UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

MARCOS MOACIR DE SOUZA JUNIOR

**Aplicação de técnicas de processamento e análise digital de imagens para a
caracterização fisio-morfológica do fungo *Monascus ruber* Thieghan IOC
2225: crescimento e produção de pigmentos**

Lorena

2018

MARCOS MOACIR DE SOUZA JUNIOR

**Aplicação de técnicas de processamento e análise digital de imagens para a
caracterização fisio-morfológica do fungo *Monascus ruber* Thieghan IOC**

2225: crescimento e produção de pigmentos

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na área de Conversão de Biomassa.

Orientador: Prof. Dr. Julio César dos Santos

Versão Corrigida

Lorena

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Souza Junior, Marcos Moacir de

Aplicação de técnicas de processamento e análise digital de imagens para a caracterização fisiomorfológica do fungo *Monascus ruber* Thieghan IOC 2225: crescimento e produção de pigmentos / Marcos Moacir de Souza Junior; orientador Júlio César dos Santos - Versão Corrigida. - Lorena, 2018.
161 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2018

1. *Monascus ruber*. 2. Processamento e análise de imagens. 3. Pigmentos. I. Título. II. Santos, Júlio César dos, orient.

Dedico esta dissertação à minha família, aos meus amigos e ao meu avô Antenor.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, a Deus e a meu anjo da guarda por todas as bênçãos alcançadas durante a minha vida que me permitiram chegar até aqui.

Ao meu orientador, Prof. Júlio Cesar dos Santos e a todos os meus colegas de laboratório por ter me aceito no seu grupo de pesquisa e por toda orientação e paciência que me foi destinada.

Aos professores Arnaldo, Maria das Graças, Ismael, Rita, João Batista, Talita e a todos os outros pelos ensinamentos.

A toda minha família, em especial, aos meus pais, Marcos e Sonia, e às minhas irmãs, Danila e Bruna, e aos meus avós, por sempre acreditarem em mim, mesmo nos momentos em que eu mesma não o fazia. Vocês são tudo na minha vida e se eu cheguei até aqui hoje, eu devo isso totalmente à vocês. Eu amo vocês.

Aos demais estudantes do departamento pela ajuda que me foi dada em algum momento durante a minha pesquisa.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP pelo incentivo financeiro dado a mim e a todo o grupo de pesquisa.

À USP pela oportunidade dada de desenvolver este trabalho.

Sou imensamente grato a todos vocês!

RESUMO

SOUZA JUNIOR, Marcos Moacir de. **Aplicação de técnicas de processamento e análise digital de imagens para a caracterização fisio-morfológica do fungo *Monascus ruber* Thieghan IOC 2225: crescimento e produção de pigmentos.** 2018. 161 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2018.

A caracterização morfológica para a compreensão de padrões sobre o perfil comportamental e de relações entre determinados parâmetros proporciona um maior entendimento sobre sistemas naturais. Neste sentido, o processamento e análise digital de imagens (PADI) é ferramenta útil e adequada para avaliação dos aspectos morfológicos e morfométricos de seres vivos. Este projeto teve como finalidade o desenvolvimento de técnicas de PADI para a caracterização do perfil de crescimento, propagação e produção de pigmentos do fungo filamentoso *Monascus ruber*, fornecendo informações importantes para identificação e conhecimento do comportamento deste fungo a partir da variação da concentração das fontes de carbono (glicose) e de nitrogênio (glutamato monossódico – GMS) e do pH do meio. Foram elaborados e identificados parâmetros para a caracterização da fermentação em estado semissólido a partir do PADI, sendo eles área micelial, crescimento radial pigmentar e micelial, espessura, variação da intensidade pigmentar, desvio padrão pigmentar e fator forma ao longo do tempo. Foram realizados experimentos conforme delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^3 com triplicata no ponto central para avaliação de condições ótimas de produção de pigmentos amarelo, laranja e vermelho. As variáveis resposta empregadas foram produção de pigmentos amarelo, laranja, vermelho, área micelial, velocidade micelial, velocidade pigmentar e variação da intensidade pigmentar extracelular. Modelos empíricos foram ajustados e utilizados para maximização da produção de pigmentos. Os resultados mostraram que elevadas concentrações de glicose e GMS e baixo pH favoreceram a produção de pigmentos. As condições otimizadas foram: concentração de glicose de $51,37 \text{ g.L}^{-1}$, concentração de GMS de $8,19 \text{ g.L}^{-1}$ e pH 2,31. Nestas condições, produziram-se $123,05 \text{ UA.g}^{-1}$, $95,98 \text{ UA.g}^{-1}$ e $99,48 \text{ UA.g}^{-1}$ de pigmentos amarelo, laranja e vermelho, respectivamente. A partir dos resultados pôde-se determinar que os parâmetros elaborados para caracterizar os padrões do crescimento e as relações morfológicas com outras variáveis utilizando de técnicas do PADI são ferramentas poderosas para o acompanhamento e rastreabilidade deste bioprocesso. Os resultados obtidos também favorecerão futuros estudos empregando inteligência artificial, como aprendizado de máquina e redes neurais artificiais, para elaboração de modelos e estratégias de automação e acompanhamento *on-line* do padrão de crescimento do microrganismo e as relações entre variáveis de processo.

Palavras-chave: *Monascus ruber*. Processamento e análise de imagens. Pigmentos

ABSTRACT

SOUZA JUNIOR, Marcos Moacir de **Application of processing techniques and digital image analysis for the physio-morphological characterization of the fungus *Monascus ruber* Thieghan IOC 2225: growth and pigment production.** 2018. 161 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2018.

The morphological characterization for the understanding of patterns of the behavioral profile and relations between certain parameters provides a greater understanding about natural systems. In this sense, digital image processing and analysis (DIPA) is a useful and adequate tool for the evaluation of the morphological and morphometric aspects of living beings. This project aimed at the development of DIPA techniques for the characterization of the growth profile, propagation and production of pigments of the filamentous fungus *Monascus ruber*, providing important information to identify and know the behavior of this fungus from the variation of the concentration of the carbon source (glucose) and the nitrogen source (monosodium glutamate - MSG) and from the variation of the pH of the medium. Parameters for the characterization of the fermentation in semi-solid state were elaborated and identified using DIPA, which were mycelial area, pigmentary and mycelial radial growth, thickness, variation of pigment intensity, pigmentary standard deviation and form factor over time. Experiments were carried out in accordance with the delineation of the central rotational compound (DCRC) 2^3 with triplicate at the central point to evaluate optimal conditions of production of yellow, orange and red pigments. The response variables employed were yellow, orange, red pigment, mycelial area, mycelial velocity, pigment velocity and extracellular pigment intensity. Empirical models were fitted and used to maximize pigment production. The results showed that high concentrations of glucose and MSG and low pH favored the production of pigments. Optimized conditions were: glucose concentration of 51.37 g.L^{-1} , MSG concentration of 8.19 g.L^{-1} and pH 2.31. Under these conditions were produced 123.05 AU.g^{-1} , 95.98 AU.g^{-1} and 99.48 AU.g^{-1} of yellow, orange and red pigments, respectively. From the results it was possible to determine that the parameters elaborated to characterize growth patterns and morphological relationships with other variables using DIPA techniques are powerful tools for monitoring and traceability of this bioprocess. The results obtained will also favor future studies using artificial intelligence, such as machine learning and artificial neural networks, for the elaboration of automation strategies and online monitoring of the growth pattern of the microorganism and the relations between process variables.

Keywords: *Monascus ruber*. Image processing and analysis. Pigments

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sensibilidade relativa do olho humano aos diferentes comprimentos de onda da luz visível.....	24
Figura 2 - Imagem bidimensional em um arranjo de pixels e sua intensidade em níveis (tons) de cinza	25
Figura 3 - Bandas espectrais de diversos comprimentos de onda e quantidade de energia.	26
Figura 4 - Sequência padrão do processamento e análise de imagem (PADI)	30
Figura 5 - Fotografia de uma placa de Petri com uma cultura de <i>Monascus ruber</i> em meio PDA.	43
Figura 6 - Hifas de <i>Monascus ruber</i> observadas em microscópio, com magnificação de 1000X.....	44
Figura 7 –Estruturas dos principais pigmentos produzidos por fungos <i>Monascus ruber</i>	46
Figura 8 - Biossíntese dos pigmentos do <i>Monascus ruber</i>	47
Figura 9 - Fluxograma nas atividades do presente trabalho.	48
Figura 10 - Gabarito (fundo) para a retirada das amostras fotográficas.....	54
Figura 11 - Processamento digital de imagem utilizando a transformação em 8 bits, padronizando-se a imagem em 256 tonalidades de cinza.....	55
Figura 12 - Exemplos de aplicação de algumas máscaras gráficas para a determinação do melhor método para avaliação da propagação micelial e pigmentar do fungo <i>Monascus ruber Thieghan IOC 2225</i>	56
Figura 13 - Arquitetura lógica para o fluxo de dados na elaboração dos cálculos a partir da interação entre os parâmetros primários e secundários correlacionados com o tempo.	60
Figura 14 - Caracterização dos parâmetros morfométricos da macromorfologia.	62

Figura 15 - Caracterização e identificação das regiões miceliais, pigmentares e do meio de cultivo.....	63
Figura 16 - Análise morfológica e pigmentar: região radial de amostragem.	64
Figura 17 - Espectro de absorbância correspondente aos experimentos do ponto central do planejamento estatístico.	66
Figura 18 - Gráficos de Pareto para significância das variáveis produção de pigmentos e suas relações proporcionais.....	69
Figura 19 - Superfícies de resposta (a,c,e) e curvas de nível (b,d,f) para a produção de pigmento amarelo em função das variáveis estudadas.....	73
Figura 20 - Superfícies de resposta (a,c,e) e curvas de nível (b,d,f) para a produção de pigmento laranja em função das variáveis estudadas..	76
Figura 21 - Superfícies de resposta (a,c,e) e curvas de nível (b,d,f) para a produção de pigmento vermelho em função das variáveis estudadas.	79
Figura22 - Curvas de nível para a relação vermelho/amarelo (a,b,c) vermelho/laranja (d,e,f) e amarelo/laranja (g,h,i)..	82
Figura 23 - Arquitetura simplificada do <i>plugin</i> de extração dos dados.....	85
Figura 24 - Painel gráfico automático para análise de dados – <i>Dashboard</i>	877
Figura 25 - Perfil da intensidade pigmentar na superfície da placa, micélio aéreo nas posições 0 mm, 20mm e 40 mm a partir do ponto de inoculação, ao longo do tempo de fermentação.	88
Figura 26 - Perfil da intensidade pigmentar no reverso da placa, micélio vegetativo nas posições 0 mm, 20mm e 40 mm a partir do ponto de inoculação, ao longo do tempo de fermentação.	88
Figura 27 - Exemplos de imagens de micrografias realizadas para a detecção de estruturas micromorfológicas do fungo <i>Monascus ruber</i>	91

Figura 28 - Aplicação e caracterização do perfil de propagação do fungo <i>Monascus ruber</i> Thieghan IOC 2225 utilizando a máscara gráfica “16 colors”: experimentos 1 a 6 do planejamento estatístico.....	92
Figura 29 - Aplicação e caracterização do perfil de propagação do fungo <i>Monascus ruber</i> Thieghan IOC 2225 utilizando a máscara gráfica “16 colors”: experimentos 7 a 12 do planejamento estatístico	93
Figura 30 - Aplicação e caracterização do perfil de propagação do fungo <i>Monascus ruber</i> Thieghan IOC 2225 utilizando a máscara gráfica “16 colors”: experimentos 13 a 17 do planejamento estatístico.....	94
Figura 31 - Halos pigmentares e miceliais com representação gráfica proporcional no tempo de 480 horas para os experimentos do planejamento estatístico	95
Figura 32 - Área pigmentar e micelial com representação gráfica proporcional no período de fermentação de 480 horas, correspondente aos experimentos 1 a 9 do planejamento estatístico	96
Figura 33 - Área pigmentar e micelial com representação gráfica proporcional no período de fermentação de 480 horas, correspondente aos experimentos 10 a 17 do planejamento estatístico	97
Figura 34 - Perfil da velocidade radial micelial correspondente aos experimentos 1 ao 10 do planejamento estatístico	99
Figura 35 - Perfil da velocidade radial micelial correspondente aos experimentos 11 ao 17 do planejamento estatístico	100
Figura 36 - Perfil da velocidade radial de propagação pigmentar correspondente aos experimentos 1 ao 10 do planejamento estatístico	102
Figura 37 - Perfil da velocidade radial de propagação pigmentar correspondente aos experimentos 11 ao 17 do planejamento estatístico	103
Figura 38 - Variação da intensidade pigmentar, que compreende a diferença colorimétrica do meio de cultivo no tempo inicial (0 h) com o tempo final (480 h).	104
Figura 39 - Gráficos de Pareto para significância das variáveis da caracterização morfológica.....	107

Figura 40 - Superfícies de resposta (a, c, e) e curvas de nível (b, d, f) para a área micelial em função das variáveis estudadas..... 110

Figura 41 - Superfícies de resposta (a, c, e) e curvas de nível (b, d, f) para a velocidade de propagação (crescimento) micelial em função das variáveis estudadas. 113

Figura 42 - Superfícies de resposta (a, c, e) e curvas de nível (b, d, f) para a velocidade de propagação pigmentar em função das variáveis estudadas..... 116

Figura 43 - Superfícies de resposta (a, c, e) e curvas de nível (b, d, f) para a variação da intensidade pigmentar no meio de cultivo em função das variáveis estudadas 119

Figura 44 - Espectrofotometria de varredura, da placa total e pontual, a partir no ponto de inoculação, conforme a seção 4.5.4.1. 123

Figura 45 – Relação da posição radial a partir do ponto de inoculação e quantidade de pigmentos amarelo, laranja e vermelho 126

Figura 46 - Micrografia óptica do experimento otimizado, na região interna , intermediária e externa a partir do ponto de inoculação. 127

Figura 47 - Micrografias mostrando cristais pigmentares produzidos pelo fungo *Monascus ruber Thieghan IOC 2225* durante o experimento realizado nas condições otimizadas* 128

Figura 48 - Perfil de propagação do fungo no experimento conduzido nas condições otimizadas, destacando a região micelial e halo pigmentar, aplicação e caracterização do fungo *Monascus ruber Thieghan IOC 2225* utilizando a máscara gráfica “16 colors”. 130

Figura 49 – Caracterização dos parâmetros morfométricos para cada halo micelial e pigmentar, a partir da média do experimento otimizado, perfil de propagação do fungo *Moanscus ruber Thieghan IOC 2225* utilizando a máscara gráfica “16 colors”. 131

Figura 50 – Produtividade micelial e razão indireta de pigmentação extracelular 135

Figura 51 – Estimativa da produção de pigmentos usando o processamento e análise de imagens (PADI) a partir da quantificação pigmentar dos halos 136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Intervalo de níveis (tons) de intensidade a partir da capacidade de armazenamento em <i>bits</i>	26
Tabela 2 - Campo de Aplicações de imagens obtidas por processamento digital de diversas fontes.....	27
Tabela 3 - Aplicações de determinados comprimentos de onda para mensuração e identificação, a partir do satélite Landsat da Nasa.....	27
Tabela 4 - Tipos de resolução de uma imagem utilizadas para o processamento e análise de imagens (PADI).	28
Tabela 5 - Intervalo de comprimento de onda, cor absorvida e complementar do espectro visível.	29
Tabela 6 - Tipos de corantes e sua definição.	33
Tabela 7 - Corantes artificiais autorizados para consumo: origem, aplicação e efeitos adversos.	35
Tabela 8 - Principais corantes encontrados na natureza em plantas e animais. ..	36
Tabela 9 - Microrganismos produtores de pigmento: cor e molécula.	38
Tabela 10 - Planejamento estatístico composto central estrela rotacional 2 ³ (valores codificados das variáveis entre parênteses).	51
Tabela 11 - Procedimentos adotados para o processamento e análise de imagem - PADI.	53
Tabela 12 - Produção de pigmentos (U.A.g ⁻¹) e suas relações proporcionais, sob diferentes valores de pH, concentração de glicose (g.L ⁻¹) e concentração de glutamato monossódico (g.L ⁻¹).....	68
Tabela 13 - Análise de variância para o modelo empírico ajustado para a variável resposta produção de pigmento amarelo.....	72
Tabela 14 - Análise de variância para o modelo empírico ajustado para a variável resposta produção de pigmento laranja.	74

Tabela 15 - Análise de variância para o modelo empírico ajustado para a variável resposta produção de pigmento vermelho.....	77
Tabela 16 - Análise de variância para o modelo empírico ajustado para as variáveis respostas produção de pigmentos vermelho/anarelo, vermelho/laranja, amarelo/laranja.....	81
Tabela 17 - Relação de experimentos com presença ou ausência de pigmentos e estruturas micromorfológicas do fungo nas diferentes regiões (halo).....	90
Tabela 18 - Valores obtidos para as variáveis resposta morfológicas/morfométricas do perfil de propagação do fungo <i>Monascus ruber</i> Thieghan IOC 2225 sob diferentes valores de pH, concentração de glicose (g.L^{-1}) e concentração de glutamato monossódico (g.L^{-1})	106
Tabela 19 - Análise de variância para o modelo empírico ajustado para a variável resposta área micelial.....	109
Tabela 20 - Análise de variância para o modelo empírico ajustado para a variável resposta velocidade de propagação micelial.....	111
Tabela 21 - Análise de variância para o modelo empírico ajustado para a variável resposta velocidade de propagação pigmentar.....	114
Tabela 22 - Análise de variância para o modelo empírico ajustado para a variável resposta variação da intensidade pigmentar no meio de cultivo.....	117
Tabela 23 - Valores preditos pelos modelos ajustados para as variáveis resposta produção de pigmentos e razão entre concentrações de pigmentos e resultados obtidos no experimento de confirmação das predições dos modelos.....	121
Tabela 24 - Valores preditos pelos modelos ajustados para as variáveis resposta da caracterização macromorfológica e resultados obtidos no experimento de confirmação das predições dos modelos.....	122
Tabela 25 - Espectrofotometria de varredura, da placa inteira e pontual a partir do ponto de inoculação, conforme a seção 4.5.4.1.	125
Tabela 26 —Quantidade de pigmentos (U.A.g^{-1}) e relação proporcional em cada halo da média do experimento otimizado.....	133

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVO	22
2.1 Objetivos específicos	22
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
3.1 Processamento digital de imagem e sua aplicação em biotecnologia .	23
3.2 Percepção humana - imagem	23
3.3 Imagem digital.....	24
3.3.1 Imagem digital: resolução e cor	28
3.4 Etapas do processamento e análise de imagem (PADI).....	29
3.5 Software <i>ImageJ</i>	32
3.6 A cor como característica sensorial	32
3.7 Pigmentos	33
3.7.1 Pigmentos sintéticos	34
3.7.2 Pigmentos naturais.....	36
3.7.2.1 Pigmentos microbianos.....	37
3.8 Fungos – produção de pigmentos	39
3.8.1 Fungos do gênero <i>Monascus</i> e sua aplicação na produção de biopigmentos.....	41
3.8.1.1 <i>Monascus ruber</i> - morfologia	43
3.8.1.1.1 Macromorfologia	43
3.8.1.1.2 Micromorfologia	44
3.8.2 Pigmentos de <i>Monascus</i>	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1 Micro-organismo.....	49
4.2 Preparo do inóculo	49
4.3 Condições de cultivo	49
4.4. Planejamento experimental	50
4.5 Métodos analíticos.....	52
4.5.1 Quantificação de pigmentos produzidos	52

4.5.2 Processamento e análise digital de imagem (PADI) – caracterização morfológica	52
4.5.2.1 Processamento digital de imagens – (PDI)	54
4.5.2.1.1 Área	57
4.5.2.1.2 Variação da intensidade média de pigmentação	57
4.5.2.1.3 Desvio da intensidade média	58
4.5.2.1.4 Fator forma	58
4.5.2.2 Análise digital de imagens – (ADI)	59
4.5.2.2.1 Raio de deslocamento	60
4.5.2.2.2 Velocidade de deslocamento	61
4.5.2.2.3 Espessura	61
4.5.3 Análise micromorfológica - Identificação da área pigmentar e micelial	62
4.5.4 Caracterização do sistema nas condições otimizadas	63
4.5.4.1 Análise micromorfológica	63
4.5.4.2 Quantificação de pigmentos	64
4.5.4.3 Macromorfologia	65
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1 Produção de pigmentos	65
5.1.1 Perfil pigmentar: espectro de absorbância na região do visível ...	65
5.1.2 Avaliação, empregando planejamento estatístico, da influência das variáveis pH, concentração de fonte de carbono e concentração de fonte de nitrogênio na produção de pigmentos pelo fungo <i>Monascus</i> <i>ruber Thieghan IOC 2225</i>	66
5.1.2.1 Modelos empíricos ajustados para explicar a influência das concentrações de glicose e glutamato monossódio e do pH do meio na produção de pigmentos e nas razões entre suas concentrações	71
5.2 Processamento e análise digital de imagens – PADI	84
5.2.1 Processamento digital de imagens – PDI	84
5.2.1.1 Elaboração do algoritmo de extração dos dados	84
5.2.2 Análise digital de imagens - ADI	86
5.2.2.1 Elaboração do algoritmo de análise dos dados	86

5.2.3 Análise, por PADI, dos resultados obtidos com a execução do planejamento estatístico: caracterização macromorfológica	87
5.2.3.1 Área	95
5.2.3.2 Velocidade radial de propagação micelial	98
5.2.3.3 Velocidade radial de propagação pigmentar	101
5.2.3.4 Variação da Intensidade pigmentar	104
5.2.4 Avaliação, empregando planejamento estatístico, da influência das variáveis pH, concentração de fonte de carbono e concentração de fonte de nitrogênio no perfil de propagação macromorfológico pelo fungo <i>Monascus ruber</i> Thieghan IOC 2225	105
5.2.4.1 Modelos empiricos ajustados para explicar a influência das concentrações de glicose e glutamato monossódio e do pH do meio de cultivo no perfil de propagação macromorfológica: area micelial, velocidade de propagação micelial, velocidade propagação pigmentar, variação da intensidade pigmentar.	108
5.2.5 Otimização das condições de cultivo e confirmação do modelo	120
5.2.5.1 Análise espectrofotométrica e micromorfológica do experimento condizido nas condições otimizadas	124
5.2.5.2 Experimento otimizado – Análise morfométrica: área, espessura, deslocamento radial, intensidade média, desvio médio da intensidade pigmentar, fator forma e o inter-relacionamento entre a produção de pigmentos e as características morfométricas.	129
6 CONCLUSÃO	137
7 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	139
REFERÊNCIAS	140
APÊNDICE A – Espectrofotometria de varredura dos experimentos do planejamento estatístico	153
APÊNDICE B – Algoritmo de extração de dados: <i>Monascus ruber</i> aplicação da mascara gráfica e extração de dados macromorfológicos aplicados no <i>ImageJ</i>	155
APÊNDICE C – Algoritmo de extração de dados: <i>Monascus ruber</i> , varredura para deteminar o perfil de padrão da intensidade pigmentar ao longo da posição radial no meio fermentativo aplicado no <i>ImageJ</i>	159

1 INTRODUÇÃO

A caracterização de aspectos morfológicos e padrões da natureza possibilitam compreender e avaliar a expressão dos diversos parâmetros que influenciam no comportamento de determinado sistema natural. Uma das técnicas de uso crescente e com potencial para caracterização qualitativa e quantitativa de aspectos morfológicos de microrganismos corresponde ao processamento e análise digital de imagens (PADI), técnica utilizada em diversas áreas do conhecimento (GONZALEZ; WOODS, 2000; GALLON, 2013; AZEVEDO; CONCI; LETA, 2018).

Dificuldades para acompanhamento do perfil de uma fermentação em estado semissólido ao longo do tempo têm sido obstáculo para análise dos parâmetros importantes no processo e que influenciam nos metabólitos produzidos, pela falta de ferramentas para obtenção de dados e caracterização do perfil de propagação do crescimento e da morfologia do microrganismo.

Vários microrganismos são cultivados em fermentação em estado semissólido e, entre estes, os fungos filamentosos apresentam relevância econômica, utilizando-se dos meios de cultivo para obter os substratos necessários e como suporte para sua propagação. Entre os metabólitos produzidos pelos fungos filamentosos, destacam-se os pigmentos, os quais são empregados em diversos setores industriais, como o alimentício.

De fato, entre os atributos sensoriais, a cor é um dos primeiros observados pelo consumidor no momento de escolha e aquisição de alimentos. Na indústria alimentícia, as cores são importantes para imitar, realçar ou restituir a aparência original de um produto, podendo ser adicionadas em diferentes etapas da produção, incluindo estocagem, processamento, armazenamento e distribuição, com a finalidade de tornar o alimento visualmente mais atraente (CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002; KONGRUANG, 2011; WIBOWO et al., 2015).

No contexto atual, existe uma crescente preocupação dos consumidores sobre efeitos prejudiciais dos pigmentos sintéticos à saúde, que são comumente utilizados na indústria de alimentos devido a seu baixo custo e facilidade de obtenção (DUFOSSÉ, 2006; VELMURUGAN et al., 2010). Assim, a utilização de pigmentos naturais em alimentos tem aumentado nos últimos anos, devido ao mercado consumidor e ao desenvolvimento de novos ingredientes naturais. Entre

as fontes de pigmentos naturais estão plantas, flores, frutos, animais e micro-organismos que podem ser fungos, bactérias e microalgas (MEINICKE et al., 2012; SHAHID; SHAHID-UL-ISLAM; MOHAMMAD, 2013).

Pigmentos microbianos, por sua vez, apresentam-se como uma alternativa viável aos de origem animal ou vegetal, porque não apresentam problemas de sazonalidade e possuem elevada produtividade (CARVALHO, 2005). Micro-organismos pertencentes aos gêneros *Monascus*, *Rhodotorula*, *Aspergillus* e *Penicillium*, têm sido reportados como potenciais produtores de biopigmentos (PANDEY; LARROCHE; SOCCOL, 2008). Entre as moléculas produzidas, destacam-se os carotenoides, melaninas, flavinas, quinonas e monascinas (LEE et al., 2016; MARIOA et al., 2016; CHACÓN-ORDOÑEZ et al., 2017).

Entre as alternativas disponíveis, os pigmentos de *Monascus* vêm sendo usados em alimentos tradicionais, em países orientais, há séculos. No entanto, a pesquisa sobre a produção e aplicação industrial desses pigmentos é mais recente e ganhou força especialmente na última década, em conjunção com a produção de outros aditivos alimentares por fermentação. A maioria da literatura disponível sobre fungos produtores de pigmentos por alimentos descreve o uso de espécies deste gênero, que produz pigmentos os quais são bons corantes devido à estabilidade na faixa de pH de 2 – 10, estabilidade ao calor e autoclavagem e por exibir diferentes cores (MAPARI et al., 2005).

O gênero *Monascus* envolve três principais espécies - *M. pilosus*, *M. purpureus* e *M. ruber* - pertencendo à família *Monascaceae* e à classe *Ascomyceta*, cuja característica é a habilidade para produzir metabólitos secundários de estruturas policetídicas, algumas delas com pigmentação amarela, laranja e vermelha. Facilmente encontrados em muitos ecossistemas, esses fungos foram usados originalmente na China e Tailândia, para a preparação de *angkak*, um arroz de cor vermelho escura com vários usos, desde para conferir cor para outros produtos como vinho, queijo e carne, até uso medicinal e conservador de carne (BLANC, 1995; HAMDÍ et al., 1997; LIAN et al., 2015; LIU; WU; LV, 2015; NING et al., 2017).

A produção qualitativa e quantitativa dos pigmentos está relacionada com vários fatores, como o tipo de fermentação (submersa ou fermentação sólida), as espécies de micro-organismos, pH, fontes de carbono, nitrogênio, nutrientes, oxigênio dissolvido e aeração. Entre esses fatores, o pH tem se revelado

essencial na produção de pigmentos por espécies de *Monascus*, pois influencia o crescimento radial e a produção de pigmentos, particularmente o perfil de produção dos pigmentos amarelo, laranja e vermelho (SHI et al., 2015; VENDUSCOLO et al., 2016).

Os pigmentos de *Monascus* são normalmente produzidos por processos biotecnológicos em estado sólido, em farelo de trigo, palha de arroz, milho, soja, batata, bagaço de maçã e bagaço de malte (VELMURUGAN, 2010; PANESAR; KAUR; PANESAR, 2015; OLIVEIRA et al., 2016).

Observa-se que diversos substratos vêm sendo estudados para o crescimento de *Monascus* tanto por fermentação em estado sólido quanto por fermentação submersa, sendo que o melhor crescimento geralmente é observado em glicose (HAJJAJ et al., 2000, MEINICKE et al., 2012).

O presente trabalho teve como finalidade elaboração de técnicas de caracterização do perfil de crescimento, propagação e produção de pigmentos utilizando o fungo *Monascus ruber* Tieghem IOC 2225, empregando ferramentas de processamento e análise digital de imagens (PADI). Neste sentido, foi elaborado um planejamento estático composto central rotacional estrela 2^3 , com variação dos níveis de três fatores, sendo eles o pH a concentração de glicose e a fonte de nitrogênio (glutamato monossódico), para a maximização da produção de pigmentos.

2 OBJETIVO

O objetivo geral deste trabalho foi a elaboração de técnicas e identificação de parâmetros para caracterização do perfil de crescimento, propagação e produção de pigmentos do fungo *Monascus ruber* Tieghem IOC 2225 em meio semissólido, utilizando-se de ferramentas de planejamento estatístico e de processamento e análise digital de imagens (PADI), visando-se à compreensão da influência de condições de cultivo e o desenvolvimento de estratégias e técnicas para maximização da produção de pigmentos.

2.1 Objetivos específicos

Como objetivos específicos, teve-se:

- a) Executar experimentos conforme um planejamento estatístico composto central rotacional estrela, com variação dos níveis de pH, concentração de glicose e de glutamato monossódico, visando-se à determinação da influência destas variáveis no processo e à maximização da produção de pigmentos amarelo, laranja e vermelho pelo fungo filamentoso *Monascus ruber* Tieghem IOC 2225 em meio semissólido;
- b) A partir do processamento e análise digital de imagem (PADI), identificar parâmetros adequados para caracterizar o perfil fisio-morfológico do crescimento e propagação do fungo filamentoso *Monascus ruber* Tieghem IOC 2225 em meio semissólido.
- c) Elaborar técnicas e algoritmos especialistas capazes de extrair informações para análise quantitativa e qualitativa visando à determinação de padrões morfológicos (micro e macromorfológicos) do fungo no meio semissólido;
- d) Elaborar ferramentas capazes de criar mecanismos de rastreabilidade a partir dos dados extraídos do PADI, possibilitando o desenvolvimento de painéis gráficos inteligentes e dinâmicos, para a compreensão do bioprocessamento de fermentação em estado semissólido.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Processamento digital de imagem e sua aplicação em biotecnologia

O processamento e análise digital de imagens (PADI) pode ser definido como uma extensão da observação visual, extraindo de uma imagem informações qualitativas e quantitativas acerca de uma determinada amostra (GOMES, 2001).

A área de processamento de imagens em conjunto com a análise computacional vem ganhando crescente interesse, em diversas áreas do conhecimento, tais como: medicina; astronomia; geografia; biologia; indústria; arqueologia; física; engenharias; entre outras. Por viabilizar grande número de aplicações no aprimoramento de informações em imagens para posterior investigação e com a possibilidade da análise automática destas informações, torna-se uma ótima técnica para redução de gastos, de tempo e de erros nos processos, além da possibilidade de criação de padrões de qualidade (GONZALEZ; WOODS, 2000; GALLON, 2013; AZEVEDO; CONCI; LETA, 2018).

Na biotecnologia, existem diversos trabalhos que se utilizam do PADI, como em análise da síntese e atividade *in vitro* de anticorpos (AQUINO et al., 2011); contagem de células e parasitas (TENÓRIO et al., 2005; LIESEN et al., 2010; GOMES et al., 2013; CARVALHO et al., 2014); contagem de elementos em imagens para realizar uma análise estereológica na área médica (OLIVEIRA, 2013); e caracterização de imagens estereológicas e biológicas (bactérias e leveduras) (SILVA et al., 2016).

3.2 Percepção humana - imagem

A visão é um dos sentidos do ser humano, os quais permitem compreensão e interação com a natureza, sendo a responsável pelo maior volume de dados processados pelo cérebro (SCLACO, 2005).

O olho possui grandes quantidades de receptores, os quais são sensores que captam as informações de determinada cena (imagem). Entre os receptores,

destacam-se os cones e os bastonetes. Os Cones são responsáveis pela visão fotóptica (luz clara), são sensíveis a cores e têm grande capacidade de discernir detalhes de uma imagem. Os bastonetes, por sua vez, determinam a percepção do campo geral da visão, não têm percepção de cores e são responsáveis pela visão estocópica (luz escura) (SCLACO, 2005, GONZALEZ; WOODS, 2010).

Existem, de maneira resumida, três características da percepção humana: a acuidade, que é capacidade de distinguir detalhes; o contraste, o qual corresponde ao gradiente entre os tons (brilho) mais luminosos e mais escuros de uma imagem; e a cor, a qual indica o comprimento de onda da luz refletida por determinado corpo e que atinge os olhos. A Figura 1 demonstra a sensibilidade relativa do olho humano aos diferentes comprimentos de onda. (SCLACO, 2005; SOLOMON; BRECKON, 2011).

Figura 1 - Sensibilidade relativa do olho humano aos diferentes comprimentos de onda da luz visível.

Fonte: Sclaco (2005).

3.3 Imagem digital

Uma imagem digital pode ser definida como uma função bidimensional $F(x,y)$, conforme a Figura 2, em que x e y são coordenadas espaciais de um plano e F representa a intensidade ou nível de algum parâmetro, seja em cinza ou em

cor, como o modelo RGB (*Red, Green, Blue*), que são processados a partir de um computador digital (GONZALEZ; WOODS, 2010; SOILLE, 2013). A imagem digital é composta de determinado número de elementos, cada um possuindo uma posição no plano bidimensional, e com valores específicos, que são chamados de elementos pictóricos ou pixels.

O pixel (*picture element*) é o elemento básico de uma imagem. Sua forma é retangular ou quadrada e cada um possui apenas uma intensidade ou nível de cor, sendo que a faixa de níveis (tons) é referenciada por intervalos numérico de 2, 4, 8, 16, 24 ou 32 *bits*, e está relacionado à capacidade de processamento do dispositivo, determinando a quantidade de cores (níveis de intensidade ou tons) disponíveis.

Figura 2 - Imagem bidimensional em um arranjo de pixels e sua intensidade em níveis (tons) de cinza.

Fonte: Queiroz (2006).

Este parâmetro está relacionado à quantização da imagem, ou seja, a quantidade de cores ou tons que pode ser representada, conforme a Tabela 1 (IGNACIO, 2013).

Tabela1 - Intervalo de níveis (tons) de intensidade a partir da capacidade de armazenamento em *bits*.

<i>Bits</i>	Intervalo de Intensidade (tons)
8	256
16	65.535
32	4.294.967.295
64	18.446.744.073.709.551.615

Fonte: Pozzer (2006).

As imagens exercem o papel mais importante da percepção humana, sendo neste caso limitada à banda visual do espectro eletromagnético (EM). Diferente da percepção humana, os aparelhos de processamento de imagem cobrem quase todo EM, variando de ondas gama a ondas de rádio. A Figura 3 mostra as bandas espectrais, a quantidade de energia, frequência e o comprimento de onda, variando de raios gama (mais alta energia) à onda de rádio (mais baixa energia) (GONZALEZ; WOODS, 2010; SOILLE, 2013).

Figura 3 - Bandas espectrais de diversos comprimentos de onda e quantidade de energia.

Fonte: Adaptado Gonzalez e Woods (2010).

As áreas de aplicação do processamento digital de imagens têm grande variedade, e geralmente são categorizadas pela sua fonte. As ondas eletromagnéticas podem ser interpretadas como ondas senoidais de vários comprimentos que se propagam, ou também podem ser entendidas como um

fluxo de partículas sem massa que contém uma determinada quantidade de energia, denominada fóton (GONZALEZ; WOODS, 2010).

As fontes incluem ultrassom, microscopia eletrônica e imagens geradas por computador, incluindo um amplo e variado campo de aplicações. A Tabela 2 mostra as aplicações do processamento de imagens de diferentes fontes, enquanto que a Tabela 3 apresenta um exemplo de aplicações de processamento de imagens obtidas a partir de um satélite da NASA.

Tabela 2 - Campo de Aplicações de imagens obtidas por processamento digital de diversas fontes.

Tipo	Aplicação
Raios gama	Medicina Nuclear e observações astronômicas
Raios X	Medicina Diagnóstica, astronomia, indústria
Raios Ultravioleta	Microscopia, lasers, imagens biológicas
Raios Visíveis e Ultravioleta	Microscopia ótica, indústria, sensoriamento remoto
Banda de Micro-ondas	Radar
Bandas de rádio	Medicina (Ressonância magnética), Astronomia

Fonte: Adaptado de Gonzalez e Woods (2010); Soille (2013).

Tabela 3 - Aplicações de determinados comprimentos de onda para mensuração e identificação, a partir do satélite Landsat da Nasa.

Identificação	Comprimento de onda (μm)	Características e utilizações
Azul visível	0,45 – 0,52	Máxima penetração na água
Verde visível	0,52 – 0,60	Mensuração do vigor de plantas
Vermelho visível	0,63-0,69	Discriminação da vegetação
Infravermelho próximo	0,76 – 0,90	Mapeamento da biomassa e linha costeira
Infravermelho médio	1,55 – 1,75	Conteúdo de umidade no solo e vegetação
Infravermelho terminal	10,4 – 12,5	Mapeamento térmico

Fonte: Gonzalez e Woods (2010).

3.3.1 Imagem digital: resolução e cor

A resolução é um parâmetro muito importante na imagem e pode ser definida como a quantidade de detalhes para uma grandeza dividida em determinados intervalos. A Tabela 4 apresenta as grandezas relacionadas à resolução de uma imagem.

Tabela 4 - Tipos de resolução de uma imagem utilizadas para o processamento e análise de imagens (PADI).

Resolução	Descrição
Resolução Espacial	Referente à proximidade entre as amostras (pontos analisados) de uma imagem. É a distância entre dois pixels
Resolução Espectral	Referente à quantidade de cores espectrais existente em uma imagem.
Resolução Radiométrica	Referente à quantidade distinta de intensidade luminosa (iluminância)
Resolução Temporal	Referente à unidade de tempo de duas amostras; caracteriza imagens dinâmicas (sequência de imagens).

Fonte: Sclaco (2005).

A cor é um grande descritor que facilita a detecção e extração de características de uma determinada cena (imagem), as quais posteriormente podem ser usadas para a compreensão de determinados padrões morfológicos.

As suas características são atribuídas a uma estrutura química específica denominada cromóforo e é definida pelas médias de frequência das faixas de onda que as suas moléculas constituintes refletem, sendo formada em um objeto ao não absorver os raios que correspondem à frequência da cor aparente (RESNICK; HALLIDAY, 1973; TIPLER; MOSCA, 2000).

Nos compostos orgânicos, ao absorver uma energia incidente, seja ela visível ou não, a molécula sofre uma transição eletrônica, ocorrendo a promoção de elétrons de seu estado fundamental para um estado mais excitado. No caso de um corante absorver a luz visível, ele vai emitir o complemento da cor absorvida (TIPLER; MOSCA, 2000). A Tabela 5 mostra a cor absorvida e complementar do espectro visível.

Tabela 5 - Intervalo de comprimento de onda, cor absorvida e complementando espectro visível.

Intervalo de comprimento de onda (nm)	Cor absorvida	Cor complementar (observada)
380 – 435	Violeta	Amarelo esverdeado
435 – 480	Azul	Amarelo
480 – 490	Azul	Esverdeado Laranja
490 – 500	Verde azulado	Vermelho
500 – 560	Verde	Roxo
560 – 580	Verde amarelado	Violeta
580 – 595	Amarelo	Azul
595 – 605	Laranja	Azul esverdeado
605 – 780	Vermelho	Verde azulado

Fonte: Adaptado de Tipler e Mosca (2000).

O processamento digital de imagens coloridas pode ser dividido em duas categorias: imagens coloridas e *pseudocolor*. Na primeira a imagem é adquirida por um sensor que consegue representá-la em cores reais, sendo que na segunda categoria uma faixa de cores é atribuída a um determinado intervalo de tons de cor monocromática a fim de caracterizar algum parâmetro (GONZALEZ; WOODS, 2010).

A imagem em cores fornece características que facilitam sua compreensão, diferenciando os seus elementos. Entretanto, elas são muito subjetivas para cada observador e, para evitar discrepâncias com relação a sua percepção, alguns padrões internacionais foram criados. O órgão responsável pela padronização e elaboração de modelos colorimétricos e de fotometria é o CIE (*Comission Internationale de l' Eleriage*), criado em 1923 (SCLACO, 2005).

3.4 Etapas do processamento e análise de imagem (PADI)

O processamento e análise de imagens pode ser entendido como o conjunto de duas técnicas: o Processamento Digital de Imagens (PDI), que consiste no preparo da imagem para posteriores análises, em que são realizadas operações matemáticas e lógicas; e a Análise Digital de Imagens (ADI), que compreende a análise quantitativa do processo a partir da qual as regiões, partículas e objetos identificados na imagem são medidos (GOMES, 2001;

GONZALEZ; WOODS, 2010). A Figura 4 apresenta as etapas e o fluxo do processo do PADI.

Figura 4 - Sequência padrão do processamento e análise de imagem (PADI).

Fonte: Gomes (2001).

Nota: PDI - Processamento Digital de Imagens.

ADI - Análise Digital de Imagens.

Segundo Gomes (2001) e Gonzalez e Woods (2010), o PADI é realizado em 6 etapas:

- a) Aquisição da Imagem:** Para que uma imagem digital seja adquirida são necessários; um instrumento formador de imagem; um dispositivo físico sensível a uma faixa do espectro eletromagnético, capaz de produzir um sinal elétrico proporcional ao nível de energia percebida; e um digitalizador, que converterá a saída elétrica do dispositivo de sensoriamento físico para a forma digital;
- b) Pré-processamento:** Tem como objetivo melhorar a imagem, corrigindo algum defeito proveniente de sua aquisição e/ou realçando detalhes importantes para a análise;

- c) **Segmentação:** é a etapa crítica do fluxograma de PADI e corresponde à obtenção da imagem a partir da qual alguma informação será extraída. Seu objetivo principal é subdividir uma imagem em regiões ou objetos de interesse, formados pelo agrupamento de pixels contíguos;
- d) **Pós-Processamento:** é a etapa para a correção de defeitos residuais nas imagens, como a separação de objetos que se tocam, a eliminação de objetos dos quais não se deseja extrair nenhuma informação e o agrupamento de objetos para a formação de outros mais complexos. Estes procedimentos são realizados através de operações lógicas e morfológicas;
- e) **Extração de Atributos:** é a etapa na qual se inicia a análise da imagem propriamente. Nesta etapa são realizadas medidas na imagem segmentada ou pós-processada, ou até mesmo na imagem em tons de cinza. Através dessas medidas, os grupos de pixels são descritos por atributos característicos, gerando dados quantitativos para o objetivo final;
- f) **Reconhecimento e interpretação:** Separa os grupos e classifica o objeto a partir da função de decisão programada, afim de reconhecer e interpretar os padrões importantes para o objetivo do estudo.

Gonzalez e Woods (2010) reforçam ainda que o campo de processamento digital de imagens permite ir além das capacidades sensoriais humanas, uma vez que é possível empregar estes métodos em outras tecnologias de captura de imagens, não se limitando ao espectro visível das ondas eletromagnéticas, podendo varrer quase todo o espectro, desde ondas gama até ondas de rádio.

3.5 Software *ImageJ*

O *ImageJ* é um programa computacional livre de análise de imagens com código aberto, amplamente utilizado, que funciona em múltiplas plataformas (SCHNEIDER et al., 2012; RASBAND, 2013).

É um programa para processamento e análise de imagens desenvolvido por Wayne Rasband no *National Institute of Mental Health*, EUA, em linguagem Java. Com ele é possível exibir, editar, analisar, processar, salvar e imprimir imagens de 8, 16 e 32 bits. Permite o processamento de diversos formatos de imagem e suporta a técnica de empilhamento, isto é, uma série de imagens que compartilham uma única janela para animações. Além disso, a leitura de um arquivo de imagem pode ser feita paralelamente a outras operações. A janela contendo os resultados (área, perímetro, orientação, entre outros) permite que estes sejam exportados para um arquivo, por exemplo, no formato (xls) (Microsoft Excel).

No *ImageJ*, o cálculo das áreas é feito pela contagem de pixels das regiões selecionadas pelo usuário ou por um algoritmo específico. Atua na imagem pela intensidade, ou nível de cinza dos pixels. Em vários casos é necessário adicionar ao programa principal um *plugin*, que corresponde a um programa de computador usado para adicionar funções a outros programas maiores, provendo alguma funcionalidade especial (SCHNEIDER et al., 2012).

3.6 A cor como característica sensorial

No que se refere a cor, este atributo está ligado a vários aspectos da vida, é capaz de influenciar decisões do cotidiano. A cor para o consumidor é um fator importante para a seleção do produto final, em especial no setor alimentício, sendo que características como a aparência, segurança, percepção sensorial e aceitabilidade são influenciadas, uma vez que os seres humanos são instintivamente atraídos pelas cores (RODRIGUES, 2015). A ligação de cores com alimentos está relacionada ao desenvolvimento cognitivo, que depende de experiências vividas, sendo que produtos com cores agradáveis geram sensações mais prazerosas e indicam maior qualidade global para os consumidores (ASHFAQ; MASUD, 2002; RODRIGUES, 2015).

As cores são utilizadas em diferentes etapas da obtenção de produtos alimentícios com a finalidade de tornar o alimento visualmente mais atraente e também ajudar a identificar o aroma normalmente associado a determinados produtos, levando o consumidor a crer que determinada cor tem relação direta com certos atributos, como qualidade nutricional, aroma e textura (CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002; KONGRUANG, 2011; WIBOWO et al., 2015).

3.7 Pigmentos

Pigmentos naturais e sintéticos são utilizados em diversas áreas tais como na indústria de alimentos, na área têxtil, na produção de papel e indústria farmacêutica. A legislação brasileira define e classifica os pigmentos alimentícios pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) (BRASIL, 2010).

Os corantes alimentícios foram definidos a partir da resolução nº 4 de 1977, que os define como “a substância ou mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de um alimento” (BRASIL, 2010).

Foram divididos em naturais, sintéticos, idênticos aos naturais, inorgânicos e caramelo (Tabela 6) (KAPOR, 2001; CSERHÁTI, 2006; BRASIL, 2010).

Tabela 6 - Tipos de pigmentos e sua definição.

Tipo	Definição
Corante orgânico natural	Obtido a partir de vegetal, ou eventualmente, de animal, cujo princípio do corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado
Corante orgânico sintético	Aquele obtido por síntese orgânica mediante o emprego de processo tecnológico adequado
Corante orgânico sintético idêntico ao natural	É o corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural
Corante inorgânico	É aquele obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados a seu emprego em alimento.
Caramelo	Corante natural obtido pelo aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão.

Fonte: Brasil (2010).

O emprego de pigmentos em alimentos exige avaliação de sua toxicidade, solubilidade, estabilidade e reatividade química com os demais componentes do produto (BRASIL, 2010).

3.7.1 Pigmentos sintéticos

Os pigmentos sintéticos são utilizados em alimentos para melhorar a aparência dos produtos, além de possuírem características como estabilidade à luz, oxigênio e pH, uniformidade da cor, baixa contaminação microbiológica e baixos custos de produção (ALVES et al., 2008; VELOSO, 2012). Com essas propriedades, os pigmentos sintéticos são muito utilizados nas indústrias de alimentos, atingindo em torno de 90% dos processos (ENAYATZAMIR et al., 2009; ALMEIDA et al., 2010).

O uso de pigmentos sintéticos é controverso, fato este que aumenta a preocupação de consumidores quanto à segurança na ingestão e utilização dessas substâncias em alimentos (VELOSO, 2012).

São substâncias não encontradas na natureza, sendo em sua maioria advindos de produtos derivados do petróleo, carvão e derivados, que em uso excessivo ou prolongado conduzem a sérios riscos à saúde, pois possuem características mutagênicas e cancerígenas, além de acarretarem problemas ambientais e perturbações no eco equilíbrio da natureza, devido ao fato de não serem biodegradáveis.

A Tabela 7 descreve alguns pigmentos sintéticos autorizados para uso humano, o seu número INS (Sistema de identificação internacional), a quantidade de ingestão diária aceitável (IDA), o seu uso, e efeitos adversos (DUFOSSE, 2005; BULUT; AKAR, 2012; BABITHA, 2009; PORCO et al., 2017).

Tabela 7 – Corantes artificiais autorizados para consumo: origem, aplicação e efeitos adversos.

Corantes	IDA (mg/Kg)	Origem	Aplicação	Efeitos adversos
Amarelo crepúsculo INS E-110	10	Sintetizado a partir da tinta do alcatrão de carvão e tintas azoicas	Cereais, balas, caramelos, coberturas, xaropes, laticínios, gomas de mascar.	Alergia, produzindo urticária, angioedema e problemas gástricos.
Azul brilhante INS E-133	30	Sintetizado a partir da tinta do alcatrão de carvão	Laticínios, balas, cereais, queijos, recheios, gelatinas, licores, refrescos.	Hiperatividade em crianças, eczema e asma
Amarelo ou Vermelho Boudeuax INS E-123	5	Sintetizado a partir do alcatrão de carvão	Cereais, balas, laticínios, geleias, gelado, recheios, xaropes, preparados, líquidos	Deve ser evitado por pessoas sensíveis a aspirina. Esse corante já causou polêmica sobre sua toxicidade em animais de laboratório, sendo proibido em vários países.
Azul indigotina INS E-132	30	Tinta do alcatrão de carvão	Goma de mascar, iogurte, balas, caramelos, refrescos artificiais.	Náuseas, vômitos, hipertensão e alergia.
Vermelho Ponceau 4R INS E-124	10	Tinta do alcatrão de carvão	Frutas em caldas, laticínios, xaropes de bebidas, cereais, refrescos, refrigerantes, sobremesas.	Deve ser evitado por pessoas sensíveis a aspirina e asmáticos; pode causar anemia e doença renal.
Amarelo tartrazina INS E-102	7,5	Tinta do alcatrão de carvão	Laticínios, licores, fermentados, produtos de cereais, frutas, iogurtes.	Insônia e doença gastrointestinal.
Vermelho 40 INS E-139	30	Sintetizado quimicamente	Cereais, balas laticínios, sobremesas, refrescos.	Causa hiperatividade em crianças, eczema e doenças respiratórias.

Fonte: Adaptado de Prado e Godoy (2009); Barros e Barros (2010).

Nota: IDA - Ingestão diária aceitável.

INS - Sistema de identificação internacional.

3.7.2 Corantes naturais

Historicamente, os pigmentos naturais foram amplamente utilizados e comercializados até o advento dos pigmentos sintéticos no século XIX, como grande fonte de riqueza (CRISTEA; VILAREM, 2006).

A utilização de pigmentos naturais em alimentos tem aumentado recentemente, devido ao mercado consumidor e ao desenvolvimento de novos ingredientes. Entre as fontes de pigmentos naturais estão plantas, flores, frutos, animais e micro-organismos que podem ser fungos, bactérias e microalgas (MENDONÇA, 2011; MEINICKE et al., 2012; SHAHID; SHAHID-UL-ISLAM; MOHAMMAD, 2013).

Os corantes mais comumente encontrados na natureza (Tabela 8) extraídos de plantas e animais, são divididos em cinco classes principais: tetrapirrol, tetraterpeno ou caroteno, flavonoide, antraquinona e betalaína (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009; MENDONÇA, 2011; CHACÓN-ORDÓÑEZ et al., 2017).

Tabela 8 - Principais corantes encontrados na natureza em plantas e animais.

Classe	Corante	Cor	Fontes de obtenção
Tetrapirrol	Clorofila	Verde	Folhas verdes
	Astaxantina	Vermelho	Microalgas, salmão, camarão.
	Crocina	Amarelo	Açafrão
	Capsorrubina	Amarelo	Páprica
Tetraterpeno	Delfinidina	Amarelo	Maracujá
	Bixina	Vermelho	Semente de urucum
	Luteolina	Amarelo	Frutas, flores e vegetais
	Licopeno	Vermelho	Tomate, melancia
Flavonóide	Cianidina	Vermelho/roxo	Cereja, morango, açaí
	Pelargonidina	Vermelho/roxo	Morango, amora vermelha
	Campferol	Vermelho/roxo	Uva
Antraquinona	Ácido Cármico	Vermelho	Cochonilha (inseto)
Betalaína	betanina	Vermelho/roxo	Beterraba

Fonte: Chattopadhyay et al. (2008); Mendonça (2011); Piacentini, Vasconcelos e Farley (2013); Mereddy et al. (2017); Sankar et al. (2017).

A recente preocupação com a origem e os efeitos dos constituintes dos alimentos pelos consumidores que buscam um estilo de vida mais saudável e sustentável, provoca uma pressão no mercado, exigindo-se alterações na legislação e na formulação de alimentos com menos ingredientes artificiais e contribuindo assim para o ressurgimento de pesquisas e o desenvolvimento da produção de corantes naturais (GRIFONI et al., 2009; RODRIGUES, 2015). Assim, o uso de pigmentos naturais tem recebido crescente interesse por fabricantes de alimentos e seus consumidores, substituindo gradualmente os corantes sintéticos (DAWSON, 2008; RODRIGUES, 2015).

3.7.2.1 Pigmentos microbianos

A produção biotecnológica de pigmentos microbianos é uma alternativa com grande potencial para a substituição de corantes químicos usados em indústrias e laboratórios, pois eles apresentam rápida taxa de crescimento e viabilidade de desenvolvimento, independem de condição climática e em geral os substratos empregados têm baixo custo (ZHAO; LU; QIN, 1998; PALANICHAMY et al., 2011).

A produção de biopigmentos por micro-organismos é um método promissor, mas existem alguns obstáculos e pontos a serem otimizados. Entre eles estão as exigências da legislação por testes toxicológicos dispendiosos, custo do processamento, incluindo o modo de fermentação, rastreabilidade e falta de técnicas da gestão qualidade para o monitoramento da produção, extração e purificação, além da aceitação pelos consumidores de um material proveniente de microrganismos, os quais são frequentemente relacionados a efeitos patogênicos (WISSGOTT; BORTLIK, 1996; MAPARI et al., 2005; PANESPAR; KAUR; PANESAR, 2015).

Micro-organismos como bactérias e fungos são reconhecidos como potenciais produtores e, de acordo com o meio em que se encontram, produzem diversos tipos de pigmentos, como carotenoides, melaninas, flavinas, quinonas e, mais especificamente, monascinas, violaceína, conforme a Tabela 9.

Dentre os micro-organismos, podem-se citar como produtores de pigmentos os fungos pertencentes aos gêneros *Monascus*, *Rhodotorula*,

Aspergillus e *Penicillium* (MENDEZ et al., 2011), além de espécies de bactérias como *Serratia marcescens*, *Pseudomonas magnesorubra*, *Vibrio psychroerythrous*, *S. rubidaea*, *Vibrio gazogenes*, *Alteromonas rubra*, *Rugamonas rubra*, *Streptoverticillium rubrireticulie*, *Streptomyces longisporus* (DUFOSSE, 2006; GUPTA et al., 2011).

Tabela 9 - Microrganismos produtores de pigmentos: cor e molécula.

Micro-organismo	Cor	Molécula	Referências
Fungos Filamentosos			
<i>Monascus spp.</i>	Amarelo	Ankaflavia	Hsu et al. (2013)
<i>Penicillium oxalicum</i>	Vermelho	Antraquinoma	Yao et al. (2016)
<i>Blakeslea trispora</i>	Vermelho	Licopeno	Jones, Hohn e Leathers (2004)
<i>Fusarium sporotrichioides</i>	Vermelho	Licopeno	Jones, Hohn e Leathers (2004)
<i>Monascus spp.</i>	Vermelho	Monascorubramin	Morgavi, Martin e Boudra (2013)
<i>Ashbya gossypii</i>	Amarelo	Riboflavina	Santos et al. (2005)
<i>Monascus spp.</i>	Laranja	Rubropunctatina	Jo et al. (2014)
<i>Blakeslea trispora</i>	Amarelo-Laranja	β -caroteno	Ribeiro, Barreto e Coelho (2011)
<i>Monascus roseus</i>	Laranja-Rosa	Cantaxantina	Malik, Tokkas e Goyal (2012)
<i>Haematococcus</i>			
<i>Pluvialis</i>	Vermelho	Astaxantina	Malik, Tokkas e Goyal (2012)
	Vermelho	Antraquinona	Malik, Tokkas e Goyal (2012)
Bactérias			
<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	Vermelho-rosa	Astaxantina	Flores-Cotera e Sanchez (2001)
<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	Vermelho-rosa	Astaxantina	Murata et al. (2012)
<i>Bradyrhizobium spp.</i>	Vermelho-rosa	Cantaxantina	Hannibal et al. (2000)
<i>Streptomyces echinoruber</i>	Vermelho	Rubrolone	Kirti et al. (2014)
<i>Flavobacterium spp.</i>	Amarelo	Zeaxantina	Soltani et al. (2010)
<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i>	Amarelo	Zeaxantina	Hümbelin et al. (2002)
Fungos - Leveduras			
<i>Phaffia rhodozyme</i>	Vermelho-rosa	Astaxantina	Flores-Cotera e Sanchez (2001)
<i>Saccharomyces neoformans</i>	Preto	Melanina	Vinarov et al. (2003)
<i>Rhodotorula spp.</i>	Laranja-vermelho	Torularodina	Sakaki et al. (2000)
Algas			
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Vermelho-Laranja	Luteína	Valduga et al. (2009b)
<i>Dictyococcus cinnabarinus</i>	Vermelho-rosa	Cantaxantina	Valduga et al. (2009b)
<i>Dunaliella salina</i>	Amarelo-Laranja	β -caroteno	Valduga et al. (2009a)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Amarelo-Laranja	β -caroteno	Valduga et al. (2009a)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Vermelho-rosa	Astaxantina	Chekanov et al. (2014)
<i>Spongiococcum</i>	Vermelho-Laranja	Luteína	Johnson e Schroeder (1995)

Fonte:Adapatdo Oliveira (2017).

Algumas espécies de leveduras também são potenciais fontes de pigmento como *Rhodotorula glutinis*, *Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Yarrowia lipolytica*, *Cryptococcus sp.* e *Phaffia rhodozyma* (DUFOSSE, 2006; PANESPAR; KAUR; PANESAR, 2015).

3.8 Fungos – produção de pigmentos

Os fungos são amplamente encontrados na natureza e são essenciais na degradação e reciclagem da matéria orgânica, sendo capazes de produzir vários metabólitos (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991). Sua capacidade enzimática e seu potencial bioquímico e de adaptação a condições extremas têm sido explorados para a produção de moléculas de interesse industrial (penicilinas, cefalosporinas), alcalóides, enzimas (amilase, celulase), ácidos orgânicos (ácido cítrico) e pigmentos alimentares (ex: *Angkak*) (HAJJAJ et al., 2000; VENDRUSCOLO et al., 2013).

Os fungos se disseminam no globo terrestre produzindo, na maioria das vezes, estruturas denominadas esporos (reprodução sexuada) ou conídeos (reprodução assexuada), dos mais diversos tipos, formando ou não estruturas especializadas para essa função, e resultantes de um de seus ciclos de reprodução.

O esporo, encontrando um substrato adequado e em condições ambientais de temperatura, umidade, pH e luminosidade ideais, desenvolve-se, dando origem a um ou mais tubos germinativos, em fungos filamentosos, ou a um blastoconídeo, se for originado de um fungo leveduriforme (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991; ANDRADE et al., 2015). Os tubos germinativos desenvolvem-se formando hifas, e o conjunto de hifas é denominado micélio. O micélio que está em contato com o substrato, envolvido principalmente com a nutrição do fungo, é denominado micélio vegetativo, e o responsável pela produção de esporos é denominado micélio reprodutor (ou aéreo) (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991; ANDRADE et al., 2015).

O uso de fungos para a obtenção de produtos comercialmente importantes tem aumentado rapidamente ao longo do último meio século, e são bastante utilizados em processos biotecnológicos para produção de enzimas, vitaminas, polissacarídeos, pigmentos e lipídeos, sendo que a produção de pigmentos por

micro-organismos é muito comum na natureza. É, assim, uma alternativa para produção de pigmentos naturais em altas concentrações, existindo um grande potencial para produção de corantes nas tonalidades de amarelo a vermelho. A autorização para o uso de corantes derivados de fungos tem incentivado as pesquisas para obtenção biotecnológica de pigmentos para alimentos (MAPARI et al., 2005; VENDRUSCOLO et al., 2013).

Muitas destas substâncias são produzidas comercialmente e outras apresentam valor potencial para a biotecnologia. Os pigmentos são metabólitos secundários do crescimento de alguns micro-organismos, e têm grande importância e potencial para viabilidade econômica. Como exemplo, citam-se os pigmentos produzidos por *Monascus*, quimicamente pertencentes ao grupo dos Azafilonas, mais especificamente monascinas (FABRE et al., 1998; LEE et al., 2016). As espécies produtoras incluem *Monascus purpureus*, *Blakeslea trispora* (WANG et al., 2002), *Penicillium* sp. (VAN LONG et al., 2017) e *Aspergillus* sp. (DASAN; BO-YACI; MUTLU, 2017). Pigmentos microbianos tais como carotenoides (CHACÓN-ORDOÑEZ et al., 2017), melaninas, flavinas e quinonas (MARIOA et al., 2016) estão entre as moléculas produzidas.

Os fungos têm elevado potencial para produção de pigmentos de interesse econômico. Realmente, a produção de pigmentos a partir de plantas e insetos apresenta alto custo e dependência de condições climáticas, podendo ser frequentemente insuficientes para suprir as necessidades industriais ao longo do ano. Assim, é interessante a produção biotecnológica, a qual possibilita a obtenção dos corantes naturais em grande escala, como a produção microbiológica com fungos apropriados para este fim, tendo em vista que a sua produção faz uso de técnicas de cultura que independem de outros fatores além daqueles inerentes ao processo de fermentação (DURÁN et al., 2002; ABEROUMAND, 2011; KUMAR et al., 2015).

O fungo *Ashbya gossypii*, por exemplo, produz riboflavina, uma vitamina hidrossolúvel pertencente ao complexo vitamínico B2 que apresenta coloração amarela e é fluorescente. Esse pigmento apresenta uma variedade de aplicações em alimentos como em produtos à base de cereais, bebidas e sorvete (SANTOS et al., 2005). Outro fungo, o *Monascus purpureus*, tem sido utilizado para produção de arroz vermelho, vinho, queijo de soja, carnes e peixes com

autorização para uso em alimentos na China e no Japão (CARVALHO et al., 2005).

3.8.1 Fungos do gênero *Monascus* e sua aplicação na produção de biopigmentos

Os fungos do gênero *Monascus* pertencem ao filo Eumycota, subfilo Ascomycotina, classe Ascomyceto, ordem Eurotiales e afamília Monascaceae. Os fungos da classe dos ascomicetos são denominados “fungos superiores”, sendo morfologicamente fungos filamentosos (SABATER-VILAR et al., 1999; DUFOSSÉ et al., 2005), os quais apresentam morfologia complexa, exibindo diferentes estruturas durante seus ciclos de vida. Quando submersos, exibem diferentes formas morfológicas, variando de filamentos dispersos, pequenos aglomerados (*clumps*) e aglomerados maiores e mais densos formando grumos (*pellets*) (OROZCO; PEREIRA; KILIKIAN, 2003).

O gênero *Monascus* compreende sete espécies: *M. ruber*, *M. pilosus*, *M. purpureus*, *M. floricans*, *M. pallens*, *M. sanguineus* e *M. mucoroides*. No entanto, as espécies de maior significância para a indústria alimentícia são: *M. ruber*, *M. purpureus* e *M. pilosus* (MARTINKOVA et al., 1999; LIAN et al., 2015; SHAO et al., 2014).

Os fungos desse gênero apresentam várias aplicações e a característica mais importante é a habilidade de produzir metabólitos secundários com estrutura policetídica, em processos biotecnológicos, produzindo pigmentos, agentes antimicrobianos, alcoóis, ácidos orgânicos, compostos com atividade terapêutica, enzimas, proteases e glicoamilases (LEE et al., 1995; ANIYA et al., 2000; TSENG et al., 2000; DUFOSSÉ et al., 2005; SHAO et al., 2014; LIAN et al., 2015). São amplamente utilizados em pesquisas e em alimentos tradicionais (WANG et al., 2002).

Entretanto, produzem também o antibiótico monascidina A, o qual foi caracterizado como citrinina, uma conhecida micotoxina (BLANC et al., 1995; SABATER-VILAR et al., 1999; XU et al., 2006). Extratos de *Monascus* vêm sendo utilizados, no entanto, como corantes alimentares por séculos e efeitos médicos não foram relatados, o que se pode atribuir às baixas concentrações de citrinina

produzida pela maioria das espécies, sendo que alguns autores relatam que o potencial tóxico é muito mais baixo que o da nitrosamina utilizada em carnes curadas (SABETER-VILAR et al., 1999; BAKOSOVA, 2001; WANG; JU; ZHOU, 2005).

O fungo *Monascus* sp. produz uma variedade de pigmentos azafilonas com variantes de cor, que podem ser classificados em três grupos: pigmentos amarelos (ankaflavinas e monascina), pigmentos laranja (rubropunctatina e monascorubina) e pigmentos vermelhos (rubropuntamina e monascorubramina) (PATTANAGUL et al., 2007).

Monascus ruber Van Tieghen, particularmente, produz pigmentos vermelhos, que são utilizados para colorir alimentos (arroz, vinho e produtos cárneos) e na área médica. O fungo metaboliza celulose, maltose, frutose e glicose e é facilmente encontrado em muitos ecossistemas (WONG; KOEHLER, 1981).

Os fatores que influenciam o crescimento e a produção de pigmento são: meio de cultura, temperatura, presença de oxigênio e aeração (PASTRANA et al., 1995; HAMDÍ et al., 1996), pH (YONGSMITH et al., 2000; BABITHA et al., 2007; MUKHERJEE; SINGH, 2011), fonte de nitrogênio (PASTRANA et al., 1995; JUNG et al., 2003; MUKHERJEE; SINGH, 2011), reologia do meio de cultura (VENDRUSCOLO et al., 2010) e morfologia do microrganismo (CARELS; SHEPHERD, 1975; MORITZ, 2005).

Espécies de *Monascus* também respondem à luz (azul, vermelho, ausência de luz), que regula a produção de metabólitos secundários e o desenvolvimento celular. Este sistema de sensibilidade à luz pode ter uma importante aplicação comercial (MIYAKE et al., 2005). As respostas são mediadas por fotorreceptores de luz, capazes de iniciar a transmissão de sinal que resulta em alterações na expressão do gene que codifica enzimas responsáveis pelo crescimento micelial e a produção de metabólitos secundários em fungos (ZHENG et al., 2009; VELMURUGAN et al., 2010; HILARES et al., 2018).

Várias fontes de carbono já foram utilizadas e reportadas na literatura como substrato para crescimento de *Monascus* spp., sendo as mais comuns a glicose, sacarose e amido. O melhor crescimento é geralmente observado em glicose, o qual se relaciona à produção de pigmentos extracelulares (HAJJAJ et al., 2000; WANG et al., 2017). Alguns substratos alternativos para a produção de pigmentos

por *Monascus spp.* são: suco de pêra (HAMDI et al., 1996), sementes de jaca (BABITHA et al., 2006), etanol (HAMDI et al., 1997), frutose, maltose, sacarose e lactose (TSENG et al., 2000), xarope de milho (HAMANO; KILIKIAN, 2006), resíduos de uva (SILVEIRA et al., 2008), farinha de milho (XU, 2011), amido de mandioca (KONGRUANG, 2011), e glicerol (MEINICKE et al., 2012).

3.8.1.1 *Monascus ruber* - morfologia

3.8.1.1.1 Macromorfologia

Colônias de *Monascus ruber* apresentam um crescimento relativamente rápido em meio PDA (Potato Dextrose Agar) à temperatura ambiente. São saprófitas do solo, suas colônias apresentam topografias levemente rugosas, circulares, flocosas, de coloração púrpura e de coloração reversa também púrpura, mas' com maior intensidade. Cresce em diferentes substratos como ágar Sabouraud, ágar Czapek's, ágar extrato de malte, além de arroz e outros grãos como milho e soja.

As colônias apresentam pequeno desenvolvimento aéreo (Figura 5), que depende das condições de cultivo. O micélio é inicialmente branco nos primeiros 2 a 3 dias, passando para laranja a vermelho à medida que a cultura se desenvolve, com a formação de cleistotécios e aleurioconídias. Após sete dias, as colônias têm um diâmetro de 20 a 30 mm em PDA. (PITT; HOCKING, 1999; VENDRUSCOLO, 2009).

Figura 5 - Fotografia de uma placa de Petri com uma cultura de *Monascus ruber* em meio PDA.

Fonte: Autoria própria.

3.8.1.1.2 Micromorfologia

As estruturas predominantes na micromorfologia estão relacionadas a numerosos ascocarpos com a forma arredondada e com a presença de cadeia de conídios. Os corpos de frutificação são ascocarpos na forma de cleistotécio, entre 30µm a 60 µm de paredes finas, e os ascocarpos maduros são empacotados com ascósporos frouxos. Os ascos podem ser vistos claramente, até nos ascocarpos jovens. Os esporos são ascósporos ovais (5,5 – 6 µm), lisos, incolores, e com cadeias redondas, e os conídios incolores (9-10,5 µm por 7-9 µm), com base achatada e as hifas (Figura 6) são indiferenciadas (CARVALHO, 2005).

As condições e a quantidade de nutrientes como sais minerais, carboidratos e aminoácidos interferem nas estruturas de reprodução. Em condições de limitação, observam-se cleistotécios e em condições de abundância de nutrientes, observam-se conídios. A literatura relata que a formação de pigmentos vermelhos ocorre na fase de limitação, e o número de cleistotécios presentes indica a fase de início da formação de pigmentos vermelhos (MORITZ, 2005).

A produção de pigmentos pelo fungo *Monascus* está relacionada com a formação de estruturas de reprodução sexuada (formação de cleistotécios), sendo possível determinar as condições ótimas de crescimento e produção de pigmentos pelo fungo monitorando as estruturas de frutificação e de conidiação, evidenciando a importância do acompanhamento da morfologia fúngica em conjunto com os outros fatores, como pH, aeração, concentração de substrato e frequência de agitação (MORITZ, 2005).

Figura 6 - Hifas de *Monascus ruber* observadas em microscópio, com magnificação de 1000x.

Fonte: Eduardo (2010).

Nota: a) cultivadas em meio submerso.

b) cultivadas em meio sólido.

3.8.2 Pigmentos de *Monascus*

Os pigmentos produzidos pelo gênero *Monascus* são tradicionalmente utilizadas para produção de pigmentos alimentares, em alimentos fermentados, bebidas alcoólicas, arroz, salsicha, carne e vegetais em países como China, Taiwan, Tailândia, Japão, Indonésia e Filipinas. Apresentam uma promissora utilização na coloração de produtos cárneos em substituição aos sais de nitrito que conferem coloração vermelha com a produção de nitrosaminas, compostos que possuem efeitos cancerígenos (LIU et al., 2015; NING et al., 2017).

Mais de 50 tipos de pigmentos de *Monascus* foram identificados e investigações se concentram em 6 tipos (Figura 7), divididos em três grupos que dependem da cor apresentada. São eles: monascina (MS), ankaflavina (AK) rupropunctatina (RUN), monascorubrina (MON), rupropunctamina (RUM) e monascorubramina (MOM) (BLANC et al., 1995; PATTANAGUL et al., 2007; FENG; SHAO; CHEN, 2012).

MS e AK são pigmentos amarelos dos mesmos cromóforos e são distintos pelos comprimentos de suas cadeias laterais saturadas. A mesma relação estrutural foi observada para os pigmentos laranja (RUN e MON) e vermelho (RUM e MOM) (PATTANAGUL et al., 2008).

A via biossintética, Figura 8, corresponde à condensação de um mol de acetato com cinco mols de malonato no citosol, levando à formação de um cromóforo hexacetídeo pelo complexo enzimático da policetideosintase. Ácidos graxos de cadeia média, por exemplo, o ácido octanoico, são sintetizados pela via dos ácidos graxos e se ligam à estrutura do cromóforo através de uma reação de transesterificação, gerando o pigmento laranja monascorubrina - $C_{23}H_{26}O_5$ ou rubropunctatina - $C_{21}H_{22}O_5$.

Com base na semelhança estrutural entre os pigmentos amarelo e laranja, sugere-se que os pigmentos amarelos são o produto de redução dos pigmentos laranja, em que duas das duplas ligações de carbono na cadeia conjugada de dois pigmentos laranja são reduzidas a ligações simples, assim oxidando a monascorubrina em pigmentos amarelo ankaflavina - $C_{23}H_{30}O_5$, ou monascina - $C_{21}H_{26}O_5$ (JÚZLOVÁ; MARTINKOVA; KŘEN, 1996; WANG et al., 2009).

Os pigmentos vermelhos monascorubramina- $C_{23}H_{27}NO_4$ e rubropunctamina - $C_{21}H_{23}NO_4$ são produzidos pela reação com compostos contendo NH_3 e NH_2 com a molécula dos pigmentos laranja, sendo que esta molécula tem alta afinidade a compostos contendo grupos amino primários. As reações com aminoácidos levam à formação de pigmentos vermelhos solúveis.

A especificação da cor de pigmentos vermelhos de *Monascus* depende em grande medida do aminoácido ou da proteína ao qual o pigmento foi associado, sendo que diversos aminoácidos foram relatados na síntese, destacando-se a glicina e o glutamato monossódico como os mais eficientes em termos quantitativos (CARVALHO et al., 2005; DUFOSSÉ et al., 2005; JUNG et al., 2003; HAJJAJ et al., 2000; JUNG et al., 2005; CHEN et al., 2015).

Dentre estes pigmentos, o vermelho (monascorubramina e rubropunctamina) apresenta maior valor comercial, devido a sua estabilidade ao calor, pH (2 a 10) e pela aplicação em alimentos (MAPARI et al., 2005; YOSHIZAKI et al., 2010).

Figura 7 - Estrutura dos principais pigmentos produzidos por fungos *Monascus ruber*.

Fonte: Hajjaj et al. (2000); Chen et al. (2015).

Figura 8 - Biossíntese dos pigmentos do *Monascus ruber*.

Fonte: Adaptado de Chen et al. (2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em duas etapas principais (Figura 9). Na primeira, procedeu-se à realização de experimentos conforme um planejamento estatístico composto central estrela ortogonal, variando-se o pH (2,31 – 8,19) a concentração de fonte de carbono (glicose, de 18,18 a 51,21 g.L⁻¹) e a concentração de fonte de nitrogênio (glutamato monossódico, de 1,64 a 8,36 g.L⁻¹). Avaliou-se a produção de pigmentos e o crescimento do fungo *Monascus ruber* em cultivo semissólido. Nesta primeira etapa também foram elaboradas técnicas de processamento e análise de imagens para caracterização do perfil de crescimento, propagação do fungo filamentoso e produção de pigmentos. Na segunda etapa do trabalho realizou-se a validação dos modelos estatístico no otimizado da produção de pigmentos e uma análise mais aprofundada, baseando-se principalmente em técnicas de processamento e análise de imagens.

Figura 9 - Fluxograma nas atividades do presente trabalho.

Fonte: Autoria própria.

4.1 Micro-organismo

Foi empregado o fungo *Monascus ruber* Tieghem IOC 2225, gentilmente doado pela Coleção de Culturas de Fungos Filamentosos (CCFF) da Fundação Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) (Rio de Janeiro, Brasil). A cepa foi mantida em placa contendo meio ágar malte YMA (5 g.L⁻¹ extrato de levedura, 3 g/L extrato de malte, 20 g.L⁻¹ ágar), a qual era incubada a 30° C por 10 dias, sendo posteriormente mantida sob refrigeração a 4°C, com repicagem a cada 21 dias.

4.2 Preparo do inóculo

Partindo-se da cultura estoque, fez-se um repique em uma nova placa de Petri com meio YMA e no 14º dia de incubação, preparou-se a partir desta placa uma suspensão com 4 x 10⁶ esporos mL⁻¹ de água destilada contendo 0,3 % (m/m) de ágar, para evitar o espalhamento dos esporos. Uma alíquota de 10 µL⁻¹ desta suspensão foi inoculada no centro de cada placa de Petri empregada nos cultivos realizados para avaliação da produção de pigmentos e caracterização morfológica sob diferentes condições.

4.3 Condições de cultivo

O meio de cultivo, por litro, era formado a partir dos seguintes minerais: 5 g de K₂HPO₄; 5 g de KH₂PO₄; 0,1 g de CaCl₂; 0,5 g de MgSO₃.7H₂O; 0,01 g de FeSO₃.7H₂O; 0,01 g de ZnSO₃.7H₂O e 0,03 g de MnSO₄.H₂O (PASTRANA et al., 1995; MORITZ, 2005).

A concentração da fonte de carbono (glicose) e de nitrogênio (glutamato monossódico) no meio foi ajustada conforme a Tabela 10. A solução contendo glicose, glutamato e os minerais foi preparada, utilizando-se 2% de ágar bacteriológico como solidificante. Posteriormente, as soluções foram autoclavadas a 121 °C durante 15 minutos em 0,5 atm. Após resfriamento, porém com o meio ainda líquido, o pH foi ajustado nas faixas estabelecidas pelo planejamento experimental, empregando-se soluções de ácido clorídrico 0,1 mol/L e hidróxido

de sódio 0,1mol/L, em ambiente asséptico. Após ajuste do pH, o meio foi vertido em placas de Petri de 90 mm.

As placas foram então inoculadas conforme seção 4.2, no centro de cada placa e em ambiente asséptico, sendo incubadas em estufa a 30°C, na ausência de luz durante 480h (20 dias). Os cultivos foram fotografados a cada 96 horas para caracterização da propagação e crescimento morfológico do fungo.

4.4. Planejamento experimental

Planejamento estatístico foi empregado como ferramenta para avaliação da produção de pigmentos produzidos pelo fungo *Monascus ruber* e para elaboração e caracterização do perfil de propagação do fungo por PADI, a partir da construção de estruturas algorítmicas.

Os dados apresentados durante o desenvolvimento de todas as etapas deste trabalho foram analisados estatisticamente com o auxílio softwares Design-Expert 7.0 (Statease, EUA) e Statistica 8.0 (StatSoft Inc., EUA).

Foram executados experimentos conforme um delineamento composto central estrela rotacional 2^3 (DDCR 2^3), seguindo os princípios da experimentação por casualização, controle local e repetição no ponto central

As variáveis avaliadas foram a concentração de glicose (fonte de carbono), pH e concentração de glutamato monossódico (fonte de nitrogênio), de acordo com a Tabela 10, com três repetições no ponto central, de modo a avaliar a condição mais favorável para as variáveis resposta relacionadas à produção de pigmentos amarelo ($\lambda=410\text{nm}$), laranja ($\lambda=470\text{nm}$), vermelho ($\lambda=510\text{nm}$) e as razões entre as produções de pigmentos amarelo/laranja, vermelho/laranja e vermelho/amarelo. A produção de cada pigmento foi avaliada em unidades de absorbância, conforme explicado na seção 4.5.1.

Foram avaliados também aspectos macromorfológicos de propagação micelial e do pigmento produzido pelo fungo a partir da elaboração de técnicas de processamento e análise digital de imagens para as variáveis área micelial, velocidade radial pigmentar, velocidade radial micelial e variação da intensidade pigmentar no meio de cultivo.

Posteriormente foi realizado a validação dos modelos a partir do ponto otimizado da produção de pigmentos e analisados os aspectos

macromorfológicos descritos acima e também da espessura, fator forma, raio de deslocamento e desvio da intensidade pigmentar, conforme explicado adiante. Os dados obtidos a partir da produção de pigmentos e da caracterização macromorfológica/morfométrica foram inter-relacionados a fim de obter parâmetros para uma caracterização do perfil de crescimento e produção de pigmentos mais apurada.

Tabela 10 - Planejamento estatístico composto central estrela rotacional 2³ (valores codificados das variáveis entre parênteses).

Experimento	Concentração de carbono (g.L ⁻¹)	Concentração de nitrogênio (g.L ⁻¹)	pH
1(-1)	25	3	3,5
2(-1)	45	3	3,5
3(-1)	25	7	3,5
4(-1)	45	7	3,5
5(1)	25	3	7,0
6(1)	45	3	7,0
7(1)	25	7	7,0
8(1)	45	7	7,0
9(0)	18,18	5	5,25
10(0)	51,82	5	5,25
11(0)	35	1,64	5,25
12(0)	35	8,36	5,25
13(-1,68)	35	5,0	2,31
14(1,68)	35	5,0	8,19
15(0)	35	5,0	5,25
16(0)	35	5,0	5,25
17(0)	35	5,0	5,25

Fonte: Autoria própria.

Nota: Realizado para avaliação da influência da concentração da fonte de carbono (glicose), pH e concentração de fonte de nitrogênio (glutamato monossódico) na produção de pigmentos, razão entre produção de diferentes pigmentos e aspectos morfológicos do fungo *Monascus ruber* Tieghem IOC 2225.

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Quantificação de pigmentos produzidos

Todo meio de cultivo contendo as colônias do *Monascus ruber* Tieghem IOC 2225 foi retirado da placa e adicionado em frascos Erlenmeyer contendo 60 mL de álcool etílico 95 °GL. As amostras foram colocadas em banho maria a 85 °C por 12 minutos sob agitação de 100 rpm. Posteriormente, estas foram centrifugadas a 4000 rpm, sendo que a fração líquida contendo os pigmentos foi recuperada, posteriormente quantificados por espectrofotometria.

Procedeu-se à leitura de absorbância em espectrofotômetro (Eppendorf BioPhotometer – Eppendorf, Califórnia, EUA) sendo realizada uma varredura na região do visível. Para a quantificação de pigmentos, considerou-se a leitura de absorbância nos comprimentos de onda de 400, 470 e 510 nm (pigmento amarelo, laranja e vermelho, respectivamente), conforme estabelecido por diversos trabalhos da literatura (HAJJAJ et al., 2000; KONGRUANG, 2011). O valor das leituras foi corrigido contra branco (solução de etanol 95%) e multiplicado pelo volume de solvente usado na extração, sendo os resultados expressos em unidades de absorbância UA_{400} , UA_{470} e UA_{510} , para os pigmentos amarelo, laranja e vermelho, respectivamente. As razões entre as produções dos pigmentos foram calculadas como razões entre as respectivas unidades de absorbância.

4.5.2 Processamento e análise digital de imagem (PADI) – caracterização morfológica

Foi elaborada uma técnica para PADI adaptada a partir de Gomes (2001) e Gonzales & Woods (2010). Assim, foram elaborados procedimentos e parâmetros para análise, divididos em duas etapas. A primeira etapa correspondeu à extração de informações da imagem (processamento digital da imagem - PDI) com 7 procedimentos e a segunda etapa à análise de dados (análise digital de imagens – ADI), com 2 procedimentos, conforme a Tabela 11.

Tabela 11 - Procedimentos adotados para o processamento e análise digital de imagem – PADI.

PDI – Processamento digital de imagens		
Nº	Etapa	Parâmetro utilizado
1	Aquisição da imagem	Resolução de 16 Megapixels
2	Correção	Correção da intensidade luminosa
3	Tipo de processamento	16 <i>bits</i> (256 níveis de cor ou tons)
4	Determinação da escala	Pixels/mm
5	Determinação da região de interesse	Área da Placa (área útil)
6	Reconhecimento – (Máscara gráfica, “ <i>Pseudocolor</i> ”)	Determinação da máscara gráfica a ser utilizada, utilizando os parâmetros de limiarização e homogeneização para a consistência dos dados
7	Aplicação	Aplicação da Máscara gráfica
ADI – Análise digital de imagens		
Nº	Etapa	Parâmetro utilizado
8	Mensuração	Detecção de parâmetros (intensidade pigmentar, área, raio entre outros)
9	Análise de dados	Elaboração de estruturas lógicas para construção de painéis inteligentes (Dashboard) para gráficos e tabelas automáticos em VBA-Excel

Fonte: Autoria própria.

Nota: Procedimento adotado no PADI na fermentação em estado semissólido visando à análise da macromorfologia na formação de halos, no crescimento micelial e na produção de pigmentos.

Entre as etapas 3 e 7 os procedimentos foram realizados empregando-se um algoritmo que foi elaborado para este projeto, funcionando como um *plugin* (macro) ao programa *Image J*.

Para o procedimento 8, os dados gerados pelo algoritmo empregado no programa *Image J* foram analisados com a elaboração de outra estrutura lógica (algoritmo) em VBA (“Visual Basic Application”) no programa Microsoft Office Excel 2016, para a análise de dados, realização de cálculos e para a geração de gráficos e tabelas de forma automática.

4.5.2.1 Processamento digital de imagens – (PDI)

O procedimento 1 consistiu no estabelecimento e execução de uma rotina de aquisição das imagens. Estas corresponderam a fotografias adquiridas empregando a câmera digital do aparelho celular Moto G4 Plus (Lenovo Brasil, São Paulo, SP). As fotografias foram obtidas com uma resolução espacial de 16 megapixels, a uma altura de 20 cm da amostra em um suporte previamente preparado, de maneira que exista homogeneização da resolução radiométrica (intensidade luminosa) na amostra, com um fundo elaborado (gabarito) conforme Figura 10 e com iluminação artificial do laboratório com lâmpadas fluorescentes.

Figura 10 - Gabarito (fundo) para a retirada das amostras fotográficas.

Fonte: Autoria própria.

No procedimento 2 ocorreu a correção da intensidade luminosa a partir da região amostral (Figura 10), estabelecendo o mínimo e máximo de brilho a partir regiões das regiões amostrais 4 (preto) e 5 (branco). Isto foi realizado empregando a função brilho/contraste do software *ImageJ*. No procedimento 3 ocorreu a transformação da imagem para 8 bits em uma escala cinza de 256 tonalidades, conforme a Figura 11.

Figura 11 - Processamento digital de imagem utilizando a transformação em 8 *bits*, padronizando-se a imagem em 256 tonalidades de cinza.

Fonte: Autoria própria.

A escolha da profundidade de *bits* foi feita pela capacidade do computador empregado (Acer Aspire E 15 com processador Intel core i5, 6 GB de memória RAM e placa gráfica integrada O120, Placa Vídeo Acer Extensa 2900, Acer do Brasil, São Paulo, Brasil), favorecendo a agilidade no processamento.

Com relação ao procedimento 4, este consistiu no ajuste da escala empregando-se de uma referência conhecida, a qual correspondeu ao diâmetro da placa de Petri (90 mm), possibilitando o estabelecimento de uma relação pixel/mm. A partir desta etapa, qualquer mensuração realizada pelo programa foi feita na escala determinada.

No procedimento 5, selecionou-se a região de interesse, que consistia na área útil da placa, eliminando-se as outras regiões da imagem.

Realizou-se então, na etapa 6, um teste a fim de estabelecer as regiões e as faixas de intensidade para determinar padrões de halos pigmentares, utilizando uma máscara gráfica “*Pseudo-color*” (a qual representa as regiões com determinada faixa de intensidade). Este procedimento permitiu a obtenção da melhor máscara gráfica para o acompanhamento da propagação da área micelial e dos pigmentos no processo de fermentação (Figura 12), utilizando-se dois parâmetros para a escolha: a limiarização que é a definição de limites de uma determinada região, e a homogeneização, que se refere a regiões contínuas e que tenham representação significativa em área.

A partir da determinação das faixas de intensidade e sua limiarização (Figura 12), na etapa 7 ocorreu a aplicação da máscara gráfica “16-colors”, sendo

escolhida a que possuía as melhores características para o acompanhamento do perfil de propagação micelial e de pigmentos no cultivo do fungo *Monascus ruber* Thieghan IOC 2225. Para a avaliação do perfil de propagação micelial do fungo filamentososo, foram analisados diversos parâmetros, os quais foram classificados como primários e secundários, para a realização dos cálculos.

Figura 12 - Exemplos de aplicação de algumas máscaras gráficas para a determinação do melhor método para avaliação da propagação micelial e pigmentar do fungo *Monascus ruber* Thieghan IOC 2225.

Fonte: Autoria própria.

Os parâmetros primários são os atributos sem a interação com os demais e que se utilizam de função específica já estabelecida no software *ImageJ*, incluindo a intensidade média, desvio padrão da intensidade, área e o fator forma correspondente a determinada região de interesse.

4.5.2.1.1 Área

A área foi calculada como a soma de todos os pixels da região determinada, sendo que cada pixel tem determinado tamanho em milímetros, conforme definido pela resolução espacial (mm/pixel). Foram classificadas 2 áreas: a primeira é a área pigmentar que corresponde a toda área que contém pigmentos, a segunda é a área micelial, que compreende a região na qual há, simultaneamente, a presença de biomassa e pigmentos, formando-se sub-regiões de halos miceliais.

As áreas foram definidas a partir do contraste entre a intensidade pigmentar do meio de cultivo e a pigmentação formada pelo microrganismo. Fez-se também análise micromorfológica para verificar a presença de biomassa. A Equação 1 demonstra o cálculo da área.

$$A = \sum_{x=0, y=0}^{x=m, y=n} P_{(x,y)} \quad (1)$$

Em que:

A: área em mm² de determinada região;

P_(x,y): determinado ponto, em uma posição x e y;

m: última ordenada do eixo x;

n: última ordenada do eixo y.

4.5.2.1.2 Variação da intensidade média de pigmentação

Calculou-se inicialmente a média dos valores dos tons (níveis de cinza) de cada pixel, com processamento em 8 *bits*, nas áreas pigmentar e micelial, conforme a Equação 2.

$$I_m = \frac{\sum_{i=1}^k I_i}{k} \quad (2)$$

Em que:

I_m: intensidade média;

I_i: intensidade de determinado pixel;

k: quantidade de pixels da região.

Posteriormente calculou-se a variação da pigmentação nos tempos inicial (0h) e final (480 h), em módulo.

$$\Delta I = |I_{Mf} - I_{Mi}| \quad (3)$$

Em que:

I_{Mf} : intensidade média final;

I_{Mi} : intensidade média inicial;

ΔI : Variação da intensidade média de pigmentação.

4.5.2.1.3 Desvio da intensidade média

Calculou-se, conforme a Equação 4, os desvios padrão referentes à intensidade média dos pixels das regiões selecionadas, os quais são um indicativo de homogeneidade de pigmentação.

$$I_{dm} = \sqrt{\frac{\sum_i^k (I_i - \bar{I})^2}{k-1}} \quad (4)$$

Em que:

I_{dm} = Desvio padrão da intensidade de determinada região (halo);

I_i : intensidade de determinado pixel;

$\bar{I}$: intensidade média dos pixels de determinada região.

4.5.2.1.4 Fator forma

Calculou-se, conforme a Equação 5, o fator forma das regiões de interesse. O fator forma é uma medida de homogeneidade no contorno de uma determinada região (halo micelial e pigmentar) que representa uma constante de proporcionalidade que relaciona a área superficial de uma região, ou de uma amostra de partículas, em uma dimensão linear medida de modo padronizado, no qual o valor unitário 1, refere-se a um círculo perfeito, é um indicativo de homogeneidade geométrica e descritor de forma.

$$F_{\text{Forma}} = \frac{4\pi A}{P^2} \quad (5)$$

Em que:

F_{Forma} : valor do fator forma (1 a 0) de determinada região (halo);

A: área de determinado halo;

P: perímetro de determinado halo.

4.5.2.2 Análise digital de imagens – (ADI)

Na etapa 8, ocorreu a análise de dados, a qual consistiu em calcular os parâmetros secundários e proceder à normalização dos valores de todos os parâmetros. Considerando o grande número de informações trabalhadas, foi elaborado um algoritmo em *Visual Basic Application* (Vba) para os cálculos de cada parâmetro e normalização. Empregou-se, neste caso, o programa Microsoft Office Excel 2016 para concatenar e relacionar os dados em relação ao tempo e inter-relacionar as variáveis, transformando dados brutos em informação. Como consequência, realizou-se a elaboração dos gráficos e das tabelas em modelo “Dashboard” (painéis inteligentes que, a partir de um determinado algoritmo, automatizam e simplificam o processo).

A normalização foi realizada conforme a Equação 6. Para o nível com maior intensidade de tonalidade (escuro), que representa o valor 0 na escala de 8 *bits*, foi atribuído o valor 100, enquanto que, para o nível de tonalidade menos intenso (claro), que representa o valor 255 na escala 8 *bits*, atribuiu-se o valor 0. Desta forma, após a normalização, a escala de tonalidade pigmentar variou de 0 a 100.

$$\text{Intensidade} = 100 - 0,392 * \text{Valor (8 bits)} \quad (6)$$

Os parâmetros secundários, os quais incluem o raio de deslocamento, a velocidade radial e a espessura das regiões de interesse, foram calculadas a partir da interação entre os parâmetros primários e correlacionados com o tempo, conforme a Figura 13, a qual mostra a arquitetura lógica empregada, conforme explicado a seguir.

Figura 13 - Arquitetura lógica para o fluxo de dados na elaboração dos cálculos a partir da interação entre os parâmetros primários e secundários correlacionados com o tempo.

Fonte: Autoria própria.

Nota: VIm: velocidade da intensidade média ao longo tempo.

Vd: velocidade do raio de deslocamento.

4.5.2.2.1 Raio de deslocamento

O raio de deslocamento (RD) foi calculado com referência ao ponto de inoculação, sendo correspondente ao raio da circunferência menor que delimita uma determinada região (área micelial, área do halo pigmentar), conforme a Equação 7.

$$RD_n = \sqrt{\frac{AT_{n-1}}{\pi}} \quad (7)$$

Em que:

n: representa a região de interesse (pode ser determinado halo ou a região micelial);

RD: é o raio de deslocamento da região n, em mm;

AT_{n-1} : área total referente a toda região a partir do ponto de inoculação até o halo pigmentar anterior.

4.5.2.2.2 Velocidade de deslocamento

A velocidade de deslocamento é referente ao crescimento micelial(crescimento radial) e à velocidade de propagação do halo pigmentar ao longo do tempo. Está foi calculado conforme a Equação 8.

$$V_d = \frac{(RD_n - RD_{n-1})}{(t_i - t_f)} \quad (8)$$

Em que:

n : representa a região de interesse (pode ser determinado halo ou a região micelial);

RD_n : é o raio de deslocamento da região n ; em mm;

RD_{n-1} : é o raio de deslocamento da região $n-1$; em mm;

V_d : é a velocidade de deslocamento em mm/h;

t_i : tempo inicial;

t_f : tempo final;

4.5.2.2.3 Espessura

A espessura refere-se ao raio (largura) de determinado halo pigmentar ou micelial, calculada conforme a Equação 9 a seguir

$$E = RD_n - RD_{n-1} \quad (9)$$

Em que:

RD = Raio da circunferência que limita a área referente ao halo pigmentar.

n = índice referente ao halo pigmentar cuja espessura está sendo determinada.

A Figura 14, a seguir, demonstra de forma simplificada os parâmetros morfométricos e as relações a partir da aplicação da máscara gráfica (“16 colors”) para a identificação macromorfológica.

Figura 14 - Caracterização dos parâmetros morfométricos da macromorfologia.

Fonte: Autoria própria.

Nota: RD – Raio de deslocamento.

E – Espessura.

I_m – Intensidade média.

I_{dm} – Desvio da intensidade média.

4.5.3 Análise micromorfológica - Identificação da área pigmentar e micelial

Foram caracterizadas três regiões, conforme a Figura 15, sendo elas: referentes à área micelial que contém pigmentos e biomassa; à área pigmentar que contém os halos miceliais e a área de meio de cultivo.

Para a identificação de cada região foi realizada uma análise para os pigmentos conforme a seção 4.5.4.2 e também microscópica qualitativa para detectar a presença de biomassa. Para isso, empregou-se microscópio o microscópio de luz binocular (Olympus Optical - modelo U-MDOB3 - Japão).

Figura 15 - Caracterização e identificação das regiões miceliais, pigmentares e do meio de cultivo.

Fonte: Autoria própria.

4.5.4 Caracterização do sistema nas condições otimizadas

4.5.4.1 Análise micromorfológica

Foi realizada análise das características microscópicas qualitativas e quantitativas, a partir das micrografias óticas em amostras retiradas das placas do cultivo em condições otimizadas conforme planejamento estatístico.

As micrografias foram obtidas em microscópio óptico de luz polarizada (Olympus Optical - modelo U-MDOB3 – Japão), com câmera de vídeo anexa (Cole-Palmer 49901-35, Cole-Palmer, Vernon Hills, IL, EUA) conectada a um microcomputador.

A micromorfologia do fungo foi analisada por técnicas de processamento e análise digital de imagem com auxílio dos programas *ImageJ* versão 1j.46r (desenvolvido por Wayne Rasband no *National Institute of Mental Health*, EUA, em linguagem Java) e Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft Brasil, São Paulo, Brasil).

Para amostragem, as placas foram divididas em três diferentes regiões (Figura 16), sendo a primeira (interna) compreendendo um cilindro reto com base de raio (r) de 1,5 cm, e as outras duas correspondendo a cilindros retos vazados com furo circular. Na segunda região (intermediária), a base do cilindro vazado corresponde a uma coroa circular com $1,5 \text{ cm} < r \leq 3,0 \text{ cm}$ e, na terceira região (externa), uma coroa circular com $3,0 \text{ cm} < r \leq 4,5 \text{ cm}$.

Em cada região foram retiradas amostras circulares de diâmetro de 0,35 cm, para a análise microscópica e de pigmentos, nas posições 0 mm, 20 mm e 40 mm.

Foram dimensionadas duas estruturas - as hifas e o cleistotécio – com auxílio do programa *ImageJ*, medindo-se pelo menos 30 estruturas de cada tipo em micrografias de cada região obtidas com magnificação de 400x.

Figura 16 - Análise morfológica e pigmentar: região radial de amostragem.

Fonte: Autoria própria.

4.5.4.2 Quantificação de pigmentos

Para a quantificação de pigmentos utilizaram-se as amostras retidas em cada região em tubos de ensaio contendo 5 mL de álcool etílico 95 °GL. As amostras foram então analisadas conforme descrito na seção 4.5.1.

4.5.4.3 Macromorfologia

Para a análise da macromorfologia do fungo procedeu-se conforme seção 4.5.2, caracterizando-se a velocidade radial e pigmentar, área, espessura, variação da intensidade pigmentar, desvio padrão e o fator forma para cada halo micelial e pigmentar ao longo do tempo de fermentação. Estes parâmetros foram inter-relacionados com a quantificação pigmentar, para determinar a quantidade de pigmentos (amarelo, laranja e vermelho) em U.A.g⁻¹ em cada halo micelial e pigmentar também para relação entre área mm² e a variação da intensidade pigmentar (níveis de cinza - PADI).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção de pigmentos

5.1.1 Perfil pigmentar: espectro de absorbância na região do visível

Os pigmentos produzidos nas diferentes concentrações de glicose, glutamato monossódico e pH foram submetidos a análise de varredura em espectrofotômetro na faixa de 350 a 600 nm (Apêndice A). Um espectro típico é mostrado na Figura 17, na qual se apresenta o resultado correspondente ao ponto central do planejamento de experimentos (Tabela 10). Os dados obtidos para varredura na região do visível foram expressos em unidades de absorbância por massa de meio de cultivo (U.A./g) e são apresentados na Figura 17 como o extrato pigmentar de todo meio de cultivo em placa de Petri.

Observaram-se dois picos próximos aos comprimentos de onda de 410 nm e 510nm, relatados na literatura como correspondentes aos pigmentos amarelo e vermelho, e um vale no comprimento de onda 470 nm, referente ao pigmento laranja (VENDRUSCOLO et al., 2016).

Figura 17 - Espectro de absorbância correspondente aos experimentos do ponto central do planejamento estatístico.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Exp.15, Exp.16, Exp.17: pH 5,25.

Concentração de glutamato monossódico 5 g/L.

Concentração de glicose 35 g/L.

Na maioria dos trabalhos publicados sobre o gênero *Monascus*, um comprimento de onda específico para a absorbância foi selecionado para medir as concentrações dos diferentes pigmentos produzidos. Em alguns, a absorbância foi medida a 400, 470 e 500 nm, para pigmentos amarelo, laranja e vermelho, respectivamente (BABITHA et al., 2007; LEE et al., 2016), e em outros, foi medida a 410, 470 e 510 nm (BÜHLER, 2013; SHI et al., 2015; VENDRUSCOLO et al., 2016).

Os resultados obtidos da análise de varredura (Figura 17) evidenciam a presença dos três pigmentos nos comprimentos de onda mencionados pela literatura.

5.1.2 Avaliação, empregando planejamento estatístico, da influência das variáveis pH, concentração de fonte de carbono e concentração de fonte de nitrogênio na produção de pigmentos pelo fungo *Monascus ruber* Thieghan IOC 2225

Procedeu-se à análise estatística dos resultados obtidos com a execução do planejamento experimental. As variáveis resposta consideradas foram

produção de pigmentos amarelo (410nm), laranja (470 nm) e vermelho (510 nm) e também a relação quantitativa entre os pigmentos vermelho/laranja, amarelo/laranja e vermelho/amarelo, todos obtidos no tempo de 20 dias de fermentação. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 12.

Pode-se observar na Tabela 12 que a produção dos pigmentos amarelo, laranja e vermelho variaram, respectivamente, entre 24-103 UA/g, 14-96 UA/g e 19-135 UA/g. Esta grande diferença entre os valores máximos e mínimos obtidos indica que os níveis escolhidos para as variáveis estudadas foram adequados para observação de variações na produção de pigmentos, sugerindo a existência da influência significativa entre as variáveis estudadas (independentes) e as variáveis resposta (dependentes).

Tabela 12 - Produção de pigmentos (U.A.g⁻¹) e suas relações proporcionais, sob diferentes valores de pH, concentração de glicose (g.L⁻¹) e concentração de glutamato monossódico (g.L⁻¹)

Variáveis independentes (valores codificados entre parênteses)				Variáveis dependentes					
Tratamento	pH	Concentração de Carbono, g.L ⁻¹	Concentração de Nitrogênio, g.L ⁻¹	Pigmento amarelo, UA.g ⁻¹	Pigmento laranja, UA.g ⁻¹	Pigmento vermelho, UA.g ⁻¹	Vermelho/ Amarelo	Vermelho/ Laranja	Amarelo/ Laranja
1	3,5 (-1)	25 (-1)	3 (-1)	24,59	18,39	24,26	0,99	1,32	0,75
2	3,5 (-1)	45 (1)	3 (-1)	101,21	65,30	91,08	0,90	1,39	0,65
3	3,5 (-1)	25 (-1)	7 (+1)	52,59	44,53	60,92	1,15	1,37	0,85
4	3,5 (-1)	45 (1)	7 (+1)	107,49	93,51	121,90	1,13	1,30	0,87
5	7 (1)	25 (-1)	3 (-1)	37,72	23,07	30,24	0,80	1,31	0,61
6	7 (1)	45 (1)	3 (-1)	42,08	23,97	31,13	0,74	1,30	0,57
7	7 (1)	25 (-1)	7 (1)	62,30	57,55	83,43	1,34	1,45	0,92
8	7 (1)	45(1)	7 (1)	64,95	50,60	72,27	1,11	1,43	0,78
9	5,25 (0)	18,18 (-1,68)	5 (0)	27,08	24,72	34,68	1,28	1,40	0,91
10	5,25 (0)	51,82 (1,68)	5 (0)	90,66	56,77	79,60	0,88	1,40	0,63
11	5,25 (0)	35 (0)	1,64 (-1,68)	24,15	14,68	19,33	0,80	1,32	0,61
12	5,25 (0)	35 (0)	8,36 (1,68)	103,62	95,64	135,19	1,30	1,41	0,92
13	2,31 (-1,68)	35 (0)	5 (0)	42,60	44,90	47,98	1,13	1,07	1,05
14	8,19 (1,68)	35 (0)	5 (0)	51,85	36,88	47,12	0,91	1,28	0,71
15	5,25 (0)	35 (0)	5 (0)	91,71	68,09	87,41	0,95	1,28	0,74
16	5,25 (0)	35 (0)	5 (0)	74,09	53,50	70,86	0,96	1,32	0,72
17	5,25 (0)	35 (0)	5 (0)	70,73	48,16	66,88	0,95	1,39	0,68

Fonte: Autoria própria.

Nota: Reações conduzidas em fermentação semissólida segundo um planejamento fatorial a 2³ estrela rotacional, em um período de 20 dias.
Produção de pigmentos em unidades de absorbância por massa de meio de cultivo (UA.g⁻¹).

Em relação às variáveis resposta correspondentes à razão proporcional entre a produção dos pigmentos vermelho/amarelo, vermelho/laranja e amarelo/laranja, os seus valores também variaram bastante, obtendo-se, respectivamente, razões entre 0,8-1,30, 1,07-1,45 e 0,57-1,05. Para a análise da significância dos efeitos das variáveis em estudo nas respostas avaliadas, foram elaborados gráficos de Pareto (Figura 18) para significância dos efeitos das variáveis produção de pigmentos e suas relações proporcionais: pigmentos amarelo (Figura 18a), laranja (Figura 18b) e vermelho (Figura 18c) e vermelho/amarelo (Figura 18d), vermelho/laranja (Figura 18e) e amarelo/laranja (Figura 18f).

Figura 18 - Gráficos de Pareto para significância dos efeitos das variáveis produção de pigmentos e suas relações proporcionais.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Concentração de glicose e glutamato monossódico (GMS) em g.L⁻¹

(a) amarelo.

(b) laranja.

(c) vermelho.

(d) vermelho/amarelo.

(e) vermelho/laranja,

(f) amarelo/laranja.

Conforme pode ser observado na Figura 18, o efeito linear das variáveis concentração de glicose e de glutamato monossódico, bem como o efeito de interação entre a concentração de glicose e pH do meio, foram significativos ($p < 0,05$) na produção dos pigmentos amarelo, laranja e vermelho. Para a produção de pigmento amarelo, a concentração de glicose apresentou efeito mais importante, seguido da concentração de glutamato e da interação entre concentração de glicose e pH. Para a produção de pigmentos vermelho e laranja, no entanto, a concentração de glutamato apresentou efeito mais importante. Em todos estes casos, a interação entre a concentração de glicose e pH apresentou efeito negativo, enquanto que o efeito da concentração das fontes de carbono e nitrogênio foi positivo.

Com relação às razões entre as quantidades de pigmentos produzidos, as concentrações de glicose e glutamato apresentaram efeito linear significativo ($p < 0,05$) para as razões vermelho/amarelo e amarelo/laranja, embora com sinal oposto para cada uma destas variáveis resposta. Para a razão vermelho/amarelo, também foi significativo ($p < 0,05$) o efeito de interação entre a concentração de glutamato monossódico e o pH do meio, enquanto que para a razão amarelo/laranja também foi significativo ($p < 0,05$) o efeito linear da variável pH. Para a razão vermelho/laranja apenas o efeito linear da variável pH foi significativo ($p < 0,05$), sendo negativo.

O efeito significativo e positivo da concentração de glicose na produção de pigmentos está relacionado à via metabólica de produção no fungo, sendo que a maior disponibilidade de fontes de carbono resulta no aumento da quantidade produzida pelo microrganismo, o que já foi relatado por outros autores (HAJJAJ et al., 1998; MORITZ, 2005; MEINICKE et al., 2012). Explicação similar pode ser dada ao efeito positivo da concentração de glutamato no meio, uma vez que a concentração de fonte de nitrogênio é um fator importante para a produção de pigmentos pelo fungo *Monascus Ruber*. De fato, relata-se que a maior concentração de fonte de nitrogênio resulta em aumento na produção de pigmentos amarelo, laranja e vermelho, principalmente relacionados ao vermelho, pois este reage prontamente com compostos contendo grupos amino contidos no meio e formam pigmentos que se tornam solúveis em água (WONG, KOEHLER, 1981; VENDRUSCOLO, 2009; KANG et al., 2013).

É interessante observar que, para os pigmentos laranja e vermelho, a concentração de glutamato apresentou efeito mais importante que a de glicose. Este fato pode ser explicado pela influência da disponibilidade de fonte de nitrogênio na conversão de pigmentos laranja em vermelho. Realmente, o pigmento laranja é reportado como precursor dos demais (LEE et al., 1995; HAJJAJ et al., 2000; VENDRUSCOLO., 2009; CHEN et al., 2015) e sua conversão em pigmento vermelho é favorecida em maiores concentrações de fonte de nitrogênio (WONG; KOEHLER, 1981; VENDRUSCOLO, 2009; HAJJAJ et al., 2015). De fato, conforme mostrado na Figura 18, a razão entre os pigmentos amarelo/laranja foi influenciada negativamente pela concentração de glutamato, efeito contrário ao observado para a razão amarelo/vermelho, indicando que, em condições de maior disponibilidade de fonte de nitrogênio, o pigmento laranja foi mais direcionado à produção de pigmento vermelho, ao invés de amarelo.

Com relação ao pH do meio de cultivo, a influência desta variável também foi importante, tanto em relação a seu efeito linear quanto em relação a seu efeito de interação com a glicose, conforme será melhor discutido adiante.

5.1.2.1 Modelos empíricos ajustados para explicar a influência das concentrações de glicose e glutamato monossódio e do pH do meio na produção de pigmentos e nas razões entre suas concentrações

Com base nos resultados mostrados na Tabela 12, procedeu-se à modelagem empírica das variáveis resposta relacionadas à produção de pigmentos e razão entre suas concentrações em função das variáveis estudadas. Em todos os casos, os modelos foram reduzidos pela exclusão de coeficientes de baixa significância, exceto quanto necessários para manutenção de hierarquia.

A Tabela 13 apresenta a análise de variância para um modelo ajustado para a resposta concentração de pigmento amarelo. O modelo correspondente é apresentado na Equação 10.

Tabela 13 - Análise de variância para o modelo empírico ajustado para a variável resposta produção de pigmento amarelo.

Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Modelo	10791,58	5	2158,31	11,45	0,0005*
A	4411,14	1	4411,14	23,40	0,0005*
B	3396,90	1	3396,40	18,02	0,0014*
C	293,25	1	293,25	1,56	0,2382
AC	1937,60	1	1937,60	10,28	0,0084*
C²	752,69	1	752,69	3,99	0,0714**
Resíduo	2073,80	11	188,53		
Falta de ajuste	1819,79	9	202,20	1,59	0,446
Erro puro	254,01	2	127,01		
Total	12865,38	16			
R²	0,8388				

Fonte: Autoria própria.

Nota: A - Concentração de glicose (g.L⁻¹).

B- concentração de glutamato monossódico. (g.L⁻¹).

C- pH.

*significativo ao nível de confiança de 95%.

**significativo ao nível de confiança de 90%.

$$\text{Conc. de pigmento amarelo } \left(\frac{\text{UA}}{\text{g}} \right) = 69,01 + 17,97.A + 15,77.B - 4,63.C - 15,56.A.C - 7,60.C^2 \quad (10)$$

Em que:

A: Concentração de glicose (g.L⁻¹)

B: Concentração de glutamato monossódico (g.L⁻¹)

C: pH

Conforme mostrado na Tabela 13, o modelo ajustado foi significativo ($p < 0,05$), não apresentando falta de ajuste e com valor de R^2 de 0,84. Assim, o modelo foi considerado adequado para explicar a variabilidade da variável resposta concentração de pigmento amarelo em função das concentrações de glicose e glutamato e do pH de cultivo na faixa de valores estudada. Com base no modelo, foram traçadas as superfícies (Figura 19 a,c,e) de resposta e curvas de nível (Figura 19 b,d,f) apresentadas nas seguintes condições de pH : 2,31 (Figura 19 a,b), 5,21 (Figura 19 c,d) e 8,19 (Figura 19 e,f).

Figura 19 - Superfícies de resposta (a,c,e) e curvas de nível (b,d,f) para a produção de pigmento amarelo em função das variáveis estudadas.

Fonte: Autoria própria.
 Nota: (a) e (b) pH 2,31.
 (c) e (d) pH 5,25
 (e) e (f) pH 8,19

Conforme mostrado na Figura 19, em todos os casos, valores mais elevados de concentração de fonte de nitrogênio resultaram em maior produção de pigmento amarelo. Os maiores valores produzidos foram observados em pH baixo. As diferentes condições de pH alteram o perfil de produção e suas quantidades, sendo que, para valores de pH mais elevado (Figura 19 e,f), concentração maior do pigmento é obtida empregando-se menor concentração de glicose, comportamento que se inverte para valores de pH intermediário (Figura 19c,d) ou mais baixo (Figura 19a,b). Este comportamento é relatado na literatura, em que valores de pH mais baixos favorecem a produção de pigmento amarelo em diferentes fontes de carbono, como glicose (VENDRUSCOLO, 2009), glicerol (MEINICKE et al., 2012), maltose (OLIVEIRA et al., 2016) e lactose (COSTA, 2017).

Conforme Wang et al. (2017), alta concentração de glicose e baixo pH favorece a conversão do pigmento laranja em amarelo com a diminuição da produção de citrinina, este fato pode estar relacionado com a maior facilidade proporcionada em pH baixo para oxidação do pigmento laranja (precursor) na conversão para o pigmento amarelo (VENDRUSCOLO, 2009; KANG et al., 2013), observado pela Figura (19 e,f), em que, a produção deste pigmento diminui consideravelmente com o aumento do pH.

A Tabela 14 apresenta a análise de variância para um modelo ajustado para a resposta concentração de pigmento laranja. O modelo correspondente é apresentado na Equação 11.

Tabela 14 - Análise de variância para o modelo empírico ajustado para a variável resposta produção de pigmento laranja.

Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Modelo	8436,62	6	1406,10	20,56	<0,0001*
A	1512,779	1	1512,779	22,077	0,000844*
B	4634,860	1	4634,860	67,639	<0,0001*
C	469,102	1	469,102	6,846	0,0257*
AC	1298,637	1	1298,637	18,952	0,0014*
A²	322,492	1	322,492	4,706	0,0555
C²	316,18	1	316,18	4,612	0,0572
Resíduo	685,225	10	68,522		
Falta de ajuste	471,32	8	58,91	0,55	0,7746**
Erro puro	212,75	2	106,37		
Total	9120,698	16			"continua"

Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	“conclusão” <i>p</i>
R²	0,9250				

Fonte: Autoria própria.

Nota: A -Concentração de glicose (g.L⁻¹).

B- concentração de glutamato monossódico (g.L⁻¹).

C- pH.

*significativo ao nível de confiança de 95%.

**significativo ao nível de confiança de 90%.

$$\text{Conc. pigmento laranja } \left(\frac{\text{UA}}{\text{g}} \right) = -150,84 + 5,056.A + 9,21 * B + 20,93.C - \quad (11)$$

$$0,036.A.B - 0,758.A.C + 0,24.B.C$$

Em que:

A: Concentração de glicose (g.L⁻¹)

B: Concentração de GMS (g.L⁻¹)

C: pH

Conforme mostrado na Tabela 14, o modelo ajustado foi significativo ($p < 0,05$), não apresentando falta de ajuste e com valor de R² de 0,925. Assim, o modelo foi considerado adequado para explicar a variabilidade da variável resposta concentração de pigmento laranja em função das concentrações de glicose e glutamato e do pH de cultivo na faixa de valores estudada.

Com base no modelo, foram traçadas as superfícies (Figura 20 a,c,e) de resposta e curvas de nível (Figura 20 b,d,f) apresentadas nas seguintes condições de pH : 2,31 (Figura 20 a,b), 5,21 (Figura 20 c,d) e 8,19 (Figura 20 e,f).

Figura 20 - Superfícies de resposta (a,c,e) e curvas de nível (b,d,f) para a produção de pigmento laranja em função das variáveis estudadas.

Fonte: Autoria própria.

Nota: (a) e (b) pH 2,31.

(c) e (d) pH 5,25.

(e) e (f) pH 8,19.

Conforme mostrado na Figura 20, em todos os casos, valores mais elevados de concentração de fonte de nitrogênio resultaram em maior produção de pigmento laranja. Os maiores valores produzidos foram observados em pH baixo e alta concentração de glicose (Figura 20a,b). As diferentes condições de pH alteram o perfil de produção e suas quantidades, sendo o aumento dos valores do pH (Figura 20e,f), diminuiu a quantidade de pigmento laranja produzido e a influência da concentração de glicose promoveu alterações na produção. É relatado na literatura que menores valores de pH, de 2 a 4, favorecem a produção de pigmento laranja, que é considerado o precursor dos pigmentos amarelo e vermelho (VENDRUSCOLO, 2009; SHI et al., 2015).

A Tabela 15 apresenta a análise de variância para um modelo ajustado para a resposta concentração de pigmento vermelho. O modelo correspondente é apresentado na Equação 12.

Tabela 15 - Análise de variância para o modelo empírico ajustado para a variável resposta produção de pigmento vermelho.

Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Modelo	16159,30	6	3693,22	18,24	<0,0001*
A	2729,33	1	2729,33	15,82	0,0022*
B	9314,94	1	9314,94	53,99	<0,0001*
C	499,07	1	499,07	2,89	0,1170
AC	2382,42	1	2382,42	13,81	0,0034
C²	812,47	1	812,47	4,71	0,0528
Resíduo	1897,75	11	172,52		
Falta de ajuste	1660,65	9	184,52	1,56	0,4515
Erro puro	237,10	2	118,55		
Total	17635,99	16			
R²	0,8924				

Fonte: Autoria própria.

Nota: A - Concentração de glicose (g.L⁻¹).

B- Concentração de glutamato monossódico (g.L⁻¹).

C- pH.

*significativo ao nível de confiança de 95%.

**significativo ao nível de confiança de 90%.

$$\text{Conc. pigmento. vermelho } \left(\frac{\text{UA}}{\text{g}} \right) = -277,60 + 6,59.A + 13,05.B + 58,13.C - 0,986.A.C - 2,578.C^2 \quad (12)$$

Em que:

A: Concentração de glicose (g.L⁻¹)

B: Concentração de GMS (g.L⁻¹)

C: pH

Conforme mostrado na Tabela 15, o modelo ajustado foi significativo ($p < 0,05$), não apresentando falta de ajuste e com valor de R^2 de 0,89. Assim, o modelo foi considerado adequado para explicar a variabilidade da variável resposta concentração de pigmento vermelho em função das concentrações de glicose e glutamato e do pH de cultivo na faixa de valores estudada.

Com base no modelo, foram traçadas as superfícies (Figura 21 a,c,e) de resposta e curvas de nível (Figura 21 b,d,f) apresentadas nas seguintes condições de pH : 2,31 (Figura 21 a,b), 5,21 (Figura 21 c,d) e 8,19 (Figura 21 e,f).

Figura 21 - Superfícies de resposta (a,c,e) e curvas de nível (b,d,f) para a produção de pigmento vermelho em função das variáveis estudadas.

Fonte: Autoria própria.

Nota: (a) e (b) pH 2,31.

(c) e (d) pH 5,25.

(e) e (f) pH 8,19.

Conforme mostrado na Figura 21, em todos os casos, valores mais elevados de concentração de fonte de nitrogênio resultaram em maior produção de pigmento vermelho. Os maiores valores produzidos foram observados em pH baixo e alta concentração de glicose (Figura 21a,b). As diferentes condições de pH alteram o perfil de produção e suas quantidades, sendo que, para valores de pH mais elevado (Figura 21e,f), concentração maior do pigmento é obtida empregando-se menor concentração de glicose, comportamento que se inverte para valores de pH intermediário (Figura 21c,d) ou mais baixo. Nota-se a semelhança do perfil gráfico e dos efeitos dos fatores com o pigmento amarelo. É relatado na literatura que a concentração de nitrogênio é um fator importante para a produção de pigmentos no *Monascus ruber*, principalmente o pigmento vermelho que são relacionados a reação com compostos contendo NH_3 e NH_2 com a molécula do pigmento precursor (laranja), uma vez que, esta molécula tem alta afinidade a compostos contendo grupos amino primários (HAJJAJ et al., 2000; JUNG et al., 2003; CARVALHO et al., 2005; JUNG et al., 2005; DUFOSSÉ et al., 2006; CHEN et al., 2015).

Os resultados demonstram em geral que o pH é um fator de grande importância na produção dos pigmentos amarelo (Figura 19), laranja (Figura 20) e vermelho (Figura 21), particularmente, com a interação da concentração de glicose. sobre o perfil da produção pigmentar. Foi observado também para todos os pigmentos o pH com baixo valor resultou em maior produção. Assim, para melhor compreensão foi estudado as relações proporcionais dos pigmentos produzidos, que está diretamente relacionado a característica colorimétrica final do extrato pigmentar.

A Tabela 16 apresenta a análise de variância para um modelo ajustado para a resposta das relações proporcionais vermelho/amarelo, vermelho/laranja, e amarelo/laranja.

Os modelos correspondentes são apresentados nas Equações 13, 14, 15. Com base nos modelos, foram traçadas curvas de nível (Figura 22), para as relações proporcionais vermelho/amarelo (Figura 22 a,b,c), vermelho/laranja (Figura 22 d,e,f) e amarelo/laranja (Figura 22 g,h,i) apresentadas nas seguintes condições de pH : 2,31 (Figura 22 a,d,j), 5,21 (Figura 22 b,e,h) e 8,19 (Figura 22 c,h,i).

Tabela 16 - Análise de variância para o modelo empírico ajustado para as variáveis respostas produção de pigmentos vermelho/amarelo, vermelho/laranja, amarelo/laranja.

Relação vermelho/amarelo						Relação vermelho/laranja					Relação amarelo/laranja				
Fator	SQ	GL	QM	F	p	SQ	GL	QM	F	p	SQ	GL	QM	F	p
Modelo	0,49	5	0,098	22,76	<0,0001*	0,094	6	0,016	5,00	0,0129	0,77	4	0,19	19,45	<0,0001*
A	0,085	1	0,085	19,64	0,0010	<0,0001	1	<0,0001	0,014	0,9082	0,13	1	0,13	13,33	0,0033*
B	0,34	1	0,34	79,37	<0,0001*	0,011	1	0,011	3,55	0,0887	0,47	1	0,47	46,93	<0,0001*
C	0,022	1	0,022	5,15	0,0443	0,015	1	0,015	4,80	0,0532	0,13	1	0,13	12,58	0,0040
BC	0,032	1	0,032	7,36	0,0202*	0,012	1	0,012	3,87	0,0774					
A²	<0,0001	1	<0,0001	2,30	0,1579	0,010	1	0,010	3,28	0,100					
C²						0,034	1	0,034	10,83	0,0081	0,049	1	0,049	4,96	0,0458
Resíduo	0,048	11	<0,0001			0,031	10	<0,0001			0,12	12	<0,0001		
FA	0,047	9	<0,0001	169,67	0,059	0,026	8	<0,0001	1,15	0,5453	0,11	10	0,011	2,88	0,285
EP	<0,0001	2	<0,0001			<0,0001	2	<0,0001			<0,0001	2	<0,0001		
Total	0,54	16				0,12	16				0,89	16			
R²	0,911					0,750					0,866				

Fonte: Autoria própria.

Nota : A -Concentração de glicose.

B- GMS em g/L.

C- pH.

SQ- Soma quadrática

GL – Graus de liberdade.

QM – Média quadrática.

FA – Falta de ajuste

EP – Erro puro.

Figura 22 - Curvas de nível para a relação vermelho/amarelo (a,b,c) vermelho/laranja (d,e,f) e amarelo/laranja (g,h,i).

Fonte: Autoria própria

Nota: (a), (d) e (g) pH 2,31.

(b), (e) e (h) pH 5,21

(c), (h) e (i) pH 8,19.

Equações das relações proporcionais pigmentares

$$\frac{\text{vermelho}}{\text{amarelo}} = 1,890 - 0,0272.A - 0,0153.B - 0,113.C + 0,0180.B.C + 2,76e^{-004}.A^2 \quad (13)$$

$$\frac{\text{vermelho}}{\text{laranja}} = 1,36 + 0,020.A - 0,04.B + 0,142.C - 0,01.B * C + 2,87e^{-004}.A^2 - 0,017C^2 \quad (14)$$

$$\frac{\text{amarelo}}{\text{laranja}} = 0,67 + 9,85e^{-004}.A - 0,092.B + 0,265.C - 0,020.C^2 \quad (15)$$

O modelo da relação pigmentar vermelho/amarelo, Tabela 16 foi considerado significativo a ($p < 0,05$), possui falta de ajuste ($p > 0,05$) e o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,911. Foi verificado que possui falta de ajuste, mas com um coeficiente de determinação superior a 0,9, conforme os critérios de Moldaviski e Cohen (1996) foi considerado como um modelo satisfatório.

Para a variável vermelho/amarelo notou-se que o fator concentração de glutamato possui o maior efeito, assim o aumento deste fator favorece proporcionalmente o pigmento vermelho, o fator glicose, ao contrário, favorece o pigmento amarelo podendo ser verificado a partir da Figura 22 (a,b,c). Nota-se também que empH mais básicos fatores concentração de glutamato e glicose provocaram maior variabilidade quantitativa em comparação com pH mais ácido, indicando que em meio básico o efeito destes fatores aumenta.

O modelo da relação pigmentar vermelho/laranja, Tabela 14 foi considerado significativo a ($p < 0,05$), sem falta de ajuste ($p > 0,05$) e o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,75, sendo considerada um modelo satisfatório. O fator pH foi o único significativo, com efeito quadrático negativo, podendo ser notado a partir da Figura 22 (d,e,f).

Em pH baixo, concentrações menores de glutamato favorecem o aumento da concentração proporcional de pigmento vermelho em relação ao laranja e em condições básicas o efeito é invertido.

O modelo da relação pigmentar amarelo/laranja, Tabela 16 foi considerado significativo a ($p < 0,05$), sem falta de ajuste ($p > 0,05$) e o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,86, foi considerado um modelo satisfatório. O fator concentração de glutamato possui maior efeito, assim o aumento deste fator diminui proporcionalmente o pigmento amarelo Figura 22 (g,h,i), podendo ser

explicado pela tendência deste fator reagir com grupos aminos e formar o pigmento vermelho, observa-se este fato, também, na variável resposta relacional vermelho/amarelo.

Na Figura 22 (g,h,i) nota-se que a relação amarelo/laranja apresentaram o mesmo comportamento variando somente os valores numéricos com a mudança do pH, diferente da relação vermelho/laranja.

As relações proporcionais podem ser entendidas como uma velocidade de transformação de um pigmento para o outro, assim pode-se sugerir que em pH baixo esta relação de transformação pode ser mais lenta que em pH básico, porém quantitativamente muito maior como verificado nas variáveis respostas produção de pigmentos amarelo, laranja e vermelho, onde em condições com pH mais ácido as quantidades produzidas de pigmentos são maiores. Este fato influencia na relação proporcional entre os pigmentos que é importante no padrão colimétrico final da fermentação no meio de cultura.

5.2 Processamento e análise digital de imagens – PADI

5.2.1 Processamento digital de imagens – PDI

5.2.1.1 Elaboração do algoritmo de extração dos dados

Para o processamento digital de imagens, foi construído um *plugin*, ou seja, uma estrutura algorítmica (Apêndice B), conforme mostrado na Figura 23.

No *plugin*, há entradas (*inputs*) e saídas (*outputs*) de informações. As entradas consistem na localização (x, y) do ponto de inoculação, no diâmetro da placa em (mm), e na resolução espacial (pixels/mm) da amostra fotográfica. A saída consiste na criação de uma planilha de dados no formato .xls (compatível com o Microsoft Excel) com as informações primárias da área pigmentar, micelial e dos halos miceliais, intensidade de pigmentação e desvio padrão.

Figura 23 - Arquitetura simplificada do plugin de extração dos dados.

Fonte: Autoria própria.

A resolução espacial foi de 17,19 pixels/mm, relacionadas a resolução espacial do instrumento fotográfico (16 megapixels) e à distância deste com o experimento (placa de Petri), que foi de 20 cm, utilizando uma placa com diâmetro de 90 mm.

A localização $F(x, y)$ do ponto central da placa (inoculação) das amostras fotográficas está no eixo horizontal x, com valor entre 100 a 105 mm, a partir do ponto referencial no limite esquerdo da amostra. Para o eixo vertical y, o valor está entre 120 a 125 mm a partir do limite superior da amostra.

As imagens foram convertidas em 8 bits (255 valores de intensidade) e segmentadas em níveis de cinza, sendo testadas 103 tipos de máscaras gráficas

a partir do software *ImageJ*. Entre elas, foi escolhida a máscara gráfica “16 colors”, por possuir as melhores características de limiarização, homogeneização, e uniformidade com identificação de regiões contíguas dos halos. Esta máscara gráfica segmenta a amostra fotográfica em 16 faixas de intervalos de intensidade, (cada faixa representada em determinada cor) possuindo cada uma com 16 unidades de níveis de cinza,

A intensidade baseia-se no contraste do gradiente pigmentar, expressos em níveis de cinza, que foram convertidos em uma escala de 0 a 100, sendo o valor “0” correspondente à intensidade pigmentar visível mínima (claro-branco) e o valor “100” à intensidade visível máxima (escuro – preto), conforme a seção 4.5.2.2. A homogeneização e a limiarização referem-se à detecção dos halos miceliais e pigmentares, e que dependem da identificação de regiões contíguas e inteiras com padrões de propagação bem definidos.

Estas características foram observadas com esta máscara gráfica, possibilitando a caracterização do perfil morfológico do crescimento microbiano e de pigmentos do *Monascus ruber* Thieghan IOC 2225 e a quantificação dos parâmetros estudados.

5.2.2 Análise digital de imagens - ADI

5.2.2.1 Elaboração do algoritmo de análise dos dados

Para os dados originados do PDI, foram criadas estruturas algorítmicas em VBA (*Visual Basic for Applications*), em linguagem orientada ao objeto, para elaboração de um painel inteligente (*Dashboard*), as quais constroem gráficos e tabelas automáticos (PALEY et al., 2017), conforme Figura 24.

Estes algoritmos inter-relacionam os dados obtidos (extraídos da análise fotográfica) e permitem a obtenção das informações, além de possibilitar a rastreabilidade e o monitoramento ágil dos dados primários e secundários.

Figura 24 - Painel gráfico automático para análise de dados – Dashboard.

Fonte: Autoria própria.

5.2.3 Análise, por PADI, dos resultados obtidos com a execução do planejamento estatístico: caracterização macromorfológica

Os experimentos realizados nas diferentes concentrações de glicose, glutamato monossódico e pH, foram submetidos à análise de parâmetros para a caracterização do perfil de propagação e crescimento do fungo, considerando os parâmetros velocidade radial pigmentar, velocidade radial micelial, área micelial e variação da intensidade pigmentar.

Para a definição do perfil de crescimento e de propagação, elaborou-se uma estrutura algorítmica (Apêndice C) que realiza uma varredura do perfil pigmentar, a partir do ponto de inoculação, caracterizando radialmente em unidades milimétricas (mm) a intensidade pigmentar até a região limítrofe da placa de Petri, em determinado tempo ou durante a fermentação (Figura 25 e Figura 26). Assim, foi realizada uma análise preliminar para verificar o

crescimento vegetativo, que está em contato direto com o substrato, a partir do reverso da placa de Petri.

Também se avaliou o micélio reprodutivo ou aéreo, composto por esporos, localizado na superfície da placa. As avaliações determinaram o padrão de crescimento, que é radial e consistiu em verificar o gradiente pigmentar a partir do ponto de inoculação.

Figura 25 - Perfil da intensidade pigmentar na superfície da placa, micélio aéreo nas posições 0 mm, 20mm e 40 mm a partir do ponto de inoculação, ao longo do tempo de fermentação.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Experimento 15 conforme a Tabela 10.

Gráfico elaborado a partir dos algorítmicos constuídos no *Dashboard*.

Figura 26 - Perfil da intensidade pigmentar no reverso da placa, micélio vegetativo nas posições 0 mm, 20mm e 40 mm a partir do ponto de inoculação, ao longo do tempo de fermentação.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Experimento 15 conforme a Tabela 10.

Gráfico elaborado a partir dos algorítmicos constuídos no *Dashboard*.

Pode-se observar a partir dos dados que em cada posição da placa existe um determinado valor de intensidade pigmentar. Além disso, esses valores são diferentes entre si, indicando que em cada local ao longo da placa existe um estado diferente da fermentação. Isso pode ser observado nas Figura 25 e 26, as quais mostram o perfil pigmentar ao longo do tempo das posições 0 mm, 20mm e 40 mm, a partir do ponto de inoculação, para o reverso e a superfície da placa.

Os resultados obtidos mostram que o micélio reprodutivo (aéreo - superfície) (Figura 25) possui padrão complexo e seu gradiente pigmentar aumenta e diminui ao longo do tempo. Este fato acontece devido ao aspecto de coloração dos esporos. Nota-se para a região de 0 mm, que a partir do tempo de 192 h a pigmentação diminui e para a região de 20mm no tempo de 288 h sua intensidade se estabiliza, ocorrendo pelo o avanço da região esporulante. Para a região de 40 mm é verificada uma estabilização na intensidade inicial devido ao tempo que o microrganismo leva para atingir esta região (192 h). Posteriormente ocorre uma curva ascendente nos seus valores.

O micélio vegetativo (reverso), por outro lado, demonstrou um comportamento correspondente a um perfil linear ascendente (Figura 26), a partir do ponto de inoculação, um comportamento bem definido.

Foi observado, que o tempo de início para mudança pigmentar variou conforme a posição. Em regiões próximas ao ponto central (inoculação) as mudanças pigmentares foram mais rápidas, e em comparação com o micélio aéreo obteve um crescimento radial maior.

A partir destes resultados e com a complexidade elevada do padrão pigmentar do micélio aéreo, o que dificulta a detecção métrica dos parâmetros, adotou-se o micélio vegetativo (reverso da placa) como parâmetro para a caracterização de crescimento e propagação morfológica do *Monascus ruber*.

Para a definição dos halos pigmentares e miceliais, foi realizada, conforme a seção 4.5.3, uma análise micromorfológica qualitativa no 12º dia para verificar a presença ou ausência de estruturas do microrganismo em cada halo de pigmentação visando à determinação dos halos miceliais e pigmentares, ou meio de cultivo, conforme a Tabela 17.

Tabela 17 - Relação de experimentos com presença ou ausência de pigmentos e estruturas micromorfológicas do fungo nas diferentes regiões (halo).

Experimento*	Intensidade de pigmentação**						
	100-94	94-88	88-76	76-70	70-64	64-58	58-0
Experimento 1	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	P	-
Experimento 2	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	P	-
Experimento 3	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	P	-
Experimento 4	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	P	-
Experimento 5	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	P	-
Experimento 6	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	P	-
Experimento 7	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	P	-
Experimento 8	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	P	-
Experimento 9	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	P	-
Experimento 10	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	P	-
Experimento 11	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	P	-
Experimento 12	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	P	-
Experimento 13	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	P	-
Experimento 14	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	P	-
Experimento 15	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	P	-
Experimento 16	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	P	-
Experimento 17	P/M	P/M	P/M	P/M	P/M	P	-

Fonte: Autoria própria.

Nota: As faixas de intensidade determinam cada halo detectado pela máscara gráfica.

* experimentos realizados nas condições especificadas na Tabela 12.

**P - presença de pigmento extracelular; M – presença de estruturas do microrganismo.

(-) - ausência de pigmento e estruturas microbianas.

Assim, observou-se que nos halos pigmentares 100-94, 94-98, 88-76, 76-70, 70-64 havia presença de estruturas micromorfológicas do microrganismo (Tabela 17) e foram considerados como halos miceliais.

O halo referente à faixa 64-58 foi apenas pigmentar e os halos com intensidade abaixo de 58 são valores do padrão colorimétrico do meio de cultivo.

Logo, as faixas de intensidades de 64 a 100 correspondem a áreas referentes ao micélio vegetativo e pigmentar e as áreas de 58 a 100 foram consideradas áreas contendo apenas pigmentos liberados pelo fungo filamentoso.

A Figura 27 demonstra algumas micrografias realizadas para a determinação do halo micelial, pigmentar e micelial/pigmentar.

Figura 27 - Exemplos de imagens de micrografias realizadas para a detecção de estruturas micromorfológicas do fungo *Monascus ruber*.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Micrografia com aumento de 400X.

A partir da determinação do padrão de propagação, aplicou-se, conforme as Figuras 28, 29 e 30 a máscara gráfica “16 colors” a partir do software *ImageJ*, para identificar e caracterizar os parâmetros macromorfológicos.

É possível verificar a mudança nos halos detectados (por cada faixa de intensidade pigmentar), onde estes se deslocam, variam a sua forma e tamanho ao longo do tempo dos 20 dias do tempo de fermentação.

Figura 28 - Aplicação e caracterização do perfil de propagação do fungo *Monascus ruber* Thieghan IOC 2225 utilizando a máscara gráfica “16 colors”:
experimentos 1 a 6 do planejamento estatístico.

92

Fonte: Autoria própria.
Nota: Condições mostradas na Tabela 12.

Figura 29 - Aplicação e caracterização do perfil de propagação do fungo *Monascus ruber* Thieghan IOC 2225 utilizando a máscara gráfica “16 colors”: experimentos 7 a 12 do planejamento estatístico.

Fonte: Autoria própria.
Nota: Condições mostradas na Tabela 12.

Figura 30 - Aplicação e caracterização do perfil de propagação do fungo *Monascus ruber* Thieghan IOC 2225 utilizando a máscara gráfica “16 colors”: experimentos 13 a 17 do planejamento estatístico.

Fonte: Autoria própria.
Nota: Condições mostradas na Tabela 12.

5.2.3.1 Área

A área micelial refere-se ao micélio vegetativo, que está em contato direto com o substrato e se origina a partir do crescimento dos tubos germinativos para a formação das hifas, formando uma região onde ocorre um contato direto do microrganismo com meio de cultivo (ANDRADE et al., 2015).

A Figura 31 representa a distribuição proporcional, em mm², da área pigmentar e micelial. Esta corresponde à soma da área micelial (presença de estruturas microscópicas do microrganismo), que contém os halos miceliais, com o halo pigmentar (ausência de estruturas microscópicas do microrganismo), o qual está relacionado à presença apenas de pigmentos e se origina da difusão dos pigmentos produzidos pelo metabolismo do *Monascus ruber* no meio de cultivo.

Figura 31 - Área pigmentar, micelial e halos pigmentares e miceliais com representação gráfica proporcional no tempo de 480 horas para os experimentos do planejamento estatístico

Fonte: Autoria própria.

Nota: Condições de cada experimento apresentadas na Tabela 10.

As Figuras 32 e 33 mostram a área micelial e pigmentar de cada experimento ao longo do tempo. Observa-se que os experimentos conduzidos sob pH baixo apresentaram áreas miceliais menores em comparação aos realizados em meio com pH mais alcalino.

Figura 32- Área pigmentar e micelial com representação gráfica proporcional no período de fermentação de 480 horas, correspondente aos experimentos 1 a 9 do planejamento estatístico.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Condições de cada experimento apresentadas na Tabela 10.

Gráficos elaborados a partir dos algorítmicos constuídos no *Dashboard*.

Figura 33 - Área pigmentar e micelial com representação gráfica proporcional no período de fermentação de 480 horas, correspondente aos experimentos 10 a 17 do planejamento estatístico.

LEGENDA

■ Área micelial :100-94 ■ Área micelial: 94-88 ■ Área micelial: 88-82 ■ Área micelial: 82-76
 ■ Área micelial: 76-70 ■ Área micelial 70-64 ■ Área pigmentar 64-58 ■ Meio de cultivo: 58-0

Fonte: Autoria própria.

Nota: Condições de cada experimento apresentadas na Tabela 10.

Gráficos elaborados a partir dos algorítmicos constuídos no *Dashboard*.

O experimento 16 (pH 5,25, glicose 35g.L⁻¹, glutamato 5g.L⁻¹) apresentou maior área micelial, enquanto que o experimento 13 (pH 2,31, glicose 25g.L⁻¹, glutamato 5g.L⁻¹) apresentou a menor área.

Pode-se se notar pelo perfil das Figuras 32 e 33 que, conforme a evolução do tempo de fermentação, as áreas que representaram pigmentação mais intensa (escura) aumentaram de valor e as áreas que representam o halo pigmentar e os halos miceliais de menor intensidade diminuíram de tamanho.

5.2.3.2 Velocidade radial de propagação micelial

A velocidade radial pigmentar (Figuras 34 e 35) caracteriza o perfil de propagação micelial (biomassa) no meio de cultivo, sendo um parâmetro muito importante para a compreensão do perfil de crescimento ao longo do tempo. É relatado na literatura que mensurar a velocidade de crescimento radial é importante parâmetro para auxiliar na seleção de meios e condições de cultivo e também para selecionar microrganismos produtores de diferentes metabólitos, seja pigmentos, biosurfactentes, entre outros (GABIATTI et al., 2006; LOPEZ-MALO et al., 1995; VENDRUSCOLO, 2009; MAGRO et al., 2016).

Em diversos trabalhos, a mensuração da velocidade radial é a partir da utilização de uma técnica manual, utilizando um paquímetro e por detecção visual em determinados pontos pré-estabelecidos (CARVALHO et al., 2005; MEINICKE, 2008; DE OLIVEIRA et al., 2016; MAGRO et al., 2016). A técnica proposta neste trabalho se diferencia pela utilização de rotinas algorítmicas, com detecção a partir do PADI e que compreendem toda amostra, resultando em alta precisão, além de extrair diversos parâmetros e empregando variáveis lógicas para a determinação do perfil de crescimento ao longo do tempo, o que provoca maior confiabilidade e entendimento nos resultados.

Foi observado que, nos dois primeiros tempos amostrais, o crescimento foi mínimo e praticamente não havia definição macromorfológica visual.

Figura 34 - Perfil da velocidade radial micelial correspondente aos experimentos 1 ao 10 do planejamento estatístico.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Condições de cada experimento apresentadas na Tabela 10.

Gráficos elaborados a partir dos algorítmicos constuídos no *Dashboard*.

Figura 35 - Perfil da velocidade radial micelial correspondente aos experimentos 11 ao 17 do planejamento estatístico.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Condições de cada experimento apresentadas na Tabela 10.

Gráficos elaborados a partir dos algorítmicos constuídos no *Dashboard*.

O perfil gráfico (Figuras 34 e 35) dos experimentos mostra a existência de um período de adaptação do inóculo e germinação dos esporos até o tempo de 96 horas, um período de crescimento mais acentuado, no qual a velocidade depende das concentrações dos fatores (glicose, pH, glutamato) e outro com crescimento mais lento, quando o experimento ultrapassa os 40 mm de raio útil, conforme verificado nos experimentos 8,9,10,14,15,16,17. Este fato está relacionado com a proximidade da área micelial da região limítrofe do meio de

cultivo, verifica-se uma relação sigmoideal com uma analogia com o crescimento microbiano.

O ajuste linear dos dados de crescimento radial micelial obtidos nos experimentos, em sua maioria, resultou em coeficientes de regressão acima de 0,90, o que indica um comportamento de perfil linear na fase de crescimento.

A maior velocidade de crescimento radial micelial ($0,1056 \text{ mm.h}^{-1}$) foi obtida no cultivo realizado no experimento 16 (pH 5,25, glicose 25g.L^{-1} , glutamato 5g.L^{-1}). A menor velocidade de crescimento radial ($0,0311 \text{ mm h}^{-1}$), por sua vez, foi obtida no experimento 13 (pH 2,31, glicose 25g.L^{-1} , glutamato 5g.L^{-1}).

Nota-se, a partir dos resultados obtidos, que o pH é fator importante no crescimento micelial, sendo que em valores mais baixos para esta variável (2 a 4), resultaram na diminuição da velocidade radial, conforme os experimentos 1, 3, 13. Realmente, o pH normalmente tem sido relatado em outros trabalhos como um dos fatores mais importantes no crescimento microbiano e na atividade metabólica em fermentação em estado sólido (BABITHA et al., 2007, VELMURUGAN et al., 2011; OLIVEIRA, 2017).

5.2.3.3 Velocidade radial de propagação pigmentar

A velocidade radial pigmentar (Figuras 36 e 37), caracteriza o perfil de propagação de pigmentos no meio de cultivo, sendo um parâmetro muito importante para a definição visual/imagem da colônia formada. Foi observado que, nos dois primeiros tempos amostrais, assim como ocorreu com o crescimento micelial, o crescimento radial foi mínimo e praticamente não existia definição macromorfológica visual.

A maior velocidade de crescimento radial de propagação pigmentar foi obtida no cultivo realizado no experimento 16 ($0,117 \text{ mm.h}^{-1}$), (pH 5,25, glicose 35g.L^{-1} , glutamato 5g.L^{-1}), enquanto que a menor velocidade de crescimento radial ($0,0311 \text{ mm h}^{-1}$) foi obtida no experimento 13 ($0,0504 \text{ mm.h}^{-1}$), (pH 2,31, glicose 35g.L^{-1} , glutamato 5g.L^{-1}).

Figura 36 - Perfil da velocidade radial de propagação pigmentar correspondente aos experimentos 1 ao 10 do planejamento estatístico.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Condições de cada experimento apresentadas na Tabela 10.

Gráficos elaborados a partir dos algorítmicos constuídos no *Dashboard*.

Figura 37 - Perfil da velocidade radial de propagação pigmentar correspondente aos experimentos 11 ao 17 do planejamento estatístico.

Fonte: Autoria própria

Nota-se que os coeficientes de regressão obtidos para o ajuste linear dos dados das Figuras 36 e 37 estão entre 0,57 a 0,90. Esta variabilidade pode ser explicada pelo fato da velocidade radial pigmentar estar relacionada à liberação e propagação de pigmentos e à sua difusão no meio de cultivo, sendo que a difusão pigmentar pode ser alterada pelos níveis das variáveis em estudo empregados em cada caso e pelo perfil de liberação dos metabólitos do microrganismo.

O perfil de liberação de metabólitos no meio, de acordo com relatos da literatura, pode tornar o meio de cultivo propício ao crescimento da colônia, o que depende das condições aplicadas (CARVALHO et al., 2005; MEINICKE, 2008; OLIVEIRA, 2017). Este fato pode explicar a variabilidade do coeficiente de regressão dos experimentos.

5.2.3.4 Variação da Intensidade pigmentar

A variação da intensidade pigmentar refere-se à mudança pigmentar da liberação extracelular que o microrganismo provocou na condição colorimétrica do meio de cultivo, durante a fermentação, conforme a Figura 38.

Figura 38 - Variação da intensidade pigmentar, que compreende a diferença colorimétrica do meio de cultivo no tempo inicial (0 h) com o tempo final (480 h).

Fonte: Autoria própria

Nota: Condições de cada experimento apresentadas na Tabela 10

Conforme mostrado na Figura 38, o experimento 7 (pH 7, glicose 25g.L⁻¹, glutamato 7g.L⁻¹) foi o que apresentou maior variação pigmentar e o experimento 13 (pH 2,31, glicose 25g.L⁻¹, glutamato 5g.L⁻¹) apresentou menor variação. Nota-se, assim, que o pH foi um forte fator de influência na variação pigmentar, que está relacionado a liberação extracelular dos pigmentos no meio de cultivo.

Conforme alguns trabalhos, a concentração do pH no meio de cultivo tem fundamental importância na ativação das enzimas que participam do metabolismo secundário e também na permeabilidade dos grupos aminosatravés da parede celular (OROZCO; PEREIRA; KILIKIAN, 2003; RITCHIE, 2013). Este fato, altera a proporção entre os pigmentos produzidos (intracelular) e sua liberação (extracelular) para o meio de cultivo, principalmente o pigmento vermelho, acarretando mudanças no aspecto macromorfológico do microrganismo. (MEINICKE, 2008).

5.2.4 Avaliação, empregando planejamento estatístico, da influência das variáveis pH, concentração de fonte de carbono e concentração de fonte de nitrogênio no perfil de propagação macromorfológico pelo fungo *Monascus ruber* Thieghan IOC 2225

Procedeu-se à análise estatística dos resultados obtidos com a execução do planejamento experimental. As variáveis resposta consideradas foram área micelial, velocidade de propagação micelial, velocidade de propagação pigmentar, variação da intensidade pigmentar extracelular, todos obtidos no tempo de 20 dias de fermentação. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 18.

Tabela 18 - Valores obtidos para as variáveis reposta morfológicas/morfométricas do perfil de propagação do fungo *Monascus ruber* Thieghan IOC 2225 sob diferentes condições.

Variáveis independentes (valores codificados entre parênteses)				Variáveis dependentes			
Experimento	pH	Concentração de glicose (g.L ⁻¹)	Concentração de glutamato de (g.L ⁻¹)	Área micelial (mm ²)	Velocidade radial micelial (mm/h)	Velocidade radial pigmentar (mm/h)	Variação da Intensidade pigmentar
1	3,5 (-1)	25 (-1)	3 (-1)	2119,38	0,0554	0,0825	7,056
2	3,5 (-1)	45 (1)	3 (-1)	5391,86	0,0908	0,1109	19,60
3	3,5 (-1)	25 (-1)	7 (+1)	2331,26	0,0536	0,0769	9,408
4	3,5 (-1)	45 (1)	7 (+1)	3682,59	0,0724	0,103	10,192
5	7 (1)	25 (-1)	3 (-1)	6063,32	0,0985	0,1074	23,912
6	7 (1)	45 (1)	3 (-1)	5707,51	0,0949	0,106	21,952
7	7 (1)	25 (-1)	7 (1)	6221,14	0,1022	0,1146	35,864
8	7 (1)	45(1)	7 (1)	6063,32	0,105	0,1124	32,144
9	5,25 (0)	18,18 (-1,68)	5 (0)	6135,94	0,1028	0,1104	33,712
10	5,25 (0)	51,82 (1,68)	5 (0)	6095,85	0,1036	0,1135	34,496
11	5,25 (0)	35 (0)	1,64 (-1,68)	5797,17	0,0892	0,1076	21,168
12	5,25 (0)	35 (0)	8,36 (1,68)	694,45	0,0837	0,1029	13,72
13	2,31 (-1,68)	35 (0)	5 (0)	4750,85	0,0311	0,0504	4,312
14	8,19 (1,68)	35 (0)	5 (0)	6136,40	0,1101	0,11	31,752
15	5,25 (0)	35 (0)	5 (0)	6198,33	0,1054	0,1166	34,104
16	5,25 (0)	35 (0)	5 (0)	6168,33	0,1056	0,117	31,41
17	5,25 (0)	35 (0)	5 (0)	6201,48	0,1052	0,113	31,752

Fonte: Autoria própria

Nota: A fermentação foi conduzida em estado semissólido segundo um planejamento fatorial 2³ estrela rotacional, durante 20 dias.

Para a análise da significância dos efeitos das variáveis em estudo nas respostas avaliadas, foram elaborados gráficos de Pareto (Figura 39), para significância das variáveis da caracterização morfológica, variáveis respostas: área micelial (Figura 39a), velocidade de propagação micelial (Figura 39b), velocidade de propagação pigmentar (Figura 39c), variação da intensidade pigmentar (Figura 39d).

Figura 39 - Gráficos de Pareto para significância das variáveis da caracterização morfológica.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Concentração de glicose e glutamato monossódico (GMS) em g.L⁻¹.

(a) área micelial.

(b) velocidade de propagação micelial.

(c) velocidade de propagação pigmentar.

(d) variação da intensidade pigmentar.

Conforme pode ser observado na Figura 39, o pH apresentou efeitos linear e quadrático significativos ($p < 0,05$) para todas as variáveis resposta obtidas via PADI. Também para todas as respostas, o efeito linear da variável pH foi o mais importante, sendo positivo em todos os casos. A concentração de glutamato

monossódico apresentou efeito quadrático significativo ($p < 0,05$) para a velocidade micelial e variação da intensidade pigmentar, sendo também significativa ($p < 0,05$), para esta última variável resposta, sua interação com o pH do meio. Para as variáveis resposta área micelial, velocidade micelial e intensidade pigmentar, foi também significativa ($p < 0,05$) e negativa o efeito do glutamato e também a interação entre a concentração de glicose e o pH.

O efeito linear positivo da variável pH indica que o aumento no valor, favorece maior crescimento do fungo e a propagação de pigmentos em comparação a pH mais ácidos. O efeito quadrático negativo, por sua vez, sugere que a faixa de valores de pH avaliada neste projeto, contém ou é próxima da região que maximiza os valores das variáveis resposta consideradas.

O efeito linear positivo da variável concentração de pH no meio está diretamente relacionado ao perfil e velocidade de crescimento do fungo filamentoso.

Este fato é relatado na literatura como sendo um dos fatores mais importante na determinação macromorfológica do *Monascus ruber*, em que, pH baixo (2 a 3) diminui o tamanho da colônia formada e nestas condições a intensidade pigmentar extracelular tendência a pigmentação amarelo-laranja, o que explica o efeito linear positivo desta variável, uma vez que, em pH alto a coloração se intensifica em vermelho-purpura (VENDRUSCOLO, 2009; OLIVEIRA 2017).

5.2.4.1 Modelos empíricos ajustados para explicar a influência das concentrações de glicose e glutamato monossódio e do pH do meio de cultivo no perfil de propagação macromorfológica: área micelial, velocidade de propagação micelial, velocidade propagação pigmentar, variação da intensidade pigmentar.

Com base nos resultados mostrados na Tabela 18, procedeu-se à modelagem empírica das respostas resultantes do processamento e análise digital de imagens. Em todos os casos, os modelos foram reduzidos pela exclusão de coeficientes de baixa significância, exceto quanto necessários para manutenção de hierarquia. A Tabela 19 apresenta a análise de variância para um

modelo ajustado para a resposta área micelial. O modelo correspondente é apresentado na Equação 16.

Tabela 19 - Análise de variância para o modelo empírico ajustado para a variável resposta área micelial.

Área micelial (mm ²)					
Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Modelo	4,45.10 ⁷	5	4,445.10 ⁷	22,55	<0,0001*
A	1,197.10 ⁶	1	1,197.10 ⁶	3,03	0,1094
B	5,511.10 ⁵	1	5,511.10 ⁵	1,40	0,2620
C	2,837.10 ⁷	1	2,837.10 ⁷	71,94	<0,0001*
AC	3,299.10 ⁶	1	3,299.10 ⁶	8,37	0,0146*
C²	1,104.10 ⁷	1	1,104.10 ⁷	28,00	0,0003*
Resíduo	4,338.10 ⁶	11	3,943.10 ⁵		
Falta de ajuste	4.337.10 ⁶	9	4,819.10 ⁵	1,59	0,0007*
Erro puro	654,96	2	327,48		
Total	4,879.10 ⁷	16			
R²	0,911				

Fonte: Autoria própria.

Nota: A - Concentração de glicose (g.L⁻¹).

B - Concentração de glutamato monossódico (g.L⁻¹).

C - pH.

*significativo ao nível de confiança de 95%.

**significativo ao nível de confiança de 90%.

$$\text{Área micelial} = -14101,05 + 222,26.A - 100,44.B + 5264,04.C + 36,70.A.C - 300,58.C^2 \quad (16)$$

Em que:

A: Concentração de glicose (g.L⁻¹)

B: Concentração de GMS (g.L⁻¹)

C: pH

Conforme mostrado, o modelo ajustado foi significativo ($p < 0,05$), com valor de R^2 de 0,91, embora tenha apresentado falta de ajuste significativa ($p < 0,05$). Apesar da falta de ajuste, considerando-se o valor de R^2 superior a 0,90, conforme os critérios de Moldaviski e Cohen (1996), o modelo foi aceito. Com base no modelo, foram traçadas as superfícies (Figura 40 a,c,e) de resposta curvas de nível (Figura 40 b,d,f) apresentadas nas seguintes condições de pH: 2,31 (Figura 40 a,b), 5,21 (Figura 40 c,d) e 8,19 (Figura 40 e,f).

Figura 40 - Superfícies de resposta (a, c, e) e curvas de nível (b, d, f) para a área micelial em função das variáveis estudadas.

Fonte: Autoria própria.

Nota: (a) e (b) pH 2,31.

(c) e (d) pH 5,25.

(e) e (f) pH 8,19.

O modelo sugere que o pH mais básico aumenta a área micelial tendo uma faixa de valores que maximiza este valor. Por sua vez valores baixos diminuem o tamanho do micélio vegetativo. A interação linear negativa entre glicose e pH determina que o aumento da glicose no meio, diminui o efeito do pH, assim condições mais ácidas com concentrações altas de glicose podem possuir áreas miceliais com tamanho que não sejam tão diminutos.

Conforme mostrado na Figura 40, valores mais elevados de concentração de carbono para concentração de pH baixo (Figura 40 a,b) e intermediário (Figura 40 c,d) resultaram em maior área micelial. Os maiores valores encontrados foram observados em pH alto e com baixa concentração de glicose. Pode-se observar pelos dados o pH como um fator importante e limitante na determinação da área micelial vegetativa, que está relacionada a quantificação da biomassa e também com a utilização do substrato, onde maior área micelial, maior contato das hifas do fungo filamentoso e como consequência a utilização do substrato disponível. Este fato, pode explicar as condições preditas em pH elevado (Figura 40 e,f), em que, quantidade menores da concentração de glicose favorecem áreas miceliais maiores, pois, o modelo indica uma necessidade menor da concentração de glicose para a sua propagação.

A Tabela 20 apresenta a análise de variância para um modelo ajustado para a resposta velocidade de propagação micelial. O modelo correspondente é apresentado na Equação 17.

Tabela 20 - Análise de variância para o modelo empírico ajustado para a variável resposta velocidade de propagação micelial.

Velocidade micelial mm/h					
Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Modelo	$7,684.10^{-3}$	6	$7,684.10^{-3}$	22,55	$<0,0001^*$
A	$2,195.10^{-4}$	1	$2,195.10^{-4}$	3,86	0,0777
B	$1,793.10^{-5}$	1	$1,793.10^{-5}$	0,32	0,5865
C	$4,998.10^{-3}$	1	$4,998.10^{-3}$	88,00	$<0,0001^*$
AC	$3,781.10^{-4}$	1	$3,781.10^{-4}$	6,66	$0,0274^*$
B²	$5,557.10^{-4}$	1	$5,557.10^{-4}$	9,78	$0,0107^*$
C²	$1,872.10^{-3}$	1	$1,872.10^{-3}$	32,96	0,0002
Resíduo	$5,680.10^{-4}$	10	$5,680.10^{-5}$		
Falta de ajuste	$5,679.10^{-4}$	8	$7,099.10^{-5}$	1774,65	0,0006
Erro puro	$8,000.10^{-8}$	2	$4,000.10^{-8}$		
Total	$8,252.10^{-3}$				"contínua"

Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	“conclusão” p
R²	0,931				

Fonte: Resultados originais de pesquisa

Nota: A - Concentração de glicose.

B - concentração de glutamato monossódico.

C - pH.

*significativo ao nível de confiança de 95%.

**significativo ao nível de confiança de 90%

$$\text{Vel. micelial} = 0,10 + 4,00 \cdot 10^{-3} \cdot A - 1,146 \cdot 10^{-3} + 0,019 \cdot -6,875 \cdot 10^{-3} \cdot A - 6,708 \cdot 10^{-3} \cdot B^2 - 0,012 \cdot C^2 \quad (17)$$

Onde:

A: Concentração de glicose (g.L⁻¹)

B: Concentração de GMS (g.L⁻¹)

C: pH

Conforme mostrado, o modelo ajustado foi significativo ($p < 0,05$), com valor de R^2 de 0,93, embora tenha apresentado falta de ajuste significativa ($p < 0,05$). Apesar da falta de ajuste, considerando-se o valor de R^2 superior a 0,90, conforme os critérios de Moldaviski e Cohen (1996), o modelo foi aceito. Com base no modelo, foram traçadas as superfícies (Figura 41 a,c,e) de resposta e curvas de nível (Figura 41 b,d,f) apresentadas nas seguintes condições de pH: 2,31 (Figura 41 a,b), 5,21 (Figura 41 c,d) e 8,19 (Figura 41 e,f).

Figura 41 - Superfícies de resposta (a, c, e) e curvas de nível (b, d, f) para a velocidade de propagação (crescimento) micelial em função das variáveis estudadas.

Fonte: Autoria própria.

Nota: (a) e (b) pH 2,31.

(c) e (d) pH 5,25.

(e) e (f) pH 8,19.

Conforme mostrado na Figura 41, valores mais elevados de concentração de carbono para concentração de pH baixo (Figura 41 a,b) e intermediário (Figura 41c,d) resultaram em maior crescimento radial micelial. Ao contrário, para pH elevado concentrações menores de glicose favorecem o crescimento. Nota-se, que em pH baixo obtém-se os menores valores de crescimento radial micelial, fato relatado na literatura em diferentes condições de substrato (HAJJAJ et al., 1998; MORITZ, 2005; MEINICKE et al., 2012).

Pode-se observar pelo perfil gráfico, de modo geral (Figura 41), que existem intervalos de valores, independente da concentração de pH, em que, a concentração de glutamato favorece o crescimento, estes valores se encontram em faixas intermediárias de concentração.

Nota-se, também a similaridade com os resultados encontrados com a variável resposta área micelial, que estão diretamente relacionadas no perfil de propagação.

A Tabela 21 apresenta a análise de variância para um modelo ajustado para a resposta velocidade radial da propagação pigmentar. O modelo correspondente é apresentado na Equação 18.

Tabela 21 - Análise de variância para o modelo empírico ajustado para a variável resposta velocidade de propagação pigmentar.

Velocidade de propagação pigmentar					
Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Modelo	$4,267 \cdot 10^{-3}$	5	$8,533 \cdot 10^{-4}$	14,91	0,0001*
A	$2,306 \cdot 10^{-4}$	1	$2,306 \cdot 10^{-4}$	4,03	0,0700
B	$4,460 \cdot 10^{-6}$	1	$4,460 \cdot 10^{-6}$	0,078	0,7853
C	$2,05 \cdot 10^{-3}$	1	$2,05 \cdot 10^{-3}$	35,82	<0,0001*
AC	$4,22 \cdot 10^{-4}$	1	$4,22 \cdot 10^{-4}$	7,37	0,0201*
C²	$1,56 \cdot 10^{-3}$	1	$1,56 \cdot 10^{-3}$	27,25	0,0003*
Resíduo	$6,297 \cdot 10^{-4}$	11	$5,724 \cdot 10^{-5}$		
Falta de ajuste	$6,20 \cdot 10^{-4}$	9	$6,20 \cdot 10^{-4}$	14,19	0,0675**
Erro puro	$9,70 \cdot 10^{-6}$	2	$9,70 \cdot 10^{-6}$		
Total	$4,897 \cdot 10^{-3}$	16			
R²	0,871				

Fonte: Resultados originais de pesquisa

Nota: A -Concentração de glicose; B- concentração de glutamato monossódico; C- pH.

*significativo ao nível de confiança de 95%

**significativo ao nível de confiança de 90%

$$\text{Velocidade pigmentar} = -0,1124 + 2,58963 \cdot 10^{-3} \cdot A - 2,8573 \cdot 10^{-4} \cdot B + 0,059 \cdot C - 4,150 \cdot 10^{-4} \cdot A \cdot C - 3,57311 C^2 \quad (18)$$

Em que:

A: Concentração de glicose (g.L⁻¹)

B: Concentração de GMS (g.L⁻¹)

C: pH

Conforme mostrado na Tabela 21, o modelo ajustado foi significativo ($p < 0,05$), não apresentando falta de ajuste e com valor de R^2 0,871. Assim, o modelo foi considerado adequado para explicar a variabilidade da variável resposta velocidade de propagação pigmentar em função das concentrações de glicose e glutamato e do pH de cultivo na faixa de valores estudada, com base no modelo, foram traçadas as superfícies (Figura 42 a,c,e) de resposta e curvas de nível (Figura 42 b,d,f) apresentadas nas seguintes condições de pH : 2,31 (Figura 42 a,b), 5,21 (Figura 42 c,d) e 8,19 (Figura 42 e,f).

Figura 42 - Superfícies de resposta (a, c, e) e curvas de nível (b, d, f) para a velocidade de propagação pigmentar em função das variáveis estudadas.

Fonte: Autoria própria.

Nota: (a) e (b) pH 2,31.

(c) e (d) pH 5,25.

(e) e (f) pH 8,19.

Conforme mostrado na Figura 42, valores mais elevados da concentração de carbono em condições de pH baixo (Figura 42 a,b) e intermediário (Figura 42c,d) provocam maior crescimento radial da propagação pigmentar. Ao contrário, para pH elevado concentrações menores de glicose favorecem a propagação. Nota-se que os menores valores foram encontrados em pH baixo e que a concentração de glutamato tem pouca influencia nesta variável. Assim, indicando que o efeito da concentração do pH é influência determinante para esta variável.

É também observado uma paridade dos resultados com as variáveis da área micelial e velocidade micelial, em especial com o efeito do fator concentração de pH no meio. Este fato pode ser explicado pela origem da difusão pigmentar no meio, que está relacionada a liberação de pigmentos do micélio vegetativo e como estes pigmentos se difunde no meio de cultura.

A Tabela 22 apresenta a análise de variância para um modelo ajustado para a resposta variação da intensidade pigmentar no meio de cultivo. O modelo correspondente é apresentado na Equação 19.

Tabela 22 - Análise de variância para o modelo empírico ajustado para a variável resposta variação da intensidade pigmentar no meio de cultivo.

Variação da intensidade pigmentar					
Fator	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p
Modelo	1726,34	5	345,27	22,31	<0,0001*
B	0,48	1	0,48	0,031	0,8633
C	947,68	1	947,68	61,22	<0,0001*
BC	106,58	1	106,58	7,37	0,0201*
B²	427,13	1	427,13	27,59	0,0003*
C²	397,43		397,43	25,68	0,0004*
Resíduo	170,27	11	15,48		
Falta de ajuste	165,97	9	18,44	8,57	0,1088
Erro puro	4,30	2	2,15		
Total	1896,61	16			
R²	0,936				

Fonte: Resultados originais de pesquisa.

Nota: A - Concentração de glicose (g.L⁻¹).

B - concentração de glutamato monossódico (g.L⁻¹).

C - pH.

*significativo ao nível de confiança de 95%.

**significativo ao nível de confiança de 90%.

$$\text{Variação da ntensidade pigmentar} = -53,285 + 9,320.B + 18,995.C + 1,049.A.C + 1,470.B^2 + 1,852.C^2 \quad (19)$$

Em que:

A: Concentração de glicose (g.L⁻¹)

B: Concentração de GMS (g.L⁻¹)

C: pH

Conforme mostrado na Tabela 22, o modelo ajustado foi significativo ($p < 0,05$), não apresentando falta de ajuste e com valor de R^2 de 0,871. Assim, o modelo foi considerado adequado para explicar a variabilidade da variável resposta variação da intensidade pigmentar em função das concentrações de glicose e glutamato e do pH de cultivo na faixa de valores estudada. com base no modelo, foram traçadas as superfícies (Figura 43 a,c,e) de resposta e curvas de nível (Figura 43 b,d,f) apresentadas nas seguintes condições de pH : 2,31 (Figura 43 a,b), 5,21 (Figura 43 c,d) e 8,19 (Figura 43 e,f).

Figura 43 - Superfícies de resposta (a, c, e) e curvas de nível (b, d, f) para a variação da intensidade pigmentar no meio de cultivo em função das variáveis estudadas.

Fonte: Autoria própria.
 Nota: (a) e (b) pH 2,31.
 (c) e (d) pH 5,25.
 (e) e (f) pH 8,19.

Conforme mostrado na Figura 43, em condições de concentração de pH baixo (Figura 43 a,b) e intermediário (Figura 43 c,d) a glicose tem pouco efeito na variação da intensidade pigmentar extracelular. Ao contrário, para pH elevado o efeito da variação da glicose exerce determinada influência, em que concentrações menores tendem a provocar maior variação.

Nota-se que, para a concentração de glutamato existem intervalos de valores onde a variação é maximizada, dependendo da concentração do pH, em que, conforme se aumenta a concentração de pH, as faixas destes intervalos também se elevam. Observa-se que, as maiores variações ocorrem em concentração de pH alto, principalmente relacionados a pigmentos de coloração mais intensa, ou seja, os pigmento vermelho.

Este fato corrobora com os resultados da relação proporcional de produção de pigmentos, onde em concentração elevados de pH e glutamato favorecem o pigmento vermelho em relação ao amarelo. Esta variável é um indicativo de liberação extracelular dos pigmentos, onde uma maior variação indica maior quantidade liberada.

Este resultado, em conjunto com a área micelial, velocidade de propagação micelial e pigmentar, identifica o fator concentração de pH determinante para o perfil de propagação do *Monascus ruber*.

5.2.5 Otimização das condições de cultivo e confirmação do modelo

Com base nos modelos ajustados, procedeu-se à otimização da produção de pigmentos amarelo, laranja e vermelho pelo fungo *Monascus ruber* Thieghan IOC 2225 em função das condições de cultivo avaliadas, ou seja, concentração de glicose e glutamato e pH do meio. Para isto, empregou a ferramenta de otimização numérica do programa Design Expert v.7, colocando-se como critério de otimização a maximização da concentração de pigmentos.

Não foi colocado critério para os modelos ajustados para as demais variáveis resposta, embora os valores preditos para cada uma delas tenham sido considerados no experimento de validação dos modelos.

A predição dos modelos obtidos indicou que a produção de pigmentos seria otimizada nas seguintes condições: concentração de glicose 51,37 g.L⁻¹, concentração de glutamato 8,19 g.L⁻¹ e pH 2,31.

Para validação dos modelos estatísticos, foi realizado um novo experimento, em triplicata, nestas condições.

A Tabela 23 apresenta os valores preditos para o modelo das variáveis resposta produção de pigmentos e razão entre concentrações de pigmentos. Na Tabela 24 estes valores são apresentados para as variáveis resposta obtidas por PADI, dos aspectos macromorfológicos. Foi realizado uma nova análise qualitativa micromorfológica para caracterizar e determinar os halos miceliais e os halos pigmentares, pois as condições de cultivo modificam a o aspecto inicial colorimétrico do meio. Nesta análise a faixa de intensidade entre 100-64 se apresentou como área pigmentar e a faixa entre 100-70 como área micelial.

As Tabelas 23 e 24 demonstram os valores preditos pelos modelos elaborados pela análise estatística em comparação com os valores observados.

Tabela 23 - Valores preditos pelos modelos ajustados para as variáveis resposta produção de pigmentos e razão entre concentrações de pigmentose resultados obtidos no experimento de confirmação das predições dos modelos.

Valores	Produção de pigmentos		
	Amarelo	Laranja	Vermelho
Predito	156,051± 42,63*	122,184±29,08*	161,078±42,72*
Observado	123,481±23,65**	95,978±18,96**	99,478±16,54**
Valores	Relação proporcional de pigmentos		
	Vermelho/Amarelo	Vermelho/Laranja	Amarelo/Laranja
Predito	1,098±0,208*	1,171±0,201*	0,902±0,220*
Observado	0,808±0,156**	1,074±0,102**	0,765±0,096**

Fonte: Autoria própria.

Nota: Resultados obtidos no experimento de confirmação das predições dos modelos.

Condições de cultivo: glicose 51,37 g.L⁻¹; concentração de glutamato 8,19 g.L⁻¹ e pH 2,31.

*média±intervalo de confiança 95%.

** média±desvio padrão.

Tabela 24 - Valores preditos pelos modelos ajustados para as variáveis respostas da caracterização macromorfológica e resultados obtidos no experimento de confirmação das predições dos modelos.

Valores	Parâmetros do perfil de propagação a partir do PADI			
	Área micelial (mm ²)	Velocidade micelial (mm/h)	Velocidade pigmentar (mm/h)	Varição intensidade de pigmentação extracelular (níveis de cinza)
Predito	2740,751±1949,59*	0,0425 ± 0,0265*	0,087±0,023*	23,973±13,077*
Observado	2575,372±456,89**	0,0544±0,0057**	0,082±0,018**	11,348±6,582**

Fonte: Autoria própria.

Nota: Resultados obtidos no experimento de confirmação das predições dos modelos.

Condições de cultivo: glicose 51,37 g.L⁻¹; concentração de glutamato 8,19 g.L⁻¹ e pH 2,31.

*média±intervalo de confiança 95%.

** média±desvio padrão.

Para a produção de pigmentos, conforme mostrado na Tabela 23, as predições dos modelos foram confirmadas para as respostas, produção de pigmento amarelo, laranja e as relações proporcionais entre vermelho/laranja e amarelo/laranja, com diferenças entre os valores preditos e observados menores que 20,8%; 21,4%; 9,53%; 15,74% respectivamente. A diferença entre os valores preditos e as médias dos valores observados foi maior que o intervalo de confiança de 95% da predição do modelo para a variável resposta produção de pigmento vermelho, e a razão vermelho/amarelo. O valor da produção de pigmentos vermelha não foi confirmado, mas obteve-se uma produtividade alta, o que indica uma tendência, em que as condições dos parâmetros adotados potencializam a quantidade deste pigmento.

Entre os motivos para o modelo de pigmento vermelho não ser confirmado está o fato, que as condições adotadas, terem valores altos para glicose e glutamato, e valor muito baixo para a concentração de pH o que pode provocar maior variabilidade metabólica, desviando para a produção de outros produtos.

Outro motivo pode ser o tempo insuficiente para formação do pigmento vermelho, que depende da reação de grupos aminos com os pigmentos laranja. A partir da espectrofotometria de varredura da Figura 44a, nota-se pelo perfil gráfico, o ponto que corresponde a pigmentação laranja não está com a formação característica de vale acentuada, descrita na literatura, o que reforça a argumentação que os pigmentos ainda serão formados. Por este motivo a variável proporcional, vermelho/amarelo, que depende dos valores numéricos de pigmento

Figura 44- Espectrofotometria de varredura, da placa total e pontual, a partir no ponto de inoculação, conforme a seção 4.5.4.1.

Fonte: Autoria própria.

Nota: R1, R2, R3 – Repetição do experimento otimizado.

(a) Placa total.

(b) Região interna 0 mm.

(c) Região intermediária 20 mm.

(d) Região externa 40 mm.

vermelho não foi confirmada.

Para a caracterização macromorfológica conforme mostrado na Tabela 24, as predições dos modelos foram confirmadas para todas as respostas, são elas a área micelial, velocidade de propagação micelial, velocidade de propagação pigmentare variação da intensidade pigmentar, com diferenças entre os valores preditos e observados menores que 6,02%; 27,05%; 5,7%; 52,63% respectivamente.

Estes resultados, de maneira geral possibilitam afirmar que os parâmetros do (PADI) elaborados em conjunto com o modelo estatístico utilizado, são potentes ferramentas para caracterizar o perfil de crescimento microbiano ao longo da fermentação semissólida e entender como os diferentes parâmetros influenciam no estilo de propagação do fungo *Monascus ruber* Thieghan IOC 2225.

A inter-relação destas variáveis tem grande potencial de uso, que possibilitam a determinação de fatores para otimização e predição do comportamento do microrganismo.

Como os dados são mensurados e analisados em nível computacional são evidenciados um grande potencial de automação no monitoramento, que dependendo da instrumentação e refinamento algorítmico pode ser realizado *on-line*, o que possibilita a rastreabilidade do processo, essencial no gerenciamento da fermentação e dos bioprocessos.

5.2.5.1 Análise espectrofotométrica e micromorfológica do experimento conduzido nas condições otimizadas

Procedeu-se, com os resultados obtidos no experimento de confirmação do modelo, uma caracterização mais detalhada relacionando a espectrometria com a micromorfologia.do perfil de propagação do fungo, com avaliação dos parâmetros referentes aos halos miceliais, incluindo os parâmetros área, espessura, deslocamento radial, intensidade media, fator forma e desvio médio da intensidade pigmentar, em cada halo.

Estes parâmetros irão contribuir para compreensão e estudos futuros para a caraterização do crescimento de fungos filamentos em fermentação em estado

semissólido. Os dados obtidos com a varredura na região do visível (Figura 44) foram expressos em unidades de absorbância por massa de meio de cultivo (U.A.g^{-1}) e são apresentados para a placa de Petri como um todo e para as diferentes regiões avaliadas (Tabela 25), conforme a seção 4.5.4.1.

Tabela 25 - Espectrofotometria de varredura, da placa inteira e pontual, a partir do ponto de

Região	Absorbância específica para os pigmentos produzidos (U.A.g^{-1} de meio de cultivo)		
	Amarelo (410 nm)	Laranja (470 nm)	Vermelho (510 nm)
Placa inteira	123,48±23,65	95,98±5,18	99,48±16,54
Interna	270,44±30,08	126,96±14,23	200,28±22,22
Intermediária	128,43±14,25	67,26±7,49	106,45±18,54
Externa	20,77±2,30	19,27±2,14	23,56±2,51

inoculação, conforme a seção 4.5.4.1.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Região interna – 0 mm.

Região intermediária – 20 mm.

Região externa – 40 mm.

Os dados obtidos para varredura na região do visível foram expressos em unidades de absorbância por massa de meio de cultivo (U.A.g^{-1}) e são apresentados para a placa de Petri como um todo e para as diferentes regiões avaliadas, interna (0 mm), intermediária (20 mm) e externa (40 mm).

Os resultados mostraram que a intensidade na região mais interna apresenta absorbância com valores mais altos nos três comprimentos de onda, sendo também observada a formação de um gradiente do ponto central até a borda da placa do meio de cultivo, com os valores da absorbância diminuindo ao longo do raio da placa.

Esta diminuição também foi identificada pela caracterização a partir do PADI, mostrando que existe um gradiente pigmentar a partir do ponto de inoculação. A intensidade pigmentar diminui ao longo do raio de crescimento do microrganismo, conforme a Tabela 25. Para a região interna, (Figura 44b), os valores para o pigmento amarelo (λ 410nm) foi de 270,44±30,08, para o laranja (λ 470 nm) de 126,96±14,23 e para o pigmento vermelho (λ 510nm) de 200,28±22,22. Pode-se observar no gráfico (Figura 44b) um perfil bem definido, com o pico referente ao amarelo com maior intensidade, o vale referente ao laranja com descendência acentuada e o vermelho com pico também bem definido.

Para compreender a variação de pigmentação ao longo do meio fermentativo, foi elaborado a partir da Figura 45, o perfil da quantidade de pigmentos ao longo do ponto de inóculo (0 mm) até a região mais limítrofe (40 mm) da placa de Petri. Nota-se a existência de um gradiente pigmentar entre o ponto de inoculação e a região limítrofe do meio de cultivo (Placa de Petri), ficando evidente uma relação linear entre a posição radial (eixo x) e a quantidade produzida (eixo y) para o pigmento amarelo (Figura 45a), laranja (Figura 45b) e vermelho (Figura 45c).

Figura 45 – Relação da posição radial a partir do ponto de inoculação e quantidade de pigmentos amarelo, laranja e vermelho.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Gráficos elaborados a partir dos algorítmicos constuídos no *Dashboard*.

(a) pigmento amarelo.

(b) pigmento laranja.

(c) pigmento vermelho.

A partir da relação posição radial e produção de pigmentos, amarelo, laranja e vermelho (Figura 45), obteve-se as equações 20, 21, 22, com os

respectivos coeficientes de determinação 0,993; 0,996 e 0,998, estas equações relacionam a posição com a quantidade de pigmentos produzido, onde o x é a posição radial na placa de Petri.

$$\text{Qtd. pig. amarelo} = -6,25x + 264,33 \quad (20)$$

$$\text{Qtd. pig. laranja} = -2,68x + 124,17 \quad (21)$$

$$\text{Qtd. pig. vermelho} = -4,43x + 198,17 \quad (22)$$

Estas diferenças estão relacionadas também à micromorfologia do fungo, em que, apresentou estruturas microscópicas distintas em cada região, conforme mostrado nas micrografias apresentadas na Figura 46. Esses dados estão relacionados à posição das determinadas regiões (interna, intermediária e externa), ficando evidente a relação entre a produção de pigmentos e as formas e dimensões métricas das estruturas microscópicas.

Figura 46 - Micrografia óptica do experimento otimizado, nas regiões interna, intermediária e externa a partir do ponto de inoculação.

Fonte: Autoria própria.

Nota: (A,D,F) aumento de 100X.

(B,E,G) aumento de 400X.

(C,F,G) aumento de 1000X.

Regiões interna - 7,5mm, intermediária 22,5 mm, externa 37,5 mm.

De maneira geral, o exame microscópico (Figura 46) mostrou um micélio com pigmentação pardo avermelhada, cleistotécios com paredes finas e ascósporos hialinos de forma ovalada, constituídos em um nó de hifas, com divisões celulares tornando-se marrons com a maturação.

A caracterização do perfil da análise micromorfológica permite observar que, na região interna (Figura 46 A,B,C) havia poucas estruturas reprodutoras sexuadas (cleistotécio), as quais estão relacionados ao aparecimento de pigmentos (Moritz, 2005). Estas estruturas estão em fase de maturação avançada e apresentaram diâmetro médio de $17,7 \pm 5,8 \mu\text{m}$, indicando que a produção de pigmentos nesta região está próxima ou já atingiu seu máximo. Foram também observados cristais pigmentares (Figura 47), o que já foi também relatado por Vendruscolo (2009).

A região intermediária da placa (Figura 46 D,E,F) apresentou muitas estruturas reprodutoras (sexuadas) em estágio de amadurecimento intermediário, com diâmetro médio de $10,7 \pm 4,8 \mu\text{m}$. Nesta região, há uma grande densidade de hifas com diversos diâmetros, sendo o valor médio igual a $5,3 \pm 3,4 \mu\text{m}$.

Figura 47 - Micrografias mostrando cristais pigmentares produzidos pelo fungo *Monascus ruber* Thieghan IOC 2225 durante o experimento realizado nas condições otimizadas*

Fonte: Autoria própria.

Nota: a) aumento de 400x,

b) aumento de 100X.

*pH 2,31; concentração de glicose $51,37 \text{ g.L}^{-1}$; concentração de glutamato $8,19 \text{ g.L}^{-1}$.

A região externa (Figura 46 F,G,H), por sua vez, não apresentou estruturas microscópicas visíveis, indicando que nesta região ocorre apenas uma difusão do pigmento liberado pelo fungo.

5.2.5.2 Experimento otimizado – Análise morfométrica: área, espessura, deslocamento radial, intensidade média, desvio médio da intensidade pigmentar, fator forma e o inter-relacionamento entre a produção de pigmentos e as características morfométricas.

Procedeu-se, com os resultados obtidos no experimento de confirmação do modelo, uma caracterização mais detalhada, com avaliação dos parâmetros referentes aos halos miceliais, incluindo os parâmetros área, espessura, deslocamento radial, intensidade média, fator forma, desvio médio da intensidade pigmentar, em cada halo e também inter-relacionamento entre produção e as características morfométricas.

A Figura 48 mostra o perfil de crescimento e propagação no experimento conduzido nas condições otimizadas, utilizando a técnica do PADI. Os parâmetros foram calculados a partir da técnica desenvolvida e descrita na seção 4.5.2, para cada halo pigmentar.

A partir da Figura 48 e 49 pode-se notar a evolução dos halos pigmentares e suas características morfológicas ao longo da fermentação a partir da aplicação das estruturas algorítmicas.

Pode-se observar pela Figura 49(a), que conforme o tempo de fermentação vai evoluindo, a proporção média da área (mm^2) de cultivo diminuiu e a área que identifica a presença do microrganismo (área pigmentar e micelial) aumentou.

No qual, a área de cultivo que no tempo de 0 horas é 100% do total, diminui para 78% em 288 horas e 20% no tempo de 480 horas, esta relação indica que o microrganismo utilizou 42% da área total disponível na região micelial (biomassa) e 80% da área total para a soma da região micelial (42%) e pigmentar (38%).

É possível verificar por estes dados, que uma grande região do aspecto colorimétrico visual do meio fermentativo é causado apenas pela liberação e difusão dos pigmentos extracelulares, observa-se este comportamento também no parâmetro da espessura dos halos (Figura 49b), que está relacionada a determinada faixa radial (mm), da utilização do meio de cultivo em uma região específica.

Figura 48 - Perfil de propagação do fungo no experimento conduzido nas condições otimizadas, destacando a região micelial e halo pigmentar a partir da aplicação e caracterização do fungo *Monascus ruber* Thieghan IOC 2225 utilizando a máscara gráfica “16 colors”.

Fonte: Autoria própria.
 Nota: *Condições do experimento: pH 2,31, Glicose 51,37 g.L⁻¹, GMS 8,19g.L⁻¹

Figura 49 - Caracterização dos parâmetros morfométricos para cada halo micelial e pigmentar, a partir da média do experimento otimizado, perfil de propagação do fungo *Monascus ruber* Thieghan IOC 2225 utilizando a máscara gráfica “16 colors”.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Condições do experimento: pH 2,31, Glicose 51,37 g.L⁻¹, GMS 8,19g.L⁻¹
Gráficos elaborados a partir dos algorítmicos constiuídos no *Dashboard*.

- (a) Área.
- (b) Espessura.
- (c) Intensidade pigmentar.
- (d) Desvio padrão da intensidade pigmentar.
- (e) Raio de deslocamento.
- (f) Fator forma - homogeneidade geométrica.

A intensidade e o desvio padrão pigmentar Figura 49 (c,d) podem ser comparadas a uma medida de homogeneidade pigmentar em cada halo ao longo do tempo, a partir disso é possível determinar a consistência dos padrões pigmentares, colaborando com a identificação do padrão do perfil de propagação do microrganismo.

É possível assim, observar pela Figura 49c que a intensidade pigmentar de cada halo aumentou no início, quando se originou e posteriormente permaneceu constante ao longo do tempo. Este fato, também, foi verificado no desvio padrão da pigmentação. Como os halos pigmentares se deslocam ao longo do tempo a partir do ponto de inoculação (Figura 49e), no qual, são formados por faixas de intensidades (6 unidades, de uma escala onde 0 é a mínima e 100 é a máxima intensidade de pigmentação pelo PADI), nota-se visivelmente um padrão constante e consistente do perfil de propagação. Este fato identifica uma relação entre os parâmetros morfométricos visuais e a produção de pigmentos do *Monascus ruber* Thieghan IOC 2225.

A partir da determinação da posição de cada halo utilizando o raio de deslocamento (RD) e também da espessura (E) no tempo de 480 horas, foi determinado a quantidade de pigmentos (amarelo, laranja e vermelho) de cada halo, correlacionando com as equações 20, 21 e 22 (relação posição radial e quantidade de pigmentos produzido).

Assim elaborou-se as equações 23, 24, 25 para a determinação do padrão pigmentar em (U.A.g⁻¹) com valores expressos na Tabela 26, para a quantidade de pigmentos e suas relações proporcionais em cada halo.

$$\text{Qtd. pig. amarelo} = -6,25 \frac{((RD + E) + RD)}{2} + 264,33 \quad (23)$$

$$\text{Qtd. pig. laranja} = -2,68 \frac{((RD + E) + RD)}{2} + 124,17 \quad (24)$$

$$\text{Qtd. pig. vermelho} = -4,43 \frac{((RD + E) + RD)}{2} + 198,17 \quad (25)$$

Com os resultados apresentados na Tabela 26 e inter-relacionando com a caracterização a partir do processamento digital de imagens (PADI), pode-se

afirmar que, os halos detectados possuem perfis distintos de pigmentação onde os halos mais próximos ao ponto de inoculação, têm maiores quantidades de pigmentos.

Tabela 26 - Quantidade de pigmentos (U.A.g⁻¹) e relação proporcional em cada halo da média do experimento otimizado.

Halo	Quantidade de pigmentos (U.A.g ⁻¹)			Relação proporcional		
	amarelo	laranja	vermelho	vermelho /amarelo	vermelho /laranja	amarelo /laranja
70-64*	45,58	30,37	43,12	0,946	1,42	1,50
76-70**	133,08	67,89	105,14	0,79	1,55	1,96
82-76**	173,71	85,31	133,94	0,77	1,57	2,04
88-82**	208,08	100,05	158,30	0,76	1,58	2,07
94-88**	236,21	112,11	178,24	0,75	1,59	2,10
100-94**	—	—	—	—	—	—

Fonte: Autoria própria.

Nota: Condições do experimento: pH 2,31, Glicose 51,37 g.L⁻¹, GMS 8,19g.L⁻¹.

* Halo pigmentar.

** Halo micelial.

(-) Ausência.

Foi observado que, o halo referente apenas a difusão pigmentar extracelular (70-64) tem em relação proporcional ao demais halos, maior quantidade de pigmento laranja. Este halo representa a região limítrofe entre o meio de cultivo e biomassa do microrganismo, sendo o estado inicial da fermentação e o primeiro a ser formado, por este fato a conversão entre os pigmentos vermelho/laranja e amarelo/laranja é menor que os demais halos. Em relação a proporção vermelho/ amarelo é possível verificar uma maior proporção de vermelho, sugerindo a princípio uma maior liberação deste pigmento.

Nota-se que nos demais halos esta relação (vermelho/amarelo) propende ao amarelo e o valor desta relação é constante com média de 0,767, assim, o meio de cultivo nessas áreas tendem a apresentar uma cor visual amarelada. Em relação ao vermelho/laranja e amarelo/laranja, observa-se valores menores para o halo pigmentar (70-64), descrevendo uma maior uniformidade da concentração pigmentar nesta região. Os valores para os demais halos permaneceram constante para a relação vermelho/amarelo com média de 1,57. Contudo, para a relação amarelo/laranja os valores apresentaram um aumento conforme a proximidade (raio de deslocamento - RD) do ponto de inoculação, resultando em maior quantidade de pigmentos amarelos nas regiões contíguas.

Também é possível observar na Figura 49 (e,f) um padrão entre o raio de deslocamento e o fator forma, que determina a uniformidade geométrica (contorno) de cada halo identificado pela máscara gráfica “16 colors”.

Os halos que estão mais próximos do ponto de inoculação apresentaram uma uniformidade geométrica (fator forma) menor, e à medida que o halo se desloca com o tempo, Figura 49e, sua geometria se altera, tornando-se mais uniformes. Este fato permite concluir que existe um determinado perfil geométrico, e que está relacionada com o tempo de fermentação, a posição radial do halo na placa e as condições do meio.

É possível também concluir que os parâmetros elaborados e estudados estão inter-relacionados, e esta relação auxilia na compreensão do perfil de crescimento do fungo filamentoso. Na literatura é crescente o estudo das relações morfométricas para o entendimento dos padrões da natureza, o que possibilita identificar como determinadas variáveis influenciam em determinado sistema, seja biológico ou físico (BORTEN et al., 2018). Nota-se o crescente uso deste tipo de técnica para análises quantitativas e qualitativas relacionadas a morfometria biométrica, como a identificação de plantas e animais e seus padrões de crescimento até a identificação humana, por reconhecimento digital ou de íris. (NOBRE et al., 2015; CUBAS; COSTA; ZANIZ, 2016; VENIAL et al., 2017; LAFETÁ et al., 2017; NAWROCKA et al., 2018; PEREIRA et al., 2018).

Assim é possível a partir do inter-relacionamento dos dados obter parâmetros de produtividade como a relação produção de pigmentos (U.A.g^{-1}) e área micelial (mm^2), Equação 26, que indica uma relação da área com a presença (útil) do microrganismo em relação a produção de pigmentos.

Pode-se também estimar a produção de pigmentos total em determinado tempo, Equação 27, a partir da análise PADI da amostra fotográfica, em que determinando a área de cada halo e conhecendo a quantidade de pigmentos que este possui (Tabela 26), é possível quantificar uma estimativa de pigmentos total.

Outro parâmetro é a relação indireta de liberação dos pigmentos extracelulares a partir da correlação da produção de pigmentos (U.A.g^{-1}) com a intensidade (níveis de cinza) pelo PADI, conforme a Equação 28.

$$\text{Produtividade micelial} = \frac{\text{Pigmento (U.A. g}^{-1}\text{)}}{\text{Área micelial (mm}^2\text{)}} \quad (26)$$

$$\sum \text{Pig. (halo)} = \frac{\text{Área do halo (mm}^2\text{)} * \text{Qtd pig (U.A. g}^{-1}\text{)}}{\text{Área pigmentar (mm}^2\text{)}} \quad (27)$$

$$\text{Razão pig. extracelular} = \frac{\Delta \text{Pigmentos (U.A. g}^{-1}\text{)}}{\Delta \text{Int. pig. (PADI - níveis cinza)}} \quad (28)$$

A partir das equações 26, 27 e 28 foram calculados os parâmetros de produtividade conforme a Figura 50 e 51.

Figura 50 - Produtividade micelial e razão indireta de pigmentação extracelular.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Condições do experimento: pH 2,31, Glicose 51,37 g.L⁻¹, GMS 8,19g.L⁻¹.

Gráficos elaborados a partir dos algorítmicos constuídos no *Dashboard*.

(a) Produtividade micelial.

(b) Razão indireta da pigmentação extracelular.

A partir da Figura 51(a) pode-se concluir que o pigmento amarelo foi o que obteve maior conversão do substrato em relação a sua área em mm², fato que também ocorreu na correlação da produção de pigmentos com variação da intensidade pigmentar, Figura 51(b). Esta relação indica a quantidade (U.A.g⁻¹) necessária de cada pigmento para variar uma unidade da intensidade na imagem (PADI – níveis de cinza), assim quanto menor esta relação maior a liberação de pigmentos.

A Figura 51 mostra uma estimativa de produção de pigmentos, baseado na relação da área (mm^2) de cada halo (mensurada pelo PADI) com a quantidade de pigmentos padrão (U.A.g^{-1}) que este halo detém (Tabela 26), calculadas pela Equação 27. Este parâmetro correlacionado com o tempo estima uma média de produtividade de cada pigmento ao longo da fermentação.

Figura 51 - Estimativa da produção de pigmentos usando o processamento e análise de imagens (PADI) a partir da quantificação pigmentar dos halos.

Fonte: Autoria própria.

Nota: Condições do experimento: pH 2,31, Glicose 51,37 g.L^{-1} , GMS 8,19 g.L^{-1}

Gráficos elaborados a partir dos algorítmicos constiuídos no *Dashboard*.

Este parâmetro é muito útil, pois com o padrão pigmentar de cada halo determinado é capaz apenas com a amostra fotográfica estimar a produção de pigmentos, de um modo indireto e não invasivo no meio de cultivo.

Os parâmetros e os padrões encontrados com as inter-relações sugerem o a grande capacidade desta técnica para a utilização na identificação, seleção e monitoramento da fermentação e também para a compreensão de como determinadas variáveis do ambiente influenciam no crescimento microbiano. A partir deste fato, existe um grande potencial no uso para a elaboração de modelos computacionais com o PADI, para estimar o perfil de crescimento e propagação do microrganismo, utilizando o refinamento das técnicas algorítmicas.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos possibilitam concluir que:

Com a técnica de processamento e análise digital de imagem, verificou-se que a melhor máscara gráfica para o estudo da propagação e produção de pigmentos do fungo *M. ruber* Tieghem IOC 2225 foi a “16 colors”, do software *ImageJ*, possuindo limiarização e homogeneidade na detecção dos halos pigmentares.

A formação de halos pigmentares apresenta padrões morfológicos os quais foram detectados pelo processamento e análise de imagem, sendo que o estudo destes padrões possibilitam a melhor compreensão dos processos de fermentação semissólido em placas de Petri na produção de pigmentos.

Foram elaborados técnicas e algoritmos especialistas capazes de extrair informações para análise quantitativa e qualitativa visando à determinação de padrões morfológicos (micro e macromorfológicos) do fungo no meio semissólido, possibilitando o desenvolvimento de painéis gráficos inteligentes e dinâmicos, *Dashboard* para gerenciamento de dados para compreensão do bioprocessamento de fermentação em estado semissólido.

Os fatores mensurados pelo processamento digital e análise de imagens, como área, velocidade radial, raio de deslocamento, espessura do halo e intensidade média, e fator forma, possibilitam a compreensão da propagação do microrganismo e a produção de pigmentos durante o período de fermentação no meio cultivo semissólido em placas de Petri.

O delineamento composto central rotacional estrela ortogonal (DCCR) 2³ visando a avaliação da influência de variáveis importantes (concentração de glicose, concentração de GMS e pH do meio) na produção de pigmentos laranja, amarelo e vermelho, permitiu a geração de modelos matemáticos que aumentam a compreensão da produção destes metabólitos. Verificou-se que elevadas concentrações de glicose, GMS, e baixo pH maximizam a produção de pigmentos.

A análise dos resultados do delineamento composto central rotacional estrela ortogonal (DCCR) 2³ empregando variáveis resposta obtidas por processamento digital e análise de imagens (velocidade micelial, velocidade

pigmentar, área micelial e variação da intensidade pigmentar) permitiu a geração de modelos matemáticos que possibilitaram a obtenção de mais informações sobre a influência dos fatores pH, glicose e glutamato monossódico (GMS) no perfil de fermentação. Podendo ser utilizadas para orientar as melhores condições de cultivo, dependendo das características requeridas.

7 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Para os trabalhos futuros, espera-se que a técnica e os parâmetros elaborados a partir do PADI contribuam para compressão do perfil de crescimento e propagação de outros microrganismos. Além disso, com a evolução e refinamento dos algoritmos e com a utilização de inteligência artificial, empregando técnicas como aprendizado de máquina e redes neurais artificiais, pode-se vislumbrar o uso de técnicas de PADI para elaboração de estratégias de automação e acompanhamento *on-line* do padrão de crescimento e identificação do microrganismo e das relações indiretas com outras variáveis, além de permitir a seleção das melhores condições de cultivo.

REFERÊNCIAS

- ABEROUMAND, A. et al. A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. **World J Dairy Food Sci**, v. 6, n. 1, p. 71-78, 2011.
- ALMEIDA, M. R. et al. Spectroscopic and theoretical study of the “Azo”-Dye E124 in condensate phase: Evidence of a dominant hydrazo form. **The Journal of Physical Chemistry**, Washington, v. 114, n. 1, p. 526–534, 2010.
- ALVES, S. P. et al. Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV-DAD detection. **Food Chemistry**, v. 107, n. 1, p. 489-496, 2008.
- ANDRADE, Marcus Vinicius Ribeiro Fernandes et al. Isolamento, caracterização fenotípica e perfil de crescimento de cepas do fungo *Cunninghamella* sp. de solo do Sul do Tocantins, Brasil. **Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)**, v. 5, n. 2, p. 58-64, 2015.
- ANIYA, Y. et al. Dimerumic acid as an antioxidant of the mold, *Monascus anka*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 6, p. 999-1004, 2000.
- ASHFAQ, N.; MASUD, T. Surveillance on artificial colours in different ready to eat foods. **Pakistan J Nutr**, v. 5, p. 223-225, 2002.
- AQUINO, T. M. et al. Synthesis, anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial activities of 2-hydrazolyl-3-phenyl-5-(4-nitrobenzylidene)-4-thiazolidinone substituted derivatives. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 30, n. 8, p. 1567-73, 2011.
- AZEVEDO, Eduardo; CONCI, Aura; LETA, Fabiana R. **Computação gráfica: Teoria e prática: geração de imagens**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.
- BABITHA, S. et al. Jackfruit seed-a novel substrate for the production of *Monascus* pigments through solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 4, p. 465-471, 2006.
- BABITHA, S. et al. Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1554-1560, 2007.
- BABITHA, S. Microbial pigments. **Biotechnology for agro-industrial residues utilisation**, V.5, p. 147-162, 2009.
- BAKOSOVA, A. et al. Utilization of *Monascus purpureus* in the production of foods of animal origin. **BULLETIN-VETERINARY INSTITUTE IN PULAWY**, v. 45, n. 1, p. 111-116, 2001.
- BARROS, A. A; BARROS, E.B. P. A química dos alimentos: produtos fermentados e corantes. **São Paulo: Sociedade Brasileira de Química. 88p.-(Coleção Química no cotidiano)**, v. 4, p. 30-32, 2010.
- BLANC, P. J. et al. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, p. 201-213, 1995.

BORTEN, Michael A. et al. Automated brightfield morphometry of 3D organoid populations by OrganoSeg. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 5319, 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n. 45, de 03 de novembro de 2010. Dispõe sobre aditivos alimentares autorizados para uso segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF). Brasília, DF: **ANVISA**, 2010. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 06 ago. 2018.

BULUT, M. O.; AKAR, E. Ecological dyeing with some plant pulps on woolen yarn and cationized cotton fabric. **Journal of Cleaner Production**, Knoxville, v. 32, p. 1-9, 2012.

BÜHLER, R. M. M. **Produção de pigmentos por *Monascus ruber* utilizando co-produtos da produção do biodiesel**. 2013. 182f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

CARVALHO, J. C. et al. Biopigments from *Monascus*: Strain Selection, Citrinin Production and Color Stability. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Curitiba, v. 48, n. 6, p. 885-894, 2005.

CARVALHO, L. P. et al. Anti-parasite effects of new thiosemicarbazones and their products thiazolidinone including cellular aspects of intracellular elimination of *Trypanosoma cruzi* in vitro. **J. Develop. Drugs**, v. 3, n. 126, p. 10.4172, 2014.

CARELS, M.; SHEPHERD, D. Sexual reproductive cycle of *Monascus* in submerged shaken culture. **Journal of bacteriology**, v. 122, n. 1, p. 288-294, 1975.

CSERHÁTI, Tibor. **Liquid chromatography of natural pigments and synthetic dyes**. 1. ed, v.71. Budapest: Elsevier, 2006.

CHACÓN-ORDÓÑEZ, T. et al. Carotenoids and carotenoid esters of orange-and yellow-fleshed mamey sapote (*Pouteria sapota* (Jacq.) HE Moore & Stearn) fruit and their post-prandial absorption in humans. **Food chemistry**, v. 221, p. 673-682, 2017.

CHATTOPADHYAY, P. et al. Biotechnological potential of natural food grade biocolorants. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 17, 2008.

CHEKANOV, K.; LOBAKOVA, E.; SELYAKH, I.; SEMENOVA, L.; SIDOROV, R.; SOLOVCHENKO, A. Accumulation of Astaxanthin by a New *Haematococcus pluvialis* Strain BM1 from the White Sea Coastal Rocks (Russia). **Marine Drugs**, v. 12, n. 5, p. 4504-4520, 2014.

CHEN, W. et al. Edible filamentous fungi from the species *Monascus*: early traditional fermentations, modern molecular biology, and future genomics. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 5, p. 555-567, 2015.

CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 203-220, 2002.

COSTA, J. P. V. **Soro de queijo como substrato potencial à produção de pigmentos por *Monascus ruber***. 2017. 143f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Goiás, Goiana, 2017.

CRISTEA, D.; VILAREM, G. Improving light fastness of natural dyes on cotton yarn. **Dyes and pigments**, v. 70, n. 3, p. 238-245, 2006.

CUBAS, Rafael; COSTA, Emanuel Arnoni; ZANIZ, Viviane. Carbon contents and modelling of total organic carbon for *Pinus taeda* L. From natural regeneration. **Revista Árvore**, v. 40, n. 4, p. 661-668, 2016.

DASAN, B. G.; BOYACI, I. H.; MUTLU, M. Nonthermal plasma treatment of *Aspergillus spp.* spores on hazelnuts in an atmospheric pressure fluidized bed plasma system: Impact of process parameters and surveillance of the residual viability of spores. **Journal of Food Engineering**, v. 196, p. 139-149, 2017.

DAWSON, T. L. It must be green: meeting society's environmental concerns. **Coloration Technology**, v. 124, n. 2, p. 67-78, 2008.

DUFOSSÉ, L. et al. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 9, p. 389-406, 2005.

DUFOSSÉ, L. Microbial Production of Food Grade Pigments. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n.6, p. 313-321, 2006.

QUEIROZ, J. E. R.; GOMES, H. M. Introdução ao Processamento Digital de Imagens. **RITA**, v. 13, n. 2, p. 11-42, 2006. DURÁN, N. et al. Ecological-friendly pigments from fungi. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 42, n. 1, p. 53-66, 2002.

EDUARDO, M. P. **Desempenho e homogeneidade de cultivos em meio sólido de *Monascus sp.* em biorreator do tipo tambor com agitação interna: efeito do padrão de agitação**. 2010. 145 f. Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

ENAYATZAMIR, E. et al. Assessment of the joint effect of laccase and cellobiose dehydrogenase on the decolouration of different synthetic dyes. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 169, n. 1–3, p. 176–181, 2009.

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

FENG, Yanl; SHAO, Yanchun; CHEN, Fusheng. *Monascus* pigments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 6, p. 1421-1440, 2012.

FLORES-COTERA, L. B.; SANCHEZ, S. Copper but not iron limitation increases astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* in a chemically defined medium. **Biotechnology letters**, v. 23, n. 4, p. 793-797, 2001.

GALLON, L. **Sistema de visão computacional para classificação de pedras naturais através de vídeo em tempo real**, 2013. 72p. TCC (Sistemas de Informação) – Lageado, RS, Centro universitário Univates, 2013.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. **Processamento de imagens digitais**. São Paulo: Edgard Blucher, 2000.

GONZALEZ, R. C.; WOODS, R. E. **Processamento Digital de Imagens**. 3. Ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2010.

GOMES, O.F.M. **Processamento e análise de imagens aplicadas à caracterização automática de materiais**. 2001. Dissertação. (Mestrado em Ciências de Materiais) - Pontifícia Universidade Católica (PUC), Rio de Janeiro, 2001.

GOMES, M. A. GB et al. Evaluating anti-*Toxoplasma gondii* activity of new serie of phenylsemicarbazone and phenylthiosemicarbazones in vitro. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 8, p. 3574-3580, 2013.

GRIFONI, D. et al. Laboratory and outdoor assessment of UV protection offered by flax and hemp fabrics dyed with natural dyes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 1, p. 313-320, 2009.

GUPTA, C. et al. Microbes as potential source of biocolours. **Pharmacology online**. n.2, p.1309-1318, 2011.

HAJJAJ, H. et al. Sampling techniques and comparative extraction procedures for the quantitative determination of intra and extracellular metabolites in filamentous fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 164, n. 1, p. 195-200, 1998.

HAJJAJ, H. et al. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 8, p. 619-625, 2000.

HAJJAJ, H. et al. Effect of the cultivation mode on red pigments production from *Monascus ruber*. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, n. 8, p. 1731-1736, 2015.

HANNIBAL, L. et al. Masson-Boivin, C.; Dreyfus, B.; Giraud, E. Isolation and characterization of canthaxanthin biosynthesis genes from the photosynthetic bacterium *Bradyrhizobium sp.* Strain ORS 278. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 5, p. 3850-3853, 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.

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

HAMDI, M. et al. A new process for red pigment production by submerged culture of *Monascus purpureus*. **Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 2, p. 75-79, 1997.

HILARES, Ruly Terán et al. Sugarcane bagasse hydrolysate as a potential feedstock for red pigment production by *Monascus ruber*. **Food chemistry**, v. 245, p. 786-791, 2018.

HSU, L. C.; LIANG, Y. H.; HSU, Y. W.; KUO, Y. H.; PAN, T. M. Anti-inflammatory properties of yellow and orange pigments from *Monascus purpureus* NTU 568. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 11, n. 7, p. 20-61, 2013.

HÜMBELIN, H.; THOMAS, A.; LIN, J.; JORE, J.; BERRY, A. Genetics of isoprenoid biosynthesis in *Paracoccus zeaxanthinifaciens*. **Gene**, v. 297, n. 4, p. 129-139, 2002.

IGNACIO, J. S. **Processamento e análise digital de imagens em estudos da cinética de recristalização de ligas Al-Mg-X**. 2013. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, 2013.

JO, D.; CHOE, D.; NAM, K.; SHIN, C. S. Biological evaluation of novel derivatives of the orange pigments from *Monascus sp.* as inhibitors of melanogenesis. **Biotechnology Letters**, v. 8, n. 6, p. 36-39, 2014.

JOHNSON, E. A.; SCHROEDER, W. A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis *Phaffia rhodozyma*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 7, p. 374-379, 1995.

JONES, J. D.; HOHN, T. H.; LEATHERS, T. D.; Genetically modified strains of *Fusarium sporotrichioides* for production of lycopene and β -carotene. **Proceedings of Annual Meeting of Society of Industrial Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 91, 2004.

JUNG, H. et al. Color characteristics of *Monascus* pigments derived by fermentation with various amino acids. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 5, p. 1302-1306, 2003.

JUNG, H.; KIM, C.; SHIN, C. S. Enhanced photostability of *Monascus* pigments derived with various amino acids via fermentation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 18, p. 7108-7114, 2005.

JŮZLOVÁ, P.; MARTINKOVA, L.; KŘEN, V. Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 163-170, 1996.

KANG, Biyu et al. Effect of pH and non-ionic surfactant on the intracellular and extracellular *Monascus* pigment profile. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 5-6, p. 759-767, 2013.

KAPOR, M A. et al. Eletroanálise de corantes alimentícios: determinação de índigo carmim e tartrazina. **Eclética química**, v. 26, n. 1, 2001.

KIRTI, K.; AMITA, S.; PRITI, S.; KUMAR, A. M.; JYOTI, S. J. Colorful World of Microbes: Carotenoids and Their Applications. **Advances in Biology**, v. 5, n. 7, p. 20-33, 2014.

KONGRUANG, S. Growth kinetics of biopigment production by Thai isolated *Monascus purpureus* in a stirred tank bioreactor. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 2, n. 12, p. 93-99, 2011.

KUMAR, A. et al. Microbial pigments: production and their applications in various industries. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences**, v. 5, n. 1, 2015.

LACAZ, C. da S.; PORTO, Edward; MARTINS, Jose Eduardo Costa. Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 4, p. 332-332, 1991.

LACAZ, C.S, PORTO E., MARTINS J.E.C. Tratado de Micologia Médica. São Paulo: **Sarvier**; 2002. p. 918-990.

LAFETÁ, B. O. et al. Biometria e superação da dormência em sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit/Biometry and dormancy break of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit seeds. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 3, p. 76-83, 2017.

LEE, Y.K. et al. Production of *Monascus* pigments by a solid-liquid state culture method. **Journal of fermentation and bioengineering**, v. 79, n. 5, p. 516-518, 1995.

LEE, C. L. et al. The blood lipid regulation of *Monascus* produced monascin and ankaflavin via the suppression of low-density lipoprotein cholesterol assembly and stimulation of apolipoprotein A1 expression in the liver. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 4, n. 6, p. 1-11, 2016.

LIAN, Xijun et al. Two new *monascus* red pigments produced by Shandong Zhonghui Food Company in China. **European Food Research and Technology**, v. 240, n. 4, p. 719-724, 2015.

LIESEN, A. P. et al. Synthesis and evaluation of anti-*Toxoplasma gondii* and antimicrobial activities of thiosemicarbazides, 4-thiazolidinones and 1, 3, 4-thiadiazoles. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 9, p. 3685-3691, 2010.

LIU, Y.; WU, L.; LV, Q. DFT/TDDFT study on the photo dissociation mechanism of the original *Monascus* red and orange pigments. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 145, n. 6, p. 181-187, 2015.

MALIK, K., TOKKAS, J.; GOYAL, S. Microbial Pigments: A review. **International Journal of Microbial Resource Technology**, Haryana, v. 1, n. 4, p. 361-365, 2012.

MAPARI, S. A. S. et al. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 231-238, 2005.

MARIOA, D. A. et al. Interference of melanin in the susceptibility profile of *Sporothrix* species to amphotericin B. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, n. 1, p. 21-25, 2016.

MARTINKOVA, L. Biological activities of oligoketide pigments of *Monascus purpureus*. **Food Additives & Contaminants**, v. 16, n. 1, p. 15-24, 1999.

MENDEZ, A. et al. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced pH and temperature. **Biomed Biotechnol.** V. 12, p. 961-968.2011.

MENDONÇA, J. N. **Identificação e isolamento de corantes naturais produzidos por actinobactérias**. 2011. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

MEINICKE, R.M. **Estudo da produção de pigmentos por *Monascus ruber* CCT 3802 utilizando glicerol como substrato em cultivo submerso**. 2008. 177f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

MEINICKE, R. et al. Potential use of glycerol as substrate for the production of red pigments by *Monascus ruber* in submerged fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 238-242, 2012.

MEREDDY, R. et al. Betalain rich functional extract with reduced salts and nitrate content from red beetroot (*Beta vulgaris* L.) using membrane separation technology. **Food chemistry**, v. 215, p. 311-317, 2017.

MIYAKE, T. et al. Light effects on cell development and secondary metabolism in *Monascus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 103-108, 2005.

MOLDAVISKI, N.; COHEN, S. Determinants of liposome partitioning in aqueous twophase systems: Evaluation by means of a factorial design. **Biotechnology and Bioengineering**. v.52, p. 529-537, 1996.

MORGAVI, D. P.; MARTIN, C.; BOUDRA, H. Fungal secondary metabolites from *Monascus spp.* reduce rumen methane production in vitro and in vivo. **Journal of Animal Science**, v. 2, n. 91, p. 848-860, 2013.

MORITZ, D. E. **Produção de pigmento monascus por *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo submerso**. 2005. 134 f. Tese. (Doutorado-Curso de Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, UFSC, Florianópolis, 2005.

MUKHERJEE, G.; SINGH, S. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 188-192, 2011.

MURATA, K.; OYAGI, A.; TAKAHIRA, D.; TSURUMA, K.; SHIMAZAWA, M.; ISHIBASHI, T.; HARA, H. Protective effects of astaxanthin from *Paracoccus carotinifaciens* on murine gastric ulcer models. **Phytotherapy Research**, v.5, n. 8, p. 26-32, 2012.

NAWROCKA, Anna et al. Computer software for identification of honey bee subspecies and evolutionary lineages. **Apidologie**, v. 49, n. 2, p. 172-184, 2018.

NING, Z. Q. 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.

NOBRE, D. A.C. et al. Caracterização morfométrica de uma população natural de macaúba no norte de Minas Gerais. **Energia na agricultura**, v. 30, n. 3, p. 290-293, 2015.

OLIVEIRA, C. F. D. et al. Bagaço de malte como substrato para produção de biopigmentos produzidos por *Monascus ruber* CCT 3802. **Revista de Agricultura Neotropical**, v. 3, n. 3, p. 6-9, 2016.

OLIVEIRA, C. F. D. **Produção de pigmentos por *Monascus ruber* CCT 3802 a partir do xarope de maltose como substrato**. 2017. 101f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Goiás, Goiana, 2017.

OLIVEIRA, K.C. **Análise estereológica postmortem do córtex orbitofrontal de indivíduos acometidos por transtorno obsessivo-compulsivo ou por transtorno afetivo bipolar**. 2013. 235p. Tese (Doutorado em Ciências) São Paulo, SP, Universidade de São Paulo – USP, 2013.

OROZCO, S. F. B.; PEREIRA, D. G.; KILIKIAN, B. V. Influência do pH na Produção de Pigmentos Vermelhos e na Micromorfologia de *Monascus purpureus* CCT 3802 em Cultivo Submerso. **SINAFERM-XIV Simpósio Nacional de Fermentações. Florianópolis-SC: Anais-artigo**, v. 133, 2003.

PALANICHAMY, V. et al. Optimization of cultivation parameters for growth and pigment production by *Streptomyces spp.* isolated from marine sediment and rhizosphere soil. **International Journal of plant, animal and environmental sciences**, v. 1, n. 3, p. 158-170, 2011.

PALEY, Suzanne et al. The Omics Dashboard for interactive exploration of gene-expression data. **Nucleic acids research**, v. 45, n. 21, p. 12113-12124, 2017.

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

PANDEY, A.; LARROCHE, C.; SOCCOL, R. General considerations about solid-state fermentation processes. In: **Current Developments in Solid-state Fermentation**. New York: Springer, 2008. p.13-25.

- PASTRANA, L. et al. Production of red pigments by *Monascus ruber* in synthetic media with a strictly controlled nitrogen source. **Process biochemistry**, v. 30, n. 4, p. 333-341, 1995.
- PATTANAGUL, P. et al. Review of angkak production (*Monascus purpureus*). **Chiang Mai J Sci**, v. 34, n. 3, p. 319-328, 2007.
- PATTANAGUL, P., et al. Mevinolin, citrinin and pigments of adlay angkak fermented by *Monascus sp.* **International journal of food microbiology**, v. 126, n. 1, p. 20-23, 2008.
- PEREIRA, Marcio Dias et al. Germinação e biometria de frutos e sementes de *Prosopis juliflora* (Sw) DC. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 3, p. 1271-1281, 2018.
- PIACENTINI, T.; VASCONCELOS, P. M.; FARLEY, K. A. 40 Ar/39 Ar constraints on the age and thermal history of the Urucum Neoproterozoic banded iron-formation, Brazil. **Precambrian Research**, v. 228, p. 48-62, 2013.
- PITT J. I.; HOCKING A. D. **Fungi and food spoilage**. 2 ed. London: Chapman & Hall, 1999.
- PORCO, T., et al. Uma atualização sobre a adsorção de corantes sintéticos em minerais com base de argila: Uma revisão do estado-da-arte. **Journal of Gestão Ambiental**, v. 191, n. 15, p. 33-57, 2017.
- POZZER, Cesar Tadeu. **Introdução à Informática**. 2006. Departamento de Eletrônica e Computação (DELC) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.
- PRADO, Marcelo Alexandre; GODOY, Helena Teixeira. Corantes artificiais em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 14, n. 2, 2009.
- RASBAND, W. S. **ImageJ**. (1997-2012). US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. 2013.
- RESNICK, R.; HALLIDAY, D. **Física**, Vol. IV, 2.Ed.. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S/A, 1973.
- RIBEIRO, B. D.; BARRETO, D. W.; COELHO, M. A. Z. Technological Aspects of β -Carotene Production. **Food Bioprocess Technology**, v. 4, n. 6, p. 693-701, 2011.
- RITCHIE, Raymond J. The ammonia transport, retention and futile cycling problem in cyanobacteria. **Microbial ecology**, v. 65, n. 1, p. 180-196, 2013.
- RODRIGUES, P. S. **Estudo do uso de corantes artificiais em alimentos e estimativa de ingestão de tartrazina pela população brasileira**. 2015. 105f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- SABATER-VILAR, M. et al. Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 444, n. 1, p. 7-16, 1999.

SAKAKI, H.; NAKANISHI, T.; SATONAKA, K. Y.; MIKI, W.; FUJITA, T.; KOMEMUSHI, S. Properties of a high-torularhodin mutante of *Rhodotorula glutinis* cultivated under oxidative stress. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 203-205, 2000.

SANKAR, R. et al. Facile synthesis of *Curcuma longa* tuber powder engineered metal nanoparticles for bioimaging applications. **Journal of Molecular Structure**, v. 1129, p. 8-16, 2017.

SANTOS, M. A. et al. Insertional mutagenesis in the vitamin B₂ producer fungus *Ashbya gossypii*. **Microbial Processes and Products**, p. 283-300, 2005.

SANTOS, M. A.; MATEOS, L.; STAHMANN, K. P.; REVUELTA, J. L. Insertional Mutagenesis in the Vitamin B₂ Producer Fungus *Ashbya gossypii*. **Microbial processes and Products**, v. 6, n. 7, p. 283-300, 2005.

SCALCO, Roberto. **Introdução a computação gráfica**. São Paulo: Instituto Mauá de Tecnologia, 2005. 176 p.

SCHNEIDER, C. A., et al. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.

SILVA, A. G. P. **Quanto, um software para auxiliar a caracterização de imagens**. 2016.122p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência dos materiais) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2016.

SOLTANI, A. A.; KHAVAZI, K.; ASADI-RAHMANI, H.; OMIDVARI, M.; DAHAJI, P. A.; MIRHOSEYNI, H. Plant Growth Promoting Characteristics in Some *Flavobacterium spp.* Isolated from Soils of Iran. **Journal of Agricultural Science**, v. 2, n. 4, p. 17-24 2010.

SHAHID, M; SHAHID-UL-ISLAM; MOHAMMAD, F. Recent advancements in natural dye applications: a review. **Journal of Cleaner Production**, Knoxville, v. 53, p. 310-331, 2013.

SHAO, Y., et al. Insights sobre a biologia de *Monascus* no nível genético. **Microbiologia aplicada e biotecnologia**, v. 98, n. 9, p. 3911-3922, 2014.

SHI, K. et al. Controlling composition and color characteristics of *Monascus pigments* by Ph and nitrogen sources in submerged fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 2, p. 145-154, 2015.

SILVEIRA, S. T., et al. Pigment production by *Monascus purpureus* in grape waste using factorial design. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 170-174, 2008.

SOILLE, Pierre. **Morphological image analysis: principles and applications**. Springer Science & Business Media, 2013.

SOLOMON, C.; BRECKON, T. **Fundamentos do processamento de imagens digitais: uma abordagem prática com exemplos em Matlab**. John Wiley & Sons, 2011.

TENÓRIO, R. P. et al. Synthesis of thiosemicarbazone and 4-thiazolidinone derivatives and their in vitro anti-*Toxoplasma gondii* activity. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 15, n. 10, p. 2575-2578, 2005.

TIPLER, P.; MOSCA, G. **Física para cientistas e engenheiros. Vol. 2:** eletricidade e magnetismo, óptica. São Paulo:Grupo Gen-LTC, 2000.

TSENG, Y. et al. Growth, pigment production and protease activity of *Monascus purpureus* as affected by salt, sodium nitrite, polyphosphate and various sugars. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 1, p. 31-37, 2000.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M. D. Produção de carotenoides: micro-organismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2429-2436, 2009.a

VALDUGA, E.; VALERIO, A.; TATSCH, P.; TREICHEL, H. A.; LUCCIO, M. D.; Assessment of cell disruption and carotenoids extraction from *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636). **Food Bioprocess Technology**, v. 2, p. 234-238, 2009.b

VAN LONG, N. N. et al. Temperature, water activity and pH during conidia production affect the physiological state and germination time of *Penicillium* species. **International journal of food microbiology**, v. 241, p. 151-160, 2017.

VELOSO, L. D. A. **Corantes e pigmentos**. Dossiê Técnico. Curitiba: TECPAR - Instituto de Tecnologia do Paraná. 2012.

VELMURUGAN, P., et al. Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 346-350, 2010.

VENDRUSCOLO, F. Produção de pigmento vermelho a partir de pigmento laranja produzido por *Monascus ruber* CCT 3802. 272 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Curso de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

VENDRUSCOLO, F. et al. Construction and application a vane system in a rotational rheometer for determination of the rheological properties of *Monascus ruber* CCT 3802. **Journal of biorheology**, v. 24, n. 1, p. 29-35, 2010.

VENDRUSCOLO, F. et al. Thermal stability of natural pigments produced by *Monascus ruber* in submerged fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 278-284, 2013.

VENDRUSCOLO, F. et al. Isoelectric point of amino acid: Importance for *Monascus* pigment production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 179-185, 2016.

VENIAL, Lucimara Ribeiro et al. Biometria e armazenamento de sementes de genótipos de cacaueiro. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 37, n. 89, p. 39-46, 2017.

VINAROV, A.; ROBUCHEVA, Z.; SIDORENKO, T.; DIRINA, E. Microbial biosynthesis and making of pigment melanin. **Communications in agricultural and applied biological Science**, v. 68, n. 2, p. 325-326, 2003.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 20, n. 1, p. 157-166, 2009.

XU, B. et al. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin citrinin. **Food control**, v. 17, n. 4, p. 271-285, 2006.

XU, W. Study on the liquid fermentation to produce *Monascus* pigment with corn starch and antibacteria. In: **Advanced Materials Research**. Trans Tech Publications, p. 1336-1340, 2011.

YAO, G.; GAO, L.; WU, R.; KAN, Q.; LIU, G.; QU, Y. Redesigning the regulatory pathway to enhance cellulase production in *Penicillium oxalicum*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 73-86, 2016.

YONGSMITH, B. et al. Color mutants of *Monascus sp.* KB9 and their comparative glucoamylases on rice solid culture. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, n. 1, p. 263-272, 2000.

YOSHIZAKI, Yumiko et al. Characterization of glucoamylase and α -amylase from *Monascus anka*: enhanced production of α -amylase in red koji. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 110, n. 6, p. 670-674, 2010.

ZHAO, D.; LU, L.; QIN, H. Studies on the properties of a microbial blue pigment. **Food and Fermentation Industries**, v. 24, n. 5, p. 21-24, 30, 1998.

ZHENG, W. et al. NMR-based metabonomic analysis on effect of light on production of antioxidant phenolic compounds in submerged cultures of *Inonotus obliquus*. **Bioresource technology**, v. 100, n. 19, p. 4481-4487, 2009.

WANG, R. et al. The application of a generic feedstock from wheat for microbial fermentations. **Biotechnology progress**, v. 18, n. 5, p. 1033-1038, 2002.

WANG, You-Zhi; JU, Xiu-Lian; ZHOU, Yu-Guang. The variability of citrinin production in *Monascus* type cultures. **Food Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 145-148, 2005.

WANG, G. L. et al. Effects of different reduced carbon sources on succinic acid production by anaerobic fermentation of recombinant *Escherichia coli*. **China Brewing**, v. 204, n. 3, p. 16-19, 2009.

WANG, Meihua et al. Production of water-soluble yellow pigments by fermentation with high glucose content of *Monascus ruber* CGMCC 10910. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 8, p. 3121-3130, 2017.

WIBOWO, Scheling et al. Changes in the quality of pasteurized orange juice during storage: A kinetic study of specific parameters and their relation to color instability. **Food Chemistry**, v. 187, p. 140-151, 2015.

WISSGOTT, U.; BORTLIK, K. Prospects for new natural food colorants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 9, p. 298-302, 1996.

WONG, Hin-chung; KOEHLER, Philip E. Production and isolation of an antibiotic of *Monascus purpureus* and its relationship with the production of pigments. **Journal of Food Science**, v. 46, n. 2, p. 589-592, 1981.

APÊNDICE A – Espectrofotometria de varredura dos experimentos do planejamento estatístico

APÊNDICE B – Algoritmo de extração de dados: *Monascus ruber* aplicação da mascara gráfica e extração de dados macromorfológicos aplicados no *ImageJ*

// Variável da referência de localização

var x =0;

var y =0;

// Variável que determina o diametro a placa

var diametro =0;

// Variável que delimita a região que será analisada

var a =0;

var b =0;

var c =0;

var d =0;

// Variável que determina a faixa de intensidades "tons" que serão analisadas

var t =16; //Faixa de aplicação para a máscara gráfica

// Variável que determina a faixa de intensidades "tons" que serão analisadas

var escala =0;

// Posição no eixo x do inóculo

x = getNumber ("Digite a posição x inicial do inóculo:", x);

// Posição no eixo y do inóculo

y = getNumber ("Digite a posição y inicial do inóculo:", y);

// Diâmetro da placa

diâmetro = getNumber ("Digite o diâmetro da placa, em mm:", d);

// Conversão mm para pixels

escala = getNumber ("Qual é a escala entre pixels e mm:", x);

// Área util

diâmetro=diâmetro-1; // -1 referente a largura da borda da placa de Petri

```

x=x*escala
y=y*escala
diametro=diametro*escala
// Referenciando as coordenadas para seleção região de interesse
    a=x-(diametro/2);
b=y-(diametro/2);
    c=(diametro);
d=(diametro);
// elipse que demilita a região que será analisada
    makeOval(a,b,c,d);
// Eliminado a região que não será analisada
    setBackgroundColor(0, 0, 0);
    run("Clear Outside");
// Escala cinza
    run("8-bit");
// Mascara Gráfica
    run("16 Colors");
// Selecionando os parâmetros que seram analisados
    run("Set Measurements...", "area standard median limit display
redirect=None decimal=3");
// Selecionando a região de análise
    // Região 1
    setThreshold(1, t);
    run("Measure");
    // Região 2
    setThreshold(t+1, 2*t);
    run("Measure");

```

```

// Região 3
    setThreshold(2*t+1, 3*t);
    run("Measure");

// Região 4
    setThreshold(3*t+1, 4*t);
    run("Measure");

// Região 5
    setThreshold(4*t+1, 5*t);
    run("Measure");

// Região 6
    setThreshold(5*t+1, 6*t);
    run("Measure");

// Região 7
    setThreshold(6*t+1, 7*t);
    run("Measure");

// Região Equivalente ao meio de cultura
    setThreshold(7*t+1, 254);
    run("Measure");

// Selecionando a área total para cálculo do deslocamento radial

// Região 1
    setThreshold(1, t);
    run("Measure");

// Região 2
    setThreshold(1, 2*t);
    run("Measure");

// Região 3
    setThreshold(1, 3*t);

```

```
run("Measure");  
// Região 4  
setThreshold(1, 4*t);  
run("Measure");  
// Região 5  
setThreshold(1, 5*t);  
run("Measure");  
// Região 6  
setThreshold(1, 6*t);  
run("Measure");  
// Região 7  
setThreshold(1, 7*t);  
run("Measure");  
// Região Equivalente ao meio de cultura  
setThreshold(1, 254);  
run("Measure");
```


APÊNDICE C – Algoritmo de extração de dados: *Monascus ruber*, varredura para deteminar o perfil de padrão da intensidade pigmentar ao longo da posição radial no meio fermentativo aplicado no *ImageJ*

```
// Variável que determina o diâmetro da coroa circular
    var t =1;

// Posição no eixo x do inóculo
    // Variável da referência de localização
    var x =0;
    var y =0;

// Variável que determina o diametro a placa - inicializando
    var diametro =0;

// Variável que delimita aregião que será analisada - inicializando
    var a =0;
    var b =0;
    var c =0;
    var d =0;

// Variável conversor escala - inicializando
    var escala=0;

// Posição no eixo x do inóculo
    x = getNumber ("Digite a posição x inicial do inóculo:", x);

// Posição no eixo y do inóculo
    y = getNumber ("Digite a posição y inicial do inóculo:", y);

// Diâmetro da placa
    diametro = getNumber ("Digite o diâmetro da placa, em mm:", d);

// Conversão mm para pixels
    escala = getNumber ("Qual é a escala entre pixels e mm?", x);
```

```

// Área util

    diametro=diámetro-1;

    x=x*escala;

    y=y*escala;

    diametro=diámetro*escala;

// Referenciando as coordenadas para seleção região de interesse - ROI

    a=x-(diámetro/2);

    b=y-(diámetro/2);

    c=(diámetro);

    d=(diámetro);

// elipse que demilita a região que será analisada

    makeOval(a,b,c,d);

// Eliminado a região que não será analisada

    setBackgroundColor(0, 0, 0);

    run("Clear Outside");

// Elaborando a detecção mm - t por mm- t da variação pigmentar

//setTool("oval");

    var r=t;

    a=0;

    b=0;

    c=0;

    d=0;

// Estrutura lógica de varredura

    for (i = 0; i <48; i ++ ) {

a=x-(i*r*escala);

b=y-(i*r*escala);

```

```
c=r+(r*i*2*escala);  
d=r+(r*i*2*escala);  
makeOval(a,b,c,d);  
run("RGB Measure");  
}
```