

Estudo comparativo entre espécies de *Monascus* para produção de pigmentos naturais utilizando resíduo agroindustrial como substrato

Comparative study between *Monascus* species for the production of natural pigments using agroindustrial waste as a substrate

Estudio comparativo entre especies de *Monascus* para la producción de pigmentos naturales utilizando residuos agroindustriales como substrato

Recebido: 18/08/2021 | Revisado: 26/08/2021 | Aceito: 30/08/2021 | Publicado: 02/09/2021

Thayná Torres da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2326-6365>
Universidade Estadual de Campinas, Brasil
E-mail: thayna-torres10@hotmail.com

José Renato da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0732-1849>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: j_renatossilva123@hotmail.com

Alana Emilia Soares de França Queiroz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8603-6076>
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil
E-mail: alana.soares@ufrpe.br

Daniele Silva Ribeiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5677-3916>
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, Brasil
E-mail: ribeirodanieles@gmail.com

Resumo

As espécies do fungo filamentosso *Monascus* produzem pigmentos naturais de diferentes cores, além de compostos bioativos com potencial antioxidante, sendo capazes de metabolizar substratos de baixo custo. Entretanto, existem várias espécies deste gênero que podem apresentar comportamentos distintos em relação à produção de pigmentos em um mesmo meio de produção. Assim, a proposta de trabalho foi avaliar o comportamento de duas espécies do gênero *Monascus*, *M. ruber* URM 4530 e *M. purpureus* CCT 3802 quanto à produção de pigmentos e, a partir dos melhores resultados e avaliar a atividade antioxidante de captura dos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•] utilizando farelo de mandioca como substrato fermentativo e glutamato monossódico como fonte de nitrogênio, com auxílio de um Delineamento Composto Central (DCC). Como resultado, foram verificadas melhores produção e atividade antioxidante na utilização da espécie *M. purpureus*, apresentando 13,77 UA₅₁₀ para a produção de pigmentos e 96,1 % e 62,7 % de inibição dos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•], respectivamente. Em contrapartida, a cepa *M. ruber* apresentou produção máxima de 5,82 UA₅₁₀. Desta forma, os resultados indicaram diferentes desempenhos das espécies do gênero *Monascus*, empregando o mesmo resíduo como substrato e condições de processo, com melhor performance de produção de pigmentos e atividade antioxidante para a cepa *M. purpureus* CCT 3802.

Palavras-chave: Atividade antioxidante; Farelo de mandioca; Pigmentos *Monascus*.

Abstract

The filamentous fungus species *Monascus* produce natural pigments of different colors, in addition to bioactive compounds with antioxidant potential, being able to metabolize low cost substrates. However, there are several species of this genus that can exhibit different behaviors in relation to the production of pigments in the same production medium. Thus, the work proposal was to evaluate the behavior of two species of the genus *Monascus*, *M. ruber* URM 4530 and *M. purpureus* CCT 3802 regarding pigment production and, from the best results, evaluate the antioxidant activity of capturing ABTS^{•+} radicals and DPPH[•] using cassava bran as a fermentative substrate and monosodium glutamate as a nitrogen source, with the aid of a Central Composite Design (DCC). As a result, better production and antioxidant activity were verified when using the *M. purpureus* strain, presenting 13.77 UA₅₁₀ for the production of pigments and 96.1 % and 62.7 % inhibition of the radicals ABTS^{•+} and DPPH[•], respectively. In contrast, the *M. ruber* strain had a maximum production of 5.82 UA₅₁₀. Thus, the results indicated different performances of the species of the genus *Monascus*, using the same residue as substrate and process conditions, with better pigment production performance and antioxidant activity for the strain *M. purpureus* CCT 3802.

Keywords: Antioxidant activity; Cassava bran; *Monascus* pigments.

Resumen

Las especies de hongos filamentosos *Monascus* producen pigmentos naturales de diferentes colores, además de compuestos bioactivos con potencial antioxidante, pudiendo metabolizar sustratos de bajo costo. Sin embargo, existen varias especies de este género que pueden exhibir diferentes comportamientos en relación a la producción de pigmentos en un mismo medio de producción. Así, la propuesta de trabajo fue evaluar el comportamiento de dos especies del género *Monascus*, *M. ruber* URM 4530 y *M. purpureus* CCT 3802 respecto a la producción de pigmentos y, a partir de los mejores resultados, evaluar la actividad antioxidante de la captura de radicales ABTS^{•+} y DPPH[•] utilizar salvado de yuca como sustrato fermentativo y glutamato monosódico como fuente de nitrógeno, con la ayuda de un diseño compuesto central (DCC). Como resultado, se verificó una mejor producción y actividad antioxidante en el uso de la especie *M. purpureus*, presentando 13,77 UA₅₁₀ para la producción de pigmentos y 96,1 % y 62,7 % de inhibición de los radicales ABTS^{•+} y DPPH[•], respectivamente. Por el contrario, la cepa de *M. ruber* tuvo una producción máxima de 5,82 UA₅₁₀. Así, los resultados indicaron diferentes comportamientos de las especies del género *Monascus*, utilizando el mismo residuo como sustrato y condiciones de proceso, con mejor rendimiento de producción de pigmento y actividad antioxidante para la cepa *M. purpureus* CCT 3802.

Palabras clave: Actividad antioxidante; Salvado de yuca; Pigmentos de *Monascus*.

1. Introdução

Os corantes sintéticos comumente utilizados pela indústria de alimentos vêm sendo substituídos pelos corantes naturais, devido aos efeitos toxicológicos indesejáveis, incluindo mutagenicidade e potencial carcinogênico. Os corantes naturais além de conferirem cor, apresentam princípios benéficos à saúde dos consumidores, como a capacidade antioxidante, que promove a melhora na circulação sanguínea e dos batimentos cardíacos. Por essa razão, o emprego de corantes naturais vem se tornando uma alternativa eficiente e interessante na indústria de alimentos, visando oferecer ao consumidor produtos saudáveis e seguros (Rocha & Reed, 2014; Lermen et al., 2015; Vendruscolo et al., 2017).

Dentre as fontes de pigmentos naturais, os micro-organismos se sobressaem, pois apresentam rápida produção, não sofrem com a sazonalidade, são seguros, podem metabolizar substratos de baixo custo (como subprodutos agroindustriais) e apresentam elevada estabilidade. O gênero *Monascus* abrange fungos filamentosos que possuem grande poder biotecnológico, pois são capazes de sintetizar pigmentos naturais de interesse industrial, utilizados milenarmente em países Asiáticos como ingrediente alimentar. Além disso, produzem outros metabólitos secundários com atividade antioxidante, como a monakolina K, o ácido γ -aminobutírico e o dimerúmico. A literatura reporta mais de 20 espécies de *Monascus*, sendo *Monascus purpureus* K, o ácido γ -aminobutírico e o dimerúmico. A literatura reporta mais de 20 espécies de *Monascus*, sendo *Monascus purpureus* e *Monascus ruber* as mais utilizadas para a síntese de pigmentos, capazes de metabolizar celulose, maltose, frutose e glicose. Destaca-se que diferentes espécies deste gênero podem apresentar comportamentos distintos em relação à produção de pigmentos em um mesmo meio de produção (Wang et al., 2016; Jin & Pyo, 2017; Vendruscolo et al., 2017; Yuliana et al., 2017; Zhang et al., 2018; Sánchez-Muñoz et al., 2020).

As espécies de *Monascus* são responsáveis pela produção de pigmento de cores laranja (monascorubrina e rubropunctatina), vermelho (monascorubramina e rubropunctamina) e amarelo (monascinas e ankaflavinas), sendo os de cor laranja precursores dos demais pigmentos. Dentre estes, os pigmentos vermelhos são os que mais se destacam em processos fermentativos, retendo maior interesse em virtude da estabilidade que apresentam em ampla faixa de temperatura e pH. A produção de pigmentos é determinada por diversos fatores, dentre os quais, têm-se composição do meio em que o fungo é incubado. As fontes de nitrogênio favorecem a produção dos pigmentos vermelhos, obtidos por meio do processo de aminação a partir dos pigmentos laranjas. Outro fator a ser analisado é o substrato utilizado, pois deve conter os nutrientes necessários para o desenvolvimento do micro-organismo, além de apresentar um baixo custo (Zhang et al., 2013; Shi et al., 2015; Woiciechowski et al., 2015; Lv et al., 2017).

Neste contexto, os resíduos agroindustriais são amplamente utilizados em bioprocessos para a produção de metabólitos secundários por micro-organismos, devido ao baixo custo de obtenção e rica composição em carboidratos e proteínas, como é o caso da casca de mandioca (*Manihot esculenta* L.), um resíduo oriundo da Mandiocultura (Panesar et al., 2015). O Brasil é um dos maiores produtores de mandioca e a produção de farinha é considerada a principal forma de

industrialização desta matéria-prima; dentre os principais subprodutos resultante do seu processamento, tem-se a casca da mandioca. Neste contexto, a biotecnologia microbiana vem surgindo com a possibilidade de utilização desse resíduo, como substrato para a síntese de compostos com alto valor agregado, como pigmentos e enzimas (Woiciechowski et al., 2015; Lv et al., 2017; Kantifedaki et al., 2018; Silbir & Goksungur, 2019; Nnolim et al., 2020).

A casca da mandioca (*Manihot esculenta L.*) apresenta rica composição em amido, proteína e fibras (celulose, hemicelulose e pectina), tornando-se, portanto, uma alternativa viável como fonte de carbono para micro-organismos, uma vez que servem com fonte de energia para o seu metabolismo e síntese de metabólitos secundários de interesse. Apesar deste potencial como substrato, a casca da mandioca detém um alto teor de umidade, tornando-se alvo de fermentação de micro-organismos do solo, afetando sua conservação durante o tempo. Portanto, para sua utilização biotecnológica faz-se necessária secagem e posterior produção de farelo, sendo este obtido a partir da desidratação da casca, seguido de processo de moagem (Cruz et al., 2015; Martinez & Feiden, 2017). Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar o comportamento de duas espécies distintas do fungo filamentosso *Monascus* frente à síntese de pigmentos vermelhos e avaliar a capacidade antioxidante dos ensaios que obtiverem melhores produções, empregando farelo de mandioca como substrato e glutamato monossódico como fonte externa de nitrogênio.

2. Metodologia

Micro-organismos

A cepa *Monascus purpureus* CCT 3802 foi obtida da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello de Pesquisa e Tecnologia (Campinas, São Paulo) e a cepa *Monascus ruber* URM 4530 utilizada foi cedida pela Coleção de Culturas Tropical, Micoteca URM (University Recife Mycologia), do Departamento de Micologia do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Pernambuco). As culturas estoques foram mantidas em tubos inclinados contendo meio estéril BDA (Batata Dextrose Ágar) a 4 °C e repicadas periodicamente. Para manutenção dos isolados, uma alçada de cada espécie foi transferida para frascos Erlenmeyers contendo BDA previamente esterilizado (121 °C por 15 min), os quais foram incubados a 30 °C por 10 dias para a cepa *M. purpureus* e por 7 dias para a cepa *M. ruber*.

Tratamento do substrato e preparo dos sistemas fermentativos

As cascas de mandioca (*Manihot esculenta L.*) utilizadas como substrato foram adquiridas em casas de farinhas da região de Lajedo-PE e em seguida transportadas para o Centro Laboratorial de Apoio à Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns (CENLAG/UFRPE/UAG). O material foi devidamente lavado em água corrente, em seguida, submetido à secagem em estufa com circulação de ar a 70 °C por 6 horas. Posteriormente, o resíduo seco foi triturado, com a utilização de mini processador elétrico de alimentos (Britânia®), e o farelo obtido foi armazenado em recipiente de vidro hermeticamente fechado, sob temperatura ambiente (± 25 °C) até posterior utilização. O glutamato monossódico (Ajinomoto®) utilizado nos experimentos foi obtido em supermercado da região de Garanhuns – PE.

A fermentação submersa ocorreu em frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio. Foram realizados 11 ensaios com diferentes concentrações do farelo de mandioca (substrato) e do glutamato monossódico (GMS), seguindo condições do Delineamento Composto Central (DCC) (Tabela 1). Após o preparo, os meios foram submetidos a tratamento térmico de 121 °C por 15 min. Os esporos fúngicos foram suspensos em 15 mL de solução estéril de Tween 80 a 0,3 %, sob agitação magnética. Em seguida foram coletados cerca de 10^6 esporos.mL⁻¹ e inoculados nos frascos contendo os meios.

Delineamento Composto Central e condições de fermentação

Visando otimização da produção dos pigmentos extracelulares vermelhos pelas espécies *Monascus*, foi executado um

Delineamento Composto Central 2² (DCC) com três pontos centrais, utilizando como variáveis independentes os componentes do meio fermentativo (concentrações de farelo de mandioca e GMS) em cinco níveis diferentes (-1,41; -1; 0; +1; +1,41), como pode ser observado na Tabela 1. Os resultados também foram analisados com auxílio da Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). As variáveis independentes estudadas e as concentrações foram escolhidas de acordo com estudos realizados anteriormente (Silva et al., 2018).

Tabela 1. Valores codificados e níveis reais das variáveis independentes.

Variáveis Independentes	Níveis DCC 2 ²				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Farelo de Mandioca (g/L)	40	46	60	74	80
GMS (g/L)	5	7	10	13	15

Fonte: Autores (2021).

Os frascos com os substratos e inóculos das cepas foram incubados (Incubadora Tecnal TE-421, Piracicaba/SP) a 30 °C por 160 rpm durante 7 dias para a cepa *Monascus purpureus* CCT 3802 e 8 dias para o *Monascus ruber* URM 4530, ambos na ausência de luz.

Quantificação dos pigmentos extracelulares

Ao final do cultivo, o meio fermentado foi filtrado sob vácuo utilizando papel filtro quantitativo. O sobrenadante foi centrifugado a 4.500 x g por 20 min a 23 °C e, em seguida, a produção dos pigmentos extracelulares vermelhos foi expressa em Unidade de Absorbância (UA) utilizando espectrofotômetro (Libra S6, Biochrom®) no comprimento de onda de 510 nm (vermelho) (Vendruscolo et al., 2017).

Determinação da atividade antioxidante pelo método de captura dos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•]

A determinação da capacidade antioxidante *in vitro* dos melhores resultados obtidos foi baseada nos métodos dos sequestros dos radicais ABTS^{•+} (2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) e DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), descritos por Tseng et al. (2006) e Aniya et al. (2000), respectivamente, com modificações. O cátion ABTS^{•+} foi formado a partir da reação de soluções aquosas de 7 mM de ABTS e 2,45 mM de persulfato de potássio (1:1 v/v) por 16 h, à temperatura ambiente e na ausência de luz. Transcorrido esse tempo, a solução do radical ABTS^{•+} foi diluída em água para uma absorbância de 0,700 (± 0,05), a 734 nm. Alíquotas de 0,5 mL da amostra diluída em água na proporção de 1:5, foram adicionadas em tubos de ensaio, juntamente com 3,5 mL da solução do radical ABTS^{•+} e em seguida a mistura foi lida em espectrofotômetro a 734 nm, após 6 min no escuro. Um controle negativo foi preparado com a utilização de água destilada no lugar da amostra. Para o reagente DPPH[•], foi preparada uma solução a 0,1 mM, empregando álcool metílico 95% (v/v) como solvente. A mistura reacional consistiu em 3,5 mL de DPPH[•] 0,1 mM em metanol e alíquota de 0,5 mL dos extratos de pigmentos de *Monascus* diluídos em água destilada na proporção de 1:5. A absorbância da mistura foi medida a 517 nm após 30 min de reação no escuro. Um controle negativo foi preparado com a utilização de álcool metílico 95% (v/v) no lugar da amostra. Todos os ensaios ocorreram em triplicata. A atividade antioxidante por DPPH[•] e ABTS^{•+}, foi calculada em relação à atividade de eliminação do radical (%) de acordo com a Equação 1:

$$\text{Inibição DPPH ou ABTS (\%)} = ((A_c - A_{am}) / A_c) \times 100 \quad (1)$$

Onde A_c representou a absorvância da amostra controle e A_{am} foi a absorvância dos ensaios contendo os extratos de pigmentos *Monascus*.

Análise estatística

A partir do planejamento estatístico, os resultados obtidos foram processados no software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA), para indicar os efeitos estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Efetuou-se a análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias dos resultados obtidos foram avaliadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade utilizando o software Minitab 18.0.

3. Resultados e Discussão

A avaliação da produção de pigmentos vermelhos pelas cepas *M. purpureus* CCT 3802 e *M. ruber* URM 4530, com uso do farelo de mandioca como substrato e o glutamato monossódico (GMS) como fonte de nitrogênio para a produção de pigmentos pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2. Matriz do Delineamento Composto Central e valores preditos e experimentais para otimização da produção de pigmentos por *M. purpureus* CCT 3802 e *M. ruber* URM 4530.

Ensaio	Valores codificados		Valores reais		Pigmentos vermelhos 510nm(*UA ₅₁₀)		
	Farelo	GMS	Farelo	GMS	<i>M. purpureus</i>	<i>M. purpureus</i>	<i>M. ruber</i>
					CCT 3802	CCT 3802	URM 4530
					Predito	Experimental	Experimental
1	-1	-1	46	7	7,29	8,04 ± 0,09 ^{Ac}	2,13 ± 0,07 ^{Bf}
2	+1	-1	74	7	10,60	10,9 ± 0,04 ^{Ab}	1,67 ± 0,06 ^{Bf}
3	-1	+1	46	13	7,96	7,79 ± 0,59 ^{Ac}	4,23 ± 0,33 ^{Bbcd}
4	+1	+1	74	13	14,38	13,74 ± 0,10 ^{Aa}	3,54 ± 0,55 ^{Bde}
5	-1,41	0	40	10	6,54	6,15 ± 0,02 ^{Ad}	2,81 ± 0,21 ^{Bef}
6	+1,41	0	80	10	13,49	13,77 ± 0,16 ^{Aa}	5,82 ± 0,29 ^{Ba}
7	0	-1,41	60	5	8,94	8,35 ± 0,16 ^{Ac}	4,04 ± 0,46 ^{Bcde}
8	0	+1,41	60	15	12,65	13,16 ± 0,11 ^{Ab}	5,59 ± 0,34 ^{Bab}
9(C)	0	0	60	10	8,42	8,32 ± 0,08 ^{Ac}	5,25 ± 0,41 ^{Babc}
10(C)	0	0	60	10	8,42	8,31 ± 0,09 ^{Ac}	5,19 ± 0,47 ^{Babc}
11(C)	0	0	60	10	8,42	8,58 ± 0,10 ^{Ac}	3,75 ± 0,25 ^{Bde}

*Médias que compartilham a letra minúscula na mesma coluna e letra maiúscula na mesma linha, não diferente estatisticamente a um nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. *UA = Unidade de Absorvância. Fonte: Autores (2021).

As duas espécies do gênero *Monascus* foram utilizadas em condições de fermentação submersa idênticas, por meio de um Delineamento Composto Central 2² que objetivou analisar a influência da concentração de farelo de mandioca e GMS na produção dos pigmentos. De acordo com os valores experimentais, ambas as espécies foram capazes de produzir pigmentos (Tabela 2), isto é, foram capazes de utilizar o farelo de mandioca como substrato e o GMS como fonte de nitrogênio.

Ao comparar as duas espécies de *Monascus* em relação à produção de pigmentos vermelhos, foi observado que a cepa *Monascus purpureus* CCT 3802 apresentou maiores valores para a produção deste metabólito (13,74 e 13,77 UA₅₁₀), com diferença significativa a um nível de confiança de 95 % em comparação com a cepa *Monascus ruber* URM 4530, em que as maiores produções foram de 5,19; 5,25; 5,59 e 5,82 UA₅₁₀ (Tabela 2).

Cada micro-organismo possui condições próprias para produção dos seus metabólitos e dependem da composição do meio de produção, como o tipo de substrato e fontes de carbono e nitrogênio, por exemplo. Assim, algumas espécies de um mesmo gênero podem apresentar diferentes comportamentos em relação à produção de metabólitos, como observado neste estudo, em que o *Monascus purpureus* CCT 3802 apresentou uma maior produção de pigmentos vermelhos em relação ao *Monascus ruber* URM 4530 (Tabela 2). Desta maneira, nota-se que as espécies de *Monascus* foram capazes de metabolizar o farelo de mandioca e sintetizar pigmentos vermelhos, porém a cepa *M. purpureus* apresentou maior produção de pigmentos vermelhos nas condições fermentativas estudadas.

Verificou-se que a máxima produção de pigmentos por *M. purpureus* CCT 3802 foi observada em sistemas fermentativos que continham os níveis mais altos do farelo de mandioca (74 e 80 g/L), comprovando a efetividade da fonte de carbono na produção do metabólito pela cepa. Em contrapartida, na produção do *M. uber* URM 4530 foi observado que, além das maiores produções de pigmentos serem produzidas em sistemas com níveis altos (80 g/L), a cepa também apresentou maior produção do metabólito em sistemas fermentativos no nível central (60 g/L), refletindo a diferença de comportamento entre as duas espécies do gênero estudado em meios de cultivos semelhantes.

A casca de mandioca é um resíduo proveniente da fabricação de farinhas, sendo rica em proteínas, amido e principalmente em fibras. Por sua vez, as fibras são formadas por celulose, hemicelulose, oligossacarídeos, pectinas e outros componentes, que podem servir como fonte de carbono para micro-organismos, já que a maioria dos fungos filamentosos conseguem metabolizar carboidratos complexos, demonstrando que este resíduo apresenta grande potencial como substrato em processos biotecnológicos para obtenção de metabólitos secundários com alto valor agregado, como os pigmentos naturais (Martinez & Feiden, 2017). Em estudo anterior, foi realizada a caracterização físico-química do farelo de mandioca utilizado neste estudo; como resultado, foram encontrados altos teores de fibras totais (62,85 %) e carboidratos não fibrosos (30,01 %), além de 4,46 % de proteínas e 2,29 % de cinzas, revelando potencial de uso na produção de pigmentos vermelhos pelas espécies de *Monascus* (Silva et al., 2018).

Diversos trabalhos reforçam a capacidade das espécies do gênero *Monascus* de metabolizar resíduos agroindustriais para produção de pigmentos vermelhos, propondo uma alternativa viável para utilização correta deste tipo de material. Embaby et al. (2018) empregaram resíduos agroindustriais como bagaço de cana, espigas de milho e cascas de batata e relataram maiores produções de pigmentos por *Monascus purpureus* em cultivos com espigas de milho. Em seus estudos, Liu et al. (2020) empregaram palha de arroz na produção de pigmentos em fermentação submersa por *M. purpureus*, encontrando valor de produção de 8,46 UA₅₀₀. Utilizando farelo de milho como substrato, Almeida et al. (2021), por meio de um planejamento fatorial 2², maximizaram a produção de pigmentos, utilizando peptona como fonte de nitrogênio. Diante dos resultados, os pesquisadores, verificaram que o aumento das concentrações do farelo de milho e peptona, refletiram nas maiores produções, indicando o desempenho eficiente do farelo de milho como substrato.

A fonte de nitrogênio é um parâmetro importante na produção de metabólitos secundários — como pigmentos — por fungos filamentosos, pois o uso de aminoácidos estimula a produção de pigmentos vermelhos extracelulares, uma vez que os pigmentos de cor laranja, sintetizados inicialmente, reagem com os grupamentos de nitrogênio da estrutura destes compostos e contribuem para o aumento da produtividade de pigmentos vermelhos solúveis em água (Shi et al., 2015).

De acordo com os resultados verifica-se a importância da fonte de nitrogênio que foi adicionada ao meio de cultivo das duas espécies de *Monascus* (Tabela 2), em que os melhores resultados de produção foram observados nos níveis altos e

centrais de GMS (10, 13 e 15 g/L). Em seus estudos, Zhang et al. (2013), avaliaram o efeito da fonte de nitrogênio em cultivos de espécie de *Monascus* sp. e relataram que o GMS estimulou a produção de pigmentos. De forma semelhante à Moussa et al. (2018), que obtiveram o mesmo resultado em meios de cultivos fermentados por *M. purpureus* utilizando resíduos agroindustriais e diversas fontes de nitrogênio, com o glutamato monossódico e a peptona apresentando as melhores produções do metabólito.

A análise dos efeitos estatísticos da Tabela 3 para a cepa *M. ruber* URM 4530 mostra que nenhuma variável apresentou efeito significativo ($p < 0,05$), indicando que o aumento nas concentrações das variáveis independentes (farelo de mandioca e GMS) não afetaram a produção de pigmentos (variável resposta). Em contrapartida, em relação à cepa *M. purpureus* CCT 3802, a análise dos efeitos estatísticos revela que as variáveis independentes apresentaram efeitos significativos positivos (lineares e quadráticos), refletindo que maiores concentrações do farelo de mandioca e GMS promovem maiores produções de pigmentos pela cepa, confirmando mais uma vez o comportamento distinto entre as espécies.

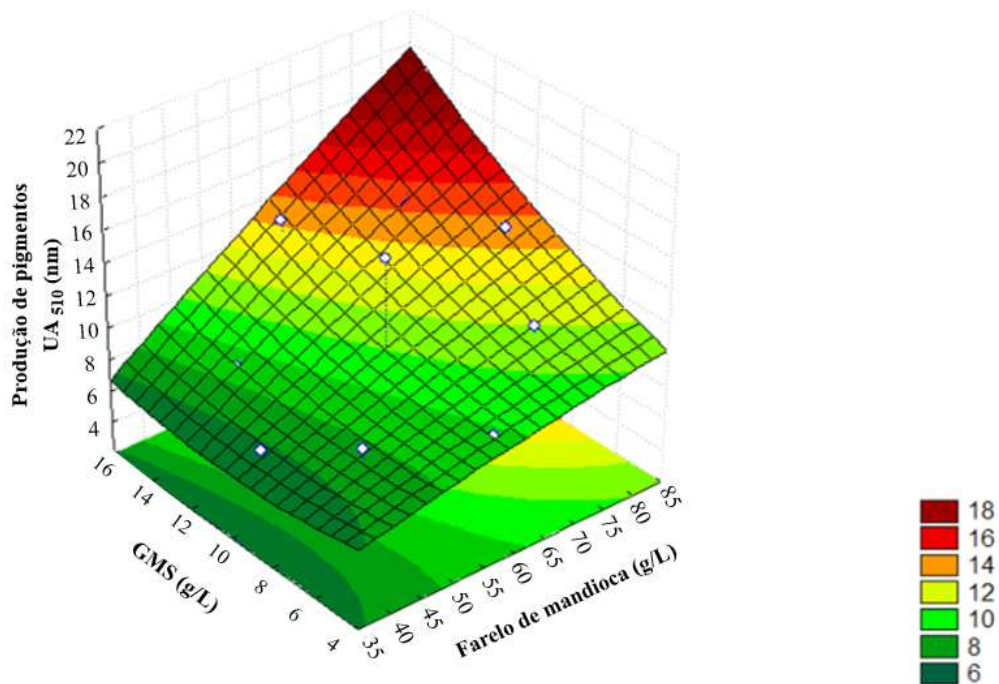
Tabela 3. Efeitos estatísticos do farelo de mandioca e GMS em relação à produção de pigmentos por *Monascus purpureus* CCT 3802 e *Monascus ruber* URM 4530.

Variáveis	<i>M. purpureus</i> CCT 3802		<i>M. ruber</i> URM 4530	
	Efeitos	<i>p</i> -valor	Efeitos	<i>p</i> -valor
(1) Farelo de mandioca (L)	4,8645	0,0004*	0,7795	0,4328
(2) GMS (L)	1,5657	0,0068*	-0,9517	0,4275
Farelo de mandioca (Q)	2,2231	0,0019*	1,3716	0,2034
GMS (Q)	1,7121	0,0031*	-0,1658	0,8416
1 (L) x 2 (L)	1,5575	0,0091*	-0,1150	0,9287

*Valores estatisticamente significativos ao nível de confiança de 95%. L: linear; Q: quadrático. Fonte: Autores (2021).

Para melhor análise dos resultados obtidos, a Figura 1 apresenta a superfície de resposta obtida a partir dos resultados apresentados na Tabela 2 para a cepa *Monascus purpureus* CCT 3802, em que o eixo Z representa a variável resposta (produção de pigmentos), o eixo Y a concentração do farelo de mandioca e o eixo X a concentração do GMS.

Figura 1. Superfície de resposta para a produção de pigmentos para *Monascus purpureus* CCT 3802.



Fonte: Autores (2021).

Apesar da cepa *M. purpureus* CCT 3802 apresentar maior produção de pigmentos vermelhos utilizando farelo de mandioca e GMS, por meio da Figura 1, constata-se que não foi possível atingir à região de máxima produção de pigmentos vermelhos. No entanto, de acordo com os resultados, devido aos efeitos estatísticos significativos positivos do farelo de mandioca e da fonte de nitrogênio (GMS) (Tabela 3), nota-se que o aumento da concentração destas variáveis ocasiona em um aumento na produção dos pigmentos vermelhos pela cepa *M. purpureus* CCT 3802.

Por meio da análise do modelo de segunda ordem da superfície de resposta e das interações significativas das variáveis independentes (farelo de mandioca e GMS) foi gerada a seguinte equação empírica (Equação 2) que descreve o valor predito em relação a produção de pigmentos vermelhos (Tabela 2) empregando a cepa *Monascus purpureus* CCT 3802:

$$UA_{510}(M. purpureus) = 29,3045 - 0,4909X_1 + 0,0039X_1^2 - 2,6443X_2 + 0,0951X_2^2 + 0,0185X_1X_2 \quad (2)$$
$$R^2 = 0,972$$

Onde X_1 e X_2 representam as concentrações (em g/L) do farelo de mandioca e GMS, respectivamente. Este modelo matemático pode ser utilizado para prever a produção de pigmentos dentro dos limites experimentais, devido aos valores preditos apresentarem semelhança com os valores experimentais.

Através da análise de variância (ANOVA) (Tabela 4), verificou-se que o modelo ajustado é estatisticamente significativo ($F_{cal} > F_{tab}$), e que a variação dos resultados experimentais encontrada foi de 97,20 %.

Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) para produção pigmentos por *M. purpureus* CCT 3892 de acordo com o Delineamento Composto Central.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados médios	Fcal	Ftab
Regressão	72,56	5	14,51	36,83	5,05
Resíduo	1,97	5	0,394		
Total	74,53	10			

Fcal: F calculado; Ftab: F tabelado $R^2=0,972$. Fonte: Autores (2021).

A Tabela 5 apresenta os resultados da capacidade antioxidante determinada pelos métodos de sequestro dos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•] para os ensaios com maiores produções de pigmentos vermelhos (13,74 e 13,76 UA₅₁₀), selecionados da cepa *Monascus purpureus* CCT 3802. Percebe-se que os extratos fúngicos obtidos por fermentação submersa por meio do *Monascus purpureus* CCT 3802 apresentaram capacidade antioxidante, pois foram capazes de sequestrar os radicais ABTS^{•+} e DPPH[•], evidenciando que o farelo de mandioca e a fonte externa de nitrogênio propiciaram a produção de compostos com atividade antioxidante pela cepa *M. purpureus*.

Ainda é possível observar que não houve diferença significativa entre os ensaios 4 e 6 em relação à capacidade antioxidante verificada pelos métodos de captura dos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•] ($p < 0,05$), no entanto, os resultados indicaram que houve diferença significativa entre os dois métodos, isto é, a atividade antioxidante por ABTS^{•+} foi maior (96,1 %) que o DPPH[•] (62,7 %). Este comportamento deve-se ao fato de que o radical ABTS^{•+}, dissolvido em solução aquosa, apresenta maior afinidade com metabólitos antioxidantes hidrofílicos. Com isso, supõe-se que por serem produzidos em extratos aquosos, a maioria dos componentes antioxidantes produzidos pelos *Monascus* possuem natureza hidrofílica (Bei et al., 2017; Seon et al., 2020).

Tabela 5. Atividade antioxidante (ABTS^{•+} e DPPH[•]) dos extratos fúngicos de *Monascus purpureus* CCT 3802 obtidos por fermentação submersa com farelo de mandioca suplementado com GMS.

Ensaio	Farelo (g/L)	GMS (g/L)	UA ₅₁₀	% Inibição ABTS ^{•+}	% Inibição DPPH [•]
4	74	13	13,74	95,5 ± 0,76 ^{Aa}	51,1 ± 0,46 ^{Ba}
6	80	10	13,77	96,1 ± 0,12 ^{Aa}	62,7 ± 0,20 ^{Ba}

*Médias que compartilham a letra minúscula na mesma coluna e letra maiúscula na mesma linha, não diferente estatisticamente a um nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. *UA = Unidade de Absorbância. Fonte: Autores (2021).

Ao estudarem a atividade antioxidante dos extratos de *Monascus*, Srianta et al. (2017) empregaram sementes durião no sistema fermentativo e verificaram uma maior atividade antioxidante avaliada pela captura do radical DPPH[•] (56,26 %), inferior a captura deste trabalho (62,7 % de captura por DPPH[•]).

Em seus estudos, utilizando *M. pilosus* e farelo de arroz como substrato para produção de compostos bioativos, Cheng et al. (2016), verificaram a capacidade antioxidante dos extratos e obtiveram 70 % e 60 % de inibição do radicais ABTS^{•+} e DPPH[•], respectivamente, em cultivos que continham maiores concentrações do substrato, demonstrando que a utilização de um subproduto da moagem do arroz foi fundamental na síntese de compostos com potencial bioativo pelas espécies de *Monascus*, assim como no presente trabalho.

Os estudos citados, assim como o presente trabalho, revelam que a utilização de fungos como via biotecnológica para a produção de compostos bioativos antioxidantes e pigmentos é uma atividade promissora, uma vez que as espécies de

Monascus estudadas apresentaram capacidade de metabolizar resíduos agroindustriais nos produtos de interesse, sugerindo uma alternativa para o uso de resíduos provenientes da mandiocultura.

4. Conclusão

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que ambas as espécies de *Monascus* estudadas foram capazes de metabolizar o farelo de mandioca e o GMS para produção de pigmentos vermelhos, demonstrando potencial de reaproveitamento da casca de mandioca e comprovando que a utilização deste resíduo é uma atividade promissora com viés ambiental importante, por reduzir problemas decorrentes do destino incorreto deste.

Entre as duas espécies, *Monascus purpureus* CCT 3802 apresentou maior produção de pigmentos vermelhos nas condições experimentais do presente estudo. Isto demonstra que diferentes espécies de *Monascus* podem apresentar comportamentos distintos em um mesmo meio fermentativo que podem afetar a produção de pigmentos.

Em relação à capacidade antioxidante, os resultados indicaram que a cepa *Monascus purpureus* CCT 3802 foi capaz de sintetizar compostos com atividade antioxidante quando da utilização do farelo de mandioca e do glutamato monossódico no meio fermentativo.

Agradecimentos

À Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns (UFRPE/UAG) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Referências

- Almeida, A. B., Santos, N. H., de Lima, T. M., Santana, R. V., de Oliveira Filho, J. G., Peres, D. S., & Egea, M. B. (2021). Pigment bioproduction by *Monascus purpureus* using corn bran, a byproduct of the corn industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 32. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101931>
- Aniya, Y., Ohtani, I. I., Higa, T., Miyagi, C., Gibo, H., Shimabukuro, M., & Taira, J. (2000). Dimerumic acid as an antioxidant of the mold, *Monascus anka*. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(6), 999-1004. [10.1016/s0891-5849\(00\)00188-x](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00188-x)
- Bei, Q., Liu, Y., Wang, L., Chen, G., & Wu, Z. (2017). Improving free, conjugated, and bound phenolic fractions in fermented oats (*Avena sativa* L.) with *Monascus anka* and their antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 32, 185-194. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.02.028>
- Cheng, J., Choi, B. K., Yang, S. H., & Suh, J. W. (2016). Effect of fermentation on the antioxidant activity of rice bran by *Monascus pilosus* KCCM 60084. *Journal of Applied Biological Chemistry*, 59(1), 57-62. <https://doi.org/10.3839/jabc.2016.011>
- Cruz, E. A., Melo, M. C., Santana, N. B., Franco, M., de Santana, R. S. M., Santos, L. S., & Gonçalves, Z. S. (2015). Produção de alfa-Amilase por *Aspergillus niger* em resíduo de cascas de mandioca. *Journal of Health Sciences*, 13(4). <https://doi.org/10.17921/2447-8938.2011v13n4p%25p>
- Embaby, A. M., Hussein, M. N., & Hussein, A. (2018). *Monascus orange* and red pigments production by *Monascus purpureus* ATCC 16436 through co-solid state fermentation of corn ob and glycerol: An eco-friendly environmental low cost approach. *PLoS One*, 13(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207755>
- Jin, Y. J., & Pyo, Y. H. (2017). Effect of monascus-fermented soybean extracts on antioxidant and skin aging-related enzymes inhibitory activities. *Preventive Nutrition and Food Science*, 22(4), 376. [10.3746/pnf.2017.22.4.376](https://doi.org/10.3746/pnf.2017.22.4.376)
- Kantifedaki, A., Kachrimanidou, V., Mallouchos, A., Papanikolaou, S., & Koutinas, A. A. (2018). Orange processing waste valorisation for the production of bio-based pigments using the fungal strains *Monascus purpureus* and *Penicillium purpurogenum*. *Journal of Cleaner Production*, 185, 882-890. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.03.032>
- Lermen, F. H., de Souza Matias, G., Modesto, F. A., Röder, R., & Boikor, T. J. P. (2015). Teste de consumidores e análise de aparência, sabores e cores para o desenvolvimento de novos produtos: O case do Projeto de Broinhas de Milho Saboreadas. *Revista Latino-Americana de Inovação e Engenharia de Produção*, 3(4), 97-110. <http://dx.doi.org/10.5380/relainep.v3i4.37744>
- Liu, J., Luo, Y., Guo, T., Tang, C., Chai, X., Zhao, W., & Lin, Q. (2020). Cost-effective pigment production by *Monascus purpureus* using rice straw hydrolysate as substrate in submerged fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 129(2), 229-236. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.08.007>
- Lv, J., Zhang, B. B., Liu, X. D., Zhang, C., Chen, L., Xu, G. R., & Cheung, P. C. K. (2017). Enhanced production of natural yellow pigments from *Monascus purpureus* by liquid culture: the relation ship between fermentation conditions and mycelial morphology. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124(4), 452-458. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.05.010>

- Martínez, D. G., & Feiden, A. (2017). Potencial do resíduo do processamento da mandioca para produção de etanol de segunda geração. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, 6(2), 141-148. 10.5380/rber.v6i2.45811
- Moussa, S., Abdou, D., Mohamed, G. A., Abo-El-Seoud, M. A., Karam Eldin, A. Z. A., & El-mehalawy, A. A. (2018). Production of red pigment by *Monascus purpureus* Nrr1 1992 under submerged and solid-state fermentation. *Egyptian Journal of Microbiology*, 53(1), 83-94. 10.21608/EJM.2018.3962.1059
- Nnolim, N. E., Okoh, A. I., & Nwodo, U. U. (2020). Proteolytic bacteria isolated from agro-waste dumpsites produced keratinolytic enzymes. *Biotechnology Reports*, 27, e00483. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00483>
- Panesar, R., Kaur, S., & Panesar, P. S. (2015). Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. *Current Opinion in Food Science*, 1, 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.12.002>
- Rocha, D. S., & Reed, E. (2014). Pigmentos Naturais em Alimentos e sua Importância para a Saúde. *Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde*, 41(1), 76-85. <http://revistas.pucgoias.edu.br/index.php/estudos/article/viewFile/3366/1953>
- Sánchez-Muñoz, S., Mariano-Silva, G., Leite, M. O., Mura, F. B., Verma, M. L., da Silva, S. S., & Chandel, A. K. (2020). Production of fungal and bacterial pigments and their applications. In *Biotechnological Production of Bioactive Compounds*, 327-361. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64323-0.00011-4>
- Seon, H. Y., Sun, S., & Yim, S. H. (2020). Correlation of the free radical and antioxidant activities of *Eriobotrya Japonica* Lindl. with phenolic and flavonoid contents. *Food Science and Technology*. <http://orcid.org/0000-0002-0227-5484>
- Shi, K., Song, D., Chen, G., Pistolozzi, M., Wu, Z., & Quan, L. (2015). Controlling composition and color characteristics of *Monascus* pigments by pH and nitrogen sources in submerged fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(2), 145-154. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.01.001>
- Silbir, S., & Goksungur, Y. (2019). Natural red pigment production by *Monascus purpureus* in submerged fermentation systems using a food industry waste: Brewer's spent grain. *Foods*, 8(5), 161. <https://doi.org/10.3390/foods8050161>
- Silva, J. R., Da Silva, T. T., Da Silva, É. K., Da Silva, S. P., Moreira, K. A., & Ribeiro, D. S. (2018). Produção de pigmentos de *Monascus ruber* CCT 3802 utilizando casca de mandioca como substrato. *Revista Brasileira de Agrotecnologia*, 8(3), 26-31. <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/REBAGRO/article/view/6321>
- Srianta, I., Zubaidah, E., Estiasih, T., Iuchi, Y., Harijono, H., & Yamada, M. (2017). Antioxidant activity of pigments derived from *Monascus purpureus* fermented rice, corn, and sorghum. *International Food Research Journal*, 24(3), 1186-1191. <http://repository.wima.ac.id/id/eprint/16353>
- Tseng, Y. H., Yang, J. H., Chang, H. L., Lee, Y. L., & Mau, J. L. (2006). Antioxidant properties of methanolic extracts from monascus adlay. *Food Chemistry*, 97(3), 375-381. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.022>
- Vendruscolo, F., Schmidell, W., de Oliveira, D., & Ninow, J. L. (2017). Kinetic of orange pigment production from *Monascus ruber* on submerged fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(1), 115-121. 10.1007/s00449-016-1679-5
- Wang, L., Dai, Y., Chen, W., Shao, Y., & Chen, F. (2016). Effects of light intensity and color on the biomass, extracellular red pigment, and citrinin production of *Monascus ruber*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(50), 9506-9514. 10.1021/acs.jafc.6b04056
- Woiciechowski, A. L., Carvalho, J. C., Spier, M. R., & Soccol, C. (2015). Emprego de resíduos agroindustriais em bioprocessos alimentares. *Biotecnologia de Alimentos*, 1, 143-171. 10.13140/RG.2.1.1508.7529
- Yuliana, A., Singgih, M., Julianti, E., & Blanc, P. J. (2017). Derivates of azaphilone *Monascus* pigments. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 9, 183-194. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.12.014>
- Zhang, B. B., Xing, H. B., Jiang, B. J., Chen, L., Xu, G. R., Jiang, Y., & Zhang, D. Y. (2018). Using millet as substrate for efficient production of monacolin K by solid-state fermentation of *Monascus ruber*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 125(3), 333-338. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.10.011>
- Zhang, X. W., Wang, J. H., Chen, M. H., & Wang, C. L. (2013). Effect of nitrogen sources on production and photostability of *Monascus* pigments in liquid fermentation. *IERI Procedia*, 5, 344-350. <https://doi.org/10.1016/j.ieri.2013.11.114>