁLE-FURLONG, E. Método QuEChERS para determinação de ocratoxina a e citrinina em arroz e farelo de arroz. **Química Nova**, [S.L.], v. 35, n. 9, p. 1733-1737, 2012

HAIJAJ, 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**, [S.L.], v. 27, n. 8, p. 619-625, nov. 2000.

HAMANO, P. S.; KILIKIAN, B. V. Production of red pigments by *Monascus ruber* in culture media containing corn steep liquor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 4, p. 443-449, 2006.

HILARES, R. T.; SOUZA, R. A.; MARCELINO, P. F.; SILVA, S. S.; DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I.; SANTOS, J. C. Sugarcane bagasse hydrolysate as a potential feedstock for red pigment production by *Monascus ruber*. **Food Chemistry**, [S.L.], v. 245, p. 786-791, abr. 2018

INTELLIGEN. Guia do Usuário. SuperPro Designer®. Disponível em: <<http://intelligen.com/>>. Acesso em: 05 set 2020.

KANTIFEDAKI, A.; KACHRIMANIDOU, V.; MALLOUCHOS, A.; PAPANIKOLAOU, S.; KOUTINAS, A. A. Orange processing waste valorisation for the production of bio-based pigments using the fungal strains *Monascus purpureus* and *Penicillium purpurogenum*. **Journal Of Cleaner Production**, [S.L.], v. 185, p. 882-890, jun. 2018

LIU, L.; WU, S.; WANG, W.; ZHANG, X.; WANG, Z. Sulfonation of *Monascus* pigments to produce water-soluble yellow pigments. **Dyes And Pigments**, [s.l.], v. 173, fev. 2020a.

LIU, J.; LUO, Y.; GUO, T.; TANG, C.; CHAI, X.; ZHAO, W.; BAI, J.; LIN, Qi. Cost-effective pigment production by *Monascus purpureus* using rice straw hydrolysate as substrate in submerged fermentation. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [S.L.], v. 129, n. 2, p. 229-236, fev. 2020b.

LONG, C. et al. High-level production of *Monascus* pigments in *Monascus ruber* CICC41233 through ATP-citrate lyase overexpression. **Biochemical Engineering Journal**, v. 146, p. 160-169, 2019.

PAN, T.-M.; HSU, W. H. *Monascus*-Fermented Products. **Encyclopedia Of Food Microbiology**, [S.L.], p. 815-825, 2014.

PANESAR, R.; KAUR, S.; PANESAR, P. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. **Current Opinion In Food Science**, [S.L.], v. 1, p. 70-76, fev. 2015

PASTRANA, L.; GOMA, G. Estimation of bioprocess variables from *Monascus ruber* cultures by means of stoichiometric models. **Process Biochemistry**, [S.L.], v. 30, n. 7, p. 607-613, jan. 1995

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

PAVAN, F. A.; JUNQUEIRA, T. L.; WATANABE, M. D.b.; BONOMI, A.; QUINES, L. K.; SCHMIDELL, W.; ARAGAO, G. Economic analysis of polyhydroxybutyrate production by *Cupriavidus necator* using different routes for product recovery. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 146, p.97-104, jun. 2019.

PHAN, K; BROECK, E. D; VAN SPEYBROECK, V; CLERCK, K; RAES, K; MEESTER, S. The potential of anthocyanins from blueberries as a natural dye for cotton: A combined experimental and theoretical study. **Dyes And Pigments**, [s.l.], v. 176, maio 2020.

PRADO, M. A; GODOY, H. T. **Corantes artificiais em alimentos**. 14 v. Unicamp, Araraquara, 2003.

PRADO, J. M. **Estudo do aumento de escala do processo de extração supercrítica em leito fixo**. 2010. 283 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

MABROUKI, J.; ABBASSI, M. A.; GUEDRI, K.; OMRI, A.; JEGUIRIM, M. Simulation of biofuel production via fast pyrolysis of palm oil residues. **Fuel**, [S.L.], v. 159, p. 819-827, nov. 2011.

MAPARI, S. A; NIELSEN, K. F; LARSEN, T. O; FRISVAD, J. C; MEYER, A.S; THRANE, U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current Opinion In Biotechnology**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.231-238, abr. 2005.

MEINICKE, R. M. **Estudo da produção de pigmentos por *monascus ruber* cct 3802 utilizando glicerol como substrato em cultivo submerso**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

MELO, R. F. R. **Fungos coprófilos de Pernambuco**. 2015. 762 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

MORAIS, M. S. N. **Modelagem e simulação de um processo fermentativo com sistema de monitoramento via supervisório**. 62 f. Monografia (Especialização) - Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, 2019.

MORITZ, D. E. **Produção se pigmentos *Monascus* Por *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo submerso**. 2005. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

MORITZ, P. H. E. **Processo de exportação de pigmentos naturais para o mercado francês**. 2019. 56 f. TCC (Graduação) - Curso de Relações Internacionais, Universidade do Sul de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

NING, Z. et al. Deleting the citrinin biosynthesis-related gene, *ctnE*, to greatly reduce citrinin production in *Monascus aurantiacus* Li AS3.4384. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 241, p. 325-330, 2017.

OLIVEIRA, C. F. D.; COSTA, J. P. V.; VENDRUSCOLO, F. Maltose syrup residue as the substrate for *Monascus* pigments production. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, v. 18, p. 1-8, 2019.

OLIVEIRA, Camila Fernanda Dias de et al. **Produção de pigmentos por *Monascus ruber* CCT 3802 a partir do xarope de maltose como substrato**. 2017.

OLIVEIRA, A. D. S.; DUTRA, R. S.; CORRAL, S. O.; AVILA, C. O.; ORREGO, C. E.; GRAJALES, L. M. SIMULAÇÃO EM SUPERPRO DESIGNER DOS CUSTOS DE PRODUÇÃO DO FUNGO *Metarhizium anisopliae* POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SOLIDO. **Avanços das Pesquisas e Inovações na Engenharia Química 2**, [S.L.], p. 140-151, 24 mar. 2020.

RANGEL-YAGUI, C. O.; DANESI, E. D. G.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v 92, p. 133-141, 2004.

RAKICKA-PUSTUŁKA, M.; MIROŃCZUK, A. M.; CELIŃSKA, E.; BIAŁAS, W.; RYMOWICZ, W. Scale-up of the erythritol production technology – Process simulation and techno-economic analysis. **Journal Of Cleaner Production**, [S.L.], v. 257, p. 120533-100540, jun. 2020

RESEARCH NESTER. **Visão geral do mercado de cores para alimentos naturais**. Disponível em: <https://www.researchnester.com/reports/natural-food-colors-market-global-demand-growth-analysis-opportunity-outlook-2023/232>. Acesso em: 10 jul. 2020.

SÁ, Renata Anselmo de et al. Estudo da produção de metabólitos secundários por *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo submerso. 2005.

SAINI, D. K; PABBI, S; SHUKLA, P. Cyanobacterial pigments: Perspectives and biotechnological approaches. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 120, p.616-624, out. 2018.

SALMON, D. N. X.; FENDRICH, R. C.; CRUZ, M. A.; MONTIBELLER, V. W.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; SPIER, M. R. Bioprocess for phytase production by *Ganoderma* sp. MR-56 in different types of bioreactors through submerged cultivation. **Biochemical Engineering Journal**, [S.L.], v. 114, p. 288-297, out. 2016.

SCHIOZER, A. L; BARATA, L. E.S. Estabilidade de corantes e pigmentos de origem vegetal. **Revista Fitos**, Campinas, v. 1, n. 1, p.1-19, 02 jun. 2007.

SEYEDIN, A. et al. Natural Pigment Production by *Monascus purpureus*: Bioreactor Yield Improvement through Statistical Analysis. **Applied Food Biotechnology**, v.2, n.2, p.23-30, 2015.

SILVA, W. S. **Produção de pigmentos fúngicos e seu uso no tingimento de tecidos**. 2013. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São João Del-Rei, Ouro Branco, 2013.

SILVEIRA, S. T.; DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. Pigment production by *Monascus purpureus* in grape waste using factorial design. **Lwt - Food Science And Technology**, [S.L.], v. 41, n. 1, p. 170-174, jan. 2008

SOUZA, R.M. **Corantes naturais alimentícios e seus benefícios à saúde**. 2012. 65 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Uezo, Rio de Janeiro, 2012.

SOUZA JUNIOR, M. M. **Aplicação de técnicas de processamento e análise digital de imagens para caracterização fiso-morfológica do fungo *Monascus ruber* Thieghan IOC 2225: crescimento e produção de pigmentos**. 2018. 163 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

STRINGHETA, P.C. **Uso e aplicação de corantes naturais**. Apresentação realizada no evento sobre “Corantes artificiais e naturais em alimentos”. 19 de abril de 2007, ITAL, Campinas, SP.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M.; FORIGO JÚNIOR, A. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, 2009.

VENDRUSCOLO, F. **Produção de pigmento vermelho a partir de pigmento laranja produzido por *Monascus ruber* CCT 3802**. 2009. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

VENIL, C. K.; ZAKARIA, Z. A.; AHMAD, W. A. Bacterial pigments and their applications. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 48, n. 7, p.1065-1079, jul. 2013.

VELMURUGAN, P.; HUR, H.; BALACHANDAR, V.; KAMALA-KANNAN, S.; LEE, K.; LEE, S.-M.; CHAE, J. C.; SHEA, P. J.; OH, B. T. *Monascus* pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [S.L.], v. 112, n. 6, p. 590-594, dez. 2011.

VIDYALAKSHMI, R., PARANTHAMAN, R., MURUGESH, S., & SINGARAVADIVEL, K. Microbial bioconversion of rice broken to food grade pigments. **Global Journal of Biotechnology and Biochemistry**, v. 4, p. 84-87, 2009.

YANG, Y.; LIU, B.; DU, X.; LI, P.; LIANG, B.; CHENG, X.; DU, L.; HUANG, D.; WANG, L.; WANG, S. Complete genome sequence and transcriptomics analyses reveal pigment biosynthesis and regulatory mechanisms in an industrial strain, *Monascus purpureus* YY-1. **Scientific Reports**, [s.l.], v. 5, n. 1, 2015.

WIBOWO, S.; VERVOORT, L.; TOMIC, J.; SANTIAGO, J. S.; LEMMENS, L.; PANOZZO, A.; GRAUWET, T.; HENDRICKX, M.; LOEY, A. V. Colour and carotenoid changes of pasteurised orange juice during storage. **Food Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 330-340, 2015.