

Avaliação do processo de liofilização na estabilidade dos pigmentos produzidos por *Monascus purpureus* CCT 3802

Evaluation of the lyophilization process on the stability of pigments produced by *Monascus purpureus* CCT 3802

Evaluación del proceso de liofilización sobre la estabilidad de pigmentos producidos por *Monascus purpureus* CCT 3802

Recebido: 01/12/2022 | Revisado: 16/12/2022 | Aceitado: 17/12/2022 | Publicado: 21/12/2022

José Renato da Silva

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

Thayná Torres da Silva

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

Alana Emilia Soares de França Queiroz

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

Keila Aparecida Moreira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7715-9285>
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, Brasil
E-mail: keila.moreira@ufape.edu.br

Daniele Silva Ribeiro

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

Resumo

Os pigmentos *Monascus*, além de possuírem cores atrativas, possuem alto poder corante, entretanto, podem ser instáveis em temperaturas elevadas e pH extremos. Nesse contexto, alguns métodos alternativos vêm surgindo para favorecer sua estabilidade, como a liofilização. Este estudo buscou avaliar o efeito da liofilização na estabilidade frente à temperatura (50 a 90 °C) e pH (3 a 8) dos pigmentos de *Monascus purpureus* CCT 3802 produzidos por fermentação submersa. A estabilidade térmica se baseou na determinação da constante de degradação térmica (K_d), tempo de meia vida ($t_{1/2}$), energia de ativação (E_a), valor de redução decimal (D), Valor Z e a análise termodinâmica que foram calculados antes e após a liofilização. O extrato bruto apresentou um valor de $K_d = 0,232 \text{ h}^{-1}$, $t_{1/2} = 3,0 \text{ h}$ e valor D = 9,93 h a 90 °C e valor Z = 31,25 h. Entretanto, o extrato liofilizado apresentou $K_d = 0,167 \text{ h}^{-1}$, $t_{1/2} = 4,2 \text{ h}$ e valor D = 13,84 h a 90 °C e valor Z = 58,82 h, demonstrando maior estabilidade deste extrato à altas temperaturas. Os resultados obtidos em relação à estabilidade ao pH demonstraram que a liofilização apresentou menor degradação dos pigmentos, com percentual de pigmentos variando de 100 a 96% em 60 min. Portanto, a tecnologia de secagem por liofilização se mostrou uma excelente alternativa para aprimorar a estabilidade dos pigmentos sintetizados por *Monascus purpureus* CCT 3802.

Palavras-chave: Estabilidade; Secagem; Pigmentos *Monascus*.

Abstract

Monascus pigments, in addition to having attractive colors, have high coloring power, however, they are unstable at high temperatures and extreme pH. In this context, some alternative methods have been emerging to favor its stability, such as freeze drying. This study evaluated the effect of lyophilization on the stability against temperature (50 to 90 °C) and pH (3 to 8) of *Monascus purpureus* CCT 3802 pigments produced by submerged fermentation. Thermal stability was based on the determination of the thermal degradation constant (K_d), half-life ($t_{1/2}$), activation energy (E_a), decimal reduction value (D), Z value and the thermodynamic analysis that were calculated before and after lyophilization. The crude extract showed a value of $K_d = 0.232 \text{ h}^{-1}$, $t_{1/2} = 3.0 \text{ h}$ and D value = 9.93 h at 90 °C and Z value = 31.25 h. However, the lyophilized extract showed $K_d = 0.167 \text{ h}^{-1}$, $t_{1/2} = 4.2 \text{ h}$ and D value = 13.84 h at 90 °C and Z value = 58.82 h, demonstrating greater stability of this extract at high temperatures. The results obtained in relation to pH stability demonstrated that lyophilization showed less pigment degradation, with the percentage of pigments varying from 100

to 96% in 60 min. Therefore, freeze drying technology proved to be an excellent alternative to improve the stability of the pigments synthesized by *Monascus purpureus* CCT 3802.

Keywords: Stability; Drying; *Monascus* pigments.

Resumen

Los pigmentos de *Monascus*, además de tener colores atractivos, tienen un alto poder colorante, sin embargo, son inestables a altas temperaturas y pH extremos. En este contexto, han ido surgiendo algunos métodos alternativos para favorecer su estabilidad, como la liofilización. Este estudio buscó evaluar el efecto de la liofilización sobre la estabilidad frente a la temperatura (50 a 90 °C) y pH (3 a 8) de pigmentos *Monascus purpureus* CCT 3802 producidos por fermentación sumergida. La estabilidad térmica se basó en la determinación de la constante de degradación térmica (Kd), la vida media ($t_{1/2}$), la energía de activación (Ea), el valor de reducción decimal (D), el valor Z y el análisis termodinámico que se calcularon antes y después. liofilización. El extracto crudo mostró un valor de $K_d = 0.232 \text{ h}^{-1}$, $t_{1/2} = 3.0 \text{ h}$ y valor $D = 9.93 \text{ h}$ a 90 °C y valor $Z = 31.25 \text{ h}$. Sin embargo, el extracto liofilizado mostró $K_d = 0.167 \text{ h}^{-1}$, $t_{1/2} = 4.2 \text{ h}$ y valor $D = 13.84 \text{ h}$ a 90 °C y valor $Z = 58.82 \text{ h}$, demostrando mayor estabilidad de este extracto a altas temperaturas. Los resultados obtenidos en relación a la estabilidad del pH demostraron que la liofilización mostró una menor degradación del pigmento, variando el porcentaje de pigmentos del 100 al 96% en 60 min. Por tanto, la tecnología de liofilización demostró ser una excelente alternativa para mejorar la estabilidad de los pigmentos sintetizados por *Monascus purpureus* CCT 3802.

Palabras clave: Estabilidad; El secado; Pigmentos *Monascus*.

1. Introdução

Os pigmentos de origem natural são compostos que apresentam várias colorações e podem apresentar capacidade antioxidante, sendo as principais fontes os insetos, as plantas e os microrganismos, com os últimos se destacando cada vez mais dos demais, pois podem ser produzidos sob diferentes condições físico-químicas, a partir do controle de variáveis e meios utilizados, tornando-se ênfase nos estudos de pesquisa e desenvolvimento científico, além de apresentar um maior rendimento em sua produção (Agboyibor *et al.*, 2018, 2019). Com isso, alguns gêneros de bactérias, algas e fungos, capazes de produzir biopigmentos, tem ganhado uma maior atenção devido à sua estabilidade, segurança e possibilidade de produção utilizando como substrato subprodutos de baixo custo (Panesar *et al.*, 2015; Nnolim *et al.*, 2020).

Neste contexto, o fungo filamentosso *Monascus* apresenta-se como alternativa, em virtude de seus benefícios à saúde e do alto poder corante, sendo muito utilizado em países Asiáticos como ingrediente alimentar (Wang *et al.*, 2016). As principais espécies deste gênero capazes de produzir pigmentos referem-se à *M. purpureus*, *M. ruber* e *M. pilosus*. Estas espécies são conhecidas por produzirem pigmentos laranja, amarelo e vermelho. Os pigmentos vermelhos destacam-se, devido à aplicação em alimentos, ao maior valor comercial, apresentando dessa forma maior interesse biotecnológico (Ali *et al.*, 2021; Lv *et al.*, 2017; Yuliana *et al.*, 2017).

O gênero *Monascus* tem a capacidade de metabolizar resíduos agroindustriais e utilizá-lo como substrato para produção de pigmentos, tornando-se uma alternativa interessante, em virtude da redução de custos de produção e danos ambientais (Pineda-Insuasti *et al.*, 2016). Neste panorama, o farelo de mandioca, apresenta rica composição nutricional em fibras, amido e proteínas, tornando-se, portanto, uma fonte de carbono ideal para que o microrganismo seja capaz de sintetizar os pigmentos naturais (Silva *et al.*, 2018). No entanto, a depender da cepa de *Monascus* utilizada e condições de fermentação, os pigmentos produzidos podem ser considerados instáveis quando submetidos à altas temperaturas e pH extremos. Com isso, o conhecimento acerca da estabilidade dos pigmentos frente às variáveis mencionadas torna-se interessante, uma vez que promoverá o direcionamento de uma aplicação adequada e viável nos processamentos de alimentos, nas condições de estabilidades conhecidas, tendo em vista que os pigmentos naturais são mais susceptíveis a perda de cor durante o processo.

Em virtude desta vulnerabilidade, técnicas que possibilitem melhor utilização dos pigmentos na indústria de alimentos têm sido estudadas, com intuito de facilitar a aplicação e incrementar a performance em relação à estabilidade. Neste sentido, secagem por liofilização apresenta-se com uma técnica promissora para aplicação em pigmentos *Monascus*, com o objetivo de facilitar sua aplicação, transporte e armazenamento, de forma a concentrar os compostos que constituem o extrato fúngico,

aprimorando suas atividades corantes e antioxidantes. Ademais, a liofilização é um processo apropriado e recomendado para produtos sensíveis ao calor, onde se pretende preservar as características originais do material (Yamaguchi et al., 2017). Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito do processo de secagem por liofilização na estabilidade térmica e ao pH dos pigmentos vermelhos sintetizados por *Monascus purpureus* CCT 3802 obtidos por fermentação submersa, empregando resíduo de mandioca como substrato.

2. Metodologia

2.1 Micro-organismo

A cepa *Monascus purpureus* CCT 3802 foi obtida da Fundação André Tosello de Pesquisa e Tecnologia. A cultura estoque foi mantida em tubos inclinados contendo meio estéril BDA (Batata Dextrose Ágar) a 4 °C e repicada periodicamente. A manutenção do isolado foi realizada em Erlenmeyer de 125 mL contendo BDA, esterilizados a 121 °C/15 min, em que uma alçada do fungo foi transferida para os tubos e incubados por 10 dias a 30 °C.

2.2 Materiais e Processo fermentativo

As cascas de mandioca, utilizadas como substrato fermentativo, foram adquiridas em casas de farinhas da região de Lajedo-PE e encaminhadas ao Centro Laboratorial de Apoio à Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns (CENLAG/UFPE), onde o material foi devidamente higienizado com água corrente e submetido à secagem em estufa a 70 °C por 6 horas e, posteriormente, as cascas foram trituradas em processador doméstico. O glutamato monossódico, utilizado como fonte externa de nitrogênio no meio fermentativo, foi obtido em supermercado da região de Garanhuns-PE. O processo de fermentação ocorreu em frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de água destilada, foi composto por farelo de mandioca (90 g.L⁻¹) e glutamato monossódico (25 g.L⁻¹). Tais condições experimentais foram otimizadas em estudos anteriores. Os esporos foram suspensos em 15 mL de solução estéril de Tween 80 (0,3%), sob agitação magnética. Em seguida cerca de 10⁶ esporos.mL⁻¹ foram coletados e transferidos aos frascos contendo o meio fermentativo previamente submetido a tratamento térmico a 121 °C por 15 minutos para esterilização e incubados em incubadora com agitação orbital refrigerada (Modelo TE-422, Tecnal®) durante 7 dias, a 30 °C por 160 rpm, na ausência de luz.

2.3 Quantificação dos pigmentos extracelulares e determinação do pH

Ao final do processo fermentativo, o meio fermentado foi filtrado sob vácuo utilizando papel filtro quantitativo. O sobrenadante foi centrifugado a 4.500 x g por 20 min, em seguida, aferido o pH final e avaliada a quantificação dos pigmentos. A produção dos pigmentos extracelulares foi expressa em Unidade de Absorbância (UA) utilizando espectrofotômetro (Libra S6, Biochrom®) no comprimento de onda de 510 nm (vermelho).

2.4 Extração, concentração e liofilização dos pigmentos extracelulares

Após a quantificação dos pigmentos vermelhos extracelulares, um volume conhecido do extrato de *Monascus* foi destinado para extração alcoólica, em que 100 mL do caldo fermentativo foram colocados em Erlenmeyer de 500 mL e adicionados 100 mL de etanol a 95%, seguido de agitação em incubadora com agitação orbital a 180 rpm e 30 °C, com ausência de luz por 1h. Em seguida, as soluções foram centrifugadas e filtradas. O extrato alcoólico de pigmentos foi conduzido a um evaporador rotativo (SL-126, Solab®), onde foi concentrado e em seguida liofilizado (LD 500, Terroni®), obtendo o extrato liofilizado utilizado nas análises posteriores (Jung et al., 2011).

2.5 Reconstituição do pigmento em pó liofilizado

A reconstituição do pó liofilizado de pigmentos *Monascus* foi realizada em água destilada, e foi determinada mantendo-se a proporção de sólidos presentes no extrato bruto líquido, se baseando na análise de sólidos totais do extrato de pigmento bruto (Bezerra et al., 2015). Para tanto, 5 mL do extrato bruto de pigmentos foram previamente evaporados em banho-maria a 100 °C, seguido de secagem em estufa a 100 °C por 30 min. A quantidade de sólidos presente na amostra foi determinado por gravimetria, levando em consideração a massa do extrato obtida após a secagem e o volume da amostra antes do processo.

2.6 Parâmetros de cor

Os parâmetros de cor do extrato bruto e do extrato liofilizado reconstituído foram determinados empregando um colorímetro portátil manual (Konica MINOLTA CR-10®). Foram determinadas as coordenadas L^* (luminosidade), a^* (coordenada vermelho/verde) e b^* (coordenada amarelo/azul) e a partir destas o índice de saturação ou *croma* (C^*) e a tonalidade angular *hue* (H°), de acordo com as Equações 1 e 2:

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (1)$$

$$H^\circ = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (2)$$

2.7 Estudo da estabilidade dos pigmentos *Monascus*

2.7.1 Estabilidade à temperatura

A estabilidade térmica dos pigmentos vermelhos foi determinada após a padronização da concentração dos extratos para 1UA₅₁₀. Assim, 2 mL dos extratos a 1UA₅₁₀, foram aquecidos em banhos termostatizados na faixa de 50 a 90 °C, e a cada intervalo de tempo pré-determinado, alíquotas submetidas a leitura em espectrofotômetro a 510 nm e calculada constante de degradação térmica (K_d), o tempo de meia vida ($t_{1/2}$), a energia de ativação (E_a), valor de redução decimal (D), o Valor Z e a análise termodinâmica.

A constante de degradação térmica (K_d) dos extratos bruto e liofilizado reconstituído foi determinada por meio de um modelo cinético de primeira ordem (Equação 3), linearizada aplicando as condições de contorno: $A=A_0$, quando $t=0$ e $A=A$, resultando nas Equações 3 e 4.

$$\frac{dA}{dt} = -K_d \cdot t \quad (3)$$

$$\ln\left(\frac{A}{A_0}\right) = -K_d \quad (4)$$

Em que A representou a absorvância (UA₅₁₀), A_0 a absorvância inicial (UA₅₁₀), t o tempo em horas e K_d a constante de degradação térmica (h^{-1}). O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para cada condição estudada foi calculado com base nos valores de K_d , onde A/A_0 é igual a 2, de acordo com a Equação 5.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_d} \quad (5)$$

A energia de ativação dos extratos bruto e do liofilizado reconstituído foi determinada pelo modelo de *Arrhenius*, segundo a Equação 6, que foi linearizada obtendo a Equação 7.

$$K_d = K_o \cdot e^{\frac{-E_a}{R \cdot T_e}} \quad (6)$$

$$\ln K_d = \frac{-E_a}{R} \left(\frac{1}{T} \right) + \ln K_o \quad (7)$$

Onde E_a é a energia de ativação (Kcal mol^{-1}), K_o é o fator pré-exponencial (h^{-1}), R é a constante universal dos gases ($1,987 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$) e T_e é a temperatura (K). O valor de redução decimal e o valor Z, foi determinado, de acordo com a Equação 8 e 9 (Mercali et al., 2013; Peron, Fraga & Antelo, 2017).

$$D = \frac{\ln(10)}{K_d} \quad (8)$$

$$\log D = \frac{1}{Z} \cdot T + B \quad (9)$$

Em que D representa o valor da redução decimal e K_d a constante de degradação térmica (h^{-1}), T a temperatura em Celsius ($^{\circ}\text{C}$) e B o coeficiente linear fornecido pelo gráfico gerado por meio da regressão linear.

Os parâmetros termodinâmicos dos extratos bruto e liofilizado reconstituído se basearam na entalpia (ΔH), energia livre de Gibbs (ΔG) e a entropia (ΔS), de acordo com as Equações 10, 11 e 12 (Rosa, Antelo & Rosa, 2018).

$$\Delta H = E_a - R \cdot T \quad (10)$$

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln \left(\frac{K_d \cdot H}{K_b \cdot T} \right) \quad (11)$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad (12)$$

Em que R representou a constante dos gases ideais ($R=8,314 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$), K_b ($1,3806 \times 10^{-23} \text{ J/K}$) a constante de Boltzmann e H a Constante de Plank ($6,6262 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$).

2.7.2 Estabilidade ao pH

O efeito da variação do pH na estabilidade dos extratos bruto e liofilizado reconstituído de *M. purpureus* CCT 3802 foi avaliado em uma ampla faixa de pH (3 a 8) (Selim et al., 2008). Foram preparadas soluções tampão de McIlvaine com valor de pH desejado (3 a 8), assim, 1 mL dos extratos de pigmentos (bruto e liofilizado reconstituído) foram submetidos a 10 mL das soluções preparadas, sendo a cada intervalo de 15 min retiradas alíquotas da mistura e realizada a leitura das absorbâncias em UA_{510} , tendo como tempo total pré-determinado de 60 min, com o intuito de verificar o comportamento dos extratos submetidos

aos variados valores de pH ao longo do tempo. O cálculo do percentual de pigmentos foi realizado levando em consideração a absorvância inicial (tempo 0) de 100% e a absorvância final para cada intervalo de tempo avaliado, conforme Equação 13.

$$\text{Percentual de pigmentos (\%)} = (A_t \times 100) / A_{\text{inicial}} \quad (13)$$

Onde A_t representou a absorvância final para cada tempo estudado e A_{inicial} a absorvância no início do experimento.

2.8 Análise estatística

Os parâmetros analisados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação de médias através do teste de Tukey, ao nível de significância de 5%, por meio do *software* estatístico Minitab® 18.0 (Statistic Software).

3. Resultados e Discussão

3.1 Influência da liofilização na quantificação dos pigmentos vermelhos e parâmetros de cor

Na Tabela 1, observam-se os resultados referentes à quantificação de pigmentos, ao pH final do meio de cultivo e aos parâmetros de cor do extrato bruto e do extrato submetido ao processo de liofilização e reconstituição. A quantificação dos pigmentos vermelhos indicou que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao extrato bruto (16,89 UA₅₁₀) e o extrato submetido à liofilização (17,04 UA₅₁₀), demonstrando que o processo de secagem, como esperado, não alterou a quantidade de pigmentos inicialmente produzida, sendo capaz de preservar o metabólito, devido à utilização de baixas temperaturas.

Por outro lado, ao comparar o pH final do extrato bruto (6,28) e do extrato liofilizado (5,24) dos pigmentos *Monascus*, observa-se que apresentaram diferença significativa. Entretanto, apesar da diferença, estes valores de pH estão dentro da faixa ideal de estabilidade destes metabólitos, que varia de 2 a 10 (Carvalho et al., 2005).

Tabela 1 - Resultado para a quantificação dos pigmentos, pH final e parâmetros de cor do extrato bruto e liofilizado dos pigmentos de *Monascus purpureus* CCT 3802

Análise	Extrato bruto	Extrato liofilizado
UA ₅₁₀	16,89 ± 0,085 ^a	17,04 ± 0,049 ^a
pH	6,28 ± 0,001 ^a	5,24 ± 0,006 ^b
Cor		
L*	10,35 ± 0,07 ^a	8,20 ± 1,56 ^a
a*	32,05 ± 1,63 ^a	32,95 ± 4,30 ^a
b*	15,90 ± 0,85 ^a	15,05 ± 0,07 ^a
H°	26,42 ± 1,08 ^a	24,77 ± 4,79 ^a
C*	35,79 ± 2,38 ^a	36,26 ± 3,63 ^a

*Médias seguidas de mesmo expoente na mesma linha, não diferente estatisticamente a um nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. Fonte: Autores (2022).

Em relação aos parâmetros de cor, o parâmetro L* (luminosidade) indica a capacidade da amostra de refletir luz, portanto, maiores valores para L* apontam cores mais claras, já valores positivos da coordenada a* reflete a tendência da cor da amostra para o vermelho. Diante dos resultados (Tabela 1), verifica-se que não houve diferença estatística ($p < 0,05$) para o valor de L*, bem como para os valores positivos da coordenada a* entre os extratos, com 10,35 e 32,05 para o extrato bruto e para o

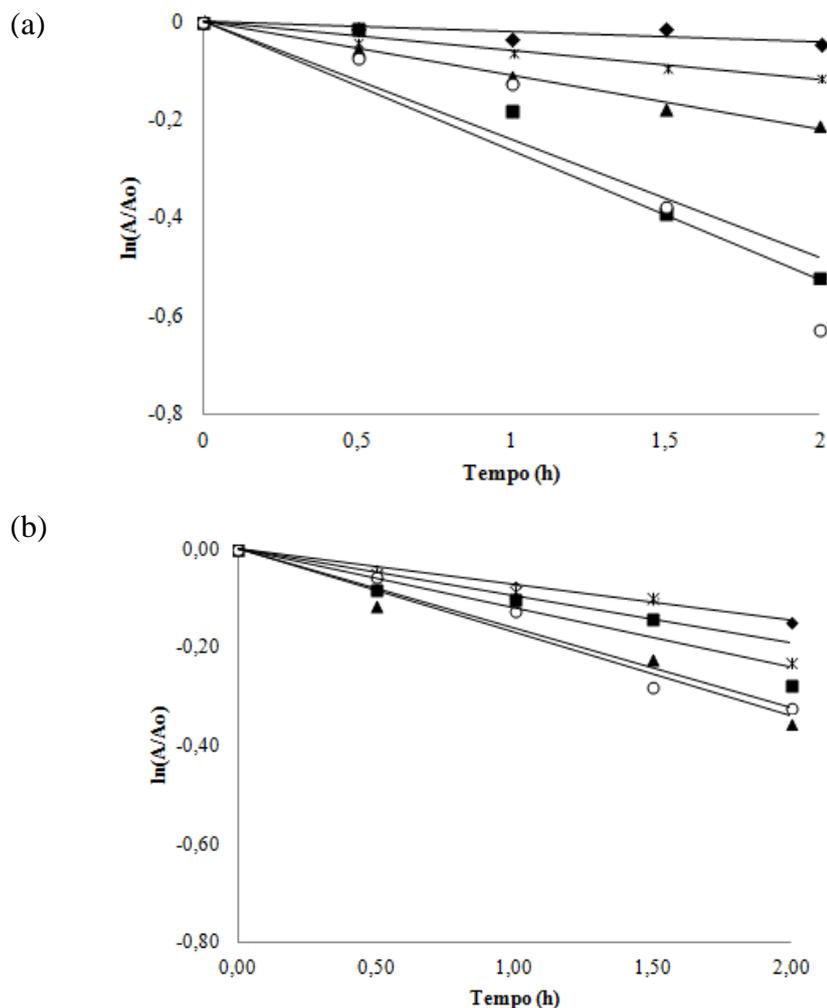
extrato liofilizado 8,20 e 32,95, respectivamente, indicando que ambos os extratos apresentaram tendência a apresentar cores mais claras e para a tonalidade vermelha, e por sua vez, o processo de liofilização preservou a cor dos pigmentos *Monascus*. Os valores para o ângulo tonalidade (H°) do extrato bruto e do extrato submetido à liofilização, não diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,05$) com 26,42 e 24,77, respectivamente, assim como os valores de croma (C^*) com 35,79 e 36,26, respectivamente. Esses valores revelam que as cores dos extratos apresentaram tonalidade vermelha e cores saturadas, reafirmando que o processo de liofilização foi eficaz na conservação dos pigmentos vermelhos sintetizados pelo *M. purpureus* CCT 3802 deste estudo.

3.2 Influência da liofilização na estabilidade térmica dos pigmentos *Monascus*

A compreensão da estabilidade dos pigmentos torna-se um parâmetro importante, tendo em vista que as informações obtidas possibilitam a avaliação do processo de liofilização na estabilidade dos pigmentos, bem como o direcionamento para uma possível aplicação industrial.

Por meio da regressão linear entre o $\ln(A/A_0)$ versus o tempo de tratamento térmico (Figura 1), foi possível determinar as constantes de degradação (K_d), o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e a energia de ativação (Tabela 2) do extrato bruto e do extrato submetido ao processo de secagem por liofilização.

Figura 1 - Degradação térmica dos pigmentos sintetizados por *Monascus purpureus* CCT no (a) extrato bruto e (b) extrato liofilizado sob diferentes temperaturas ($^\circ\text{C}$) (\blacklozenge)50, (\ast)60, (\blacktriangle)70, (\blacksquare)80, (\circ)90



Conforme ilustrado na Figura 1, a temperatura exerceu efeito sob a degradação dos pigmentos, tendo em vista que a taxa de degradação foi mais rápida em maiores temperaturas, levando em consideração o comportamento de $\ln(A/A_0)$ em relação ao tempo de tratamento térmico. Por meio da regressão linear, foi observado que a degradação térmica dos pigmentos vermelhos seguiu um modelo cinético de primeira ordem.

Através da análise dos dados apresentados (Tabela 2), verifica-se que a constante de degradação térmica (K_d) para o extrato bruto variou de 0,028 para 0,261 h^{-1} , refletindo um aumento de aproximadamente 9 vezes. No entanto, para o extrato liofilizado, K_d aumentou de 0,066 para 0,223 h^{-1} , representando um aumento de aproximadamente 3 vezes, revelando que o processo de liofilização proporcionou menor taxa de degradação dos pigmentos *Monascus*, mesmo com o aumento progressivo da temperatura de 50 a 90 °C. Foi observado que a velocidade de degradação tornou-se mais significativa com o aumento de temperatura, provavelmente em virtude do rompimento das ligações ésteres dos pigmentos vermelhos (Vendruscolo et al., 2013). Vale ressaltar que, em relação à temperatura de 80 °C, a constante de degradação térmica não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), quando confrontado o extrato bruto e o extrato submetido à liofilização. Entretanto, na temperatura de 90 °C, nota-se que esta variável foi menor para o extrato liofilizado, refletindo em uma menor taxa de degradação térmica e indicando que a concentração dos pigmentos por liofilização foi eficiente na preservação da estabilidade térmica dos pigmentos nas temperaturas mais altas utilizadas no experimento, enquanto que o extrato bruto apresentou menores valores de K_d para os pigmentos na faixa de 50 a 70 °C.

Tabela 2 - Constante de degradação térmica (K_d), tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e energia de ativação (E_a) do extrato bruto e extrato liofilizado dos pigmentos vermelhos de *Monascus purpureus* CCT 3802 sob diferentes tratamentos térmicos

Parâmetro	Temp. (°C)	Extrato bruto	R ²	Extrato liofilizado	R ²
Kd (h^{-1})	50	0,028 ± 0,000 ^{bD}	0,87	0,066 ± 0,003 ^{aB}	0,93
	60	0,058 ± 0,001 ^{bC}	0,98	0,078 ± 0,001 ^{aB}	0,96
	70	0,118 ± 0,001 ^{bB}	0,99	0,163 ± 0,10 ^{aAB}	0,97
	80	0,261 ± 0,016 ^{aA}	0,94	0,223 ± 0,070 ^{aA}	0,96
	90	0,232 ± 0,006 ^{aA}	0,95	0,167 ± 0,008 ^{bAB}	0,95
$t_{1/2}$ (h)	50	24,8 ± 0,000 ^{aA}	-	10,5 ± 0,45 ^{bA}	-
	60	12,0 ± 0,29 ^{aB}	-	8,9 ± 0,082 ^{bA}	-
	70	5,9 ± 0,070 ^{aC}	-	4,3 ± 0,259 ^{bB}	-
	80	2,7 ± 0,159 ^{aD}	-	3,3 ± 1,031 ^{aB}	-
	90	3,0 ± 0,073 ^{bD}	-	4,2 ± 0,195 ^{aB}	-
E_a (Kcal.mol ⁻¹)	-	16,76	0,99	11,27	0,94

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na mesma linha e maiúscula na mesma coluna, não difere estatisticamente a um nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. Fonte: Autores (2022).

Em seus estudos, Oliveira et al., (2019), avaliaram a estabilidade térmica de pigmentos *Monascus* em cultivo submerso, na faixa de 50 a 90 °C, e verificaram que os pigmentos vermelhos se degradaram mais rapidamente com o aumento da temperatura, onde K_d apresentou um aumento de 10 vezes do seu valor inicial, refletindo em maior taxa de degradação térmica, em comparação com os resultados encontrados nos extratos estudados nesta pesquisa.

Outro parâmetro importante para verificar a estabilidade térmica dos pigmentos é o tempo de meia vida ($t_{1/2}$), que está relacionado ao tempo para que a concentração do metabólito analisado seja reduzida à metade do seu valor inicial para cada temperatura estudada. Em relação a este parâmetro, observa-se que o extrato bruto apresentou maior estabilidade térmica nas temperaturas iniciais (50 a 70 °C), tendo em vista que apresentou maiores valores de $t_{1/2}$, decrescendo de 24,8 em 50 °C para 5,9

h em 70 °C, enquanto o extrato liofilizado apresentou decréscimo de 10,5 para 4,3h, indicando menor estabilidade térmica do extrato liofilizado no intervalo citado. Todavia, semelhante à constante de degradação térmica (K_d), o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) indicou que o extrato submetido ao processo de liofilização apresentou maior estabilidade térmica na temperatura mais alta utilizada (90 °C), apresentando maiores valores ($p < 0,05$), apresentando um tempo de meia vida de 4,2 h. Para a temperatura de 80 °C, não foi observada diferença significativa em ambos os extratos, refletindo que o processo de secagem por liofilização foi capaz de aprimorar o desempenho, em termos de estabilidade térmica dos pigmentos vermelhos nas temperaturas mais altas utilizadas.

Almeida et al. (2021) avaliaram a estabilidade térmica dos pigmentos vermelhos produzidos por *Monascus purpureus* utilizando farelo de milho como substrato e encontraram valores de $K_d = 0,2734 \text{ h}^{-1}$ e $t_{1/2} = 2,5394 \text{ h}$ em 80 °C, em que o tempo de meia-vida foi inversamente proporcional à constante de degradação térmica com aumento da temperatura, demonstrando que os pigmentos degradaram-se com o aumento da temperatura, resultado também encontrado no presente estudo.

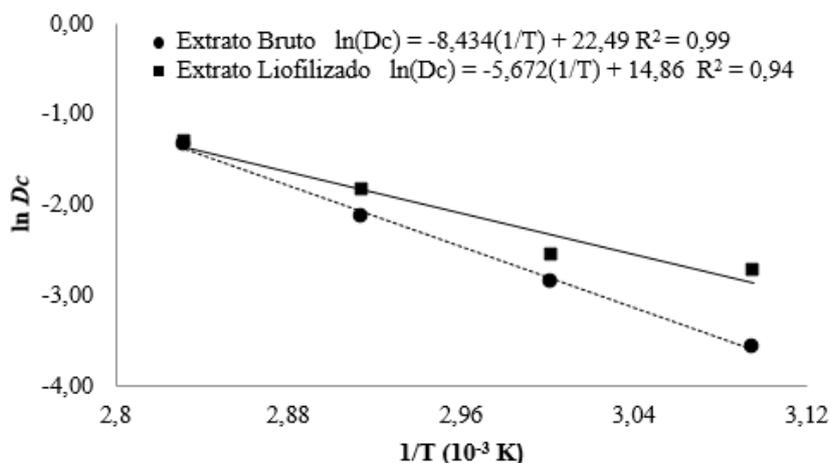
Abdollahi et al., (2021), também avaliaram a estabilidade térmica dos pigmentos produzidos por *Monascus purpureus* ATCC 16362/PTCC em fermentação submersa e verificaram que nas temperaturas mais altas utilizadas no experimento (88 e 97,8 °C), houve maior degradação dos pigmentos. Keivan e Jahadi (2022) estudaram o efeito da luz e da temperatura nos pigmentos sintetizados por *Monascus purpureus* ATCC16362 utilizando farelo de soja, verificaram que os valores da constante de degradação térmica aumentaram de forma proporcional à temperatura e na presença da luz e concluíram que a presença de luz e o aumento da temperatura aceleraram a degradação dos pigmentos vermelhos.

Em comparação com outros pigmentos vermelhos naturais, a exemplo dos de origem vegetal, comumente aplicados em alimentos como as antocianinas e betacianinas, os pigmentos *Monascus* apresentam uma maior estabilidade térmica em função dos valores de K_d e $t_{1/2}$ (Bastos et al., 2015).

Dentro desse contexto, os pigmentos sintetizados por *Monascus purpureus* CCT 3802, podem ser utilizados nas indústrias de alimentos em produtos submetidos a tratamento térmico de pasteurização, por exemplo, seja lenta (62 a 65 °C/30 min) ou rápida (72 a 75 °C/15 seg.), com degradação de cor mínima, ou em tecnologia de processamento não térmico, viabilizando sua utilização nestas condições. No entanto, deve-se avaliar a estabilidade térmica destes metabólitos em temperaturas mais altas, a fim de direcionar uma possível aplicação em alimentos que sejam submetidos a tratamento térmicos acima de 100 °C, como a esterilização.

Por meio das análises dos dados experimentais, foi possível também obter a energia de ativação (E_a), utilizando o modelo de *Arrhenius*, conforme apresentado na Figura 2, com valores de E_a de 16,75 Kcal.mol⁻¹ para o extrato bruto e 11,27 Kcal.mol⁻¹ para o extrato liofilizado. O modelo de *Arrhenius* é a primeira aproximação apropriada para verificar o efeito da temperatura sobre a equação cinética, adequando bem os resultados obtidos sob diferentes temperaturas. A energia de ativação foi calculada ao multiplicar o coeficiente angular ($-E_a/R$) da regressão linear de cada extrato de pigmentos *Monascus*, por 1,987 (constante dos gases ideais em cal.mol⁻¹.K⁻¹). Segundo Oliveira et al., (2019), reações que necessitam de altos valores de energia de ativação são consideradas mais sensíveis à temperatura, ou seja, pequenas variações de temperatura são necessárias para modificar rapidamente a estrutura da molécula. Desta forma, verifica-se que para o extrato bruto, a energia de ativação apresentou-se superior, confirmando uma maior sensibilidade à temperatura dos pigmentos presentes neste extrato.

Figura 2 - Determinação da energia de ativação (Ea) do extrato bruto e liofilizado dos pigmentos vermelhos produzidos por *Monascus purpureus* CCT 3802



Fonte: Autores (2022).

O valor de redução decimal (Valor D) e o valor Z dos extratos bruto e liofilizado dos pigmentos vermelhos produzidos pelo *Monascus purpureus* CCT 3802 encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Parâmetros cinéticos da degradação dos pigmentos de *Monascus purpureus* CCT 3802.

Temp. (°C)	Valor D (h)		Valor Z (°C)			
	Extrato bruto	Extrato Liofilizado	Extrato bruto	R ²	Extrato liofilizado	R ²
50	82,24 ± 0,0 ^{aA}	34,92 ± 1,496 ^{bA}				
60	39,71 ± 0,968 ^{aB}	29,71 ± 0,271 ^{bA}				
70	19,51 ± 0,234 ^{aB}	14,15 ± 0,860 ^{bB}	31,25	0,99	58,82	0,96
80	8,84 ± 0,527 ^{aD}	10,89 ± 3,425 ^{aB}				
90	9,93 ± 0,242 ^{bD}	13,84 ± 0,647 ^{aB}				

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na mesma linha e maiúscula na mesma coluna, não difere estatisticamente a um nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. Fonte: Autores (2022).

O valor D representa o tempo necessário para uma redução de dez vezes da cor inicial em uma dada temperatura, isto é, refere-se à resistência a uma dada temperatura (Heidtmann et al., 2012). Para o extrato bruto, este parâmetro apresentou-se maior ($p < 0,05$) no intervalo de temperatura entre 50 e 70 °C, corroborando que os pigmentos vermelhos foram mais estáveis no intervalo citado. Entretanto, a 80 e 90 °C o valor D apresentou-se maior ($p < 0,05$) para o extrato submetido à liofilização, demonstrando que os pigmentos vermelhos se mostraram mais estáveis a essas temperaturas, sugerindo que o processo de liofilização foi eficaz na preservação da estabilidade à altas temperaturas deste metabólito, tornando a utilização destes pigmentos viáveis em processos que necessitem destas condições em períodos prolongados de tempo.

O valor Z refere-se à variação de temperatura necessária em um sistema para que ocorra uma variação de 10 vezes na velocidade de degradação e reforça as observações acima citadas, visto que para os pigmentos do extrato bruto foi de 31,25 °C, enquanto para o extrato liofilizado de 58,82 °C. Este parâmetro em conjunto com o valor D, é usado para caracterizar a resistência térmica de um metabólito ou microrganismo. Consequentemente, ao passo que o valor Z aumenta, menor será a velocidade de degradação com a variação da temperatura, desta forma, menores valores de Z significam que maior será a sensibilidade do

metabólito à temperatura (Wang et al., 2003). O valor Z foi superior para os pigmentos do extrato liofilizado (58,82 °C), sugerindo que existe a necessidade de uma grande variação na temperatura para afetar a estabilidade térmica dos pigmentos presente neste extrato, constituindo menor sensibilidade à temperatura ao se comparar com o extrato bruto, que por sua vez apresentou um valor de Z de 31,25 °C, comprovando que os pigmentos do extrato liofilizado apresentaram maior resistência à temperatura.

Semelhante a este estudo, Silveira et al. (2013) também avaliaram os parâmetros cinéticos (Valor D e Z) da degradação dos pigmentos vermelhos de *Monascus purpureus* em cultivo submerso utilizando bagaço de cana como substrato e, como resultado, verificaram um valor Z de 50,12 °C e valor D variando de 357,16 a 33,98 h, refletindo que em temperaturas mais altas (60 e 80 °C) a degradação térmica dos pigmentos tornou-se mais acentuada, como ocorrido no presente estudo.

O conhecimento dos parâmetros termodinâmicos no estudo da estabilidade à temperatura de um metabólito torna-se importante, considerando que fornecem informações necessárias para o entendimento do efeito da temperatura na taxa de degradação térmica, bem como das modificações físicas, químicas e bioquímicas ocasionadas no processo (Heidtmann et al., 2012). Com relação a estes parâmetros, o ajuste das taxas de degradação dos pigmentos ao modelo de *Arrhenius*, proporcionou o cálculo da entalpia (ΔH), energia livre de Gibbs (ΔG) e entropia (ΔS) e encontram-se representados na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros termodinâmicos para os pigmentos em diferentes extratos de *Monascus purpureus* CCT 3902 sob diferentes temperaturas

	Temp. (°C)	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	ΔS (J/mol.K)
Extrato bruto	50	67,43	110,97	-134,72
	60	67,35	112,47	-135,43
	70	67,26	113,90	-135,91
	80	67,18	114,97	-135,33
	90	67,10	118,67	-142,01
Extrato liofilizado	50	44,48	108,66	-198,62
	60	44,40	111,66	-201,92
	70	44,31	112,98	-200,11
	80	44,23	115,44	-201,65
	90	44,15	119,67	-207,97

Fonte: Autores (2022).

A entalpia e a energia livre de Gibbs fornecem uma medida do número de ligações não covalentes rompidas, isto é, a barreira que as moléculas devem romper e a medida do equilíbrio e espontaneidade de uma reação, proporcionando informações sobre mudanças no sistema, respectivamente (Peron et al., 2017). Em relação à entalpia, pode-se observar que para o extrato bruto este parâmetro variou entre 67,43 e 67,10 kJ/mol, no entanto, para o extrato liofilizado variou entre 44,48 e 44,15 kJ/mol, e verificado um brando decréscimo com o aumento da temperatura em ambos os extratos. Os valores positivos de ΔH desse presente estudo indicam que o processo de degradação térmica dos pigmentos de ambos os extratos é um processo endotérmico, onde ocorre absorção de calor e a energia térmica absorvida enfraquece as ligações não covalentes dos pigmentos vermelhos (monascorubramina e rubropunctamina), correspondendo com a perda da coloração (Silveira et al., 2013). Todavia, é notório que ocorreram alterações na estabilidade dos pigmentos em ambos os extratos ao passo que a temperatura aumentou, entretanto,

pode-se observar maior estabilidade térmica dos pigmentos do extrato submetido à liofilização nas temperaturas mais altas do intervalo estudado (80 e 90 °C), reforçando os achados comprovados neste estudo.

A energia livre de Gibbs variou entre 118,67 e 110,97 kJ/mol para o extrato bruto e de 119,67 e 108,66 kJ/mol em relação ao extrato de pigmentos liofilizado. Os valores positivos de ΔG , de ambos os extratos, refletem a não espontaneidade da reação de degradação, estabelecendo a necessidade da ação de fatores externos como a temperatura na degradação dos pigmentos e, ainda, maiores valores de ΔG apontam maior resistência à degradação térmica. Com isso, ao comparar os valores de ΔG entre os extratos de pigmentos *Monascus*, nas temperaturas de 80 e 90 °C, observa-se que este parâmetro foi relativamente maior para o extrato liofilizado, constatando-se a maior estabilidade dos pigmentos deste extrato nestas condições.

Em concordância com os princípios termodinâmicos, os valores de ΔH e ΔG deste estudo estabelecem a ocorrência de modificações estruturais dos pigmentos vermelhos com o aumento da temperatura (rompimento das ligações éster) e sugere que as condições da reação de degradação de cor não são favoráveis em altas temperaturas se a reação ocorre de forma espontânea, refletindo a necessidade de agentes externos para a perda da cor, respectivamente (Silveira et al., 2013).

Os resultados obtidos em relação à entropia (ΔS) variaram de -142,01 e -134,72 J/mol.K para o extrato bruto e -207,97 a -198,62 J/mol.K para o extrato liofilizado. A entropia refere-se à medida da desordem das moléculas do sistema, sendo que o valor negativo indica que as moléculas se apresentam mais organizadas quando comparadas com o início da reação. As alterações que ocorrem na entropia indicam a proximidade do sistema para atingir o equilíbrio termodinâmico e tornar-se menos reativo (Silva et al., 2017). Foi verificado no intervalo de temperatura estudado um decréscimo no valor da entropia quando a temperatura é aumentada em ambos os extratos, refletindo no decréscimo na desordem do sistema, reafirmando a não espontaneidade da reação de degradação dos pigmentos *Monascus* ($\Delta S < 0$).

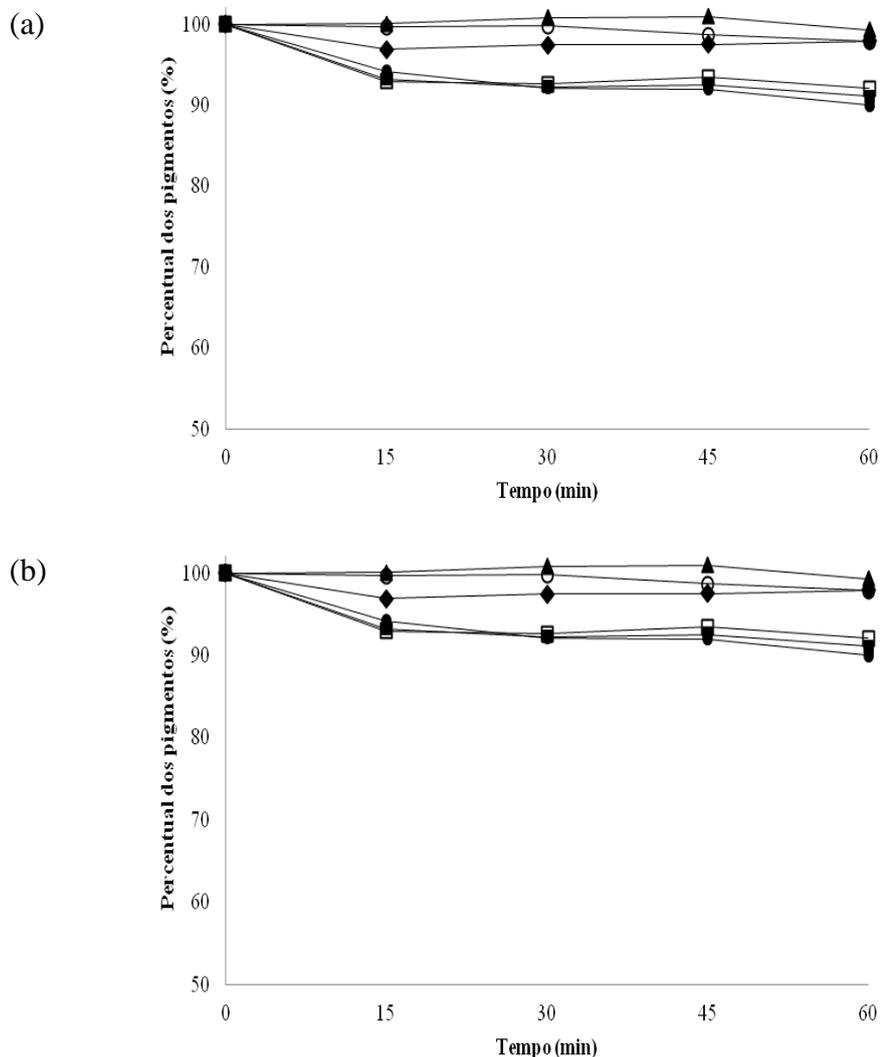
3.3 Influência da liofilização na estabilidade dos pigmentos frente ao pH

A estabilidade ao pH dos extratos de *Monascus purpureus* CCT 3802 foi verificada submetendo o extrato bruto e o liofilizado a diferentes valores de pH (3 a 8) em temperatura ambiente (± 25 °C) por 60 minutos, com retiradas de alíquotas para análises de degradação a cada 15 minutos. O comportamento dos pigmentos vermelhos sob diferentes valores de pH está apresentado na Figura 3, onde pode ser observado que a porcentagem de pigmentos no extrato bruto variou entre 100 e 89,9% no decorrer de 60 min, enquanto para o extrato liofilizado de pigmentos *Monascus*, este parâmetro variou entre 100 e 96,6% no intervalo de tempo citado, refletindo uma maior estabilidade dos metabólitos avaliados em relação ao pH.

Semelhante à estabilidade térmica, o conhecimento da estabilidade ao pH é importante, uma vez que promove informações sobre o comportamento do metabólito em diferentes condições, tendo em vista que os pigmentos apresentam propriedades distintas quando submetidos ao processamento ou até mesmo, fenômenos naturais (Silva et al., 2018).

De acordo com os resultados para a estabilidade ao pH indicaram que os pigmentos de ambos os extratos foram estáveis no intervalo avaliado (3 a 8). No entanto, é notório que o extrato liofilizado apresentou maior estabilidade no decorrer de 60 min, quando comparado ao extrato bruto, indicando que provavelmente o processo de secagem por liofilização não foi capaz de romper as ligações éster dos pigmentos vermelhos, não modificando sua estabilidade ao pH (Teng & Feldheim, 2001), evidenciando que, assim como a estabilidade a temperatura, o processo de secagem por liofilização melhorou a estabilidade ao pH dos pigmentos sintetizados por *Monascus purpureus* CCT 3802 em diferentes valores de pH, apresentando menor taxa de degradabilidade de cor.

Figura 3 - Efeito do pH: (▲) pH 3, (○) pH 4, (■) pH 5, (□) pH 6, (●) pH 7 e (◆) pH 8, no percentual de pigmentos vermelhos em (a) extrato bruto e (b) extrato liofilizado produzidos por *Monascus purpureus* CCT 3802



Fonte: Autores (2022).

Os resultados alcançados neste trabalho, em relação à estabilidade térmica e ao pH dos pigmentos vermelhos de *Monascus purpureus* CCT 3802, denotam que as espécies do gênero são capazes de sintetizar pigmentos estáveis à variadas condições de temperatura e pH. Dessa forma, o processo de secagem por liofilização apresenta-se como uma alternativa viável para manuseio, transporte, facilidade e direcionamento à uma possível aplicação em alimentos, tendo em vista que melhorou a estabilidade nas temperaturas mais altas e aos variados valores de pH estudados.

4. Conclusão

Pode-se concluir que os pigmentos sintetizados por *Monascus purpureus* CCT 3802, por meio dos parâmetros avaliados, apresentaram estabilidade à temperatura na faixa estudada; além disso, o processo de liofilização não alterou a cor dos pigmentos vermelhos, propiciando incremento da estabilidade térmica nas temperaturas mais altas (80 a 90 °C).

Em relação ao pH, os pigmentos *Monascus* dos extratos estudados apresentaram estabilidade na faixa de pH de 3 a 8, com menor perda de pigmentos por degradação no tempo de 60 minutos quando da avaliação do extrato liofilizado, demonstrando que a liofilização não foi capaz de alterar a estabilidade ao pH, nas condições empregadas no estudo.

Deste modo, apesar da carência de estudos que avaliem o efeito do processo de secagem por liofilização nos pigmentos sintetizados pelas espécies de *Monascus*, os resultados nos metabólitos microbianos avaliados neste trabalho foram promissores. Assim, a aplicação da liofilização pode ser uma alternativa viável, facilitando o transporte, manuseio e a aplicação dos pigmentos *Monascus* em processamento de alimentos. No entanto, se faz importante também averiguar a estabilidade térmica do extrato bruto e liofilizado em temperaturas superiores a 90 °C, bem como em matrizes alimentícias e, assim, avaliar a influência da adição dos pigmentos nas características sensoriais e físico-químicas de produtos.

Agradecimentos

À Universidade Federal do Agreste de Pernambuco – (UFAPE) e ao Centro Laboratorial de Apoio à Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns (CENLAG/UFAPE) por possibilitar a realização da pesquisa.

Referências

- Abdollahi, F., Jahadi, M., & Ghavami, M. (2021). Thermal stability of natural pigments produced by *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Food Science & Nutrition*, 9(9), 4855-4862. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2425>
- Agboyibor, C., Kong, W. B., Chen, D., Zhang, A. M., & Niu, S. Q. (2018). *Monascus* pigments production, composition, bioactivity and its application: A review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 433-447. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.09.012>
- Agboyibor, C., Kong, W. B., Zhang, A. M., Niu, S. Q. (2019). Nutrition regulation for the production of *Monascus* red and yellow pigment with submerged fermentation by *Monascus purpureus*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, (21), 1-7, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.10.1276>
- Ali, I., Al-Dalali, S., Hao, J., Ikram, A., Zhang, J., Xu, D., & Cao, Y. (2022). The stabilization of *Monascus* pigment by formation of *Monascus* pigment-sodium caseinate complex. *Food Chemistry*, 384, 132480. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132480>
- Almeida, A. B., Santos, N. H., Lima, T. M., Santana, R. V., Filho, J. G. O., Peres, D. S., & Egea, M. B. (2021). Pigment bioproduction by *Monascus purpureus* using corn bran, a byproduct of the corn industry. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 32, 101931. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.10.1931>
- Bastos, B., Grandini, C., Rodrigues, S., Santos, M. A., Lopes, T., & Antelo, F. (2015). Avaliação da cinética de degradação térmica de betalainas extraídas de Beta Vulgaris L. *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, 1(2), 3916-3923. 10.5151/chemeng-cobeq2014-0765-24116-172169
- Bezerra, D. P., Santana, J. M., Nunes, R. I., de Oliveira, J. B., de Souza, W. W., Santos, P. R. F., & Maciel, O. S. (2015). Análise dos Parâmetros Físicos: Sólidos Totais, Sólidos Sedimentáveis, Sólidos Totais Dissolvidos e Sólidos Suspensos nas Águas do Vale do Açú. *Blucher Chemistry Proceedings*, 3(1), 746-754. 10.5151/chenpro-5erq-am17
- Carvalho, J. C. D., Oishi, B. O., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2005). Biopigments from *Monascus*: strains selection, citrinin production and color stability. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(6), 885-894. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000800004>
- Heidtmann, R. B., Duarte, S. H., Pereira, L. P. D., Braga, A. R. C., & Kalil, S. J. (2012). Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. *Brazilian Journal of Food Technology*, 15(1), 41-49. <https://doi.org/10.1590/S1981-67232012000100005>
- Jung, H., Choe, D., Nam, K. Y., Cho, K. H., & Shin, C. S. (2011). Degradation patterns and stability predictions of the original reds and amino acid derivatives of *Monascus* pigments. *European food research and technology*, 232(4), 621-629. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1427-7>
- Keivani, H., & Jahadi, M. (2022). Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from soybean meals. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 46, 102531. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102531>
- Lv, J., Zhang, B. B., Liu, X. D., Zhang, C., Chen, L., Xu, G. R., & Cheung, P. C. K. (2017). Enhanced production of natural yellow pigments from *Monascus purpureus* by liquid culture: the relationship between fermentation conditions and mycelial morphology. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124(4), 452-458. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.05.010>
- Mercali, G. D., Jaeschke, D. P., Tessaro, I. C., & Marczak, L. D. F. (2013). Degradation kinetics of anthocyanins in acerola pulp: Comparison between ohmic and conventional heat treatment. *Food chemistry*, 136(2), 853-857. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.024>
- Nnolim, N. E., Okoh, A. I., & Nwodo, U. U. (2020). Proteolytic bacteria isolated from agro-waste dumpsites produced keratinolytic enzymes. *Biotechnology Reports*, 27, e00483. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00483>
- Oliveira, C. F. D., Costa, J. P. V., & Vendruscolo, F. (2019). Maltose syrup residue as the substrate for *Monascus* pigments production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101101. 10.1016/j.bcab.2019.10.1101
- Panesar, R., Kaur, S., & Panesar, P. S. (2015). Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. *Current Opinion in Food Science*, 1, 70-76. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2014.12.002>
- Pereda, J. A. O., Rodríguez, M. I. C., Álvarez, L. F., Sanz, M. L. G., Minguillón, G. D. G. F., Perales, L. H., Cortecero, M. D. S. (2005). *Tecnología de Alimentos: Componentes dos Alimentos e Processos*. Porto Alegre: Artmed.

- Peron, D. V., Fraga, S., & Antelo, F. (2017). Thermal degradation kinetics of anthocyanins extracted from juçara (*Euterpe edulis* Martius) and “Italia” grapes (*Vitis vinifera* L.), and the effect of heating on the antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 232, 836-840. [10.1016/j.foodchem.2017.04.088](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.088)
- Pineda-Insuasti, J. A., Duarte-Trujillo, A. S., Ayala-Pastaz, K. B., Soto-Arroyave, C. P., & Pineda-Soto, C. A. (2016). Produção de metabólitos por *Monascus* spp.: Uma revisão. *ICIDCA. Sobre os derivados da cana-de-açúcar*, 50 (2), 43-52.
- Priatni, S. (2015). Encapsulation and Stability Study of *Monascus* Fermented Rice Extract. *Procedia Chemistry*, 17, 189-193. <https://doi.org/10.1016/j.proche.2015.12.118>
- Reis, R. C., Viana, E. D. S., Jesus, J. L., Lima, L. F., Neves, T. T. D., & Conceição, E. A. D. (2015). Compostos bioativos e atividade antioxidante de variedades melhoradas de mamão. *Ciência Rural*, 45(11), 2076-2081. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140776>
- Rosa, C. H., Antelo, F., & Rosa, G. R. (2018). Kinetics of thermal-degradation of betanins: A teaching mini-project for undergraduates employing the red beet. *Journal of Food Science Education*, 17(4), 104-110. <https://doi.org/10.1111/1541-4329.12147>
- Selim, K. A., Khalil, K. E., Abdel-Bary, M. S., & Abdel-Azeim, N. A. (2008). Extraction, encapsulation and utilization of red pigments from roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) as natural food colourants. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 7-20. [10.21608/ajfs.2008.19642](https://doi.org/10.21608/ajfs.2008.19642)
- Silva, N. L., Crispim, J. M., & Vieira, R. P. (2017). Kinetic and thermodynamic analysis of anthocyanin thermal degradation in acerola (*Malpighia emarginata* DC) pulp. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(4), 1-7. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13053>
- Silva, J. R., Silva, T. T., Silva, E. K., Silva, S. P., Moreira, K. A., & Ribeiro, D. S. (2018). Produção de pigmentos de *Monascus ruber* CCT 3802 utilizando casca de mandioca como substrato. *Revista Brasileira de Agrotecnologia*, 8(3), 26-31.
- Silveira, S. T., Daroit, D. J., Sant’Anna, V., & Brandelli, A. (2013). Stability modeling of red pigments produced by *Monascus purpureus* in submerged cultivations with sugarcane bagasse. *Food and Bioprocess Technology*, 6(4), 1007-1014. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0710-8>
- Teng, S. S., & Feldheim, W. (2001). Anka and anka pigment production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(5), 280-282. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000126>
- Vendruscolo, F., Müller, B. L., Moritz, D. E., de Oliveira, D., Schmidell, W., & Ninow, J. L. (2013). Thermal stability of natural pigments produced by *Monascus ruber* in submerged fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(3), 278-284. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.03.008>
- Vendruscolo, F., Schmidell, W., de Oliveira, D., & Ninow, J. L. (2017). Kinetic of orange pigment production from *Monascus ruber* on submerged fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(1), 115-121. [10.1007/s00449-016-1679-5](https://doi.org/10.1007/s00449-016-1679-5)
- Wang, Y., Wig, T. D., Tang, J., & Hallberg, L. M. (2003). Sterilization of foodstuffs using radio frequency heating. *Journal of Food Science*, 68(2), 539-544. [10.1111/j.1365-2621.2003.tb05708.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05708.x)
- Wang, L., Dai, Y., Chen, W., Shao, Y., & Chen, F. (2016). Effects of light intensity and color on the biomass, extracellular red pigment, and citrinin production of *Monascus ruber*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(50), 9506-9514. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04056>
- Yamaguchi, S. K. F., Krebs, C. S., Bertolli, S. L., & Carvalho, L. F. (2017). Liofilização de produtos lácteos: Uma revisão. *Revista Espacios*, 38(22), 1-12.
- Yuliana, A., Singgih, M., Julianti, E., & Blanc, P. J. (2017). Derivates of azaphilone *Monascus* pigments. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 9, 183-194. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.12.014>