

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Marina Del Bianco Sousa

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE COLORANTE
NATURAL VERMELHO PELO FUNGO ENDOFÍTICO *Talaromyces*
*minnesotensis***

SÃO CARLOS – SP
2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Avaliação do processo de produção de corante natural vermelho pelo
fungo endofítico *Talaromyces minnesotensis***

Marina Del Bianco Sousa
Aluna de pós-graduação

Alberto Colli Badino Júnior
Orientador - PPG-EQ/UFSCar

Álvaro de Baptista Neto
Co-orientador – DBB/UNESP-Araraquara

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutora em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

SÃO CARLOS – SP
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Marina Del Bianco Sousa, realizada em 29/06/2022.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Alberto Colli Badino Junior (UFSCar)

Prof. Dr. Álvaro de Baptista Neto (UNESP)

Profa. Dra. Fernanda Perpétua Casciotori (UFSCar)

Prof. Dr. Kaio César da Silva Rodrigues (UFOB)

Profa. Dra. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma (UNESP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

*Dedico este trabalho aos meus pais, Renato e Mônica,
ao meu irmão, Ricardo, e ao meu noivo, Rauber.*

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fermentações do Departamento de Engenharia Química (DEQ) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me acompanhar em todos os meus caminhos e me por conceder a fé, a resiliência, a perseverança e a sabedoria espiritual necessárias para a realização deste trabalho.

Ao meu irmão, Ricardo, e aos meus pais, Renato e Mônica, que me apoiaram, torceram e vivenciaram todos os obstáculos e conquistas dessa trajetória.

Ao meu companheiro de vida, Rauber, por todo amor, respeito, paciência e companheirismo. E aos meus sogros, João e Ivânia, por todas as orações e todo carinho de sempre.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Alberto Colli Badino e Prof. Dr. Álvaro Baptista Neto, pela oportunidade, pelo apoio, por todo conhecimento compartilhado, pela paciência, e sobretudo, pela amizade e por todos os ensinamentos.

Aos professores Eloízio Júlio Ribeiro, Líbia Diniz Santos e Vicelma Luiz Cardoso por me ensinarem com maestria, ainda na graduação, o respeito e o carinho para com a ciência e a pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, por gentilmente se disporem a contribuir com o enriquecimento deste trabalho.

Aos meus colegas e amigos de laboratório por toda paciência, ajuda, parcerias, colaboração, companheirismo e momentos de descontração, que com certeza fizeram dessa jornada mais leve.

Aos técnicos Natália, Amadeus, Thais, Aline, Samuel e Oscar, pelo suporte e ajuda cedida no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos e à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade concedida e pelo suporte institucional e financeiro.

E por fim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram e auxiliaram no desenvolvimento desse trabalho.

Muito obrigada!

Coragem!
(Padre Robson Caramano)

RESUMO

Diante do crescente incentivo e conscientização sobre o consumo e emprego de propostas mais sustentáveis, os biocolorantes oriundos de fungos filamentosos se apresentam como uma promissora alternativa aos colorantes sintéticos, por serem menos prejudiciais aos seres vivos e ao meio ambiente, além de possuírem maior estabilidade e potencial biotecnológico em comparação com outras fontes naturais. Neste contexto, a presente tese teve como objetivo caracterizar o biocolorante vermelho sintetizado pelo fungo endofítico *Talaromyces minnesotensis*, bem como avaliar o processo de produção de biocolorante em frascos agitados e em biorreatores convencionais, visando a melhoria do bioprocesso. Inicialmente, o fungo endofítico *Talaromyces minnesotensis* foi caracterizado fenotipicamente por ensaios conduzidos em diferentes meios sólido. Em seguida, através de cultivos submerso em frascos agitados foi verificado seu potencial de produção de biocolorante. Visando avaliar a melhoria do bioprocesso, o biocolorante sintetizado foi caracterizado por meio de ensaios de fluorescência, citotoxicidade (MTT e MIC), estabilidade e aplicabilidade. Os ensaios de caracterização e aplicação demonstraram que o biocolorante apresenta atividade contra células de hepatoblastoma humano (HepG2) apenas em concentrações acima de $5,0 \text{ g L}^{-1}$, ao passo que para bactérias patogênicas e leveduras a concentração deve ser superior a $50,0 \text{ g L}^{-1}$. Além disso, o biocolorante apresentou alta estabilidade em valores de pH neutro (6 a 8) e em baixas temperaturas (10 a 20°C), bem como expressiva capacidade de coloração em diferentes matrizes como detergente, gelatina, esmalte, tinta e tecidos, demonstrando a viabilidade do estudo mais aprofundado do bioprocesso buscando sua melhoria e conseqüentemente o aumento da produção de biocolorante vermelho. Dessa forma, foi desenvolvido um planejamento fatorial (2^2+3PC), visando avaliar a influência de três combinações de impelidores de diferentes geometrias sob diferentes condições de frequência de agitação (400-800 rpm) e vazão específica de alimentação de ar (0,5-1,5 vvm) sobre a produção de biocolorante em biorreator convencional. Os resultados, analisados com base na Desejabilidade Global (D_G) em termos das variáveis-resposta principais de desempenho produção e produtividade em biocolorante, demonstraram que a configuração composta por dois impelidores orelha de elefante (EEDP-EEUP) operada a 600 rpm e 1,0 vvm, se apresentou como a mais favorável ao bioprocesso, obtendo-se uma produção de 45,30 UA. Ainda, através da análise de correlações, verificou-se que as propriedades hidrodinâmicas tendem a apresentar maior relevância sobre o desempenho do bioprocesso frente às de transferência de oxigênio. Visando avaliar o desempenho do bioprocesso em maior escala, foi realizado o estudo exploratório de escalonamento do bioprocesso de 4 para 10 L, no qual se obteve um resultado satisfatório, alcançando uma produção na escala de 10 L estatisticamente igual à obtida em 4 L. Por fim, visando melhorar a produção de biocolorante, avaliou-se o emprego da batelada alimentada em frascos agitados e em biorreator convencional, obtendo resultados expressivos em ambas escalas, onde em frascos agitados se alcançou uma produção máxima da ordem de 86,0 UA, ao passo que em biorreator convencional os ganhos em termos de produção máxima variaram entre 80 a 238% em relação à batelada convencional a depender das condições de alimentação ($F.C_{SF}$), entre as quais a alimentação a $0,01 \text{ L h}^{-1}$ (F) e uma concentração de substrato de 60 g L^{-1} (C_{SF}) se apresentou como a condição mais favorável ao bioprocesso, alcançando uma produção máxima de aproximadamente 153,0 UA, mostrando ser o bioprocesso de produção de colorante pelo fungo endofítico *T. minnesotensis* promissor e de elevado potencial para futuros estudos visando sua implementação em nível industrial.

Palavras – chave: fungo endofítico, biocolorante, estabilidade, aplicabilidade, bioprocesso, impelidores, escalonamento, batelada alimentada.

ABSTRACT

The growing incentive and awareness regarding the consumption and use of more sustainable proposals, biocolorants from filamentous fungi are presented as a promising alternative to synthetic colorants. These biocompounds are less harmful to living beings and the environment, presenting greater stability and biotechnological potential compared to other natural sources. In this context, this thesis aimed to characterize the red biocolorant synthesized by the endophytic fungus *Talaromyces minnesotensis*, as well as to evaluate the biocolorant production process in shaken flasks and in conventional bioreactors, aiming the improvement of the bioprocess. Initially, the endophytic fungus *T. minnesotensis* was phenotypically characterized by assays carried out in different solid media. Then, its potential for biocolorant production was verified through submerged cultures in shaken flasks. The synthesized biocolorant was characterized by means of fluorescence, cytotoxicity (MTT and MIC), stability, and applicability assays. The characterization and application tests showed that the biocolorant has activity against human hepatoblastoma cells (HepG2) at concentrations above 5.0 g L⁻¹, while for pathogenic bacteria and yeasts the concentration must be higher than 50.0 g L⁻¹. In addition, the bioproduct showed high stability at neutral pH values (6 to 8) and at low temperatures (10 to 20°C). Expressive coloring potential of the red biocolorant produced in different matrices such as detergent, gelatin, enamel, paint, and fabrics, was also verified, which indicates the feasibility of a more in-depth study of the bioprocess to improve and increase its production. Thus, a factorial design (2²+3PC) was performed, aiming to evaluate the influence of three combinations of impellers of different geometries under different conditions of agitation frequency (400-800 rpm) and specific air supply flow rate (0, 5-1.5 vvm) on the production of biocolorant in a conventional bioreactor. The results were analyzed based on the Global Desirability (D_G) in terms of the main response variables of performance, production, and productivity of biocolorant. It was shown that the configuration composed of two elephant ear impellers (EEDP-EEUP) operated at 600 rpm and 1.0 vvm was the most favorable to the bioprocess, obtaining a production of 45.30 AU. By correlations assessment, it was verified that the hydrodynamic properties tended to present greater relevance to the performance of the bioprocess compared to the oxygen transfer properties. In order to evaluate the performance of the bioprocess on a larger scale, an exploratory study was carried out to scale up the bioprocess from 4 to 10 L bioreactor, in which a satisfactory result was obtained by reaching an equal production for both scales. Finally, in order to improve the production of biocolorant, the use of the fed-batch mode in shaken flasks and in a conventional bioreactor was evaluated. The production in these assays reached expressive results for both scales: a maximum production of the order of 86.0 AU in shaken flasks, and maximum production ranged from 80 to 238% in relation to the conventional batch for bioreactors. Regarding this last, the increase of production depended on the feeding conditions (FC_{SF}), reaching a maximum production of approximately 153.0 AU in the most favorable condition at a feeding flow rate of 0.01 L h⁻¹ (F) and a substrate concentration of 60 g_S L⁻¹ (C_{SF}). These results proved the fact the bioprocess production of colorant by the endophytic fungus *T. minnesotensis* has a high potential for future studies aiming for its implementation at pilot and industrial scales.

Key words: endophytic fungus, biocolorant, stability, applicability, bioprocess, impellers, scaling, fed batch.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1- Esquema dos mecanismos de formação das formas macromorfológicas de microrganismos filamentosos.....	22
Figura 2.2- Estrutura padrão de conidióforo para fungos filamentosos biverticiliado.....	25
Figura 2.3- Modelos de biorreatores: (A) convencional tipo tanque agitado e aerado, (B) coluna de bolhas e (C) airlift de cilindros concêntricos.....	30
Figura 2.4- Biorreator tanque agitado e aerado.....	32
Figura 2.5- Principais tipos de escoamento em biorreatores convencionais: (A) radial, (B) axial e (C) misto.....	39
Figura 2.6- Impelidor turbina de Rushton.....	39
Figura 2.7- Impelidores orelha de elefante: (A) modo de bombeamento para baixo (EEDP) e (B) modo de bombeamento para cima (EEUP).....	40
Figura 2.8- Trabalhos referentes a produção de biocolorantes pelos gêneros fúngico <i>Talaromyces</i> / <i>Penicillium</i>	45
Figura 3.1- Crescimento do endofítico <i>T. minnesotensis</i> em meio de ágar ISP2. (A) lado reverso das colônias e (B) fenótipo característico da colônia e exsudação microbiana do biocolorante vermelho. Imagens microscópicas (400x) do fungo endofítico mostrando (C) hifas septadas e (D) fiáldes nos conidióforos.....	60
Figura 3.2- Características macromorfológicas de <i>T. minnesotensis</i> após 7 dias cultivado a 25°C em (A) CREA, (B) OA, (C) MEA, (D) CYA e (E) YES.....	62
Figura 3.3- Perfis de produção de biocolorante vermelho (ABS ₅₀₀ , em unidades arbitrárias) e pH durante o cultivo de <i>T. minnesotensis</i>	63
Figura 3.4- Espectro de fluorescência do biocolorante vermelho em solução aquosa (1,0 g L ⁻¹) em diferentes pHs: 4,0; 6,0; 6,74; 8,0; 10,0 e 12,0.....	64
Figura 3.5- Resultados para exposição de células HepG2 ao colorante vermelho. (A) viabilidade das células HepG2 (%) após a exposição por 24 e 48 h (apresentadas como médias com desvios-padrão). Imagens de microscopia óptica de células HepG2 expostas ao colorante vermelho: (B a F) após 24 h para C-, C+, 10,0, 5,0 e 1,0 g L ⁻¹ , respectivamente; (G a K) após 48 h para C-, C+, 10,0, 5,0 e 1,0 g L ⁻¹ , respectivamente.....	66
Figura 3.6- Viabilidade celular (%) e valores de IC ₅₀ para células HepG2 expostas ao colorante vermelho: (A) após 24 h e (B) após 48 h.....	67
Figura 3.7- Perfil da porcentagem residual de colorante vermelho (%RCR), de acordo com o tempo, para pH de 1,0 a 10,0, em temperaturas de (A) 10°C, (B) 20°C, (C) 40°C, (D) 60°C, e (E) 80°C.....	69
Figura 3.8- Variação da coloração após 24 horas de incubação.....	70
Figura 3.9- Gráficos do modelo de Arrhenius, nos pHs 6 a 8, para o colorante vermelho produzido por <i>T. minnesotensis</i>	74
Figura 3.10- Aplicação do biocolorante vermelho em diferentes matrizes: (A) detergente, (B) gelatina, (C) esmalte e (D) tinta.....	75

Figura 3.11- Tecidos multifibras tingidos com o biocolorante vermelho bruto produzido por <i>T. minnesotensis</i>	76
Figura 4.1- Etapas de preparo do inóculo.....	82
Figura 4.2- Esquema das etapas do processo de inoculação dos ensaios conduzidos em biorreatores.....	83
Figura 4.3- Esquema do sistema de análise de gases e monitoramento do oxigênio dissolvido.....	84
Figura 4.4- Esquema das combinações de impelidores avaliadas.....	84
Figura 4.5- Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados ao nível de significância de 95% correspondente às três variáveis independentes (frequência de agitação (N), vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}) e combinação de impelidores (CI)) e suas respectivas interações sobre a variável resposta Desejabilidade Global (DG) estimada a partir dos 21 ensaios realizados em biorreator convencional.....	98
Figura 4.6- Diagramas de Pareto dos efeitos padronizados ao nível de significância de 95% correspondente às variáveis independentes (frequência de agitação (N) e vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar})) e suas respectivas interações sobre a variável resposta desejabilidade global (dg), correspondente as seguintes combinações de impelidores: (A) turbina Rushton (RT-RT), (B) combinação híbrida (EEDP-RT) e (C) orelha de elefante de três lâminas (EEDP-EEUP).....	100
Figura 4.7- Tempos característicos (t_{OTR} , t_{OUR} e t_M) correspondentes às respectivas combinações de impelidores: (A) turbina Rushton (RT-RT), (B) combinação híbrida (EEDP-RT) e (C) orelha de elefante (EEDP-EEUP).....	104
Figura 4.8- Valores de Desejabilidade Global (DG) correspondente às combinações de impelidores RT-RT, EEDP-RT e EEDP-EEUP, operados sob diferentes condições de agitação (N em rpm) e de aeração (ϕ_{ar} em vvm).....	106
Figura 4.9- Análise comparativa dos melhores ensaios para cada combinação de impelidores referente as quatro variáveis-respostas principais: (A) produção (ABS_{500} em UA), (B) produtividade (P_P em UA h ⁻¹), (C) produção específica ($ABS_{500/X}$ em UA gx ⁻¹) e (D) produtividade específica ($P_{P/X}$ em UA gx ⁻¹ h ⁻¹).....	107
Figura 4.10- Perfil da relação obtida entre a variável-resposta primária produção (ABS_{500} - R1) e as variáveis-resposta secundárias: o percentual de oxigênio transferido (O_{2-T} - R6) para as três combinações de impelidores estudadas: (A) turbina Rushton (RT-RT), (B) combinação híbrida (EEDP-RT) e (C) orelha de elefante de três lâminas (EEDP-EEUP); e o oxigênio dissolvido mínimo (T_{OD-Min} - R8) para as três combinações de impelidores estudadas: (D) turbina Rushton (RT-RT), (E) combinação híbrida (EEDP-RT) e (F) orelha de elefante de três lâminas (EEDP-EEUP).....	110
Figura 4.11- Perfis de crescimento celular (C_X), consumo de substrato (C_S) e produção de colorante vermelho (ABS_{500nm}) no cultivo conduzido em biorreator tipo tanque agitado e aerado de 4 L de volume útil.....	118
Figura 4.12- Perfis de crescimento celular, consumo de substrato e produção de colorante vermelho no cultivo no cultivo conduzido em biorreator tipo tanque agitado e aerado de 10 L de volume útil.....	118

Figura 4.13- Bioprocesso de produção de corante em biorreator tanque agitado e aerado de 4 e 10 L de volume útil.....	119
Figura 5.1- Esquema das etapas de inoculação dos ensaios conduzidos em frascos agitados e em biorreator.....	126
Figura 5.2- Etapas do processo de inoculação dos ensaios conduzidos em frascos agitados....	127
Figura 5.3- Etapas de amostragem e adição de pulso no cultivo contínuo com alimentação intermitente à volume constante.....	128
Figura 5.4- Distribuições dos pulsos ao longo do cultivo de avaliação do comportamento da fermentação contínua com alimentação intermitente de meio de cultura suplementar.....	129
Figura 5.5- Distribuição dos pulsos ao longo dos cultivos de avaliação da composição do meio de cultura de alimentação.....	131
Figura 5.6- Esquema de execução do cultivo batelada alimentada intermitente com pulso de meio de cultura suplementar concentrado.....	132
Figura 5.7- Esquema de execução dos cultivos em batelada alimentada intermitente com pulso de meio de cultura suplementar concentrado.....	133
Figura 5.8- Esquema do aparato experimental empregado nos ensaios em biorreator conduzidos em batelada convencional (BC).....	134
Figura 5.9- Aparato experimental empregado nos ensaios em biorreator conduzidos em batelada alimentada.....	137
Figura 5.10- Princípio de leitura da absorbância via espectrofotômetro.....	139
Figura 5.11- Procedimento de extração realizado com amostra do caldo de cultivo tratado....	140
Figura 5.12- Ajuste do modelo linear aos dados experimentais de concentração de sólidos solúveis no caldo tratado (C_{P_SSCT}) ou concentração de corante no caldo extraído (C_{P_CE}) em função da ABS_{500}	149
Figura 5.13- Perfis de crescimento celular, de consumo de substrato e de produção de corante vermelho no cultivo em batelada convencional (BC) em frascos agitado.....	151
Figura 5.14- Perfis de crescimento celular, consumo de substrato e produção de corante vermelho no cultivo com alimentação intermitente de meio Sabraud (CPS) em frascos agitados.....	151
Figura 5.15- Perfis de crescimento celular, consumo de substrato e produção de corante vermelho no cultivo com alimentação intermitente de solução de dextrose (CPD) em frascos agitados.....	152
Figura 5.16- - Coloração final dos sobrenadantes referentes aos cultivos alimentados com o meio Sabraud (CPS), com solução de dextrose (CPD) e o convencional em batelada (BC)...	155
Figura 5.17 Variação dos espectros de varredura referente aos cultivos alimentados com meio Sabraud (CPS), com solução de dextrose (CPD) e convencional em batelada (BC).....	155
Figura 5.18- Variações de concentrações de glicose (C_S) e de biomassa (C_X) e produção de pigmento (ABS_{500nm}) no cultivo convencional em batelada (BC).....	156

- Figura 5.19- Variações de concentrações de glicose (C_S) e de biomassa (C_X) e produção de pigmento (ABS_{500nm}) obtidas no cultivo contínuo alimentado de forma intermitente com o meio Saboraud 1 (CPS1: 21,0 g L⁻¹ de dextrose e 10,5 g L⁻¹ de peptona de soja)..... 157
- Figura 5.20- Variações de concentrações de glicose (C_S) e de biomassa (C_X) e produção de pigmento (ABS_{500nm}) obtidas no cultivo contínuo alimentado de forma intermitente com o meio Saboraud 2 (CPS2: 10,5 g L⁻¹ de dextrose e 5,25 g L⁻¹ de peptona de soja)..... 157
- Figura 5.21- Variações de concentrações de glicose (C_S) e de biomassa (C_X) e produção de pigmento (ABS_{500nm}) obtidas no cultivo contínuo alimentado de forma intermitente com o meio Saboraud 3 (CPS3: 10,5 g L⁻¹ de dextrose e 10,5 g L⁻¹ de peptona de soja)..... 158
- Figura 5.22- Variações de concentrações de glicose (C_S) e de biomassa (C_X) e produção de pigmento (ABS_{500nm}) obtidas no cultivo contínuo alimentado de forma intermitente com meio à base de peptona (CPP: 10,5 g L⁻¹ de peptona de soja)..... 158
- Figura 5.23- Variações das concentrações de glicose (C_S) e biomassa (C_X) e de produção de pigmento (ABS_{500nm}) ao longo do cultivo convencional em batelada (BC)..... 163
- Figura 5.24- Variações das concentrações de glicose (C_S) e de biomassa (C_X) e produção de pigmento (ABS_{500nm}) ao longo do cultivo em batelada alimentada com pulsos de meio de cultura concentrado (BPC)..... 163
- Figura 5.25- Perfis de crescimento celular ao longo dos cultivos conduzidos em biorreator em batelada convencional e em batelada alimentada sob diferentes condições de alimentação de substrato: **(A)** $F.C_{SF}=1,2 \text{ gs h}^{-1}$, **(B)** $F.C_{SF}=0,6 \text{ gs h}^{-1}$ e **(C)** $F.C_{SF}=2,4 \text{ gs h}^{-1}$ 166
- Figura 5.26- Perfis de produção de colorante ao longo dos cultivos conduzidos em batelada alimentada sob diferentes condições de alimentação em relação à máxima produção obtida no cultivo em batelada convencional..... 167
- Figura 5.27- Influência da vazão mássica de nutrientes ($F.C_{SF}$) na máxima produção de colorante ($ABS_{MAX 500nm}$) em diferentes vazões volumétricas de alimentação (F) e concentrações de substrato no meio suplementar (C_{SF})..... 169
- Figura 5.28- Coeficientes globais de conversão de: **(A)** substrato em células ($Y_{X/S}$), **(B)** células em produto ($Y_{P/X}$), **(C)** substrato em produto ($Y_{P/S}$) referentes aos 9 ensaios conduzidos em batelada alimentada sob diferentes condições de alimentação (FB) e um ensaio conduzido em batelada convencional (BC)..... 171
- Figura 5.29- Gráficos comparativos entre os valores simulados e experimentais de C_X , C_S e C_P relativos aos ensaios **(A)** FB4 e **(B)** FB6 conduzidos em batelada alimentada em biorreator tipo tanque agitado e aerado..... 174
- Figura 5.30- Produtividade máxima específica ($P_{P/X-MAX}$) referente aos 9 ensaios conduzidos em batelada alimentada sob diferentes condições de alimentação (FB) e ao cultivo convencional em batelada (BC)..... 176

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1- Critérios de variação de escala para bioprocessos conduzidos em biorreatores convencionais tipo tanque agitado.....	42
Tabela 2.2- Critérios de aeração para o escalonamento de bioprocessos aeróbios conduzidos em biorreatores convencionais tipo tanque agitado.....	43
Tabela 3.1- Composições das soluções tampão empregadas no ensaio de estabilidade do corante vermelho.....	55
Tabela 3.2- Massas de matriz e de biocolorantes e proporções biocolorante/matriz empregadas nos tingimentos das matrizes gelatina, detergente, tinta acrílica e esmalte.....	58
Tabela 3.3- Resumo das características macromorfológicas de <i>Talaromyces minnesotensis</i> após 7 dias a 25, 30 e 37°C.....	61
Tabela 3.4- Parâmetros cinéticos de degradação do biocolorante (k , $t_{1/2}$ e E_a) para pH de 6,0 a 8,0, nas temperaturas de 10, 20, 40, 60 e 80°C.....	72
Tabela 4.1- Planejamento fatorial 2^2+3PC para três diferentes combinações de impelidores....	85
Tabela 4.2- Estimativa dos coeficientes de correlação, ao nível de confiança de 5%, entre as variáveis-resposta principais (produção, R1 ; produtividade, R2 ; produção específica, R3 e produtividade específica, R4) e as variáveis-resposta secundárias (velocidade global média de consumo de oxigênio, R5 ; percentual de oxigênio transferido, R6 ; coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio médio, R7 ; tensão mínima de oxigênio dissolvido, R8 ; valor médio da velocidade média de cisalhamento, R9 ; viscosidade aparente média, R10 ; valor médio da taxa de dissipação de energia, R11 e microescala de Kolmogorov média, R12).....	109
Tabela 4.3- Faixa de variação das variáveis-resposta para as combinações de impelidores RT-RT, EEDP-RT e EEDP-EEUP nas faixas de operação avaliadas, $400 < N \text{ (rpm)} < 800$ e $0,5 < \phi_{ar} \text{ (vvm)} < 1,5$	114
Tabela 4.4- Critérios de aeração para o escalonamento do bioprocesso de produção de corante pelo fungo endófito <i>T. minnesotensis</i>	117
Tabela 5.1- Relação entre as produções de colorantes por fungos filamentosos em batelada alimentada (FB) e em batelada convencional (BC).....	124
Tabela 5.2- Composições das soluções de suplementação.....	130
Tabela 5.3- Condições de alimentação dos cultivos em batelada alimentada (FB) conduzidos em biorreator de bancada.....	136
Tabela 5.4- Diluições avaliadas do caldo tratado (CT) e do caldo extraído (CE).....	141
Tabela 5.5- Parâmetros cinéticos de crescimento celular.....	148
Tabela 5.6- Parâmetros do algoritmo genético empregado na modelagem.....	148
Tabela 5.7- Parâmetros cinéticos e de rendimento referentes à produção de corante vermelho ao longo dos ensaios realizados visando a avaliação do comportamento dos cultivos com alimentação intermitente de meio suplementar (Saboraud ou solução de dextrose).....	153
Tabela 5.8- Parâmetros cinéticos e de rendimento referentes à produção de corante vermelho ao longo dos ensaios realizados visando a avaliação da composição da solução pulso.....	160

Tabela 5.9- Parâmetros cinéticos e de rendimento referentes aos cultivos convencional em batelada (BC) e em batelada alimentada com pulsos de meio de cultura concentrado (BPC)...	165
Tabela 5.10- Massa total de açúcar fornecido (M_{AT}^B) e massa total de açúcar residual (M_{AR}) referentes ao cultivo convencional em batelada (BC) e aos ensaios em batelada alimentada com diferentes condições de alimentação (FB).....	170
Tabela 5.11 – Valores estimados dos parâmetros cinéticos de produção para os cultivos FB4 e FB6 conduzidos em batelada alimentada em biorreator tanque agitado.....	175

SUMÁRIO

1.	CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	14
1.1.	INTRODUÇÃO	15
1.2.	OBJETIVOS	16
2.	CAPÍTULO 2: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E ESTADO DA ARTE	18
2.1.	COLORANTES: CORANTES (DYES) E PIGMENTOS	19
2.2.	COLORANTES NATURAIS	20
2.3.	FUNGOS FILAMENTOSOS	21
2.3.1.	Características morfológicas dos fungos filamentosos	21
2.3.2.	Metabólitos primários e secundários	23
2.3.3.	<i>Talaromyces minnesotensis</i>	24
2.4.	PRODUÇÃO DE BIOCOLORANTES	25
2.5.	BIORREATOR, VARIÁVEIS DE PROCESSO E VARIAÇÃO DE ESCALA	31
2.5.1.	Geometria do biorreator convencional tanque agitado	32
2.5.2.	Demanda e transferência de oxigênio em bioprocessos	33
2.5.3.	Parâmetros hidrodinâmicos	35
2.5.4.	Impelidores	38
2.5.5.	Variação de escala	41
2.6.	PRODUÇÃO DE BIOCOLORANTES – ESTADO DA ARTE	43
3.	CAPÍTULO 3: <i>Talaromyces minnesotensis</i>: UM POTENCIAL PRODUTOR DE BIOCOLORANTES	47
3.1.	INTRODUÇÃO	48
3.2.	MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.2.1.	Fungo endofítico: caracterização fenotípica	49
3.2.2.	Produção em frascos agitados e extração do biocolorante vermelho	50
3.2.3.	Caracterização do biocolorante	52

3.2.3.1. Emissão de fluorescência	52
3.2.3.2. Ensaio colorimétrico MTT em células derivadas de hepatoblastoma humano (HepG2)	53
3.2.3.3. Concentração inibitória mínima (MIC)	53
3.2.3.4. Ensaio de estabilidade	54
3.2.3.5. Ensaio de aplicação	58
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.3.1. Caracterização fenotípica do fungo filamentosso <i>Talaromyces minnesotensis</i>.....	59
3.3.2. Produção de biocolorante vermelho em frascos agitados.....	62
3.3.3. Ensaio de caracterização do biocolorante vermelho.....	64
3.3.3.1. Emissão de fluorescência	64
3.3.3.2. Ensaio de citotoxicidade	65
3.3.3.3. Ensaio de estabilidade	68
3.3.3.4. Aplicação do biocolorante vermelho	75
3.4. CONCLUSÕES	77
4. CAPÍTULO 4: INFLUÊNCIA DO SISTEMA DE IMPELIDORES E DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS NA PRODUÇÃO DE BIOCOLORANTE VERMELHO EM BIORREATOR CONVENCIONAL	78
4.1. INTRODUÇÃO	79
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	81
4.2.1. Microrganismo	81
4.2.2. Cultura estoque de trabalho	81
4.2.3. Preparo do inóculo	82
4.2.4. Cultivos em biorreatores tipo tanque agitado e aerado	83
4.2.4.1. Biorreator tanque agitado e aerado de 4 L de volume útil	83

4.2.5.	Variação de escala do bioprocesso de produção de corante fúngico	86
4.2.6.	Metodologia analítica	87
4.2.6.1.	Determinação do pH	87
4.2.6.2.	Determinação da concentração celular (C_X)	87
4.2.6.3.	Determinação da concentração de dextrose (C_S)	88
4.2.6.4.	Determinação da produção de corante vermelho (ABS_{500nm})	88
4.2.6.5.	Análise reológica	88
4.2.6.6.	Parâmetros hidrodinâmicos	89
4.2.6.6.1.	<i>Velocidade média de cisalhamento ($\dot{\gamma}_m$) e taxa de dissipação de energia (ϵ)</i>	89
4.2.6.6.2.	<i>Viscosidade aparente (μ_{ap})</i>	91
4.2.6.6.3.	<i>Microescala de turbulência de Kolmogorov (λ_K)</i>	91
4.2.6.7.	Consumo e transferência de oxigênio	92
4.2.6.8.	Tempos característicos	94
4.2.7.	Análise estatística	95
4.2.7.1.	Desejabilidade Global	95
4.2.7.2.	Análise dos Efeitos Padronizados	96
4.2.7.3.	Correlações entre as variáveis-resposta	97
4.3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
4.3.1.	Efeitos Padronizados das variáveis agitação, aeração e combinação de impelidores sobre o bioprocesso	97
4.3.2.	Correlações existentes no bioprocesso de produção de corante natural vermelho	108
4.3.3.	Escalonamento do bioprocesso	114
4.4.	CONCLUSÕES	120

5. CAPÍTULO 5: PRODUÇÃO DE BIOCOLORANTE VERMELHO POR <i>Talaromyces minnesotensis</i> EM BATELADA ALIMENTADA	122
5.1. INTRODUÇÃO	123
5.2. MATERIAIS E MÉTODOS	125
5.2.1. Cultura estoque de trabalho e Preparo do inóculo	125
5.2.2. Cultivos em frascos agitados	127
5.2.2.1. Batelada convencional em frascos agitados	127
5.2.2.2. Cultivos contínuos com alimentação intermitente a volume constante	127
5.2.2.2.1. <i>Avaliação do comportamento do cultivo contínuo com alimentação intermitente à volume constante</i>	127
5.2.2.2.2. <i>Avaliação da composição do meio de alimentação</i>	129
5.2.2.2.3. <i>Cultivos em batelada alimentada intermitente à volume constante</i>	131
5.2.3. Cultivos em biorreator	133
5.2.3.1. Batelada convencional em biorreator tanque agitado e aerado	134
5.2.3.2. Batelada alimentada em biorreator tanque agitado e aerado	135
5.2.4. Métodos analíticos	137
5.2.4.1. Determinação do pH	137
5.2.4.2. Determinação da concentração celular (C_X)	137
5.2.4.3. Determinação da concentração de dextrose (C_S)	138
5.2.4.4. Determinação da produção de corante vermelho (ABS_{500nm})	138
5.2.4.5. Determinação da relação entre absorvância (UA_{500}) e concentração de corante ($g_P L^{-1}$)	138
5.2.4.6. Determinação dos parâmetros de rendimento	143
5.2.4.6.1. <i>Produtividade volumétrica máxima (P_{P-MAX}) e Produtividade específica máxima ($P_{P/X-MAX}$)</i>	143

5.2.4.6.2. <i>Massa de açúcar total fornecida (M_{AT}), massa de açúcar total consumida (M_{AC}) e massa de açúcar residual (M_{AR})</i>	144
5.2.4.6.3. <i>Coefficientes globais de conversão</i>	134
5.2.5. Modelagem cinética do bioprocesso conduzido em biorreator e estimativa dos parâmetros cinéticos de produção	146
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	148
5.3.1. Determinação da relação entre absorvância (UA) e concentração de colorante ($g_P L^{-1}$)	148
5.3.2. Produção de colorante em frascos agitados	150
5.3.2.1. Cultivos contínuos com alimentação intermitente de meio de cultura suplementar	150
5.3.2.2. Avaliação da influência da composição do meio de alimentação	156
5.3.2.3. Cultivos em batelada alimentada com alimentação intermitente de meio de cultura suplementar	162
5.3.3. Cultivos em batelada alimentada em biorreator	165
5.4. CONCLUSÕES	177
6. CAPÍTULO 6: CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	178
7. CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	181

Capítulo 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. INTRODUÇÃO

A coloração apresenta-se como um importante fator responsável por influenciar na seleção, na aceitabilidade, na escolha e no consumo de diversos materiais (CLYDESDALE, 1993). Sendo mais do que uma simples ferramenta visual, uma contribuição sensorial que, juntamente com a avaliação da textura, tendem a pré-determinar expectativas como sabor, aroma e qualidade de diferentes itens como, por exemplo, os alimentos (CLYDESDALE, 1993; HENRY, 1996; DELWICHE, 2004; MARTINS *et al.*, 2016). Neste sentido, a aplicação de colorantes, sejam eles corantes (*dyes*) ou pigmentos, tem se tornado uma prática corriqueira, com a finalidade de conferir ou realçar cores, empregar identidade aos produtos, atribuir propriedades aos substratos ou simplesmente com propósitos decorativos a fim de estimular o consumo humano (HERBEST; HUNGER, 2004; SCOTTER, 2015).

Dentre os colorantes utilizados, os sintéticos oriundos em sua grande maioria de processos químicos ocupam uma grande parcela do mercado de colorantes, por sua agilidade e facilidade de processamento, estabilidade, poder tintorial e baixo custo de produção (DOWNHAM; COLLINS, 2000). Entretanto, devido ao elevado uso destes colorantes sintéticos e ao fato de serem obtidos via síntese química, os mesmos podem vir a apresentar danosos impactos, conferindo riscos tanto aos seres vivos quanto ao meio ambiente, uma vez que alguns caracterizam-se como não-biodegradáveis e uma grande parcela tende a conferir eventuais efeitos tóxicos, incluindo mutagenicidade e potencial carcinogênico (DOWNHAM; COLLINS, 2000; KUMAR *et al.*, 2015).

Associado a este fato, a crescente demanda e conscientização global sobre o consumo, o emprego e a logística de processos e recursos benéficos à saúde humana e ao meio ambiente, juntamente com os incentivos sócio-econômico-ambientais ofertados por meio de regulamentações governamentais, tem impulsionado o estudo e o desenvolvimento de tecnologias viáveis para a produção de colorantes naturais oriundos de plantas, animais e microrganismos (DUFOSSÉ *et al.*, 2014).

Alguns colorantes naturais como o extrato de urucum, o carmin de cochonilha (CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002; HENRY, 1996), o Arpink red™, o licopeno, o pigmento *Monascus* e o β -caroteno já inseridos no mercado mundial (DUFOSSÉ *et al.*, 2014), vêm sendo utilizados em diversos segmentos industriais desde alimentos a fármacos, bem como em setores de tintas, papéis e tecidos (LAGASHETTI *et al.*, 2019; SEN; BARROW;

DESHMUKH, 2019). Porém, muitas pesquisas ainda se fazem necessárias para que haja uma significativa redução ou completa independência da utilização dos colorantes sintéticos.

É neste contexto que os microrganismos, em especial os fungos filamentosos como *Monascus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Talaromyces*, *Paecilomyces* e *Trichoderma* (OGBONNA, 2016; POORNIAMMAL *et al.*, 2021; RAO; XIAO; LI, 2017; POORNIAMMAL *et al.*, 2021), vêm se destacando como uma promissora alternativa de elevado potencial biotecnológico para obtenção de biocolorantes. Isso se deve visto seu fácil crescimento, sua elevada produtividade e sua capacidade de sintetizar, em pequenas áreas e de forma ininterrupta, sem a existência de problemas sazonais, uma diversidade de compostos naturais coloridos (DUFOSSÉ *et al.*, 2014; FOUILLAUD *et al.*, 2016; SPEARS, 1988), cujos quais podem apresentar propriedades bioativas (DUFOSSÉ *et al.*, 2014; FOUILLAUD *et al.*, 2016; GESSLER; EGOROVA; BELOZERSKAYA, 2013).

Contudo, visto a elevada biodiversidade dos fungos filamentosos e ao aumento da relevância e da demanda por colorantes naturais, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas de modo a caracterizar esses biocolorantes, bem como compreender e melhorar os bioprocessos de produção por fungos filamentosos.

Diante disto, o presente trabalho, buscou avaliar o potencial processo de produção de um biocolorante vermelho sintetizado pelo fungo endofítico *Talaromyces minnesotensis*, por meio do emprego de técnicas de caracterização, análises estatísticas e análises de processo.

1.2. OBJETIVOS

A presente tese teve por objetivo geral caracterizar o biocolorante vermelho sintetizado pelo fungo endofítico *Talaromyces minnesotensis*, bem como avaliar o processo de produção de biocolorante vermelho em frascos agitados e em biorreatores convencionais.

Para alcançar o objetivo geral proposto, cumpriu-se as seguintes etapas, a saber:

- Caracterização da linhagem *Talaromyces minnesotensis*.
- Caracterização do biocolorantes vermelho por meio da realização de testes de fluorescência, toxicidade, estabilidade e aplicabilidade.
- Avaliação de diferentes configurações de impelidores e de condições operacionais sobre a síntese de biocolorante vermelho conduzida em biorreator de bancada tipo tanque agitado de 4 L de volume útil.
- Estudo da variação de escala do bioprocessos em biorreatores tanque agitado e aerado de 10 L de volume útil.

- Avaliação do emprego da batelada alimentada em cultivos submersos conduzidos em frascos agitados e em biorreatores de bancada tipo tanque agitado e aerado de 4 L de volume útil.

De modo a apresentar as etapas desenvolvidas, a presente tese foi estruturada nos seguintes capítulos:

- Capítulo 2 - **“Fundamentação teórica e Estado da arte”**

Nesse capítulo são apresentados os principais fundamentos teóricos empregados no desenvolvimento do trabalho e um panorama geral dos estudos e pesquisas voltados à produção de corante por fungos filamentosos.

- Capítulo 3 - **“*Talaromyces minnesotensis*: um potencial produtor de corante”**

Esse segundo capítulo aborda a caracterização fenotípica do fungo filamentoso *Talaromyces minnesotensis*, sua capacidade de sintetização de um biocomposto colorido e a caracterização do biocolorante em termos de fluorescência, toxicidade, estabilidade e aplicabilidade.

- Capítulo 4 - **“Influência do sistema de impelidores e das condições operacionais na produção de biocolorante vermelho em biorreator convencional”**

Nesse capítulo são analisados os efeitos de diferentes combinações de impelidores e das variáveis de operação frequência de agitação (N) e vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}) na síntese de biocolorante vermelho e o estudo de variação de escala de produção de 4 para 10 L.

- Capítulo 5 - **“Produção de biocolorante vermelho por *Talaromyces minnesotensis* em batelada alimentada”**

Nesse último capítulo é avaliado o emprego do modo de cultivo em batelada alimentada para a melhoria da produção do corante fúngico.

Capítulo 2

**FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA
E ESTADO DA ARTE**

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E ESTADO DA ARTE

2.1. COLORANTES: CORANTES (DYES) E PIGMENTOS

O emprego de compostos capazes de conferir ou realçar cores tem se tornado uma prática corrente, na qual apresenta como finalidade empregar identidade aos produtos, atribuir propriedades aos substratos ou simplesmente para fins decorativos com o propósito de estimular o consumo humano (HERBEST; HUNGER, 2004; SCOTTER, 2015).

Estes compostos tendem a serem designados de diferentes formas sendo os termos colorantes, pigmentos e corantes, os mais comumente utilizados e muitas vezes empregados de forma não criteriosa, visto que a classificação de um colorante tende a se dar mediante a uma avaliação simultânea de suas propriedades, da relação colorante-substrato, bem como das condições do processo de aplicação. Sendo assim, com base em suas solubilidades e suas características físico-químicas de interação com as matrizes a serem tingidas, os colorantes se subdividem em duas classes, os pigmentos e os corantes (*dyes*, em inglês) (CHRISTIE 2001).

Os pigmentos, particulados de 1 a 2 μm (TORRES *et al.*, 2016), caracterizam-se por serem colorantes de baixa solubilidade, onde a pigmentação de diversas matrizes tende a se dar por meio do processo de dispersão mecânica e com a ausência da interação pigmento-substrato, mantendo-se, portanto, como particulados sólidos (BONDIOLI *et al.*, 1998).

Por outro lado, os corantes (*dyes*) cujo o tamanho de suas partículas tendem a serem inferiores a 1 μm (TORRES *et al.*, 2016), definem-se como substâncias coloridas solúveis, os quais no decorrer dos processos de tingimento, via dispersão a nível molecular, tendem a apresentar interações com a matriz onde serão aplicados, acarretando na perda de suas características estruturais e cristalinas (GÜRSES *et al.*, 2016; HAKEIM *et al.*, 2015).

Ainda que as discussões sobre os termos empregados para designar os compostos coloridos sejam frequentes, em geral o termo colorante tende a ser utilizado como uma expressão genérica para descrever os compostos capazes de conferir ou realçar cores. Posteriormente, por meio de avaliações quanto às origens e propriedades destes compostos, tem-se a possibilidade de se classificar esses colorantes de uma forma mais específica, permitindo e contribuindo assim para que seja possível, através do detalhamento fornecido, que se estabeleçam estratégias que resultem em um processo de coloração eficaz e satisfatório.

2.2. COLORANTES NATURAIS

A utilização de colorantes ao longo da história humana data do período Paleolítico, onde colorantes à base de minerais eram empregados na elaboração de pinturas rupestres (CHRISTIE, 2001). Com o decorrer da história, até meados do século XIX, os colorantes empregados eram essencialmente oriundos de fontes naturais tradicionais (vegetais, animais ou minerais). Apenas em 1856, em meio ao contexto da revolução industrial, obteve-se o primeiro colorante sintético denominado mauveína, obtido via síntese química pelo inglês William Henry Perkin (CONSTANT; STRINGHETA; SANDI, 2002).

Com a descoberta da mauveína e o desenvolvimento humano e industrial, o emprego dos colorantes sintéticos se intensificaram e ocupam até hoje uma representativa parcela do mercado global, devido à facilidade de processamento, sua homogeneidade, sua estabilidade, seu poder tintorial e seu baixo custo de produção (GONZÁLEZ, 2012; OGBONNA, 2016). Entretanto, devido ao uso excessivo e indiscriminado destes colorantes e ao fato de serem obtidos por rota química, os mesmos podem vir a ser de difícil tratamento do ponto de vista ambiental (RAO *et al.*, 2017) e podem apresentar possíveis efeitos tóxicos, incluindo mutagenicidade e potencial carcinogênico, conferindo riscos tanto aos seres vivos quanto ao meio ambiente (ABDEL GHANY, 2015; BASANT; SHAHNAZ, 2016; KUMAR *et al.*, 2015).

Associado a este fato, a crescente demanda e conscientização global sobre o emprego, o consumo e a logística de processos e recursos benéficos à saúde humana e ao meio ambiente, juntamente com os incentivos sócio-econômico-ambientais ofertados por meio de regulamentações governamentais, vêm impulsionando o estudo e o desenvolvimento de tecnologias viáveis para a produção de colorantes naturais oriundos de plantas (folhas, flores e fruto), animais (insetos e moluscos), minerais e, principalmente, de microrganismos (levedura, fungos, bactérias e microalgas) (DUFOSSE *et al.*, 2014). É neste cenário que a produção e o emprego dos colorantes naturais derivados de fontes agrícolas, biológicas ou minerais, vêm se destacando frente aos colorantes sintéticos, em virtude de apresentarem baixa ou nula toxicidade (MERUVU; DOS SANTOS, 2021) e, principalmente, devido ao fato de alguns colorantes naturais apresentarem propriedades bioativas (MAPARI *et al.*, 2009).

Alguns colorantes naturais como o extrato de urucum, o carmin de cochonilha (HENRY, 1996; CONSTANT, STRINGHETA; SANDI, 2002), o Arpink red™, o licopeno, o pigmento Monascus e o β -caroteno já inseridos no mercado mundial (DUFOSSE *et al.*, 2014), vêm sendo utilizados em diversos segmentos industriais desde alimentos à fármacos, bem como, em setores de tintas, papéis e tecidos (LAGASHETTI *et al.*, 2019; SEN, BARROW; DESHMUKH, 2019).

Entretanto, embora os colorantes naturais venham ganhando cada vez mais espaço, algumas barreiras apresentadas principalmente pelas fontes vegetais precisam ser superadas, como por exemplo, problemas relacionados à estabilidade e solubilidade de alguns colorantes, bem como a falta de padronização do perfil químico e, em termos de processo, a dependência de fatores climáticos, de amplos espaços físicos e eventuais problemas de escassez (GUNASEKARAN; MAPARI *et al.*, 2009, 2005; POORNIAMMAL, 2008).

Portanto, pesquisas ainda se fazem necessárias de modo a superar as limitações existentes e para que haja uma significativa redução ou completa independência da utilização dos colorantes sintéticos.

2.3. FUNGOS FILAMENTOSOS

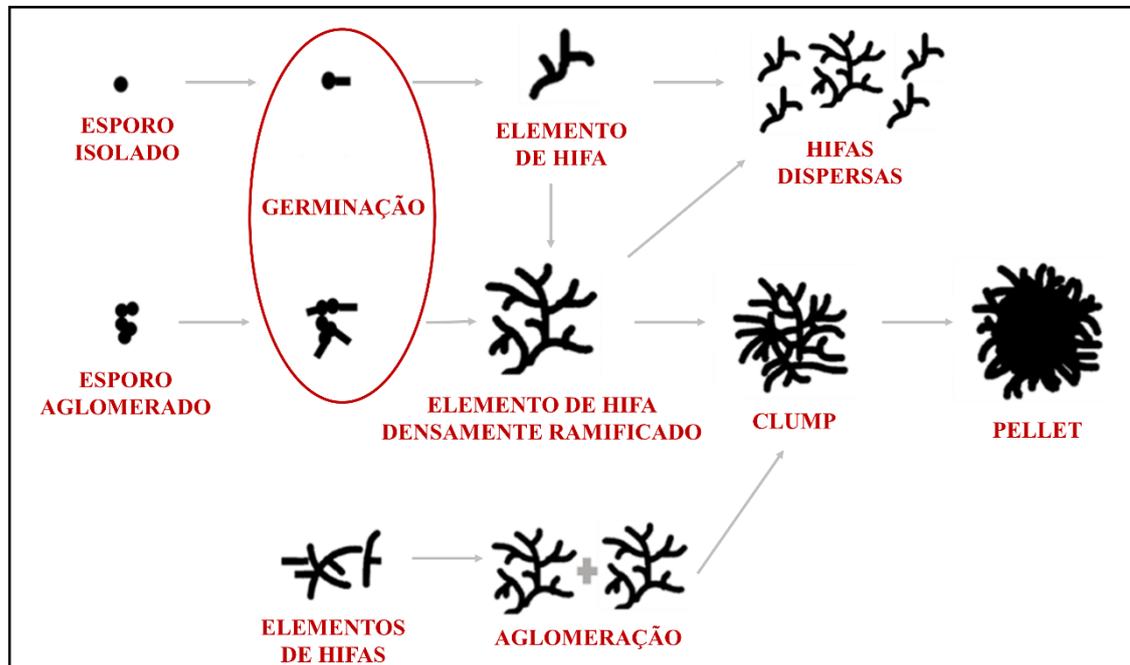
Como forma de atender as necessidades do mercado global de colorantes, visando o desenvolvimento de processos sustentáveis e a manutenção e/ou amplificação das cartelas de cores, das qualidades e da eficiência dos colorantes já existentes no mercado, os microrganismos, em especial os fungos filamentosos, vêm se destacando como uma fonte promissora para obtenção de colorantes naturais. Além de serem de rápido e fácil crescimento, de origem renovável e inesgotável, de apresentarem elevada produtividade, não necessitar grandes áreas e serem independentes de fatores climáticos, características apresentadas pela maioria das fontes microbianas (BICAS; DA SILVA, 2013; JOSHI *et al.*, 2003; MAPARI *et al.*, 2005; VENIL, *et al.* 2020), os fungos filamentosos, em especial, possuem a característica de sintetizar compostos de colorações e classes químicas variadas (DUFOSSÉ *et al.*, 2014), cuja estabilidade a diferentes luminosidades, pHs e temperaturas tende a ser maior quando comparada aos demais colorantes naturais, além do fato destes compostos poderem vir a apresentar propriedades bioativas (MAPARI *et al.*, 2005; RAO *et al.*, 2017).

2.3.1. Características morfológicas dos fungos filamentosos

Os fungos filamentosos, caracterizam-se por serem microrganismos heterotróficos eucarióticos, de reprodução sexuada, mediante a fusão de 2 núcleos haploides compatíveis ou assexuada, por meio de esporos (conídios) (POWERS-FLETCHER *et al.*, 2016; SERRANO-CARREÓN *et al.*, 2015). Em termos estruturais micromorfológicos (nível microscópico), os fungos filamentosos são constituídos de filamentos ramificados vegetativos (hifas), rígidos, espessos e com a existência ou não de septos, compartimentos celulares delimitados por paredes transversais internas constituídas por um poro que permite o fluxo de organelas celulares entre os septos (QUINTANILLA *et al.*, 2015).

A hifa origina-se do crescimento apical de um tubo germinativo, oriundo do processo de germinação de um único esporo onde, no decorrer de seu desenvolvimento, após excederem um determinado comprimento, tem-se a formação de novas ramificações (pontas) (NIELSEN, 1996). O crescimento contínuo de hifas na extensão apical tende a resultar em uma rede complexa e multicelular denominada micélio, com hifas constituintes de diferentes períodos e estados fisiológicos (POWERS-FLETCHER *et al.*, 2016; SERRANO-CARREÓN *et al.*, 2015). O agrupamento ou não de esporos, bem como a forma como as hifas tendem a se aglomerar, principalmente em cultivos submersos, permitem uma classificação macromorfológica dos fungos filamentosos em duas principais formas de morfologias, "pelletizada" e dispersa (NIELSEN, 1996). A morfologia "pelletizada" caracteriza-se pela formação de aglomerados esféricos estáveis de hifas ramificadas denominados *pellets*, enquanto a morfologia dispersa caracteriza-se pela existência de agregados miceliais (*clumps*) ou, simplesmente, pelo arranjo livre e disperso das hifas no meio de cultivo. A Figura 2.1 ilustra as formas de morfologia dos microrganismos filamentosos, bem como os diferentes mecanismos de formação.

Figura 2.1- Esquema dos mecanismos de formação das formas macromorfológicas de microrganismos filamentosos.



Fonte: Adaptado de Nielsen (1996) e Buffo (2020).

Um mesmo fungo filamentoso, devido ao complexo ciclo de vida morfológico, a depender de fatores como linhagem, inóculo e condições de processo, pode vir a assumir tanto a forma "pelletizada" quanto dispersa (NIELSEN, 1996; PAPAGIANNI, 2004). Além disso, a morfologia assumida pode influenciar direta ou indiretamente nos fenômenos de transferência

(quantidade movimento, calor e massa) existentes no decorrer do bioprocesso, bem como na síntese de metabólitos (KRULL *et al.*, 2013; SERRANO-CARREÓN *et al.*, 2015).

2.3.2. Metabólitos primários e secundários

A síntese de metabólitos, sejam eles primários ou secundários, como é o caso dos colorantes, é influenciada por diversos fatores, dentre os quais o conhecimento da via metabólica é uma alternativa para se estabelecer estratégias de melhorias para o bioprocessos.

No entanto, o efetivo conhecimento da rota metabólica de produção de metabólitos naturais por fungos filamentosos, principalmente colorantes, ainda hoje se apresenta como um obstáculo a ser superado, visto sua elevada complexidade e especificidade (CALVO *et al.*, 2002; MAPARI *et al.*, 2009).

Os metabólitos primários, como aminoácidos, nucleotídeos, proteínas, ácidos nucléicos, lipídeos, carboidratos, entre outros, são definidos como os metabólitos sintetizados no decorrer da fase de crescimento e, portanto, se apresentam como essenciais ao crescimento e a manutenção celular (DEMAIN, 1986).

Os metabólitos secundários ou também denominados metabólitos especializados (FOUILLAUD; DUFOSSÉ 2022), como antibióticos, enzimas, ácidos orgânicos e colorantes, caracterizam-se por serem moléculas complexas e de elevada diversidade química estrutural. Esses tendem a serem gerados no decorrer da fase estacionária, seja por via de produção ou pelo mecanismo de conversão de um metabólito primário ou componente existente no meio, onde somente após a existência de uma quantidade mínima de células e do acúmulo desses precursores se dá a conversão em metabólito secundário, muito possivelmente devido a desrepressão de genes responsáveis pela produção e/ou conversão dos metabólitos secundários (DEMAIN, 1986).

Alguns gêneros de fungos filamentosos como *Monascus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Talaromyces* e *Paecilomyces* (OGBONNA, 2016; RAO; XIAO; LI, 2017) tem se mostrados como potenciais produtores de metabólitos secundários dos mais variados tipos, incluindo os colorantes naturais. Estes gêneros, além de poderem ser obtidos nos mais diversos ecossistemas (KALRA; CONLAN; GOEL, 2020), apresentam a capacidade de sintetizarem colorantes de diversas classes como carotenoides, melaninas, policetídeos, azafilonas, entre outros (MERUVU; DOS SANTOS, 2021).

O estudo de fungos filamentosos como fontes de colorantes aplicáveis especialmente ao setor alimentício data de antes de 1884, quando o botânico francês Tieghem caracterizou o

fungo *Monascus* (OGBONNA, 2016; VAN TIEGHEM, 1884). Desde então, inúmeras pesquisas para obtenção de colorantes naturais via cultivo de fungos filamentosos vêm sendo desenvolvidas uma vez que a biodiversidade genética e bioquímica das espécies fúngicas é muito ampla, o que favorece e ainda requer muitos estudos de modo a melhorar os bioprocessos já existentes ou até mesmo obter novas linhagens e/ou biocompostos, incluindo os colorantes.

2.3.3. *Talaromyces minnesotensis*

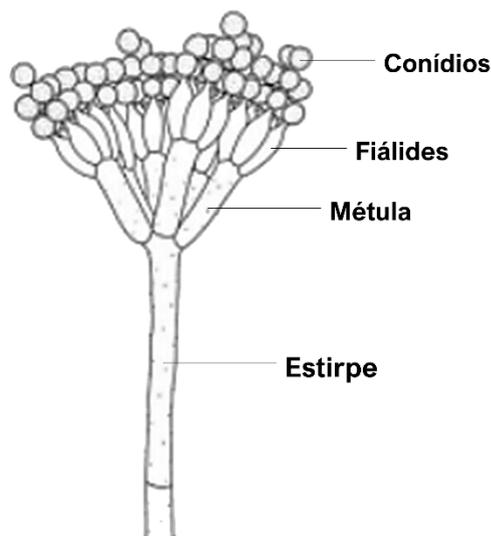
Em meio a grande biodiversidade fúngica capaz de produzir colorantes, os estudos com fungos do gênero *Talaromyces* têm se intensificado nos últimos anos, principalmente pelo fato dos colorantes sintetizados por esse gênero tenderem a apresentar uma ampla gama de propriedades biológicas (MORALES-OYERVIDES *et al.*, 2020a).

Além disso, os fungos do gênero *Talaromyces*, os quais até meados de 2010 um grande número eram caracterizados como espécies do gênero *Penicillium* (FRISVAD 2015; TSANG *et al.*, 2018), caracterizam-se, assim como os fungos filamentosos do gênero *Penicillium*, por se reproduzirem por esporulação, apresentarem um rápido crescimento celular e uma alta tolerância a variações de propriedades físico-químicas do meio, o que lhe conferem a capacidade de crescerem em diferentes ambientes que lhe proporcionem desde o mínimo de sais minerais até as mais complexas fontes de carbono (PEBERDY, 1987).

Dentre as espécies de *Talaromyces* produtoras de colorantes encontra-se a espécie *Talaromyces minnesotensis*, a qual foi isolada de uma secreção do ouvido humano em 2010, mas foi identificada e reportada pela primeira vez apenas em 2017 por Guevara-Suarez *et al.* (2017).

De modo geral, o fungo filamentoso *T. minnesotensis* caracteriza-se por ser um biverticiliado, no qual seus conidióforos apresentam em sua região apical as denominadas fiálides (Figura 2.2) e tem suas hifas constituídas por septos (GUEVARA-SUAREZ *et al.*, 2017).

Figura 2.2- Estrutura padrão de conidióforo para fungos filamentosos biverticiliado.



Fonte: Adaptado de Visagie *et al.* (2014).

Além disso, embora a espécie *T. minnesotensis* se apresente filogeneticamente muito semelhante às espécies *Talaromyces minioluteus* e *Talaromyces udagawae*, a mesma distingue-se no fato de produzir ácidos em meio creatina sucrose ágar (CREA), diferentemente da linhagem *Talaromyces minioluteus* e não produzir ascomata, característica da espécie *Talaromyces udagawae* (GUEVARA-SUAREZ *et al.* 2017).

Devido à recente identificação da espécie *T. minnesotensis*, os estudos relacionados à produção e às eventuais propriedades bioativas apresentadas por seus colorantes ainda são escassos. Entretanto, trabalhos como de Sousa (2018) demonstram e instigam a continuidade e o desenvolvimento de novos estudos com esta linhagem, visto seu potencial de síntese de biocolorantes.

2.4. PRODUÇÃO DE BIOCOLORANTES

Diante do desenvolvimento global e das exigências socioambientais, diversas pesquisas começaram a ser desenvolvidas sobre a potencialidade de produção, aplicação e comercialização dos colorantes fúngicos, os quais sua produção era empregada inicialmente apenas como ferramenta taxonômica para identificação e diferenciação de espécies (MAPARI *et al.*, 2005; PITT *et al.*, 1979).

Com o decorrer do tempo, mediante um maior conhecimento do potencial dos colorantes fúngicos e a continuidade das pesquisas, pôde-se constatar que a síntese de colorantes por fungos filamentosos tende a ser influenciada não apenas por fatores biológicos, mas também por fatores de processo como os físico-químicos, os nutricionais e os operacionais, onde a

dependem das condições de operação observa-se para uma mesma espécie diferentes comportamentos ao longo do mesmo bioprocessamento (JOSHI *et al.*, 2003; MIYAKE *et al.*, 2008).

Dentre a vasta diversidade bioquímica de fungos filamentosos, a avaliação do potencial de uma espécie fúngica como fonte de biocolorantes baseada em fatores biológicos, tende a ser facilitada mediante o emprego de ferramentas quimiotaxonômicas. Estas definem-se por serem programas computacionais de rastreamento de elevado desempenho, que a partir do fornecimento de informações como o nicho ecológico, o perfil e a diversidade metabólica de uma espécie, permitem de forma rápida, segura e eficiente uma análise prévia quanto ao potencial biotecnológico da linhagem como produtora de biocolorantes (FRISVAD; ANDERSEN; THRANE, 2008; MAPARI *et al.*, 2005; MAPARI; MEYER; THRANE, 2009; NIELSEN; SMEDSGAARD, 2003).

Somado a isso, dentre os fatores de processo capazes de influenciar a síntese de colorantes por uma dada espécie fúngica, destacam-se:

- **Composição do meio de cultivo**

Os fungos filamentosos são capazes de metabolizar diferentes tipos de fontes nutricionais, desde as mais simples até as mais complexas (PEBERDY, 1987), estando sua eficiência de metabolização vinculada aos fatores biológicos e operacionais.

Dentre as principais fontes nutrientes utilizadas em cultivos de fungos filamentosos, especificamente no bioprocessamento de síntese de colorantes, destacam-se as fontes de carbono e de nitrogênio. As fontes de carbono são consideradas as principais fontes de obtenção de energia para o crescimento e produção de metabólitos por fungos filamentosos (KRAIRAK *et al.*, 2000; REYNDERS; RAWLINGS; HARRISON, 1996). As fontes de nitrogênio caracterizam-se por direta ou indiretamente, induzirem a expressão e controle de genes que ativam as vias metabólicas relacionadas com a produção de biocolorantes (CHATTERJEE *et al.*, 2009).

Dentre as fontes de carbono e nitrogênio comumente estudadas na biossíntese de colorantes por fungos filamentosos encontram-se, no caso das fontes de carbono, a glicose, a frutose, a sacarose, o amido, entre outros (GMOSER *et al.*, 2017; MORALES-OYERVIDES *et al.*, 2020b). Quanto às fontes de nitrogênio, tem-se tanto as fontes inorgânicas como o glutamato monossódico (MSG), o sulfato de amônio e o nitrato de amônio, quanto as fontes orgânicas como peptonas, extrato de levedura e extrato de carne (MORALES-OYERVIDES *et al.*, 2020b, OGBONNA *et al.*, 2016). Além disso, recentes estudos vêm sendo desenvolvidos visando avaliar o emprego de resíduos alimentícios e agro industriais como fontes de nutrientes no processo de síntese dos colorantes fúngicos, o que tende a tornar o bioprocessamento de produção de

colorantes por fungos filamentosos ainda mais atraente do ponto de vista sócio-econômico-ambiental (CHATRAGADDA; DUFOSSÉ 2021; GMOSER *et al.*, 2017; SILBIR; GOKSUNGUR, 2019).

Diante da diversidade das fontes de nutrientes e das possíveis influências ocasionadas pelos tipos, concentrações, assim como pela relação carbono: nitrogênio (C:N) (WONG; LIN; KOEHLER, 1981), tem-se que uma mesma espécie, sob as mesmas condições operacionais, pode apresentar diferentes desempenhos quando cultivados em diferentes meios, a depender da finalidade do bioprocessamento. Portanto, tem-se que a avaliação quanto a fonte nutriente ótima para um determinado bioprocessamento tende a ser mais eficiente mediante a análise e combinação simultânea de três fatores, sendo eles a espécie fúngica, as demais condições de processo e, principalmente, o objetivo do bioprocessamento em execução.

- **pH e Temperatura**

Assim como as fontes nutricionais, o pH e a temperatura apresentam-se como importantes fatores na síntese de biocolorantes, sendo seus efeitos variáveis de espécie para espécie, bem como entre as etapas de crescimento celular e de produção de metabólitos dentro de um mesmo bioprocessamento.

Embora os efeitos do pH e da temperatura possam vir a variar entre espécies e a depender do bioprocessamento, no geral, as condições ótimas de pH e temperatura para a produção de colorantes por diversas espécies de fungos filamentosos variam entre 2,5 a 9,0 em termos de pH e de 15 a 32°C em relação à temperatura (MORALES-OYERVIDES *et al.*, 2020a; OGBONNA, 2016).

Embora o metabolismo de síntese de colorantes por fungos filamentosos ainda seja de difícil compreensão devido à complexidade deste bioprocessamento (MORALES-OYERVIDES *et al.*, 2020a) sabe-se, mediante hipóteses e análises empíricas, que a produtividade e eficiência da síntese de colorantes fúngicos tende a ser influenciada pela combinação das influências do pH e da temperatura, uma vez que essas variáveis tendem a interferir nos mecanismos de controle genético e metabólico (MÉNDEZ *et al.*, 2011), o que mostra a relevância dessas variáveis na busca da melhoria e ampliação de escala do bioprocessamento de produção de colorantes por fungos filamentosos.

- **Tipos de cultivo**

A síntese de colorantes por fungos filamentosos pode ser conduzida, basicamente, por meio de dois tipos de cultivo, em estado sólido e submerso.

Os cultivos em estado sólido, por definição, caracterizam-se por serem cultivos no qual o bioprocessamento tende a ocorrer sobre ou dentro de matrizes sólidas (substratos ou materiais inertes) capazes de conter ou absorver água, sem que exista água drenada (MORAES *et al.*, 2021). A produção de corante neste tipo de cultivo tende a ser reportada em termos de absorvância máxima por massa de substrato (MORALES-OYERVIDES *et al.*, 2020a).

Por outro lado, os cultivos submersos definem-se como cultivos conduzidos em meios líquidos, nos quais a quantificação de corante produzido é expressa em termos de densidade óptica no comprimento de onda de absorção máxima (amarelo: 400-450 nm, laranja: 450-490 nm e vermelho: 490-520 nm) ou, em alguns casos, até mesmo em massa de corante por unidade de volume de caldo de cultivo (MORALES-OYERVIDES *et al.*, 2020a).

De modo geral, além das fontes nutrientes e das condições de pH e temperatura, fatores estes de expressiva influência em ambos modos de cultivo, alguns aspectos específicos de cada tipo de cultivo devem ser também avaliados, visando a eficiência do bioprocessamento de obtenção de corantes fúngicos. No caso dos cultivos em estado sólido, fatores como a umidade, a densidade de empacotamento e a porosidade do leito, a densidade e o tamanho das partículas, a aeração e o tipo de biorreator devem ser levados em consideração. Nos cultivos submersos incluem-se como fatores de influência do bioprocessamento de obtenção de corantes, as condições de agitação e/ou aeração e o tipo de biorreator (AMAN MOHAMMADI *et al.*, 2022; MORALES-OYERVIDES *et al.*, 2020a).

Ainda que o tipo de cultivo mais adequado a ser empregado seja alvo de diversas discussões e de muitas pesquisas, uma vez que seus eventuais efeitos sobre o bioprocessamento podem estar vinculados à espécie fúngica, de modo geral, o estudo e o desenvolvimento do processo de produção de corantes por fungos filamentosos tende a ser realizado através de cultivos submersos (MERUVU; DOS SANTOS, 2021; MORALES-OYERVIDES *et al.*, 2020a). Isto se deve à perspectiva e maior facilidade de ampliação de escala dos cultivos submersos, visando uma futura inserção destes biocompostos no mercado global (MORAES *et al.*, 2021), bem como, à existência de diversos recursos tecnológicos (VENKATACHALAM *et al.*, 2020), que permitem um rígido controle e monitoramento das condições do processo em cultivos submersos, frente as limitações tecnológicas apresentadas em cultivos conduzidos em estado sólido.

- **Agitação e aeração**

Com base em estudos relacionados com produção de biocorantes em cultivos submersos, as condições de agitação e aeração apresentam-se como relevantes de modo a serem

avaliadas quando se objetiva o aumento da eficiência e da produtividade do bioprocessamento, devido à sua influência sobre os fenômenos hidrodinâmicos e de transferência de quantidade de movimento, calor e massa, bem como seus eventuais efeitos sobre a morfologia dos fungos filamentosos que pode ou não estar vinculada à síntese de colorantes, a depender da espécie (AFSHARI *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2002; OGBONNA 2016).

Embora, a grande maioria dos estudos voltados à produção de colorantes em cultivos submersos sejam inicialmente desenvolvidos em frascos agitados, onde a faixa de agitação estudada tende a variar de 100 a 300 rpm, alguns trabalhos relatam estudos mais avançados em biorreatores de bancada, onde no geral, a faixa de frequência de rotação do agitador varia entre 100 e 1000 rpm e a de vazão específica de aeração entre 0,01 e 4 vvm (MERUVU; DOS SANTOS, 2021; MORALES-OYERVIDES *et al.*, 2020a; OGBONNA 2016).

Ressalta-se que embora estas duas variáveis se apresentem como de relevância ao bioprocessamento de síntese de colorantes fúngicos, sua existência e seus efeitos encontram-se diretamente atrelados ao tipo de biorreator empregado no processo.

Define-se por biorreator todo equipamento que permita o controle adequado das condições operacionais, gerando um ambiente propício ao crescimento celular e à conversão de matérias-primas em bioprodutos empregando-se enzimas, microrganismos, células animais ou vegetais (TONSO; BADINO; SCHMIDELL, 2021).

No contexto do bioprocessamento de síntese de colorantes por fungos filamentosos, embora a diversidade de biorreatores seja extensa, tem-se como modelos mais comumente empregados nos estudos e desenvolvimento do bioprocessamento, independentemente da escala, os biorreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado e, com menor frequência, os biorreatores não convencionais pneumáticos tipo coluna de bolhas ou tipo *airlift* (MERUVU; DOS SANTOS, 2021; TORRES *et al.*, 2016).

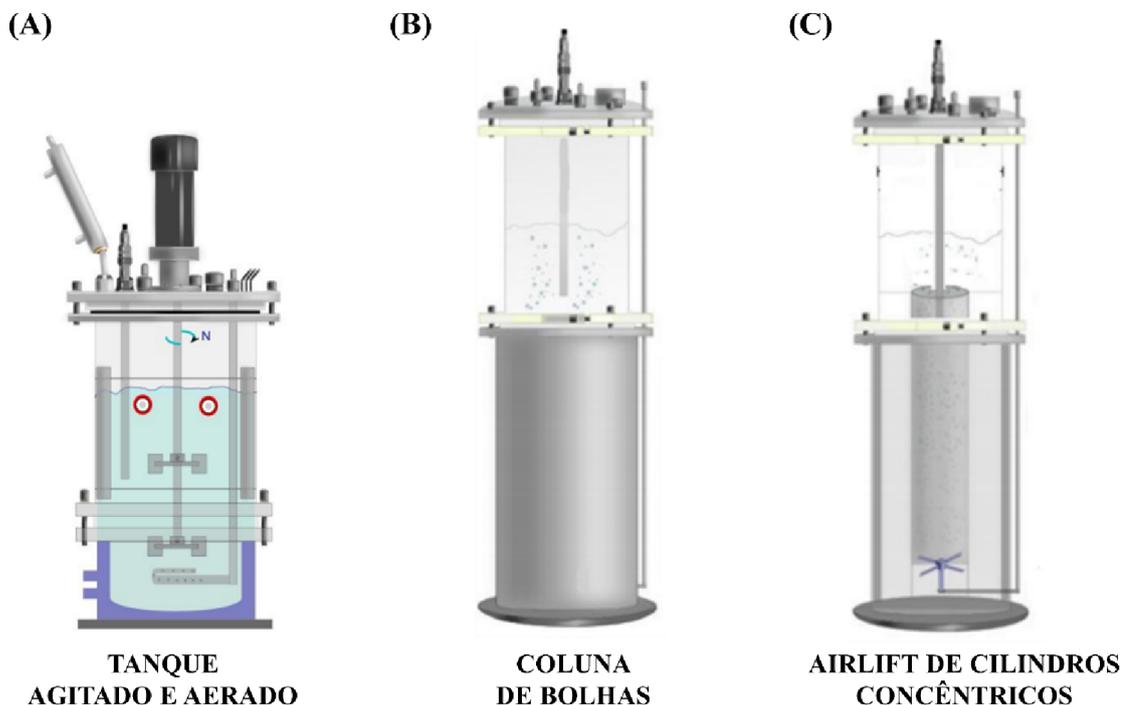
O biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado, conforme ilustrado pela Figura 2.3A, consiste basicamente em um tanque cilíndrico de relações geométricas definidas e um sistema de agitação e aeração, constituído de impelidores acoplados a um eixo central rotacionado por meio de um motor e um aspersor localizado na base do tanque. Diante de sua configuração, os parâmetros possíveis de serem alterados são a frequência de rotação do agitador (N), a vazão volumétrica de alimentação de gás ($Q_{\text{gás}}$), a geometria e a posição dos impelidores e a presença ou ausência de chicanas (TONSO; BADINO; SCHMIDELL, 2021).

Os biorreatores pneumáticos, caracterizados por serem de fácil projeção e construção, configuram-se como biorreatores onde a homogeneização e circulação do sistema reacional são

realizadas exclusivamente pela injeção de gás (CERRI, 2009; CHISTI, 1989). De forma geral, os biorreatores pneumáticos podem ser divididos em duas classes de modelos, o modelo coluna de bolhas e o modelo de circulação (*airlift*), os quais se diferenciam pela presença ou não de artefatos no interior do biorreator que influenciam no tipo de escoamento da fase líquida. No caso do modelo coluna de bolhas (Figura 2.3B), a fase líquida tende a apresentar um escoamento aleatório devido à ausência de artefatos no interior do sistema. Nos modelos de circulação (*airlift*) (Figura 2.3C), a fase líquida exibe um escoamento cíclico, devido à conformação geométrica desses modelos. Diante destas características, os principais parâmetros possíveis de modificação são a vazão volumétrica de alimentação de gás ($Q_{\text{gás}}$), a geometria interna do biorreator e a geometria e tamanho dos orifícios do aspensor (ESPERANÇA, 2018).

A Figura 2.3 ilustra os tipos de biorreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado e não-convencionais pneumáticos.

Figura 2.3- Modelos de biorreatores: (A) convencional tipo tanque agitado e aerado, (B) coluna de bolhas e (C) airlift de cilindros concêntricos.



Fonte: Adaptado de Mendes (2016).

O controle das condições operacionais somado a uma avaliação crítica baseada em aspectos mecânicos, operacionais e hidrodinâmicos, do tipo de biorreator a ser empregado no processo de síntese de biocolorantes por fungos filamentosos, afetam a eficiência do

bioprocesso como um todo. No entanto, estes fatores quando vinculados a estratégias de cultivo, podem vir a ter seus efeitos sobre o bioprocesso potencializados.

- **Estratégias de cultivo**

Cultivos de fungos filamentosos visando a síntese de colorantes são conduzidos, em sua grande maioria, na forma descontínua, no qual a adição dos nutrientes se dá apenas no início do bioprocesso, previamente à inoculação de células no reator (SHULER; KARGI, 1992).

No entanto, diante do fato de os biocolorantes se apresentarem como metabólitos secundários, algumas estratégias de cultivo já empregadas na produção de outros metabólitos secundários, como a realização de cultivos a baixa temperatura ou a condução de cultivos em batelada alimentada, apresentam-se como alternativas promissoras para a melhoria da produção de colorantes, visto que estas estratégias interferem no metabolismo das células durante o bioprocessos.

De forma geral, a condução de cultivos a baixa temperatura pode ser favorável à obtenção de elevados rendimentos na síntese de metabólitos secundários, pois a partir do controle da temperatura pode-se interferir na cinética do bioprocessos, de modo que os efeitos de inibição ou repressão sejam minimizados pela diminuição da velocidade de assimilação de nutrientes pelas células, o que tende a aumentar produção (COSTA; BADINO, 2012; FARRELL; ROSE, 1967).

Outra estratégia similar de interferência na assimilação de nutrientes pelos microrganismos e com potencial aplicação na produção de biocolorantes é a condução de cultivos em batelada alimentada.

O cultivo em batelada alimentada, estratégia já consolidada no processo de produção de antibióticos, é caracterizado pela alimentação de nutrientes ao longo do bioprocessos, de modo que a oferta de nutrientes se dê de forma controlada (SHULER; KARGI, 1992).

Logo, diante da biodiversidade fúngica e da complexidade e especificidade do bioprocessos de colorante por fungos filamentosos como um todo, o estudo das variáveis de processo apresentam-se relevantes para o conhecimento, a melhoria do bioprocessos e a facilidade de seu escalonamento visando a produção industrial.

2.5. BIORREATOR, VARIÁVEIS DE PROCESSO E VARIAÇÃO DE ESCALA

Embora o desenvolvimento de diversos modelos de biorreatores específicos aos mais variados tipos de bioprocessos seja algo frequente e em constante avanço, ainda hoje o biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado se apresenta como o mais versátil e amplamente

empregado nas mais variadas escalas de produção, desde a escala de bancada até a industrial (BADINO; SCHMIDELL, 2021b). Sua ampla utilização provém dos vastos estudos já desenvolvidos quanto a geometria do biorreator e as cinéticas de crescimento celular e de produção neste sistema, conhecimentos estes que levaram à consolidação de um sistema simples, quando comparado aos demais modelos de biorreatores.

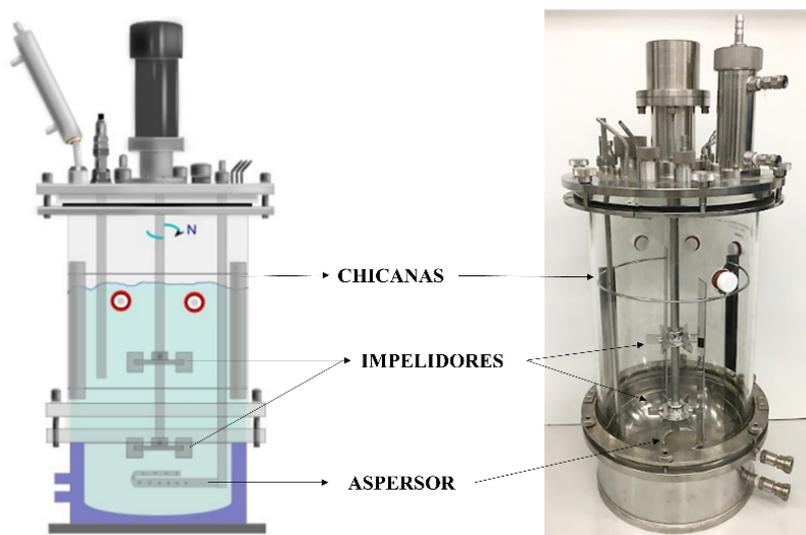
A simplicidade do biorreator convencional permite o monitoramento e o controle de variáveis operacionais como pH, temperatura, concentração de nutrientes e das condições de agitação e aeração favorecendo fenômenos de transferência e a capacidade de homogeneização do sistema, adequando-se aos mais variados bioprocessos.

2.5.1. Geometria do biorreator convencional tanque agitado

O biorreator convencional tanque agitado consiste em um tanque cilíndrico com relações geométricas definidas, no qual a agitação e a mistura do meio reacional ocorrem por meio de um motor ligado a um eixo central provido de impelidores. De modo a evitar a formação de vórtices e zonas estagnadas, bem como de promover melhores condições de homogeneização e de transferências de quantidade de movimento, calor e massa, são comumente adicionadas hastes defletoras ou chicanas na parede interna do biorreator (TONSO; BADINO; SCHMIDELL, 2021). Além disso, de forma a garantir o fornecimento de gás ao bioprocessos, quando necessário, o biorreator tanque agitado e, neste contexto, aerado tende a apresentar em sua estrutura um aspersor localizado na base do tanque cilíndrico.

A Figura 2.4 ilustra o esquema de um biorreator tanque agitado e aerado.

Figura 2.4- Biorreator tanque agitado e aerado.



Fonte: Adaptado de Mendes (2016).

De forma a analisar o desempenho do bioprocesso sob determinadas condições de agitação e aeração, avalia-se diversos parâmetros como a tensão de oxigênio dissolvido (T_{OD}), a demanda de oxigênio devido à respiração celular ($Q_{O_2C_X}$), o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La), a taxa de dissipação de energia cinética (ϵ), a velocidade média de cisalhamento ($\dot{\gamma}_m$), a viscosidade aparente (μ_{ap}) e a microescala de turbulência de Kolmogorov (λ_K). Esses parâmetros tendem a demonstrar como os fenômenos relacionados à hidrodinâmica e à transferência de oxigênio podem influenciar o desempenho do bioprocessos.

2.5.2. Demanda e transferência de oxigênio em bioprocessos

Sendo a solubilidade do oxigênio baixa frente a outros nutrientes que compõem o meio de cultivo e devido ao fato do oxigênio ser um substrato essencial para o crescimento e a manutenção celular, bem como para o desenvolvimento de diversas rotas metabólicas, a transferência de oxigênio tende a ser um fator de expressiva importância nos bioprocessos aeróbios.

Diante da dificuldade de atender à demanda do bioprocessos, o emprego de sistemas de agitação e aeração se faz necessário, pois além do fornecimento de oxigênio, esses sistemas contribuem para que a transferência de oxigênio se dê de forma satisfatória (BADINO; SCHMIDELL, 2021a).

Dentre os parâmetros que auxiliam na descrição deste fenômeno no decorrer do bioprocessos e permitem uma avaliação do desempenho do bioprocessos, destacam-se a tensão de oxigênio dissolvido (T_{OD}), o consumo de oxigênio devido à respiração celular ($Q_{O_2C_X}$) e o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La).

A tensão de oxigênio dissolvido (T_{OD}), medida por um sistema composto por um sensor acoplado um analisador de oxigênio dissolvido, é a porcentagem de oxigênio dissolvido no caldo de cultivo no estado estacionário em relação à concentração de saturação de oxigênio dissolvido no meio de cultura em equilíbrio com o ar antes do início do cultivo (C_0^*). Ao longo do bioprocessos, o sensor afere a concentração de oxigênio dissolvido (C), fornecendo a porcentagem de oxigênio dissolvido no caldo de cultivo em relação à concentração de saturação (T_{OD}) (Equação 2.1).

$$T_{OD} = \frac{C}{C_0^*} \cdot 100 \quad (2.1)$$

onde:

T_{OD} : tensão de oxigênio dissolvido (%).

C : concentração de oxigênio dissolvido no caldo de cultivo ($\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1}$).

C_0^* : concentração de saturação de oxigênio dissolvido no meio de cultura em equilíbrio com o ar antes do início do cultivo ($\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1}$).

Quanto aos parâmetros de consumo de oxigênio pela respiração celular ($Q_{O_2}C_X$) e o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}), tem-se que dentre os diversos métodos de determinação de $Q_{O_2}C_X$ e de k_{LA} na presença de células, o método do balanço gasosos baseado nas vazões e nos teores de oxigênio (O_2) e gás carbônico (CO_2) nos gases de entrada e saída do biorreator, tende a ser uma metodologia vantajosa, principalmente quando já se tem uma expressiva concentração celular, visto sua efetiva e integral quantificação dos componentes gasosos que compõem o bioprocessos, além do fato de ser uma metodologia que não requer interferências na operação do biorreator em termos de alterações da vazão volumétrica de alimentação de ar (Q_{ar}) ou da frequência de rotação (N) (BADINO; SCHMIDELL, 2021a).

A demanda de oxigênio ($Q_{O_2}C_X$), produto entre a velocidade específica de respiração (Q_{O_2} em $\text{gO}_2 \text{ gX}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e a concentração de células (C_x em gX L^{-1}), pode ser estimada mediante a aplicação do balanço molar de oxigênio (O_2) na fase gasosa, segundo a Equação 2.2 (BADINO; FACCIOTTI; SCHMIDELL, 2001).

$$Q_{O_2}X = \frac{\dot{n}_{entrada} y_{O_2}^{entrada} - \dot{n}_{saída} y_{O_2}^{saída}}{V} \quad (2.2)$$

onde:

$Q_{O_2}X$: velocidade global de consumo de oxigênio ($\text{molO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

$\dot{n}_{entrada}$: vazão molar de gás na entrada do biorreator ($\text{mol}_{ar} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

$y_{O_2}^{entrada}$: fração molar de oxigênio no gás de entrada ($\text{molO}_2 \text{ mol}_{ar}^{-1}$).

$\dot{n}_{saída}$: vazão molar de gás na saída do biorreator ($\text{mol}_{ar} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

$y_{O_2}^{saída}$: fração molar de oxigênio no gás de saída ($\text{molO}_2 \text{ mol}_{ar}^{-1}$).

V : volume de líquido no tanque (L).

O coeficiente volumétrico de transferência de O_2 (k_{LA}), parâmetro que expressa a grandeza da transferência de oxigênio da fase gasosa para fase líquida, é o produto entre coeficiente convectivo de transferência de massa do filme líquido (k_L) e a área interfacial de transferência de oxigênio (a). O k_L é favorecido pela diminuição da película estagnada da fase

líquida e afetado pelas condições de agitação e aeração empregadas. A área interfacial de transferência de oxigênio (a) favorece a transferência de oxigênio do gás para o líquido mediante o emprego de bolhas de pequeno diâmetro e o aumento da retenção gasosa (BADINO; SCHMIDELL, 2021a).

Diante da dificuldade em se quantificar separadamente as contribuições individuais do coeficiente convectivo de transferência de massa do filme líquido (k_L) e da área interfacial de transferência de oxigênio (a), emprega-se a medida do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}), que pode ser determinado em bioprocessos a partir do balanço de massa de oxigênio na fase líquida supondo estado quase estacionário, de acordo com a Equação 2.3 (BADINO; SCHMIDELL, 2021a). Tal suposição é muito próxima a realidade, considerando que o tempo de leitura das concentrações e frações molares é pequeno e que as variações nas concentrações são lentas, com isso é possível determinar o k_{LA} em um determinado momento com precisão.

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C) - Q_{O_2} X \xrightarrow{\frac{dC}{dt}=0} k_L a = \frac{Q_{O_2} X}{C^* - C} \quad (2.3)$$

onde:

$k_L a$: coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1}).

$Q_{O_2} C_X$: velocidade global de consumo de oxigênio ($mol_{O_2} L^{-1} h^{-1}$).

C^* : concentração de saturação de oxigênio dissolvido na fase líquida em equilíbrio com ar na fase gasosa ($mol_{O_2} L^{-1}$).

C : concentração de oxigênio dissolvido no caldo de cultivo ($mol_{O_2} L^{-1}$).

2.5.3. Parâmetros hidrodinâmicos

Os fenômenos relacionados à hidrodinâmica caracterizam-se por serem fenômenos que descrevem a transferência de quantidade de movimento, a qual tende estar relacionada à capacidade de mistura do sistema (ESPERANÇA, 2018). No caso dos biorreatores tanque agitado e aerado, os fenômenos relacionados à hidrodinâmica são uma consequência da combinação da geometria do biorreator, da geometria dos impelidores e das condições operacionais, frequência de agitação (N) e vazão volumétrica de alimentação de ar (Q_{ar}).

Dentre os parâmetros relacionados à hidrodinâmica, tem-se a velocidade média de cisalhamento ($\dot{\gamma}_m$), o qual se configura como um parâmetro relevante no desempenho do

bioprocesso, uma vez que o cisalhamento pode vir a interferir diretamente no crescimento e na morfologia celular (BUFFO, 2020).

O cisalhamento se caracteriza como um efeito proveniente da exposição das células a um gradiente de velocidade resultante do escoamento de fluido no interior do biorreator (BUFFO, 2020; ESPERANÇA, 2018). No entanto, diante da complexidade do escoamento em biorreatores, somado ao fato de a tensão de cisalhamento ser uma função da posição no biorreator, a medida da velocidade de cisalhamento apresenta elevada dificuldade. Logo, as condições de cisalhamento são avaliadas pela velocidade média de cisalhamento ($\dot{\gamma}_m$) a partir de correlações e com base na frequência de agitação (N), na vazão volumétrica de alimentação de ar (Q_{ar}) e nos parâmetros reológicos do caldo de cultivo, índice de consistência (K) e índice de comportamento de escoamento (n) (BUSTAMANTE; CERRI; BADINO, 2013; CAMPESI *et al.*, 2009; CERRI *et al.*, 2008; METZNER; OTTO, 1957).

Outros parâmetros vinculados à hidrodinâmica do bioprocessos são a taxa de dissipação de energia cinética (ε) e a viscosidade aparente (μ_{ap}).

A taxa de dissipação de energia cinética, embora seja variável com a posição no biorreator, para fins comparativos pode ser aproximada satisfatoriamente pela dissipação de potência (COLLIGNON *et al.* 2010), caracterizada pela razão entre o consumo de potência do sistema gaseificado (P_g), a massa específica do fluido (ρ) e o volume de líquido no tanque (V), conforme dado pela Equação 2.4.

$$\varepsilon = \frac{P_g}{\rho \cdot V} \quad (2.4)$$

onde:

ε : taxa de dissipação de energia cinética ($W \text{ kg}^{-1}$).

P_g : consumo de potência do sistema gaseificado (W).

V: volume de líquido no tanque (L).

ρ : massa específica (kg m^{-3}).

Já a viscosidade aparente (μ_{ap}) para fluidos não-Newtonianos pseudoplásticos, como é o caso dos caldos de cultivo envolvendo microrganismos filamentosos, é definida como a razão entre a tensão (τ_m) e a taxa de cisalhamento médio ($\dot{\gamma}_m$), conforme expresso pela Equação 2.5.

$$\mu_{ap} = \frac{\tau_m}{\dot{\gamma}_m} = K \cdot \dot{\gamma}_m^{n-1} \quad (2.5)$$

onde:

μ_{ap} : viscosidade aparente (cP).

τ_m : tensão média de cisalhamento (Pa).

$\dot{\gamma}_m$: velocidade média de cisalhamento (s^{-1}).

K : índice de consistência (Pa s^n).

n : índice de comportamento de escoamento (-).

Por fim, um quarto parâmetro de desempenho relacionado aos fenômenos hidrodinâmicos é a microescala de turbulência de Kolmogorov (λ_K). Segundo a teoria da turbulência isotrópica de Kolmogorov (KOLMOGOROV, 1941; KOLMOGOROV, 1991), a microescala de turbulência de Kolmogorov (λ_K) caracteriza o tamanho dos microturbilhões gerados no interior do biorreator devido à geometria do impelidor, às condições operacionais e a reologia do caldo de cultivo, permitindo assim a avaliação da intensidade de interação célula-turbilhão e suas eventuais consequências à estrutura micelial (SHAMLOU *et al.*, 1994).

Logo, o parâmetro microescala de turbulência de Kolmogorov (λ_K) se apresenta como um parâmetro de relevância na análise do bioprocesso, pois permite a avaliação das eventuais interferências dos microturbilhões sobre a estrutura micelial. Caso o comprimento médio das hifas principais de micélios filamentosos dispersos seja superior a 100 μm (CUI; VAN DER LANS; LUYBEN, 1997; SERRANO-CARREÓN *et al.*, 2015) e as dimensões dos microturbilhões forem inferiores ao comprimento médio das hifas, tem-se um aumento da interação célula-turbilhão, resultando em eventuais danos celulares por cisalhamento. No entanto, se os microturbilhões forem maiores que comprimento médio das hifas, as células passam a ser envoltas e conduzidas pelos microturbilhões, sem efetivas alterações estruturais (SERRANO-CARREÓN *et al.*, 2015).

A Equação 2.6 expressa a microescala de turbulência de Kolmogorov (λ_K), a qual sintetiza a relação entre a reologia do caldo de cultivo e os fenômenos hidrodinâmicos. A microescala de turbulência de Kolmogorov é definida como a razão entre viscosidade cinemática ($\nu = \mu_{ap}/\rho$) e a taxa de dissipação de energia cinética (ε) (BUFFO *et al.*, 2016; COLLIGNON *et al.*, 2010).

$$\lambda_K = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon}\right)^{1/4} = \left(\frac{\mu_{ap}^3}{\left(\frac{P_g}{V}\right)\rho^2}\right)^{1/4} = \left(\frac{(K\dot{\gamma}_m^{n-1})^3}{\left(\frac{P_g}{V}\right)\rho^2}\right)^{1/4} \quad (2.6)$$

onde:

λ_K : microescala de turbulência de Kolmogorov (m).

ν : viscosidade cinemática ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$).

ε : taxa de dissipação de energia cinética (W kg^{-1}).

μ_{ap} : viscosidade aparente (Pa s).

P_g : consumo de potência do sistema gaseificado (W).

V: volume de líquido no tanque (m^3).

ρ : massa específica (kg m^{-3}).

$\dot{\gamma}_m$: velocidade média de cisalhamento (s^{-1}).

K: índice de consistência (Pa s^n).

n: índice de comportamento de escoamento (-).

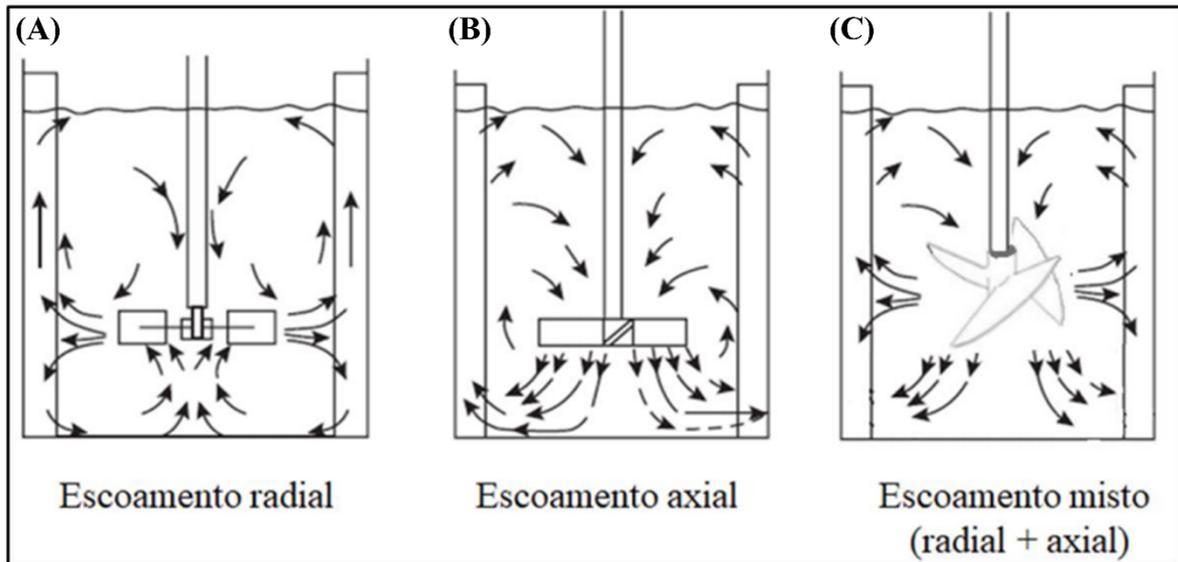
2.5.4. Impelidores

Os biorreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado são providos de impelidores, os quais são responsáveis por proporcionarem a agitação e mistura, visando garantir uma homogeneidade do caldo de cultivo e contribuir para que os fenômenos de transferência de quantidade de movimento, calor e massa ocorram de forma satisfatória.

Diante da variedade de modelos, a geometria do impelidor se apresenta como um importante fator a ser levado em consideração no desenvolvimento de um bioprocessos, devido à sua influência na hidrodinâmica do caldo de cultivo, no consumo de potência, nos fenômenos de transferência, na morfologia do microrganismo, bem como na síntese de metabólitos (TANG *et al.*, 2015).

De modo geral, os impelidores empregados em biorreatores tipo tanque agitado, a depender de sua geometria, tendem a imprimir sobre o caldo de cultivo basicamente três tipos de escoamento, quais sejam, escoamento radial, escoamento axial e escoamento misto, conforme ilustrado na Figura 2.5.

Figura 2.5- Principais tipos de escoamento em biorreatores convencionais: (A) radial, (B) axial e (C) misto.



Fonte: Adaptado de Buffo (2020).

O escoamento radial é definido pelo deslocamento de líquido do eixo do agitador em direção à parede do tanque (Figura 2.5A), ao passo que no escoamento axial o líquido tende a ser deslocado para cima e/ou para baixo (Figura 2.5B) (STANBURY; WHITAKER; HALL, 2017).

Dentre os diversos tipos de impelidores, a tradicional turbina com disco e 6 pás planas também conhecida como turbina de Rushton (Figura 2.6), se apresenta como o impelidor mais comumente empregado em biorreatores convencionais e tende a conferir escoamento radial ao fluido.

Figura 2.6- Impelidor turbina de Rushton.



Fonte: Acervo pessoal.

O impelidor turbina de Rushton (RT) é caracterizado por realizar a efetiva quebra de bolhas de ar em diâmetros menores favorecendo a dispersão do gás. No entanto, além de apresentar um alto consumo de potência, a depender das condições operacionais, o impelidor turbina de Rushton (RT) tende a gerar regiões de misturas não uniformes e regiões de alta turbulência e elevado cisalhamento (BADINO; FACCIOTTI; SCHMIDELL, 2001; BUSTAMANTE; CERRI; BADINO, 2013; KADIC; HEINDEL, 2010; STANBURY; WHITAKER; HALL, 2017).

Diante das características apresentadas pelo impelidor turbina de Rushton (RT), impelidores de escoamento axial ou misto, como é o caso do impelidor “orelha de elefante” (EE) (Figura 2.7), se apresentam como uma alternativa para bioprocessos empregando bactérias e fungos filamentosos, nos quais tem-se a geração de caldos mais viscosos somado ao fato de que os microrganismos são mais sensíveis ao cisalhamento. Esses impelidores de escoamento axial ou misto possuem a capacidade de conferir um satisfatório efeito de mistura e, devido à geometria das pás, tendem a gerar condições de cisalhamento mais brandas (COLLIGNON *et al.*, 2010).

Figura 2.7- Impelidores orelha de elefante: (A) modo de bombeamento para baixo (EEDP) e (B) modo de bombeamento para cima (EEUP).

(A)



**BOMBEAMENTO
PARA BAIXO (EEDP)**

(B)



**BOMBEAMENTO
PARA CIMA (EEUP)**

Fonte: Acervo pessoal.

Conforme ilustrado na Figura 2.7, o impelidor de fluxo misto (radial e axial) “orelha de elefante”, possui três pás planas inclinadas em 45°, onde a depender do posicionamento das

pás, o impelidor pode ser operado no modo de bombeamento para baixo (EEDP- Figura 2.7A) ou no modo de bombeamento para cima (EEUP- Figura 2.7B).

Diante das eventuais influências da geometria do impelidor e das condições operacionais (agitação e aeração) sobre os bioprocessos conduzidos em biorreatores convencionais, a análise combinada dessas variáveis se mostram de relevância para um maior conhecimento e melhoria dos bioprocessos, contribuindo assim para futuros estudos de escalonamento dos mesmos.

2.5.5. Variação de escala

De modo a reproduzir em escalas piloto e industrial o desempenho de um bioprocessos alcançado em escala de bancada, ou visando verificar em escala de bancada determinados aspectos de um bioprocessos já consolidado industrialmente, tem-se o estudo de variação de escala de um bioprocessos.

Mantendo a similaridade geométrica dos sistemas, no caso de bioprocessos aeróbios o estudo de variação de escala de um bioprocessos tende a se dar mediante a escolha de um critério de variação de escala e de um critério de aeração (BADINO; SCHMIDELL, 2021b).

Dentre os diversos critérios de variação de escala, os critérios listados na Tabela 2.1 tendem a serem os normalmente recomendados no caso de bioprocessos envolvendo biorreatores convencionais (BADINO; SCHMIDELL, 2021b).

Tabela 2.1- Critérios de variação de escala para bioprocessos conduzidos em biorreatores convencionais tipo tanque agitado.

Critério	Expressão
Constância do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$)	$(k_L a)_1 = (k_L a)_2 \rightarrow (N)_2 = (N)_1 \cdot \left(\frac{(D_i)_2}{(D_i)_1}\right)^{\left(\frac{2B-2,85A}{3,15A}\right)} \cdot \left(\frac{(Q)_2}{(Q)_1}\right)^{\left(\frac{0,25A-B}{3,15A}\right)}$
Constância da potência de no sistema não aerado por unidade de volume de meio (P_0/V)	$\left(\frac{P_0}{V}\right)_1 = \left(\frac{P_0}{V}\right)_2 \rightarrow (N)_2 = (N)_1 \cdot \left(\frac{(D_i)_1}{(D_i)_2}\right)^{2/3}$
Constância da velocidade na extremidade do impelidor (v_{tip})	$(v_{tip})_1 = (v_{tip})_2 \rightarrow (N)_2 = (N)_1 \cdot \left(\frac{(D_i)_1}{(D_i)_2}\right)$
Constância do tempo de mistura (t_m)	$(t_m)_1 = (t_m)_2 \rightarrow (N)_2 = (N)_1 \cdot \left(\frac{(D_i)_2}{(D_i)_1}\right)^{1/4}$
Constância da capacidade de bombeamento do impelidor (F_L/V)	$\left(\frac{F_L}{V}\right)_1 = \left(\frac{F_L}{V}\right)_2 \rightarrow (N)_2 = (N)_1$
Constância do número de Reynolds (Re)	$(Re)_1 = (Re)_2 \rightarrow (N)_2 = (N)_1 \cdot \left(\frac{(D_i)_1}{(D_i)_2}\right)^2$

* N : frequência de agitação (rps); D_i : diâmetro do impelidor (m); Q : vazão volumétrica de ar ($m^3 s^{-1}$); A e B: coeficientes.

Fonte: Adaptado de Badino e Schmidell (2021).

Para bioprocessos aeróbios tem-se também a necessidade de se escolher o critério de aeração, de modo a se determinar as condições de aeração do bioprocessos na nova escala dimensionada. A Tabela 2.2 destaca os principais critérios de aeração recomendados para os

bioprocessos aeróbios conduzidos em biorreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado (BADINO; SCHMIDELL, 2021b).

Tabela 2.2- Critérios de aeração para o escalonamento de bioprocessos aeróbios conduzidos em biorreatores convencionais tipo tanque agitado.

Critério	Expressão
Número de aeração (N_A) constante	$(Na)_1 = (Na)_2 \rightarrow (Q)_2 = (Q)_1 \cdot \left(\frac{(D_i)_2}{(D_i)_1}\right)^3 \cdot \left(\frac{(N)_2}{(N)_1}\right)$
Velocidade superficial de ar (v_s) constante	$(v_s)_1 = (v_s)_2 \rightarrow (Q)_2 = (Q)_1 \cdot \left(\frac{(D_i)_2}{(D_i)_1}\right)^2$
Vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}) constante	$(\Phi_{ar})_1 = (\Phi_{ar})_2 \rightarrow (Q)_2 = (Q)_1 \cdot \left(\frac{(D_i)_2}{(D_i)_1}\right)^3$

* Q : vazão volumétrica de ar ($m^3 s^{-1}$); D_i : diâmetro do impelidor (m); N : frequência de agitação (rps).

Fonte: Adaptado de Badino e Schmidell (2021).

Ressalta-se que embora o emprego de critérios de variação de escala e de aeração tornem o estudo do escalonamento de um bioprocessos mais efetivo e direcionado, diante da diversidade dos critérios existentes, o critério ideal de aumento de escala tende a ser próprio de cada bioprocessos de acordo com suas especificidades (BADINO; SCHMIDELL, 2021b).

Diante do exposto, a melhoria de um bioprocessos, bem como seu escalonamento, requerem estudos que permitam um maior conhecimento do bioprocessos em termos operacionais e, conseqüentemente, possibilitem o desenvolvimento de estratégias e tecnologias que viabilizem sua inserção a nível industrial.

2.6. PRODUÇÃO DE BIOCOLORANTES – ESTADO DA ARTE

A presente seção tem como intuito abordar os principais pontos de pesquisa em desenvolvimento relacionados a produção de biocolorantes fúngicos, visando avaliar as lacunas ainda existentes em termos de condições de processo e estratégias de cultivo, que possam vir a contribuir para a melhoria e o escalonamento do bioprocessos de modo a viabilizar sua implementação a nível industrial.

O estudo de biocolorantes provenientes de fungos filamentosos vêm gradualmente crescendo devido principalmente ao aumento da conscientização global e da demanda por

produtos benéficos aos seres vivos e ao meio ambiente. Além disso, a grande biodiversidade das linhagens fúngicas e seu elevado potencial bioquímico, somado ao fato de serem de fácil e rápido crescimento, de se adaptarem a condições adversas (HAJJAJ *et al.*, 2000), bem como de serem capazes de produzir uma vasta gama de metabólitos secundários, dentre eles compostos coloridos também tem incentivado os estudos desses biocompostos. Tais compostos, além de apresentarem maior estabilidade a variação de pH e temperatura frente aos demais colorantes naturais oriundos de vegetais e animais, podem apresentar importantes atividades biológicas, a saber, atividade antibacteriana, antifúngica, antimicrobiana, antioxidante, anticancerígeno, antiproliferativo, imunossupressor, entre outras (DUFOSSE *et al.*, 2014; FOUILLAUD *et al.*, 2016; GEWEELY, 2011; KUMAR *et al.*, 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

De forma genérica, os estudos e pesquisas em desenvolvimento voltados aos biocolorantes fúngicos podem ser segmentadas em três grandes vertentes: identificação e caracterização microbiológica e do biocolorante, otimização das etapas de produção, extração e purificação do biocolorante (AMAN MOHAMMADI *et al.*, 2022; MORALES-OYERVIDES *et al.*, 2020a).

A primeira vertente se caracteriza por pesquisas no âmbito de caracterização microbiana e do biocolorante, na qual se têm estudos voltados ao isolamento, identificação e caracterização de linhagens fúngicas com potencial de produção de biocolorantes, bem como caracterizações dos biocolorantes sintetizados em termos de identificação química, de avaliação das propriedades físico-químicas-biológica e de aplicação do mesmo.

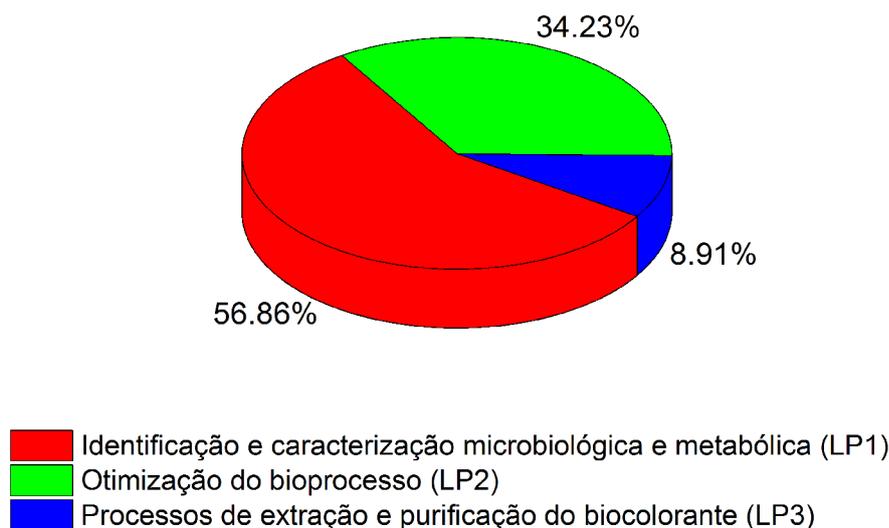
Já a segunda vertente é composta por estudos voltados a otimização do bioprocessamento de produção de colorantes fúngicos, na qual se tem a avaliação por meio de cultivos em estado sólido e submersos de potenciais fatores que podem vir a influenciar o desempenho do bioprocessamento como um todo, como por exemplo: pH, temperatura, composição do meio de cultivo (proporção C:N, tipos de fontes de carbono e nitrogênio, emprego de resíduos alimentícios e agro industriais como fontes de nutrientes), modelos de biorreatores e condições operacionais (agitação, aeração) e estratégias de cultivo (batelada, batelada alimentada, cultivos a baixa temperatura).

Por fim, a terceira vertente está relacionada à pesquisas voltadas às etapas de extração e purificação dos colorantes fúngicos, na qual por meio de diferentes métodos de extração e separação, se busca recuperar e ampliar o grau de pureza dos compostos coloridos extra e intracelulares visando o desenvolvimento de tecnologias eficientes, limpas e sustentáveis

(CHATRAGADDA; DUFOSSÉ, 2021; KALRA; CONLAN; GOEL, 2020; MERUVU; DOS SANTOS, 2021).

Especificamente para os fungos filamentosos do gênero *Talaromyces/Penicillium*, conforme ilustrado na Figura 2.8, nos últimos anos as pesquisas com este gênero de potencial capacidade de sintetização de compostos coloridos tem-se concentrado na vertente de identificação e caracterização microbiológica e metabólica (LP1), sendo os estudos de identificação e caracterização de cepas produtoras de colorantes responsáveis por cerca de 32% dos estudos desenvolvidos nessa vertente, ao passo que os estudos voltados a avaliação das propriedades físico-químicas-biológica e de aplicação dos biocolorantes somam cerca de 25% (MORALES-OYERVIDES *et al.*, 2020a).

Figura 2.8- Trabalhos referentes a produção de biocolorantes pelos gêneros fúngico *Talaromyces/Penicillium*.



Fonte: Adapto de Morales-Oyervides *et al.* (2020a).

As demais vertentes, conforme mostrado pela Figura 2.8 (LP2 e LP3), configuram juntas cerca de 43% dos estudos voltados aos biocolorantes sintetizados por fungos filamentosos do gênero *Talaromyces/Penicillium*.

Embora os estudos voltados a otimização do bioprocessamento se apresente como a segunda maior linha de pesquisa em desenvolvimento, a maioria dos estudos se dão mediante a realização de cultivos submersos conduzidos em escalas de bancada, mais especificamente em frascos agitados, nos quais as principais variáveis avaliadas são o pH, a temperatura, a composição do meio de cultivo, agitação, e uma pequena parcela dos estudos se encontra

voltado para o emprego de diferentes estratégias de cultivo (MORALES-OYERVIDES *et al.*, 2020a).

No entanto, embora o bioprocesso de produção de corante por fungos filamentosos se apresente de elevada complexidade e especificidade, as pesquisas em biorreatores de bancada e em escala piloto ainda são limitadas, principalmente os estudos voltados à avaliação das condições operacionais (agitação e aeração), geometria do sistema, estratégias de cultivo, bem como aqueles propriamente voltados ao emprego de critério de escalonamento do bioprocessos (KALRA; CONLAN; GOEL, 2020; MORALES-OYERVIDES *et al.*, 2020a).

Embora as pesquisas relacionadas à aplicação de diferentes estratégias de cultivos e ao estudo da variação de escala do bioprocessos de produção de colorantes por fungos filamentosos sejam escassos, trabalhos como de Krairak *et al.* (2000) e Chen *et al.* (2021) relataram promissores resultados quanto ao emprego da batelada alimentada na produção de biocolorante pelo gênero *Monascus*, apresentando ganhos na faixa de 35 a 84% em termos de produção frente a batelada convencional. Em termos de escalonamento do bioprocessos, Kim *et al.* (2002) também relataram resultados da produção de biocolorante vermelho por *Monascus sp.* ao estudarem de forma criteriosa o escalonamento do bioprocessos em biorreatores de 5, 30 e 300 L.

Especificamente quanto a linhagem *T. minnesotensis*, uma espécie recém descoberta e relatada por Guevara-Suarez *et al.* (2017), tem-se que, embora os estudos voltados a essa espécie em particular se encontrem escassos e ainda em estágios iniciais, Sousa (2018), verificou o potencial e a expressiva capacidade de produção de um biocolorante vermelho pela linhagem, alcançando produções em frascos agitados a 250 rpm e 24°C da ordem de 50,0 UA.

Logo, diante do exposto e dos promissores resultados obtidos por Sousa (2018), buscou-se explorar as características do metabólito colorido sintetizado pelo fungo endofítico *T. minnesotensis*, bem como avaliar o bioprocessos em biorreatores convencionais sob diferentes configurações e condições operacionais e mediante o emprego da estratégia de batelada alimentada.

Capítulo 3

Talaromyces minnesotensis: UM
POTENCIAL PRODUTOR DE
BIOCOLORANTES

3. *Talaromyces minnesotensis*: UM POTENCIAL PRODUTOR DE BIOCOLORANTES

3.1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda global por produtos mais saudáveis e naturais, aliada aos possíveis riscos associados ao uso de colorantes sintéticos, tem impulsionado o desenvolvimento de estudos de viabilidade e tecnologias para a produção de colorantes naturais obtidos de plantas (folhas, flores e frutos), animais (insetos) e microrganismos (leveduras, fungos, bactérias e microalgas). Embora geralmente tenham menor intensidade de cor e estabilidade do que os compostos sintéticos, os colorantes naturais (biocolorantes) têm a vantagem de serem menos prejudiciais à saúde humana e ao meio ambiente (RAO; XIAO; LI, 2017). Além disso, muitos deles apresentam importantes atividades biológicas antibacterianas, antioxidantes e antitumorais (KUMAR *et al.*, 2015).

Em estudos sobre fontes alternativas para a produção de novos colorantes, é importante identificar novos compostos industrialmente relevantes, mais baratos e com efeitos deletérios menores, em comparação aos compostos sintéticos. Para tanto, os endófitos representam uma importante fonte para a produção de metabólitos bioativos para diversas aplicações (SOUSA; SERRANO; LACAVA, 2017). Endófitos são microrganismos que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem causar doença aparente no hospedeiro (ARAÚJO; SILVA; AZEVEDO, 2000; PETRINI, 1991), podendo desenvolver uma relação simbiótica com a planta (OWEN; HUNDLEY, 2004).

A savana tropical brasileira é um bioma mosaico (BATALHA, 2011) caracterizado por plantas endêmicas e medicinais com características únicas, das quais microrganismos podem ser isolados (SOUSA; SERRANO; LACAVA, 2017). A precipitação anual varia entre 1200 e 1800 mm, e uma estação seca ocorre durante 5 a 6 meses do ano (SOUSA; SERRANO; LACAVA, 2017). Os solos da savana tropical brasileira apresentam populações ricas e complexas de microrganismos, com os diferentes habitats levando a uma prodigiosa variedade de micróbios (STROBEL; DAISY, 2003). Este típico bioma contém plantas endêmicas que podem estar associadas a microrganismos endofíticos (PIZA; HOKKA; SOUSA, 2015; SOUSA; SERRANO; LACAVA, 2017), incluindo fungos filamentosos, que são microrganismos que estão gradualmente ganhando atenção do mercado de colorantes, devido ao seu potencial de produção.

A vasta biodiversidade de espécies fúngicas, associada ao seu alto potencial biotecnológico para a produção de biocompostos capazes de conferir cor, além de suas

propriedades bioativas (DUFOSSÉ *et al.*, 2014; FOUILLAUD *et al.*, 2016), tem estimulado o estudo e a identificação de novas espécies fúngicas pertencentes a uma grande variedade de gêneros, como *Monascus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* e *Talaromyces* (OGBONNA, 2016; RAO; XIAO; LI, 2017). Os bioprocessos com fungos não ocupam grandes áreas e podem ser conduzidos de forma contínua, sem impedimentos sazonais (DUFOSSÉ *et al.*, 2014; MAPARI *et al.*, 2005; OGBONNA, 2016). Além disso, em comparação com outros colorantes naturais, os colorantes fúngicos apresentam maior estabilidade em diferentes condições de pH e temperatura, oferecendo uma ampla variedade de cores (RAO; XIAO; LI, 2017) e classes químicas, incluindo carotenóides, melaninas, flavinas, fenazinas, quinonas e mais especificamente monascinas, violaceína e índigo (DUFOSSÉ *et al.*, 2014; MAPARI *et al.*, 2005).

Embora os biocolorantes sintetizados por fungos filamentosos tenham alto potencial para aplicações industriais, devido às suas origens naturais, é imprescindível a realização de testes toxicológicos, juntamente com caracterizações físico-químicas para confirmar a estabilidade do biocolorante. Os resultados obtidos permitem identificar os setores industriais em que o colorante pode ser utilizado, levando em consideração as normas e as legislações vigentes.

Diante do exposto, visando ampliar o conhecimento quanto a linhagem endofítica *T. minnesotensis* em termos morfológicos e metabólicos, teve-se por objetivo caracterizar fenotipicamente o fungo filamentoso isolado por Romano (2015) das folhas de *Hymenaea courbaril*, uma árvore endêmica do cerrado tropical brasileiro. Além disso, face aos resultados promissores apresentados por Romano (2015) e Sousa (2018), os quais relataram expressivas produções de um biocomposto colorido pela espécie em frascos agitados, buscou-se caracterizar o biocolorante em termos de citotoxicidade, estabilidade e aplicabilidade, previamente às avaliações das condições de operação e do modo de cultivo em maior escala.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Fungo endofítico: caracterização fenotípica

O fungo filamentoso endofítico isolado por Romano (2015) de folhas da árvore *Hymenaea sp.* (conhecida como “jatobazeiro”) do cerrado brasileiro, e identificado como *Talaromyces minnesotensis* pela Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI/DRM-WDCM 823, Paulínia, SP), foi caracterizado fenotipicamente através do cultivo da linhagem em diferentes meios sólidos (YILMAZ *et al.*, 2014).

Primeiramente, para obtenção das colônias de *T. minnesotensis*, a linhagem previamente isolada foi cultivada em placas de Petri de 90 mm contendo aproximadamente 30 mL de meio Ágar ISP2 (International *Streptomyces* Project Medium 2), composto de 4 g L⁻¹ de dextrose, 4 g L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g L⁻¹ de extrato de malte, 20 g L⁻¹ de ágar e pH 5,4. As placas foram incubadas por um período de 7 dias a 25°C.

Posteriormente, visando avaliar suas características macroscópicas, o endofítico *T. minnesotensis* foi inoculado por meio da adição de discos de esporos (≈ 8,5 mm) em placas de Petri de 90 mm contendo aproximadamente 30 mL de 5 diferentes tipos de meios sólidos, a saber, **meio extrato de levedura ágar (CYA)** (concentrado de Czapek (NaNO₃ – 300,0 g L⁻¹; KCl – 50,0 g L⁻¹; MgSO₄.7H₂O – 50,0 g L⁻¹; FeSO₄.7H₂O – 1,0 g L⁻¹) - 10 mL L⁻¹; sacarose – 30,0 g L⁻¹; extrato de levedura – 5,0 g L⁻¹; K₂HPO₄ – 1,0 g L⁻¹; solução de sais traços (CuSO₄.5H₂O – 5,0 g L⁻¹; ZnSO₄.7H₂O – 1,0 g L⁻¹) - 1 mL L⁻¹; ágar 20,0 g L⁻¹; dH₂O 1000 mL em pH final de 6,2), **meio creatina sacarose ágar (CREA)** (sacarose – 30,0 g L⁻¹; creatina 1H₂O – 3,0 g L⁻¹; K₃PO₄.7H₂O - 1,6 g L⁻¹; MgSO₄.7H₂O - 0,5 g L⁻¹; KCl - 0,5 g L⁻¹; FeSO₄.7H₂O - 0,01 g L⁻¹; solução de sais traços - 1 mL L⁻¹; roxo de bromocresol 0,05 g L⁻¹; ágar – 20,0 g L⁻¹; pH 8,0), **meio aveia ágar (OA)** (Aveia – 30,0 g L⁻¹; solução de sais traços - 1 mL L⁻¹; ágar – 20,0 g L⁻¹; pH: 6,5), **meio extrato de malte ágar (MEA)** (extrato de malte – 50,0 g L⁻¹; solução de sais traço íon - 1 mL L⁻¹; ágar – 20,0 g L⁻¹; pH: 5,4) e **meio extrato de levedura sacarose ágar (YES)** (extrato de levedura – 20,0 g L⁻¹; sacarose – 150,0 g L⁻¹; MgSO₄.7H₂O - 0,5 g L⁻¹; sais traços solução - 1 mL L⁻¹; ágar - 20,0 g L⁻¹; pH: 6,5).

Os ensaios foram conduzidos em triplicata e as culturas foram incubadas por 7 dias a 25°C, 30°C e 37°C.

3.2.2. Produção em frascos agitados e extração do biocolorante vermelho

A cultura estoque de trabalho da linhagem *T. minnesotensis* foi mantida em tubos inclinados contendo meio de cultura Ágar ISP2 (International *Streptomyces* Project Medium 2) composto de (em g L⁻¹ água destilada): ágar bacteriológico, 20,0; dextrose, 4,0; extrato de malte, 10,0 e extrato de levedura, 4,0, pH 5,4. Após estriado sobre o meio sólido uma amostra de esporos da colônia de *T. minnesotensis* previamente isolada, os tubos inclinados foram incubados a 28 °C por 10 dias e, posteriormente, conservados em geladeira a 4°C, sendo subcultivados mensalmente, de modo a garantir a viabilidade das culturas.

Para obtenção do inóculo, inicialmente, preparou-se um volume conhecido de meio líquido ISP2 isento de ágar, onde o mesmo teve seu pH ajustado em 5,0 com solução de ácido clorídrico 2,0 M, sendo posteriormente autoclavado a 121°C por 20 minutos.

Na sequência, foram adicionados aos tubos inclinados (*slants*) da cultura estoque de trabalho 7 mL de meio ISP2 esterilizado, sendo a superfície da cultura raspada com alça de platina esterilizada para desprendimento dos esporos.

Diante da concentração de esporos obtida através da técnica de contagem em Câmara de Neubauer (MANACHINI; FORTINA; PARTINI, 1987), de aproximadamente 10^8 esporos mL^{-1} , alíquotas de 7 mL da suspensão foram transferidas para Erlenmeyers de 500 mL contendo 43 mL de meio ISP2 estéril, de modo que a concentração final de esporos no inóculo fosse da ordem de 10^7 esporos mL^{-1} .

Os Erlenmeyers foram mantidos em incubador rotativo (New Brunswick Scientific, modelo C25KC; NOVA ÉTICA, modelo 430RD) a 250 rpm e 28°C por 24 horas.

Após o preparo do inóculo, seguiu-se o procedimento de inoculação dos frascos agitados visando a obtenção do biocolorante a ser caracterizado.

Inicialmente, foram preparados 1800 mL de meio de cultivo composto de 20,0 g L^{-1} de dextrose e 10,0 g L^{-1} de peptona de soja. O mesmo teve seu $\text{pH}_{\text{inicial}}$ ajustado para 5,0 com solução de HCl 2,0 M, sendo posteriormente armazenado em frasco Schott graduado de 2 L e autoclavado a 121°C por 20 minutos.

Após o resfriamento, foram inoculados 200 mL de suspensão micelial obtida da etapa de preparo do inóculo. O conteúdo foi homogeneizado em agitador magnético e distribuiu-se 50 mL do caldo de cultivo em frascos Erlenmeyers de 500 mL. Os ensaios em frascos agitados foram conduzidos em incubador rotativo (New Brunswick Scientific, modelo C25KC; NOVA ÉTICA, modelo 430RD) a 250 rpm e 24°C.

Amostras (frascos inteiros) foram retiradas a cada 24 h, e determinou-se o pH do caldo de cultivo através de um medidor de pH (Modelo QX 1500, Qualxtron). Posteriormente, o caldo de cultivo foi centrifugado por 20 min a 4°C e 12.000 rpm e o sobrenadante foi filtrado a vácuo através de uma membrana de nitrato de celulose de 0,45 μm de diâmetro de poro para total separação das células.

A quantidade de biocolorante produzida foi avaliada mediante a leitura de absorbância, em espectrofotômetro-UV (Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences), do sobrenadante filtrado considerando o fator de diluição de cada amostra. De modo a se determinar o

comprimento de onda correspondente à máxima absorção para o colorante vermelho, realizou-se o escaneamento da amostra do caldo de cultivo livre de células na faixa de 300 a 600 nm. Os resultados obtidos foram expressos em termos de Unidades de Absorbância a 500 nm (UA), o que concorda com a máxima absorção para colorantes vermelhos reportados pela literatura (CHATTERJEE *et al.*, 2009; CHRISTIE, 2001; SINGH *et al.*, 2015).

Posteriormente a conclusão do cultivo, realizado em duplicata, uma alíquota do caldo de cultivo tratado (isento de células) foi submetida a um processo sequencial de extrações líquido-líquido com os solventes hexano e acetato de etila, utilizando-se uma relação volumétrica de 1,25:1 (caldo/solvente). Após a extração com acetato de etila, a fase aquosa foi separada e teve seu pH ajustado para 2,0 com solução de HCl 2,0 M. Uma terceira extração líquido-líquido foi, então, realizada com *n*-butanol como solvente, utilizando uma razão volumétrica de 2:1 (fase aquosa/solvente).

A fase orgânica resultante foi submetida a um processo de reextração utilizando uma solução aquosa ajustada para pH 12,0 com solução de NaOH 1,0 M, para a concentração do colorante vermelho na solução aquosa. A razão utilizada no processo de reextração foi de 1:1 (pH 12,0 solução/fase orgânica). Ao final do processo, a fase aquosa (pH 7,5) foi liofilizada e a amostra sólida obtida foi utilizada para caracterização do biocolorante vermelho.

3.2.3. Caracterização do biocolorante

Visando obter um maior conhecimento sobre ao biocomposto sintetizado, o mesmo foi o caracterizado com base em ensaios de fluorescência, citotoxicidade (MTT e MIC), estabilidade e capacidade de coloração em diferentes matrizes.

Os ensaios de fluorescência foram realizados em colaboração com o Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP). Os testes de citotoxicidade, ensaio colorimétrico MTT e concentração mínima inibitória (MIC) foram realizados, respectivamente, em colaboração com o Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas (LIDI) e o Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB) do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

3.2.3.1. Emissão de fluorescência

Análises espectrofluorimétricas de soluções de biocolorante ($1,0 \text{ g L}^{-1}$) em diferentes pH (2,0, 4,0, 6,0, 6,74, 8,0, 10,0 e 12,0), ajustadas com soluções de HCl 2,0 M e NaOH 1,0 M, foram realizadas usando um espectrofluorímetro (Fluorolog-3, Horiba Jobin Ivon-Spex, Nova

Jersey, EUA). O instrumento foi equipado com uma cubeta de quartzo de quatro faces (10 mm) e foi operado em larguras de fenda de excitação e emissão de 10 e 15 nm, respectivamente. A emissão de fluorescência foi registrada na faixa de 530-700 nm com a excitação fixada em 490 nm.

3.2.3.2. Ensaio colorimétrico MTT em células derivadas de hepatoblastoma humano (HepG2)

Células HepG2 (fornecidas pelo Laboratório de Toxicologia Ambiental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Brasil) foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Sigma) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) e solução antibiótica a 1% (v/v) (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em frasco de cultura celular, a 37°C, em atmosfera umidificada com 5% (v/v) de CO₂.

O ensaio colorimétrico MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio]) foi usado para avaliar a viabilidade celular medindo a função redutora mitocondrial. Células HepG2 foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 10⁴ células/poço e foram mantidas por 24 h, a 37°C, em atmosfera umidificada com 5% (v/v) de CO₂. Após esse período, as células foram tratadas por 24 ou 48 h com o biocolorante vermelho em diferentes concentrações (0,05 a 10,0 g L⁻¹). As células não tratadas foram usadas como controle negativo (C-). O controle positivo (C+) foram células tratadas com 5% (v/v) de Extran®. As células foram lavadas duas vezes com 1xPBS, seguido da adição de 100 µL de solução de MTT (5 g L⁻¹, Sigma) a cada poço e incubação por 150 min. Sequencialmente, o meio foi removido dos poços e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em 100 µL de DMSO. As leituras de absorbância foram realizadas a 570 nm usando um leitor de microplacas (Multiskan GO). A viabilidade celular foi calculada como uma porcentagem do controle negativo. Os testes foram realizados em triplicata.

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade na distribuição dos dados. A análise dos resultados utilizou o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn não corrigido para comparações múltiplas (p<0,05), aplicado aos grupos tratamento e controle negativo (C-). A IC₅₀ (concentração inibitória média) foi calculada usando uma curva de regressão não linear construída com o software GraphPad Prism v. 7.0.

3.2.3.3. Concentração inibitória mínima (MIC)

Os ensaios para determinação dos valores de concentração inibitória mínima (MIC) para o biocolorante vermelho foram realizados em triplicata e sobre os microrganismos patogênicos

Staphylococcus aureus ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14502 e *Candida albicans* ATCC 10231.

As culturas foram semeadas em placas de 96 poços a uma concentração final de 5×10^5 UFC mL⁻¹ em meio Müller-Hinton (MHCA) e foram mantidas por 12 h, a 37°C. Após este período, concentrações de biocolorante vermelho, variando de 0,095 µg mL⁻¹ a 100,0 mg mL⁻¹, foram adicionados aos poços. Posteriormente, a placa de 96 poços foi incubada novamente a 37°C por 12 horas. A atividade do biocolorante frente às bactérias patogênicas e a levedura foi determinada medindo a densidade óptica de cada poço após 12 horas de incubação nos respectivos, comprimentos de onda de 600 nm e 520 nm, usando um leitor de placas.

Ressalta-se que o crescimento normal dos patógenos sem a adição de biocolorante foi empregado como controle negativo (C-).

3.2.3.4. Ensaios de estabilidade

Visando caracterizar e avaliar as propriedades do colorante vermelho produzido pelo fungo *T. minnesotensis*, foram realizados testes de avaliação da estabilidade em meio a variação do pH e da temperatura.

Nos ensaios de estabilidade a diferentes pHs, foram preparadas soluções tampões como mostrado na Tabela 3.1, cujos pHs de 1 a 10 foram ajustados utilizando soluções de ácido clorídrico (HCl) 2,0 M e hidróxido de sódio (NaOH) 1,0 M.

Tabela 3.1- Composições das soluções tampão empregadas no ensaio de estabilidade do corante vermelho.

Solução Tampão	pH	Composição	Concentração (g L ⁻¹)
Tampão HCl-KCl	1	Cloreto de potássio (KCl)	7,5
		Ácido clorídrico (HCl)	0,8
	2	Cloreto de potássio (KCl)	7,5
		Ácido clorídrico (HCl)	0,8
Tampão Fosfato-Ácido Cítrico	3	Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O)	16,7
		Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	5,9
	4	Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O)	12,9
		Fosfato Dissódico (Na ₂ HPO ₄)	11,0
	5	Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O)	10,1
		Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	14,6
Tampão Ácido Cítrico-Citrato	6	Ácido Cítrico (C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O)	8,0
		Citrato de sódio (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O)	47,7
Tampão Fosfato-Ácido Cítrico	7	Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O)	3,7
		Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	23,4
	8	Ácido cítrico (C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O)	0,6
		Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	27,6
Tampão Glicina-NaOH	9	Glicina (C ₂ H ₅ NO ₂)	75,0
		Hidróxido de sódio (NaOH)	7,0
	10	Glicina (C ₂ H ₅ NO ₂)	75,0
		Hidróxido de sódio (NaOH)	25,6

Fonte: Acervo pessoal.

Na realização dos ensaios foram preparados 70 mL de solução tampão para cada pH estudado e adicionados a cada um deles cerca de 1,4 mL de caldo de cultivo tratado (isento de células), de modo que a diluição se mantivesse a mesma em todos os ensaios.

Após a adição, realizou-se a homogeneização das soluções utilizando agitador magnético por 5 minutos e, posteriormente, 20 mL de cada solução foram distribuídos em frascos falcon de 50 mL. Os mesmos foram levados ao banho termostático, de modo a se manter a temperatura constante ao longo de todo o ensaio.

Os ensaios foram realizados em triplicata e conduzidos nas seguintes temperaturas de 10, 20, 40, 60 e 80°C, de modo que todos os pHs foram avaliados nas 5 temperaturas.

As amostragens se deram na primeira hora de cada ensaio e, posteriormente, a cada 4 horas durante um período total de 24 horas. Para avaliação da estabilidade, assim como nos cultivos, aferiu-se a absorvância de cada solução à 500 nm.

A estabilidade do colorante vermelho natural foi avaliada pelo cálculo da porcentagem residual do colorante vermelho (%RCR), usando a Equação 3.1 (SANTOS-EBINUMA *et al.*, 2013):

$$RCR (\%) = \frac{ABS_{500}(t)}{ABS_{500,0}} \times 100 \quad (3.1)$$

onde:

RCR: resíduo de colorante vermelho.

$ABS_{500}(t)$: absorvância à 500 nm da solução contendo o colorante vermelho ao longo do tempo (UA).

$ABS_{500,0}$: absorvância inicial à 500 nm da solução contendo o colorante vermelho (UA).

A cinética de degradação do colorante vermelho produzido por *T. minnesotensis* foi avaliada usando o modelo cinético de primeira ordem expresso pela Equação 3.2:

$$\frac{dABS_{500}}{dt} = -k \cdot ABS_{500} \quad (3.2)$$

onde:

ABS_{500} : absorvância a 500 nm (UA).

t: tempo de incubação (h).

k: constante da taxa de degradação (h^{-1}).

A constante da taxa de degradação (k), corresponde à inclinação do gráfico resultante da linearização da Equação 3.2:

$$\ln \left(\frac{ABS_{500}(t)}{ABS_{500_0}} \right) = -k \cdot t \quad (3.3)$$

onde:

ABS_{500_0} : absorvância inicial ($t=0$) à 500 nm (UA).

$ABS_{500}(t)$: absorvância no tempo t à 500 nm (UA).

t : tempo de incubação (h).

k : constante da taxa de degradação (h^{-1}).

Para estimativa da constante de taxa de degradação (k), foram utilizados os valores médios de absorvância das triplicatas.

O tempo necessário para atingir 50% de degradação do colorante vermelho (meia-vida, $t_{1/2}$) foi calculado usando a Equação 3.4.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (3.4)$$

onde:

$t_{1/2}$: tempo de meia-vida (h).

k : constante da taxa de degradação (h^{-1}).

A relação entre a constante de taxa de degradação (k) e a temperatura foi modelada usando a linearização da equação de Arrhenius (Equação 3.5), como segue:

$$\ln k = \ln k_0 - \frac{E_a}{RT} \quad (3.5)$$

onde:

k : constante da taxa de degradação (h^{-1}).

k_0 : fator pré-exponencial (-).

E_a : energia de ativação ($kJ mol^{-1}$).

R : constante universal do gás ($8,314 J mol^{-1} K^{-1}$).

T : temperatura absoluta (K).

3.2.3.5. Ensaio de aplicação

Para avaliar, em caráter exploratório, a aplicabilidade do biocolorante, foram tingidas 6 diferentes matrizes:

- Gelatina (Dr. Oetker TM, incolor)
- Detergente (Ipê TM, incolor)
- Tinta acrílica branca (Acrilex TM, Nature Colors)
- Esmalte cremoso (Colorama TM, França)
- Esmalte incolor (Risqué TM)
- Tecidos: poliéster, algodão branqueado, algodão bruto, linho e seda

As massas e as proporções biocolorante/matriz relativas aos processos de tingimento das matrizes gelatina, detergente, tinta e esmalte encontram-se na Tabela 3.2.

Tabela 3.2- Massas de matriz e de biocolorantes e proporções biocolorante/matriz empregadas nos tingimentos das matrizes gelatina, detergente, tinta acrílica e esmalte.

Tipo de Matriz	mMATRIZ (g)	mH₂O (g)	mACETONA (g)	mBIOCOLORANTE (g)	Proporção (% m/m)
Gelatina	4,0	50,0	-	-	-
	4,0	49,5	-	0,006	0,01%
	4,0	49,0	-	0,013	0,02%
	4,0	45,0	-	0,065	0,13%
	4,0	40,0	-	0,129	0,29%
Detergente	10,0	-	-	0,016	0,16%
Tinta acrílica	4,0	-	-	0,26	6,50%
Esmalte cremoso	1,5	-	0,8	0,012	0,52%
Esmalte transparente	1,5	-	0,8	0,012	0,52%

Fonte: Acervo pessoal.

Ressalta-se que para a coloração do esmalte, devido as propriedades químicas do biocolorante, foi necessário diluir inicialmente o biocolorante em acetona e, posteriormente, a solução obtida foi adicionada aos esmaltes a serem tingidos. Nos demais tingimentos (gelatina, detergente e tinta acrílica) o biocolorante foi adicionado às matrizes e as misturas foram homogeneizadas na sequência.

No tingimento dos tecidos foi desenvolvido um protocolo baseado nos métodos de

Suwannarach *et al.* (2019) e Bisht *et al.* (2020), com algumas modificações.

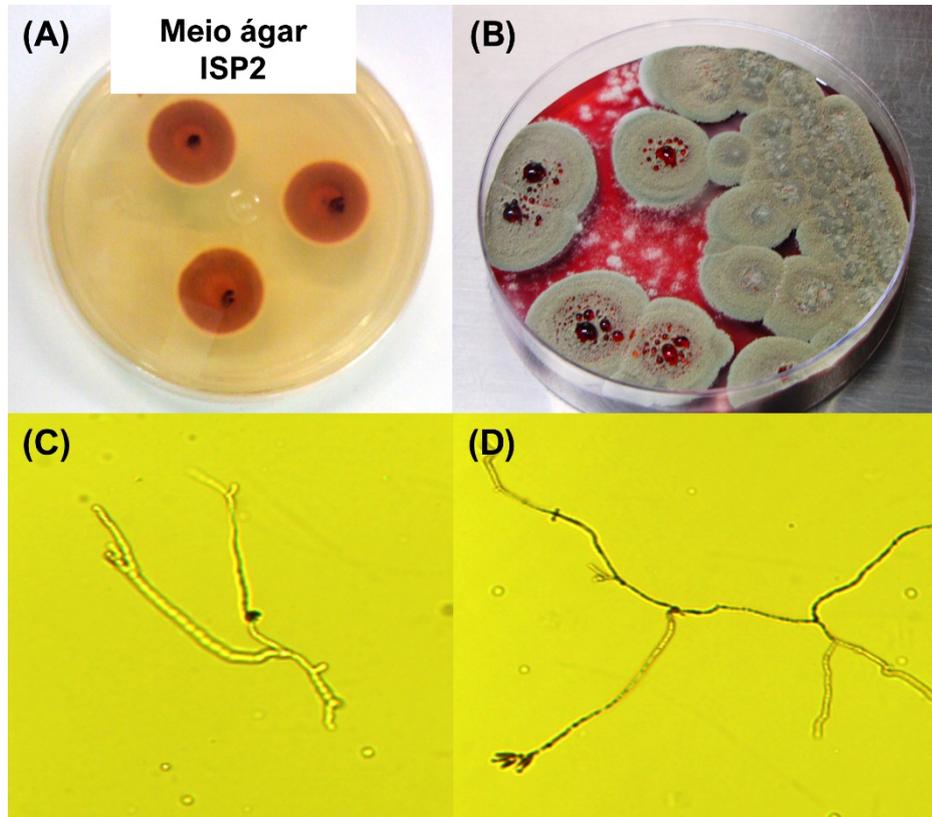
Inicialmente, 5 diferentes tipos de tecido foram cortados em discos de aproximadamente 5 cm de diâmetro, os quais foram submersos em 50 mL de caldo tratado em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Os fracos foram então incubados por 1 h a 35°C de forma estática. Após o tingimento, as amostras foram lavadas com água da torneira para remover o biocolorante não fixado e foram embebidas em solução mordente de CuSO₄ 0,1% m/v por 10 min e enxaguadas novamente com água da torneira. Após a segunda lavagem, as amostras foram secas ao ar livre por 24 h em temperatura ambiente (25°C), seguida de análise visual para avaliação da retenção do biocolorante.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Caracterização fenotípica do fungo filamentosso *T. minnesotensis*

O fungo endofítico *T. minnesotensis* em meio ágar ISP2, apresentou, devido ao processo de esporulação em ISP2, a formação de colônias de cor verde-oliva e foi possível observar, conforme a Figura 3.1B, o fenômeno de exsudação do colorante vermelho. Além disso, verificou-se que o reverso das colônias apresentou coloração alaranjada (Figura 3.1A). Por meio de imagens microscópicas, observou-se a presença de hifas septadas (Figura 3.1C) e fiálides nas pontas dos conidióforos (Figura 3.1D), característica típica do gênero *Talaromyces*.

Figura 3.1- Crescimento do endofítico *T. minnesotensis* em meio de ágar ISP2. (A) Lado reverso das colônias e (B) fenótipo característico da colônia e exsudação microbiana do biocolorante vermelho. Imagens microscópicas (400x) do fungo endofítico mostrando (C) hifas septadas e (D) fiáldes nos conidióforos.



Fonte: Adaptado de Romano (2015).

Ao avaliar as características macromorfológica em 5 diferentes meios sólidos, conforme mostrado na Tabela 3.3, observou-se que os cultivo de *T. minnesotensis* em diferentes meios sólidos não revelaram crescimento a 37 °C.

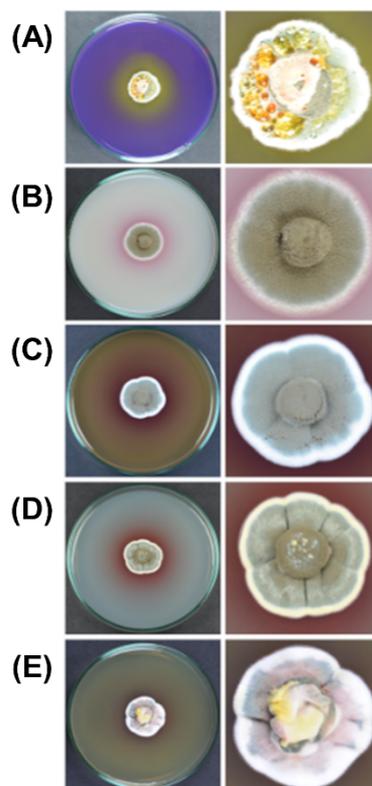
Tabela 3.3- Resumo das características macromorfológicas de *T. minnesotensis* após 7 dias a 25, 30 e 37°C.

Temperatura de incubação (°C)	Diâmetro da colônia após 7 dias (mm)				
	OA	MEA	CYA	YES	CREA
25	23-24	26-27	23-25	21-25	16-19
30	26-25	27-30	27-29	27-31	19-21
37	Sem crescimento	Sem crescimento	Sem crescimento	Sem crescimento	Sem crescimento
	Produção de colorante (7 dias)				Produção de ácido em meio CREA (7 dias)
	OA	MEA	CYA	YES	
25	Ausente	Vermelho	Vermelho	Marrom	Forte
30	Ausente	Vermelho	Vermelho	Vermelho	Forte
37	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Fonte: Acervo pessoal.

Além disso, segundo a Tabela 3.3, foi verificado a forte produção de ácido em meio CREA e a geração de colorante nos meios CYA, MEA e YES, corroborando com os resultados macromorfológicos ilustrados pela Figura 3.2.

Figura 3.2- Características macromorfológicas de *T. minnesotensis* após 7 dias cultivado a 25°C em (A) CREA, (B) OA, (C) MEA, (D) CYA e (E) YES.



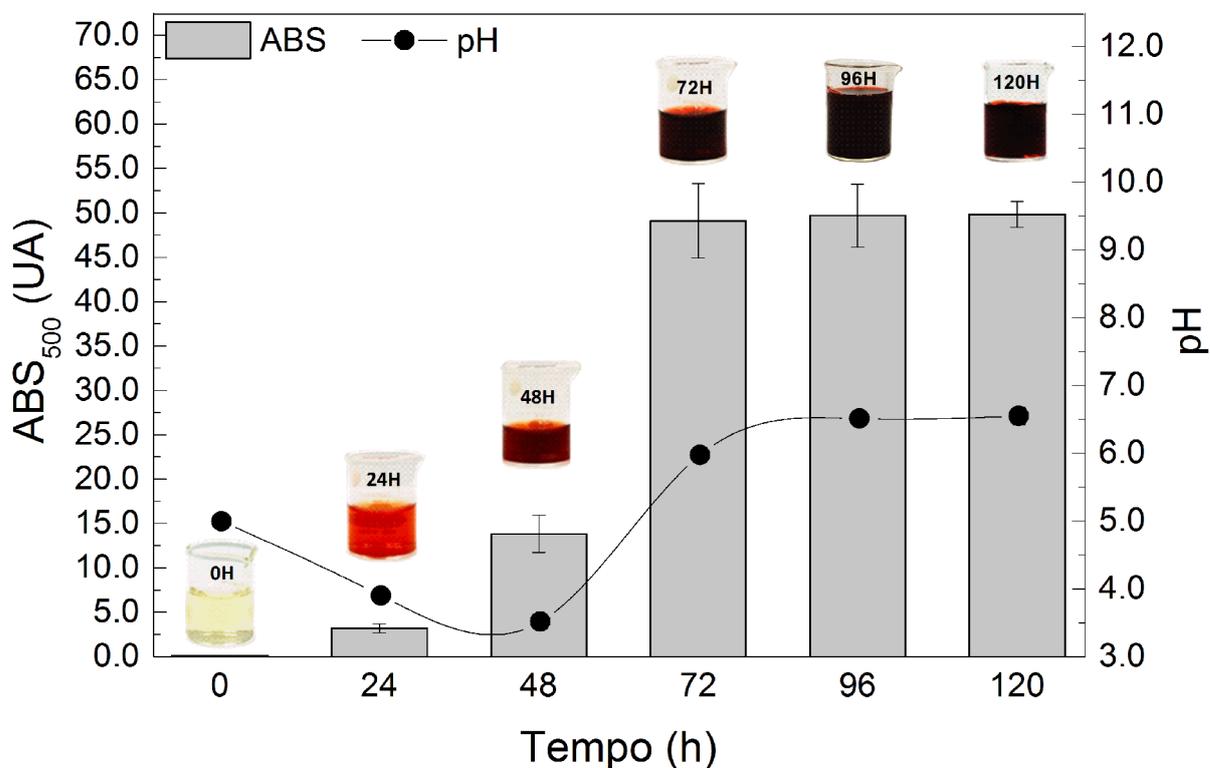
Fonte: Acervo pessoal.

De modo geral, as características obtidas, se apresentaram similares às observadas por Guevara-Suarez *et al.* (2017) ao relatarem pela primeira vez o isolamento e a identificação da linhagem *T. minnesotensis*.

3.3.2. Produção de biocolorante vermelho em frascos agitados

Para produção e caracterização do biocolorante vermelho, cultivos submersos (em duplicata) foram realizados com *T. minnesotensis*. A Figura 3.3 mostra os resultados para o pH do caldo e a produção do colorante vermelho, em termos de unidades de absorvância a 500 nm (ABS_{500}), durante o cultivo.

Figura 3.3- Perfis de produção de biocolorante vermelho (ABS_{500} , em unidades arbitrárias) e pH durante o cultivo de *T. minnesotensis*.



Com base na Figura 3.3, observou-se que a produção do colorante iniciou em 24 h, e aumentou até 72 h de cultivo, atingindo uma absorbância máxima (ABS_{500}) de aproximadamente 50 UA. Após este tempo, os valores do ABS_{500} permaneceram constantes. O pH iniciou em pH 5,0 e diminuiu durante as primeiras 48 h, associado ao consumo de glicose, seguido de um aumento até 96 h de cultivo, atingindo um valor de pH 6,5. O aumento do pH pode ser atribuído ao consumo dos aminoácidos da peptona de soja, após a exaustão da glicose. O aumento da produção de colorante vermelho após a exaustão da glicose sugeriu que o biocolorante poderia ser um metabólito secundário, como relatado para outros colorantes microbianos, especialmente aqueles produzidos por fungos (KUMAR *et al.*, 2015; MÉNDEZ *et al.*, 2011).

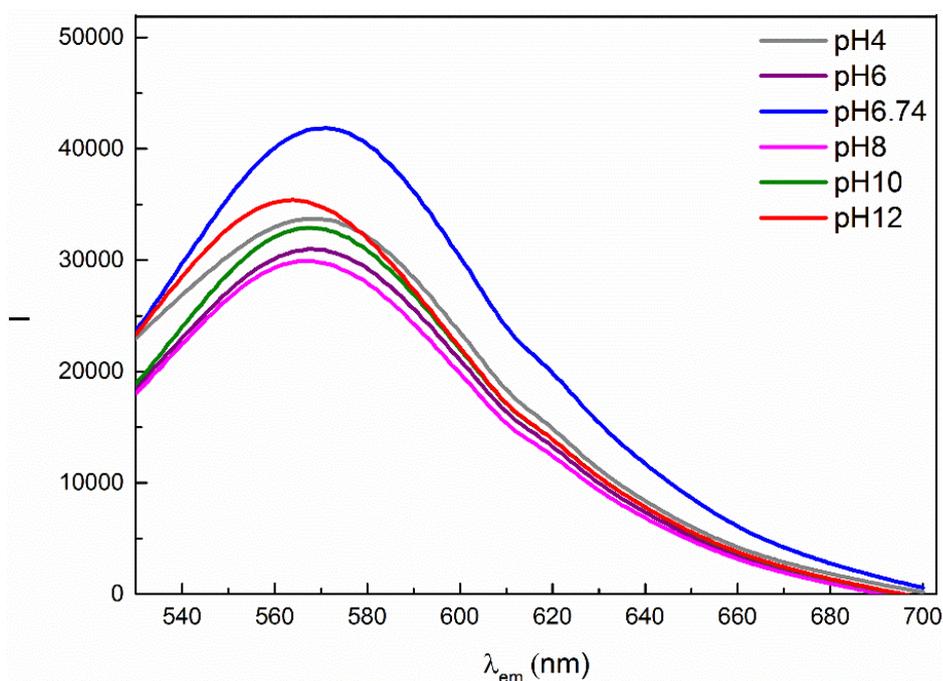
Ao final do cultivo, uma parcela do sobrenadante do caldo centrifugado e filtrado foi submetido a uma extração líquido-líquido sequencial utilizando hexano, acetato de etila, *n*-butanol e solução aquosa de pH 12,0. A fase aquosa foi então completamente seca e a amostra sólida foi utilizada para caracterização bioquímica do colorante vermelho.

3.3.3. Ensaios de caracterização do biocolorante vermelho

3.3.3.1. Emissão de fluorescência

As propriedades do biocolorante vermelho avaliadas por análises de fluorescência (em meio aquoso) em diferentes pHs (2-12) e mantendo a mesma concentração (1 g/L), mostraram um comprimento de onda máximo de emissão na faixa de 564 a 572 nm, a partir da excitação fixa em 490 nm, conforme mostrado na Figura 3.4.

Figura 3.4- Espectro de fluorescência do biocolorante vermelho em solução aquosa (1,0 g/L) em diferentes pHs: 4,0; 6,0; 6,74; 8,0; 10,0 e 12,0.



Com base na Figura 3.4, observou-se que o biocolorante vermelho quando em solução aquosa (1,0 g/L) e submetido a diferentes pHs (2-12), tende a apresentar uma propriedade de emissão de fluorescência mais pronunciada em pH 6,74, onde foi verificado uma intensidade de fluorescência expressiva (4×10^4) para um comprimento de onda de emissão de 571 nm. Como visto para o biocolorante vermelho, a propriedade de fluorescência também é relatada para outros biocolorantes sintetizados por fungos como *Monascus sp.* (HSU *et al.*, 2011) e *Talaromyces amestolkiae* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019), sendo uma importante propriedade fotofísica de biomoléculas para possíveis aplicações biotecnológicas.

A variação do pH (LAKOWICZ, 2006), bem como a solubilidade do biocolorante, tendem a influenciar o comportamento e a exposição dos grupos fluoróforos e, conseqüentemente, a propriedade de emissão de fluorescência, o que justifica o fato de a pH 2, o biocolorante não ter apresentado fluorescência significativa, uma vez que a insolubilidade do

biocomposto em solução aquosa foi claramente observada (dados não apresentados). Para as amostras de pH 4 a 12, a constância e a definição adequada dos perfis espectrais, bem como o baixo deslocamento químico das bandas de emissão da ordem de 10 nm, demonstram a ausência de modificações químicas estruturais nas moléculas que compõem o biocolorante e, portanto, é possível confirmar que a diferença na emissão de fluorescência observada tende a ser resultado do processo de solubilização e/ou protonação dos grupos químicos e fluoróforos do biocomposto.

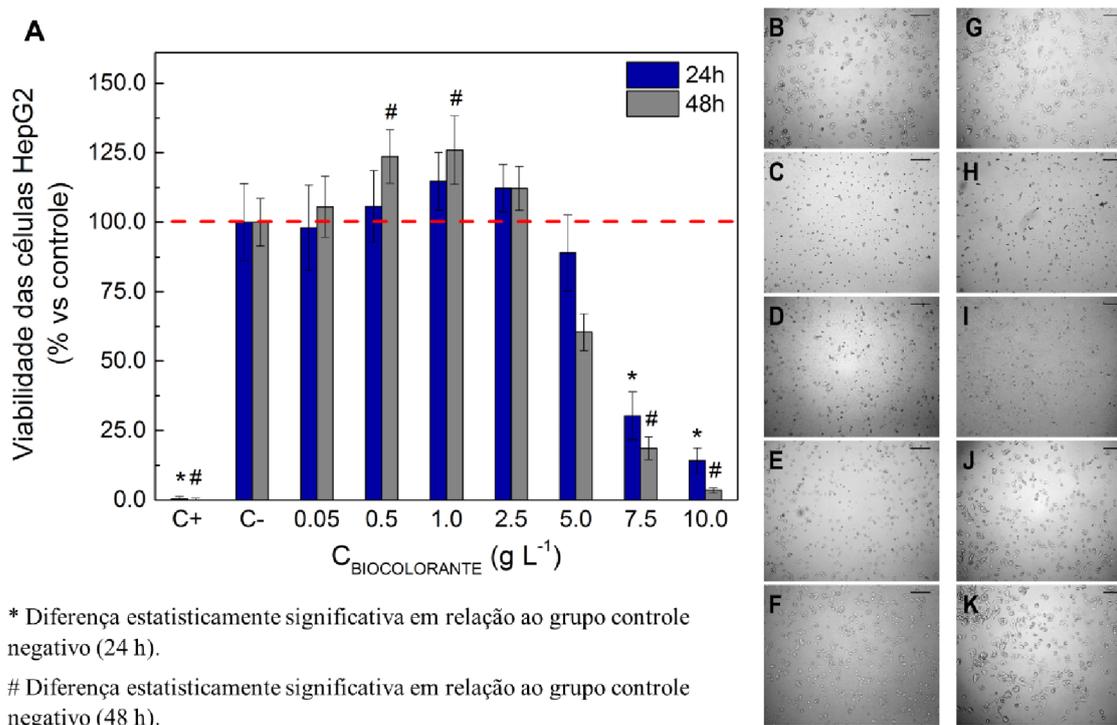
Assim, esses resultados indicaram que o colorante vermelho de origem biotecnológica sintetizado por *T. minnesotensis*, possui alto potencial de fluorescência em meio aquoso e em pH (6,74) próximo à faixa de pH biológico, o que demonstra seu potencial de aplicação em diversas matrizes industriais desde biomarcadores a alimentos, medicamentos, cosméticos, entre outros.

3.3.3.2. Ensaios de citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade e atividade biológica do biocolorante vermelho, foram realizados ensaios de MTT e MIC.

As propriedades citotóxicas do colorante vermelho foram avaliadas pelo ensaio MTT realizado com células HepG2, para períodos de exposição de 24 e 48 h (Figura 3.5A).

Figura 3.5- Resultados para exposição de células HepG2 ao colorante vermelho. (A) Viabilidade das células HepG2 (%) após a exposição por 24 e 48 h (apresentadas como médias com desvios-padrão). Imagens de microscopia óptica de células HepG2 expostas ao colorante vermelho: (B a F) após 24 h para C-, C+, 10,0, 5,0 e 1,0 g L⁻¹, respectivamente; (G a K) após 48 h para C-, C+, 10,0, 5,0 e 1,0 g L⁻¹, respectivamente.

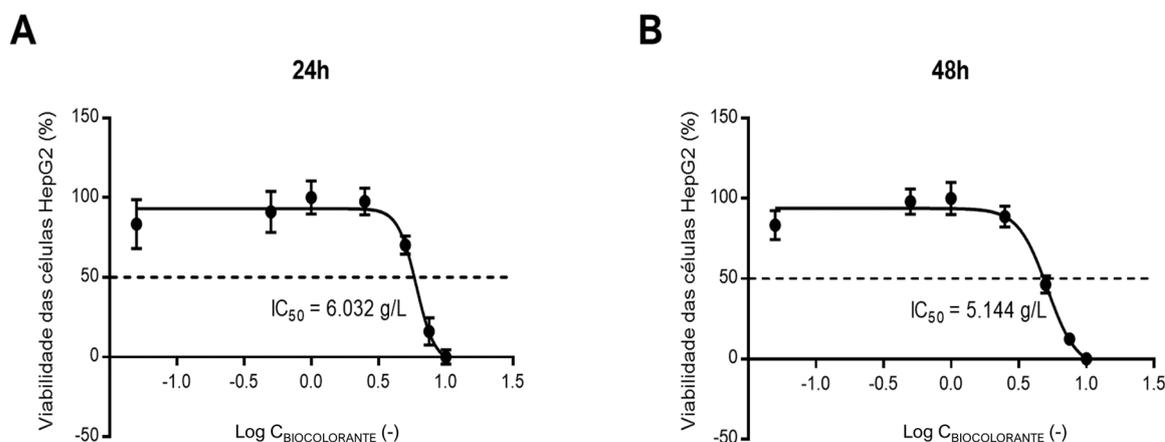


Fonte: Acervo pessoal.

Os valores percentuais médios de viabilidade celular obtidos foram 98,0, 105,7, 114,7, 112,3, 84,8, 30,3 e 14,1%, após 24 h, e 105,6, 123,7, 126,0, 112,2, 60,4, 18,6 e 3,48%, após 48 h, para exposição a 0,05, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0 g L⁻¹ de colorante vermelho, respectivamente. Os resultados mostraram uma diminuição significativa da viabilidade celular nas concentrações mais altas (a partir de 7,5 g L⁻¹), para ambos os períodos analisados. A diminuição da viabilidade celular (sem significância estatística) também foi observada no nível de exposição de 5,0 g L⁻¹. Esses efeitos puderam ser observados nas imagens de microscopia óptica (Figura 3.5B a 3.5K). Aumentos da viabilidade celular após 48 h foram observados para as baixas concentrações do colorante vermelho (0,5 e 1,0 g L⁻¹).

Os valores da concentração inibitória média (IC₅₀) foram determinados para as exposições de 24 h (Figura 3.6A) e 48 h (Figura 3.6B) ao colorante vermelho, resultando em valores de IC₅₀ de 6,03 e 5,14 g L⁻¹ para 24h e 48h de exposição, respectivamente.

Figura 3.6- Viabilidade celular (%) e valores de IC₅₀ para células HepG2 expostas ao colorante vermelho: (A) após 24 h e (B) após 48 h.



Diante dos resultados obtidos, verificou-se reduções significativas na viabilidade das células HepG2 após exposição ao colorante vermelho em altas concentrações (7,5 e 10 g L⁻¹), conforme demonstrado pelo ensaio MTT (atividade mitocondrial) e confirmado com microscopia óptica. Os valores de IC₅₀ mostraram maior efeito citotóxico do colorante vermelho para exposição de 48 h (IC₅₀ = 5,14 g L⁻¹), em comparação com exposição de 24 h (IC₅₀ = 6,03 g L⁻¹). Embora os resultados obtidos tenham se apresentado como de expressiva citotoxicidade quando comparados ao biocolorante sintetizado pelo fungo *Talaromyces amestolkiae*, o qual apresentou para células com células 3T3 um valor de IC₅₀ de 187,0 g L⁻¹ para 72 h de exposição (ZACCARIM *et al.*, 2018). De modo geral, ao serem comparados com outros biocolorantes como os de *T. australis* e *P. murcianum*, os quais apresentaram, respectivamente, segundo Hernández *et al.* (2019), valores de IC₅₀ para células NIH/3T3 de 0,21 e 0,54 g L⁻¹ após 24 h, o biocolorante vermelho de *T. minnesotensis* se demonstrou de baixa citotoxicidade. Além disso, quando comparado a outros colorantes naturais como o açafrão (obtido da planta *Crocus sativus* L.), também se demonstrou de baixa citotoxicidade, visto que o açafrão quando utilizado contra células HepG2, tende a apresentar valores de IC₅₀ na ordem de 1,8 e 0,95 g L⁻¹ para exposições de 24 h e 48 h, respectivamente (TAVAKKOL-AFSHARI *et al.*, 2008).

Quanto à análise da atividade biológica, o biocolorante revelou atividade em concentrações superiores a 50,0 g L⁻¹ contra as bactérias patogênicas *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* ATCC 11775 e *P. aeruginosa* ATCC 14502, e a levedura *C. albicans* ATCC 10231. Esse resultado sugere o potencial de aplicabilidade desse biocolorante em produtos alimentícios, cosméticos, farmacêuticos e tecidos, não apenas potencializando a coloração, mas também, dependendo da concentração, contribuindo para a proteção contra contaminantes

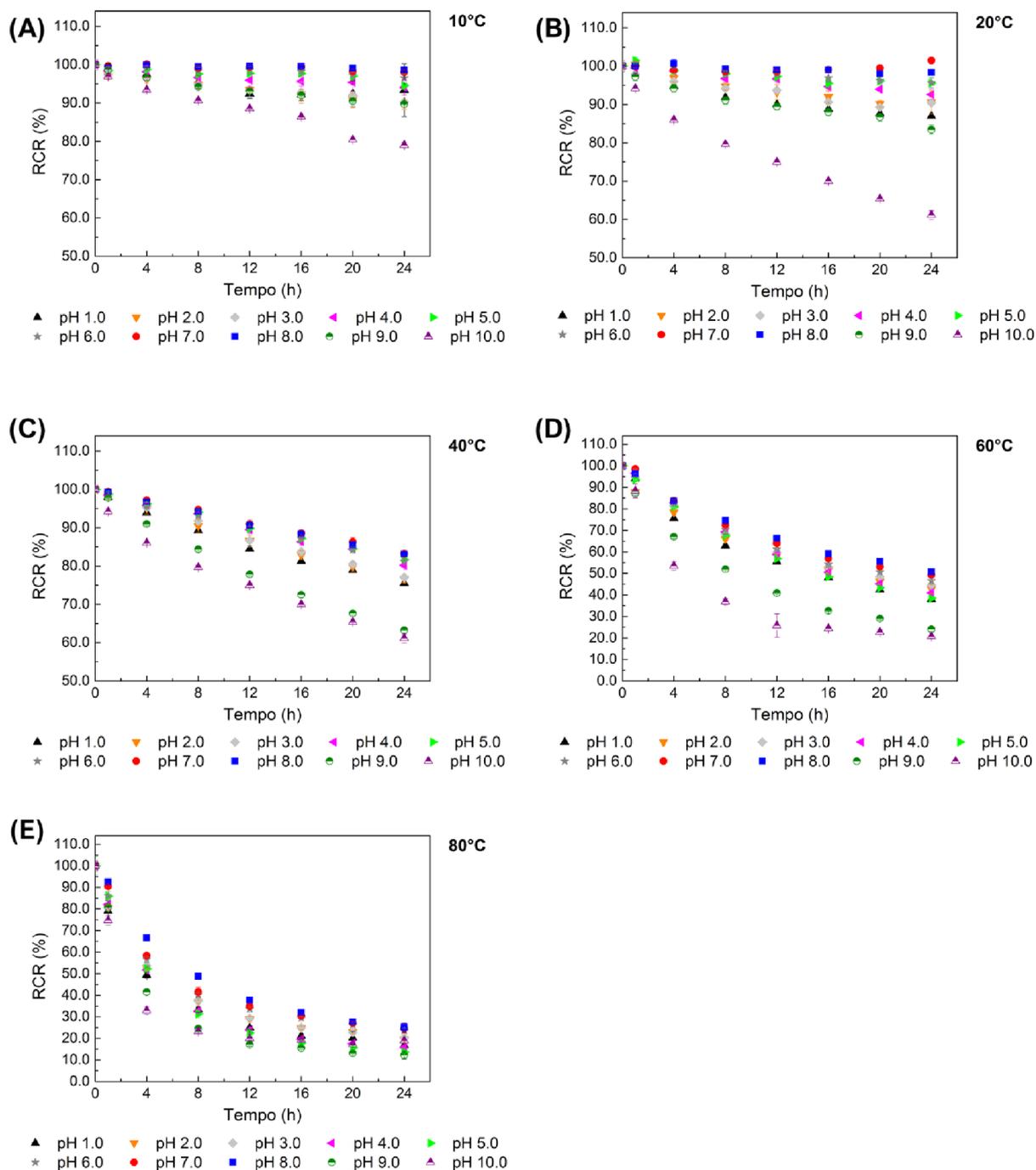
microbiológicos. Isso é semelhante ao observado para outros colorantes fúngicos como o colorante vermelho produzidos por *T. amestolkiae* (ZACARIM *et al.*, 2018) e o pigmento *Monascus* sintetizado por *Monascus ruber* CCT 3802 (VENDRUSCOLO *et al.*, 2013a). Zaccarim *et al.* (2018) descreveram que o colorante vermelho mostrou atividade em valores de CIM de 1,9, 19,0 e 47,0 g L⁻¹ contra *E. coli* ATCC 25922, *P. aeurogenosa* ATCC 9721 e *S. aureus* ATCC 10390, respectivamente. Enquanto Vendruscolo *et al.* (2013a) relataram que os colorantes (laranja e vermelho) produzidos por *Monascus ruber* CCT 3802 em cultivo submerso exibiram efeitos antimicrobianos contra os patógenos de origem alimentar *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922, com CIMs variando de 10,0 a 20,0 g L⁻¹.

Logo, os ensaios de citotoxicidade demonstraram que o biocolorante vermelho sintetizado por *T. minnesotensis* apresenta potencial para maiores estudos.

3.3.3.3. Ensaios de estabilidade

A estabilidade do biocolorante vermelho foi caracterizada por meio de testes realizados em diferentes valores de pH (1,0-10,0) e temperaturas (10, 20, 40, 60 e 80 °C), onde o monitoramento da variação de cor considerou a porcentagem residual do colorante vermelho (% RCR), como mostrado na Figura 3.7.

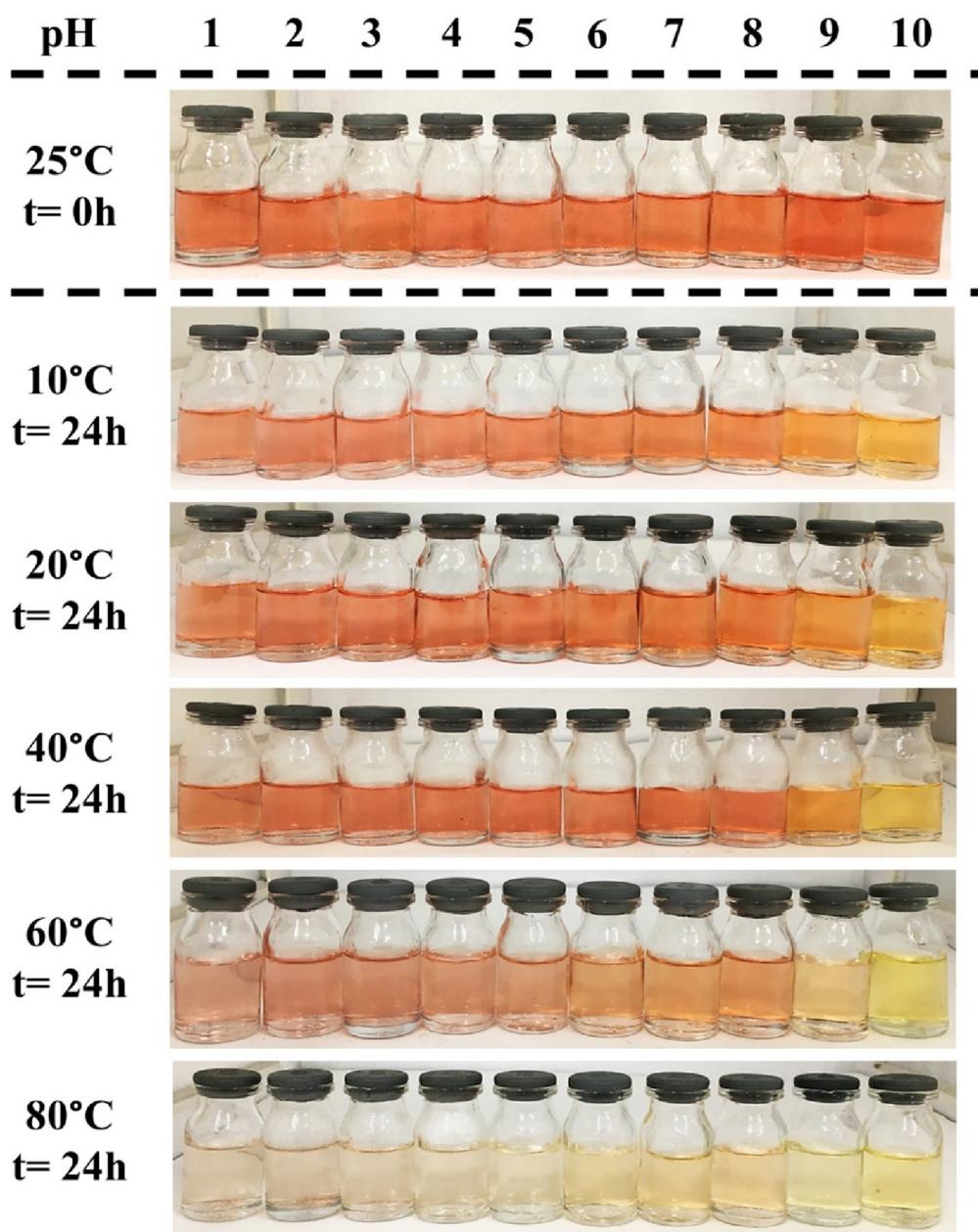
Figura 3.7- Perfil da porcentagem residual de colorante vermelho (%RCR), de acordo com o tempo, para pH de 1,0 a 10,0, em temperaturas de (A) 10°C, (B) 20°C, (C) 40°C, (D) 60°C, e (E) 80°C.



Conforme mostrado na Figura 3.7, a estabilidade do colorante vermelho foi favorecida pelo pH próximo à neutralidade (6,0 a 8,0) e temperatura mais baixa, já que nas temperaturas de 10 e 20 °C (Figura 3.7A e 3.7B), a diminuição da %RCR foi inferior a 5% após 24 h de incubação, para pH de 6,0 a 8,0. No entanto, em temperaturas mais altas e com maior variação

do pH, a estabilidade do colorante foi comprometida, principalmente em pH alcalino (9,0 e 10,0), com reduções de %RCR na faixa de 5 a 85%, a depender das condições térmicas de incubação. Associado a isto, a alteração expressiva de coloração das soluções após 24 h de incubação, conforme ilustrado pela Figura 3.8, evidenciou que a estabilidade do biocolorante foi comprometida pela exposição aos efeitos simultâneos de pH e temperatura.

Figura 3.8- Variação da coloração após 24 horas de incubação.



Fonte: acervo pessoal.

Embora a exposição ao pH ácido (1,0-5,0) tenha afetado a estabilidade do biocolorante, a degradação do biocomposto foi menos abrupta, em comparação com a exposição ao pH

alcalino (9,0 e 10,0), onde foi visivelmente observada uma mudança na cor da solução. após 24 h de incubação, independentemente da temperatura. Essa mudança de cor pode ter sido causada por alterações nas estruturas químicas das moléculas que compõem o corante vermelho natural (CARVALHO *et al.*, 2005; SANTOS-EBINUMA *et al.*, 2013; SIPAHLI; MOHANLALL; MELLEM, 2017).

Mudanças de cor em função dos valores de pH também são comumente observadas para outros biocolorantes, conforme relatado por De Oliveira *et al.* (2022) e Fonseca *et al.* (2022), que avaliaram a estabilidade dos colorantes produzidos por *Talaromyces amestolkiae* e *Penicillium brevicompactum*, respectivamente. De Oliveira *et al.* (2022) observaram que o caldo fermentado contendo os colorantes produzidos por *Talaromyces amestolkiae* passou de vermelho para laranja em meio alcalino forte (pH 13,0), enquanto o biocolorante produzido por *Penicillium brevicompactum* tendeu a ser mais avermelhado em meio alcalino (6,0-10,0) e amarelado em pH ácido (3,0-5,0), conforme relatado por Fonseca *et al.* (2022).

Assim, embora o biocolorante tenha se apresentado mais estável em pH próximo à neutralidade (6,0-8,0), seu uso em processos mais ácidos também se faz possível, como na fermentação de derivados do leite (CARVALHO *et al.*, 2005), uma vez que as moléculas tendem a serem mais estáveis em pH ácido do que em pH alcalino.

A evidente estabilidade em pH neutro e baixas temperaturas, está de acordo com os resultados obtidos para outros colorantes naturais relatados na literatura. Na avaliação da fotoestabilidade de colorantes fúngicos produzidos por *Penicillium aculeatum* IBT 14263 e *Epicoccum nigrum* IBT 41028 em tampão citrato em pH ácido e neutro, Mapari *et al.* (2009) observaram que a degradação da cor foi maior em pH 5,0 do que em pH 7,0. Carvalho *et al.* (2005) avaliaram a estabilidade de colorantes vermelhos produzidos por *Monascus spp.* na fermentação em estado sólido, onde se obteve melhor estabilidade em pH próximo à neutralidade (6,0, 7,6 e 7,9) e temperatura na faixa de 0 a 32 °C, sendo a porcentagem residual de corante de até 92% em pH 7,9 e temperatura de 32 °C, após um período de incubação de 25 h. Da mesma forma, na avaliação da influência do pH e da temperatura no corante vermelho sintetizado por *Talaromyces purpurogenum*, Santos-Ebinuma *et al.* (2013) observaram que o corante apresentou boa estabilidade em pH 8,0 e temperatura de 25°C, com %RCR próximo a 91% após incubação por 24 h.

Tanto Carvalho *et al.* (2005) quanto Santos-Ebinuma *et al.* (2013) relataram que os biocolorantes avaliados tenderam a apresentar melhor estabilidade em soluções alcalinas do que em soluções ácidas. Em contraste, na avaliação da estabilidade e cinética de degradação de

extratos de antocianinas de *Hibiscus sabdariffa*, Sipahli *et al.* (2017) observaram melhor estabilidade em soluções ácidas do que em ambientes alcalinos, o que corrobora com os resultados obtidos para o biocolorante de *T. minnesotensis*.

Como as amostras apresentaram melhor estabilidade contra a variação de temperatura em pH 6,0-8,0, ao analisar-se os parâmetros cinéticos de degradação para essa faixa de pH, a saber, constante de velocidade de degradação (k) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$), conforme mostrado na Tabela 3.4, verificou-se uma tendência de manutenção da estabilidade nas temperaturas de 10 e 20°C.

Tabela 3.4- Parâmetros cinéticos de degradação do biocolorante (k , $t_{1/2}$ e E_a) para pH de 6,0 a 8,0, nas temperaturas de 10, 20, 40, 60 e 80°C.

pH	Temperature (°C)	k (h^{-1})	R^2	$t_{1/2}$ (h)	E_a ($kJ mol^{-1}$)
6.0	10	$0,0014 \pm 0,0001$	0,95	495,1	$49,82 \pm 0,38$
	20	$0,0019 \pm 0,0001$	0,99	359,1	
	40	$0,0086 \pm 0,0001$	1,00	80,5	
	60	$0,0352 \pm 0,0014$	0,99	19,7	
	80	$0,0713 \pm 0,0058$	0,95	9,7	
7.0	10	$0,0007 \pm 0,0001$	0,88	961,3	$56,29 \pm 0,31$
	20	$0,0015 \pm 0,0002$	0,91	471,5	
	40	$0,0075 \pm 0,0001$	1,00	91,9	
	60	$0,0325 \pm 0,0013$	0,99	21,3	
	80	$0,691 \pm 0,055$	0,95	10,0	
8.0	10	$0,0005 \pm 0,0001$	0,80	1494,0	$63,41 \pm 0,66$
	20	$0,0007 \pm 0,0001$	0,97	994,0	
	40	$0,0078 \pm 0,0001$	1,00	89,2	
	60	$0,0305 \pm 0,0011$	0,99	22,7	
	80	$0,0660 \pm 0,0037$	0,98	10,5	

Fonte: Acervo pessoal.

Ao se avaliar a degradação térmica para faixa de pH de 6 a 8 (Tabela 3.4) foi observado que as temperaturas de 10 e 20°C garantiram uma menor degradação do colorante vermelho

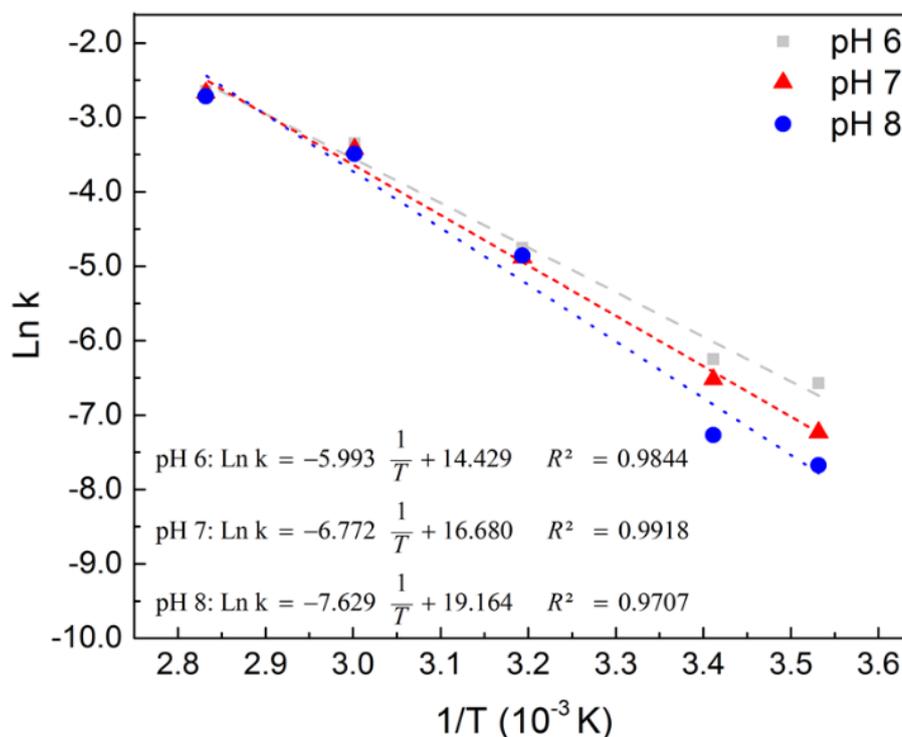
uma vez que a constante de velocidade de degradação (k) chegou a ser até 132 vezes menor quando comparada a temperatura de 80°C.

O modelo cinético de primeira ordem foi capaz de descrever satisfatoriamente a degradação do biocolorante, obtendo coeficientes de regressão de 0,80 a 1,0. De acordo com essas observações, vários colorantes naturais como as antocianinas (FERNÁNDEZ-LÓPEZ *et al.*, 2013) e os colorantes vermelhos naturais produzidos por *Monascus ruber* CCT 3802 (VENDRUSCOLO *et al.*, 2013b) e *Aspergillus tamaritii* (SARAVANAN *et al.*, 2020) mostraram comportamento cinético de degradação térmica semelhante, com aumento da constante de taxa de degradação (k) e diminuição do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) em temperaturas mais altas, como observado para o colorante vermelho produzido por *T. minnesotensis*.

Em pH 8,0, o tempo de meia-vida a 10°C foi aproximadamente 142 vezes maior que a 80°C, sugerindo a possível utilização do biocolorante em processos a frio. No entanto, embora a meia-vida diminua com o aumento da temperatura, ainda seria possível utilizar o colorante vermelho natural produzido por *T. minnesotensis* em processos de curta duração e altas temperaturas, como processos de pasteurização convencionais, onde temperaturas na faixa de 63 a 90°C são usados por períodos de até 30 min (FELLOWS 2009). Nesses processos, o %RCR ao final da operação estaria na faixa de 70 a 95%.

Os valores de energia de ativação (E_a), caracterizados por descreverem a dependência da constante de taxa de degradação (k) com a temperatura (REYES; CISNEROS-ZEVALLOS, 2007), foram obtidos por ajuste satisfatório do modelo de Arrhenius para pH de 6,0 a 8,0, conforme mostrado pela Figura 3.9.

Figura 3.9- Gráficos do modelo de Arrhenius, nos pHs 6 a 8, para o colorante vermelho produzido por *T. minnesotensis*.



Os valores de E_a calculados para temperaturas de 10 a 80 °C ficaram na faixa de 26,0 a 63,0 kJ mol^{-1} , dependendo das condições de pH (dados não mostrados). Esses valores estão de acordo com os valores de E_a relatados para outros biocolorantes, como o colorante laranja (52,93 kJ mol^{-1} , pH 4,5, 50-95°C) e o colorante vermelho (48,07 kJ mol^{-1} , pH 6,5, 50- 95°C) sintetizado por *Monascus ruber* CCT 3802 (VENDRUSCOLO *et al.*, 2013b), os colorantes vermelhos produzidos por *Penicillium purpurogenum* GH2 (42,40 kJ mol^{-1} , pH 6,0, 30-80°C) (MORALES-OYERVIDES *et al.*, 2015), e outros colorantes naturais como riboflavina (36,4 kJ mol^{-1} , 30-90°C), curcumina (27 kJ mol^{-1} , 30-90°C) (GIMÉNEZ *et al.*, 2015), gardênia (65,78 kJ mol^{-1} , pH 5,5, 40-80°C) (CERRETI *et al.*, 2020), e licopeno (45,96 kJ mol^{-1} , 70-100°C) (BADIN *et al.*, 2021).

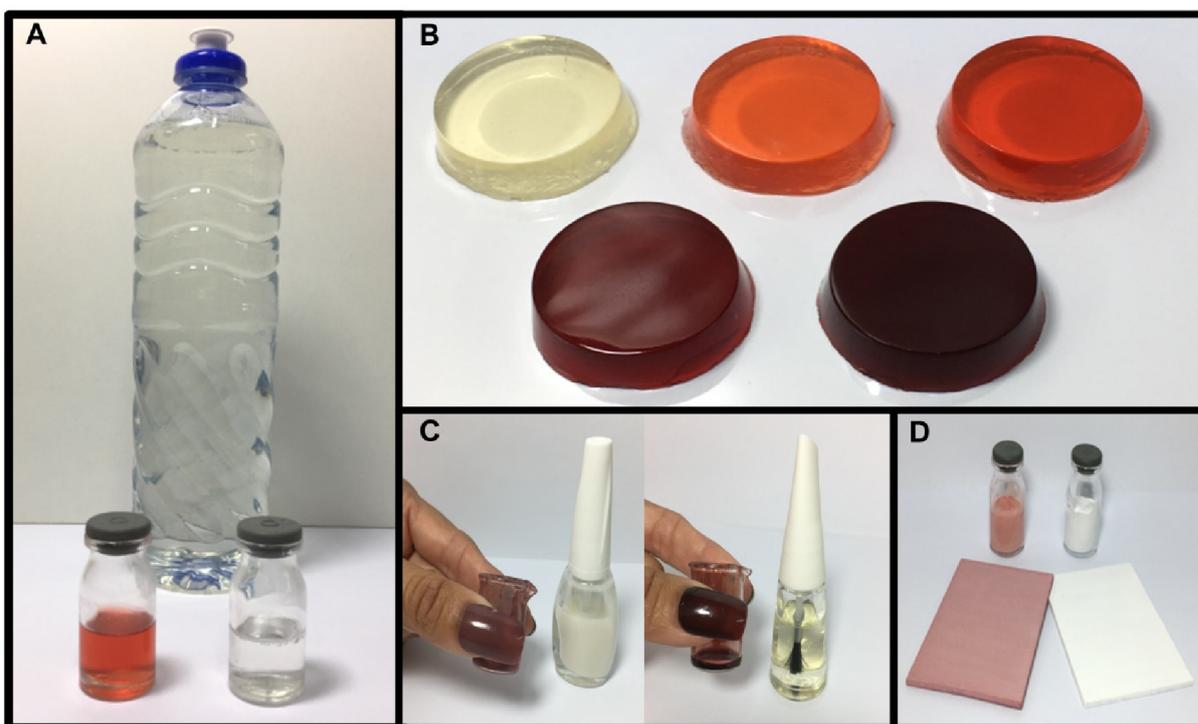
A energia de ativação necessária para iniciar o processo de degradação em pH 8,0 foi cerca de 27% maior do que em pH 6,0 (Tabela 3.4). No entanto, a alta energia de ativação também mostrou maior sensibilidade da constante de degradação (k) à mudança de temperatura, uma vez que a variação da constante de degradação em pH 8,0, para temperaturas de 10 a 80 °C, foi aproximadamente 27 e 13% maior do que em pH 6,0 e 7,0, respectivamente (para a mesma faixa de temperatura). Assim, embora a alta energia de ativação esteja associada à maior sensibilidade da constante de degradação ($\ln k$) à variação da temperatura, a energia mínima necessária para iniciar o processo de degradação também será maior.

Portanto, os resultados indicaram que o uso de pH 8,0 e baixas temperaturas proporcionaram as condições mais favoráveis para a manutenção da estabilidade do biocolorante vermelho sintetizado por *T. minnesotensis*. No entanto, dadas as suas características, e dependendo do tempo de processamento, o biocolorante pode ser utilizado em uma ampla gama de processos, demonstrando sua potencial versatilidade de aplicação em diversos setores industriais, como também foi observado posteriormente em testes de aplicabilidade do colorante vermelho.

3.3.3.4. Aplicação do biocolorante vermelho

Para avaliação do potencial colorante, o biocolorante vermelho foi aplicado em diversas matrizes, incluindo detergente, gelatina, esmalte, tinta (Figura 3.10).

Figura 3.10- Aplicação do biocolorante vermelho em diferentes matrizes: (A) detergente, (B) gelatina, (C) esmalte e (D) tinta.



Fonte: Acervo pessoal.

A aplicação do biocolorante em detergente, gelatina, esmalte e tinta proporcionou resultados satisfatórios, com todas as matrizes apresentando alterações uniformes e substanciais das cores originais, como também observado por Latha e Jeevaratnam (2010) após a aplicação do colorante produzido por *Rhodotorula glutinis* em diferentes tipos de alimentos.

Embora o tipo de matriz e/ou a intensidade de cor desejada impliquem no uso de diferentes quantidades de biocolorante, o tingimento de gelatinas incolores (Figura 3.10B)

demonstrou que uma pequena quantidade do colorante pode conferir uma cor homogênea de forma eficiente, confirmando o potencial de coloração do biocomposto.

Além das matrizes citadas acima, diversos tipos de tecidos multifibras também foram tingidos pelo biocolorante vermelho, conforme ilustrado na Figura 3.11.

Figura 3.11- Tecidos multifibras tingidos com o biocolorante vermelho bruto produzido por *T. minnesotensis*.



Fonte: Acervo pessoal.

Dentre os cinco tipos de tecidos tingidos, nos quais a aplicação do biocolorante geralmente resultou em uma paleta de cores em tons pastéis, a seda (um tecido derivado de animais) apresentou visivelmente a melhor assimilação de cores, enquanto o tecido de poliéster

sintético não foi tingido. Esse resultado se encontra similar ao observado por Suwannarach *et al.*, (2019), cuja a aplicação do corante vermelho sintetizado pelo fungo *Nigrospora aurantiaca* CMU-ZY2045 em tecido de poliéster conferiu inicialmente uma coloração levemente rosada e com algumas manchas, seguida do retorno à sua coloração original (branco) após uma etapa de lavagem.

O uso da solução 0,1% (p/v) de CuSO₄ como mordente (fixador) resultou, em alguns casos, em pequenas alterações do tom de cor para os tecidos como algodão cru e seda, mas em geral a solução de CuSO₄ como mordente melhorou a fixação do corante, principalmente para o tecido de algodão branqueado. Resultados semelhantes em relação à contribuição de tecidos tingidos com mordente foram observados por Lagashetti *et al.* (2022) ao aplicar o extrato de corante bruto do *Gonatophragmium triuniae* NFCCI 487 com e sem a presença de diferentes mordentes (FeSO₄ e Alum). Os autores relataram que os tecidos de algodão com mordente apresentaram maior fixação do corante do que o tecido sem mordente.

Os testes de aplicação demonstraram a versatilidade do biocolorante vermelho produzido por *T. minnesotensis*, indicando seu excelente potencial de aplicação em diversos setores industriais.

3.4. CONCLUSÕES

A linhagem isolada por Romano (2015) e identificada como *T. minnesotensis*, apresentou diferentes características macromorfológicas a depender do meio de cultivo, sendo observada uma forte produção de ácido em meio CREA, uma característica padrão da linhagem originalmente relatada por Guevara-Suarez *et al.* (2017). Além disso, verificou-se que a linhagem possui uma expressiva capacidade de produção de biocolorante vermelho, o qual exibe propriedades altamente promissoras em termos de fluorescência, citotoxicidade, estabilidade e potencial de coloração.

Os resultados demonstraram evidências claras do potencial biotecnológico do biocomposto colorido, instigando assim o desenvolvimento de futuros estudos voltados a melhoria da produção e ampliação de escala do bioprocesso, bem como a realização de ensaios complementares de caracterização do biocomposto visando sua futura inserção no mercado global de colorantes.

Capítulo 4

**INFLUÊNCIA DO SISTEMA DE
IMPELIDORES E DAS CONDIÇÕES
OPERACIONAIS**

4. INFLUÊNCIA DO SISTEMA DE IMPELIDORES E DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS NA PRODUÇÃO DE BIOCOLORANTE VERMELHO EM BIORREATOR CONVENCIONAL

4.1. INTRODUÇÃO

Diante da crescente demanda global por produtos mais saudáveis e naturais, biocompostos em geral vêm ganhando gradualmente cada vez mais relevância, por serem oriundos de processos biotecnológicos nos quais por meio do emprego de fontes naturais como minérios, plantas, animais e microrganismos, tem-se a obtenção de diversos compostos com propriedades e características de serem menos agressivos ao meio ambiente e à saúde humana. É neste cenário que os microrganismos, em especial os fungos filamentosos, vêm se destacando como uma fonte promissora na produção de biocolorantes, devido à sua produção contínua e regular de uma gama variada de compostos naturais coloridos (DUFOSSÉ *et al.*, 2014; FOUILLAUD *et al.*, 2016; SPEARS, 1988), que além de terem capacidade de coloração, podem também apresentar propriedades bioativas (DUFOSSÉ *et al.*, 2014; FOUILLAUD *et al.*, 2016; GESSLER *et al.*, 2013).

Dentre os padrões de cultivos utilizando microrganismos fúngicos para obtenção de biocolorantes e visando a inserção desses biocompostos no mercado global, o emprego de cultivos submersos tende a ser mais propício à obtenção de colorantes frente aos cultivos em estado sólido, tanto pela sua capacidade de produção como pela existência de recursos tecnológicos de controle e monitoramento altamente desenvolvidos (KIM *et al.*, 2002; VENKATACHALAM *et al.*, 2020). Entretanto, a produção submersa de biocolorantes sintetizados por microrganismos, especialmente de caráter filamentoso, é influenciada por diversos fatores como pH, temperatura, composição do meio de cultivo, condições operacionais e as estratégias de cultivo (AHN *et al.*, 2006; JOSHI *et al.*, 2003; OGBONNA, 2016; SANTERRE; QUEINNEC; BLANC, 1995).

Diversos estudos referentes à produção submersa de biocolorantes por fungos filamentosos têm como foco a análise dos efeitos da composição do meio de cultivo, do pH e da temperatura. Entretanto, uma menor parcela de trabalhos referentes a síntese submersa de colorantes em biorreatores visam compreender como os fenômenos hidrodinâmicos e de transferência tendem a influenciar, direta ou indiretamente, o bioprocessamento de produção destes metabólitos secundários (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2002; LV *et al.*, 2017; MOHAMED *et al.*, 2012; MUSAALBAKRI *et al.*, 2006; PEREIRA; TONSO; KILIKIAN, 2008; POLLARD *et al.*, 2007; VENDRUSCOLO *et al.*, 2017; ZHOU; TIAN E ZHONG, 2019).

A geometria do impelidor e as condições de agitação e a aeração são fatores que podem influenciar o desempenho do bioprocessamento de produção de colorantes por fungos filamentosos, devido a seus efeitos sobre as transferências de quantidade de movimento, calor e massa, bem como sobre a morfologia do microrganismo produtor, que pode estar associada à síntese do colorante (KIM *et al.*, 2002; LV *et al.*, 2017; MOHAMED *et al.*, 2012). Dentre as geometrias de impelidores, os de escoamento misto (axial e radial), como é caso do impelidor orelha de elefante (EE), apresentam a capacidade de conferir um satisfatório efeito de mistura e, devido à geometria das pás, tendem a gerar condições de cisalhamento mais brandas. Os impelidores de escoamento radial, como a tradicional turbina Rushton, são caracterizados pela efetiva quebra de bolhas de ar em diâmetros menores favorecendo a dispersão do gás. No entanto, os impelidores de escoamento radial tendem a gerar regiões de maior turbulência e elevadas tensões de cisalhamento, além de apresentarem um maior consumo de potência (BUSTAMANTE; CERRI; BADINO, 2013; KADIC; HEINDEL, 2010; STANBURY; WHITAKER; HALL, 2017), quando comparado com outros tipos de impelidores.

Estudos como o de Mohamed *et al.* (2012), voltados ao efeito da geometria do impelidor, demonstraram que o emprego do impelidor tipo fita helicoidal de escoamento misto sobre a produção de colorante por *Monascus purpureus* FTC 5391 resultou em um rendimento de colorante por energia consumida cerca de 2,5 vezes maior do que empregando-se o impelidor tipo turbina Rushton. Outros estudos voltados à influência das condições de agitação e da aeração, como o de Musaalbakri *et al.* (2006), verificaram que mantendo-se o nível de tensão de oxigênio dissolvido (T_{OD}) acima de 90% da saturação com oxigênio do ar e empregando-se uma frequência de agitação de 600 rpm, a produtividade em termos de colorante por *Monascus purpureus* FTC 5391 foi 27 e 46% superior em relação aos cultivos conduzidos com frequências de rotação de 1000 e 200 rpm, respectivamente.

Como pode ser observado, ainda que poucos, na literatura são encontrados trabalhos que avaliam individualmente as influências do tipo de impelidor e das condições de operação frequência de agitação (N) e vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}), na produção de biocolorantes. No entanto, não há relatos de trabalhos que avaliem a influência conjunta dessas variáveis, de modo a se encontrar a geometria do sistema de agitação e as condições operacionais mais adequadas para a produção de biocolorantes.

Diante do exposto, nessa etapa da pesquisa avaliou-se os efeitos de três diferentes combinações de impelidores previamente caracterizados por Buffo *et al.* (2016) e das variáveis de operação frequência de agitação (N) e vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}) sobre a

síntese de biocolorante vermelho produzido pelo fungo filamentosso endofítico *T. minnesotensis*. O estudo realizado se deu mediante o emprego de um planejamento fatorial (2^2+3PC) composto de 21 ensaios em biorreator tanque agitado e aerado de 4 L de volume útil. Além disso, também foi realizado um aumento de escala de produção de 4 para 10 L, mediante o emprego de critérios de aumento de escala e de aeração, do bioprocessamento de produção de colorante por *T. minnesotensis* em maiores escalas.

4.2. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1. Microrganismo

Utilizou-se a linhagem *Talaromyces minnesotensis* (CBMAI 2211), um fungo filamentosso endofítico isolado por Romano (2015) de folhas da árvore *Hymenaea sp.* (conhecida como “jatobazeiro”) do cerrado brasileiro, no município de São Carlos, centro-leste do Estado de São Paulo, Brasil (21°58'S, 47°52'W, 850 m acima do nível do mar) (SisGen – número de registro: ACCBF2B).

A linhagem encontra-se armazenada na micoteca do Laboratório de Microbiologia (LaMiB) no Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), bem como depositada na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI/DRM-WDCM 823), na cidade de Paulínia (SP).

4.2.2. Cultura estoque de trabalho

A cultura estoque de trabalho foi obtida através do preparo de tubos de ensaio, contendo cada um deles aproximadamente 40 mL de meio Ágar ISP2 (International *Streptomyces* Project Medium 2) composto de 4 g L⁻¹ de dextrose, 4 g L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g L⁻¹ de extrato de malte e 20 g L⁻¹ de ágar.

Após o preparo do meio, o mesmo teve seu pH ajustado para 5,0 com uma solução de ácido clorídrico (HCl) 2,0 M e, após ser devidamente distribuídos nos tubos de ensaio, foram submetidos ao processo de autoclavagem a 121°C por 20 minutos. Posteriormente, os tubos foram mantidos inclinados em câmara de fluxo laminar sob luz UV até que o meio se solidificasse.

Obtido o meio sólido Ágar ISP2, com uma alça de platina esterilizada estriou-se sobre o meio sólido uma amostra de esporos da colônia de *T. minnesotensis* previamente isolada.

Ao final do processo os tubos foram incubados a 28°C por 10 dias e, posteriormente, conservados em geladeira a 4°C, sendo repicados a cada 30 dias, de modo a garantir a viabilidade das culturas.

4.2.3. Preparo do inóculo

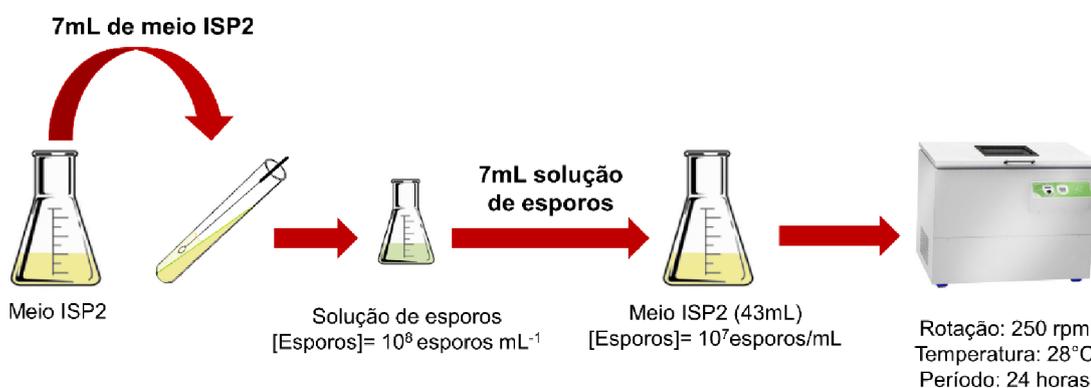
Inicialmente, preparou-se um volume conhecido de meio líquido ISP2 (International *Streptomyces* Project Medium 2) composto de 4 g L⁻¹ de dextrose, 4 g L⁻¹ de extrato de levedura e 10 g L⁻¹ de extrato de malte. O mesmo teve seu pH ajustado em 5,0 com solução de ácido clorídrico 2,0 M, sendo posteriormente autoclavado a 121°C por 20 minutos.

Na sequência, foram adicionados aos tubos inclinados (*slants*) da cultura estoque de trabalho 7 mL de meio ISP2 esterilizado, sendo a superfície da cultura raspada com alça de platina esterilizada para desprendimento dos esporos.

A solução de esporos obtida foi transferida para um Erlenmeyer de 125 mL esterilizado e por meio de contagem em Câmara de Neubauer (MANACHINI; FORTINA E PARTINI, 1987) verificou-se que a solução de esporos apresentava uma concentração próxima a 10⁸ esporos mL⁻¹. Alíquotas de 7 mL da suspensão foram, então, transferidas para Erlenmeyers de 500 mL contendo 43 mL de meio ISP2 estéril, de modo que a concentração final de esporos no inóculo fosse da ordem de 10⁷ esporos mL⁻¹.

Os Erlenmeyers foram mantidos em incubador rotativo (New Brunswick Scientific, modelo C25KC; NOVA ÉTICA, modelo 430RD) a 250 rpm e 28°C por 24 horas. O procedimento de preparo do inóculo está ilustrado na Figura 4.1.

Figura 4.1- Etapas de preparo do inóculo.

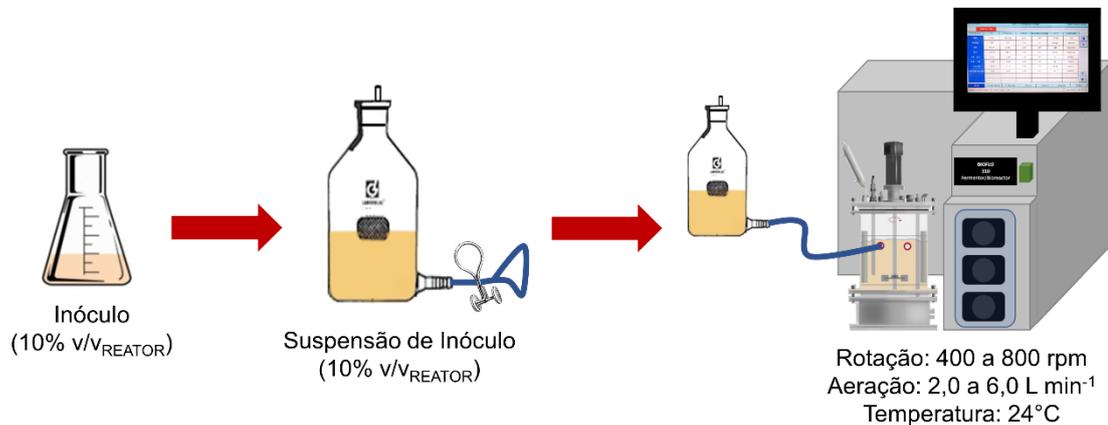


Fonte: Adaptado de Sousa (2018).

Após a obtenção do inóculo, de modo a dar início aos ensaios, teve-se o

desenvolvimento do processo de inoculação do biorreator, conforme ilustrado na Figura 4.2 a seguir.

Figura 4.2- Esquema das etapas do processo de inoculação dos ensaios conduzidos em biorreatores.



Fonte: Acervo pessoal.

Segundo a Figura 4.2, os ensaios desenvolvidos em biorreatores, tiveram seu início após a inoculação da suspensão micelial contida em frasco Mariotte na proporção de 10% (v/v_{útil reator}) ao biorreator, já contendo 90% (v/v_{útil reator}) de meio de cultura Sabouraud (SUDHA *et al.*, 2017) composto de 20,0 g L⁻¹ de dextrose e 10,0 g L⁻¹ de peptona de soja, com pH_{inicial} ajustado em 5,0 com solução de HCl 2,0 M e previamente autoclavado a 121°C por 50 minutos.

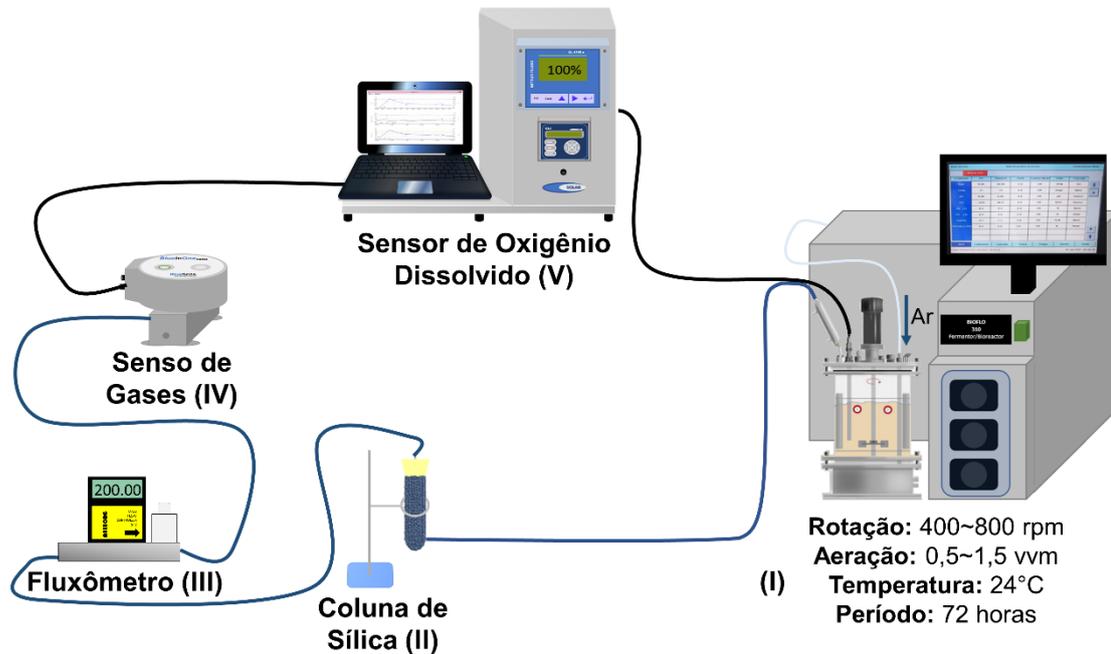
4.2.4. Cultivos em biorreatores tipo tanque agitado e aerado

4.2.4.1. Biorreator tanque agitado e aerado de 4 L de volume útil

Os experimentos em batelada convencional foram conduzidos em biorreator de bancada tipo tanque agitado e aerado de 4 L de volume útil (Bioflo 310, New Brunswick Scientific, EUA). O biorreator de 0,17 m de diâmetro interno foi equipado com quatro hastas defletoras (chicanas), um aspersor de aço inoxidável do tipo anel com diâmetro de 0,065 m, contendo quatro orifícios de 0,8 mm de diâmetro. Conforme ilustrado na Figura 4.3 a seguir, durante os cultivos, o oxigênio dissolvido foi monitorado por um sistema composto por um sensor óptico (InPro 6880i, Mettler Toledo) e um transmissor (Transmitter M400, Mettler Toledo) (V). Na saída do condensador do biorreator (I) foi instalado uma coluna de sílica (II) de modo a retirar a umidade existente no gás saída. Sequencialmente, a corrente do gás de saída seca, foi então controlada, mediante o emprego de um fluxômetro (III), em uma vazão volumétrica de aproximadamente 200 mL min⁻¹, de modo a alimentar um analisador de gases (BlueInOneFER,

BlueSens gas sensor GmbH) (IV), visando o monitoramento online e preciso das frações molares de oxigênio (y_{O_2}) e gás carbônico (y_{CO_2}) no gás de saída.

Figura 4.3- Esquema do sistema de análise de gases e monitoramento do oxigênio dissolvido.

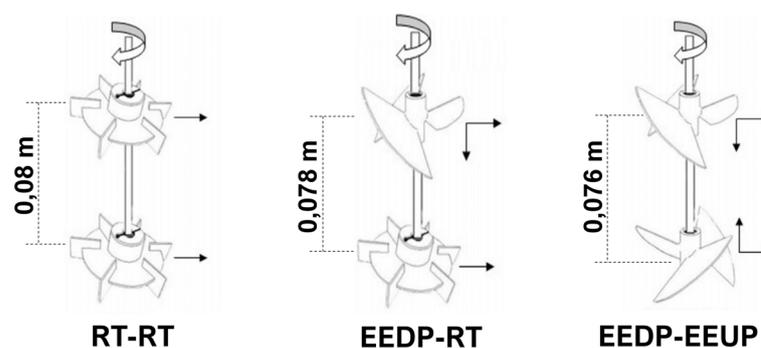


Fonte: Acervo pessoal.

A agitação do sistema foi garantida por meio da utilização combinada, dois a dois, de três diferentes tipos de impelidores instalados no eixo do agitador, a saber, uma turbina Rushton (RT) ($D_i=0,076$ m), que impõe um escoamento radial ao fluido e dois impelidores orelha de elefante de três lâminas ($D_i=0,080$ m) operados nos modos de bombeamento para baixo (EEDP) e para cima (EEUP) (New Brunswick Scientific, EUA).

Baseado no estudo realizado por Buffo *et al.* (2016), foram avaliadas três diferentes combinações de impelidores, conforme ilustrado na Figura 4.4.

Figura 4.4- Esquema das combinações de impelidores avaliadas.



Fonte: Adaptado de Buffo (2016).

Visando avaliar os efeitos das variáveis independentes frequência de agitação (N) e vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}), sobre a produção do biocolorante vermelho pelo fungo filamentosso endofítico *T. minnesotensis*, foram realizados para cada combinação dupla de impelidores um planejamento fatorial completo de dois níveis (2^2) com triplicata do ponto central (3PC), totalizando três planejamentos fatoriais 2^2+3PC , conforme detalhado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1- Planejamento fatorial 2^2+3PC para três diferentes combinações de impelidores.

Combinação de Impelidores	Cultivo	Variáveis Independentes			
		N (rpm)		ϕ_{ar} (vvm)	
RT-RT	1	400	(-1)	0.5	(-1)
	2	400	(-1)	1.5	(+1)
	3	800	(+1)	0.5	(-1)
	4	800	(+1)	1.5	(+1)
	5	600	(0)	1.0	(0)
	6	600	(0)	1.0	(0)
	7	600	(0)	1.0	(0)
EEDP-RT	8	400	(-1)	0.5	(-1)
	9	400	(-1)	1.5	(+1)
	10	800	(+1)	0.5	(-1)
	11	800	(+1)	1.5	(+1)
	12	600	(0)	1.0	(0)
	13	600	(0)	1.0	(0)
	14	600	(0)	1.0	(0)
EEDP-EEUP	15	400	(-1)	0.5	(-1)
	16	400	(-1)	1.5	(+1)
	17	800	(+1)	0.5	(-1)
	18	800	(+1)	1.5	(+1)
	19	600	(0)	1.0	(0)
	20	600	(0)	1.0	(0)
	21	600	(0)	1.0	(0)

Fonte: Acervo pessoal.

Os 21 ensaios foram conduzidos em biorreator de bancada tipo tanque agitado e aerado de 4 L de volume útil a 24°C e sem controle de pH, por um período de 72 horas, onde conforme o planejamento fatorial (2^2+3PC) desenvolvido, a frequência de agitação (N) variou entre 400 e 800 rpm e a vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}) entre 0,5 e 1,5 vvm.

Alíquotas de 20 mL foram retiradas de 8 em 8 horas durante as primeiras 48 horas de cultivo e, posteriormente, a cada 12 horas para determinações analíticas como pH, concentração celular (C_X), concentração de substrato (C_S), produção de colorante (ABS_{500nm}), entre outros.

Todos os experimentos foram realizados em ordem aleatória e os resultados obtidos foram analisados empregando o software Statistica (Statsoft, v. 7).

4.2.5. Variação de escala do bioprocesso de produção de colorante fúngico

Baseado nos ensaios conduzidos em biorreator tanque agitado e aerado de 4 L de volume útil, foi realizado um ensaio em biorreator de bancada tipo tanque agitado e aerado de 10 L de volume útil (Bioflo 310, New Brunswick Scientific, EUA).

Mantendo-se a semelhança geométrica dos biorreatores de 4 e 10 L de volume útil, foi empregado como critério de variação de escala a constância da potência no sistema não aerado por unidade de volume de meio no tanque ($P_0 V^{-1}$) e como critério de aeração utilizou-se a velocidade superficial de ar (v_S) constante.

O ensaio de variação de escala foi realizado em duplicata em um biorreator de bancada tipo tanque agitado e aerado de 10 L de volume útil (Bioflo 310, New Brunswick Scientific, EUA), de 0,21 m de diâmetro interno, equipado com quatro hastes defletoras (chicanas), um aspersor de aço inoxidável do tipo anel com diâmetro de 0,065 m, contendo quatro orifícios de 0,8 mm de diâmetro. Durante os cultivos, assim como nos ensaios em biorreator de 4 L de volume útil, o oxigênio dissolvido foi monitorado por um sistema composto por um sensor óptico (InPro 6880i, Mettler Toledo) e um transmissor (Transmitter M400, Mettler Toledo). A agitação do sistema se deu por meio da utilização combinada de dois impelidores orelha de elefante de três lâminas ($D_i = 0,09m$), distanciados cerca de 0,125 m, sendo o impelidor superior operado direcionando o escoamento para baixo (EEDP), enquanto o impelidor inferior, localizado a 0,055 m da base do biorreator, foi operado direcionando o escoamento de fluido para cima (EEUP) (New Brunswick Scientific, EUA).

De forma a minimizar os eventuais efeitos de arraste no decorrer do bioprocesso, foi alimentado ar saturado ao biorreator, proveniente do borbulhamento de ar seco em um frasco Schott graduado de 2,0 L contendo água destilada esterilizada.

O ensaio foi conduzido com frequência de agitação (N) de 555 rpm, vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}) de 0,51 vvm ($5.0 L min^{-1}$), a 24°C e sem controle de pH.

De modo a acompanhar o pH, o crescimento celular (C_X), o consumo de substrato (C_S) e a produção de colorante (ABS_{500nm}) no decorrer dos cultivos, alíquotas de cerca de 20 mL

foram retiradas de 8 em 8 horas durante as primeiras 48 horas de ensaio e, posteriormente, a cada 12 horas até o término do ensaio caracterizado pela estabilização da produção de colorante.

4.2.6. Metodologia analítica

Dentre as determinações analíticas, a avaliação do pH, a obtenção da concentração celular (C_X) pelo método de gravimetria, a determinação da concentração de dextrose (C_S) pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência e a quantificação da produção de colorante via leitura da absorbância (ABS_{500nm}) se deu em ambas as escalas avaliadas.

As demais análises referentes à reologia do caldo de cultivo e ao balanço gasoso do bioprocessamento foram realizadas apenas nos ensaios conduzidos no biorreator de 4 L de volume útil.

4.2.6.1. Determinação do pH

As amostras do caldo de cultivo tiveram seu pH aferido por meio de um pHmetro digital (QX 1500, Qualxtron).

4.2.6.2. Determinação da concentração celular (C_X)

A concentração de biomassa fúngica foi quantificada mediante o método gravimétrico, onde uma alíquota de caldo de volume conhecido foi filtrada em membrana de nitrato de celulose de 0,45 μm de diâmetro de poro, previamente seca e pesada. Posteriormente, o material retido foi submetido à secagem em estufa a 60°C por um período de 48 horas. Ao final desse período, o material foi resfriado em um dessecador por 15 min e pesado de modo a obter a concentração celular por meio da Equação 4.1.

$$C_X = \frac{(m_{Final} - m_{Inicial})}{V_{amostra}} \quad (4.1)$$

onde:

C_X : concentração celular ($g L^{-1}$).

$m_{Inicial}$: massa da membrana seca (g).

m_{Final} : massa da membrana + biomassa após o processo de secagem (g).

$V_{amostra}$: volume de amostra (L).

O filtrado resultante da etapa de separação das células foi destinado às análises de teores de glicose e de biocolorante.

4.2.6.3. Determinação da concentração de dextrose (C_s)

A concentração de dextrose foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Inicialmente, uma parcela do sobrenadante do caldo isento de células foi devidamente diluída em água ultrapura Milli-Q e, posteriormente, filtrada em microfiltros de nylon 0,22 μm de modo a se dar início as injeções.

De forma a se determinar a concentração de dextrose, volumes de 20 μL de amostra, diluída e filtrada, foram injetados em um sistema cromatográfico (e2695, Waters, EUA), equipado com um detector de índice de refração (2414, Waters, EUA) operado a 32°C e uma coluna Sugar-Pak I (300 x 6,5 mm, 10 μm , Waters) mantida a 80°C. Como eluente foi utilizado água ultrapura a uma vazão de 0,5 mL min^{-1} e soluções de dextrose anidra P.A (Labsynth) nas concentrações entre 0,1 a 25 g L^{-1} foram utilizadas como padrões.

4.2.6.4. Determinação da produção de corante vermelho ($\text{ABS}_{500\text{nm}}$)

A produção de biocolorante foi avaliada pela medida da absorbância do sobrenadante filtrado considerando o fator de diluição de cada amostra. Para medida de absorbância utilizou-se o espectrofotômetro-UV (Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences).

De modo a se determinar o comprimento de onda correspondente à máxima absorção para o corante vermelho, realizou-se o escaneamento da amostra do caldo de cultivo livre de células na faixa de 300 a 600 nm. Os resultados obtidos foram expressos em termos de Unidades de Absorbância a 500 nm (UA), o que concorda com a máxima absorção para corantes vermelhos reportados pela literatura (CHATTERJEE *et al.*, 2009; CHRISTIE, 2001; SINGH *et al.*, 2015).

4.2.6.5. Análise reológica

Os parâmetros reológicos índice de consistência (K) e índice de comportamento de escoamento (n) foram estimados pelo modelo da Lei da Potência (Equação 4.2) a partir dos reogramas obtidos usando um reômetro digital de cilindro concêntrico (LV-DV-III-plus, Brookfield Engineering Laboratories Inc.) à temperatura de 24°C, controlada através de um banho termostaticado (TC-650, LV-DV-III-plus, Brookfield Engineering Laboratories Inc.).

$$\tau = K \cdot (\dot{\gamma})^n \quad (4.2)$$

onde:

$\dot{\gamma}$: taxa de cisalhamento (s^{-1}).

τ : tensão de cisalhamento (Pa).

K : índice de consistência (Pa sⁿ).

n : índice de comportamento de escoamento (-).

Na análise reológica foram utilizados diferentes volumes de amostras com base nos *spindles* empregados (ULA; SC4-18; SC4-27; SC4-31 e SC4-34). Como programação de análise para todas as alíquotas, empregou-se uma velocidade inicial de rotação do spindle de 250 rpm com decréscimos de 10 rpm a cada 15 s, totalizando cerca de 6 min de análise por amostra. O emprego de ciclos de curta duração foi aplicado a fim de minimizar possíveis efeitos de sedimentação e, conseqüentemente, garantir satisfatória homogeneização das amostras.

4.2.6.6. Parâmetros hidrodinâmicos

Obtidos os parâmetros reológicos K e n , foram então estimados para cada um dos 21 ensaios os seguintes parâmetros hidrodinâmicos: taxa de dissipação de energia cinética (ϵ), velocidade média de cisalhamento ($\dot{\gamma}_m$), viscosidade aparente (μ_{ap}) e microescala de turbulência de Kolmogorov (λ_K).

4.2.6.6.1. Velocidade média de cisalhamento ($\dot{\gamma}_m$) e taxa de dissipação de energia (ϵ)

Inicialmente, para estimativa da velocidade média de cisalhamento ($\dot{\gamma}_m$) determinou-se para cada um dos bioensaios realizados, o consumo de potência do sistema gaseificado (P_g).

Por meio do emprego do aparato experimental proposto por Corrêa *et al.* (2016) e utilizando uma solução de goma xantana (2,5 g L⁻¹), foram medidos os valores de força (F) necessária para agitação do fluido considerando as três combinações de impelidores (RT-RT, EEDP-RT e EEDP-EEUP) operados em diferentes condições de agitação (N) de 400 a 1000 rpm e mantendo-se o sistema isento de aeração.

Obtidos os valores de força (F), foram calculados os valores de consumo de potência para o sistema não gaseificado (P_0) pela Equação 4.3, de acordo com o proposto por Buffo *et al.* (2016).

$$P_0 = 1.10 \cdot F \cdot N \quad (4.3)$$

onde:

P_0 : consumo de potência do sistema não gaseificado (W).

F : força (N).

N: frequência de agitação (rpm).

Após obtidos os valores de consumo de potência para os sistemas não gaseificados (P_0) referentes a cada conjunto de impelidores (RT-RT, EEDP-RT e EEDP-EEUP) e utilizando-se os resultados de consumo de potência (P_g) obtidos por Buffo *et al.* (2016) para as mesmas associações de impelidores sob condições de agitação (N) e aeração (ϕ_{ar}) similares, foram estimados os coeficientes “c” característicos de cada sistema de impelidores (RT-RT, EEDP-RT e EEDP-EEUP), conforme descrito pela Equação 4.4 (MICHEL; MILLER, 1962).

$$P_g = c \cdot \left(\frac{P_0^2 \cdot N \cdot D_i^3}{Q^{0.56}} \right)^{0.45} \rightarrow c = \frac{P_g}{\left(\frac{P_0^2 \cdot N \cdot D_i^3}{Q^{0.56}} \right)^{0.45}} \quad (4.4)$$

onde:

P_g : consumo de potência do sistema gaseificado (W).

c: coeficiente referente à Equação 4.4.

P_0 : consumo de potência do sistema não gaseificado (W).

N: frequência de agitação (rpm).

D_i : diâmetro do impelidor (m).

Q: vazão de alimentação de ar ($m^3 s^{-1}$).

Estimados os valores do coeficiente “c” para cada conjunto de impelidores, foram então calculados os consumos de potência para os sistemas gaseificados (P_g) pela Equação 4.4, variando-se a frequência de agitação (N) e a vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}) dentro da faixa de operação prevista para os cultivos.

Posteriormente, foram estimados os valores da taxa de dissipação de energia (ε) e da velocidade média de cisalhamento ($\dot{\gamma}_m$) pelas Equações 4.5 e 4.6 (PÉREZ *et al.*, 2006) para cada um dos 21 ensaios realizados.

$$\varepsilon = \frac{P_g}{V \cdot \rho} \quad (4.5)$$

$$\dot{\gamma}_m = \left(\frac{1}{K} \cdot \frac{P_g}{V} \right)^{\left(\frac{1}{n+1} \right)} \quad (4.6)$$

onde:

ε : taxa de dissipação de energia cinética ($W kg^{-1}$).

P_g : consumo de potência do sistema gaseificado (W).

V: volume de líquido no tanque (L).

ρ : massa específica (kg m⁻³).

$\dot{\gamma}_m$: velocidade média de cisalhamento (s⁻¹).

K: índice de consistência (Pa sⁿ).

n: índice de comportamento de escoamento (-).

4.2.6.6.2. Viscosidade aparente (μ_{ap})

Definida como a razão entre a tensão (τ_m) e a taxa de cisalhamento média ($\dot{\gamma}_m$), a viscosidade aparente (μ_{ap}) de fluidos não-Newtonianos pseudoplásticos, cuja reologia é descrita pelo modelo da lei da potência, foi calculada ao longo dos cultivos pela Equação 4.7, uma vez que caldos de cultivo envolvendo fungos filamentosos com crescimento disperso apresentam tal comportamento (STANBURY; WHITAKER; HALL, 2017).

$$\mu_{ap} = \frac{\tau_m}{\dot{\gamma}_m} = K \cdot \dot{\gamma}_m^{n-1} \quad (4.7)$$

onde:

μ_{ap} : viscosidade aparente (cP).

τ_m : tensão média de cisalhamento (Pa).

$\dot{\gamma}_m$: velocidade média de cisalhamento (s⁻¹).

K: índice de consistência (Pa sⁿ).

n: índice de comportamento de escoamento (-).

4.2.6.6.3. Microescala de turbulência de Kolmogorov (λ_K)

A microescala de turbulência de Kolmogorov (λ_K), caracterizada por descrever o potencial mecanismo responsável por danos nas estruturas celulares devido ao efeito do tamanho do microturbilhão (LI *et al.*, 2002), foi também calculada ao longo dos cultivos em função da viscosidade cinemática ($\nu = \mu_{ap}/\rho$) e da taxa de dissipação de energia cinética (ε), conforme descrito pela Equação 4.8 (BUFFO *et al.*, 2016; COLLIGNON *et al.*, 2010).

$$\lambda_K = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon}\right)^{1/4} = \left(\frac{\mu_{ap}^3}{\left(\frac{P_g}{V}\right) \cdot \rho^2}\right)^{1/4} = \left(\frac{(K \cdot \dot{\gamma}_m^{n-1})^3}{\left(\frac{P_g}{V}\right) \cdot \rho^2}\right)^{1/4} \quad (4.8)$$

onde:

λ_K : microescala de turbulência de Kolmogorov (m).

ν : viscosidade cinemática ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$).

ϵ : taxa de dissipação de energia cinética (W kg^{-1}).

μ_{ap} : viscosidade aparente (Pa s).

P_g : consumo de potência do sistema gaseificado (W).

V : volume de líquido no tanque (m^3).

ρ : massa específica (kg m^{-3}).

$\dot{\gamma}_m$: velocidade média de cisalhamento (s^{-1}).

K : índice de consistência (Pa s^n).

n : índice de comportamento de escoamento (-).

4.2.6.7. Consumo e transferência de oxigênio

Por meio do monitoramento contínuo das frações molares de oxigênio (y_{O_2}) e de gás carbônico (y_{CO_2}) no gás de saída ao longo de todos os 21 ensaios realizados, foi possível quantificar a velocidade global de consumo de oxigênio ($Q_{O_2}X$), o percentual de oxigênio transferido (O_{2-T}) e o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$), empregando o método do balanço gasoso de acordo com a metodologia proposta por Badino, Facciotti e Schmidell (2001).

Primeiramente, determinou-se a velocidade global de consumo de oxigênio ($Q_{O_2}X$) a partir do balanço molar para o oxigênio na fase gasosa (Equação 4.9):

$$Q_{O_2}X = \frac{\dot{n}_{entrada} y_{O_2}^{entrada} - \dot{n}_{saída} y_{O_2}^{saída}}{V} \quad (4.9)$$

onde:

$Q_{O_2}X$: velocidade global de consumo de oxigênio ($\text{mol}_{O_2} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$).

$\dot{n}_{entrada}$: vazão molar de gás na entrada do biorreator ($\text{mol}_{ar} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$).

$y_{O_2}^{entrada}$: fração molar de oxigênio no gás de entrada ($\text{mol}_{O_2} \text{mol}_{ar}^{-1}$).

$\dot{n}_{saída}$: vazão molar de gás na saída do biorreator ($\text{mol}_{ar} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$).

$y_{O_2}^{saída}$: fração molar de oxigênio no gás de saída ($\text{mol}_{O_2} \text{mol}_{ar}^{-1}$).

V : volume de líquido no tanque (L).

A vazão molar de entrada ($\dot{n}_{entrada}$) foi monitorada por meio do emprego de um

fluxômetro (AALBORG, GFC thermal Mass Flow Controller) e a vazão molar de saída ($\dot{n}_{saída}$) foi calculada a partir do balanço molar para o nitrogênio (Equação 4.10).

$$\dot{n}_{saída} = \frac{0.79 \dot{n}_{entrada}}{1 - y_{O_2}^{saída} - y_{CO_2}^{saída}} \quad (4.10)$$

onde:

$\dot{n}_{saída}$: vazão molar de gás na saída do biorreator ($\text{mol}_{\text{ar}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$).

$\dot{n}_{entrada}$: vazão molar de gás na entrada do biorreator ($\text{mol}_{\text{ar}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$).

$y_{O_2}^{saída}$: fração molar de oxigênio no gás de saída ($\text{mol}_{O_2} \text{mol}_{\text{ar}}^{-1}$).

$y_{CO_2}^{saída}$: fração molar de gás carbônico no gás de saída ($\text{mol}_{CO_2} \text{mol}_{\text{ar}}^{-1}$).

Determinada a velocidade global de consumo de oxigênio ($Q_{O_2}X$), foi possível se estimar o percentual de oxigênio transferido (O_{2-T}), segundo a Equação 4.11.

$$O_{2-T} = \left(\frac{\int_0^t (Q_{O_2}X \cdot V)}{\int_0^t (\dot{n}_{entrada} \cdot y_{O_2}^{entrada})} \right) \cdot 100 \quad (4.11)$$

onde:

O_{2-T} : percentual de oxigênio transferido (%).

$Q_{O_2}X$: velocidade global de consumo de oxigênio ($\text{mol}_{O_2} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$).

V: volume de líquido no tanque (L).

$\dot{n}_{entrada}$: vazão molar de gás na entrada do biorreator ($\text{mol}_{\text{ar}} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$).

$y_{O_2}^{entrada}$: fração molar de oxigênio no gás de entrada ($\text{mol}_{O_2} \text{mol}_{\text{ar}}^{-1}$).

Posteriormente, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$) foi determinado considerando a hipótese de estado estacionário e empregando o balanço molar para o oxigênio dissolvido, de acordo com a Equação 4.12:

$$k_L a = \frac{Q_{O_2}X}{C^* - C} \quad (4.12)$$

onde C^* é a concentração de saturação de oxigênio dissolvido na fase líquida em equilíbrio com o ar estimada pela Lei de Henry (Equação 4.13) e C corresponde à concentração de oxigênio dissolvido no caldo de cultivo no estado estacionário, determinado pelo produto do percentual da tensão de oxigênio dissolvido ($T_{OD}/100$), quantificada pelo sensor óptico (InPro 6880i,

Mettler Toledo), e a concentração de saturação de oxigênio dissolvido no meio de cultura em equilíbrio com o ar (C_0^*), segundo a Equação 4.14.

$$C^* = He_{(T_{sistema})} p_{O_2} = He_{(T_{sistema})} \cdot y_{O_2(t=0h)}^{saída} \cdot P_{sistema} \quad (4.13)$$

$$C = \left(\frac{T_{OD}}{100}\right) \cdot C_0^* \quad (4.14)$$

onde:

C^* : concentração de saturação de oxigênio dissolvido na fase líquida em equilíbrio com ar na fase gasosa ($\text{mol}_{O_2} \text{L}^{-1}$).

$He_{(T_{sistema})}$: constante de Henry na temperatura de operação ($\text{mol}_{O_2} \text{L}^{-1} \text{atm}^{-1}$).

p_{O_2} : pressão parcial de oxigênio (atm).

$y_{O_2(t=0h)}^{saída}$: fração molar de oxigênio no gás de saída em $t = 0\text{h}$ ($\text{mol}_{O_2} \text{mol}_{ar}^{-1}$).

$P_{sistema}$: pressão total do sistema (atm).

C : concentração de oxigênio dissolvido no caldo de cultivo no estado estacionário ($\text{mol}_{O_2} \text{L}^{-1}$).

T_{OD} : tensão de oxigênio dissolvido (%).

C_0^* : concentração de saturação de oxigênio dissolvido no meio de cultura em equilíbrio com o ar antes do início do cultivo ($\text{mol}_{O_2} \text{L}^{-1}$).

4.2.6.8. Tempos característicos

Para a identificação das etapas limitantes ao longo dos cultivos, foram calculados a partir das Equações 4.15 e 4.16, os tempos característicos referentes a transferência (t_{OTR}) e ao consumo de oxigênio (t_{OUR}), similarmente ao realizado por Gomez *et al.* (2015).

$$t_{OTR} = \frac{1}{(k_L a)_M} \quad (4.15)$$

$$t_{OUR} = \frac{C^*_{Médio}}{(Q_{O_2 X})_{Máxima}} \quad (4.16)$$

onde:

t_{OTR} : tempo característico referente a transferência de oxigênio (h).

$(k_L a)_M$: valor médio do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1}).

t_{OUR} : tempo característico referente ao consumo de oxigênio (h).

$C^*_{Médio}$: valor médio da concentração de saturação de oxigênio dissolvido na fase líquida em equilíbrio com ar ($\text{mol}_{O_2} \text{L}^{-1}$).

$(Q_{O_2}X)_{Máxima}$: máxima velocidade global de consumo de oxigênio atingida no decorrer do cultivo ($\text{mol}_{O_2} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$).

Foi também estimado o tempo de mistura (t_M) através de ensaios em biorreator tanque agitado e aerado de 4 L de volume útil empregando uma solução de goma xantana 0,3 % m/m, de modo a simular o caldo de cultivo.

Um volume de 4 L de solução de goma xantana 0,3 % m/m (fluido não-Newtoniano) foi transferida ao biorreator tanque agitado e aerado de 4 L de volume útil, contendo 4 termopares acoplados em seu interior para medir a temperatura em diferentes pontos do biorreator. Após o preparo do sistema e o ajuste das condições de agitação (N) e aeração (Φ_{ar}), simulando o ambiente o qual se desenvolve o bioprocessos, cerca de 10% (v/v) de solução de goma xantana foram retirados do biorreator e aquecidos em micro-ondas até atingir a temperatura de 70°C. Posteriormente, a solução aquecida foi então retornada ao biorreator e, mediante o acompanhamento da temperatura em 4 diferentes pontos do tanque, obteve-se o tempo necessário para que a temperatura no interior do biorreator se estabilizasse. O tempo correspondente ao efeito de mistura (t_M) foi o equivalente a 95% do tempo necessário para a estabilização da temperatura no interior do biorreator.

Ressalta-se que a estimativa do tempo de mistura (t_M) foi realizada para os três conjuntos de impelidores e sob as 5 condições operacionais avaliadas.

4.2.7. Análise estatística

4.2.7.1. Desejabilidade Global

Visando analisar os efeitos das variáveis independentes (associação de impelidores e condições de agitação e aeração) sobre as variáveis-resposta principais, quais sejam, produção (UA), produtividade (UA h^{-1}), produção específica (UA g_X^{-1}) e produtividade específica (UA $\text{g}_X^{-1} \text{h}^{-1}$) de colorante, que expressam o desempenho do processo de produção, empregou-se o tratamento estatístico proposto por Derringer e Suich (1980), no qual por meio de uma função matemática tem-se a sintetização de várias variáveis em uma única variável-resposta denominada Desejabilidade Global (D_G).

No cálculo da Desejabilidade Global (D_G), considerando os 21 ensaios realizados em

biorreator, uma vez que as variáveis-resposta apresentaram correlação entre si, realizou-se inicialmente o cálculo da Desejabilidade Individual (D_I) (Equação 4.17) de cada variável-resposta principal. Objetivando-se maximizar todas as 4 variáveis-resposta e considerando-as de igual relevância, empregou-se o peso de cada variável equivalente a 1. Posteriormente, por meio da aplicação de uma média geométrica sobre os valores obtidos de Desejabilidade Individual (D_I), estimou-se o valor de Desejabilidade Global (D_G) para os 21 ensaios realizados, conforme dado pela Equação 4.18 (DERRINGER; SUICH, 1980):

$$D_{I(m,z)} = \left(\frac{y(m,z) - L_m}{T_m - L_m} \right)^{s_m} \quad (4.17)$$

$$D_{Gz} = \sqrt[r]{\prod_{m=1}^r D_{I(m,z)}} \quad (4.18)$$

onde:

$D_{I(m,z)}$: Desejabilidade individual da variável-resposta m no ensaio z.

m: variável-resposta.

z: n° do experimento.

$y(m,z)$: valor da variável resposta m no ensaio z.

L_m : menor valor da variável resposta m considerando todos os ensaios.

T_m : maior valor da variável resposta m considerando todos os ensaios.

s_m : peso atribuído a variável-resposta m.

D_{Gz} : Desejabilidade global correspondente ao ensaio z.

r: quantidade total de tipos de variáveis- resposta.

De posse dos valores de Desejabilidade Global (D_G), que engloba as quatro variáveis-resposta em uma única variável, realizou-se o estudo dos efeitos padronizados das condições operacionais de processo, via diagrama de Pareto, sobre as 4 variáveis-resposta principais sintetizadas na variável resposta Desejabilidade Global (D_G).

4.2.7.2. Análise dos Efeitos Padronizados

Inicialmente, realizou-se uma análise dos efeitos padronizados, os quais são caracterizados pela razão entre o valor do efeito e seu respectivo erro padrão, sobre os valores obtidos de Desejabilidade Global (D_G), considerando três variáveis de processo independentes, quais sejam, a frequência de agitação (N), a vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}) e a

combinação de impelidores (CI). Posteriormente, três novas análises de efeitos padronizados sobre os valores de Desejabilidade Global (D_G) foram realizadas, individualmente, para cada combinação de impelidores (RT-RT; EEDP-RT e EEDP-EEUP), considerando como variáveis de processo independentes apenas a frequência de agitação (N) e a vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}).

Para a realização de todas as análises de efeitos padronizados, expressas via diagrama de Pareto considerando nível de significância de 95%, empregou-se o software Statistica (Statsoft, v. 7).

4.2.7.3. Correlações entre as variáveis-resposta

Por meio da utilização do software Statistica (Statsoft, v. 7) e considerando o nível de significância de 95%, avaliou-se a existência de correlação entre as variáveis-resposta principais: produção (ABS_{500} em UA), produtividade (P_P em UA h^{-1}), produção específica ($ABS_{500/X}$ em UA g_X^{-1}) e produtividade específica ($P_{P/X}$ em UA $g_X^{-1} h^{-1}$) de biocolorante e as variáveis-resposta secundárias: velocidade global média de consumo de oxigênio ($(Q_{O_2}X)_M$ em $mmol O_2 L^{-1} h^{-1}$), percentual de oxigênio transferido (O_{2-T} em %), valor médio do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($(k_L a)_M$ em h^{-1}), tensão mínima de oxigênio dissolvido (T_{OD-Min} em % C_0^*), valor médio da velocidade média de cisalhamento ($\dot{\gamma}_{m-M}$ em s^{-1}), valor médio da viscosidade aparente (μ_{ap-M} em cP), valor médio da taxa de dissipação de energia (ε_M em $W kg^{-1}$) e o valor médio da microescala de Kolmogorov (λ_{K-M} em μm).

As variáveis-resposta secundárias, no caso consumo médio de oxigênio ($(Q_{O_2}X)_M$ em $mmol O_2 L^{-1} h^{-1}$), coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio médio ($(k_L a)_M$ em h^{-1}), valor médio da velocidade média de cisalhamento ($\dot{\gamma}_{m-M}$ em s^{-1}), viscosidade aparente média (μ_{ap-M} em cP), taxa média de dissipação de energia (ε_M em $W kg^{-1}$) e o valor médio da microescala de Kolmogorov (λ_{K-M} em μm), foram calculadas com base no teorema da média considerando o tempo de 0 h até o tempo em que foi alcançada a absorvância máxima durante o bioprocessamento.

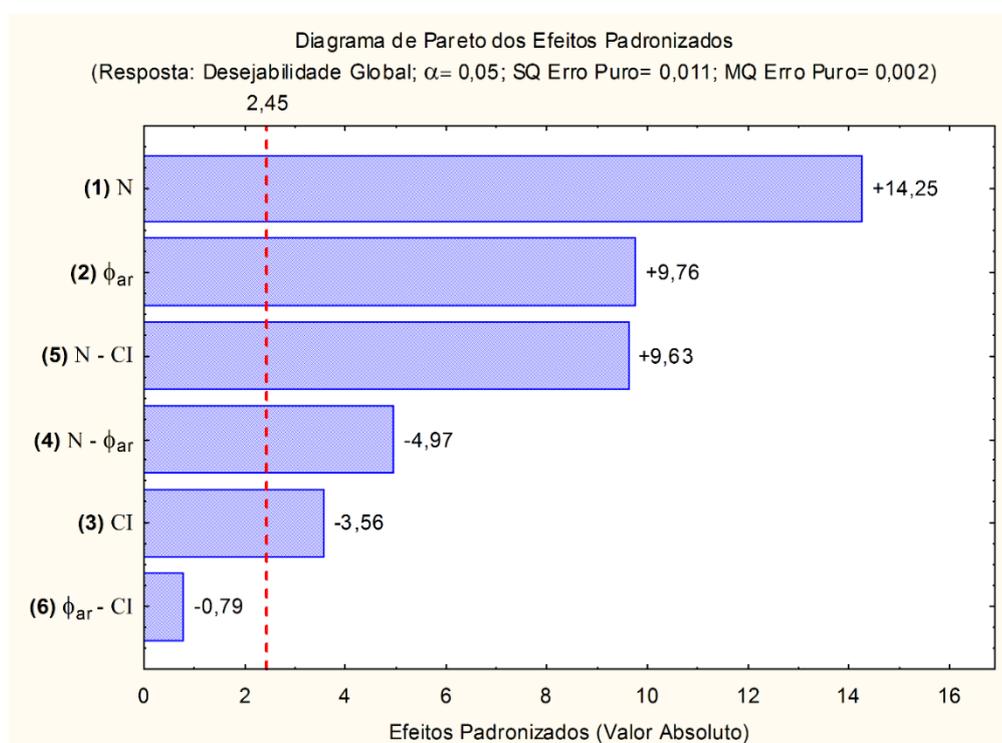
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Efeitos Padronizados das variáveis agitação, aeração e combinação de impelidores sobre o bioprocessamento

Conforme o planejamento experimental desenvolvido e considerando como variáveis de processo independentes a frequência de agitação (N), a vazão específica de alimentação de

ar (ϕ_{ar}) e a combinação de impelidores (CI), constatou-se por meio da análise de efeitos padronizados sobre a variável-resposta Desejabilidade Global (D_G), que as três variáveis independentes apresentam estatística relevância no desempenho do bioprocesso de produção do corante natural vermelho por *T. minnesotensis* em biorreator convencional, segundo ilustra a Figura 4.5.

Figura 4.5- Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados ao nível de significância de 95% correspondente às três variáveis independentes (frequência de agitação (N), vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}) e combinação de impelidores (CI)) e suas respectivas interações sobre a variável resposta Desejabilidade Global (D_G) estimada a partir dos 21 ensaios realizados em biorreator convencional.



O diagrama de Pareto (Figura 4.5), resultante de uma abordagem global do processo de produção de biocolorante vermelho, ilustra que todas as variáveis principais e suas respectivas interações, com exceção da interação ϕ_{ar} -CI (6), apresentaram efeitos significativos sobre o bioprocesso, ao nível de significância de 95%.

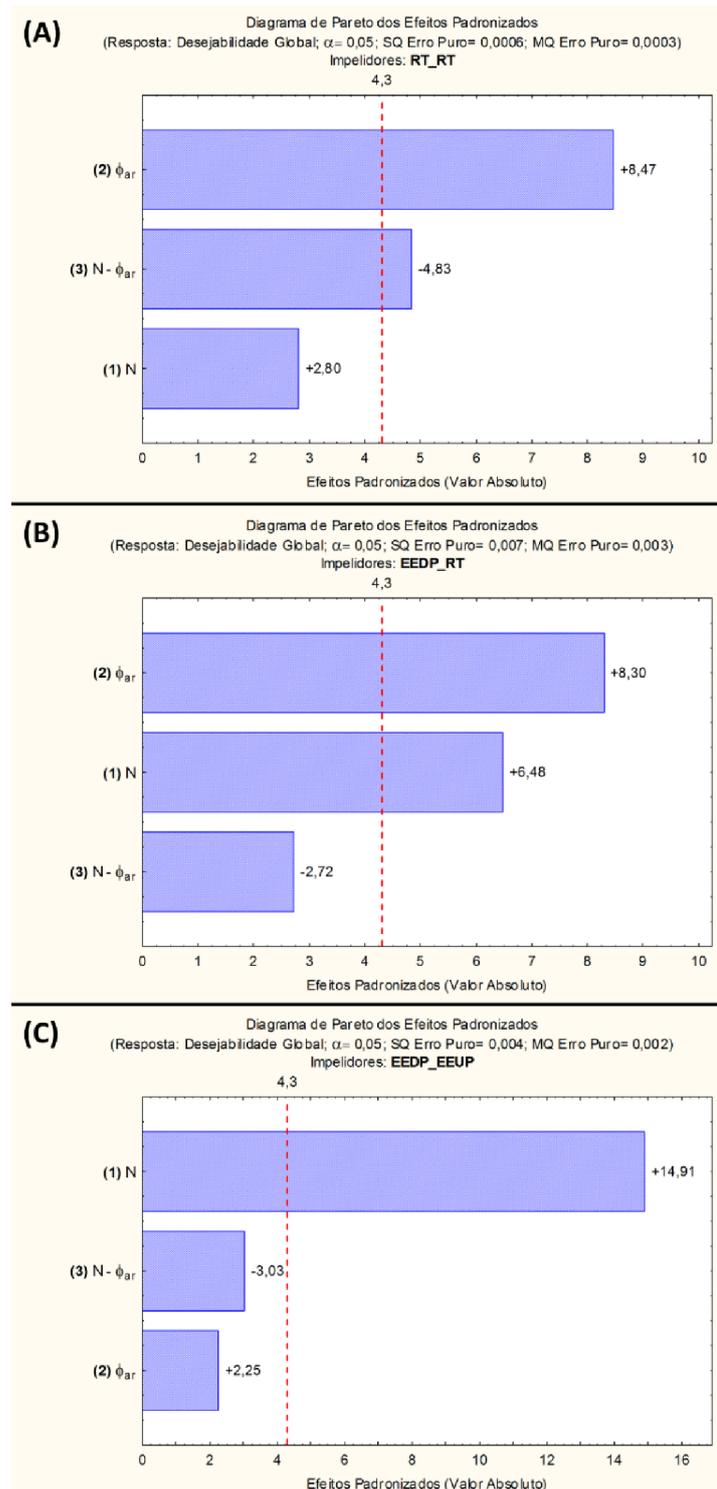
A significância obtida para as três variáveis independentes, corrobora as alternativas a serem empregadas em cultivos submersos de fungos filamentosos em sua forma dispersa, visando superar os principais obstáculos encontrados no decorrer destes cultivos. Uma vez caracterizados por apresentar caldos viscosos e de caráter não-Newtoniano, as principais barreiras encontradas estão relacionadas às transferências de massa, calor e quantidade de

movimento e a homogeneidade da mistura. Essas limitações podem possivelmente ser contornadas mediante ao arranjo balanceado das três variáveis significativas do processo: frequência de agitação (N), vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}) e combinação de impelidores (CI) (STANBURY; WHITAKER; HALL, 2017).

Ao analisar as magnitudes relativas de cada efeito, verificou-se que as variáveis N (1), ϕ_{ar} (2) e a interação N -CI (5) compõem 78% dos efeitos positivos e significativos ao bioprocessamento, ao passo que a interação N - ϕ_{ar} (4) e a variável CI (3), configuram cerca de 20% dos efeitos negativos aos quais o bioprocessamento pode vir a se encontrar exposto, a depender das configurações operacionais empregadas.

Muito embora a variável CI (3) se manifeste de forma menos pronunciada quando comparada às demais variáveis independentes, N e ϕ_{ar} , tendo em vista o fato de todos os efeitos principais apresentarem relevância estatística sobre o desempenho do bioprocessamento em estudo, optou-se por realizar para cada combinação de impelidores, uma nova análise dos efeitos padronizados sobre a variável resposta Desejabilidade Global (D_G). Visando obter um conhecimento mais descritivo e detalhado do bioprocessamento, na nova análise dos efeitos padronizados foram considerados como variáveis de processo independentes apenas a frequência de agitação (N) e a vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}), conforme ilustrado na Figura 4.6.

Figura 4.6- Diagramas de Pareto dos efeitos padronizados ao nível de significância de 95% correspondente às variáveis independentes (frequência de agitação (N) e vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar})) e suas respectivas interações sobre a variável resposta Desejabilidade Global (D_G), correspondente as seguintes combinações de impelidores: **(A)** turbina Rushton (RT-RT), **(B)** combinação híbrida (EEDP-RT) e **(C)** orelha de elefante de três lâminas (EEDP-EEUP).



Mediante a nova análise de efeitos padronizados (Figura 4.6) foi observado que para cada configuração de impelidores o sistema tende a responder de forma diferente quanto às variáveis de processo mais favoráveis. Ao analisar o sistema operado com duas turbinas Rushton (RT-RT), Figura 4.6A, foi verificado que a vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar} - 2) apresenta um efeito significativo sobre o bioprocessamento na ordem de 53%, ao passo que, embora o efeito principal da frequência de agitação (N - 1) seja estatisticamente insignificante para esta configuração de impelidores, a interação $N - \phi_{ar}$ (3) confere um efeito significativo de 30%. Desta forma, segundo a análise de efeitos padronizados para o sistema constituído de dois impelidores Rushton (RT-RT), a produção de biocolorante por *T. minnesotensis* tende a ser favorecida quando o biorreator é operado a altos níveis de vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}) e baixas frequências de agitação (N).

A geometria do impelidor turbina Rushton é caracterizada por contribuir na geração de regiões de alta turbulência e conseqüentemente elevado cisalhamento próximas às pás do impelidor, favorecendo a efetiva fragmentação das bolhas de ar e na dispersão gás-líquido (KADIC; HEINDEL 2010). Entretanto, quando empregada sob alta frequência de agitação (N) e baixa vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}) em caldos de cultivo que tendem a adquirir expressiva viscosidade no decorrer do bioprocessamento, o escoamento do caldo do impelidor à parede do tanque, torna-se comprometido devido a redução da transferência de quantidade de movimento. Essa limitação contribui para uma alteração das zonas de mistura, acarretando no surgimento ou aumento de zonas de misturas pobres, onde os processos de transferência tendem a ser prejudicados, resultando em uma baixa eficiência do bioprocessamento como um todo (BANDAIPHET; PRASERTSAN, 2006; KADIC; HEINDEL, 2010). Somado a isto, o emprego do conjunto de turbinas Rushton (RT-RT) operado com altos níveis de vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}) e frequência de agitação (N), pode vir a resultar no fenômeno de inundação (*flooding*). Nesse fenômeno, a baixa eficiência de dispersão das bolhas de gás no biorreator resulta em um acúmulo das mesmas na região próxima às pás do impelidor, levando o conjunto de impelidores a rotacionarem eventualmente em bolsões de ar (KADIC; HEINDEL, 2010; STANBURY; WHITAKER; HALL, 2017) sem efetiva transferência de quantidade de movimento e promoção de mistura.

Dessa forma, a variação da viscosidade aparente no decorrer do cultivo, tende a ser determinante no desempenho operacional das turbinas Rushton. Caldos de cultivo em que a viscosidade aparente tende a ser baixa, as turbinas Rushton quando operadas com os altos níveis de vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}) e frequência de agitação (N), tendem a beneficiar

a transferência de oxigênio no biorreator, conforme observado por Buffo *et al.* (2016). Os autores ao empregarem o conjunto de impelidores turbinas Rushton (RT-RT) sobre uma solução de goma xantana 2,5% m/v (fluido não-Newtoniano), com faixas de viscosidade aparente da ordem de 1,8 a 3,0 cP, variando a frequência de agitação (N) de 600 a 1000 rpm e a vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}) de 0,4 a 1,2 vvm, verificaram um aumento de cerca de 2 vezes no coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}). Isso demonstra que fluidos não-Newtonianos com baixa viscosidade aparente tendem a ter os fenômenos de transferência favorecidos sob altos níveis de vazão específica de ar (Φ_{ar}) e frequência de agitação (N) diante de um escoamento radial.

Entretanto, a medida em que se tem um aumento expressivo da viscosidade aparente dos caldos de cultivo, conforme o presente trabalho ($29,6 < \mu_{ap} \text{ (cP)} < 113,7 \text{ cP}$), embora a geometria do impelidor seja favorável aos fenômenos de transferência, a viscosidade aparente passa a afetar a eficiência dos impelidores turbina Rushton. Assim, à medida em que se tem caldos mais viscosos, o emprego de altos níveis de frequência de agitação (N) e vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}), no geral, tende a desfavorecer a produção de alguns biocompostos. Esse resultado encontra-se de acordo com o observado por Kim *et al.* (2002) e Bandaiphet e Prasertsan (2006). Os autores avaliaram em biorreator convencional tipo tanque agitado e aerado a produção do pigmento *Monascus* pelo fungo *Monascus sp. J101* e do exopolissacarídeo pela bactéria *Enterobacter cloacae WD7*, respectivamente, sob diferentes condições de operação, e verificaram que o aumento da frequência de agitação (N) resultou em uma baixa eficiência de produção de ambos os biocompostos.

Sendo assim, o eventual favorecimento do processo de produção de biocolorante pelo fungo filamentosso *T. minnesotensis*, quando empregada a combinação de duas turbinas Rushton sob elevados níveis de Φ_{ar} associados a baixos níveis N, corrobora as alternativas operacionais adotadas por outros bioprocessos, visando obter uma elevada eficiência de produção de biocompostos em caldos de cultivo com alta viscosidade.

Combinações de impelidores de geometria diferentes, os quais possuem características de conferir um escoamento misto (radial e axial) ao fluido, apresentam-se como uma alternativa aos bioprocessos a depender das condições operacionais, visto que a somatória das possíveis contribuições resultantes da geometria de cada impelidor pode afetar positivamente o desempenho do bioprocessos (KADIC; HEINDEL, 2010).

Neste contexto, ao realizar-se a análise dos efeitos padronizados sobre a variável resposta Desejabilidade Global (D_G) para o sistema operado com uma combinação híbrida de

impelidores (EEDP-RT), verificou-se conforme ilustrado pela Figura 4.6B que o bioprocesso tende a ser beneficiado sob altos valores de vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}) e de frequência de agitação (N), uma vez que ambas variáveis independentes contabilizam 84% de interferência significativa sobre o processo de síntese do biocolorante vermelho.

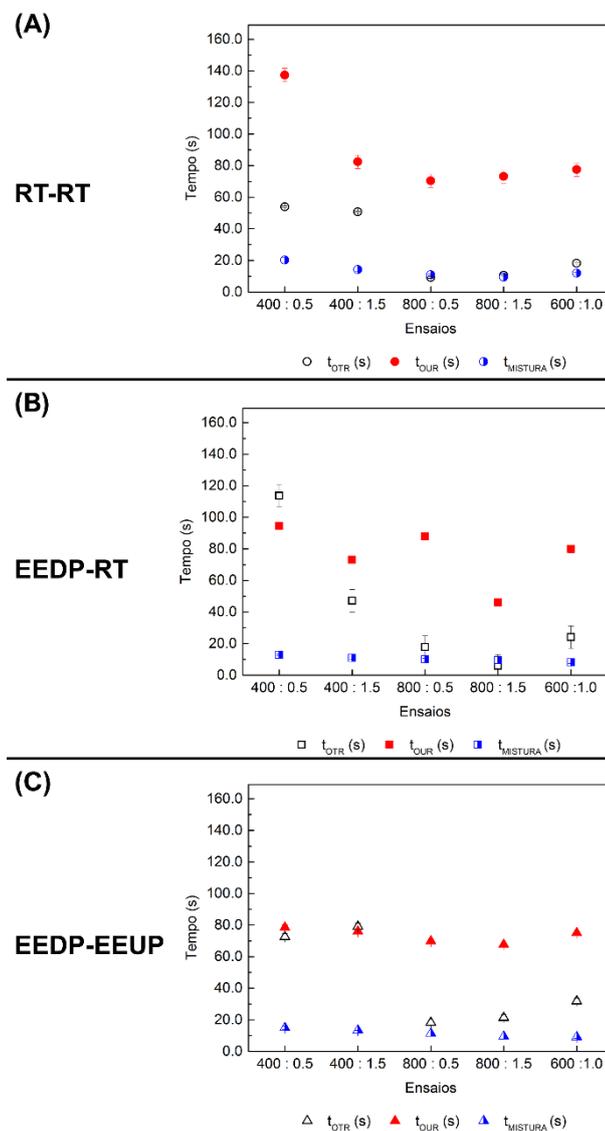
O impelidor orelha de elefante EEDP é caracterizado por conferir um escoamento misto (axial para baixo e radial) ao fluido (KRESTA; BRODKEY, 2004), o que tende a contribuir para um melhor efeito de mistura. Essa característica somada às apresentadas pelo impelidor turbina Rushton, justificam o resultado favorável ao desempenho do bioprocessos mediante o emprego do conjunto híbrido (EEDP-RT) sob altos níveis de ϕ_{ar} e N. Os elevados níveis de vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}) contribui para uma melhor eficiência do impelidor Rushton (RT) que atua na fragmentação, gerando bolhas de menor diâmetro e melhorando a dispersão de gás na fase líquida. A operação sob elevada frequência de agitação (N) favorece um melhor desempenho do impelidor orelha de elefante com bombeamento para baixo (EEDP), uma vez que a geometria do impelidor e seu tipo característico de escoamento aprimoram a mistura no biorreator (PUTHLI; RATHOD; PANDIT, 2005). Portanto, o somatório das propriedades de ambos os impelidores tende a favorecer a dispersão e os fenômenos de transferência envolvidos no bioprocessos.

Embora o conjunto híbrido apresente diversas contribuições, alguns estudos sugerem que, a depender da escala de processo e da viscosidade aparente do caldo de cultivo, o cultivo pode requerer uma mistura axial superior à contribuição que a turbina Rushton pode vir a oferecer (BOUAIFI; ROUSTAN, 2001; FUJASOVÁ *et al.* 2007; KADIC; HEINDEL, 2010). Logo, sistemas compostos por dois impelidores de escoamento misto, como é o caso do conjunto de impelidores tipo orelha de elefante com bombeamentos para baixo e para cima (EEDP-EEUP) avaliado neste trabalho, acabam por se tornar mais vantajoso neste cenário, visto seu melhor desempenho em termos de mistura imposto ao bioprocessos.

Conforme a análise de efeitos padronizados sobre a Desejabilidade Global (D_G) mostrado na Figura 4.6C, quando empregado o sistema operado com dois impelidores orelhas de elefante com bombeamentos para baixo e para cima (EEDP-EEUP), apenas a frequência de agitação (N) se configurou como uma variável operacional com efeito estatisticamente significativo sobre o bioprocessos na ordem de 74%. Quando operada a altos níveis de frequência de agitação (N), o bioprocessos tende a apresentar um melhor desempenho em termos de produção e produtividade de biocolorante. A relevância desta variável independente sobre o bioprocessos pode ser justificada pelo fato de que o escoamento misto imposto pela configuração

e a geometria dos impelidores empregados sob altos valores de N e de ϕ_{ar} tende a conferir uma melhor homogeneização do caldo. Isso contribui para que os processos de transferência, como o de oxigênio da fase gasosa para a líquida, se desenvolvam de forma satisfatória, conforme ilustrado na Figura 4.7, ou mais especificamente na Figura 4.7C, onde pode-se observar que baixos níveis de frequência de agitação (N) quando empregado o sistema EEDP-EEUP tendem a levar a uma limitação do bioprocessamento ocasionada pela baixa eficiência da dispersão gás-líquido, caracterizado pelo elevado valor do tempo de transferência de oxigênio da fase gasosa para fase líquida (t_{OTR}).

Figura 4.7- Tempos característicos (t_{OTR} , t_{OUR} e t_M) correspondentes às respectivas combinações de impelidores: (A) turbina Rushton (RT-RT), (B) combinação híbrida (EEDP-RT) e (C) orelha de elefante (EEDP-EEUP).



A análise dos tempos característicos, conforme ilustrado pela Figura 4.7, permite uma

melhor compreensão de quais possíveis fenômenos podem estar limitando o bioprocessamento como um todo, partindo da premissa que o fenômeno que apresentar um maior tempo característico tende a ser a etapa controladora do bioprocessamento (GOMEZ *et al.*, 2015).

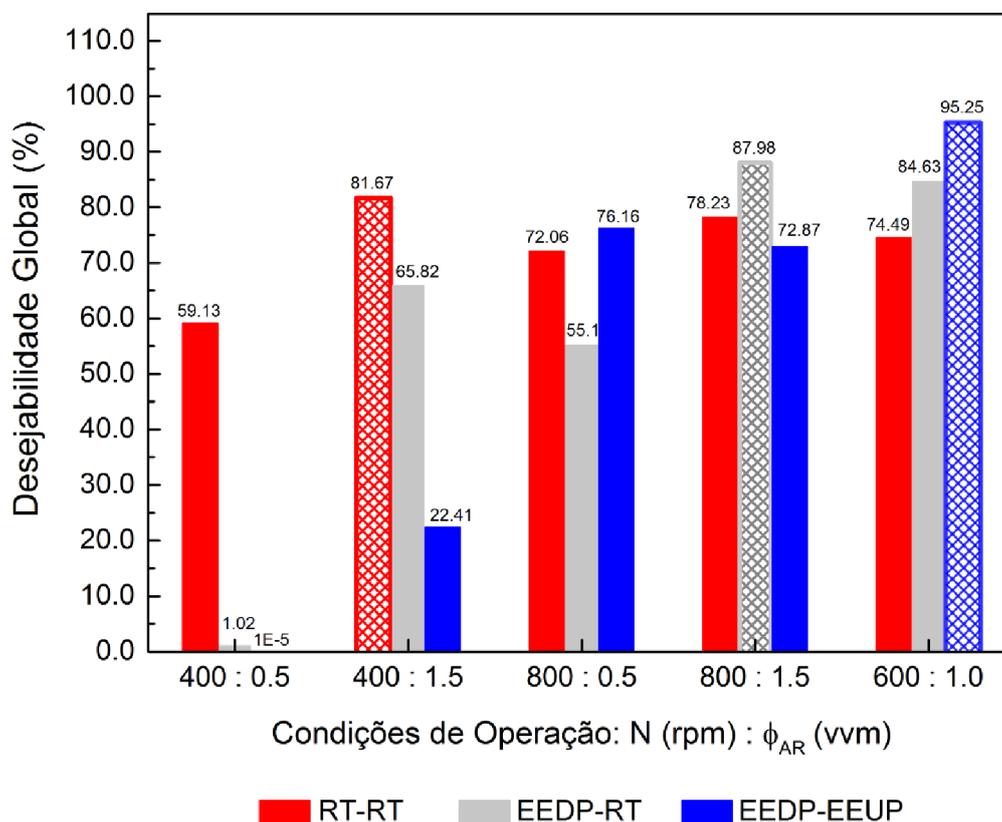
Diante dos resultados obtidos verificou-se que, independentemente do conjunto de impelidores empregados, o tempo característico referente ao consumo de oxigênio (t_{OUR}), que se manteve no intervalo de 46,1 a 137,3 s, se mostrou em todas as condições operacionais avaliadas superior ao tempo de mistura (t_M), onde a faixa de variação foi da ordem de 8,10 a 20,3 s, o que demonstra que de modo geral, durante o bioprocessamento, a mistura foi eficiente em praticamente todas as condições avaliadas.

Com relação à combinação de impelidores RT-RT, observou-se que em todas as condições de operação avaliadas, t_{OTR} foi inferior a t_{OUR} , indicando que quando utilizada essa associação a transferência de oxigênio ocorreu de forma eficiente, o que corrobora a literatura que atesta ser a turbina Rushton adequada para promover uma eficaz transferência de oxigênio (MCFARLANE; NIENOW, 1995). Nos sistemas de escoamento misto observou-se que, para o sistema EEDP-RT operado a 400 rpm e 0,5 vvm, assim como para o sistema EEDP-EEUP operado a 400 rpm e independentemente da aeração, o t_{OTR} apresentou valores próximos e até superiores a t_{OUR} o que indica nesses casos a limitação do bioprocessamento pela transferência de massa de oxigênio, como observado em trabalhos da literatura relacionados com a produção de outros biocompostos (GOMEZ *et al.*, 2015; POLLARD *et al.*, 2007).

Sendo assim, as análises de tempos característicos e dos efeitos padronizados sobre a Desejabilidade Global (DG) encontram-se em concordância, visto que para o sistema RT-RT, segundo a análise de efeitos a operação do sistema sob baixos valores de N e Φ_{ar} tenderia a levar a um desempenho insatisfatório do sistema, o que se demonstrou pelo elevado valor do tempo característico relativo ao consumo de oxigênio (137,3 s). No sistema híbrido (EEDP-RT), o maior tempo característico de 113,7 s, correspondente à transferência de oxigênio (t_{OTR}), foi obtido a 400 rpm e 0,5 vvm, o que segundo a análise de efeitos padronizados, configura-se para o sistema EEDP-RT como uma das condições mais desfavoráveis ao bioprocessamento. Por fim, para o sistema constituído por dois impelidores orelhas de elefante (EEDP-EEUP), as duas únicas condições nas quais a transferência de oxigênio se apresentou como limitante do bioprocessamento, foram as condições onde o sistema foi operado sob a menor condição de agitação (400 rpm). Essas condições resultaram num baixo desempenho do bioprocessamento como um todo, conforme ilustrado pela Figura 4.8, onde os menores valores de Desejabilidade Global (DG) para o sistema EEDP-EEUP a 400 rpm foram iguais a 10^{-5} (0,5 vvm) e 22,4 (1,5 vvm), o que expressa

a nula ou inexpressiva síntese do biocolorante vermelho.

Figura 4.8- Valores de Desejabilidade Global (DG) correspondente às combinações de impelidores RT-RT, EEDP-RT e EEDP-EEUP, operados sob diferentes condições de agitação (N em rpm) e de aeração (ϕ_{ar} em vvm).



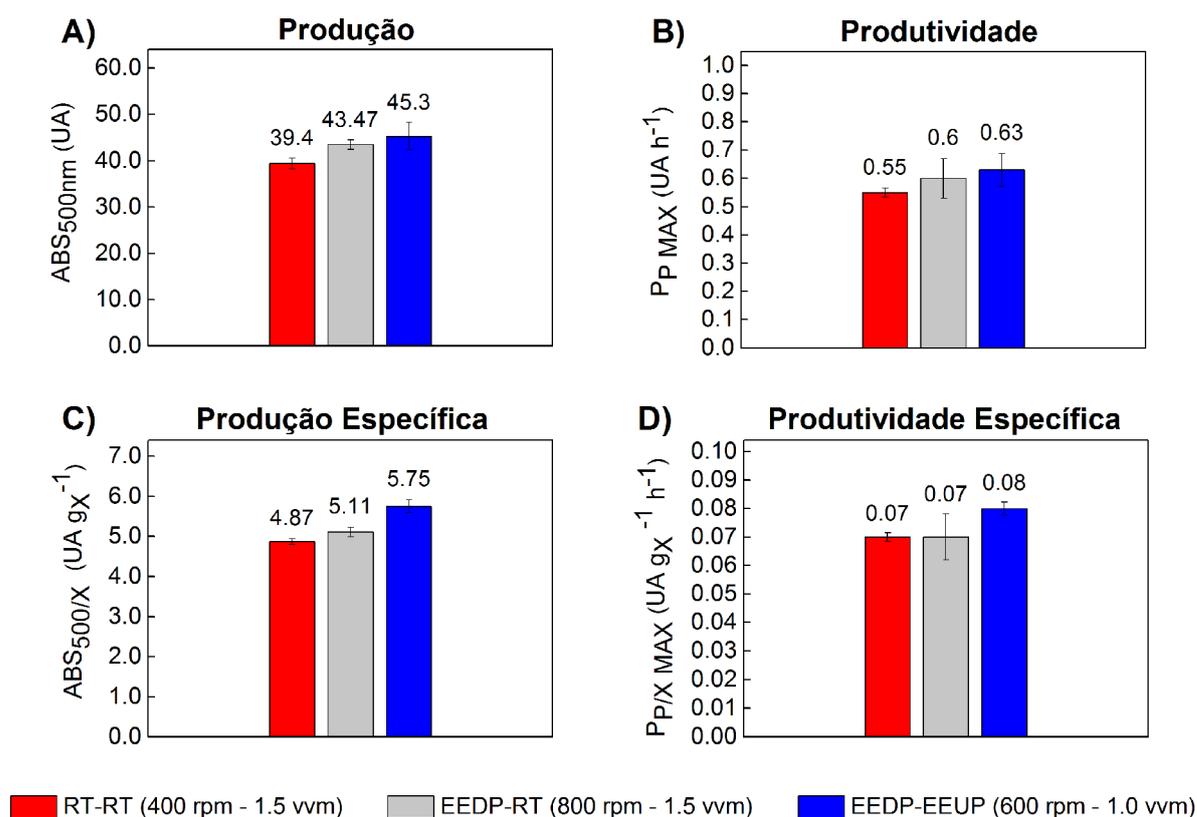
As mais expressivas produções e produtividades de biocolorante por *T. minnesotensis* para cada conjunto de impelidores ocorreram nas seguintes condições: 400 rpm - 1,5 vvm (RT-RT), 800 rpm - 1,5 vvm (EEDP-RT) e 600 rpm - 1,0 vvm (EEDP-EEUP), condições estas que reforçam a análise de efeitos padronizados.

Dentre as melhores configurações e condições de processo, o sistema constituído pela combinação de impelidores orelhas de elefante com escoamento para baixo e para cima (EEDP-EEUP) operado a 600 rpm e 1,0 vvm mostrou-se como o mais favorável ao bioprocessamento de produção do colorante vermelho. De acordo com a Figura 4.8, esta configuração apresentou um percentual de chances de maximizar as variáveis-resposta principais relacionadas à produção e produtividade do biocolorante vermelho de 95,2%, sendo que as demais configurações apresentaram percentuais para maximização de 81,7% (RT-RT) e 88% (EEDP-RT), respectivamente.

A Figura 4.9 ilustra uma comparação entre os valores das quatro variáveis-resposta

principais obtidas nos cultivos que apresentaram os maiores valores de Desejabilidade Global (D_G).

Figura 4.9- Análise comparativa dos melhores ensaios para cada combinação de impelidores referente as quatro variáveis-respostas principais: **A)** produção (ABS_{500} em UA), **B)** produtividade (PP em $UA\ h^{-1}$), **C)** produção específica ($ABS_{500/X}$ em $UA\ g_X^{-1}$) e **D)** produtividade específica ($PP_{P/X}$ em $UA\ g_X^{-1}\ h^{-1}$).



Com base nos resultados ilustrados na Figura 4.9, verificou-se que como as concentrações celulares em todos os ensaios alcançaram valores próximos, na faixa de 8,2 a 8,7 $g_X\ L^{-1}$ (dados não mostrados), os valores de produção e produtividade específicas (Figuras 4.9C e 4.9D), respectivamente, apresentaram comportamentos semelhantes aos da produção e produtividade em todos os cultivos. Além disso, com relação à produção (UA) e produtividade ($UA\ h^{-1}$) (Figuras 4.9A e 4.9B), observou-se que as três diferentes configurações alcançaram resultados expressivos e similares, o que demonstram a versatilidade e estabilidade do microrganismo nos mais variados sistemas e condições operacionais empregados.

No entanto, ao realizar-se uma análise mais restrita em termos de produção absoluta (UA), têm-se que a configuração de impelidores orelha de elefante com escoamento para baixo e para cima (EEDP-EEUP) operada a 600 rpm e 1,0 vvm resultou em valores até 15%

superiores, quando comparado as demais configurações estudadas, o que corrobora os resultados de Desejabilidade Global (Figura 4.8).

Portanto, assim como observado por Buffo *et al.* (2016), a combinação de impelidores EEDP-EEUP apresenta-se como uma configuração promissora que, quando operada a 600 rpm e 1,0 vvm, gera um expressivo desempenho do bioprocesso de síntese do colorante natural pela linhagem *T. minnesotensis*.

4.3.2. Correlações existentes no bioprocesso de produção de colorante natural vermelho

Buscando uma maior compreensão do bioprocesso de produção do colorante natural vermelho por *T. minnesotensis*, ao realizar a análise de correlação entre as variáveis-resposta principais (R1 a R4) e as variáveis-resposta secundárias (R5-R12), ao nível de significância de 95%, observou-se que, independentemente do conjunto de impelidores empregado, variáveis secundárias relacionadas tanto à transferência de oxigênio (R6 e R8) quanto à hidrodinâmica do processo (R10 e R12) apresentaram correlações válidas e significativas com as quatro variáveis-resposta principais (R1-R4), conforme descrito na Tabela 4.2.

Tabela 4.2- Estimativa dos coeficientes de correlação, ao nível de confiança de 5%, entre as variáveis-resposta principais (produção, **R1**; produtividade, **R2**; produção específica, **R3** e produtividade específica, **R4**) e as variáveis-resposta secundárias (velocidade global média de consumo de oxigênio, **R5**; percentual de oxigênio transferido, **R6**; coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio médio, **R7**; tensão mínima de oxigênio dissolvido, **R8**; valor médio da velocidade média de cisalhamento, **R9**; viscosidade aparente média, **R10**; valor médio da taxa de dissipação de energia, **R11** e microescala de Kolmogorov média, **R12**).

		R1		R2		R3		R4	
		ABS_{500nm}	Valor p	P_P	Valor p	ABS_{500nm/X}	Valor p	P_{P/X}	Valor p
R5	(Q_{O₂X})_M	-0,059	0,799	-0,025	0,914	-0,064	0,783	-0,028	0,905
R6	O_{2-T}	-0,495	0,023	-0,493	0,023	-0,474	0,030	-0,465	0,034
R7	(k_{La})_M	0,387	0,083	0,390	0,080	0,391	0,080	0,403	0,070
R8	T_{OD-Min}	0,458	0,037	0,458	0,037	0,481	0,027	0,488	0,025
R9	γ_{m-M}	0,341	0,131	0,348	0,122	0,399	0,073	0,417	0,060
R10	μ_{ap-M}	-0,506	0,019	-0,486	0,026	-0,530	0,013	-0,518	0,016
R11	ε_M	0,284	0,211	0,298	0,189	0,351	0,119	0,376	0,093
R12	λ_{K-M}	-0,599	0,004	-0,593	0,005	-0,628	0,002	-0,629	0,002

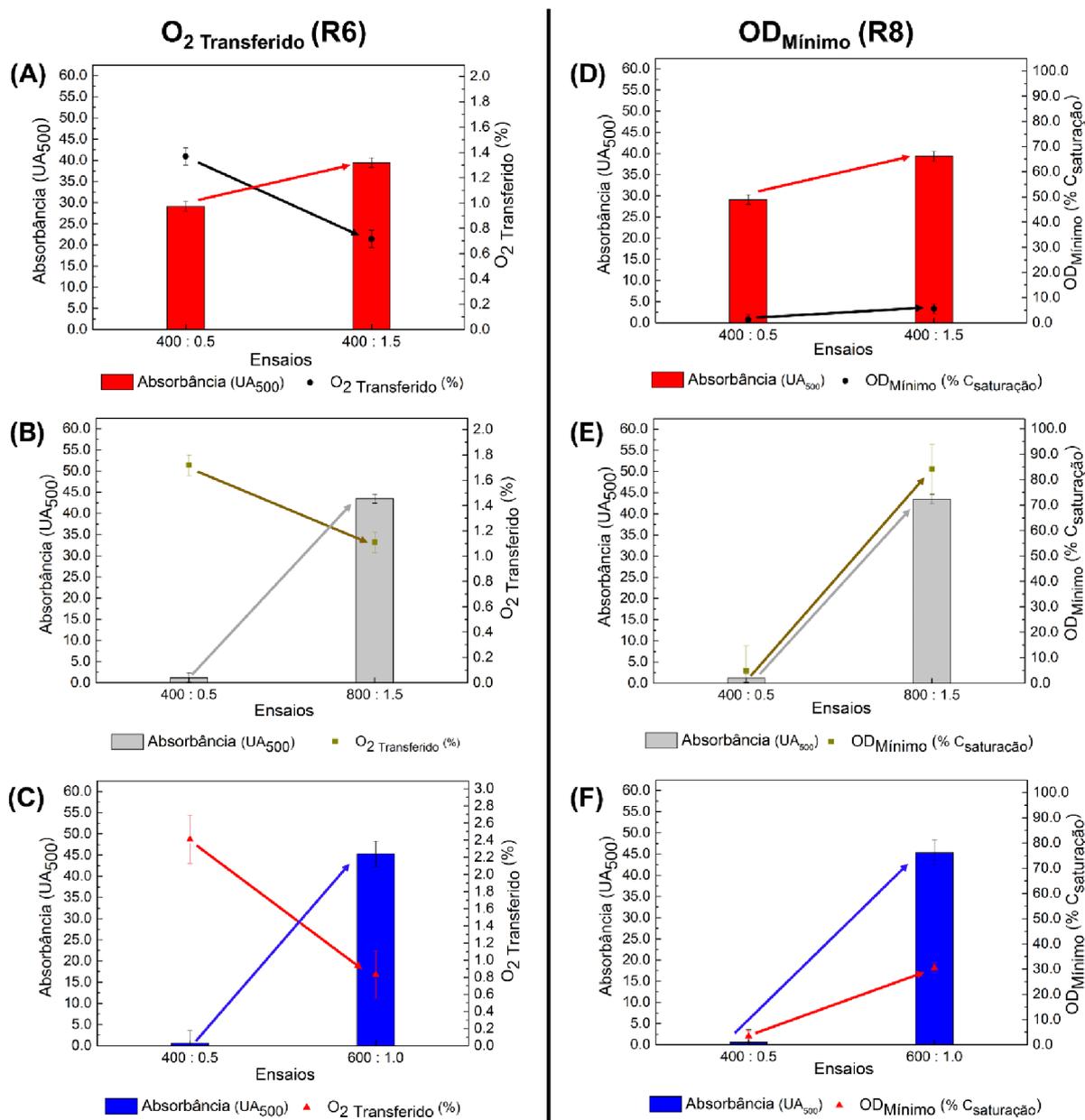
*valor p: probabilidade de significância.

Fonte: Acervo pessoal.

Ao se analisar o primeiro bloco das variáveis-resposta secundárias relacionadas à transferência de oxigênio (R5-R8), observou-se que dentre essas apenas as variáveis percentual de oxigênio transferido (O_{2-T} - R6) e tensão mínima de oxigênio dissolvido (T_{OD-Min} - R8) apresentaram correlações válidas com as quatro variáveis-resposta principais produção (ABS_{500} - R1), produtividade (P_P - R2), produção específica ($ABS_{500/X}$ - R3) e produtividade específica ($P_{P/X}$ - R4), dado que os p-valores foram abaixo de 0,05, variando de 0,023 a 0,037.

A variável percentual de oxigênio transferido (O_{2-T} - R6) demonstrou apresentar uma relação inversa com as variáveis-resposta principais (R1 a R4), ou seja, os melhores resultados em termos de produção e produtividade do biocolorante tendem a ser garantidos quando o percentual de oxigênio transferido (O_{2-T} - R6) é baixo, conforme ilustrado nas Figuras de 4.10A a 4.10C.

Figura 4.10- Perfil da relação obtida entre a variável-resposta primária produção (ABS_{500} - R1) e as variáveis-resposta secundárias: o percentual de oxigênio transferido (O_{2-T} - R6) para as três combinações de impelidores estudadas: (A) turbina Rushton (RT-RT), (B) combinação híbrida (EEDP-RT) e (C) orelha de elefante de três lâminas (EEDP-EEUP); e o oxigênio dissolvido mínimo (OD_{Min} - R8) para as três combinações de impelidores estudadas: (D) turbina Rushton (RT-RT), (E) combinação híbrida (EEDP-RT) e (F) orelha de elefante de três lâminas (EEDP-EEUP).



A variável percentual de oxigênio transferido (O_{2-T} - R6) é dado pela relação entre a quantidade média de oxigênio consumido e a quantidade de oxigênio fornecido. Uma vez que

o consumo de oxigênio foi similar nos 21 cultivos, variando de 3,31 a 10,08 mmol_{O₂} L⁻¹ h⁻¹, os cultivos em que a vazão específica de ar (Φ_{ar}) foi superior a 0,5 vvm tenderam a apresentar melhores resultados em termos de produção e produtividade do biocolorante vermelho, independentemente da combinação de impelidores, podendo ser até 80 vezes maior em termos de quantidade de biocolorante sintetizado (ABS₅₀₀ - R1) quando comparado aos ensaios em que a vazão específica de ar (Φ_{ar}) foi de 0,5 vvm. Tal resultado deve-se provavelmente ao fato que vazões específicas de alimentação de ar superiores a 0,5 vvm tendem a contribuir tanto no padrão de mistura e homogeneidade do caldo, afetando, por conseguinte os fenômenos de transferência (STANBURY; WHITAKER; HALL, 2017).

Ao se analisar a variável secundária tensão mínima de oxigênio dissolvido (T_{OD-Min} - R8) que, dentre as variáveis-resposta secundárias associadas à transferência de oxigênio, também apresentou correlações válidas com as quatro variáveis-resposta principais (R1 a R4), foi verificado com base na Tabela 4.2 que a relação existente entre a variável resposta T_{OD-Min} (R8) e as quatro variáveis-resposta principais ocorre de forma direta, o que demonstra que a síntese de biocolorante tende a ser favorecida mediante a níveis satisfatórios de concentração de oxigênio dissolvido no caldo de cultivo.

Com base nas Figuras 4.10D a 4.10F verificou-se que para as três combinações de impelidores (CI), a correlação direta se manteve. Para a combinação RT-RT que impõe um escoamento radial (Figura 4.10D), observou-se que mesmo para a melhor condição de produção, a tensão mínima de oxigênio dissolvido (T_{OD-Min}) se manteve na faixa de 6%, cerca de 4 vezes superior à condição de menor produção. Quando empregadas as associações de impelidores que impõem um escoamento misto ao caldo, quais sejam EEDP-RT e EEDP-EEUP, a T_{OD-Min} foi entre 10 a 20 vezes superior ao nível mínimo atingido nos cultivos em que se observou as menores produções de biocolorante (Figuras 4.10E e 4.10F).

Ao se comparar as melhores condições para cada um dos três conjuntos de impelidores (CI), ressalta-se que a tensão mínima de oxigênio dissolvido (T_{OD-Min}) para as combinações caracterizadas por conferir um escoamento misto foi de 84,1% (EEDP-RT) e 30,5% (EEDP-EEUP), ao passo que para o conjunto de turbinas Rushton (RT-RT), caracterizado por impor um escoamento radial unidirecional, a T_{OD-Min} foi de 5,6%. Tal diferença contribuiu para que as produções quando utilizadas as combinações EEDP-RT e EEDP-EEUP fossem entre 10 a 15% superiores à máxima produção obtida empregando-se a combinação RT-RT. Essa relação também foi observada por Mohamed *et al.* (2012) na síntese de um pigmento vermelho pelo fungo *Monascus purpureus* FTC 5391 utilizando um impelidor de fita helicoidal de escoamento

axial. Na condição de agitação e aeração de 250 rpm e 1,36 vvm, os autores observaram que o nível de T_{OD-Min} foi sustentado acima de 40% da saturação, ao passo que empregando-se dois impelidores turbina Rushton (600 rpm e 1,36 vvm) a T_{OD-Min} reduziu a valores próximos de 0% da saturação. Isso contribui para que a produção de colorante obtida fosse cerca de 52% menor quando utilizado o sistema com turbinas Rushton em comparação ao sistema com o impelidor fita helicoidal. Tal diferença na tensão mínima de oxigênio dissolvido (T_{OD-Min}) observada entre os sistemas de escoamentos radial e misto (axial/radial) resulta das contribuições conferidas por cada geometria de impelidor ao bioprocessos, melhorando a homogeneização do meio e promovendo uma mistura eficaz de nutrientes e uma adequada transferência de oxigênio.

Na sequência foram analisadas as correlações sobre as variáveis principais (R1-R4) do segundo bloco de variáveis-resposta secundárias, que expressam as características hidrodinâmicas do bioprocessos. Verificou-se que as variáveis viscosidade aparente média (μ_{ap-M} - R10) e microescala de Kolmogorov média (λ_{K-M}) apresentaram correlações válidas e uma relação inversa com as quatro variáveis-resposta principais (R1 a R4).

A viscosidade aparente média (μ_{ap-M} - R10), muitas vezes expressiva em cultivos de microrganismos filamentosos com crescimento na forma dispersa, caracterizados por gerarem caldos de cultivo não-Newtonianos pseudoplásticos (STANBURY; WHITAKER; HALL, 2017), se configura como uma variável a ser monitorada e, se possível, controlada nos bioprocessos, visto sua eventual interferência sobre a efetiva manutenção da homogeneidade do sistema, bem como sobre os fenômenos de transferência de quantidade de movimento, calor e massa (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000). Significantes impactos sobre o bioprocessos podem ser ocasionados pela viscosidade aparente, como a distribuição deficiente e o aumento da coalescência das bolhas de ar, a redução da taxa de transferência de oxigênio e o surgimento de zonas de estagnação (GIBBS; SEVIOUR; SCHMID, 2000; STANBURY; WHITAKER; HALL, 2017).

Diante dos potenciais impactos da elevada viscosidade aparente apresentada por muitos cultivos empregando microrganismos filamentosos com perfil morfológico disperso, estratégias vinculadas ao controle da concentração ou morfologia da biomassa, por meio de diferentes configurações operacionais e/ou condições físico-químicas, têm sido propostas visando obter caldos menos viscosos, dado que a síntese de diversos biocompostos, dentre eles os biocolorantes, tende a ser favorecida em caldos de cultivo menos viscosos (KIM *et al.*, 2002; YANG *et al.*, 2020). Ahn *et al.* (2006) avaliaram a estratégia de cultivo a baixas temperaturas como alternativa para modificações morfológicas e, conseqüente redução da viscosidade do

caldo. Os autores verificaram que a síntese de biocolorante pelo fungo *Monascus sp.* J101 a 25°C, em que o caldo apresentou uma baixa viscosidade aparente entre 10 e 50 cP, chegou a ser cerca de 8 vezes superior à obtida em cultivo conduzido a 30°C, no qual a viscosidade aparente variou entre 120 e 200 cP.

Dessa forma, a relação obtida no atual estudo empregando o fungo filamentosso *T. minnesotensis*, onde a produção/produktividade de biocolorante (R1-R4) tende a ser favorecida em caldos menos viscosos (μ_{ap-M} - R10), encontra-se de acordo com resultados reportados pela literatura para outros microrganismos filamentosos. Ressalta-se ainda que as maiores produções de biocolorantes, independentemente do conjunto de impelidores utilizado, foram obtidas em caldos com μ_{ap-M} na faixa de 50 a 70 cP.

A microescala de Kolmogorov média (λ_{K-M} - R12), definida na teoria da turbulência isotrópica de Kolmogorov (KOLMOGOROV, 1941; KOLMOGOROV, 1991), caracteriza o tamanho dos microturbilhões gerados no interior do caldo de cultivo e permite a avaliação da intensidade de interação célula-turbilhão e suas eventuais consequências à estrutura micelial (SHAMLOU *et al.*, 1994).

Semelhante à relação observada entre a viscosidade aparente média (μ_{ap-M} - R10) e as variáveis-resposta principais (R1- R4), a variável-resposta secundária microescala de Kolmogorov média (λ_{K-M} - R12) apresentou uma elevada e válida correlação ($0,002 < p < 0,005$) com as variáveis-resposta principais (R1- R4). Além disso, a relação obtida entre a λ_{K-M} (R12) e variáveis-resposta principais (R1- R4), segundo a Tabela 4.2, configura-se como uma relação inversa, onde quanto menores os microturbilhões, mais a produção do biocolorante é favorecida.

Embora as maiores quantidades de biocolorante tenham sido obtidas sob baixos valores de microescala de Kolmogorov média (λ_{K-M} - R12) quando comparado aos cultivos em que se observou menor síntese do biocomposto, os valores obtidos de λ_{K-M} , no geral, foram elevados (Tabela 4.3) considerando cultivos empregando fungos filamentosos com perfil morfológico disperso, tendo em vista que o comprimento médio das hifas principais de micélios filamentosos dispersos tende a ser superior a 100 μm (CUI; VAN DER LANS; LUYBEN, 1997; SERRANO-CARREÓN *et al.*, 2015). Portanto, para que os microturbilhões apresentem efeitos hidrodinâmicos sobre os micélios faz-se necessário que os valores de λ_{K-M} sejam iguais ou inferiores a 100 μm , caso contrário, as células serão conduzidas pelos microturbilhões sem efetivas alterações estruturais (SERRANO-CARREÓN *et al.*, 2015).

Tabela 4.3- Faixa de variação das variáveis-resposta para as combinações de impelidores RT-RT, EEDP-RT e EEDP-EEUP nas faixas de operação avaliadas, $400 < N$ (rpm) < 800 e $0,5 < \phi_{ar}$ (vvm) $< 1,5$.

		RT-RT	EEDP-RT	EEDP-EEUP
R1	ABS₅₀₀ (UA)	29,11 – 39,40	1,21 – 43,47	0,6 – 45,30
R2	P_P (UA h⁻¹)	0,40 – 0,55	0,02 – 0,67	0,01 – 0,63
R3	ABS_{500/X} (UA g_x⁻¹)	3,49 – 4,87	0,11 – 5,11	0,06 – 5,75
R4	P_{P/X} (UA g_x⁻¹ h⁻¹)	0,05 – 0,07	0,00 – 0,08	0,00 – 0,08

R5	(Q_{O₂X})_M (mol_{O₂} L⁻¹)	0,29 – 0,47	0,37 – 0,73	0,33 – 0,51
R6	O_{2-T} (%)	0,06 – 2,08	0,94 – 2,22	0,59 – 2,41
R7	(k_La)_M (h⁻¹)	66,71 – 391,01	31,67 – 605,54	45,48 – 197,38
R8	T_{OD-Min} (% C_{sat}uração)	1,30 – 76,50	5,00 – 84,14	1,90 – 59,70

R9	ȳ_{m-M} (s⁻¹)	194,82 – 709,25	142,20 – 514,86	128,09 – 573,23
R10	μ_{ap-M} (cP)	29,62 – 59,39	32,75 – 113,65	34,46 – 112,03
R11	ε_M (W Kg⁻¹)	0,83 – 7,35	0,53 – 4,10	0,55 – 5,59
R12	λ_{K-M} (μm)	258,38 – 638,02	311,63 – 1239,30	295,52 – 1009,41

Fonte: Acervo pessoal.

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 4.3, os valores de λ_{K-M} se apresentam superiores à 250 μm , independentemente do conjunto de impelidores utilizado, o que demonstra uma baixa interação célula-turbilhão.

Finalizando, embora algumas variáveis secundárias não tenham apresentado correlação com as variáveis-resposta principais (R1 a R4), as correlações obtidas entre as variáveis R6 (O_{2-T} (%)), R8 (T_{OD-Min} (% C_{sat}uração)), R10 (μ_{ap-M} (cP)) e R12 (λ_{K-M} (μm)) demonstram as influências significativas da transferência de oxigênio e da hidrodinâmica no desempenho do bioprocessamento de produção do corante vermelho pelo fungo filamentosso *T. minnesotensis*.

4.3.3. Escalonamento do bioprocessamento

Diante dos resultados obtidos em biorreator tipo tanque agitado e aerado de 4 L de volume útil foi realizado o escalonamento do bioprocessamento por meio do emprego de critérios de variação de escala e de aeração, visando avaliar o desempenho do bioprocessamento em uma escala maior.

Conforme a abordagem realizada na seção 4.3.2 para os ensaios conduzidos em biorreator tipo tanque agitado e aerado de 4 L de volume útil, a variável microescala de turbulência de Kolmogorov média ($\lambda_{K-M} - R12$) apresentou, dentre um conjunto de 8 variáveis secundárias relacionadas tanto com a transferência de oxigênio quanto com a hidrodinâmica do bioprocessamento, uma melhor correlação com a síntese de colorante fúngico. A variável microescala de Kolmogorov é caracterizada por relacionar as características reológicas do caldo com os efeitos hidrodinâmicos do bioprocessamento. Logo, pode-se inferir que as propriedades hidrodinâmicas tendem a apresentar maior relevância sobre o desempenho do bioprocessamento em estudo em relação à transferência de oxigênio.

Diante disto, sendo a variável microescala de Kolmogorov uma função da razão potência por unidade de volume no sistema não aerado ($P_0 V^{-1}$), conforme dado pela Equação 4.19, e tendo em vista a semelhança geométrica dos sistemas de biorreatores tipo tanque agitado e aerado de 4 e 10 L de volume útil, optou-se por empregar como critério de aumento de escala a constância da potência por unidade de volume no sistema não aerado ($P_0 V^{-1}$), critério este que se apresenta como função da frequência de agitação (N) e do diâmetro do impelidor (D_i), conforme descrito pela Equação 4.20 (BADINO; SCHMIDELL, 2021b).

$$\lambda_K = \left(\frac{(K \cdot \dot{\gamma}_m^{n-1})^3}{\left(\frac{P_g}{V}\right) \cdot \rho^2} \right)^{1/4} \rightarrow \lambda_K = \left(\frac{\left(K \cdot \frac{1}{K} \cdot \left[\frac{c \cdot \left(\frac{P_0^2 \cdot N \cdot D_i^3}{Q^{0,56}} \right)^{0,45}}{V} \right]^{\frac{n-1}{n+1}} \right)^3}{\left(\frac{c \cdot \left(\frac{P_0^2 \cdot N \cdot D_i^3}{Q^{0,56}} \right)^{0,45}}{V} \right) \cdot \rho^2} \right)^{1/4} \quad (4.19)$$

$$\left(\frac{P_0}{V} \right)_{4L} = \left(\frac{P_0}{V} \right)_{10L} \rightarrow \left(\frac{N^3 \cdot D_i^5}{D_i^3} \right)_{4L} = \left(\frac{N^3 \cdot D_i^5}{D_i^3} \right)_{10L} \rightarrow (N)_{10L} = (N)_{4L} \cdot \left(\frac{(D_i)_{4L}}{(D_i)_{10L}} \right)^{2/3} \quad (4.20)$$

onde:

λ_K : microescala de turbulência de Kolmogorov (m).

P_g : consumo de potência do sistema gaseificado (W).

V: volume de líquido no tanque (m³).

ρ : massa específica (kg m^{-3}).

$\dot{\gamma}_m$: velocidade média de cisalhamento (s^{-1}).

K : índice de consistência (Pa s^n).

n : índice de comportamento de escoamento (-).

c : coeficiente referente à Equação 4.4 (-)

Q : vazão de alimentação de ar ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$).

P_0 : consumo de potência do sistema não gaseificado (W).

V : volume de meio no tanque (m^3).

N : frequência de agitação (rpm).

D_i : diâmetro do impelidor (m).

Segundo observado na análise de desejabilidade global para os ensaios conduzidos em biorreator de bancada tipo tanque agitado e aerado de 4 L, dentre as condições avaliadas, o ensaio empregando o conjunto de impelidores orelhas de elefante EEDP-EEUP, operado a de 600 rpm e 1,0 vvm, apresentou um maior percentual de chances (95,2 %) de maximizar o bioprocesso em termos de produção e produtividade de biocolorante vermelho. Logo, essas condições de operação foram adotadas como condições características do bioprocesso de produção de colorante por *T. minnesotensis* em biorreator tanque agitado e aerado de 4 L de volume útil. Considerando o emprego do conjunto de impelidores orelhas de elefante EEDP-EEUP em ambas escalas avaliadas, obteve-se a partir da Equação 4.20 a frequência de agitação de 555 rpm a ser operada no biorreator de 10 L de volume útil.

Sendo o bioprocesso em estudo um processo aeróbio, de modo a se determinar a vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}) a ser empregada nos ensaios conduzidos na escala de 10 L de volume útil, estimou-se a partir de 3 critérios de areação (BADINO; SCHMIDELL, 2021b), as eventuais vazões de alimentação a serem empregadas, conforme mostrado na Tabela 4.4, considerando a vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}) de 1,0 vvm empregada na escala de 4 L de volume útil.

Tabela 4.4- Critérios de aeração para o escalonamento do bioprocessamento de produção de colorante pelo fungo endófito *T. minnesotensis*.

Critério	Expressão	(Q)_{10L} (L min⁻¹)	(Φ_{ar})_{10L} (vvm)
Número de aeração (N _A) constante	$(Q)_{10L} = (Q)_{4L} \cdot \left(\frac{(D_i)_{10L}}{(D_i)_{4L}}\right)^3 \cdot \left(\frac{(N)_{10L}}{(N)_{4L}}\right)$	5,27	0,53
Velocidade superficial de ar (v _S) constante	$(Q)_{10L} = (Q)_{4L} \cdot \left(\frac{(D_i)_{10L}}{(D_i)_{4L}}\right)^2$	5,06	0,51
Vazão específica de alimentação de ar (Φ _{ar}) constante	$(Q)_{10L} = (Q)_{4L} \cdot \left(\frac{(D_i)_{10L}}{(D_i)_{4L}}\right)^3$	5,70	0,57

Fonte: Acervo pessoal.

Diante dos valores muito próximos e visando os menores efeitos de arraste ao longo do bioprocessamento, optou-se por empregar a vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}) de 0,51 vvm nos ensaios conduzidos em escala de 10 L.

A partir dos critérios de variação de escala e de aeração empregados, o ensaio em biorreator tipo tanque agitado e aerado de 10 L de volume útil foi conduzido em duplicata à frequência de agitação de 555 rpm e vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}) de 0,51 vvm.

As Figuras 4.11 e 4.12 ilustram os perfis de crescimento celular (C_X), consumo de substrato (C_S) e produção de colorante (ABS_{500nm}) nos ensaios conduzidos em biorreatores tipo tanque agitado e aerado de 4 e 10 L de volume útil, respectivamente.

Figura 4.11- Perfis de crescimento celular (C_x), consumo de substrato (C_s) e produção de colorante vermelho (ABS_{500nm}) no cultivo conduzido em biorreator tipo tanque agitado e aerado de 4 L de volume útil.

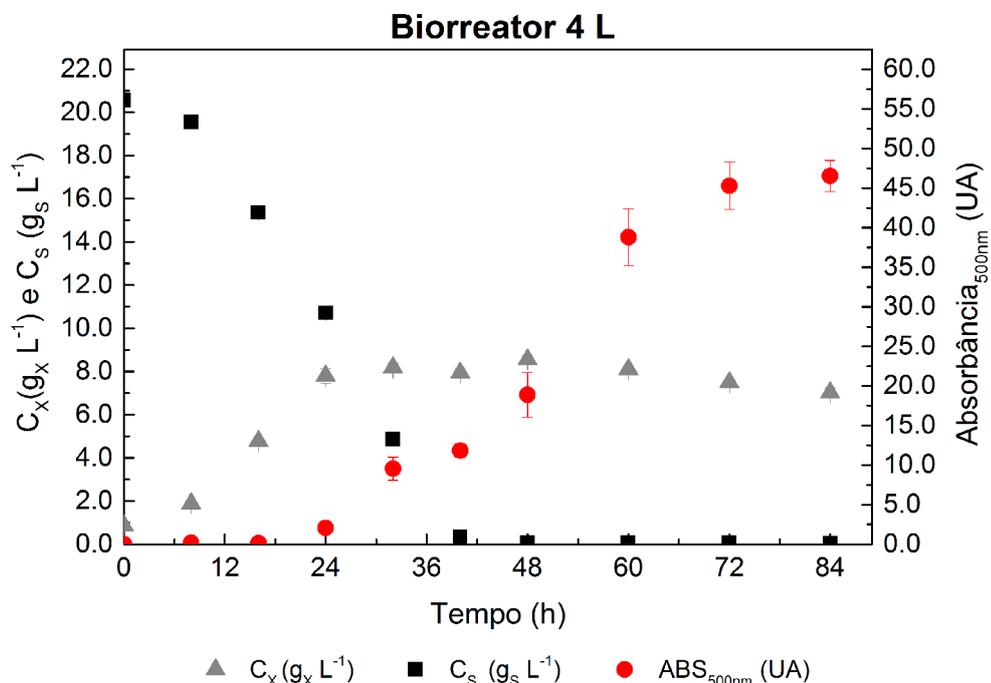
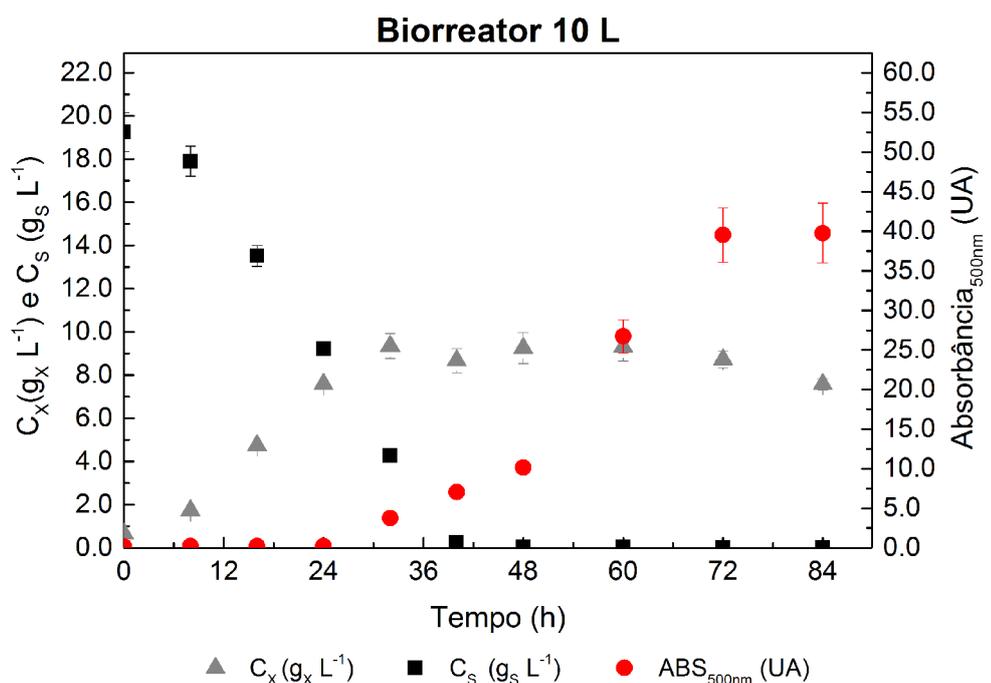


Figura 4.12- Perfis de crescimento celular, consumo de substrato e produção de colorante vermelho no cultivo no cultivo conduzido em biorreator tipo tanque agitado e aerado de 10 L de volume útil.



De modo geral, as Figuras 4.11 e 4.12 ilustram que o bioprocessamento ocorreu de forma semelhante em ambas as escalas, apresentando um completo consumo da fonte de carbono nas primeiras 40 horas de cultivo.

Em termos de produção verificou-se que, embora o ensaio em biorreator tipo tanque agitado e aerado de 4 L de volume útil, tenha apresentado uma produção ligeiramente superior ao ensaio em biorreator de 10 L de volume útil, as produções máximas observadas nas duas escalas expressas em medidas de absorvância foram estatisticamente iguais, uma vez que ao empregar-se o teste T de comparação das médias, o p valor ($p = 0,3318$) se apresentou superior a 0,05, não havendo, portanto, diferenças significativas entre os valores de absorvância. A Figura 4.13 ilustra as colorações dos caldos aos finais dos cultivos nas escalas de 4 e 10 L, onde se observa uma nítida semelhança entre elas, corroborada pelos valores próximos de absorvância em 72 horas de cultivo, alcançando o objetivo do estudo exploratório de variação de escala do bioprocessamento dentro da faixa avaliada.

Figura 4.13- Bioprocessamento de produção de corante em biorreator tanque agitado e aerado de 4 e 10 L de volume útil.

Biorreator 4 L volume útil



Biorreator 10 L volume útil



Fonte: Acervo pessoal.

Embora os trabalhos referentes à produção de biocolorantes por fungos filamentosos voltados ao aumento de escala do bioprocessamento sejam escassos, trabalhos como de Kim *et al.*

(2002) relatam resultados promissores ao avaliarem o escalonamento do bioprocessamento de produção de corante vermelho pelo fungo *Monascus sp.* em biorreatores tanque agitado e aerado de 5, 30 e 300 L. Empregando os critérios de constância da velocidade na extremidade do impelidor (v_{tip}) e da vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}), Kim *et al.* (2002) verificaram que embora a produção na escala de 300 L tenha se apresentado 16% inferior à escala de 5 L, possivelmente devido a eventuais problemas de mistura, os quais tendem a se amplificar com o escalonamento do bioprocessamento, de modo geral a produção de colorantes nas três escalas avaliadas se apresentaram muito próximas evidenciando o sucesso no escalonamento do bioprocessamento.

Os resultados obtidos por Kim *et al.* (2002) corroboram com os resultados obtidos neste trabalho. Embora os critérios de variação de escala e de aeração empregados tenham sido diferentes, o que demonstra que diante da diversidade de critérios, assim como reportado por Badino e Schmidell (2021b), o critério ideal de aumento de escala é próprio de cada bioprocessamento de acordo com sua especificidade.

Portanto, ainda que em caráter exploratório o escalonamento do bioprocessamento de síntese de corante pelo fungo endofítico *T. minnesotensis* tenha se demonstrado eficaz, outros critérios de variação de escala e de aeração devem ser avaliados visando futuras produções em nível industrial.

4.4. CONCLUSÕES

Diante do exposto, o presente trabalho apresentou resultados promissores e de efetiva contribuição ao tema de produção de biocolorantes por fungos filamentosos, uma vez que por meio do desenvolvimento e da execução de um planejamento experimental em biorreator de bancada (4 L) somado ao emprego de ferramentas estatísticas, verificou-se que as combinações de impelidores (CI) e as condições de operação, frequência de agitação (N) e vazão específica de alimentação de ar (ϕ_{ar}), tendem a afetar o desempenho do bioprocessamento de produção de biocolorante vermelho por *T. minnesotensis*.

Segundo os resultados obtidos, dentre as combinações geométricas empregadas e as condições operacionais avaliadas, o conjunto composto por dois impelidores orelha de elefante com escoamentos direcionados para baixo e para cima (EEDP-EEUP), quando operado a 600 rpm e 1,0 vvm, tende a apresentar um maior percentual para maximização da produção e produtividade de biocolorante frente as demais configurações e condições operacionais.

Verificou-se que as quatro variáveis-respostas principais referentes à produção e produtividade de biocolorante apresentaram correlações diretas com a variável tensão mínima de oxigênio dissolvido (T_{OD-Min} em %). No entanto, em relação às variáveis percentual de oxigênio transferido (O_{2-T} em %), viscosidade aparente média (μ_{ap-M} em cP) e microescala de Kolmogorov média (λ_{k-M} em μm), as variáveis-respostas principais apresentaram uma correlação inversa, sendo a microescala de Kolmogorov média (λ_{k-M} em μm) a variável com melhor correlação com a produção e a produtividade de biocolorante.

De modo geral, embora as produções de biocolorante tenham se apresentado na mesma ordem de grandeza, independentemente da configuração operacional empregada nos cultivos (CI, N e ϕ_{ar}), isso demonstra uma estabilidade e uma versatilidade do microrganismo a se adequar a diferentes configurações e condições operacionais. Essas características são favoráveis em uma produção em maior escala, o que se confirmou no cultivo visando a produção de biocolorante pelo fungo *T. minnesotensis* na escala de 10 L, onde se observou uma reprodutibilidade em termos de produção e produtividade do biocolorante em relação à escala de 4 L.

Os resultados obtidos configuram-se de relevância para compreensão do bioprocesso frente a diferentes configurações e condições operacionais, bem como de potencial para o escalonamento da produção de biocolorante pelo fungo *T. minnesotensis* visando a produção em nível comercial.

Capítulo 5

**ESTRATÉGIA DE CULTIVOS EM
DIFERENTES MODOS DE OPERAÇÃO**

5. PRODUÇÃO DE BIOCOLORANTE VERMELHO POR *Talaromyces minnesotensis* EM BATELADA ALIMENTADA

5.1. INTRODUÇÃO

Diante da gradativa relevância que os colorantes naturais derivados de fontes agrícolas, biológicas ou minerais vem assumindo frente aos colorantes sintéticos, em virtude de serem menos nocivos aos seres vivos e ao meio ambiente, os fungos filamentosos se mostram como uma fonte promissora para obtenção de biocolorantes. Isso porque, os mesmos tendem a apresentar elevada produtividade e capacidade contínua e regular de sintetizar compostos com uma vasta gama de cores e eventuais propriedades bioativas (DUFOSSÉ *et al.*, 2014; FOUILLAUD *et al.*, 2016; SPEARS, 1988).

No entanto, embora o bioprocessamento empregando fungos filamentosos se apresente favorável frente às demais fontes naturais, o bioprocessamento como um todo apresenta pontos de aperfeiçoamento, como questões toxicológicas, de produção e de down-stream (AMAN MOHAMMADI *et al.*, 2022; ANUGRAHA; THOMAS, 2021; MORALES-OYERVIDES *et al.*, 2020a). Tais pontos que requerem o desenvolvimento de pesquisas e estudos de modo a superar as limitações tecnológicas ainda existentes e viabilizar a inserção destes biocolorantes no mercado global, conciliando segurança, produtividade, qualidade e baixo custo.

Para a inserção dos biocolorantes no mercado global, torna-se necessário o estudo quanto aos fatores que podem influenciar a síntese dos compostos coloridos como pH, temperatura, composição do meio de cultivo, condições operacionais e estratégias de cultivo (AHN *et al.*, 2006; JOSHI *et al.*, 2003; SANTERRE, QUEINNEC; BLANC, 1995; OGBONNA, 2016), visto que a viabilidade técnica e econômica da produção de colorantes está atrelada a condições de processo otimizadas.

Diante do fato de os biocolorantes serem caracterizados como metabólitos secundários/especializados (ANUGRAHA; THOMAS, 2021; FOUILLAUD; DUFOSSÉ, 2022) e tendo em vista os fatores que podem vir a amplificar a produtividade do bioprocessamento, a estratégia de cultivo em batelada alimentada apresenta-se como uma alternativa promissora para a melhoria do bioprocessamento de síntese de colorantes fúngicos.

Por meio do fornecimento restrito de nutrientes (COSTA; BADINO, 2012; FARRELL; ROSE, 1967; KRAIRAK *et al.*, 2000), o emprego da estratégia de batelada alimentada, tende a conferir uma manutenção celular por mais tempo, acarretando eventualmente na desrepressão de rotas metabólicas vinculadas a síntese dos biocolorantes.

Embora, os estudos referentes aplicação da batelada alimentada especificamente no processo de obtenção de compostos coloridos por fungos filamentosos sejam menos frequentes, alguns trabalhos desenvolvidos visando avaliar o efeito da utilização do processo em batelada alimentada sobre a síntese de biocolorantes, relatam, em sua grande maioria, ganhos expressivos na eficiência de produção dos colorantes fúngicos, conforme mostrado na Tabela 5.1.

Tabela 5.1- Relação entre as produções de colorantes por fungos filamentosos em batelada alimentada (FB) e em batelada convencional (BC).

Linhagem fúngica	Colorante	FB/BC	Referências
<i>Monascus ruber</i>	vermelho	1,50	SANTERRE et al., 1995
<i>Monascus sp.</i>	amarelo	1,84	KRAIRAK et al., 2000
<i>Monascus ruber</i>	vermelho	0,87	HAJJAJ; GOMA E FRANÇOIS, 2015
<i>Monascus purpureus</i>	amarelo vermelho	1,35	CHEN et al., 2021

Fonte: Acervo pessoal do autor.

Ainda que a estratégia de batelada alimentada possa contribuir para o bioprocessamento de produção de colorantes fúngicos, segundo observado na Tabela 5.1, devido à complexidade do processo de síntese deste tipo de metabólito secundário, elementos como o controle da adição de substrato e tempo de alimentação são fatores relevantes para definir a viabilidade de implementação da estratégia de batelada alimentada como um potencial recurso para aprimorar o processo de síntese de biocolorantes (COLET *et al.*, 2019; HAJJAJ; GOMA; FRANÇOIS, 2015; JIANG *et al.*, 2017; KRAIRAK *et al.*, 2000).

Desta forma, visando aumentar a produção de biocolorante vermelho pelo fungo endofítico *T. minnesotensis*, foram realizados, inicialmente, cultivos com alimentação intermitente de meio de cultura suplementar em mesa incubadora rotativa, sendo avaliado cinco diferentes composições de meio de cultura suplementar. Posteriormente, baseado nos resultados dos ensaios conduzidos em frascos agitados e na complexidade e especificidade do bioprocessamento, foram conduzidos ensaios em biorreator de bancada tipo tanque agitado e aerado de 4 L de volume útil em batelada alimentada sob diferentes condições de alimentação (vazão e concentração de substrato), visando a avaliar a contribuição desta estratégia para a melhoria o bioprocessamento de síntese de colorante vermelho pelo fungo endofítico *T. minnesotensis*.

5.2. MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1. Cultura estoque de trabalho e Preparo do inóculo

Utilizou-se a linhagem *Talaromyces minnesotensis* (CBMAI 2211), um fungo filamentosso endofítico isolado por Romano (2015) da planta *Hymenaea sp.* (jatobazeiro) no cerrado de São Carlos (SP), a qual se encontra depositada na Coleção Brasileira de Microorganismos de Ambiente e Indústria (CBMAI/DRM), na cidade de Paulínia (SP).

A cultura estoque de trabalho foi mantida em tubos inclinados contendo meio de cultura Ágar ISP2 (International *Streptomyces* Project Medium 2) composto de (em g L⁻¹ água destilada): ágar bacteriológico, 20,0; dextrose, 4,0; extrato de malte, 10,0 e extrato de levedura, 4,0, pH 5,0. Após estriado sobre o meio sólido uma amostra de esporos da colônia de *T. minnesotensis* previamente isolada, os tubos inclinados foram incubados a 28 °C por 10 dias e, posteriormente, conservados em geladeira a 4°C, sendo subcultivados mensalmente, de modo a garantir a viabilidade das culturas.

Para obtenção do inóculo, inicialmente, preparou-se um volume conhecido de meio líquido ISP2 isento de ágar, onde o mesmo teve seu pH ajustado em 5,0 com solução de ácido clorídrico 2,0 M, sendo posteriormente autoclavado a 121°C por 20 minutos.

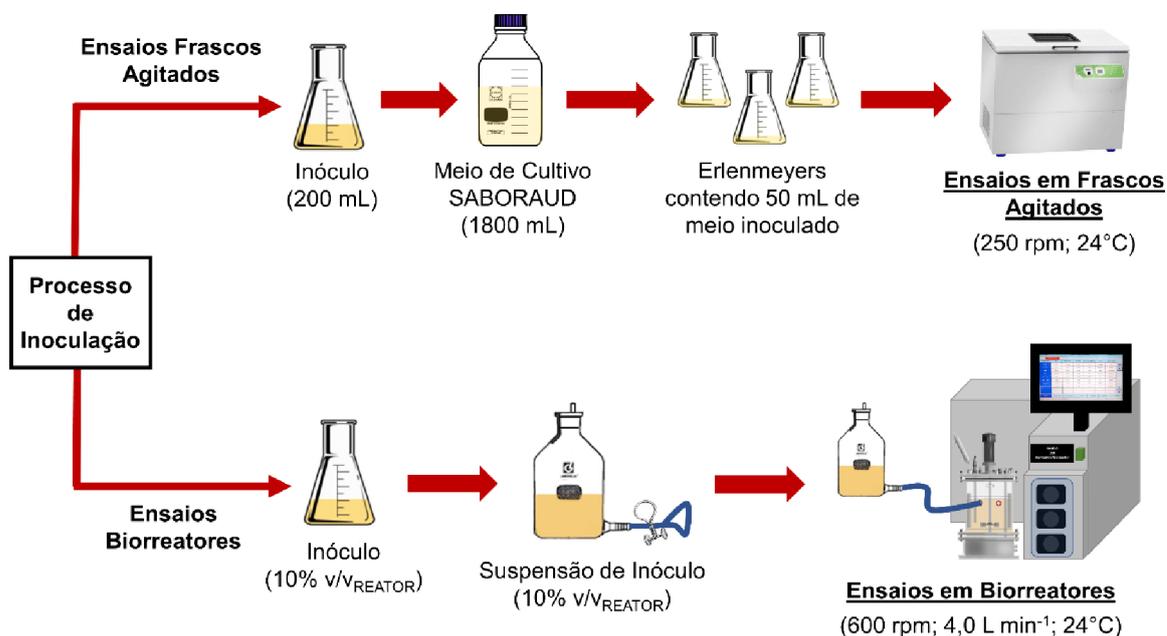
Na sequência, foram adicionados aos tubos inclinados (*slants*) da cultura estoque de trabalho 7 mL de meio ISP2 esterilizado, sendo a superfície da cultura raspada com alça de platina esterilizada para desprendimento dos esporos.

Diante da concentração de esporos obtida através da técnica de contagem em Câmara de Neubauer (MANACHINI; FORTINA; PARTINI, 1987), de aproximadamente 10⁸ esporos mL⁻¹, alíquotas de 7 mL da suspensão foram transferidas para Erlenmeyers de 500 mL contendo 43 mL de meio ISP2 estéril, de modo que a concentração final de esporos no inóculo fosse da ordem de 10⁷ esporos mL⁻¹.

Os Erlenmeyers foram mantidos em incubador rotativo (New Brunswick Scientific, modelo C25KC; NOVA ÉTICA, modelo 430RD) a 250 rpm e 28°C por 24 horas.

Após a obtenção do inóculo, seguiu-se o procedimento de inoculação, que se diferenciou de acordo com a escala de cultivo. A Figura 5.1 a seguir, ilustra as etapas de inoculação em cultivos conduzidos em frascos agitados e em biorreator.

Figura 5.1- Esquema das etapas de inoculação dos ensaios conduzidos em frascos agitados e em biorreator.



Fonte: Acervo pessoal.

Nos ensaios conduzidos em frascos agitados, foram preparados inicialmente 1800 mL de meio Saboraud (SUDHA et al., 2017) composto de 20,0 g L⁻¹ de dextrose e 10,0 g L⁻¹ de peptona de soja. O mesmo teve seu pH_{inicial} ajustado para 5,0 com solução de HCl 2,0 M, sendo posteriormente armazenado em frasco Schott graduado de 2 L e autoclavado a 121°C por 20 minutos.

Após o resfriamento, foram inoculados 200 mL de suspensão micelial obtida da etapa de preparo do inóculo. O conteúdo foi homogeneizado em agitador magnético e distribuiu-se 50 mL do caldo de cultivo em frascos Erlenmeyers de 500 mL. Os ensaios em frascos agitados foram conduzidos em incubador rotativo (New Brunswick Scientific, modelo C25KC; NOVA ÉTICA, modelo 430RD) a 250 rpm e 24°C.

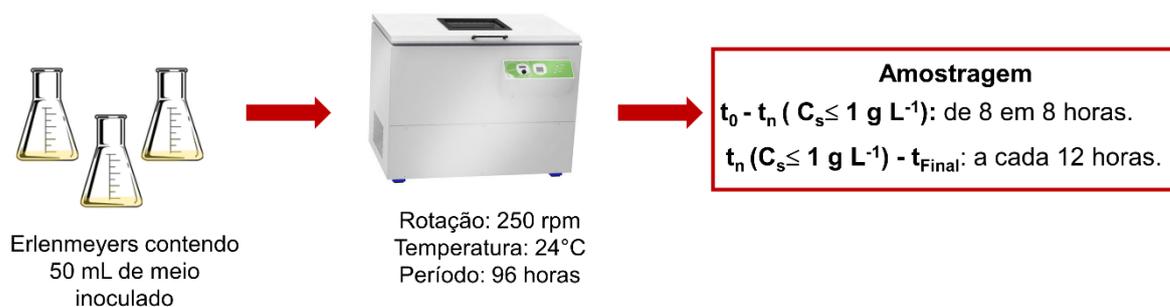
Os ensaios em biorreator tiveram seu início após a inoculação da suspensão micelial contida em frasco Mariotte na proporção de 10% (v/v_{útil reator}) ao biorreator, já contendo meio de cultura Saboraud (20 g L⁻¹ dextrose e 10 g L⁻¹ de peptona de soja), previamente autoclavado a 121°C por 50 minutos. Os ensaios foram conduzidos à frequência de rotação de 600 rpm, vazão de alimentação de ar de 4,0 L min⁻¹ e temperatura de 24°C.

5.2.2. Cultivos em frascos agitados

5.2.2.1. Batelada convencional em frascos agitados

A Figura 5.2 ilustra as etapas e os períodos de amostragem dos cultivos em batelada convencional conduzidos em frascos agitados.

Figura 5.2- Etapas do processo de inoculação dos ensaios conduzidos em frascos agitados.



Fonte: Adaptado de Sousa (2018).

O ensaio conduzido como batelada convencional em incubador rotativo foi realizado em triplicata e as amostragens ocorreram a cada 8 horas até se verificar o esgotamento da fonte de carbono e, posteriormente, a cada 12 horas até o final do cultivo, caracterizado pela estabilização da produção de colorante. Ao longo dos cultivos foram acompanhadas as variáveis pH e concentrações celular e de glicose e produção de colorante vermelho.

Ressalta-se que somente no primeiro ensaio conduzido como batelada convencional, a amostragem foi realizada a cada 8 horas durante todo o cultivo para uma avaliação mais detalhada do processo.

5.2.2.2. Cultivos contínuos com alimentação intermitente a volume constante

5.2.2.2.1. Avaliação do comportamento do cultivo contínuo com alimentação intermitente à volume constante

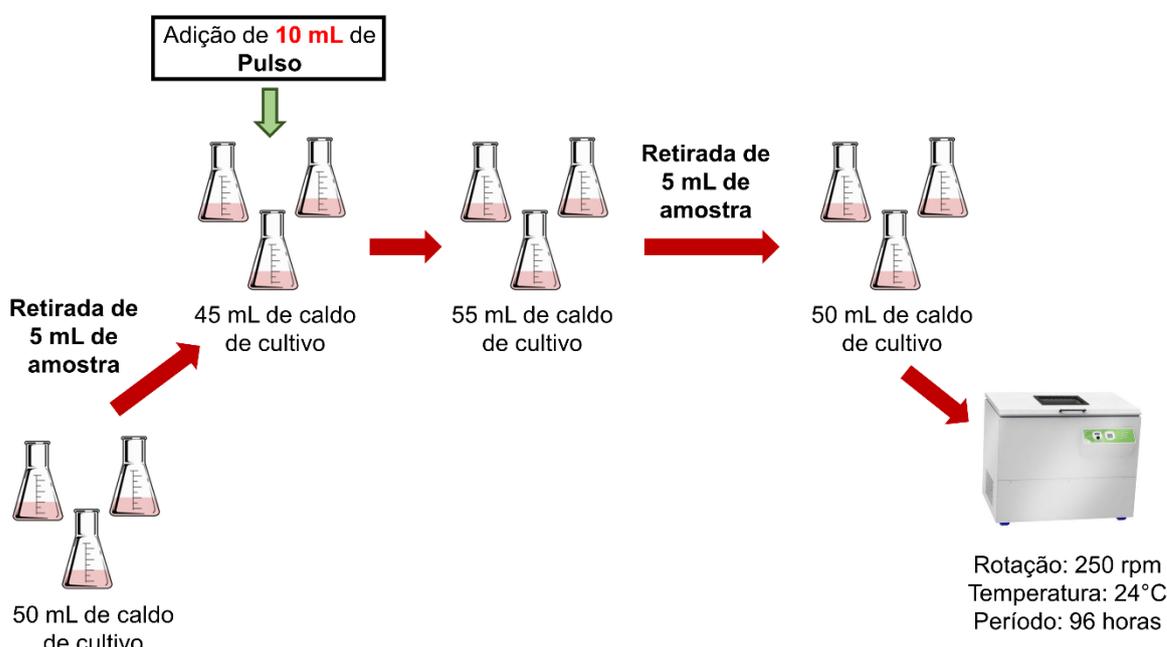
Visando avaliar o perfil do cultivo conduzido continuamente com alimentação intermitente, o procedimento de adição de pulsos aos frascos agitados iniciou-se após se verificar, durante o período de batelada convencional, uma concentração de dextrose no caldo de cultivo de, aproximadamente, 4 g L^{-1} .

Primeiramente, a cada 8 horas, retirou-se 5 mL de amostra dos Erlenmeyers contendo 50 mL de caldo de cultivo. Posteriormente, adicionou-se um pulso de 10 mL a cada frasco totalizando um volume final de 55 mL. Após a adição do pulso, foram, então, retirados uma

segunda alíquota de 5 mL, de modo a se obter por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a nova concentração de dextrose no caldo de cultivo.

Todo o procedimento de amostragem, bem como de adição dos pulsos, foi conduzido em câmara de fluxo laminar. Ao final da amostragem, os Erlenmeyers apresentando um volume total de caldo de 50 mL foram, então, retornados para o incubador rotativo, como ilustrado na Figura 5.3.

Figura 5.3- Etapas de amostragem e adição de pulso no cultivo contínuo com alimentação intermitente à volume constante.



Fonte: Acervo pessoal.

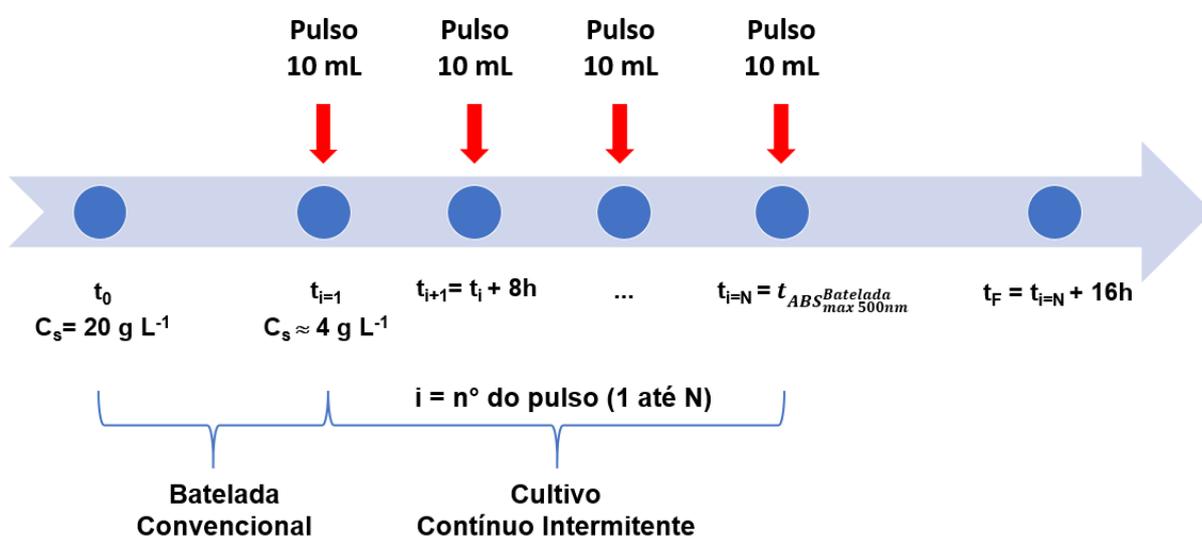
Quanto às soluções de pulso, foram preparados cerca de 200 mL de duas soluções compostas por:

- **Pulso Saboraud:** 21,0 g L⁻¹ de dextrose e 10,5 g L⁻¹ de peptona de soja.
- **Pulso Dextrose:** 21,0 g L⁻¹ de dextrose.

Após o preparo, as mesmas tiveram o pH_{inicial} ajustado em 5,0 com solução de HCl 2,0 M, sendo posteriormente depositadas em frascos Schott graduados de 500 mL e autoclavadas a 121°C por 20 minutos. Após a autoclavagem, as soluções foram mantidas em geladeira à 4°C.

Os ensaios foram conduzidos simultaneamente ao cultivo em batelada convencional e em triplicata para ambos tipos de pulso empregados. Além disso, os pulsos foram adicionados a cada 8 horas. Ao se observar o início da estabilização da produção de colorante no cultivo em batelada ($t_{ABS_{max\ 500nm}^{Batelada}}$), interrompeu-se a adição de pulsos e prosseguiu-se com o cultivo por mais 16 horas, de modo a se avaliar qual seria o comportamento do mesmo (Figura 5.4).

Figura 5.4- Distribuições dos pulsos ao longo do cultivo de avaliação do comportamento da fermentação contínua com alimentação intermitente de meio de cultura suplementar.



Fonte: Acervo pessoal.

Assim como na batelada convencional, ao longo dos ensaios foram acompanhados o pH, o crescimento celular, o consumo de glicose e a produção de pigmento. É válido ressaltar que, assim como no primeiro ensaio conduzido como batelada convencional, somente neste conjunto de ensaios a amostragem foi realizada a cada 8 horas durante todo o cultivo, visando se obter uma primeira avaliação mais detalhada dos cultivos contínuos.

5.2.2.2.2. Avaliação da composição do meio de alimentação

De modo a se avaliar a composição do meio de alimentação que possa vir a favorecer a produção do colorante natural vermelho empregando a estratégia de batelada alimentada, realizou-se um novo conjunto de ensaios em incubador rotativo, utilizando 4 diferentes soluções pulso.

Os novos cultivos contínuos com alimentação intermitente tiveram seu início após o esgotamento da fonte de carbono durante o período conduzido como batelada convencional.

Após o término da fonte de carbono, retirou-se 5 mL de amostra dos Erlenmeyers contendo 50 mL de caldo de cultivo e, sequencialmente, adicionou-se um pulso de 10 mL. Após a adição do pulso, coletou-se uma segunda alíquota de 5 mL de modo a se obter por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a nova concentração de dextrose no caldo.

Todo o procedimento de amostragem e de adição dos pulsos foi conduzido em câmara de fluxo laminar. Ao final da amostragem, os Erlenmeyers apresentando um volume total de caldo de 50 mL foram retornados para o incubador rotativo, conforme ilustrado anteriormente na Figura 5.3.

Com relação às soluções pulso, foram preparados 200 mL de 4 tipos de soluções de diferentes composições, as quais tiveram o pH_{inicial} ajustado em 5,0 com solução de ácido clorídrico (HCl) 2,0 M e posteriormente foram transferidas para frascos Schott graduados de 500 mL e autoclavadas. Ao final do processo de esterilização, as mesmas foram mantidas em geladeira à 4°C.

A Tabela 5.2 apresenta as 4 diferentes composições das soluções pulso empregadas.

Tabela 5.2-Composições das soluções de suplementação.

Tipo de Pulso	Composição	Concentração (g L⁻¹)
Pulso Saboraud 1 (CPS1)	Dextrose	21,0
	Peptona de Soja	10,5
Pulso Saboraud 2 (CPS2)	Dextrose	10,5
	Peptona de Soja	5,25
Pulso Saboraud 3 (CPS3)	Dextrose	10,5
	Peptona de Soja	10,5
Pulso Peptona (CPP)	Peptona de Soja	10,5

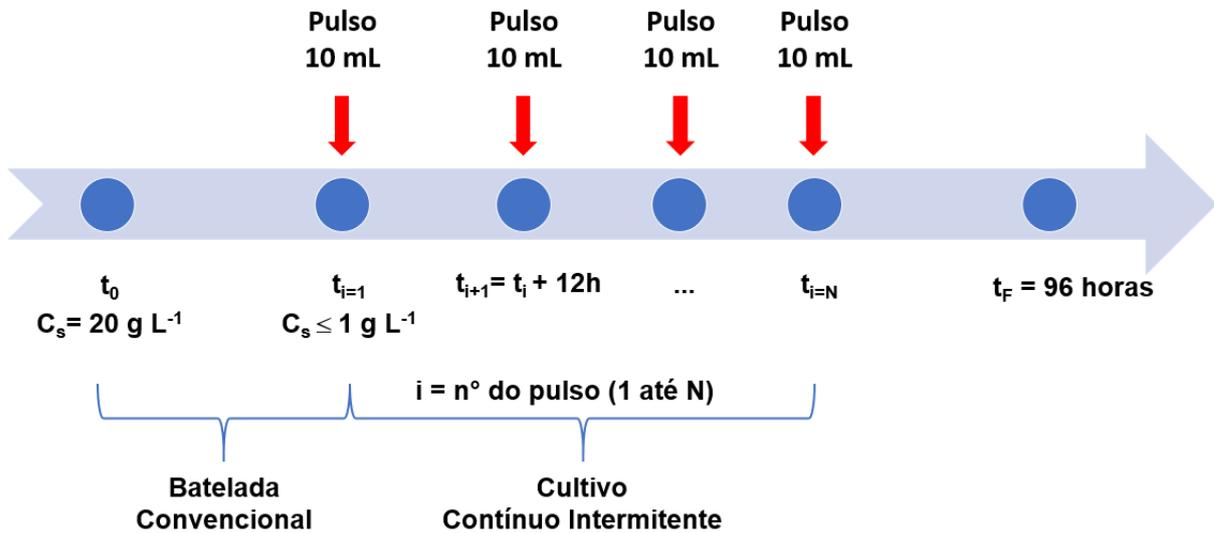
Fonte: Acervo pessoal.

Simultaneamente à batelada convencional, o novo conjunto de ensaios pulsados foi realizado em triplicata para todos os 4 tipos de pulso avaliados durante um período total de 96 horas. Ao longo do cultivo, foram acompanhados o pH, o crescimento celular, o consumo de glicose e a produção de pigmento, por meio de amostragens realizadas a cada 8 horas até se verificar o esgotamento da fonte de carbono e, posteriormente, a cada 12 horas até o final do cultivo.

Vale ressaltar que a adição dos pulsos se deu a cada 12 horas (Figura 5.5), tendo seu

início quando observado o esgotamento da fonte de carbono no caldo de cultivo, durante o período inicial conduzido em batelada.

Figura 5.5- Distribuição dos pulsos ao longo dos cultivos de avaliação da composição do meio de cultura de alimentação.



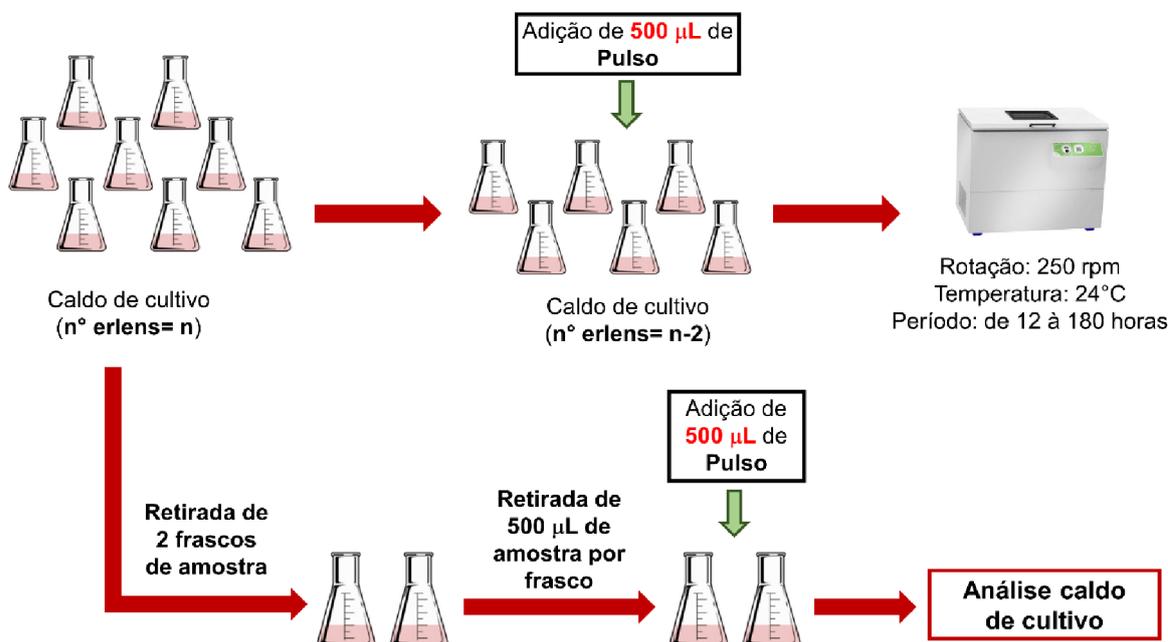
Fonte: Acervo pessoal.

5.2.2.2.3. Cultivos em batelada alimentada intermitente à volume constante

Visando conduzir cultivos em batelada alimentada intermitente com pulsos de pequenos volumes de meio de cultura concentrado e sem retirada expressiva de amostras, foi realizado um novo ensaio, em duplicata, no qual foram alimentados em 50 mL de caldo um volume de 500 μL de meio de cultura suplementar com concentração de 238,0 g L^{-1} de dextrose e 119,0 g L^{-1} de peptona de soja.

Após se verificar o esgotamento da fonte de carbono no caldo durante o período inicial conduzido em batelada, foram retirados 2 Erlenmeyers como amostras e, aos demais frascos, adicionou-se 500 μL de meio de cultura suplementar concentrado retornando-os ao incubador rotativo, conforme ilustra a Figura 5.6.

Figura 5.6- Esquema de execução do cultivo batelada alimentada intermitente com pulso de meio de cultura suplementar concentrado.



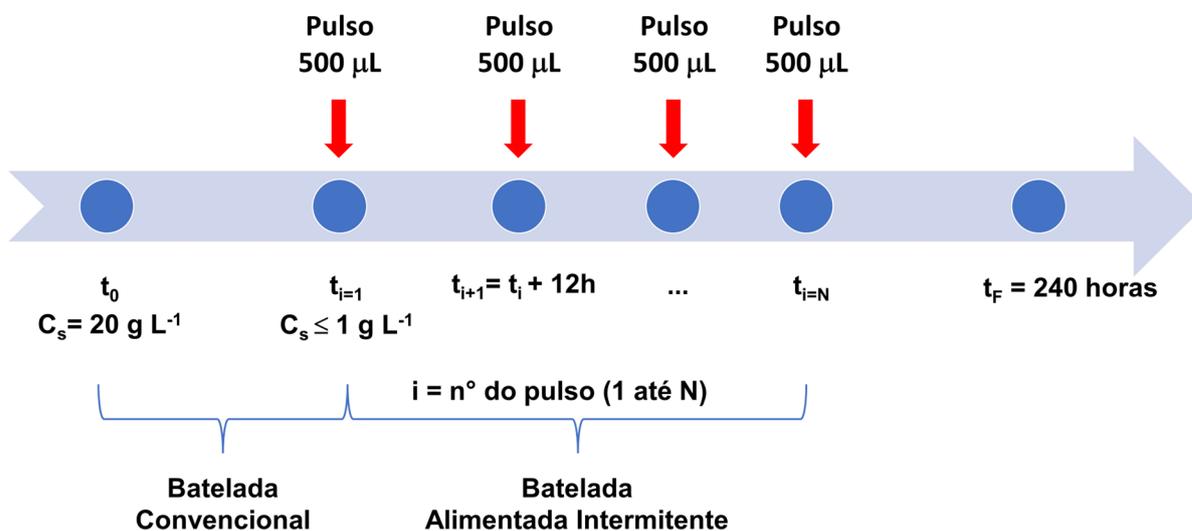
Fonte: Acervo pessoal.

Com relação aos 2 Erlenmeyers retirados, extraiu-se uma alíquota de 500 µL do caldo de cultivo de cada frasco, com o intuito de se avaliar a concentração de dextrose no caldo anteriormente à adição de pulsos. Após a retirada das alíquotas, adicionou-se 500 µL de meio de cultura suplementar a cada Erlenmeyer, homogeneizou-se o caldo e deu-se sequência às análises para o acompanhamento do pH, crescimento celular e da produção de colorante, bem como da concentração de dextrose no caldo após a adição do pulso.

Quanto à solução de alimentação concentrada, foram preparados cerca de 100 mL de solução de dextrose ($476,0 \text{ g L}^{-1}$) e 100 mL de solução de peptona de soja ($238,0 \text{ g L}^{-1}$). As mesmas tiveram o $\text{pH}_{\text{inicial}}$ ajustado em 5,0 com solução de HCl 2,0 M e, posteriormente, foram transferidas separadamente para frascos Schott graduados de 500 mL e autoclavadas a 121°C por 20 minutos. Após o processo de autoclavagem, de forma asséptica verteu-se a solução de peptona de soja no frasco Schott contendo a solução dextrose, de modo a se obter 200 mL de uma única solução composta de 238 g L^{-1} de dextrose e 119 g L^{-1} de peptona de soja. A solução pulso concentrada obtida foi, então, mantida em geladeira à 4°C .

Conforme ilustrado na Figura 5.7, os pulsos foram adicionados a cada 12 horas até o término do cultivo que se deu em 240 horas, com base na capacidade máxima de armazenamento dos incubadores rotativos (20 Erlenmeyers).

Figura 5.7- Esquema de execução dos cultivos em batelada alimentada intermitente com pulso de meio de cultura suplementar concentrado.



Fonte: Acervo pessoal.

Ressalta-se que durante o período inicial conduzido em batelada, 2 Erlenmeyers também foram retirados a cada 12 horas de modo a se acompanhar, assim como para as amostras do período de alimentação intermitente, o pH, o crescimento celular, o consumo de glicose e a produção de colorante.

5.2.3. Cultivos em biorreator

Os cultivos em batelada e batelada alimentada foram conduzidos em biorreator de bancada tipo tanque agitado de 4 L de volume útil (Bioflo 310, New Brunswick Scientific, EUA). O biorreator de 0,17 m de diâmetro interno (D_i) foi equipado com quatro hastes defletoras (chicanas), um aspensor de aço inoxidável do tipo anel com diâmetro de 0,065 m, contendo quatro orifícios de 0,8 mm de diâmetro. Durante os cultivos, o oxigênio dissolvido foi monitorado por um sistema composto por um sensor óptico (InPro 6880i, Mettler Toledo) e um transmissor (Transmitter M400, Mettler Toledo). A agitação do sistema foi garantida por meio da utilização combinada de dois impelidores orelha de elefante de três lâminas, distanciados cerca de 0,08 m, sendo o impelidor superior operado direcionando o escoamento para baixo (EEDP), enquanto o impelidor inferior, localizado a 0,037 m da base do biorreator, foi operado direcionando o escoamento de fluido para cima (EEUP) (New Brunswick Scientific, EUA).

De forma a minimizar os eventuais efeitos de arraste no decorrer do bioprocesso, foi alimentado ar saturado ao biorreator, proveniente do borbulhamento de ar seco em um frasco Schott graduado de 2,0 L contendo água destilada esterilizada.

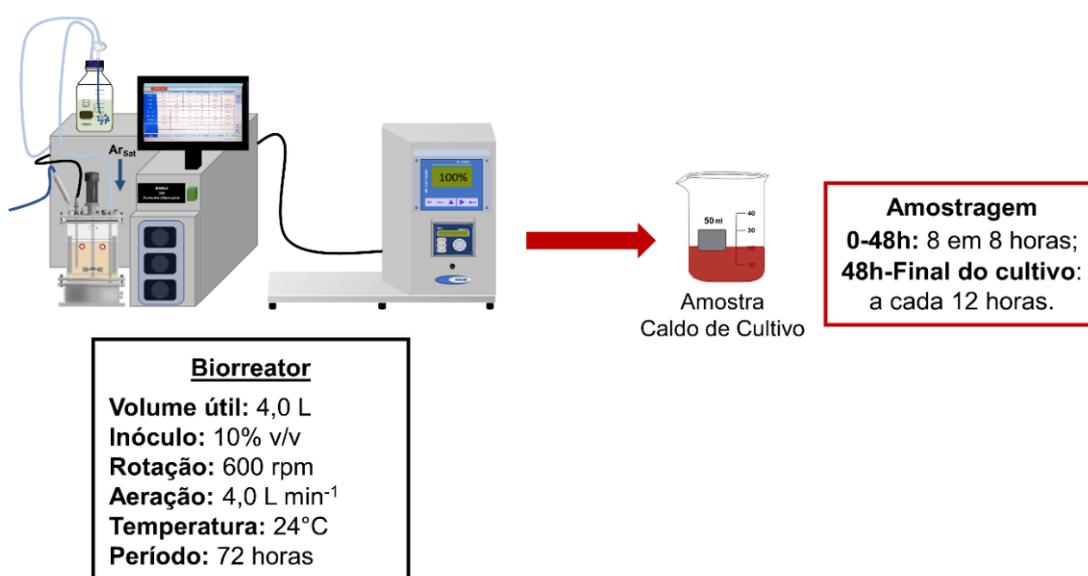
Todos os ensaios foram realizados em duplicata e conduzidos a 600 rpm, 24°C, 4,0 L min⁻¹ de alimentação de ar ($\approx 1,0$ vvm) e pH_{inicial} 5,0, condições estas que, segundo abordado no Capítulo 4, se apresentaram como as mais favoráveis ao bioprocesso de síntese de colorante vermelho por *T. minnesotensis*.

Independentemente do modo operacional, de forma geral, os ensaios conduzidos em biorreator de bancada apresentaram três etapas: preparo da cultura estoque de trabalho, preparo do inóculo e cultivo, sendo as duas primeiras etapas já previamente descritas na seção 5.2.1.

5.2.3.1. Batelada convencional em biorreator tanque agitado e aerado

Os ensaios em batelada convencional (BC), os quais foram realizados em duplicata, foram realizados em biorreator operado com 4 L de volume útil, contendo inicialmente 3,6 L de meio de cultura Saboraud (20 g L⁻¹ dextrose e 10 g L⁻¹ de peptona de soja), previamente autoclavado a 121°C por 50 minutos, que posteriormente foi inoculado assepticamente com 0,4 L de suspensão de inóculo. A Figura 5.8 ilustra o aparato experimental empregado nos ensaios conduzidos em batelada em biorreator de bancada, assim como os períodos de amostragem.

Figura 5.8- Esquema do aparato experimental empregado nos ensaios em biorreator conduzidos em batelada convencional (BC).



Fonte: Acervo pessoal do autor.

De modo a acompanhar o pH, o crescimento celular, o consumo de glicose e a produção de colorante, alíquotas de 20 mL foram retiradas de 8 em 8 horas durante as primeiras 48 horas de cultivo e, posteriormente, a cada 12 horas até o término do mesmo.

5.2.3.2. Batelada alimentada em biorreator tanque agitado e aerado

Tomando como base trabalhos anteriores do grupo, como o de TEODORO et al. (2006), no qual a estratégia de cultivo em batelada alimenta foi aplicada em biorreator tipo tanque agitado de 4 L de volume útil para produção de um metabólito secundário (ácido clavulânico) sintetizado pela bactéria filamentosa *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, a estratégia de cultivo em batelada alimentada (FB) sobre a síntese de colorante vermelho pelo fungo endofítico *T. minnesotensis* foi avaliada em três vazões mássicas de dextrose ($F.C_{SF}$), variando-se a vazão volumétrica de alimentação (F) e a concentração de substrato no meio de alimentação (C_{SF}).

Diante da variação da vazão de alimentação entre os cultivos e tomando como base um volume útil médio de 3,8 L, visando o controle do cultivo em termos de formação de espuma e aumento do volume do caldo devido à retenção gasosa e variações reológicas do caldo, para a realização dos ensaios em batelada alimentada em biorreatores de bancada, os volumes iniciais composto de 90% (v/v) de meio de cultura Saboraud (20 g L⁻¹ dextrose e 10 g L⁻¹ de peptona de soja) e 10% (v/v) de inóculo, foram iguais a 3,6, 3,7 e 3,8 L para as respectivas vazões volumétricas de alimentação de 0,04, 0,02 e 0,01 L h⁻¹, conforme mostrado na Tabela 5.3.

Tabela 5.3-Condições de alimentação dos cultivos em batelada alimentada (FB) conduzidos em biorreator de bancada.

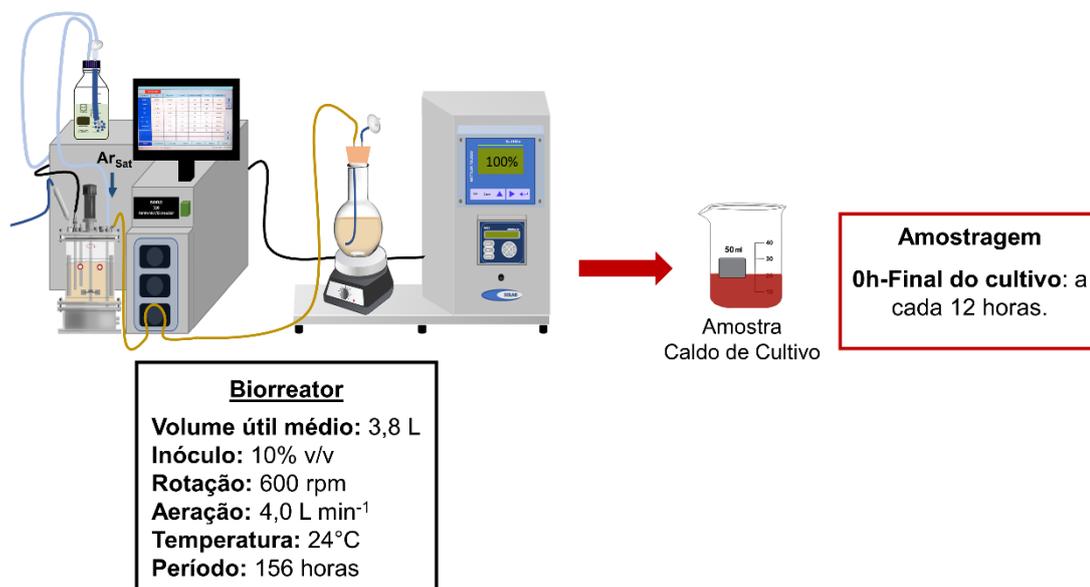
Ensaio	F (L.h⁻¹)	C_{SF} (g.L⁻¹)	F.C_{SF} (g.h⁻¹)	V_{Inicial} (L)
FB1	0,04	60,0	2,4	3,6
FB2	0,04	30,0	1,2	3,6
FB3	0,02	60,0	1,2	3,7
FB4	0,01	60,0	0,6	3,8
FB5	0,02	30,0	0,6	3,7
FB6	0,01	120,0	1,2	3,8
FB7	0,02	120,0	2,4	3,7
FB8	0,04	15,0	0,6	3,6
FB9	0,01	240,0	2,4	3,8

Fonte: Acervo pessoal do autor.

Ressalta-se que embora a concentração de dextrose no meio de alimentação (C_{SF}) tenha sido variada nos ensaios, a proporção mássica Dextrose: Peptona de Soja se manteve a mesma em todos os ensaios (2:1), sendo esta proporção igual à empregada nos cultivos em batelada alimentada intermitente à volume constante conduzidos em incubador rotativo (BPC).

Por fim, conforme ilustrado na Figura 5.9 para o acompanhamento do pH, do crescimento celular, do consumo de glicose e da produção de colorante, alíquotas de 20 mL foram retiradas de 12 em 12 horas durante as primeiras 36 horas, dentro do qual o cultivo foi operado em batelada. Posteriormente, utilizando-se uma bomba peristáltica, alíquotas variando de 120 a 240 mL a depender da vazão volumétrica de alimentação, foram retiradas a cada 12 horas até o término do ensaio, delimitado em 156 horas de processo, de modo a manter o volume constante.

Figura 5.9- Aparato experimental empregado nos ensaios em biorreator conduzidos em batelada alimentada.



Fonte: Acervo pessoal do autor.

5.2.4. Métodos analíticos

5.2.4.1. Determinação do pH

O pH dos caldos de cultivo foi aferido por meio de um pHmetro Qualxtron (modelo QX 1500).

5.2.4.2. Determinação da concentração celular (C_X)

A concentração de biomassa fúngica foi quantificada mediante método gravimétrico, onde um volume conhecido de caldo foi filtrado em membrana de 0,45 μm de diâmetro de poro, previamente seca e pesada. Posteriormente, o material foi submetido a secagem em estufa a 60°C por um período de 48 horas. Ao final desse período, pesou-se o material de modo a obter a concentração celular por meio da equação 5.1.

$$C_X = \frac{(m_{\text{Final}} - m_{\text{Inicial}})}{V_{\text{amostra}}} \quad (5.1)$$

onde:

C_X : concentração celular (g L^{-1}).

m_{Inicial} : massa da membrana seca (g).

m_{Final} : massa da membrana + biomassa após o processo de secagem (g).

$V_{amostra}$: volume de amostra (L).

5.2.4.3. Determinação da concentração de dextrose (C_S)

Nas determinações das concentrações de dextrose e de colorante, o caldo de cultivo teve inicialmente seu pH ajustado pra 8,0 e, posteriormente, foi centrifugado a 4°C e 12000 rpm por 30 minutos. Por fim, o mesmo foi filtrado a vácuo em membrana de nitrato de celulose de 0,45µm para total separação das células.

A concentração de dextrose foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Inicialmente, os sobrenadantes das amostras foram devidamente diluídos em água ultrapura Milli-Q e, posteriormente, foram filtrados em microfiltros de nylon 0,22 µm de modo a se dar início as injeções.

De forma a se determinar a concentração de dextrose, volumes de 20 µL de amostra, diluída e filtrada, foram injetados em um sistema cromatográfico (e2695, Waters, EUA), equipado com um detector de índice de refração (2414, Waters, EUA) operado a 32°C e uma coluna Sugar-Pak I (300 x 6,5 mm, 10 µm, Waters) mantida a 80°C. Como eluente foi utilizado água ultrapura a uma vazão de 0,5 mL min⁻¹ e soluções de dextrose anidra P.A (Labsynth) nas concentrações entre 0,1 a 25 g L⁻¹ foram utilizadas como padrões.

5.2.4.4. Determinação da produção de colorante vermelho (ABS_{500nm})

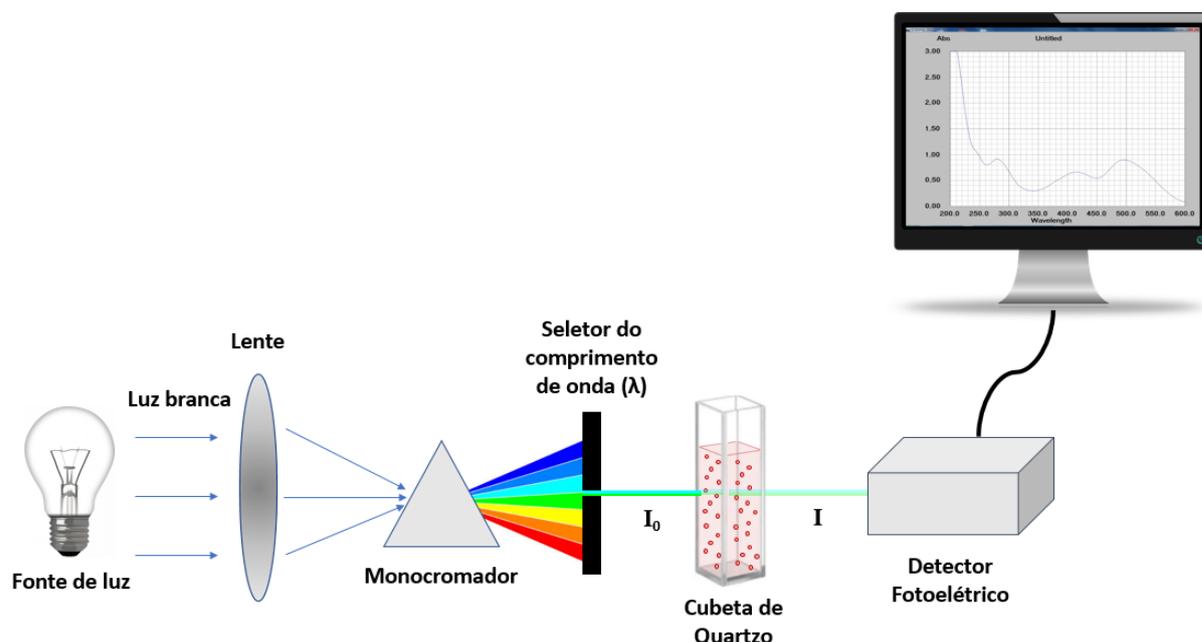
A produção de biocolorante foi avaliada pela medida da absorbância do sobrenadante filtrado considerando o fator de diluição de cada amostra. Para medida de absorbância utilizou-se o espectrofotômetro-UV (Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences).

De modo a se determinar o comprimento de onda correspondente à máxima absorção para o colorante vermelho, realizou-se o escaneamento da amostra do caldo de cultivo livre de células na faixa de 300 a 600 nm. Os resultados obtidos foram expressos em termos de Unidades de Absorbância a 500 nm (UA), o que concorda com a máxima absorção para colorantes vermelhos reportados pela literatura (CHATTERJEE *et al.*, 2009; CHRISTIE, 2001; SINGH *et al.*, 2015).

5.2.4.5. Determinação da relação entre absorbância (UA_{500}) e concentração de colorante (gp L⁻¹)

O princípio de quantificação via espectrofotômetro se baseia na quantidade de luz absorvida por uma amostra a uma concentração específica e a um dado comprimento de onda, conforme ilustra a Figura 5.10.

Figura 5.10- Princípio de leitura da absorbância via espectrofotômetro.



Fonte: Acervo pessoal.

Outro ponto também considerado quando empregado a leitura via espectrofotômetro é a existência de uma relação, denominada Lei de Lambert-Beer (Equação 5.2), entre a absorção de luz e as propriedades da substância avaliada.

$$A = \epsilon l c \quad (5.2)$$

onde:

A: absorbância da amostra (UA).

ϵ : coeficiente de absorvidade molar da espécie (propriedade intrínseca da substância) ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

l: caminho óptico (largura interna da cubeta) (mm).

c: concentração molar (mol L^{-1}).

A Lei de Lambert-Beer (SKOOG, WEST; HOLLER, 2006), descreve a existência de uma relação linear entre a absorbância da amostra e a concentração da espécie.

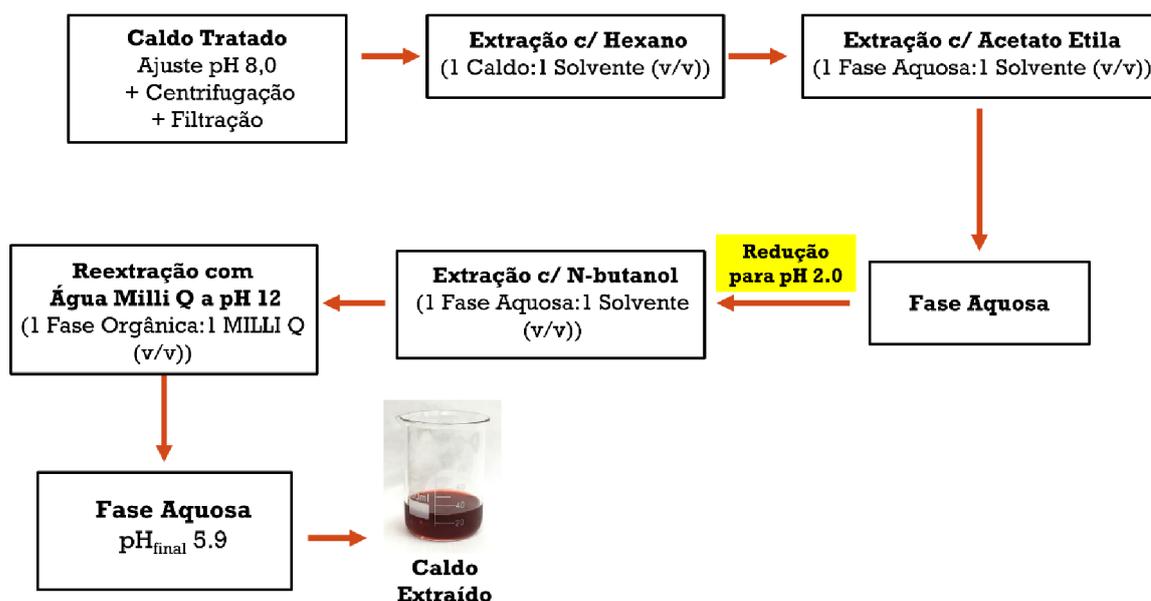
Diante disto, segundo o estudo preliminar realizado por Pereira e Baptista (2017), o biocolorante vermelho avaliado tende a seguir a Lei de Lambert-Beer (SKOOG, WEST; HOLLER, 2006). Dessa forma, visando obter uma relação entre a absorbância e a concentração de biocolorante vermelho, foi realizada a leitura de absorbância a 500 nm de amostras de

biocolorante previamente purificadas por uma sequência de extrações com solventes orgânicos e diluídas, de modo que a absorvância se apresentasse na faixa de 0,1 a 1,0 UA. Posteriormente, pelo método de gravimetria, essas amostras foram secas e pesadas de modo a se determinar a concentração (g L^{-1}) de colorante por amostra.

Primeiramente, ajustou-se o pH de uma amostra do caldo de cultivo do ensaio em batelada convencional conduzido em biorreator para 8,0, de modo a garantir a estabilidade do colorante. Em seguida, a mesma foi centrifugada a 4°C e 12000 rpm por 30 minutos, e posteriormente foi filtrada a vácuo em filtros de membrana de $0,45\mu\text{m}$, de modo a garantir a retirada total de células.

Baseados em trabalhos preliminares (PEREIRA; BAPTISTA-NETO, 2017; SOUSA, 2018), uma fração da amostra do caldo tratado (centrifugado e filtrado) foi, então, submetida a um procedimento sequencial de extração líquido-líquido, conforme ilustrado na Figura 5.11.

Figura 5.11- Procedimento de extração realizado com amostra do caldo de cultivo tratado.



Fonte: Acervo pessoal do autor.

Após o procedimento de extração, as amostras, tanto de caldo bruto (CT) tratado quanto de caldo extraído (CE), foram diluídas em balões volumétricos de 25 mL contendo água deionizada em 5 diferentes proporções, conforme mostrado na Tabela 5.4.

Tabela 5.4- Diluições avaliadas do caldo tratado (CT) e do caldo extraído (CE).

V_{Amostra} (mL)	$V_{\text{Água deionizada}}$ (mL)	Fator de diluição	$V_{\text{Análise gravimétrica}}$ (mL)
2,0	23,0	12,5	10,0
4,0	21,0	6,25	8,0
15,0	10,0	1,67	8,0
20,0	5,0	1,25	8,0
25,0	0,0	1,0	8,0

Fonte: Acervo pessoal do autor.

Posteriormente à diluição das amostras, segundo a Tabela 5.4, volumes variando na faixa de 8 a 10 mL a depender da diluição das amostras, foram adicionados em mini formas de alumínio, previamente secas e pesadas. Estas foram, então, mantidas em estufa a 60°C por um período de 24 horas até que toda a água contida nas amostras fosse evaporada. Após este período, as formas de alumínio foram armazenadas em um dessecador por um período de 10 minutos, de forma a atingirem a temperatura ambiente sem absorverem umidade. Em seguida, as mesmas foram novamente pesadas de modo a se obter, empregando a equação 5.3, a concentração de sólidos solúveis do caldo tratado (C_{SSCT}) e a concentração do colorante (C_{CE}) nas amostras extraídas.

$$C_{P_i} \text{ (g/L)} = \frac{(m_{\text{Final}} - m_{\text{Inicial}})}{V_{\text{amostra}}} \quad (5.3)$$

onde:

C_{P_i} : concentração de sólidos solúveis do caldo tratado ($C_{P_{\text{SSCT}}}$) ou do colorante extraído ($C_{P_{\text{CE}}}$) (g L^{-1}).

m_{Inicial} : massa da mini forma de alumínio vazia (g).

m_{Final} : massa da mini forma de alumínio contendo colorante seco (g).

V_{amostra} : volume de caldo tratado ou da fração extraída (L).

Simultaneamente, considerando os fatores de diluição de cada amostra, as respectivas absorvâncias foram mensuradas por espectrofotômetro UV (Ultrospec 2100 Pro, Amersham Biosciences) no comprimento de onda de 500 nm, empregando continuamente durante todas as leituras uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm, na qual o volume de amostra adicionado a cubeta foi de 3 mL.

Após a obtenção das concentrações de colorante e de suas respectivas absorvâncias (ABS_{500}), executou-se o ajuste de um modelo linear para as amostras de caldo bruto tratado e

para as amostras resultantes do procedimento de extração.

A relação linear entre concentração de sólidos solúveis e absorvância do caldo tratado é dada pela Equação 5.4:

$$C_{P_SSCT} = \frac{1}{A} \cdot ABS_{500_SSCT} \quad (5.4)$$

onde:

C_{P_SSCT} : concentração de sólidos solúveis no caldo tratado ($g L^{-1}$).

ABS_{500_SSCT} : absorvância do caldo tratado (UA).

A : constante.

A relação linear entre a concentração de colorante extraído e a absorvância da fração obtida pelo procedimento de extração é dada pela Equação 5.5:

$$C_{P_CE} = \frac{1}{B} \cdot ABS_{500_CE} \quad (5.5)$$

onde:

C_{P_CE} : concentração de colorante na fração extraída ($g L^{-1}$).

ABS_{500_CE} : absorvância da fração obtida ao final do processo de extração (UA).

B : constante.

Dividindo-se a Equação 5.4 pela Equação 5.5, obtém-se a Equação 5.6 que, ao ser substituída na Equação 5.5, resulta na relação direta entre a absorvância do caldo tratado (ABS_{SSCT}) e a concentração de colorante na fração extraída (Equação 5.7).

$$\frac{C_{P_SSCT}}{C_{P_CE}} = \frac{B}{A} \cdot \frac{ABS_{500_SSCT}}{ABS_{500_CE}} \rightarrow ABS_{500_CE} = \frac{B}{A} \cdot \frac{C_{P_CEI}}{C_{P_SSCTI}} \cdot ABS_{500_SSCT} \quad (5.6)$$

$$C_{P_CE} = \frac{1}{B} \cdot \frac{B}{A} \cdot \frac{C_{P_CEI}}{C_{P_SSCTI}} \cdot ABS_{500_SSCT} \rightarrow C_{P_CE} = \frac{1}{A} \cdot \frac{C_{P_CEI}}{C_{P_SSCTI}} \cdot ABS_{500_SSCT} \quad (5.7)$$

onde:

C_{P_SSCT} : concentração de sólidos solúveis no caldo tratado ($g L^{-1}$).

ABS_{500_SSCT} : absorvância do caldo tratado (UA₅₀₀).

C_{P_CE} : concentração de colorante na fração extraída ($g L^{-1}$).

ABS_{500_CE} : absorvância da fração obtida ao final do processo de extração (UA).

C_{P_CEI} : concentração de colorante na fração extraída integral ($g L^{-1}$).

C_{P_SSCTI} : concentração de sólidos solúveis no caldo tratado integral (g L^{-1}).

A : constante.

B : constante.

Dada a dificuldade de purificação, isolamento e identificação de colorantes naturais oriundos de microrganismos (CHEN *et al.*, 2015; VENKATACHALAM *et al.*, 2018) e considerando a absorvância uma propriedade intensiva e proporcional à concentração de colorante vermelho, os cálculos dos parâmetros de rendimento, os quais serão apresentados a seguir, empregarão os valores de concentração de colorante extraído (C_{P_CE}), calculados por meio da Equação 5.7 e dos valores de absorvância do caldo tratado (ABS_{500_SSCT}) aferidos à 500 nm durante os cultivos com *T. minnesotensis*.

5.2.4.6. Determinação dos parâmetros de rendimento

5.2.4.6.1. Produtividade volumétrica máxima (P_{P-MAX}) e Produtividade específica máxima ($P_{P/X-MAX}$)

As produtividades volumétricas e específicas máximas foram calculadas a partir das equações 5.8 e 5.9 a seguir:

$$P_{P-MAX} = \frac{C_{P_{MAX}} - C_{P_0}}{t_P^{MAX}} \quad (5.8)$$

onde:

P_{P-MAX} : produtividade máxima volumétrica em colorante ($\text{g}_P \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$).

$C_{P_{MAX}}$: concentração de colorante correspondente à máxima absorvância à 500 nm ($\text{g}_P \text{L}^{-1}$).

C_{P_0} : concentração de colorante no início do cultivo ($\text{g}_P \text{L}^{-1}$).

t_P^{MAX} : tempo referente a máxima produção alcançada à 500 nm (h).

$$P_{P/X-MAX} = \frac{C_{P_{MAX}} - C_{P_0}}{t_P^{MAX} \cdot (C_X^{t_P^{MAX}} - C_{X_0})} \quad (5.9)$$

onde:

P_{P-MAX} : produtividade máxima específica em colorante ($\text{g}_P \text{L}^{-1} \text{h}^{-1}$).

$C_{P_{MAX}}$: concentração de colorante correspondente à máxima absorvância à 500 nm ($\text{g}_P \text{L}^{-1}$).

C_{P_0} : concentração de colorante no início do cultivo ($\text{g}_P \text{L}^{-1}$).

t_P^{MAX} : tempo referente a máxima produção alcançada à 500 nm (h).

$C_X^{t_P^{MAX}}$: concentração celular no momento da máxima absorvância à 500 nm ($\text{g}_X \text{L}^{-1}$).

C_{X0} : concentração celular no início da fase de crescimento exponencial durante o período sem adições de pulsos ($g_X L^{-1}$).

5.2.4.6.2. *Massa de açúcar total fornecida (M_{AT}), massa de açúcar total consumida (M_{AC}) e massa de açúcar residual (M_{AR})*

Para os cálculos das quantidades de açúcar total fornecida (M_{AT}) e consumida (M_{AC}) no cultivo, utilizou-se as Equações 5.10 e 5.11 para os ensaios conduzidos em frascos agitados e as 5.12 e 5.13 para os ensaios conduzidos em biorreator. Quanto à quantidade de açúcar residual ao final dos ensaios (M_{AR}), empregou-se a Equação 5.14 tanto para os cultivos em frascos agitados quanto para os em biorreator.

$$M_{AT}^F = (C_S^{t=0} \cdot V_{caldo}^{t=0}) + (n \cdot C_{S_pulso} \cdot V_{pulso}) \quad (5.10)$$

onde:

M_{AT}^F : massa total de açúcar fornecida no cultivo em frascos agitados (gs).

$C_S^{t=0}$: concentração de dextrose no início do cultivo ($g_S L^{-1}$).

$V_{caldo}^{t=0}$: volume de caldo no início do cultivo (L).

n: quantidade total de pulsos (-).

C_{S_pulso} : concentração de dextrose no pulso ($g_S L^{-1}$).

V_{pulso} : volume do pulso (L).

$$M_{AC}^F = \sum_{i=1}^M [(C_{S\ i} \cdot V_{caldo\ i}^F) - (C_{S\ i+1} \cdot V_{caldo\ i+1}^F)] \quad (5.11)$$

onde:

M_{AC}^F : massa total de açúcar consumido no cultivo em frascos agitados (gs).

C_S : concentração de dextrose no caldo de cultivo equivalente a amostra i ($g_S L^{-1}$).

V_{caldo}^F : volume de caldo de cultivo no Erlenmeyer no momento da amostragem i (L).

M: número total de amostras retiradas ao longo do cultivo (-).

$$M_{AT}^B = (C_S^{t=0} \cdot V_{caldo}^{t=0}) + (F \cdot C_{SF} \cdot \Delta t_{alimentação}) \quad (5.12)$$

onde:

M_{AT}^B : massa total de açúcar fornecida no cultivo em biorreator (gs).

F: vazão volumétrica de alimentação ($L h^{-1}$).

C_{SF} : concentração de dextrose no caldo de alimentação ($g_S L^{-1}$).

$\Delta t_{\text{alimentação}}$: período total de alimentação do reator (h).

$$M_{AC}^B = \sum_{i=1}^3 [(C_{S i} \cdot V_{\text{caldo } i}^B) - (C_{S i-1} \cdot V_{\text{caldo } i}^B)] + \sum_{i=4}^M [C_{S i-1} \cdot (V_{\text{caldo } i-1} - V_{\text{amostrado } i-1}) + F \cdot C_{SF}(t_i - t_{i-1}) - C_{S i} \cdot V_{\text{caldo } i}] \quad (5.13)$$

onde:

M_{AC}^B : massa total de açúcar consumido no cultivo em biorreator (gs).

C_S : concentração de dextrose no caldo de cultivo equivalente a amostra i (gs L^{-1}).

V_{caldo} : volume de caldo de cultivo no biorreator no momento da amostragem i (L).

M : número total de amostras retiradas ao longo do cultivo (-).

F : vazão volumétrica de alimentação (L h^{-1}).

C_{SF} : concentração de dextrose no caldo de alimentação (gs L^{-1}).

t : tempo referente a amostragem i (h).

$$M_{AR} = M_{AT} - M_{AC} \quad (5.14)$$

onde:

M_{AR} : Massa total de açúcar residual (gs).

5.2.4.6.3. Coeficientes globais de conversão

O coeficiente global de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) foi obtido pela equação 5.15:

$$Y_{P/S} = \frac{m_{Pmax} - m_{P0}}{M_{AC}} \quad (5.15)$$

onde:

$Y_{P/S}$: coeficiente global de conversão de substrato a produto (gp gs^{-1}).

m_{Pmax} : massa de colorante correspondente à máxima absorbância à 500 nm (gp).

m_{P0} : massa de colorante no início do cultivo (gp).

M_{AC} : massa total de açúcar consumida no cultivo (gs).

A equação 5.16 foi utilizada para determinação do coeficiente global de conversão de células a produto ($Y_{P/X}$).

$$Y_{P/X} = \frac{C_{Pmax} - C_{P0}}{(C_{Xmax} - C_{X0})} \quad (5.16)$$

onde:

$Y_{P/X}$: coeficiente global de conversão de células a produto ($g_P g_X^{-1}$).

C_{Pmax} : concentração de colorante correspondente à máxima absorvância à 500 nm ($g_P L^{-1}$).

C_{P0} : concentração de colorante no início do cultivo ($g_P L^{-1}$).

C_{Xmax} : concentração celular máxima obtida no cultivo ($g_X L^{-1}$).

C_{X0} : concentração celular do início da fase de crescimento exponencial durante o período sem adições de pulsos ($g_X L^{-1}$).

O coeficiente global de conversão de substrato a células ($Y_{X/S}$) foi obtido pela equação 5.17:

$$Y_{X/S} = \frac{V_{caldo} \cdot (C_{Xmax} - C_{X0})}{M_{AC}} \quad (5.17)$$

onde:

$Y_{X/S}$: coeficiente global de conversão de substrato a células ($g_X g_S^{-1}$).

C_{Xmax} : concentração celular máxima obtida no cultivo ($g_X L^{-1}$).

C_{X0} : concentração celular do início da fase de crescimento exponencial durante o período sem adição de pulsos ($g_X L^{-1}$).

V_{caldo} : volume do caldo de cultivo (L).

M_{AC} : massa total de açúcar consumida no cultivo (gs).

5.2.5. Modelagem cinética do bioprocesso conduzido em biorreator e estimativa dos parâmetros cinéticos de produção

Baseando-se nos melhores resultados obtidos em batelada alimentada conduzida em biorreator, a seguinte modelagem cinética foi proposta e desenvolvida tendo como hipóteses a glicose como o único substrato limitante, a morte celular existente ao longo de todo o bioprocesso e o colorante como um produto parcialmente associado ao crescimento. Além disso, os balanços de massa para células (X), substrato (dextrose: S) e produto (colorante: P), foram realizados considerando o processo em batelada alimentada à volume constante. As Equações 5.18 a 5.20 descrevem as variações das concentrações de X, S e P ao longo do cultivo em batelada alimentada.

$$\frac{dC_X}{dt} = (\mu - k_m - D) \cdot C_X \quad (5.18)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = D \cdot (C_{SF} - C_S) - \frac{\mu C_X}{Y_{X/S}} \quad (5.19)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = \mu_P \cdot C_X - D \cdot C_P = (\alpha \cdot \mu + \beta) \cdot C_X - D \cdot C_P \quad (5.20)$$

onde:

C_X : concentração celular ($\text{g}_X \text{L}^{-1}$).

μ : velocidade específica de crescimento celular (h^{-1}).

k_m : constante de morte celular (h^{-1}).

D : taxa de diluição (h^{-1}).

C_S : concentração de substrato (glicose) ($\text{g}_S \text{L}^{-1}$).

C_{SF} : concentração de substrato alimentado ($\text{g}_S \text{L}^{-1}$).

$Y_{X/S}$: coeficiente de rendimento de substrato a células ($\text{g}_X \text{g}_S^{-1}$).

C_P : concentração de colorante ($\text{g}_P \text{L}^{-1}$).

μ_P : velocidade específica de produção (h^{-1}).

α : constante de formação de produto associada ao crescimento ($\text{g}_P \text{g}_X^{-1}$).

β : constante de formação de produto ($\text{g}_P \text{g}_X^{-1} \text{h}^{-1}$).

Para velocidade específica de crescimento celular (μ), empregou-se o modelo cinético de crescimento de Contois, dado pela equação 5.21, onde para os parâmetros μ_m , k_m e K_{SX} , foram empregados os valores previamente estimados por Sousa (2018), conforme mostrado na Tabela 5.5.

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{C_S}{K_{SX} \cdot C_X + C_S} \quad (5.21)$$

onde:

K_{SX} : constante de Contois ($\text{g}_S \text{g}_X^{-1}$).

μ_m : velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1}).

Tabela 5.5- Parâmetros cinéticos de crescimento celular.

Parâmetros Cinéticos de Crescimento Celular	
μ_m (h ⁻¹)	0,0953 ± 0,0021
K_{SX} (gs gx ⁻¹)	0,424 ± 0,025
k_m (h ⁻¹)	0,00287 ± 0,00031

Fonte: Sousa (2018).

De modo a estimar os parâmetros cinéticos de produção (α e β), utilizou-se como rotina de otimização o algoritmo genético, cujos os parâmetros utilizados no ajuste do modelo aos dados experimentais estão apresentados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6- Parâmetros do algoritmo genético empregado na modelagem.

Parâmetros do Algoritmo Genético	
Número de indivíduos da população	100
Probabilidade de cruzamento	0,7
Probabilidade de mutação	0,1
Número de gerações	20

Fonte: Veloso (2019).

Juntamente ao algoritmo genético, empregou-se o algoritmo de Runge-Kutta para solução numérica do sistema de equações diferenciais (Equações 5.18 a 5.20). Os algoritmos foram implementados no software Scilab versão 6.1.1 e utilizaram como critério de otimização para o ajuste dos parâmetros, a minimização da soma dos quadrados dos resíduos

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Determinação da relação entre absorvância (UA) e concentração de colorante (gp L⁻¹)

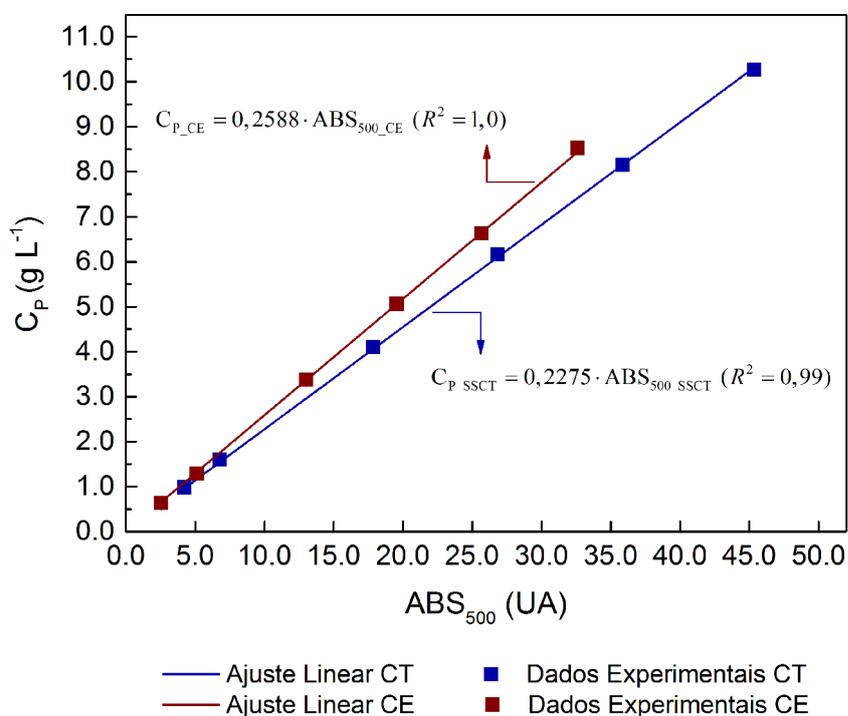
Visando ter uma melhor compreensão dos ensaios em termos de produtividade e rendimento, buscou-se obter inicialmente, baseando-se na Lei de Lambert–Beer, uma relação entre as absorvâncias aferidas no decorrer dos ensaios e suas respectivas concentrações de colorante, conforme descrito na seção 5.2.4.5.

Com base nas amostras do caldo de cultivo de um dos ensaios em batelada convencional conduzido em biorreator, após a obtenção da concentração de sólidos solúveis do caldo tratado ($C_{P_SSCT} - g L^{-1}$), da concentração de colorante da fração obtida ao final do procedimento

sequencial de extração líquido-líquido ($C_{P_CE} - g L^{-1}$) e das respectivas absorvâncias a 500 nm ($ABS_{500} - UA$) dessas amostras, realizou-se, sobre os dados experimentais, o ajuste de um modelo linear das concentrações de produto (C_{P_SSCT} ou C_{P_CE}) em função da absorvância (ABS_{500}).

A Figura 5.12 ilustra os resultados dos ajustes obtidos para o caldo tratado (CT) e para o caldo extraído (CE).

Figura 5.12- Ajuste do modelo linear aos dados experimentais de concentração de sólidos solúveis no caldo tratado (C_{P_SSCT}) ou concentração de colorante no caldo extraído (C_{P_CE}) em função da ABS_{500} .



Os valores dos coeficientes lineares obtidos por meio dos ajustes, juntamente com os resultados de absorvância e de concentração de colorante em $g L^{-1}$ das amostras integrais, ou seja, das amostras cuja o fator diluição foram iguais a 1, foram correlacionados de modo a se obter a equação 5.7, correspondente a relação direta entre a concentração de colorante extraído (C_{P_CE}) e a absorvância do caldo tratado (ABS_{500_SSCT}).

$$C_{P_CE} = 0,2275 \cdot 0,8302 \cdot ABS_{500_SSCT} = \mathbf{0,1889 \cdot ABS_{500_SSCT}} \quad (5.7)$$

Posteriormente, de modo a validar a relação obtida, cerca de 1,5 L de caldo tratado proveniente de um novo ensaio em batelada convencional conduzido em biorreator, foi submetido as etapas de extração líquido-líquido já mencionadas (secção 5.2.4.5), e

sequencialmente ao processo de liofilização, no qual resultou em uma massa de colorante de 10,52 gp.

Sendo a absorvância do caldo tratado a 500 nm de $45,74 \pm 0,83$ UA, a concentração calculada empregando a equação 29 foi de $8,64 \text{ g}_P \text{ L}^{-1}$, ao passo que a concentração a concentração real obtida foi de $7,01 \text{ g}_P \text{ L}^{-1}$. Embora, as concentrações, experimental e calculada, tenham apresentado uma diferença de $1,58 \text{ g}_P \text{ L}^{-1}$, essa diferença observada provém possivelmente de perdas existentes tanto nas etapas de extração quanto no processo de liofilização. Entretanto, de modo geral, a curva obtida se apresentou satisfatória para se estabelecer a relação entre a absorvância do caldo tratado (ABS_{500_SSCT}) e a concentração de colorante extraído (g L^{-1}).

5.3.2. Produção de colorante em frascos agitados

5.3.2.1. Cultivos contínuos com alimentação intermitente de meio de cultura suplementar

Inicialmente, visando avaliar o comportamento do processo com alimentação intermitente, foram realizados 3 cultivos simultâneos, sendo uma batelada convencional (BC) e dois cultivos contínuos com alimentação intermitente de 2 diferentes meios suplementares, sendo um composto por dextrose (21 g L^{-1}) e peptona de soja ($10,5 \text{ g L}^{-1}$) e o segundo cultivo adicionando pulsos constituídos apenas por dextrose (21 g L^{-1}).

As Figuras 5.13 a 5.15 ilustram os perfis de consumo de dextrose e de crescimento celular ao longo do tempo, ambos associados com o perfil de produção de colorante ao longo dos respectivos cultivos: batelada convencional (BC) e cultivos contínuos com alimentação intermitente de meio Sabouraud (CPS) e solução de dextrose (CPD).

Figura 5.13- Perfis de crescimento celular, de consumo de substrato e de produção de corante vermelho no cultivo em batelada convencional (BC) em frascos agitados.

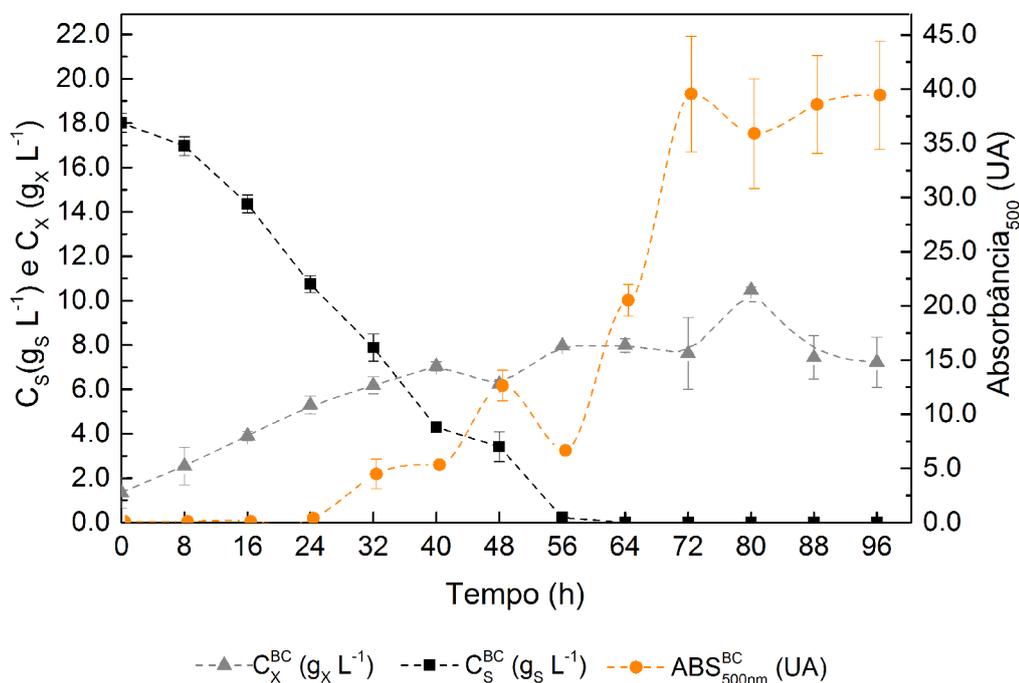


Figura 5.14- Perfis de crescimento celular, consumo de substrato e produção de corante vermelho no cultivo com alimentação intermitente de meio Sabouraud (CPS) em frascos agitados.

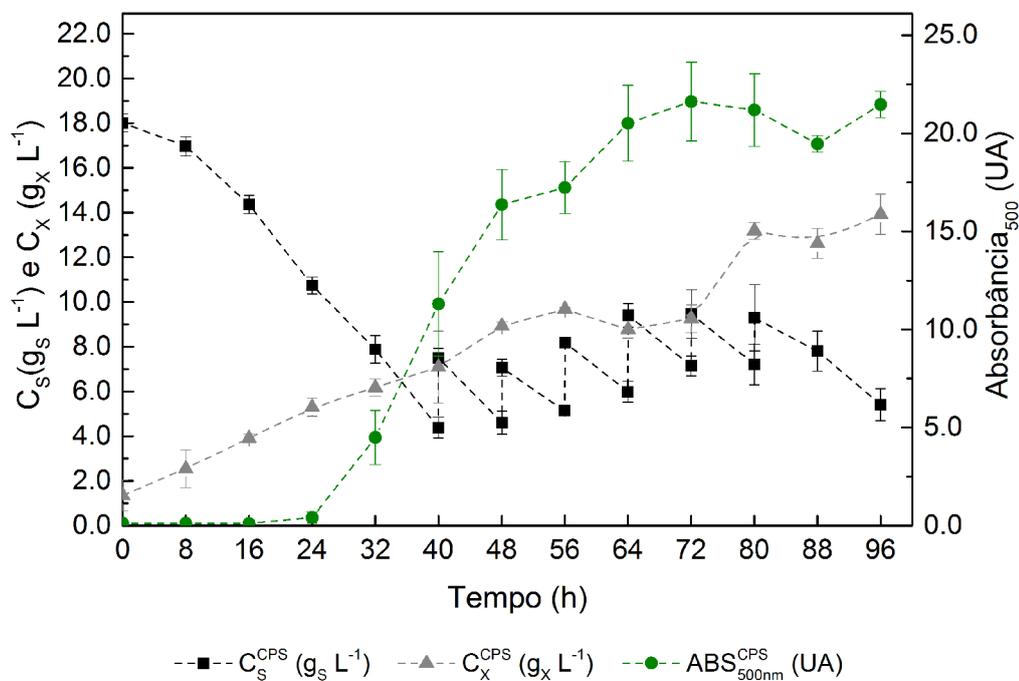
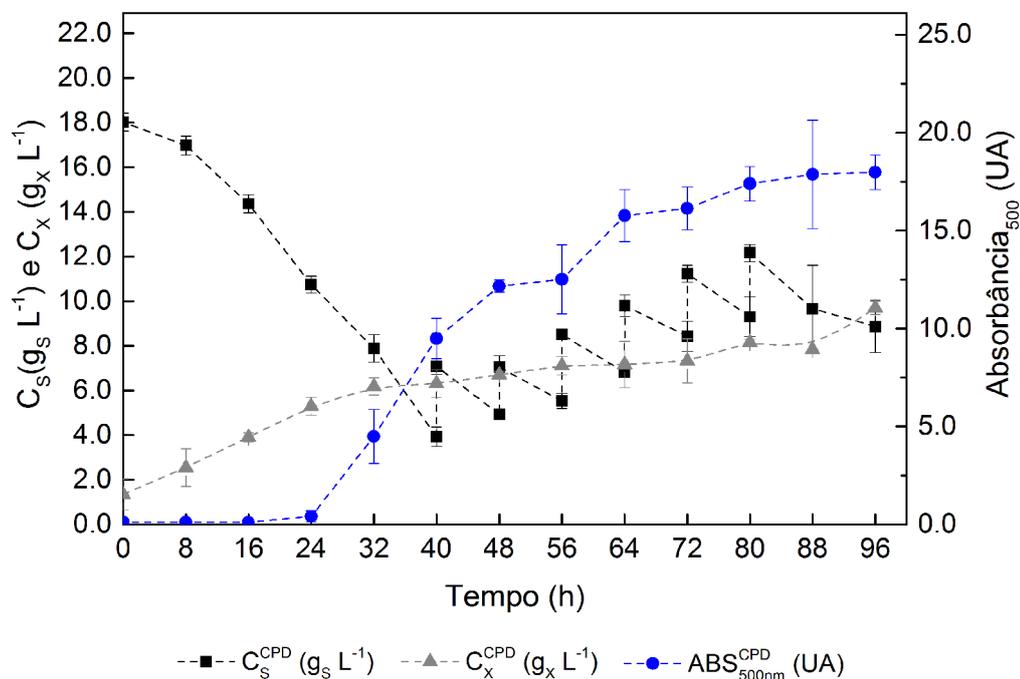


Figura 5.15- Perfis de crescimento celular, consumo de substrato e produção de colorante vermelho no cultivo com alimentação intermitente de solução de dextrose (CPD) em frascos agitados.



Conforme ilustrado nas Figuras 5.13 a 5.15, o consumo de dextrose em todos os três ensaios durante as primeiras 40 horas de cultivo foi aproximadamente igual, atingindo uma velocidade média de consumo de dextrose (r_s) de cerca de $0,34 g_s L^{-1} h^{-1}$.

A igualdade observada entre as velocidades médias de consumo de dextrose (r_s) durante as primeiras 40 horas, se deve ao fato de que nesse período a concentração celular (C_x) se apresentou próxima nos três ensaios, na ordem de $7,0 g L^{-1}$. Entretanto, no período posterior ao início de adição dos pulsos, verificou-se que o cultivo alimentado com o meio Saboraud (CPS) atingiu uma concentração celular final de cerca de $13,0 g_x L^{-1}$, enquanto que no cultivo alimentado com solução de dextrose (CPD), C_x manteve-se praticamente constante, na ordem de $8,0 g_x L^{-1}$, assim como a batelada convencional (BC).

A diferença entre os valores de concentração celular, principalmente nos dois ensaios com alimentação pulsada (CPS e CPD) está de acordo com o reportado por Chen *et al.* (2015), onde ao avaliarem a produção de colorante por *Monascus anka* em cultivos de alta densidade celular, verificaram que a concentração celular em cultivos empregando pulsos constituídos de fonte de carbono e nitrogênio foi cerca de 25% maior que as obtidas empregando pulsos constituídos apenas de fonte de carbono. Esta diferença de concentração celular está possivelmente vinculada ao fato de que o nitrogênio juntamente com o fósforo são elementos

majoritários na composição das membranas celulares e dos ácidos nucleicos. Sendo assim, a adição da fonte de nitrogênio associada à fonte de carbono tende, portanto, a favorecer o crescimento celular e, conseqüentemente, influenciar na velocidade de consumo da fonte de carbono.

Embora o ensaio alimentado intermitentemente com meio Saboraud (CPS) tenha apresentado uma concentração celular cerca de 63% maior frente aos demais ensaios, em termos de produção de colorante vermelho observou-se uma tendência contrária, na qual a produção nos ensaios alimentados com meio Saboraud (CPS) e solução de dextrose (CPD) foram aproximadamente metade do valor obtido no cultivo convencional em batelada (BC), como mostrado na Tabela 5.7.

Tabela 5.7- Parâmetros cinéticos e de rendimento referentes à produção de colorante vermelho ao longo dos ensaios realizados visando a avaliação do comportamento dos cultivos com alimentação intermitente de meio suplementar (Saboraud ou solução de dextrose).

	Cultivo convencional em batelada (BC)	Cultivo com alimentação de meio Saboraud (CPS)	Cultivo com alimentação de solução de Dextrose (CPD)
ABS_{MAX 500nm} (UA)	39,57 ± 5,33	21,62 ± 2,01	17,39 ± 0,88
CP_{MAX 500nm} (gP L⁻¹)	7,47 ± 1,01	4,08 ± 0,38	3,29 ± 0,17
PP-MAX (gP L⁻¹ h⁻¹)	0,103	0,060	0,041
PP/X-MAX (gP g_x⁻¹ h⁻¹)	0,017	0,008	0,006
Y_{P/S} (gP g_S⁻¹)	0,414	0,141	0,126
Y_{P/X} (gP g_X⁻¹)	0,817	0,343	0,442
Y_{X/S} (gX g_S⁻¹)	0,506	0,411	0,284
M_{AT}^F (g_S)	0,901 ± 0,0297	1,670 ± 0,0618	1,630 ± 0,0424
M_{AR} (g_S)	0,001	0,243	0,399

Fonte: Acervo pessoal do autor.

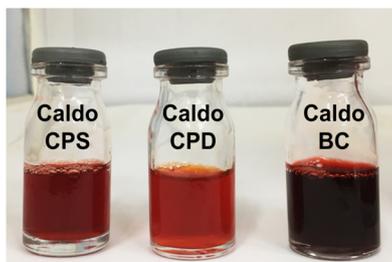
Observando a Tabela 5.7 e as Figuras 5.13 a 5.15, considerando a quantidade de dextrose fornecida por cultivo (M_{AT}^F), a concentração celular e a produção máxima de colorante alcançadas, verificou-se que a síntese deste tipo de metabólito secundário, como já amplamente relatado na literatura (BRAKHAGE, 2013; CALVO *et al.*, 2002; DEMAIN, 1986; KRAIRAK *et al.*, 2000), está mais associada a uma questão metabólica do que propriamente a uma limitação por substrato. Ao se comparar o cultivo convencional em batelada (BC) ao cultivo alimentado com o meio Saboraud, cuja produção de colorante foi maior dentre os dois cultivos

com alimentação intermitente, verificou-se que embora no cultivo alimentado com o meio Saboraud tenha sido empregado cerca de 85% a mais de substrato frente ao cultivo convencional, analisando o coeficiente de rendimento global de conversão de substrato a colorante ($Y_{P/S}$) foi observado que o cultivo alimentado com meio de cultura Saboraud (CPS) apresentou um rendimento cerca de 66% menor que o cultivo convencional em batelada (BC).

Embora o cultivo em batelada convencional (BC) tenha inicialmente se mostrado como uma estratégia mais promissora para obtenção de colorante vermelho, elementos como o início de alimentação dos pulsos e a quantidade de açúcar residual são fatores que, segundo Krairak *et al.* (2000), podem influenciar negativamente à produção de colorante ao longo dos cultivos com alimentação de meio suplementar.

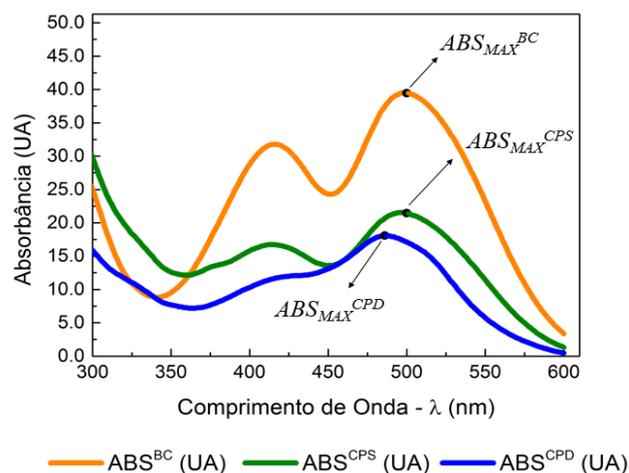
Além disso, também foi possível verificar que os ensaios com alimentação intermitente apresentaram uma faixa de 15 a 24% de açúcar residual ao final do processo, demonstrando que a quantidade de dextrose alimentada foi superior à capacidade de consumo do microrganismo. Quando comparados os ensaios com alimentação intermitente, observou-se que no cultivo alimentado com o meio Saboraud (CPS), embora tenha sido empregada uma maior quantidade de dextrose total ($M_{AT}^{F,CPS}$), o mesmo apresentou 39% menos açúcar residual e uma produção de colorante 1,24 vezes superior ao cultivo alimentado com solução de dextrose (CPD). Ou seja, dentre os cultivos com alimentação intermitente, verificou-se que o cultivo CPS, o qual apresentou uma menor quantidade de açúcar residual ($M_{AT}^{F,CPS}$) ao final do processo, também resultou em uma produção de colorante relativamente maior e mais avermelhada, como ilustram as Figuras 5.16 e 5.17.

Figura 5.16- Coloração final dos sobrenadantes referentes aos cultivos alimentados com o meio Saboraud (CPS), com solução de dextrose (CPD) e o convencional em batelada (BC).



Fonte: Acervo pessoal.

Figura 5.17- Variação dos espectros de varredura referente aos cultivos alimentados com meio Saboraud (CPS), com solução de dextrose (CPD) e convencional em batelada (BC).



Ao se comparar qualitativamente as colorações dos metabólitos secundários obtidos ao final de cada ensaio, bem como seus respectivos espectros de absorvância, com base nas Figuras 5.16 e 5.17, observou-se que o cultivo alimentado com solução de dextrose (CPD) tendeu-se a formar um colorante mais alaranjado, cuja a absorvância máxima foi em torno de 480 nm, diferentemente dos cultivos convencional em batelada (BC) e alimentado com meio Saboraud (CPS), cujos os colorantes mais avermelhados apresentaram máxima absorvância na faixa de 500 nm, comprimento este característico de colorantes vermelhos (CHATTERJEE *et al.*, 2009; CHRISTIE, 2001; SINGH *et al.*, 2015).

Diante dos resultados obtidos nos cultivos contínuos intermitentes, verificou-se que a composição do meio de suplementação tende a influenciar na variedade do colorante natural produzido e, além disso, observou-se que o emprego da estratégia de cultivo contínuo com alimentações intermitentes, no qual se objetivava manter a concentração da fonte de carbono e, conseqüentemente, a velocidade de consumo de dextrose em patamares baixos de forma a garantir a vitalidade do microrganismo e estimular a síntese do metabólito secundário, a princípio se apresentou como uma estratégia de baixo desempenho, possivelmente devido ao tempo de início da alimentação e à quantidade de fonte de carbono alimentada ao sistema pelos pulsos, visto o expressivo acúmulo de açúcar residual ao final do processo, o qual demonstra que a concentração de fonte de carbono alimentada foi superior à capacidade de assimilação pelo microrganismo.

Portanto, de modo a ajustar o fornecimento da fonte de carbono ao longo da alimentação e da concentração de dextrose alimentada, bem como obter uma composição de meio que favorecesse a produção de corante natural vermelho à 500 nm, novos ensaios contínuos intermitentes empregando diferentes composições de solução de alimentação foram realizados visando minimizar a quantidade de açúcar no caldo e garantir a manutenção da concentração da fonte de carbono em níveis baixos de forma a estimular a produção do biocolorante vermelho.

5.3.2.2. Avaliação da influência da composição do meio de alimentação

Visando minimizar as influências da quantidade de açúcar residual e do tempo de início de alimentação dos pulsos, bem como avaliar a composição do meio de alimentação mais favorável à produção de corante vermelho a 500 nm, realizou-se um novo conjunto de ensaios contínuos de alimentação intermitente empregando diferentes composições de solução pulso.

As Figuras 5.18 a 5.22 ilustram os perfis de crescimento celular (C_X), de consumo de substrato (C_S) e produção de corante vermelho (ABS_{500nm}) nos ensaios convencional em batelada (BC) e contínuos alimentados de forma intermitente com pulsos de meio Sabraud (CPS1, CPS2 e CPS3) e apenas com peptona (CPP).

Figura 5.18- Variações de concentrações de glicose (C_S) e de biomassa (C_X) e produção de pigmento (ABS_{500nm}) no cultivo convencional em batelada (BC).

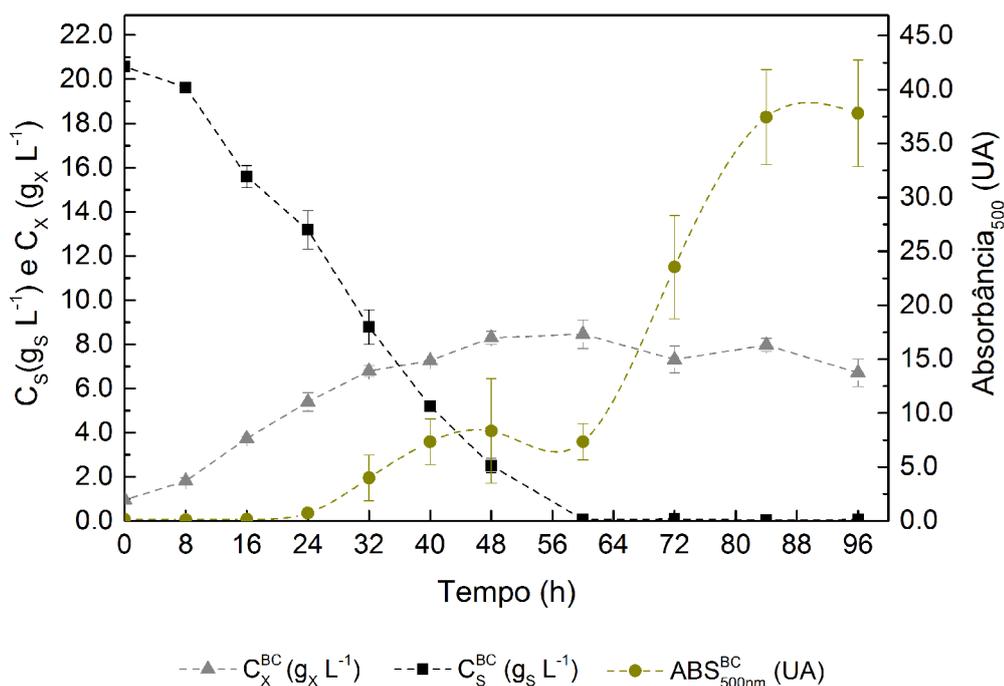


Figura 5.19- Variações de concentrações de glicose (C_s) e de biomassa (C_x) e produção de pigmento (ABS_{500nm}) obtidas no cultivo contínuo alimentado de forma intermitente com o meio Saboraud 1 (CPS1: 21,0 g L⁻¹ de dextrose e 10,5 g L⁻¹ de peptona de soja).

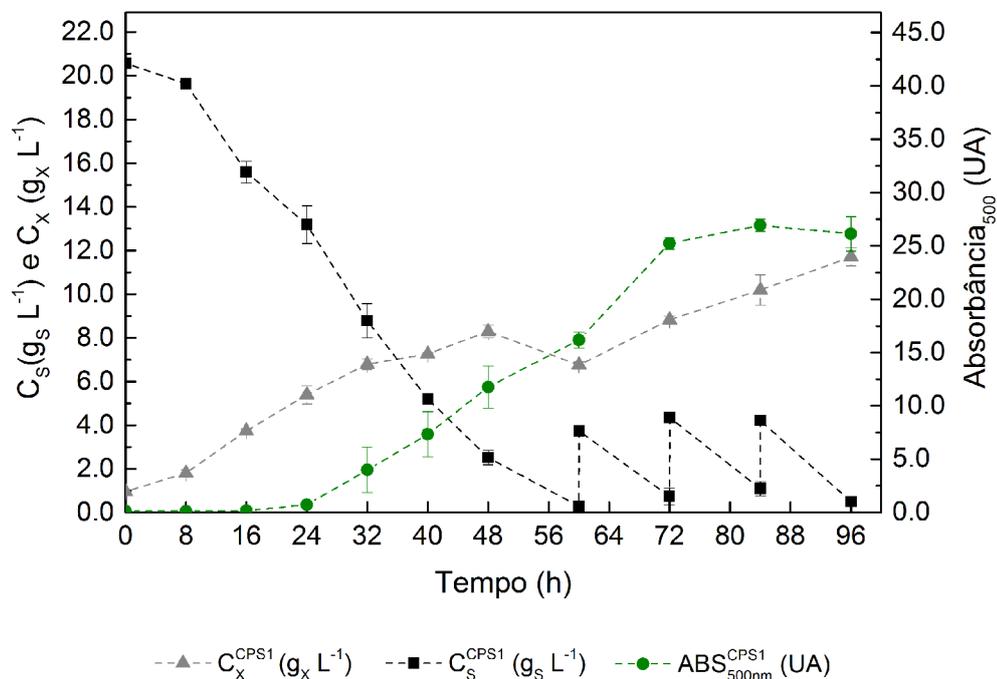


Figura 5.20- Variações de concentrações de glicose (C_s) e de biomassa (C_x) e produção de pigmento (ABS_{500nm}) obtidas no cultivo contínuo alimentado de forma intermitente com o meio Saboraud 2 (CPS2: 10,5 g L⁻¹ de dextrose e 5,25 g L⁻¹ de peptona de soja).

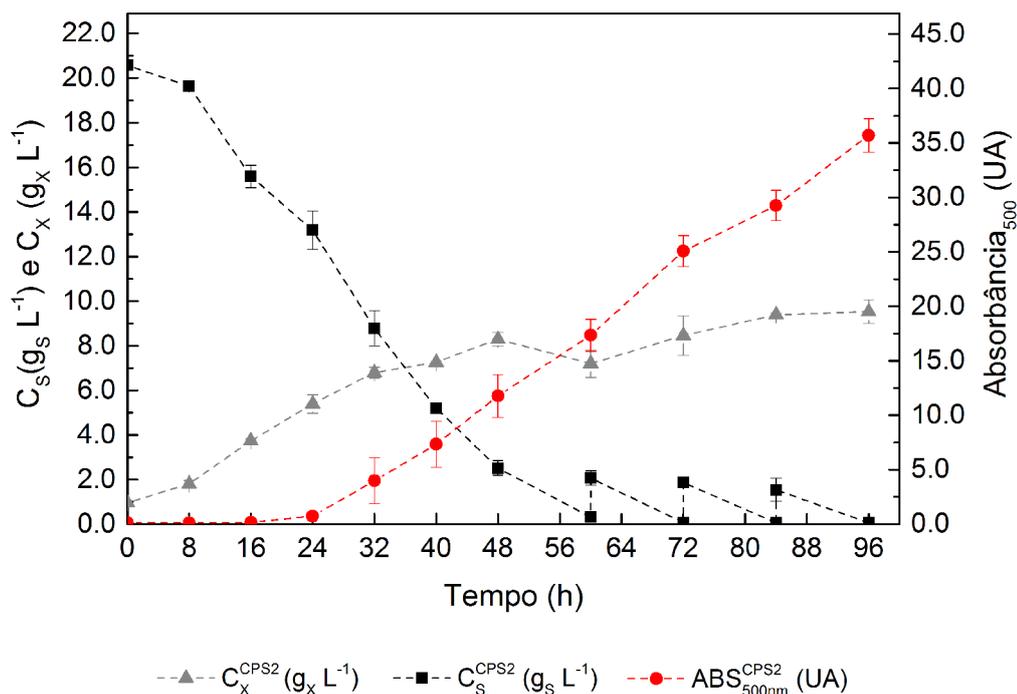


Figura 5.21- Variações de concentrações de glicose (C_s) e de biomassa (C_x) e produção de pigmento (ABS_{500nm}) obtidas no cultivo contínuo alimentado de forma intermitente com o meio Saboraud 3 (CPS3: $10,5 \text{ g L}^{-1}$ de dextrose e $10,5 \text{ g L}^{-1}$ de peptona de soja).

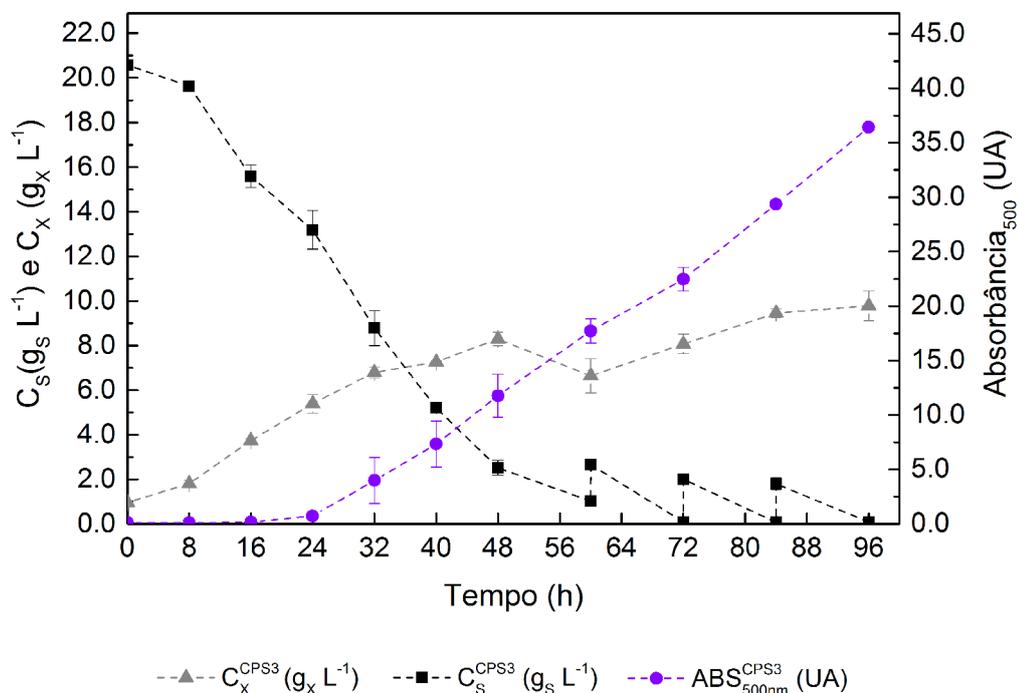
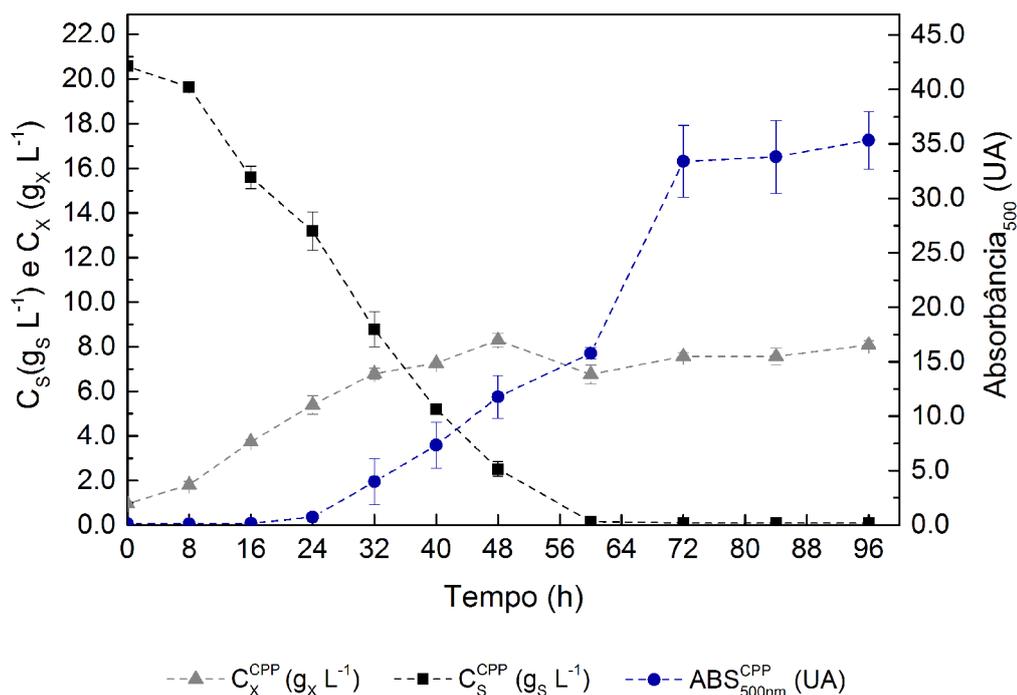


Figura 5.22- Variações de concentrações de glicose (C_s) e de biomassa (C_x) e produção de pigmento (ABS_{500nm}) obtidas no cultivo contínuo alimentado de forma intermitente com meio à base de peptona (CPP: $10,5 \text{ g L}^{-1}$ de peptona de soja).



Com base nas Figuras de 5.18 a 5.22, verificou-se que o crescimento celular no cultivo alimentado com meio Sabouraud 1 (CPS1), o qual corresponde ao cultivo alimentado com meio Sabouraud da seção 5.3.2.1, ocorreu durante o período de adição dos pulsos, atingindo uma concentração máxima de aproximadamente $12,0 \text{ g}_X \text{ L}^{-1}$. Nos demais ensaios com alimentação intermitente, a C_X manteve-se praticamente constante e igual ao cultivo convencional em batelada, alcançando concentrações máximas de células na faixa de $8,0$ a $9,0 \text{ g}_X \text{ L}^{-1}$.

Quanto a produção de corante vermelho, observou-se que, embora tenha realizado a alteração do tempo de início das adições de pulso e, conseqüentemente, a quantidade de açúcar residual ao final do processo tenha sido praticamente nula no cultivo pulsado com meio Sabouraud 1 (CPS1), as alterações realizadas na condução do processo não resultaram em melhorias expressivas na produção de corante vermelho, mantendo-se uma produtividade máxima volumétrica em corante semelhante ao obtido no ensaio descrito na seção 5.3.2.1, de $0,060 \text{ g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, como mostrado na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 - Parâmetros cinéticos e de rendimento referentes à produção de corante vermelho ao longo dos ensaios realizados visando a avaliação da composição da solução pulso.

	Cultivo convencional em batelada (BC)	Cultivo alimentado de pulsos de meio Saboraud 1 (CPS1)	Cultivo alimentado de pulsos de meio Saboraud 2 (CPS2)	Cultivo alimentado de pulsos de meio Saboraud 3 (CPS3)	Cultivo alimentado de pulsos de meio à base de peptona (CPP)
$ABS_{MAX500nm}$ (UA)	37,45 ± 4,41	26,94 ± 0,58	35,69 ± 1,54	36,42 ± 0,12	33,81 ± 3,34
$C_{P_{MAX} 500nm}$ (gp L ⁻¹)	7,07 ± 0,83	5,09 ± 0,11	6,74 ± 0,29	6,88 ± 0,02	6,39 ± 0,63
$P_{P_{MAX}}$ (gp L ⁻¹ h ⁻¹)	0,084	0,060	0,070	0,071	0,076
$P_{P/X MAX}$ (gp gx ⁻¹ h ⁻¹)	0,012	0,007	0,008	0,008	0,011
$Y_{P/S}$ (gp gs ⁻¹)	0,343	0,167	0,263	0,266	0,311
$Y_{P/X}$ (gp gx ⁻¹)	0,939	0,470	0,783	0,776	0,866
$Y_{X/S}$ (gx gs ⁻¹)	0,366	0,356	0,336	0,343	0,359
M_{AT}^F (gs)	1,03 ± 0,052	1,68 ± 0,086	1,37 ± 0,040	1,31 ± 0,051	1,06 ± 0,025
M_{AR} (gs)	0,002	0,025	0,091	0,023	0,036

Fonte: Acervo pessoal do autor.

Com base na Tabela 5.8, também foi possível verificar que o cultivo alimentado com o meio Saboraud 1 (CPS1), no qual se empregou-se pulsos de 21,0 g L⁻¹ de dextrose e 10,5 g L⁻¹ de peptona, apresentou uma produção de corante vermelho cerca de 28% menor que a observada na batelada convencional (BC). Isto possivelmente pode estar associado à elevada concentração de dextrose na solução pulso, visto que os demais ensaios pulsados empregando metade da concentração de dextrose utilizada no cultivo alimentado com meio Saboraud 1 (CPS1) obtiveram produções de corante vermelho próximas à obtida no cultivo convencional em batelada (BC).

Ao se comparar os 4 tipos de ensaio com alimentações intermitentes de diferentes meios de cultura, foi observado que o ensaio CPS1 resultou em uma produção de corante cerca de 17% inferior aos ensaios CPS2, CPS3 e CPP onde, embora as produções tenham se apresentado semelhantes, os três ensaios se distinguiram quanto à consistência do caldo de cultivo, uma vez que no decorrer do cultivo CPP foi observado que após o esgotamento da fonte de carbono, o caldo se tornou cada vez mais fluido. Esta alteração na consistência do caldo de cultivo, segundo Badino, Facciotti e Schmidell (1997), tende a ser resultante do esgotamento da fonte de carbono, visto que ao estudarem o desempenho de um sistema on-line de monitoramento contínuo da reologia empregando o cultivo em batelada convencional com *Aspergillus awamori*, verificaram que após o completo consumo da fonte de carbono, o índice de consistência do caldo de cultivo (K) relacionado com a saúde estrutural do micélio, diminuiu instantaneamente.

Além disso, ao analisar-se os ensaios CPS2 e CPS3, cujos pulsos apresentaram a mesma concentração de dextrose e metade da concentração de peptona de soja, observou-se que embora a quantidade de peptona de soja adicionada via pulsos tenha sido diferente entre os cultivos, ambos apresentaram caldos com consistências semelhantes.

Desta forma, o esgotamento da fonte de carbono no meio somado à composição do pulso alimentado no ensaio CPP, contribuíram para uma perda de vitalidade das células, tornando-as mais suscetíveis à fragmentação, favorecendo uma possível liberação de corante intracelular.

Logo, a adição de pulsos contendo peptona de soja pode estar mais vinculada ao tipo de corante sintetizado, do que propriamente à quantidade de corante produzido, visto que como observado na seção 5.3.2.1, a ausência de peptona resultou em um corante mais alaranjado, enquanto que nos ensaios contendo pulsos de dextrose e peptona, o corante tendeu a se apresentar mais avermelhado. Quando avaliados os ensaios CPS2, CPS3 e CPP, verificou-se que em termos de quantidade máxima de corante produzido ($ABS_{\max 500nm}$), os três ensaios resultaram em uma produção praticamente igual, cuja coloração avermelhada se apresentou a mesma, diferenciando-se apenas na consistência do caldo, onde na ausência de adição de dextrose (CPP), o caldo se apresentou menos consistente (mais fluido).

Ao se comparar-se os ensaios CPS2, CPS3 e CPP com o cultivo convencional em batelada, foi observado que embora a quantidade final de corante vermelho dos ensaios alimentados com pulsos não tenha sido tão alta frente ao cultivo em batelada, ao se verificar o perfil de produção de corante nos ensaios CPS2 (Figura 5.20) e CPS3 (Figura 5.21), observou-se resultados promissores, visto que a produção de corante vermelho permaneceu em ascensão até término do cultivo.

Diante dos resultados promissores obtidos nos ensaios contínuos intermitentes empregando os meios de suplementação Saboraud 2 e 3 (CPS2 e CPS3) compostos de dextrose e peptona de soja, verificou-se que o espaçamento de 12 horas de alimentação da solução suplementar, assim como a concentração reduzida de dextrose adicionada ao sistema, quando comparado ao cultivo intermitente suplementado com meio Saboraud 1 (CPS1), resultaram em uma quantidade de açúcar residual ao final do processo nula e na baixa concentração de dextrose ao longo do cultivo, na ordem de $2,0 \text{ g L}^{-1}$, o que contribui para manutenção da vitalidade do microrganismo, bem como para produção de colorante vermelho, de acordo com o perfil ascendente ao longo de todo o ensaio.

Portanto, visando manter os resultados obtidos com o emprego do cultivo contínuo intermitente, porém objetivando-se eliminar a retirada e adição de volumes expressivos de caldo e de meio de suplementação, novos ensaios em batelada alimentada intermitente com a adição de menores volumes de meio de suplementação concentrado (Saboraud 2) foram realizados visando avaliar a potencial produção de colorante vermelho em ensaios mais prolongados, mantendo-se o baixo nível de fornecimento da fonte de carbono de modo a estimular a produção do metabólito secundário. Ressalta-se que a composição do meio de suplementação concentrado utilizado neste novo ensaio foi determinada baseando-se no perfil ascendente de produção de colorante vermelho, bem como na menor concentração de peptona de soja.

5.3.2.3. Cultivos em batelada alimentada com alimentação intermitente de meio de cultura suplementar

Com base nos resultados previamente obtidos e buscando uma maior produção de colorante vermelho possível empregando a batelada alimentada intermitentemente com pulsos, realizou-se um novo ensaio adicionando pulsos de $500 \mu\text{L}$ de meio suplementar mais concentrado, constituídos de $238,0 \text{ g L}^{-1}$ de dextrose e $119,0 \text{ g L}^{-1}$ de peptona de soja.

Os perfis de crescimento celular (C_X), de consumo de substrato (C_S) e de produção de colorante vermelho ($ABS_{500\text{nm}}$) obtidos no cultivo convencional em batelada (BC) abordada na seção 5.3.2.2, bem como no cultivo batelada alimentada com pulsos concentrados (BPC) estão ilustrados nas Figuras 5.23 e 5.24, respectivamente.

Figura 5.23- Variações das concentrações de glicose (C_s) e biomassa (C_x) e de produção de pigmento (ABS_{500nm}) ao longo do cultivo convencional em batelada (BC).

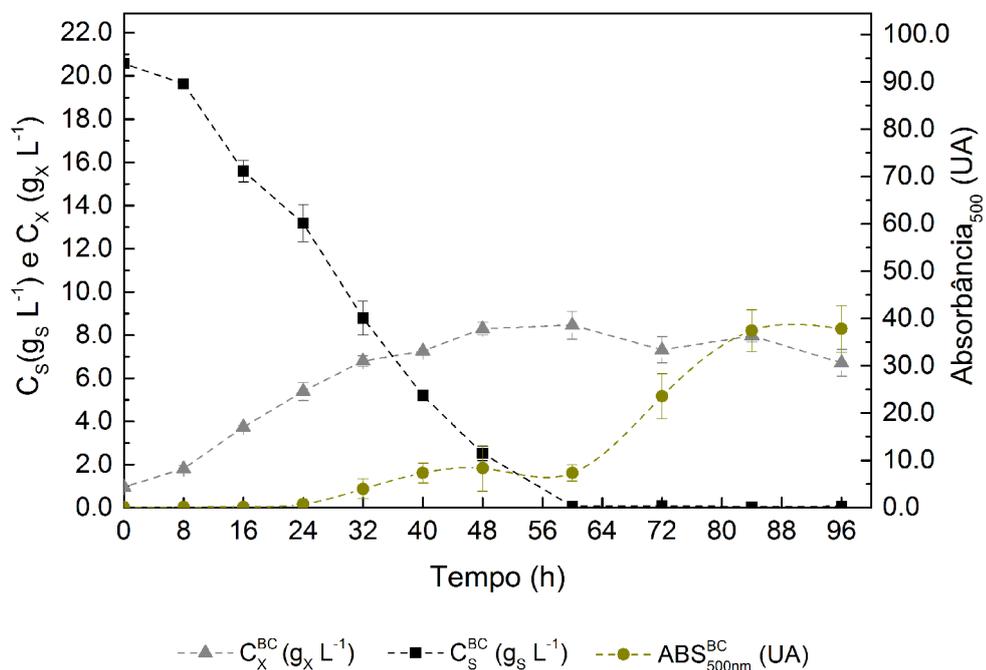
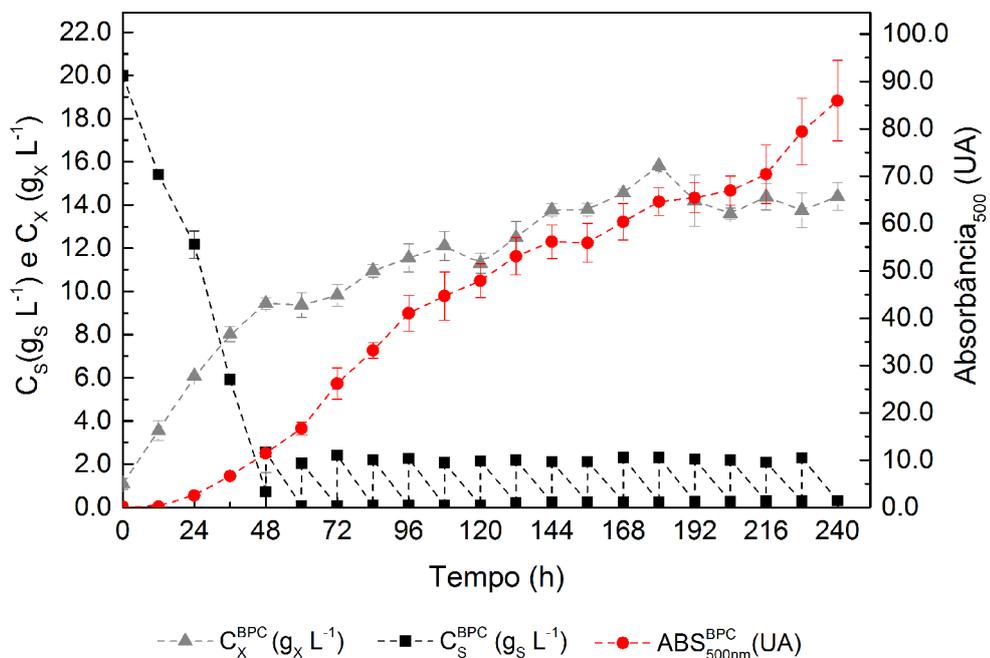


Figura 5.24- Variações das concentrações de glicose (C_s) e de biomassa (C_x) e produção de pigmento (ABS_{500nm}) ao longo do cultivo em batelada alimentada com pulsos de meio de cultura concentrado (BPC).



Através da análise da Figura 5.24, observou-se que que o cultivo apresentou um crescimento celular na fase inicial de adição de pulsos, atingindo uma concentração de células

de aproximadamente $14,0 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$ por volta de 144 horas de cultivo, a qual se manteve constante até o seu término.

Além disso, também foi possível verificar que, embora a concentração celular do ensaio em batelada alimentada com pulsos de meio de cultura concentrado (BPC) tenha sido cerca de 75% superior à concentração celular alcançada com o cultivo convencional em batelada (BC), o crescimento celular no ensaio BCP se deu majoritariamente durante o período sem adição de pulsos, sendo o período conduzido em batelada alimentada com pulsos responsável apenas por cerca de 35% da concentração celular final alcançada. Ou seja, a adição de pulsos mais concentrados se destinou principalmente à manutenção celular no decorrer do ensaio, visto que a partir de 144 horas de cultivo, verificou-se uma manutenção da concentração de células e um aumento gradual da produção de colorante (JIANG *et al.*, 2017).

Ao se analisar o perfil de produção de colorante de ambos ensaios, observou-se que o ensaio conduzido em batelada alimentada com pulso de meio concentrado (BPC), assim como já verificado na seção 5.3.2.2, apresentou um perfil de produção de colorante ascendente no decorrer de todo o cultivo, ao passo que o ensaio convencional conduzido em batelada (BC) apresentou uma estabilização da produção de colorante por volta de 84 horas de cultivo. Além disso, segundo mostrado na Tabela 5.9, foi possível verificar que embora o cultivo em batelada convencional (BC) tenha apresentado uma produtividade volumétrica máxima ($P_{P_{\max}}$) aproximadamente 24% superior à batelada alimentada com pulso de meio concentrado (BPC), em termos de produção o cultivo em batelada convencional se apresentou cerca de 56% inferior à batelada alimentada (BPC), o que demonstra que a estratégia de batelada alimentada foi promissora para a produção de biocolorantes.

Resultados semelhantes foram observados por Krairak *et al.* (2000), que ao buscarem a maximização da produção de pigmento amarelo empregando a linhagem *Monascus sp.*, verificaram que embora a obtenção da máxima produção de colorante em batelada alimentada tenha sido alcançada no dobro do tempo em relação ao cultivo convencional em batelada, a máxima produção alcançada no cultivo em batelada alimentada foi cerca de 85% maior que a obtida em batelada convencional.

Tabela 5.9- Parâmetros cinéticos e de rendimento referentes aos cultivos convencional em batelada (BC) e em batelada alimentada com pulsos de meio de cultura concentrado (BPC).

	Cultivo em batelada (BC)	Cultivo em batelada alimentada com pulsos de meio concentrado (BPC)
ABS_{MAX 500nm} (UA)	37,45 ± 4,41	85,96 ± 8,52
CP_{MAX 500nm} (gP L⁻¹)	7,07 ± 0,83	16,24 ± 1,61
PP_{MAX} (gP L⁻¹ h⁻¹)	0,084	0,068
PP/X_{MAX} (gP gX⁻¹ h⁻¹)	0,012	0,005
Y_{P/S} (gP gS⁻¹)	0,343	0,347
Y_{P/X} (gP gX⁻¹)	0,939	1,131
Y_{X/S} (gX gS⁻¹)	0,366	0,307
M_{AT}^F (gs)	1,029	3,05
M_{AR} (gs)	0,002	0,02

Fonte: Acervo pessoal do autor.

Diante dos resultados obtidos, o cultivo em batelada alimentada (BPC) empregando 238,0 g L⁻¹ de dextrose e 119,0 g L⁻¹ de peptona de soja, embora tenha apresentado uma produtividade volumétrica máxima (P_{MAX}) inferior à do cultivo convencional em batelada (BC), as condições se mostraram promissoras para a validação em biorreatores, onde se tem melhores condições de transferência de oxigênio e homogeneização do caldo, visto que por meio da manutenção do baixo nível de dextrose, conseguiu-se manter o equilíbrio entre o fornecimento de substrato e a capacidade de assimilação do microrganismo, resultando em uma manutenção da concentração e da vitalidade celular e um notório perfil ascendente de produção do biocolorante ao longo de todo o cultivo conduzido em frascos agitados, alcançando uma produção máxima 2,3 vezes superior à obtida em batelada convencional (BC).

5.3.3. Cultivos em batelada alimentada em biorreator

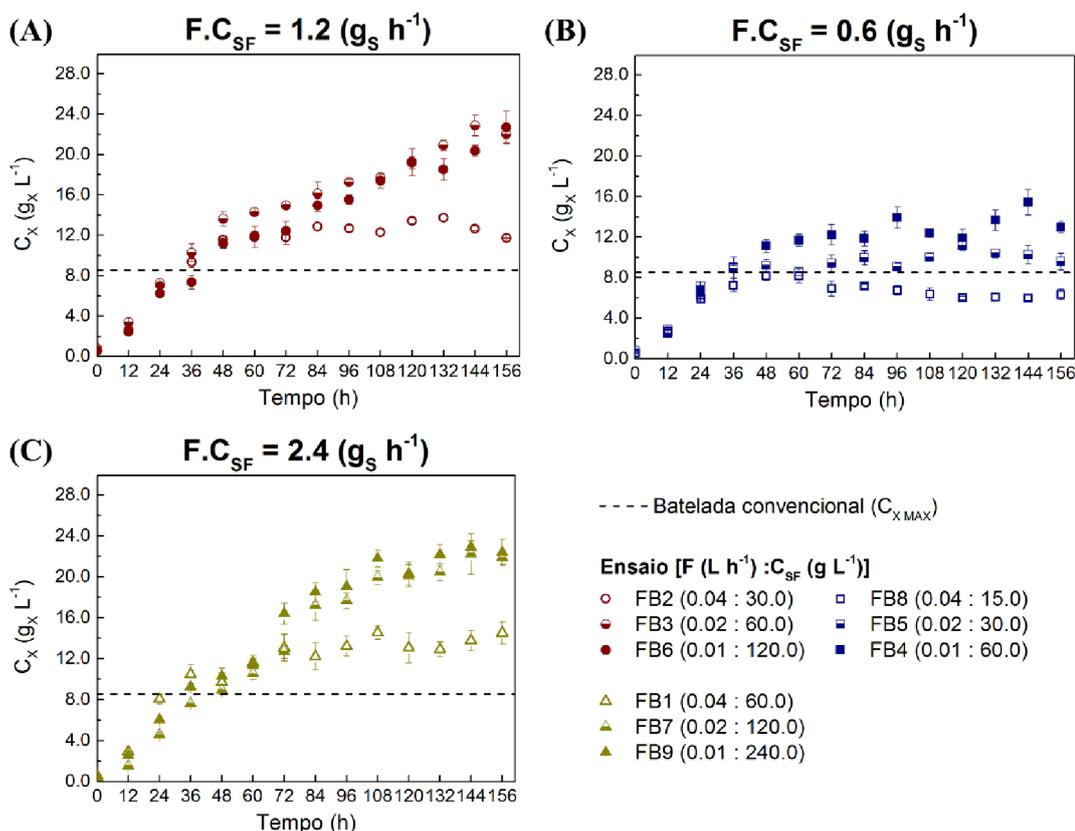
Baseado nos resultados obtidos em incubador rotativo em batelada alimentada com adição de pulsos com meio concentrado (BPC), foram desenvolvidos ensaios em biorreator de bancada empregando o mesmo modo de operação para a produção de colorante por *T. minnesotensis*.

Conforme descrito na seção 5.2.3.2, foram realizados um total de 10 cultivos em batelada alimentada em duplicata, nos quais além da comparação entre a batelada convencional

e batelada alimentada, também foram avaliadas as influências da vazão volumétrica de alimentação de meio (F) e da concentração de substrato no meio de alimentação (C_{SF}), mantendo-se fixa a proporção mássica entre glicose e peptona de soja de 2:1 no meio de cultura de alimentação (suplementar).

A Figura 5.25 ilustra os perfis de concentração celular ao longo dos 10 cultivos realizados em biorreator tipo tanque agitado.

Figura 5.25- Perfis de crescimento celular ao longo dos cultivos conduzidos em biorreator em batelada convencional e em batelada alimentada sob diferentes condições de alimentação de substrato: (A) $F.C_{SF} = 1,2 \text{ g}_S \text{ h}^{-1}$, (B) $F.C_{SF} = 0,6 \text{ g}_S \text{ h}^{-1}$ e (C) $F.C_{SF} = 2,4 \text{ g}_S \text{ h}^{-1}$.



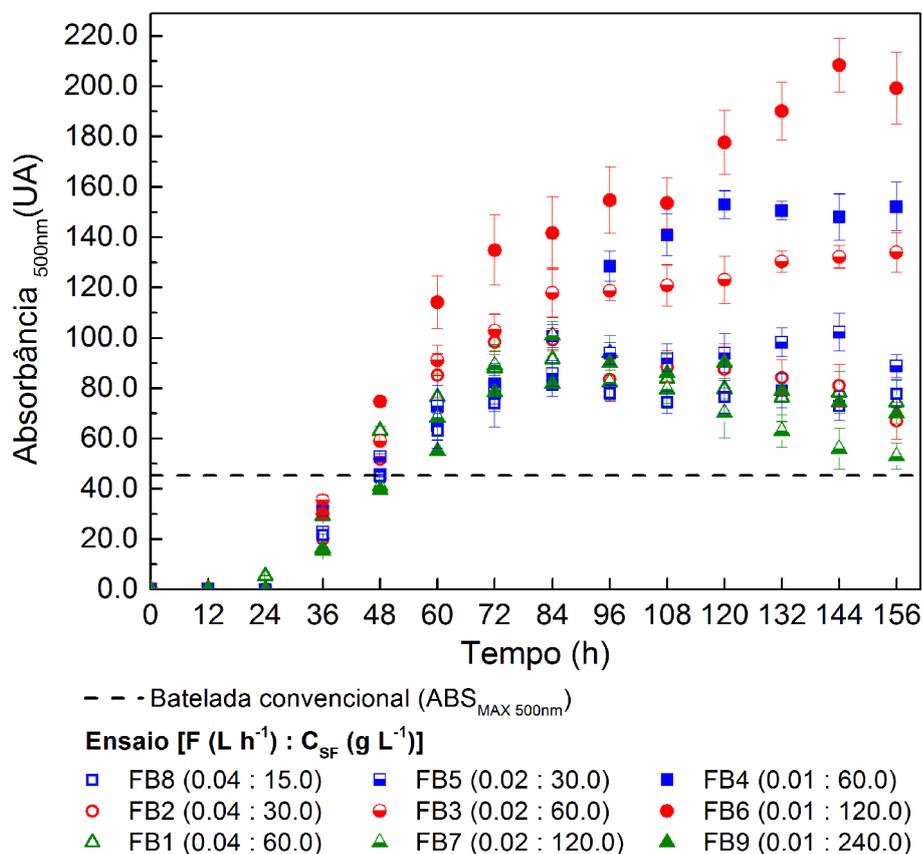
Analisando-se os perfis de concentração celular (C_x), observa-se que os ensaios conduzidos com $F.C_{SF} = 0,6 \text{ g h}^{-1}$ (Figura 5.25B) apresentaram perfis de concentração celular estáveis após o início da alimentação (36 h), atingindo uma concentração máxima de células variando na faixa de 8,0 a 13,0 g L^{-1} . Nos demais ensaios conduzidos com $F.C_{SF} = 1,2 \text{ g h}^{-1}$ (Figura 5.26A) e $2,4 \text{ g h}^{-1}$ (Figura 5.25C), verificou-se uma concentração celular máxima variando entre 13,0 e 22,0 g L^{-1} para ambos produtos $F.C_{SF}$. A diferença observada entre os perfis de crescimento celular e as concentrações máximas de células entre os ensaios com

vazões mássicas de alimentação ($F \cdot C_{SF}$) diferentes, está relacionada possivelmente à quantidade total de substrato fornecido e à capacidade de metabolização do substrato pelas células. Nos ensaios FB1 e FB2, com fornecimentos totais de substrato cerca de 1,5 (FB2) e 2,4 (FB1) vezes superiores ao ensaio FB4, verificou-se uma semelhança nos perfis de crescimento celular e na concentração máxima de células foi em torno de $13,0 \text{ g} \times \text{L}^{-1}$.

Ao se comparar a concentração máxima de células dos ensaios em batelada alimentada com a concentração máxima de células obtida no ensaio em batelada convencional, verificou-se que a depender das condições de alimentação, as concentrações máximas de células obtidas nos ensaios em batelada alimentada foram iguais ou até 2,5 vezes superiores à máxima concentração celular alcançada na batelada convencional.

Diferentemente do observado para os perfis de concentração celular, os perfis de produção de biocolorante ilustrados na Figura 5.26 mostram a superioridade de todos os cultivos conduzidos em batelada alimentada frente a batelada convencional.

Figura 5.26- Perfis de produção de colorante ao longo dos cultivos conduzidos em batelada alimentada sob diferentes condições de alimentação em relação à máxima produção obtida no cultivo em batelada convencional.



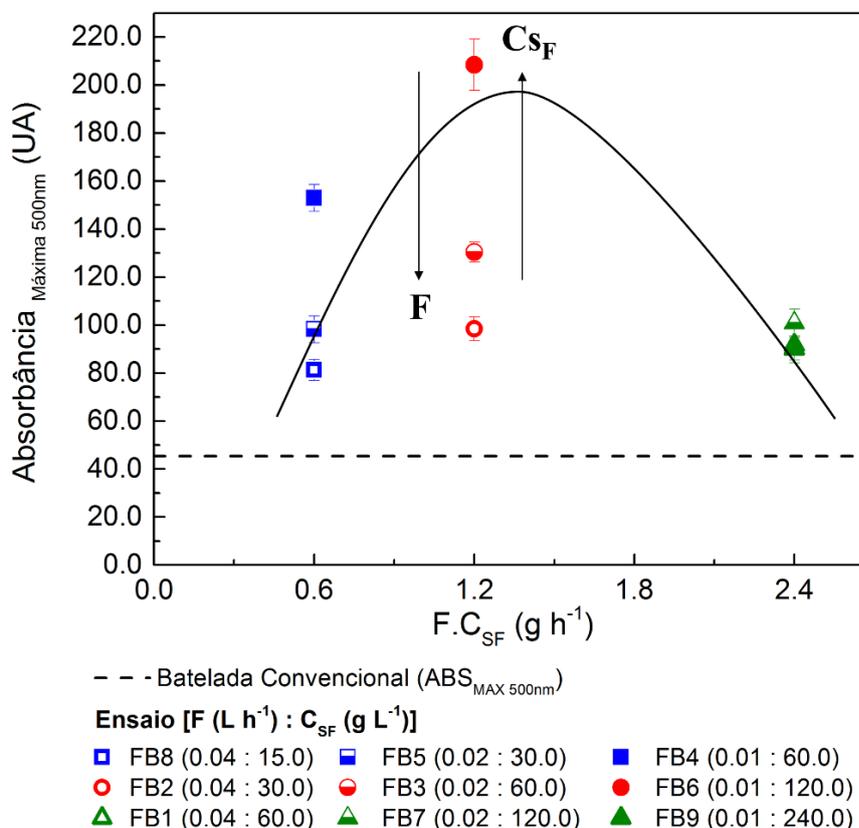
Ao se analisar os perfis de produção de corante verificou-se que os ensaios conduzidos em batelada alimentada, independentemente da condição de alimentação, alcançaram produções máximas de corante cerca de 2 a 5 vezes superiores à batelada convencional, demonstrando ser a batelada alimentada uma estratégia promissora para a síntese de biocolorante vermelho por *T. minnesotensis*.

Os resultados obtidos encontram-se em concordância com o observado para outros biocolorantes quando empregado a estratégia de batelada alimentada. Embora a quantidade de trabalhos empregando a estratégia de batelada alimentada na produção de biocolorantes por fungos filamentosos em biorreatores sejam escassos, a maioria dos trabalhos existentes relatam ganhos expressivos, variando de 35 a 85% em termos de produção de biocolorante frente aos cultivos conduzidos em batelada convencional (CHEN et al., 2021; KRAIRAK *et al.*, 2000; SANTERRE *et al.*, 1995).

Por meio de uma análise mais pontual dos resultados ilustrados na Figura 5.26, tem-se que dentre os 9 ensaios conduzidos como batelada alimentada em diferentes condições de alimentação, os ensaios FB3, FB4 e FB6 foram os que apresentaram os resultados mais expressivos em termos de produção de corante, sendo cerca de 30 a 160% superiores aos demais ensaios conduzidos em batelada alimentada.

Diante dos perfis de produção sugere-se, conforme ilustrado na Figura 5.27, que o bioprocessamento de síntese de corante por *T. minnesotensis* tende a alcançar sua máxima produção no modo de cultivo em batelada alimentada em uma faixa específica de vazão volumétrica de alimentação (F) e de concentração de substrato no meio alimentado (C_{SF}), de modo que o processo de assimilação e metabolização dos nutrientes fornecidos as células se deem de forma equilibrada e eficaz.

Figura 5.27- Influência da vazão mássica de nutrientes ($F.C_{SF}$) na máxima produção de colorante ($ABS_{MAX\ 500nm}$) em diferentes vazões volumétricas de alimentação (F) e concentrações de substrato no meio suplementar (C_{SF}).



Conforme ilustrado pela Figura 5.27, o bioprocesso tende a apresentar sua eficiência maximizada em uma faixa de produto $F.C_{SF}$ próxima a $1,2\ g_s\ h^{-1}$. Condições muito superiores a esta faixa de operação, como observado nos ensaios cujo produto $F.C_{SF}$ foi igual a $2,4\ g_s\ h^{-1}$, embora a produção de colorante ainda tenha se apresentado cerca de 2,0 vezes superior à batelada convencional, em termos de conversão global de substrato em produto ($Y_{P/S}$: Figura 5.28C) verificou-se uma queda na ordem de 48,0% quando comparado à batelada convencional. Além disso, a quantidade de açúcar residual observada nos ensaios a $2,4\ g_s\ h^{-1}$ (Tabela 5.10), os quais chegaram a ser até 8,0 % do total de açúcar fornecido, demonstraram que a velocidade de alimentação superou a capacidade de assimilação do microrganismo. Diferentemente, nos cultivos em que os produtos $F.C_{SF}$ foram iguais a 0,6 ou $1,2\ g_s\ h^{-1}$, as quantidades de açúcar residual foram inferiores a 1,5% das quantidades totais fornecidas, o que evidencia o equilíbrio entre as condições de fornecimento dos nutrientes e a demanda metabólica do microrganismo.

Logo, embora as produções de colorante nos ensaios FB1, FB7 e FB9 tenham sido superiores à da batelada convencional, em termos de desempenho o bioprocesso como um todo

não foi favorecido quando exposto a uma alimentação (FC_{SF}) de $2,4 \text{ gs h}^{-1}$, sendo possivelmente afetado por fenômenos de inibição e/ou repressão da biossíntese de corante.

Tabela 5.10 – Massa total de açúcar fornecido (M_{AT}^B) e massa total de açúcar residual (M_{AR}) referentes ao cultivo convencional em batelada (BC) e aos ensaios em batelada alimentada com diferentes condições de alimentação (FB).

	$FC_{SF} \text{ (gs h}^{-1}\text{)}$	$M_{AT}^B \text{ (gs)}$	$M_{AR} \text{ (gs)}$
BC	-	$80,29 \pm 3,69$	0,22
FB1	2,4	$350,56 \pm 12,27$	6,93
FB2	1,2	$224,45 \pm 5,84$	2,23
FB3	1,2	$226,65 \pm 8,61$	3,21
FB4	0,6	$163,35 \pm 5,23$	1,70
FB5	0,6	$154,42 \pm 4,32$	1,48
FB6	1,2	$236,79 \pm 8,76$	1,90
FB7	2,4	$393,35 \pm 10,23$	18,57
FB8	0,6	$142,20 \pm 4,12$	1,59
FB9	2,4	$397,77 \pm 18,70$	33,29

Fonte: Acervo pessoal do autor.

Para a faixa operacional onde o bioprocesso apresentou ter um melhor desempenho ($0,6$ a $1,2 \text{ gs h}^{-1}$), verificou-se que quanto maior a concentração do substrato alimentado (C_{SF}), menor deve ser a vazão volumétrica de alimentação (F), de modo que haja um alinhamento entre a suficiência em fontes nutrientes e a minimização dos efeitos de diluição.

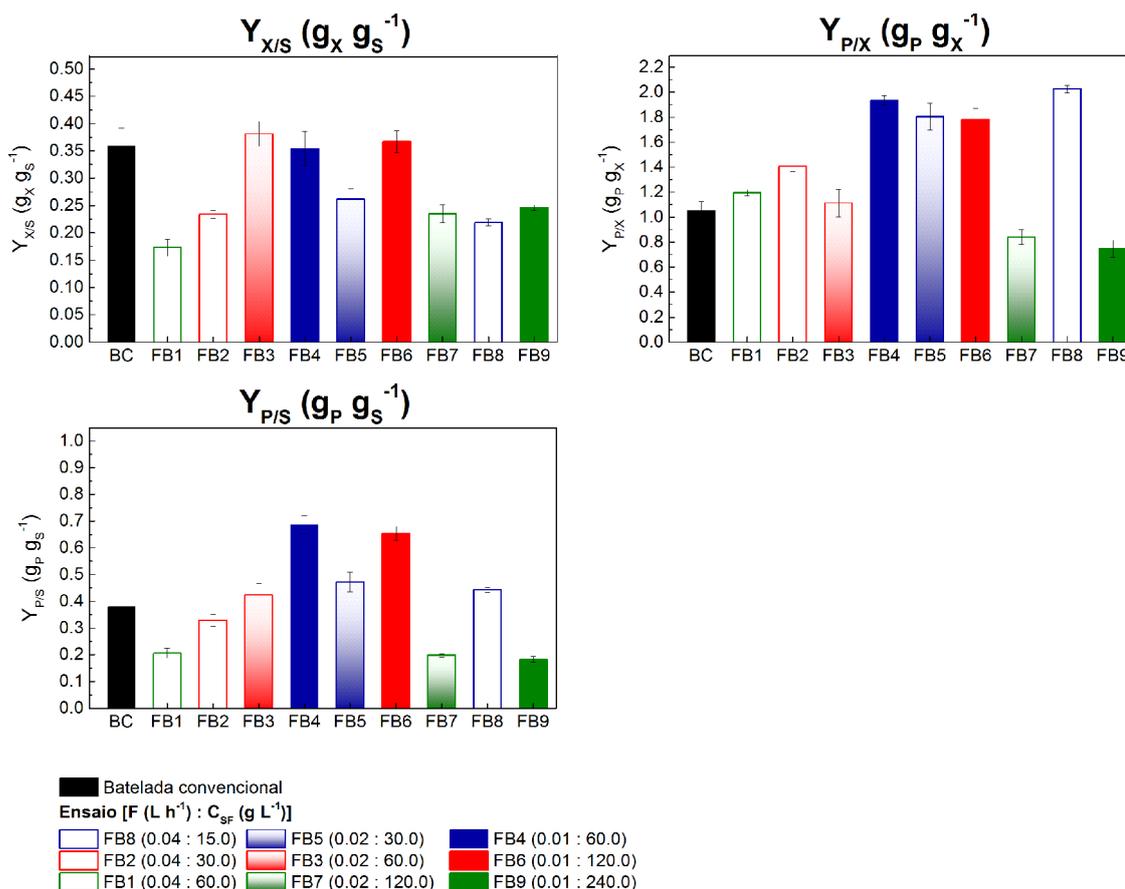
Tendências, similares a observada, foram relatadas por Teodoro *et al.* (2006) e Cruz *et al.* (1999), ao avaliarem, respectivamente, a produção de cefalosporina C e ácido clavulânico em biorreator tipo tanque agitado via cultivos em batelada alimentada sob diferentes condições de alimentação. Teodoro *et al.* (2006) contestaram que o bioprocesso de produção de ácido clavulânico pela bactéria filamentosa *Streptomyces clavuligerus* em diferentes condições de alimentação de glicerol foi até 2 vezes superior em termos de produção do metabólito secundário, quando operado a uma baixa vazão volumétrica de alimentação (F) e uma elevada concentração de substrato alimentado (C_{SF}). Cruz *et al.* (1999), de uma forma mais genérica, verificaram que as melhores condições para a produção de cefalosporina C por *Cephalosporium acremonium* strain ATCC 48272 foram a uma vazão mássica de glicose de $0,92 \text{ gs h}^{-1}$ e uma vazão volumétrica de alimentação de $0,0103 \text{ L h}^{-1}$, onde valores diferentes desse produto $F.C_{SF}$ prejudicaram o desempenho do bioprocesso em termos de produção de cefalosporina C.

Logo, os resultados obtidos demonstraram que a faixa do produto $F.C_{SF}$ entre $0,6$ a $1,2 \text{ gs h}^{-1}$, onde o bioprocesso apresentou um melhor desempenho, as condições de alimentação dos

ensaios FB4 e FB6 foram as que geraram as melhores produções de biocolorante por *T. minnesotensis*.

Ao se comparar os cultivos verifica-se que, embora o ensaio FB6 tenha apresentado uma concentração celular máxima cerca de 70% superior ao ensaio FB4 (Figura 5.25), quando analisado em termos de conversões globais, segundo ilustrado na Figura 5.28A, observa-se que os índices de conversão global de substrato em células ($Y_{X/S}$) em ambos ensaios em batelada alimentada (FB4 e FB6), bem como para batelada convencional, apresentaram-se próximos e na ordem de $0,35 \text{ g}_X \text{ g}_S^{-1}$.

Figura 5.28- Coeficientes globais de conversão de: (A) substrato em células ($Y_{X/S}$), (B) células em produto ($Y_{P/X}$), (C) substrato em produto ($Y_{P/S}$) referentes aos 9 ensaios conduzidos em batelada alimentada sob diferentes condições de alimentação (FB) e um ensaio conduzido em batelada convencional (BC).



Pela Figura 5.28B também foi possível observar que nos cultivos FB4 e FB6 as células apresentaram uma eficiência de produção de colorante cerca de 67% superior frente às células geradas no cultivo em batelada convencional. Além disso, a mesma relação fora observada para a conversão global de substrato em colorante (Figura 5.28C), na qual as conversões nos ensaios

FB4 e FB6 se mostraram cerca de 80% superiores à da batelada convencional. Esses resultados demonstraram que a estratégia de batelada alimentada se apresenta como promissora para a síntese de colorantes via *T. minnesotensis*, uma vez que o fornecimento adequado de nutrientes torna as células mais eficientes para produzirem o biocolorante vermelho.

Ao observar-se os perfis de crescimento celular, especificamente para os dois melhores cultivos conduzidos em batelada alimentada (FB4, FB6), verificou-se que o perfil celular do cultivo FB6 (Figura 5.25A) se apresentou diferente do perfil obtido no ensaio FB4 (Figura 5.25B). No ensaio FB6 foi observado que a concentração celular se manteve ascendente ao longo de todo o bioprocessamento atingindo um valor máximo da ordem de $22,0 \text{ g}_X \text{ L}^{-1}$. Ao passo que no ensaio FB4, após o início da alimentação de substrato, verificou-se um sutil crescimento de células, alcançando uma concentração celular máxima da ordem de $13,0 \text{ g}_X \text{ L}^{-1}$ em 60 horas, na qual se manteve constante até o término do cultivo.

Quanto ao consumo de substrato, verificou-se que ambos os cultivos apresentaram um consumo praticamente completo da quantidade total de açúcar fornecido (Tabela 5.10).

Dado o completo consumo da quantidade total de açúcar fornecido, foi possível estimar a velocidade de consumo de substrato (r_S) em ambos cultivos a partir do balanço de massa para o substrato considerando estado estacionário (Equação 5.22):

$$r_S \cdot V = F \cdot C_{SF} + V \cdot \frac{dC_S}{dt} \quad \xrightarrow{C_S \approx 0} \quad r_S \cdot V = F \cdot C_{SF} + V \cdot \frac{dC_S}{dt} \quad \overset{0}{\nearrow}$$

$$r_S = \frac{F}{V} \cdot C_{SF} = D \cdot C_{SF} \quad (5.22)$$

onde:

r_S : velocidade de consumo de substrato ($\text{g}_S \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

V: volume de caldo no reator (L).

F: vazão volumétrica de alimentação (L h^{-1}).

D: diluição (-).

C_{SF} : concentração de substrato no meio de alimentação ($\text{g}_S \text{ L}^{-1}$).

C_S : concentração de substrato ($\text{g}_S \text{ L}^{-1}$).

t: tempo (h).

Ao estimar a velocidade de consumo de substrato (r_S) para ambos os cultivos, verificou-se que r_S do cultivo FB6 foi o dobro do valor obtido no cultivo FB4. Portanto, diante dos perfis

de crescimento celular e das velocidades de consumo de substrato de ambos os cultivos pode-se inferir que no cultivo FB6 a alimentação de substrato fornecida superou a quantidade de substrato necessária requerida pelas células para sua manutenção. Portanto, uma parcela do substrato fornecido foi utilizada para o crescimento celular, conforme se observa no perfil ascendente de concentração celular ao longo de todo o cultivo FB6 (Figura 5.25A).

No cultivo FB4, onde a velocidade de consumo de substrato (r_s) foi em torno de $0,16 \text{ g}_S \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ foi observado que a concentração celular se manteve praticamente estável em torno de $13 \text{ g}_X \text{ L}^{-1}$, ou seja, a quantidade de substrato fornecida foi suficiente para manter as células ativas, mas sem direcionar o consumo para o crescimento celular, além de favorecer a síntese de metabólitos secundários, no caso o biocolorante vermelho.

Visando complementar a abordagem desenvolvida, foram realizadas duas modelagens cinéticas exploratórias baseando-se nos perfis de crescimento celular, consumo de substrato e produção de colorante dos ensaios FB4 e FB6, de modo a estimar os parâmetros cinéticos de produção. Para o desenvolvimento das modelagens, empregou-se o modelo cinético de crescimento de Contois e foram assumidas como hipóteses a glicose como único substrato limitante, a ocorrência de morte celular ao longo de todo o bioprocessamento e o colorante como sendo um produto parcialmente associado ao crescimento, conforme descrito na seção 5.2.5.

A Figura 5.29 e a Tabela 5.11 apresentam respectivamente o ajuste do modelo aos valores experimentais de C_X , C_S e C_P para os ensaios FB4 e FB6, assim como os valores dos parâmetros cinéticos de produção (α e β) estimados pelo ajuste do modelo.

Figura 5.29- Gráficos comparativos entre os valores simulados e experimentais de C_X , C_S e C_P relativos aos ensaios (A) FB4 e (B) FB6 conduzidos em batelada alimentada em biorreator tipo tanque agitado e aerado.

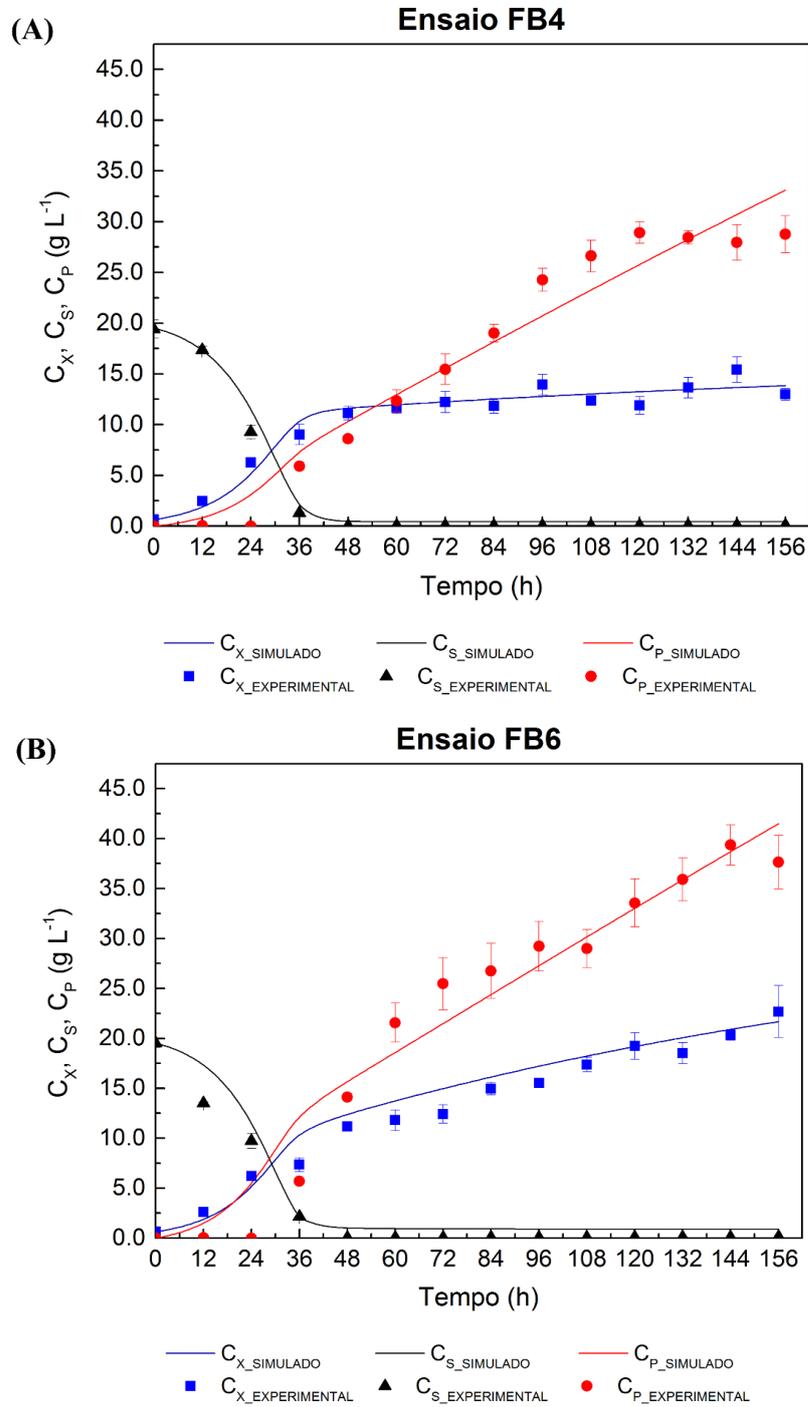


Tabela 5.11 – Valores estimados dos parâmetros cinéticos de produção para os cultivos FB4 e FB6 conduzidos em batelada alimentada em biorreator tanque agitado.

Parâmetros cinéticos de produção	FB4	FB6
α ($\text{g}_P \text{g}_X^{-1}$)	0,464	1,105
β ($\text{g}_P \text{g}_X^{-1} \text{h}^{-1}$)	0,01763	0,00645

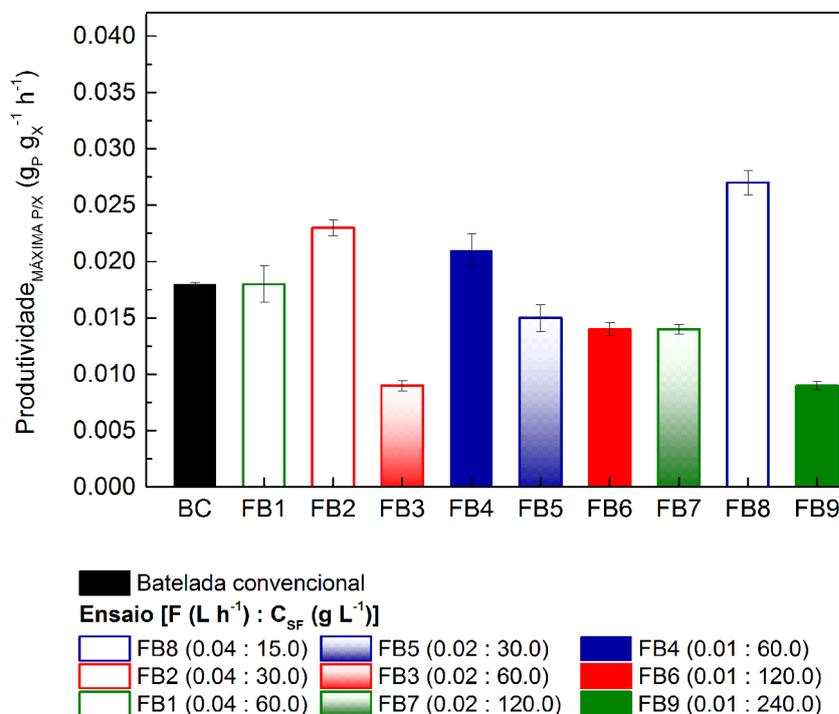
Fonte: Acervo pessoal do autor.

Com base na Figura 5.29, observou-se que embora haja uma discrepância entre os valores simulados e experimentais mais acentuada para os valores de C_P em ambos ensaios, no geral, o modelo exploratório empregado descreveu de forma satisfatória o comportamento do bioprocessamento para ambos cultivos (FB4 e FB6).

Quanto aos parâmetros cinéticos de produção mostrados na Tabela 5.11, pode-se verificar que, conforme sugerido, a velocidade de produção de biocolorante no ensaio FB6 apresentou uma maior contribuição do parâmetro α , sendo o mesmo cerca de 171 vezes maior do que o parâmetro β , ao passo que para o ensaio FB4, o mesmo parâmetro α se apresentou cerca de 26 vezes superior.

A diferença observada entre os valores do parâmetro cinético α nos ensaios FB4 e FB6 evidencia que a batelada alimentada FB6 apresentou uma maior contribuição do crescimento celular sobre a produção de colorante quando comparado ao ensaio FB4. Ou seja, diante dos resultados obtidos, sugere-se que a superioridade em termos de produção de colorante observada no ensaio FB6 frente ao ensaio FB4, possivelmente provém do expressivo crescimento de células capazes de sintetizar o biocolorante vermelho, e não propriamente do aumento da eficiência das células em produzir o biocolorante frente às condições de alimentação. Segundo ilustrado na Figura 5.30, ao se avaliar a produtividade máxima específica ($P_{P/X-MAX}$), verificou-se que para mesma quantidade de células e no mesmo período, a síntese de colorante vermelho na batelada alimentada FB4 foi cerca de 55% superior à síntese observada na no cultivo FB6.

Figura 5.30- Produtividade máxima específica ($P_{P/X-MAX}$) referente aos 9 ensaios conduzidos em batelada alimentada sob diferentes condições de alimentação (FB) e ao cultivo convencional em batelada (BC).



Portanto, a condição de alimentação empregada no ensaio FB4 demonstrou ser mais vantajosa em relação ao ensaio FB6, pois define uma maior eficiência das células em sintetizar o biocolorante vermelho. Além disso, por resultar em expressivas produções de colorante, a mesma também se mostrou mais atrativa frente as demais condições de alimentação estudadas.

Sendo assim, os resultados obtidos demonstraram que, no geral, o emprego da batelada alimentada tende a ter efetiva contribuição para o bioprocesso de síntese de colorante vermelho, podendo acarretar em um aumento de até 5 vezes na produção alcançada com a batelada convencional. Contudo, dentre todas as condições de alimentação estudadas, a empregada no ensaio FB4 tende a ser a condição mais promissora para o bioprocesso, uma vez que concilia elevada eficiência celular e expressiva produção de biocolorante. Além disso, os impactos sobre os fenômenos de transferência e de mistura ao longo do bioprocesso, ocasionados pelo elevado crescimento celular tendem a serem mínimos diante da condição de alimentação empregada, uma vez que mediante o fornecimento controlado de nutrientes, tem-se o equilíbrio do processo de assimilação e metabolização pelo fungo *T. minnesotensis*, acarretando em um moderado crescimento celular, na desrepressão de suas rotas metabólicas e, conseqüentemente, na maximização da produção de biocolorante.

5.4. CONCLUSÕES

Mediante os ensaios em frascos agitados utilizando duas diferentes estratégias de cultivo, cultivos contínuos e em batelada alimentada, ambas empregando alimentação intermitente de meio suplementar, verificou-se que a batelada alimentada se apresentou como uma estratégia favorável e promissora para produção de colorante vermelho em biorreator tanque agitado, visto que a manutenção da baixa concentração de substrato e, conseqüentemente, da baixa velocidade de consumo de substrato contribuíram para uma produção expressiva de 85,96 UA do metabólito secundário, ou seja, 16,24 g_P L⁻¹.

Diante dos resultados obtidos em frascos agitados, ao se avaliar a estratégia de batelada alimentada conduzida em biorreator de bancada tipo tanque agitado de 4 L sob diferentes condições de alimentação, verificou-se que independentemente das condições de alimentação, o bioprocessamento conduzido em batelada alimentada apresentou uma produção de colorante até 5 vezes superior à da batelada convencional. Além disso, ao se analisar as condições de alimentação foi verificado que a produção de colorante vermelho tende a ser favorecida quando empregada uma baixa vazão volumétrica de alimentação (F) de meio de cultura suplementar com elevada concentração de substrato (C_{SF}). No entanto, ambas variáveis operacionais devem ser dimensionadas de modo que o produto F.C_{SF} se apresente na faixa de 0,6 a 1,2 g_S h⁻¹, a fim de que os eventuais efeitos de inibição, repressão e/ou diluição sejam minimizados e o bioprocessamento como um todo seja favorecido. Dentre as avaliadas, a condição de alimentação FB4, caracterizada por uma vazão volumétrica de alimentação (F) de 0,01 L h⁻¹ com concentração de substrato no meio de cultura de alimentação (C_{SF}) de 60,0 g L⁻¹ se apresentou como a condição mais favorável ao bioprocessamento de síntese de colorante vermelho por *T. minnesotensis* em termos de eficiência e produção, resultando em uma produção de colorante de 152,96 UA, ou seja, 28,29 g_P L⁻¹.

Portanto, os resultados obtidos, os quais se configuram como inéditos, demonstraram que diante da complexidade e da especificidade do bioprocessamento, a estratégia de batelada alimentada apresentou efetiva contribuição para a melhoria do processo de produção de colorante vermelho pelo fungo endofítico *T. minnesotensis*.

Capítulo 6

**CONSIDERAÇÕES FINAIS E
PERSPECTIVAS FUTURAS**

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos resultados obtidos na presente tese, conclui-se que:

- Os resultados de caracterização do fungo endofítico *T. minnesotensis* e do biocolorante vermelho sintetizado demonstraram o potencial de produção do microrganismo, bem como a expressiva capacidade de coloração do biocomposto colorido nas mais variadas matrizes, desde alimentos até tecidos.
- Dentre as características do biocolorante vermelho, o mesmo apresentou propriedades fluorescentes, e baixa citotoxicidade contra células de hepatoblastoma humano (HepG2) em concentrações acima de $5,0 \text{ g L}^{-1}$ e atividade contra bactérias patogênicas e leveduras em concentrações acima de $50,0 \text{ g L}^{-1}$. Além disso, o colorante fúngico apresentou melhor estabilidade em pHs próximos à neutralidade (6,0 a 8,0) e em baixas temperaturas (10 a 20°C).
- As diferentes combinações de impelidores (CI), bem como as condições operacionais frequência de agitação (N) e vazão específica de alimentação de ar (Φ_{ar}) apresentam influências sobre o desempenho do bioprocesso. Dentre as combinações, a de impelidores orelha de elefante com bombeamento para baixo e para cima, a qual tende a conferir um escoamento misto ao caldo de cultivo, quando operada a 600 rpm e 1,0 vvm apresentou o maior percentual para maximização da produção e produtividade de biocolorante de 95,2%.
- Em termos operacionais verificou-se que a síntese de colorante apresentou correlações com parâmetros vinculados tanto a fenômenos de transferência de oxigênio ($\text{O}_{2\text{-T}}$ (R6) e $\text{T}_{\text{OD-Min}}$ (R8)) quanto aos fenômenos hidrodinâmicos ($\mu_{\text{ap-M}}$ (R10) e $\lambda_{\text{K-M}}$ (R12)). No entanto, de modo geral, as propriedades hidrodinâmicas tendem a apresentar maior relevância sobre o desempenho do bioprocesso em relação à transferência de oxigênio, visto o fato de os parâmetros hidrodinâmicos terem apresentado melhor correlação com a produção de biocolorante, sendo o parâmetro microescala de turbulência de Kolmogorov médio ($\lambda_{\text{K-M}}$) o de melhor correlação com o desempenho do bioprocesso.
- De modo geral, o fungo filamentoso *T. minnesotensis* apresentou uma elevada estabilidade e versatilidade a se adequar a diferentes configurações e condições operacionais, o que contribui para os satisfatórios resultados obtidos no estudo exploratório do escalonamento do bioprocesso em 10 L, no qual foi alcançada uma produção estatisticamente igual à escala de 4 L, na ordem de 40 UA.

- Quanto ao emprego da estratégia de batelada alimentada, verificou-se resultados promissores tanto em frascos agitados quanto em biorreator convencional. Em frascos agitados obteve-se, empregando a alimentação de um meio suplementar concentrado (dextrose: 238 g L⁻¹ e peptona de soja 119,0 g L⁻¹), uma produção máxima da ordem de 86,0 UA (16,0 g_P L⁻¹), sendo esta cerca de 2,3 vezes superior à obtida em batelada convencional. Em biorreator convencional, os ganhos em termos de produção máxima variaram na ordem de 80 a 238% frente à batelada convencional a depender das condições de alimentação (F.C_{SF}).
- Nos ensaios em biorreator convencional empregando a estratégia de batelada alimentada, observou-se que a produção de biocolorante foi favorecida quando empregada uma baixa vazão volumétrica de alimentação de meio de cultura suplementar (F) com elevada concentração de substrato (C_{SF}), sendo que essas variáveis devem ser dimensionadas de modo que o produto F.C_{SF} se apresente na faixa de 0,6 a 1,2 g_S h⁻¹.
- Dentre as condições de alimentação avaliadas, o ensaio FB4 (F: 0,01 L h⁻¹; C_{SF}: 60,0 g_S L⁻¹) se apresentou como o mais favorável ao bioprocessamento de síntese de colorante em termos de eficiência e produção, resultando em uma produção máxima de biocolorante de aproximadamente 153,0 UA (28,29 g_P L⁻¹).

Portanto, diante do exposto, tem-se que os resultados obtidos configuram-se como promissores, inéditos e de considerável contribuição ao desenvolvimento do processo de produção de colorante vermelho pelo fungo endofítico *T. minnesotensis*. Entretanto, outros estudos ainda se fazem necessários, de modo a se obter uma melhor compreensão do bioprocessamento, bem como do biocomposto visando sua futura inserção no mercado global de colorantes. Com isso, são propostos os seguintes a serem explorados em trabalhos futuros:

- Estudo do escalonamento do bioprocessamento para escalas superiores a 10 L, avaliando diferentes critérios de variação de escala e de aeração;
- Validação do emprego da estratégia de batelada alimentada em maiores escalas.
- Caracterização complementar do biocolorante em termos de propriedades bioativas, análise colorimétrica, citotoxicidade e aplicabilidade.
- Estudo e desenvolvimento de protocolos de extração e purificação do biocolorante vermelho.

Capítulo 7

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL GHANY, T. M. Safe Food Additives: A Review. **Biological and Chemical Research**, v. 32, p. 402–437, 2015.

AFSHARI, M. *et al.* Investigating the influence of pH, temperature and agitation speed on yellow pigment production by *Penicillium aculeatum* ATCC 10409. **Natural Product Research**, v. 29, n. 14, p. 1300–1306, 2015.

AHN, J. *et al.* Enhancement of Monascus Pigment Production by the Culture of *Monascus sp.* J101 at Low Temperature. **Biotechnology progress**, v. 22, n. 1, p. 338–340, 2006.

AMAN MOHAMMADI, M. *et al.* Microbial pigments as an alternative to synthetic dyes and food additives: a brief review of recent studies. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 45, n. 1, p. 1–12, 2022.

ANUGRAHA, A.C; THOMAS, T. A review on pigment producing soil fungi and its applications. **Asian Journal of Mycology**. v. 4, p. 89–112, 2021.

ARAÚJO, J. M. DE; SILVA, A. C. DA; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, p. 948–955, 2000.

BADIN, E. E. *et al.* Kinetic Modeling of Thermal Degradation of Color, Lycopene, and Ascorbic Acid in Crushed Tomato. **Food and Bioprocess Technology**, v. 14, n. 2, p. 324–333, 2021.

BADINO, A. C., FACCIOTTI, M. C. R., SCHMIDELL, W. Construction and operation of an impeller rheometer for on-line rheological characterization of non-Newtonian fermentation broths. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 14, p. 359-365, 1997.

BADINO, A. C.; FACCIOTTI, M. C. R.; SCHMIDELL, W. Volumetric oxygen transfer coefficients (kLa) in batch cultivations involving non-Newtonian broths. **Biochemical Engineering Journal**, v. 8, n. 2, p. 111–119, 2001.

BADINO, Alberto C.; SCHMIDELL, Willibaldo. Agitação e aeração em bioprocessos. *In*: SCHMIDELL, Willibaldo (org.). **Coleção Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica (Volume 2)**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2021. p. 241–310a.

BADINO, Alberto C.; SCHMIDELL, Willibaldo. Variação de escala. *In*: SCHMIDELL, Willibaldo (org.). **Coleção Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica (Volume 2)**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2021. p. 311–335b.

BANDAIPHET, C.; PRASERTSAN, P. Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, kLa in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 2, p. 216–228, 2006.

BASANT, T.; JAHAN, S. Effect of temperature on the dyeing of cotton fabric with *Monascus purpureus* dye. **International Journal of Engineering Sciences & Research Technology**, v. 5, n. 12, p. 440–443, 2016.

BATALHA, M. A. O cerrado não é um bioma. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 1, p. 21–24, 2011.

BICAS, JULIANO LEMOS; DA SILVA, WESLEY SANTIAGO DA SILVA. **Processo de Produção e Aplicação de Pigmento Oriundo de Fungo *Fusarium oxysporum***, BR 10 2013 015305-2 A2, Depósito: 18 jun. 2013. Concessão: 30 jun. 2015.

BISHT, G. *et al.* Applications of red pigments from psychrophilic *Rhodonellum psychrophilum* GL8 in health, food and antimicrobial finishes on textiles. **Process Biochemistry**, v. 94, p. 15–29, 2020.

BONDIOLI, F.; MANFREDINI, T.; OLIVEIRA, A. P. N. DE. Pigmentos Inorgânicos: Projeto, Produção e Aplicação Industrial. **Cerâmica Industrial**, v. 3, p. 13–17, 1998.

BOUAIFI, M.; ROUSTAN, M. Power consumption, mixing time and homogenization energy in dual-impeller agitated gas-liquid reactors. **Chemical Engineering and Processing**, v. 40, n. 2, p. 87–95, 2001.

BRAKHAGE, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 21–32, 2013.

BUFFO, M. M. *et al.* Influence of dual-impeller type and configuration on oxygen transfer, power consumption, and shear rate in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 114, p. 130–139, 2016.

BUFFO, Mariane Molina. **Influência da morfologia e do cisalhamento na produção de enzimas celulolíticas por *Aspergillus niger***. 2020. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020.

BUSTAMANTE, M. C. C.; CERRI, M. O.; BADINO, A. C. Comparison between average shear rates in conventional bioreactor with Rushton and Elephant ear impellers. **Chemical Engineering Science**, v. 90, p. 92–100, 2013.

CALVO, A. M. *et al.* Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 447–459, 2002.

CAMPESI, A. *et al.* Determination of the average shear rate in a stirred and aerated tank bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 2, p. 241–248, 2009.

CERRETI, M. *et al.* Heat and light stability of natural yellow colourants in model beverage systems. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**, v. 37, n. 6, p. 905–915, 2020.

CERRI, M. O. *et al.* Average shear rate for non-Newtonian fluids in a concentric-tube airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 1, p. 51–57, 2008.

CERRI, Marcel Otavio. **Hidrodinâmica e transferência de oxigênio em três biorreatores airlift de circulação interna geometricamente semelhantes**. 2009. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

CHATRAGADDA, R.; DUFOSSÉ, L. Ecological and biotechnological aspects of pigmented microbes: A way forward in development of food and pharmaceutical grade pigments. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 1–27, 2021.

- CHATTERJEE, S. *et al.* Characterization of Red Pigment from *Monascus* in Submerged Culture Red Pigment from *Monascus Purpureus*. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 5, n. 12, p. 2102–2108, 2009.
- CHEN, G. *et al.* The pigment characteristics and productivity shifting in high cell density culture of *Monascus anka* mycelia. **BMC Biotechnology**, v. 15, p. 1–9, 2015.
- CHEN, G. *et al.* Cost-effective process for the production of *Monascus* pigments using potato pomace as carbon source by fed-batch submerged fermentation. **Food Science and Nutrition**, v. 9, n. 10, p. 5415–5427, 2021.
- CHRISTIE, R. M. **Colour Chemistry**. Royal Society of Chemistry, 2001.
- CHISTI, Y. **Airlift bioreactors**. 1. ed. Northern Ireland: Elsevier Science Publishers Ltd, 1989.
- CLYDESDALE, F. M. Color as a factor in food choice. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 1, p. 83–101, 1993.
- COLET, R. *et al.* Kinetic Parameters of Fed-Batch Production of Carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* Using Low-Cost Agro-Industrial Substrates. **Industrial Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 311–321, 2019.
- COLLIGNON, M-L. *et al.* Axial impeller selection for anchorage dependent animal cell culture in stirred bioreactors. **Chemical Engineering Science**, v. 65, p. 150, 2010.
- CONSTANT, P. B. L.; STRINGHETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 203–220, 2002.
- CORRÊA, L. J.; BADINO, A. C.; CRUZ, A. J. G. Mixing design for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse: Methodology for selection of impeller configuration. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 2, p. 285–294, 2016.
- COSTA, C. L. L.; BADINO, A. C. Production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* in batch cultures without and with glycerol pulses under different temperature conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 69, p. 1–7, 2012.
- CRUZ, A. J. G. *et al.* Modelling and optimization of the cephalosporin C production bioprocess in a fed-batch bioreactor with invert sugar as substrate. **Chemical Engineering Science**, v. 54, n. 15–16, p. 3137–3142, 1999.
- CUI, Y. Q.; VANDER LANS, R. G. J. M.; LUYBEN, K. C. A. M. Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 55, n. 5, p. 715–726, 1997.
- DE CARVALHO, J. C. *et al.* Biopigments from *Monascus*: Strains selection, citrinin production and color stability. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 6, p. 885–894, 2005.
- DE OLIVEIRA, F. *et al.* Water-soluble fluorescent red colorant production by *Talaromyces amestolkiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 16, p. 6529–6541, 2019.

DE OLIVEIRA, F. *et al.* Biosynthesis of natural colorant by *Talaromyces amestolkiae*: Mycelium accumulation and colorant formation in incubator shaker and in bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, 2020.

DE OLIVEIRA, F. *et al.* Identification of azaphilone derivatives of *Monascus* colorants from *Talaromyces amestolkiae* and their halochromic properties. **Food Chemistry**, v. 372, p. 1–12, 2022.

DELWICHE, J. The impact of perceptual interactions on perceived flavor. **Food Quality and Preference**, v. 15, n. 2, p. 137–146, 2004.

DEMAIN, L. Regulation of secondary metabolism in fungi. **Pure and Applied Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 219–226, 1986.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**. v. 12, n. 4, p. 214–219, 1980.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International journal of food science & technology**, v. 35, n. 1, p. 5–22, 2000.

DUFOSSÉ, L. *et al.* Filamentous fungi are large-scale producers of pigments and colorants for the food industry. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 26, p. 56–61, 2014.

ESPERANÇA, Mateus Nordi. **Contribuição ao estudo do desempenho de biorreatores airlift de circulação interna: análise das condições operacionais e da geometria do equipamento**. 2018. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.

FARRELL, J.; ROSE, A. Temperature effects on microorganisms. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 101–120, 1967.

FELLOWS, Peter. J. Pasteurisation. **Food Processing Technology: Principles and Practice**. Editora CRC Press, 2009. p. 381–395.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A. *et al.* Thermal Stability of Selected Natural Red Extracts Used as Food Colorants. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, n. 1, p. 11–17, 2013.

FONSECA, C.S. *et al.* *Penicillium brevicompactum* as a novel source of natural pigments with potential for food applications. **Food and Bioproducts Processing**, v. 132, p. 188–199, 2022.

FOUILLAUD, M. *et al.* Anthraquinones and derivatives from marine-derived fungi: Structural diversity and selected biological activities. **Marine Drugs**, v. 14, n. 4, p. 1–64, 2016.

FOUILLAUD, M.; DUFOSSÉ, L. Microbial Secondary Metabolism and Biotechnology. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2022.

FRISVAD, J. C. Taxonomy, chemo-diversity, and chemo-consistency of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. January, p. 1–7, 2015.

FRISVAD, J. C.; ANDERSEN, B.; THRANE, U. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological Research**, v. 112, n. 2, p. 231–240, 2008.

FUJASOVÁ, M.; LINEK, V.; MOUCHA, T. Mass transfer correlations for multiple-impeller gas-liquid contactors. Analysis of the effect of axial dispersion in gas and liquid phases on “local” kLa values measured by the dynamic pressure method in individual stages of the vessel. **Chemical Engineering Science**, v. 62, n. 6, p. 1650–1669, 2007.

GESSLER, N. N.; EGOROVA, A. S.; BELOZERSKAYA, T. A. Fungal anthraquinones. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 85–99, 2013.

GEWEELY, N. S. Investigation of the optimum condition and antimicrobial activities of pigments from four potent pigment-producing fungal species. **Journal of Life Sciences**, v. 5, n. 9, 2011.

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: Problems and possible solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 17–48, 2000.

GIMÉNEZ, P. J. *et al.* Comparative Thermal Degradation Patterns of Natural Yellow Colorants Used in Foods. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70, n. 4, p. 380–387, 2015.

GMOSE, R. *et al.* Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 1–25, 2017.

GOMEZ, E. *et al.* Effect of fluiddynamic conditions on growth rate and biodesulfurization capacity of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. **Biochemical Engineering Journal**, v. 99, p. 138–146, 2015.

GONZÁLEZ, Néstor David López. **Secagem convectiva de papel reciclado com incorporação de corantes naturais**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

GUEVARA-SUAREZ, M. *et al.* Four new species of *Talaromyces* from clinical sources. **Mycoses**, v. 60, n. 10, p. 651–662, 2017.

GÜRSES, Ahmet. *et al.* Dyes and Pigments: Their Structure and Properties. In: _ (org.). **Dyes and Pigments**. 1. ed. Springer International Publishing, 2016. p. 13–29.

HAIJAJ, 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.

HAIJAJ, H.; GOMA, G.; FRANÇOIS, J. M. Effect of the cultivation mode on red pigments production from *Monascus ruber*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 8, p. 1731–1736, 2015.

HAKAIM, O. A.; ARAFA, A. A.; ABDU, L. A. W. Current Status and Future Outlook Pertaining to Encapsulation of Organic Pigments: Review Article. **World Journal of Textile Engineering and Technology**, v. 1, p. 1–22, 2015.

HENRY, B. S. Natural food colours. In: **Natural Food Colorants**. Springer, Boston, MA, 1996. p. 40–79.

HERBEST, W.; HUNGER, K. **Industrial Organic Pigments**. 3 ed. Alemanha Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2004. v. 3.

HERNÁNDEZ, V. A. *et al.* *Talaromyces australis* and *Penicillium murcianum* pigment production in optimized liquid cultures and evaluation of their cytotoxicity in textile applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 2, p. 1–9, 2019.

HSU, Y. W. *et al.* New bioactive orange pigments with yellow fluorescence from *Monascus*-fermented dioscorea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4512–4518, 2011.

JIANG, G. *et al.* Astaxanthin from Jerusalem artichoke: Production by fed-batch fermentation using *Phaffia rhodozyma* and application in cosmetics. **Process Biochemistry**, v. 63, n. April, p. 16–25, 2017.

JOSHI, V. K. *et al.* Microbial Pigments. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 362–369, 2003.

KADIC, E.; HEINDEL, T. J. Mixing considerations in stirred tank bioreactors when using fluid property altering microorganisms. In: **Fluids Engineering Division Summer Meeting**, p. 859–870, 2010.

KALRA, R.; CONLAN, X. A.; GOEL, M. Fungi as a Potential Source of Pigments: Harnessing Filamentous Fungi. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, p. 1–23, 2020.

KIM, H. J. *et al.* Morphology control of *Monascus* cells and scale-up of pigment fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 649–655, 2002.

KOLMOGOROV, A. N. The Local Structure of Turbulence in Incompressible Viscous Fluid for Very Large Reynolds Numbers. **Compt. Rend. (Dokl.) Acad. Sci. URSS**, v. 30, p. 301–305, 1941.

KOLMOGOROV, A. N. Dissipation of energy in the locally isotropic turbulence. **Proceedings of the Royal Society of London. Series A: Mathematical and Physical Sciences**, v. 434, n. 1890, p. 15–17, 1991.

KRAIRAK, S. *et al.* Maximizing yellow pigment production in fed-batch culture of *Monascus sp.* **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 90, n. 4, p. 363–367, 2000.

KRESTA, S. M.; BRODKEY, R. S. Turbulence in mixing applications. In: **Handbook of industrial mixing: science and practice**. p. 43–45, 2004.

KRULL, R. *et al.* Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 112–123, 2013.

KUMAR, A. *et al.* Microbial Pigments: Production and Their Applications in Various Industries. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 5, n. 1, p. 203–212, 2015.

LAGASHETTI, A. C. *et al.* Fungal pigments and their prospects in different industries. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 1–36, 2019.

- LAGASHETTI, A. C. *et al.* Antioxidant, Antibacterial and Dyeing Potential of Crude Pigment Extract of *Gonatophragmium triuniae* and Its Chemical Characterization. **Molecules**, v. 27, n. 2, 2022.
- LAKOWICZ, Joseph. R. Protein Fluorescence. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, Springer Science & Business Media, 2006. p. 445–486.
- LATHA, B. V.; JEEVARATNAM, K. Purification and Characterization of the Pigments from *Rhodotorula glutinis* DFR-PDY Isolated from Natural Source. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v. 5, n. 3, p. 166–174, 2010.
- LI, Z. J. *et al.* Estimation of hyphal tensile strength in production-scale *Aspergillus oryzae* fungal fermentations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 77, n. 6, p. 601–613, 2002.
- LV, J. *et al.* Enhanced production of natural yellow pigments from *Monascus purpureus* by liquid culture: The relationship between fermentation conditions and mycelial morphology. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 124, n. 4, p. 452–458, 2017.
- MANACHINI, P. L.; FORTINA, M. G.; PARTINI, C. Purification of edopolylgalacturonase produced by *Rhizopus stolonifer*. **Biotechnology Letters**, v. 9, p. 219–224, 1987.
- MAPARI, S. A. *et al.* Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2009.
- MAPARI, S. A. *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.
- MAPARI, S. A. S.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Photostability of natural orange-red and yellow fungal pigments in liquid food model systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 14, p. 6253–6261, 2009.
- MAPARI, S. A. S.; THRANE, U.; MEYER, A. S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 300–307, 2010.
- POWERS-FLETCHER, M. V. *et al.* Filamentous fungi. **Microbiology Spectrum**, v. 4, p. 1–29, 2016.
- MARTINS, N. *et al.* Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. **Trends in Food Science and Technology**, v. 52, p. 1–15, 2016.
- MCFARLANE, C. M.; NIENOW, A. W. Studies of High Solidity Ratio Hydrofoil Impellers for Aerated Bioreactors. 1. **Review. Biotechnology Progress**, v. 11, n. 6, p. 601–607, 1995.
- MENDES, Caroline Eliza. **Avaliação das condições hidrodinâmicas, de transferência de oxigênio e de cisalhamento em diferentes modelos e escalas de reatores pneumáticos**. 2016. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

- MÉNDEZ, A. *et al.* Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 12, n. 12, p. 961–968, 2011.
- MERUVU, H.; DOS SANTOS, J. C. Colors of life: a review on fungal pigments. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 8, p. 1153–1177, 2021.
- METZNER, A. B.; OTTO, R. E. Agitation of non-Newtonian fluids. **AIChE Journal**, v. 3, n. 1, p. 3–10, 1957.
- MICHEL, B. J.; MILLER, S. A. Power requirements of gas-liquid agitated systems. **AIChE Journal**, v. 8, n. 2, p. 262–266, 1962.
- MIYAKE, T. *et al.* Analysis of Pigment Compositions in Various *Monascus* Cultures. **Food Science and Technology Research**, v. 14, n. 2, p. 194–197, 2008.
- MOHAMED, M. S. *et al.* Enhancement of Red Pigment Production by *Monascus purpureus* FTC 5391 through Retrofitting of Helical Ribbon Impeller in Stirred-Tank Fermenter. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 1, p. 80–91, 2012.
- MORAES, Rodrigo de O. *et al.* Fermentação em estado sólido. In: SCHMIDELL, Willibaldo (org.). **Coleção Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica (Volume 2)**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2021. p. 519–543.
- MORALES-OYERVIDES, L. *et al.* Effect of heat exposure on the colour intensity of red pigments produced by *Penicillium purpurogenum* GH2. **Journal of Food Engineering**, v. 164, p. 21–29, 2015.
- MORALES-OYERVIDES, L. *et al.* Biotechnological approaches for the production of natural colorants by *Talaromyces/Penicillium*: A review. **Biotechnology Advances**, v. 43, n. February, 2020a.
- MORALES-OYERVIDES, L. *et al.* Medium design from corncob hydrolyzate for pigment production by *Talaromyces atrovirens* GH2: Kinetics modeling and pigments characterization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, 2020b.
- MUSAALBAKRI, A. M. *et al.* Aeration and agitation strategies for the improvement of red pigment production by *Monascus purpureus* FTC 5391. **Journal of Tropical Agriculture and Food Science**, v. 34, n. 1, p. 89–102, 2006.
- NIELSEN, J. Modelling the morphology of filamentous microorganisms. **Trends in Biotechnology**, v. 14, n. 11, p. 438–443, 1996.
- NIELSEN, K. F.; SMEDSGAARD, J. Fungal metabolite screening: Database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV-mass spectrometry methodology. **Journal of Chromatography A**, v. 1002, n. 1–2, p. 111–136, 2003.
- OGBONNA, C. N. Production of food colourants by filamentous fungi. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 26, p. 960–971, 2016.

- OWEN, N. L.; HUNDLEY, N. Endophytes – the chemical synthesizers inside plants. **Science progress**, v. 87, n. 2, p. 79–99, 2004.
- PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 3, p. 189–259, 2004.
- PEBERDY, J. F. **Penicillium and Acremonium**. Springer Science & Business Media, LLC, 1987.
- PEREIRA, D. G.; TONSO, A.; KILIKIAN, B. V. Effect of dissolved oxygen concentration on red pigment and citrinin production by *Monascus purpureus* ATCC 36928. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, n. 2, p. 247–253, 2008.
- PEREIRA, M. L.; BAPTISTA-NETO, A. DE. Extração e purificação de pigmento produzido pelo fungo *Talaromyces* complexo *minioluteus*. Relatório de Iniciação Científica FAPESP, 2017.
- PÉREZ, J. A. S. *et al.* Shear rate in stirred tank and bubble column bioreactors. **Chemical Engineering Journal**, v. 124, n. 1–3, p. 1–5, 2006.
- PETRINI, Orlando. Fungal Endophytes of Tree Leaves. *In*: ANDREWS, John H.; HIRANO, Susan S. (org.). **Microbial Ecology of Leaves**. 1. ed. [s.l.] New York: Springer-Verlag, 1991. p. 179–197.
- PITT, J. *et al.* The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. 1979.
- PIZA, A.; HOKKA, C.; SOUSA, C. Endophytic Actinomycetes from *Miconia albicans* (Sw.) Triana (*Melastomataceae*) and Evaluation of Its Antimicrobial Activity. **Journal of Scientific Research and Reports**, v. 4, p. 281–291, 2015.
- POLLARD, D. J. *et al.* Scale up of a viscous fungal fermentation: application of scale-up criteria with regime analysis and operating boundary conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 307–317, 2007.
- POORNIAMMAL, R. *et al.* Safety evaluation of fungal pigments for food applications. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 9, p. 1–15, 2021.
- PUTHLI, M. S.; RATHOD, V. K.; PANDIT, A. B. Gas-liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 1, p. 25–30, 2005.
- QUINTANILLA, D. *et al.* Fungal Morphology in Industrial Enzyme Production—Modelling and Monitoring. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 149, p. 29–54, 2015.
- RAO, M. P. N.; XIAO, M.; LI, W.J. Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–13, 2017.
- REYES, L. F.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Degradation kinetics and colour of anthocyanins in aqueous extracts of purple- and red-flesh potatoes (*Solanum tuberosum* L.). **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 885–894, 2007.

REYNDERS, M. B.; RAWLINGS, D. E.; HARRISON, S. T. L. Studies on the growth, modelling and pigment production by the yeast *Phaffia rhodozyma* during fed-batch cultivation. **Biotechnology letters**, v. 18, n. 6, p. 649–654, 1996.

ROMANO, Luis Henrique. **Bioprospeção de Microrganismos Endofíticos Isolados de *Tabebuia spp.* e *Hymenaea courbaril* e Identificação da Produção de Metabólitos de Interesse Biotecnológico**. 2015. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

SANTERRE, A. L.; QUEINNEC, I.; BLANC, P. J. A fedbatch strategy for optimal red pigment production by *Monascus ruber*. **Bioprocess Engineering**, v. 13, n. 5, p. 245–250, 1995.

SANTOS-EBINUMA, V. C. et al. Improving of red colorants production by a new *Penicillium purpurogenum* strain in submerged culture and the effect of different parameters in their stability. **Biotechnology Progress**, v. 29, n. 3, p. 778–785, 2013.

SARAVANAN, A. et al. Production of pigment using *Aspergillus tamaritii*: New potentials for synthesizing natural metabolites. **Environmental Technology and Innovation**, v. 19, p. 100967, 2020.

SCOTTER, Michael. J. **Colour Additives for Foods and Beverages**. 1. ed. Elsevier, 2015.

SEN, T.; BARROW, C. J.; DESHMUKH, S. K. Microbial pigments in the food industry—challenges and the way forward. **Frontiers in Nutrition**, v. 6, p. 1–14, 2019.

SERRANO-CARREÓN, L. et al. Hydrodynamics, fungal physiology, and morphology. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 149, p. 55–90, 2015.

SHAMLOU, P. A. et al. Turbulent breakage of filamentous microorganisms in submerged culture in mechanically stirred bioreactors. **Chemical Engineering Science**, v. 49, n. 16, p. 2621–2631, 1994.

SHULER, M. L.; KARGI, F.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall, 1992.

SILBIR, S.; GOKSUNGUR, Y. Natural red pigment production by *Monascus purpureus* in submerged fermentation systems using a food industry waste: Brewer's spent grain. **Foods**, v. 8, n. 5, 2019.

SINGH, N. et al. Modeling the red pigment production by *Monascus purpureus* MTCC 369 by Artificial Neural Network using rice water based medium. **Food Bioscience**, v. 11, p. 17–22, 2015.

SIPAHLI, S.; MOHANLALL, V.; MELLEEM, J. J. Stability and degradation kinetics of crude anthocyanin extracts from *H. sabdariffa*. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 209–215, 2017.

SKOOG, Douglas et al, **Fundamentos de Química Analítica**. 1. ed. [s.l.]. Editora Cengage, 2006.

SOUSA, Cristina. P. DE; SERRANO, Nadja. F. G.; LACAVA, Paulo. T. Endophytic Microorganisms of the Tropical Savannah: A Promising Source of Bioactive Molecules. *In*:

- AZEVEDO, João. L. DE; QUECINE, Maria. C. (org.). **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. 1. ed. [s.l.] Springer International Publishing, 2017. p. 57–70.
- SOUSA, Marina Del Bianco. **Estudo da Produção de Pigmento por Linhagem Endofítica de *Talaromyces minioluteus*/ *Penicillium minioluteum* em Diferentes Temperaturas**. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2018.
- SPEARS, K. Developments in food colourings: the natural alternatives. **Trends in Biotechnology**, v. 6, n. 11, p. 283–288, 1988.
- STANBURY, Peter. F.; WHITAKER, Allan.; HALL, Stephen. J. Aeration and agitation. In: ___. (org.) **Principles of Fermentation Technology**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Science, 2017. p. 537–618.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural product. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 491–502, 2003.
- SUDHA; GUPTA, C.; AGGARWAL, S. Optimization and extraction of extra and intracellular color from *Penicillium minioluteum* for application on protein fibers. **Fibers and Polymers**, v. 18, n. 4, p. 741–748, 2017.
- SUWANNARACH, N. *et al.* Optimization and characterization of red pigment production from an endophytic fungus, *Nigrospora aurantiaca* CMU-ZY2045, and its potential source of natural dye for use in textile dyeing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 17, p. 6973–6987, 2019.
- TANG, H.-Y. *et al.* Miniolins A–C, novel isomeric furanones induced by epigenetic manipulation of *Penicillium minioluteum*. **RSC Advances**, v. 5, n. 3, p. 2185–2190, 2015.
- TAVAKKOL-AFSHARI, J.; BROOK, A.; MOUSAVI, S. H. Study of cytotoxic and apoptogenic properties of saffron extract in human cancer cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 11, p. 3443–3447, 2008.
- TEIXEIRA, M. F. *et al.* Amazonian Biodiversity: Pigments from *Aspergillus* and *Penicillium*-Characterizations, Antibacterial Activities and their Toxicities. **Current Trends in Biotechnology & Pharmacy**, v. 6, n. 3, 2012.
- TEODORO, J. C. *et al.* Influence of feeding conditions on clavulanic acid production in fed-batch cultivation with medium containing glycerol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 3, p. 450–455, 2006.
- TONSO, Aldo; BADINO, Alberto C.; SCHMIDELL, Willibaldo. Tipos de biorreatores e formas de operação. In: SCHMIDELL, Willibaldo (org.). **Coleção Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica (Volume 2)**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2021. p. 109–126.
- TORRES, F. A. E. *et al.* Natural colorants from filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2511–2521, 2016.

- TSANG, C. C. *et al.* Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era – Past, present and future. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 16, p. 197–210, 2018.
- VAN TIEGHEM, M. P. *Monascus*, genre nouveau de l'ordre des Ascomycetes. **Bulletin de la Société Botanique de France**, v. 31, n. 5, p. 226–231, 1884.
- VELOSO, Ivan Ilich Kerbauy. **Modelagem e otimização da fermentação alcoólica em batelada alimentada a baixa temperatura**. 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.
- VENDRUSCOLO, F. *et al.* Antimicrobial activity of *Monascus* pigments produced in submerged fermentation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, n. 4, p. 1860–1865, 2013a.
- 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, 2013b.
- VENDRUSCOLO, F. *et al.* Kinetic of orange pigment production from *Monascus ruber* on submerged fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 1, p. 115–121, 2017.
- VENIL, C. K. *et al.* Fungal pigments: Potential coloring compounds for wide ranging applications in textile dyeing. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 2, 2020.
- VENKATACHALAM, M. *et al.* Production of pigments from the tropical marine-derived fungi *Talaromyces albobiverticillius*: New resources for natural red-colored metabolites. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 70, p. 35–48, 2018.
- VENKATACHALAM, M. *et al.* Statistical optimization of the physico-chemical parameters for pigment production in submerged fermentation of *Talaromyces albobiverticillius* 30548. **Microorganisms**, v. 8, n. 5, 2020.
- VISAGIE, C. M. *et al.* Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. **Studies in Mycology**, v. 78, n. 2000, p. 343–371, 2014.
- WONG, H. C.; LIN, Y. C.; KOEHLER, P. E. Regulation of Growth and Pigmentation of *Monascus purpureus* by carbon and nitrogen concentrations. **Mycologia**, v. 73, n. 4, p. 649–654, 1981.
- YANG, S. Z. *et al.* Improving mycelial morphology and adherent growth as well as metabolism of *Monascus* yellow pigments using nitrate resources. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 22, p. 9607–9617, 2020.
- YILMAZ, N. *et al.* Polyphasic taxonomy of the genus *Talaromyces*. **Studies in Mycology**, v. 78, n. 1, p. 175–341, 2014.
- ZHOU, B.; TIAN, Y.; ZHONG, H. Application of a two-stage agitation speed control strategy to enhance yellow pigments production by *Monascus anka* mutant. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 8, n. 6, p. 1260–1264, 2019.