Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Identificação e Isolamento de Corantes Naturais
produzidos por Actinobactérias”**

Jacqueline Nakau Mendonça

Dissertação apresentada à Faculdade
de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das
exigências para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO -SP

Julho/2011

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Identificação e Isolamento de Corantes Naturais
produzidos por Actinobactérias”**

Jacqueline Nakau Mendonça

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes

Versão Corrigida

A versão original se encontra na Unidade que aloja o programa

RIBEIRÃO PRETO -SP

Julho/2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Mendonça, Jacqueline Nakau

Identificação e Isolamento de Corantes Naturais produzidos por Actinobactérias. Ribeirão Preto, 2011.

121 p.: il. ; 30cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área: **Química.**

Orientador: de Moraes, Luiz Alberto Beraldo

1. Corantes Naturais 2. Micro-organismos 3. Espectrometria de Massa

Folha da Aprovação

Jacqueline Nakau Mendonça

“Identificação e Isolamento de Corantes Naturais produzidos por Actinobactérias”

Aprovada em:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*“A mais bela coragem é a confiança
que devemos ter na capacidade de nosso esforço”
(autor desconhecido)*

Dedico esta dissertação

*A Deus
por ter me dado a saúde e acima de tudo vida.*

*Aos meus pais, Ilson e Misaco,
que são essenciais na minha vida.*

*Ao meu lindo, Nelson Alexandre,
que é o amor da minha vida!*

*Aos meus irmãos, Douglas e Ilsinho,
e à minha cunhada Brenda
que me acompanharam durante esta jornada.*

*A minha tia querida, Taeco (in memoriam),
que sempre foi minha conselheira, e sempre será!*

*Ao meu orientador, Beto,
que me deu a oportunidade de conhecer sua genialidade.*

Agradecimento

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes pela oportunidade de realizar mais uma etapa da minha vida, pelos conselhos e orientações, pela paciência, confiança, amizade e por ser minha fonte de inspiração.

Ao Prof. Dr. Itamar Soares de Melo (Embrapa Meio Ambiente) pelo fornecimento dos micro-organismos e pela disponibilidade do laboratório para um intensivo aprendizado de preservação e manipulação de micro-organismo.

Ao Prof. Dr. Marcos N. Eberlin (DQ-UNICAMP), pela disponibilidade dos espectrômetros de massas para realização das análises.

Ao Prof. Dr. Pietro Ciancaglini, pela disponibilidade do seu laboratório, principalmente, do espectrofotômetro UV/Vis.

Ao professor Prof. Dr. Grégoire Jean-François Demets, pelas valiosas sugestões.

À Prof^a. Dr^a. Rogéria Rocha Gonçalves, pela análise de espectroscopia Raman e pelo entusiasmo.

À Prof^a. Dr^a. Danielle Palma de Oliveira e a aluna de doutorado Thalita Boldrin Zanoni, pela realização das análises de toxicidade e mutagenicidade.

Aos professores participantes da banca do exame de qualificação Prof^a. Dr^a. Delia Rita Tapia Blácido e ao Prof. Dr. João Atílio Jorge pelas sugestões e contribuições fornecidas.

Ao técnico João Luiz da Silva do laboratório de Microbiologia da Embrapa Meio Ambiente por ter me acompanhado e me ensinado muito durante o período de estágio.

À aluna de doutorado Flávia Mandolesi Pereira de Melo do laboratório de Microbiologia da Embrapa Meio Ambiente por ter isolado e fornecido a actinobactéria para a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Química da FFCLRP: Djalma Batista Gianeti, Ivana Aparecida Borin, André Justino, Mercia Virginia Carlos, Vinicius Palaretti, Lourivaldo dos Santos Pereira, Rodrigo Ferreira Silva, Lâmia Melloni Antunes e Silva e André Luís Pereira Barnabé, pelo auxílio prestado.

A todos da minha família, pelo apoio nesta jornada. Em especial, aos meus pais, pela educação e caráter que me foram transmitidos, pela confiança e pela oportunidade de realizar mais esta etapa da minha vida com muito amor e carinho. Muito obrigada! Amo vocês!

Ao meu lindo, futuro marido (*risos*), por ser esta pessoa maravilhosa que sempre esta ao meu lado me apoiando sem me deixar desistir, pelo companheirismo, pela paciência enorme e pelo grande amor que tem por mim. Te amo muito!

Aos meus irmãos científicos, por quem tenho um carinho imenso, Fernanda, Tânia, Anelize, Bruna, Tahuana, Ana Flávia, Ana Paula, Eduardo, André (feio), Mariana, Camila, Carol, Jussara, Paty (Japa) e Leandro pelo apoio científico, pelo convívio e, principalmente, por me escutarem!! Agradeço em especial, a Bruna, aluna de iniciação científica, por ter me auxiliado e me acompanhado durante todo o projeto. E a Fernanda e Ana Paula, por terem possibilitado e auxiliado o estudo do corante vermelho.

Obrigado a todos que de alguma forma contribuíram e me apoiaram para que esta dissertação fosse concluída.

À Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto e o departamento de Química pela infra-estrutura fornecida;

À CNPq pela bolsa concedida e à Fapesp e Capes pelo auxílio à pesquisa.

Índice

Resumo	iii
Abstract.....	iv
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	x
Lista de Abreviações	xi
1. Introdução	1
1.1. Corantes Naturais e Artificiais	2
1.2. Micro-organismos e seus Metabólitos Secundários	9
1.3. Espectrometria de Massas em Produtos Naturais.....	11
2. Objetivos.....	14
2.1. Objetivo Geral	15
2.2. Objetivos Específicos	15
3. Materiais e Métodos	16
3.1. Equipamentos	17
3.2. Reagentes e Materiais	18
3.3. Metodologia.....	19
3.3.1. Isolamento e Seleção da Actinobactéria.....	19
3.3.2. Meios de Cultura	20
3.3.2.1. Preservação das actinobactérias.....	20
3.3.2.2. Meios de cultura para o crescimento das actinobactérias.....	20
3.3.3. Fermentação.....	22
3.3.4. Procedimento de extração do corante.....	23
3.3.4.1. Extração em Fase Sólida - SPE	23
3.3.4.2. Extração com Resina de Troca Iônica	24
3.3.4.3. Extração líquido-líquido	24
3.3.5. Desenvolvimento do método cromatográfico.....	24
3.3.6. Análises de Espectrometria de Massas.....	25
3.3.7. Análises de Espectrofotometria de UV/Visível.....	25
3.3.8. Análise de Infravermelho	26
3.3.9. Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	26
3.3.10. Análise Termogravimétrica	26
3.3.11. Análises de Espectroscopia Raman	26
3.3.12. Energia Dispersiva de Raios-X (EDX).....	27
3.3.13. Ensaio de Mutagenicidade e Citotoxicidade	27
4. Resultados e Discussões.....	31
4.1. <i>Screening</i> dos micro-organismos	32
4.2. Corante Roxo (<i>Streptomyces violaceolatus</i>)	32
4.2.1. Isolamento e Caracterização do micro-organismo	32
4.2.2. Ensaio de Mutagenicidade com <i>Salmonella</i>	34
4.2.3. Ensaio de Toxicidade.....	37
4.2.4. Estudo da Produção do Corante	38
4.2.4.1. Monitoramento da produção do corante.....	40
4.2.4.2. Variação do meio de cultura.....	42
4.2.4.3. Variação da fonte de Carbono e Nitrogênio	45
4.2.4.4. Estudo do efeito da radiação luminosa na produção do corante.....	53
4.2.4.5. Dependência de O ₂	55
4.2.4.6. Adição de Ferro	57
4.2.4.7. Adição de Aminoácidos.....	61
4.2.5. Estabilidade ao pH.....	63

4.3.	Extração do corante	65
4.3.1.	Extração com cartucho SPE – C18.....	65
4.3.2.	Extração com resina de troca iônica.....	67
4.4.	Análises realizadas com extrato bruto obtido com a extração com resina	69
4.4.1.	Análise de Espectrometria de Massas	70
4.4.2.	Ressonância Magnética Nuclear.....	72
4.4.3.	Análise de Infravermelho (FTIR)	72
4.4.4.	Espectroscopia Raman.....	74
4.4.5.	EDX – Energia dispersiva de raios-X	76
4.4.6.	Análise Termogravimétrica (TGA)	77
4.5.	Corante Vermelho (<i>Streptomyces sp.</i>)	79
4.5.1.	Isolamento do micro-organismo.....	79
4.6.	Variação do meio de cultura.....	80
4.7.	Extração	83
4.8.	Isolamento do corante.....	84
4.9.	Caracterização estrutural do corante vermelho	86
4.9.1.	Espectrometria de massas.....	86
4.9.2.	Espectroscopia de Infravermelho	93
5.	Conclusões	94
6.	Referências	97

Resumo

O contestável uso de corantes sintéticos pelas indústrias, aliado ao aumento na exigência dos consumidores modernos quanto à ingestão de alimentos coloridos artificialmente, tem despertado a atenção de pesquisadores pela busca de corantes de fontes naturais alternativas.

Neste sentido, os micro-organismos se apresentam como uma valiosa fonte de corantes naturais, permitindo sua fácil obtenção alcançando altos rendimentos em processos fermentativos.

O principal objetivo deste trabalho foi o estudo da potencialidade de aplicação de micro-organismos como produtores de corantes naturais.

Inicialmente, foi realizado o *screening* visual com mais de 1.000 micro-organismos, resultando na seleção de dois micro-organismos do gênero *Streptomyces*. Um produtor de coloração roxa e outro produtor de coloração vermelha. Foram avaliados os efeitos do meio de cultura (fonte de carbono e nitrogênio, adição de aminoácido e ferro) e condições de cultivo (agitação, luminosidade) na produção dos corantes. Para os dois micro-organismos os extratos brutos foram submetidos a análises espectrofotométricas e espectrométricas.

Para *Streptomyces violaceolatus*, o qual produz coloração roxa em meio de cultura Amido-Caseína, os resultados mostraram que as fontes de carbono e nitrogênio mais promissoras foram glicerol e extrato de levedura, respectivamente. Para o corante obtido, foram realizadas análises toxicológicas e mutagênica. Os resultados sugerem que o corante roxo apresenta um grande potencial de aplicação em alimentos ou cosméticos, pois nenhuma atividade tóxica ou mutagênica foi observada.

Com relação ao *Streptomyces sp.*, o qual produz coloração vermelha em meio de cultura Batata-Dextrose, os resultados mostraram que em meio de cultura sódio-caseinato também houve a produção desta coloração. O extrato bruto foi submetido a sucessivos processos cromatográficos, no qual foi possível o isolamento do composto Balmoralmicina, responsável pela coloração vermelha do meio de cultivo.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, podemos concluir que os micro-organismos são promissores produtores de corantes naturais com potencial aplicação industrial podendo ser produzidos em larga escala.

Abstract

The questionable use of synthetic colorants by food industry followed by an increasing consumer exigency concerning the ingestion of such artificial colorants, has attracted great attention of researches that are looking for healthier alternatives, for instance, the natural colorants.

In this sense, the microorganisms present a powerful source of natural colorants, which are easily obtained in high yields by fermentative process.

The main goal of this work is to study the potentiality of applying microorganisms as successful natural colorants producers. Initially, a visual screening was conducted using more than 1,000 microorganisms. As a result, two microorganisms of *Streptomyces* genus were selected, which were produced purple and red colored. Firstly, medium composition like nitrogen and carbon sources, as well as amino acid and iron additions were assayed. Secondly, agitation and luminosity were also evaluated.

The crude extract obtained from the two selected microorganisms were then analyzed by employing spectrophotometric and spectrometric techniques. Results for *Streptomyces violaceolatus*, which produces a purple coloration in AC medium, indicated that glycerol and yeast extract are the most promising carbon and nitrogen sources for colorant production. Additionally, this extract shows a great potential for further application in foods and cosmetics, once neither toxicological nor mutagenical activity were observed. In relation to *Streptomyces sp.*, the red coloration observed in BD medium, were also observed in sodium-caseinate culture medium. The crude extract was submitted to successive chromatographic processes, which allowed the isolation of Balmoralmicin, the compound that was responsible for the red coloration of the culture media.

Based on these results, we can conclude that microorganisms are promising natural colorant producers, and for these reasons are likely to be applied in industry and to be produced in higher amounts.

Lista de Figuras

Figura 1: Estruturas químicas de alguns corantes sintéticos.	4
Figura 2: Estruturas químicas dos corantes comumente encontrados na natureza. ...	6
Figura 3: Exemplos de alguns corantes policetídeos, acompanhada da estrutura química, coloração e sua fonte.	9
Figura 4: Fluxograma referente à metodologia empregada neste estudo para a identificação dos corantes naturais.	19
Figura 5: Esquema do teste <i>Salmonella</i> /microsoma – método de pré-incubação. O número de revertentes por placa foi então avaliado utilizando-se um contador de colônias Phoenix CP600 Plus. Os testes foram feitos acompanhados da avaliação da viabilidade e da taxa de reversão espontânea das linhagens. (Fonte: Teses de Doutorado de Thalita Boldrin Zanoni).....	29
Figura 6: Resultados negativos de mutagenicidade para o corante produzido pelo <i>Streptomyces violaceolatus</i> , a) com as linhagens TA98 e YG1042 com e sem ativação metabólica S9 e b) com as linhagens TA100 e TA1535 com e sem ativação metabólica S9.	36
Figura 7: Avaliação da viabilidade celular por Azul de Tripiano do corante produzido pelo <i>Streptomyces violaceolatus</i> em cinco diferentes concentrações: 0,3 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,8 mg/mL, 1,6 mg/mL e 3,3 mg/mL, por um período de incubação de a) 1 hora à 37°C, b) 2 hora à 37°C, c) 3 hora à 37°C e d) 24 hora à 37°C.	38
Figura 8: <i>Streptomyces violaceolatus</i> a) em meio de cultura sólido ACA (Amido-Caseína-Agar), b) fermentado em 30 mL de meio de cultura líquido AC e c) fermentado em 4 L de meio de cultura líquido AC.	40
Figura 9: a) Espectro de UV/Vis do composto colorido com λ máx. de 530 nm, b) Acompanhamento via UV/Vis da produção do corante pelo micro-organismo em função do tempo em dias de fermentação realizado em diferentes frascos Erlenmeyers e c) Acompanhamento via UV/Vis da produção do corante pelo micro-organismo em função do tempo em dias de fermentação realizado em um único frasco Erlenmeyer s.	41
Figura 10: Resultado da fermentação em diferentes meios sintéticos e semi-sintéticos no período de 12 dias com agitação. Da esquerda para a direita têm-se os meios AC, Khanna, Voguel, Segato Rizzatti, Czapeck, M-5 e Adams.....	43
Figura 11: Fermentação do <i>Streptomyces violaceolatus</i> em meio AC com diferentes fontes de carbono, da esquerda para a direita temos: AC, glicerina, Karo®, polvilho doce, fécula de batata, maltose, sacarose, frutose e glicose.	46

Figura 12: Análise de UV/Vis dos fermentados obtidos com a modificação da fonte de carbono do meio de cultura, a) espectro de UV/Vis na região de 250-700 nm b) gráfico da absorvância em 530 nm versus fontes de carbono.....	47
Figura 13: Fermentação do <i>Streptomyces violaceolatus</i> em meio AC com diferentes fontes de nitrogênio, da esquerda para a direita temos: AC, extrato de levedura, TSB, proteína texturizada de soja, extrato de carne, grão de soja moída e peptona.....	48
Figura 14: Análise de UV/Vis dos fermentados obtidos com a modificação da fonte de nitrogênio do meio de cultura, a) espectro de UV/Vis na região de 250-700 nm b) gráfico da absorvância em 530 nm versus fontes de nitrogênio.....	49
Figura 15: a) Espectro de UV/Vis dos meios de cultura AC contendo diferentes concentrações de glicerina. b) Absorvância do corante em 555 nm em função a concentração de glicerina no meio de cultura AC.	50
Figura 16: Fermentação do <i>Streptomyces violaceolatus</i> em meio de cultura AC com diferentes concentrações de glicerina como fonte de carbono. Da esquerda para a direita, tem-se 30%, 20%, 15%, 10% e 5% de glicerina.....	51
Figura 17: Fermentação do <i>Streptomyces violaceolatus</i> em meio AC modificado com 5% de glicerol utilizando diferentes fontes de nitrogênio, da esquerda para a direita temos: AC, peptona, extrato de levedura, extrato de carne, TSB, proteína texturizada de soja, grão de soja moída.	52
Figura 18: a) Espectro de UV/Vis dos meios de cultura líquido AC com glicerol com diferentes fontes de nitrogênio, os quais apresentaram coloração roxa. b) Gráfico da absorvância do corante em 530 nm versus as diferentes fontes de nitrogênio utilizadas no meio de cultura.	52
Figura 19: Avaliação do efeito da radiação luminosa na fermentação do <i>Streptomyces violaceolatus</i> . a) em meio de cultura AC sem radiação de luz e com radiação de luz após 12 dias, respectivamente. b) ampliação da Figura a.	54
Figura 20: Análise de UV/Vis do fermentado do <i>Streptomyces violaceolatus</i> com e sem radiação luminosa a) espectro de UV/Vis e b) gráfico da absorvância em 530 nm versus indução da radiação luminosa.....	55
Figura 21: Avaliação da dependência de oxigênio na fermentação do <i>Streptomyces violaceolatus</i> com a utilização de diferentes volumes de meio de cultura, da esquerda para a direita temos: 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% e 80% do volume do frasco Erlenmeyer correspondente ao meio de cultura.	56
Figura 22: a) Espectros dos fermentados do <i>Streptomyces violaceolatus</i> submetido à fermentação utilizando diferentes volumes de meio de cultura para a avaliação da	

dependência de oxigênio, b) Gráfico da intensidade da absorvância em 530 nm versus volume de meio de cultura.	56
Figura 23: Estruturas dos sideróforos: (a) neopurpuratin e (b) desferrioxiaminas (desferrioxamina B – $R_1 = H$ e $R_2 = CH_3$).	58
Figura 24: Fermentação do <i>Streptomyces violaceolatus</i> em meio de cultura AC com adição de ferro antes da fermentação em diferentes concentrações, da esquerda para a direita temos: 0,1 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 2,0 mg/L e 5,0 mg/L.	59
Figura 25: Gráfico da absorvância em 530 nm versus a concentração de ferro adiciona no meio de cultura AC antes (colunas escuras) e após (colunas claras) a fermentação.	60
Figura 26: a) Fermentação do <i>Streptomyces violaceolatus</i> em meio de cultura AC com adição de ferro após a fermentação em diferentes concentrações, da esquerda para a direita temos: 0,1 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 2,0 mg/L e 5,0 mg/L, b) espectros de UV/Vis dos fermentados obtidos após a adição de ferro.	60
Figura 27: Gráfico da absorvância em 530 nm versus aminoácidos adicionados no meio de cultura, a) adição de aminoácido no meio de cultura AC e b) adição de aminoácido no meio AC com glicerol como fonte de carbono. Para ambos, colunas escuras e colunas claras correspondem, respectivamente, a concentração de aminoácido de 1,0 mg/L e 0,1 g/L.	61
Figura 28: Espectro de UV/Vis na região de 250 a 700 nm dos fermentados com a adição de diferentes concentrações de aminoácidos no meio de cultura AC, a) 1,0 mg/L e b) 0,1 g/L.	62
Figura 29: Espectro de UV/Vis na região de 250 a 700 nm dos fermentados com a adição de aminoácidos, a figura a e b correspondem, respectivamente, a concentração de 1,0 mg/L e 0,1 g/L de aminoácido adicionado no meio de cultura AC com glicerol.	63
Figura 30: Acompanhamento da coloração em função do pH, 1) 1,2; 2) 2,4; 3) 3,4; 4) 4,3; 5) 5,4; 6) 6,0; 7) 7,4; 8) 8,0; 9) 9,1; 10) 10,0; 11) 11,2; 12) 12,0 e 13) 12,5.	64
Figura 31: Gráfico da absorvância em função do comprimento de onda do composto colorido em diferentes valores de pH.	64
Figura 32: Cromatograma obtido da amostra extraída com cartucho SPE-C18 nos comprimentos de onda de 270nm, 500nm e 530nm, correspondente as cores preta, vermelha e azul, respectivamente.	66
Figura 33: Espectro de massas do extrato bruto obtido da fermentação do <i>Streptomyces violaceolatus</i> , extraído com cartucho SPE-C18.	66
Figura 34: Estrutura de um oligossacarídeo.	67

Figura 35: Espectro de massas do extrato bruto obtido por extração em resina de troca iônica. A seta vermelha representa a diferença de 22 Da.	68
Figura 36: Cromatograma obtido da amostra extraída com resina de troca iônica em coluna C18.	69
Figura 37: Espectro de massas do extrato bruto obtido no espectrômetro Q-TOF.	70
Figura 38: MS/MS dos sinais de m/z 1278, 1250, 875, 703 e 633.	71
Figura 39: RMN ¹ do extrato bruto obtido com a extração com resina de troca iônica, o solvente utilizado foi o D ₂ O (com NaOH) e a análise foi realizada em espectrômetro de 500 MHz.	72
Figura 40: Espectro de infravermelho obtido da amostra extraída com resina de troca iônica, utilizando pastilha de KBr.	73
Figura 41: Espectro de Raman da amostra sólida utilizando laser operante em 632,8 nm.	75
Figura 42: Luminescência resultante da análise Raman das amostras líquidas.	76
Figura 43: Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) em keV, para a amostra A.	77
Figura 44: Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) em keV, para o porta-amostra.	77
Figura 45: Análise Termogravimétrica. Gráfico de TGA (preto) e sua derivada, DTG (vermelho).	78
Figura 46: a) Eucalipto-12 em meio de cultura sólido TSBA 5% e b) Eucalipto-12 em meio de cultura líquido BD após 12 dias de fermentação com agitação.	80
Figura 47: Fermentação do Eucalipto-12 com diferentes meios de cultura líquido, da esquerda para a direita, temos: Sódio-Caseinato, BD e Czapeck.	81
Figura 48: a) Espectro de UV/Vis na região de 300 a 700 nm dos fermentados do Eucalipto-12 obtido com diferentes meios de cultura, b) gráfico da intensidade da absorvância em 490 nm versus diferentes meios de cultura utilizados para fermentação.	82
Figura 49: a) Espectro de UV/Vis na região de 300 a 700 nm dos fermentados do Eucalipto-12 obtido com a modificação das fontes de carbono presentes em cada meio de cultura por amido, b) gráfico da absorvância em 490 nm versus diferentes meios de cultura utilizando amido como fonte de carbono.	83
Figura 50: Cromatograma de CLAE do extrato bruto obtido pela fermentação do Eucalipto-12 em meio de cultura BD.	85

Figura 51: Cromatograma de CLAE das frações reunidas obtido pela fermentação do Eucalipto-12 em meio BD.	85
Figura 52: Espectro de massas das frações reunidas obtidas do fracionamento do extrato bruto produzido pelo <i>Streptomyces sp.</i> , a) modo positivo e b) modo negativo.	86
Figura 53: Estrutura da <i>Balmoralmycin</i>	88
Figura 54: Espectro de RMN ¹ H obtido das frações reunidas em CDCl ₃ , 500 MHz.	88
Figura 55: Ampliação do espectro de RMN obtido das frações reunidas.	89
Figura 56: Mapa de contornos HMQC para as frações reunidas.	91
Figura 57: Mapa de contornos HMBC para as frações reunidas.	91
Figura 58: Deslocamentos de hidrogênio (vermelho) e carbono (azul) atribuídos para a <i>Balmoralmycin</i>	92
Figura 59: Acoplamento entre os átomos de hidrogênio e carbono-13 obtidos por HMBC, no qual as setas rosa, verde e laranja representam acoplamento ² J, ³ J e ⁴ J, respectivamente.	92
Figura 60: Espectro de FTIR das frações reunidas obtida do Eucalipto-12.	93

Lista de Tabelas

Tabela 1: Corantes sintéticos utilizados no Brasil, nos Estados Unidos e na União Européia, de acordo com cada órgão institucional específico.	3
Tabela 2: Principais corantes naturais encontrados na natureza, extraídos de plantas e animais.....	5
Tabela 3: Composição dos meios de cultura sintéticos e semissintéticos utilizados no crescimento do <i>Streptomyces violaceolatus</i> e do <i>Streptomyces sp.</i> , todas as composições correspondem ao volume final de 1 litro.	21
Tabela 4: Compostos produzidos pelo <i>Streptomyces violaceolatus</i> descritos no banco de dados <i>Dictionary of Natural Products</i> , da esquerda para a direita, tem-se o nome químico, fórmula molecular, massa molecular, descrição física e estrutura química (Fonte: <i>Dictionary of Natural Products</i>).	33
Tabela 5: Resultado da busca realizada no banco de dados “ <i>Dictionary of Natural Products</i> ” por compostos produzidos por <i>Streptomyces</i> com massa molecular na faixa de 600-601 u.	87
Tabela 6: Dados de RMN obtido experimentalmente para as frações reunidas do Eucalipto-12 e dados descritos na literatura por Bindseil, et al.	90

Lista de Abreviações

AC – Amido-Caseína

ACA – Amido-Caseína-Agar

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BD – Batata-Dextrose

BDA – Batata-Dextrose-Agar

CD₃OD – metanol deuterado

CDCl₃ – clorofórmio deuterado

Da – Dalton (unidade de massa atômica = 1 u)

DEA – Dietilamina

D₂O – água deuterada

DMSO-d₆ – dimetilsulfóxido deuterado

DMSO – dimetilsulfóxido

DMEM – Dulbecco's Minimal Essential Medium

DTG - Derivative Thermogravimetry

EDX – Energia dispersiva de raios-X

ESI-MS – *Electrospray Ionization Mass Spectrometry* (tradução: Espectrometria de Massas com fonte de Ionização *Electrospray*)

ESI-MS/MS – *Tandem Electrospray Ionization Mass Spectrometry* (tradução: Espectrometria de Massas sequencial com fonte de Ionização *Electrospray*)

EU – European Union

FAME – Fatty Acid Methyl Ester

FDA – US Food and Drug Administration

FTIR - Fourier Transform Infrared Spectroscopy

GC-MS - Gas chromatography Mass Spectrometry

HepG2 – Human hepatocellular liver carcinoma cell line

HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (tradução: correlação heteronuclear de ligações múltiplas)

HMQC – *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation* (tradução: correlação heteronuclear de quantum múltiplas)

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* (tradução: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

JECFA – *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*

FAO – *Food and Agriculture Organization of United Nations*

WHO – *World Health Organization*

LC-MS – Liquid chromatography/Mass Spectrometry

m/z – razão massa-carga

PBS – Phosphate buffered saline

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

rpm – rotações por minuto

SBMCTA – Sociedade Brasileira de Mutagênese, Tetragênese e Carcinogênese Ambiental

SPE – *solid phase extraction* (tradução: extração em fase sólida)

SR – meio de cultivo Segato Rizzatti

TGA – Thermogravimetric Analysis

TLC-MS – Thin Layer Chromatography Mass Spectrometry

TSB – *Tript Soy Broth* (tradução: Caldo Trípico de Soja)

UV – Ultra-Violeta

UV/Vis – Ultra-Violeta visível

1. Introdução

1.1. Corantes Naturais e Artificiais

As cores presentes na natureza do mundo inteiro sempre fascinaram e impressionaram os seres humanos¹. Este fascínio despertou o grande interesse para a descoberta e obtenção de corantes produzidos por organismos vivos, como plantas e animais, antes da invenção dos corantes sintéticos².

Até meados do século XIX, a obtenção dos corantes era exclusivamente de fontes naturais³. Mas, devido à dificuldade de extração e alto custo, estes corantes eram reservados para os mais privilegiados e utilizados principalmente na tintura de tecidos, o que simbolizava poder⁴.

Com o surgimento dos corantes sintéticos, a partir de 1856 com o pioneiro W. H. Perkin, o qual sintetizou a mauveína, também denominada anilina roxa⁵; o uso dos corantes naturais quase foi extinto⁶.

Nesta época, a utilização descontrolada de corantes como aditivos em alimentos populares como ketchup, mostarda e geléias se espalhou rapidamente pela Europa e Estados Unidos, porém nunca tinha sido testada a toxicidade e efeitos adversos destes corantes⁷. Resultando em diversos problemas de saúde, intoxicações e até mortes, relacionados ao consumo de corantes sintéticos⁸.

Porém, devido às vantagens apresentadas pelos corantes sintéticos como a facilidade de obtenção, o baixo custo, ampla faixa de coloração, a estabilidade à luz, aquecimento e oxidação; e melhores propriedades de coloração, com o uso de menores quantidades de corantes, a sua utilização ainda é muito alta, uma vez que fornece propriedades adequadas para a aplicação industrial⁹.

Adicionalmente, a falta de informação de muitos consumidores quanto aos danos causados por corantes sintéticos e fatores econômicos de países

menos desenvolvidos como o Brasil, Argentina, México e Índia, a produção e comercialização de alguns corantes sintéticos ainda não foi totalmente cessada³.

Atualmente existem órgãos públicos, que estabelecem quais corantes sintéticos são permitidos para uso após avaliação toxicológica. Porém, cada país adota sua própria regulamentação o que dificulta a extinção total da produção de certos corantes¹⁰.

No Brasil o órgão responsável pela regulamentação do uso de corantes é a ANVISA¹¹ (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), e este permite o uso de 11 corantes sintéticos. Na Tabela 1 são apresentados os corantes sintéticos utilizados no Brasil, nos Estados Unidos e na União Européia para efeito de comparação. Além dos permitidos pelo o comitê científico internacional da JECFA (*Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*), que é uma instituição não governamental⁸.

Tabela 1: Corantes sintéticos utilizados no Brasil, nos Estados Unidos e na União Européia, de acordo com cada órgão institucional específico.

Classificação	Corante	ANVISA	UE	FDA	JECFA
Triarilmetano	azul brilhante FCF	sim	sim	sim	sim
	verde rápido FCF	sim	não	sim	sim
(Trifenilmetano)	verde S	não	sim	não	não
	azul patente V	sim	sim	não	não
Azo	alaranjado B	não	não	sim	não
	vermelho citrus n°2	não	-	sim	não
	vermelho allura	sim	sim	sim	sim
	amaranto	sim	sim	não	sim
	azorrubina	sim	sim	não	sim
	preto brilhante BN	não	não	sim	sim
	marrom FK	não	sim	não	não
	marrom HT	não	sim	não	sim
	Lithol Rubine BK	não	sim	não	não
	ponceau 4R	sim	sim	não	sim
	vermelho 2G	não	sim	-	sim
	amarelo crepúsculo	sim	sim	sim	sim
	tartrazina	sim	sim	sim	sim
Quinophthalon	amarelo de quinolina	não	sim	-	sim
Xantenos	eritrosina	sim	sim	sim	sim
Indigo	indigotina	sim	sim	sim	sim

Na Figura 1 está ilustrada as estruturas de alguns corantes artificiais, no qual podemos observar os principais grupos característicos de cada classe.

Figura 1: Estruturas químicas de alguns corantes sintéticos.

Dentre as classes de corantes sintéticos citadas na Tabela 1, o grupo dos corantes do tipo azo é o que merece maior destaque, pois além de corresponder à classe de corantes de maior produção mundial³, já se sabe que estes podem ser precursores de intermediários com alto potencial carcinogênico e mutagênico durante a sua metabolização^{12,13}

No entanto, surgiu um grande interesse por corantes de fontes naturais, principalmente, para a substituição dos corantes sintéticos, pois além de apresentar grandes preocupações com a saúde humana quanto ao uso em alimentos e cosméticos¹⁴, existe também preocupações ambientais agregados a sua produção e aplicação³.

Com respeito aos alimentos, a coloração é usada historicamente, para fazermos pré-julgamentos com relação à qualidade, maturamento e sabor¹⁵.

Podendo influenciar o nosso paladar e apetite pela alimentação⁹, pois “Inevitavelmente comemos com os nossos olhos”¹⁶

Atualmente, com o aumento do processamento dos alimentos, o qual é consequência da crescente demanda populacional, os alimentos perdem parte da sua coloração original tornando indispensável a adição de corantes, principalmente, no que diz respeito a aceitabilidade do consumidor¹⁵.

Assim, a utilização de corantes pelas indústrias se tornou uma prática corriqueira. Porém, há a preocupação tanto para o tipo de corantes utilizados quanto pela baixa demanda de corantes naturais existentes no mercado¹⁷.

Os corantes naturais são obtidos de três fontes principais, dentre elas as plantas (folha, flores e frutos), animais (insetos) e micro-organismos (fungos e bactérias).

Os corantes mais comumente encontrados na natureza, extraídos de plantas e animais, são divididos em cinco classes principais: tetrapirrol, tetraterpeno ou caroteno, flavonóide, antraquinona e betalaína⁹, como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Principais corantes naturais encontrados na natureza, extraídos de plantas e animais.

Classe	Corante	Cor	Fontes de obtenção
tetrapirrol	clorofila	verde	folhas verdes
tetraterpeno	β-caroteno	amarelo	cenoura
	astaxantina	vermelho	microalgas, salmão, camarão
	bixina	vermelho	sementes de urucum
flavonóide	Luteolina	amarelo	frutas, flores e vegetais
	cianidina	vermelho	frutas: cereja, morango, açaí.
antraquinona	ácido carmínico	vermelho	inseto: cochonilha
betalaína	betanina	vermelho	beterraba

Figura 2: Estruturas químicas dos corantes comumente encontrados na natureza.

Comparando as estruturas apresentadas na Figura 2 com as estruturas químicas dos corantes artificiais encontrados na Figura 1, é possível constatar que os corantes de fontes naturais não possuem grupos grupo azo, por exemplo, que podem dar origem a estruturas tóxicas.

Além das várias vantagens já mencionadas para os corantes naturais, outro fator relevante é o valor nutricional que pode ser acompanhado com a adição de alguns corantes¹⁸, como é o caso dos β -carotenos, que enriquecem os alimentos com a atividade pró-vitamina A, além de fortalecer o sistema imunológico e diminuindo a suscetibilidade de doenças degenerativas¹⁹.

Os corantes naturais obtidos de planta possuem algumas desvantagens como: (1) dependência de fatores climáticos e amplo espaço físico (2) variação

significativa da coloração de lote para lote e (3) limitações na forma de aplicação²⁰.

Como por exemplo, no caso das antocianinas, o qual são sensíveis à oxidação e variação de pH, devido à presença do cátion flavínico básico em sua estrutura (Figura 2). Outro exemplo são os carotenóides, os quais são descoloridos por oxidação, aquecimento e exposição à luz, pois contêm hidrogênio lábil em sua estrutura²¹.

Adicionalmente, a quantidade disponível destes corantes na natureza é insuficiente para suprir as necessidades industriais atuais¹⁷, fazendo-se necessário o uso da produção biotecnológica, por exemplo, a qual possibilita a obtenção dos corantes naturais em grande escala.

No entanto, a produção biotecnológica de corantes naturais empregando processos fermentativos de micro-organismos é a chave para a viabilidade econômica destes corantes, pois apresenta possibilidade de aprimoramento da produção, resultando em altas concentrações de produto em menos tempo⁹.

Desta forma, destaca-se também algumas vantagens como: (1) possibilitar a utilização de substratos de baixo custo ou até mesmo resíduos industriais, (2) pequeno espaço para a produção e (3) são independentes de condições ambientais tais como estação do ano, clima e composição do solo¹⁹.

Atualmente, alguns corantes produzidos por micro-organismos já são aprovados para consumo e são comercializados, tais como β -caroteno, a riboflavina e os pigmentos produzidos pelo fungo do gênero *Monascus*.

O β -caroteno, o qual pertence à classe dos carotenóides, é obtido por processo de fermentação, principalmente, pelo fungo *Blakeslea trispora*¹⁹.

A riboflavina, também conhecida como vitamina B₂, pertence à classe das flavinas e é produzido por diversos micro-organismos como: *Clostridium*

acetobutylicum, *Candida flareri*, *Candida guilliermundii*, *Debaryomyces subglobosus*, *Eremothecium ashbyii* e *Ashbya gossypi*²².

E finalmente, com relação ao fungo *Monascus purpureus*, este produz os corantes: ankaflavina e monascina (amarela), monascorubrina e rubropunctatina (alaranjada) e monascorubramina e rubropunctamina (roxo-avermelhado)²³. Algumas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 3.

Outros corantes obtidos de micro-organismos também já foram descobertos. Estes corantes são classificados em duas grandes classes principais: os policetídeos e carotenóides.

Os corantes policetídeos são formados pela condensação de um grupo acetil ou acil com uma unidade de malonil, seguida da descarboxilação. Este processo é responsável pela formação de cadeias carbônicas com número ímpar de carbono, que resulta em compostos policarbonílicos, sendo por sua vez responsáveis pela geração de compostos aromáticos, típicos de metabólitos secundários de micro-organismos²⁰.

Incluem na classe dos policetídeos, as antraquinonas, as hidroxiantraquinonas, as nafitoquinonas e as *azaphilones*²⁴. Na Figura 3, podemos observar a estrutura química dos principais corantes naturais produzidos por micro-organismos e sua respectiva classe química.

Figura 3: Exemplos de alguns corantes policetídeos, acompanhada da estrutura química, coloração e sua fonte.

O único fator limitante aparente na utilização dos corantes naturais provenientes de micro-organismo é a dificuldade na sua aprovação pelas autoridades legislativas, os quais exigem vários estudos toxicológicos²⁰.

1.2. Micro-organismos e seus Metabólitos Secundários

A versatilidade biossintética dos micro-organismos é enorme. E desde, a descoberta da penicilina em 1929, os metabólitos secundários produzidos pelo

micro-organismos se tornaram extremamente importantes para a nossa saúde e nutrição²⁵.

Pesquisa bibliográfica realizada por Brakhage e colaboradores²⁶, mostra que mais de 23.000 metabólitos bioativos possuem propriedades como antifúngicos, agentes antibacterianos, antivirais, imunossupressores e citotóxicos, sendo que grande parte destes metabólitos são produzidos por micro-organismos, em especial do gênero *Streptomyces*.

Portanto, entre os micro-organismos existentes, as actinobactérias, notavelmente os *Streptomyces*, são destacadas como rica fonte de produtos naturais, visto que novos metabólitos ainda são descobertos. Sabe-se que as actinobactérias são responsáveis por produzir 45% de todo metabólitos secundário bioativos, sendo que 80% deste total são produzidos por *Streptomyces*, o que equivale a mais de 6.000 compostos produzidos por este gênero²⁷.

Os metabólitos secundários apresentam funções extremamente importantes para a sobrevivência dos organismos na natureza, sendo empregados em competições interespecíes, processo de reprodução e como mecanismos de defesa²⁸.

Para os seres humanos os benefícios obtidos com os metabólitos secundários são diversos, sendo aplicados como fármacos, agroquímicos, corantes ou pigmentos, fragrâncias e aromatizantes²⁹.

Como já mencionado, os micro-organismos possuem diversas vantagens na produção de corantes naturais em relação as plantas, como a possibilidade de aperfeiçoar as condições de produção. Sendo assim, é possível constatar que os *Streptomyces* se apresentam como fontes promissoras de corantes, já que existem relatos na literatura de corantes produzidos por micro-organismos deste gênero. Como por exemplo, temos a produção de um corante azul escuro

produzido pelo *Streptomyces caeruleatus*, isolada da rizosfera do tomate³⁰, a produção de um corante vermelho produzido pelo *Streptomyces violaceoruber*, o qual apresenta atividade antibiótica³¹ (Figura 3).

1.3. Espectrometria de Massas em Produtos Naturais

Vários métodos analíticos tem sido empregados no estudo da composição química de diversos compostos oriundos de fontes naturais como, por exemplo, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ultravioleta (UV), infravermelho (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (MS)³².

Dentre estas, destaca-se a Espectrometria de Massas, uma vez que apresenta incomparável sensibilidade, limite de detecção e rapidez na análise. Além disso, apresenta uma versatilidade de aplicações, que inclui desde análises nas áreas de química, medicina, ciência forense, física até geocronologia³³.

Durante as últimas décadas, a evolução da Espectrometria de Massas foi extremamente rápida, sendo responsável pelo surgimento de novos equipamentos, novas fontes de ionização, novos analisadores, o que permitiu o desenvolvimento da Espectrometria de Massas sequencial (MSⁿ), além do acoplamento com técnicas cromatográficas, como o LC-MS, LC-MS/MS³³, GC-MS³⁴ e TLC-MS³⁵.

O emprego da análise de LC-MS, na análise do extrato bruto da fermentação tem representado uma etapa importante na identificação e caracterização *on-line* de produtos naturais, a qual facilita o processo de desreplicação dos compostos bioativos, que consiste no reconhecimento rápido e confiável de compostos já descrito em bancos de dados³⁶.

A utilização da MS na identificação de novos corantes naturais provenientes de micro-organismos vem sendo muito utilizada como uma ferramenta inteligente na seleção de espécies promissoras para a produção de corantes²¹.

O emprego da Espectrometria de Massas por inserção direta do extrato bruto obtidos pelo método de fermentação, acoplada ao conhecimento pré-existente da taxonomia do micro-organismo utilizado, possibilita a identificação da produção de eventuais metabólitos tóxicos indesejáveis, como no caso dos corantes.

Estudo realizado por Frisvad e colaboradores³⁷, o qual fez uso da espectrometria de massas como uma ferramenta na seleção de micro-organismos promissores na produção de corante e potencialmente seguros, demonstrou que fungos do gênero *Penicillium* foram viáveis para a sua utilização, corroborando os conhecimentos taxonômicos existentes.

Uma busca por compostos produzidos por micro-organismo do gênero *Streptomyces* foi realizada resultando em 6.115 metabólitos já descritos, sendo que apenas 12 compostos são substâncias tóxicas para o ser humano, 5 são mutagênicos e 15 são carcinogênicos, de acordo com bando de dados “*Dictionary of Natural Products*”.

Desta forma, é possível afirmar que os *Streptomyces* são fontes propícias e favoráveis na busca de novos corantes naturais, podendo também apresentar atividade antibiótica, muito comum deste gênero, agregada a coloração³⁸.

Neste contexto, o presente estudo consiste na seleção de *Streptomyces* com potencial biotecnológico para a produção de corantes naturais a partir de processos fermentativos e avaliação da sua aplicabilidade empregando a

Espectrometria de Massas como ferramenta para a identificação dos metabólitos secundários produzidos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O principal objetivo deste trabalho foi o estudo da potencialidade da aplicação de micro-organismos como produtores de corantes naturais.

2.2. Objetivos Específicos

- *Screening* visual de micro-organismos produtores de corantes.
- Transpor o micro-organismo do meio de cultura sólido para o meio de cultura líquido.
- Avaliar os efeitos dos processos de fermentação por meio da modificação do meio de cultura e variação dos dias de fermentação.
- Isolar e caracterizar o corante por métodos espectrofotométricos e espectrométricos.
- Realizar testes *in vitro* de citotoxicidade e mutagenicidade.

3. Materiais e Métodos

3.1. Equipamentos

- ✓ Balança analítica FA2104N - Celtac®
- ✓ Câmara de fluxo laminar
- ✓ Rota evaporador R - 144 BUCHI®
- ✓ Autoclave vertical - Mod. AV75 - Phoenix®.
- ✓ Mesa agitadora orbital - Mod. 190 Nova Ética® e MA 140 CFT Marconi®
- ✓ Speed vac – Univapo 100 ECH®
- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) - HP series 1100
- ✓ Espectrômetro de massa - Q-TOF II Micromass-UK®
- ✓ Espectrômetro de massa – Triploquadrupolo Mod. 1200L Varian®; acoplado ao auto-injetor ProStar Mod. 410 Varian®
- ✓ Espectrofotômetro UV/Visível - Ultrospec™ 5300 pro – Amersham Biosciences®
- ✓ Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear - Bruker® DRX – 500 e Bruker® DRX - 400
- ✓ Espectrofotômetro de Infravermelho FTIR – RX Perkin Helmer® (as análises foram realizadas em pastilhas de KBr)
- ✓ Espectroscópico Micro Raman LabRam HR 800 - Horiba Jobin Yvon® provido de laser de diodo operante 632,8 nm e 785,0 nm.
- ✓ Espectrômetro de Energia Dispersiva de raios-X – IXRF Systems, mod. 500 Digital Processing; acoplado a um microscópio eletrônico de varredura – Zeiss mod. EVO 50.

3.2. Reagentes e Materiais

- ✓ Todos os solventes utilizados neste projeto são de grau analítico ou cromatográfico.
- ✓ Os reagentes químicos utilizados na produção dos meios de cultura são de grau analítico.
- ✓ Solventes deuterados: D₂O, CDCl₃, CD₃OD e DMSO-d₆.
- ✓ Alguns componentes nutricionais para a produção de meio de cultura são produtos comerciais, como por exemplo, a Maizena®.
- ✓ Cartucho de Extração em Fase Sólida – ODS-C18 de 10g/20 mL – Chromabond®.
- ✓ Resina de Troca Iônica Catiônica – Dowex® 50 W – 8% de ligação cruzada e tamanho de poro da malha de 100-200 *mesh* –Sigma-Aldrich®.
- ✓ Cubetas espectrofotométricas de quartzo com comprimento óptico de 1 cm.
- ✓ Coluna cromatográfica de HPLC LiChrospher® 100 RP-C18 (5µm) de 100 mm – Agilent®.
- ✓ Coluna cromatográfica de HPLC Luna NH₂ 100 (5mm) de 250x4.60 mm – Phenomenex®.
- ✓ Resina Sephadex LH20 – Amersham Biosciences®

3.3. Metodologia

A estratégia metodológica utilizada neste estudo está ilustrada no fluxograma da Figura 4.

Figura 4: Fluxograma referente à metodologia empregada neste estudo para a identificação dos corantes naturais.

3.3.1. Isolamento e Seleção da *Actinobactéria*

Os micro-organismos monitorados nesta dissertação foram isolados de diferentes habitats. A seleção foi realizada por meio de um *screening* visual, sendo selecionados os micro-organismos que apresentavam coloração no meio de cultura sólido.

As actinobactérias empregadas neste estudo foram isoladas da rizosfera do milho pela Dr^a. Flávia Mandolesi Pereira de Melo³⁹ e da rizosfera do eucalipto pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Itamar Soares de Melo (Embrapa Meio Ambiente – Jaguariúna). As duas actinobactérias foram identificadas como *Streptomyces violaceolatus* e *Streptomyces* sp., respectivamente.

3.3.2. Meios de Cultura

3.3.2.1. Preservação das actinobactérias

A actinobactéria *Streptomyces violaceolatus* foi isolada em meio de cultura sólido ACA (Amido-Caseína-Agar), composto por 10 g de amido (Maisena®), 0,3 g de caseína, 2,0 g de NaCl, 2,0 g de NaNO₃ e 2,0 g de K₂HPO₃ para cada litro de água destilada, acrescida de 2% em massa de agar e preservada neste mesmo meio de cultura através do processo de repique por um período de tempo de aproximadamente 3 meses.

A actinobactéria *Streptomyces sp.* foi isolada em meio de cultura TSBA 5%, composto por: 0,85 g do produto da digestão enzimática da caseína, 0,15 g do produto da digestão enzimática do farelo de soja, 0,25 g de NaCl e 0,12 g de dextrose em 1 L de água destilada, acrescida de 2% em massa de agar. Foi preservada utilizando dois diferentes métodos: (1) em meio de cultura sólido de aveia, o qual é composto por 40 g de aveia (Quaker®) em 1 litro de água destilada, acrescido de 2% em massa de agar pelo processo de repique e (2) em solução de 25% de glicerol à 4°C.

3.3.2.2. Meios de cultura para o crescimento das actinobactérias

Para o crescimento das actinobactérias foram utilizados diversos meios de cultura sintéticos, semissintéticos e naturais⁴⁰. Dentre os meios sintéticos e semissintéticos estão: AC⁴¹ (Amido-Caseína), Czapeck⁴², M-5⁴³, Adams⁴⁴, Khanna⁴⁵, SR⁴⁶ (Segato Rizzatti), Voguel⁴⁷, M615⁴⁸, Sódio-Caseinato e TSB (obtido comercialmente – Acumedia®); a composição nutricional de cada meio de cultura está descrita na Tabela 3.

Tabela 3: Composição dos meios de cultura sintéticos e semissintéticos utilizados no crescimento do *Streptomyces violaceolatus* e do *Streptomyces sp.*, todas as composições correspondem ao volume final de 1 litro.

Meio de cultura	Composição nutricional
AC ^(*) ^(**)	10,0 g amido (Maisena [®]), 0,3 g caseína, 2,0 g NaCl, 2,0 g NaNO ₃ e 2,0 g K ₂ HPO ₃
Czapeck ^(*) ^(**)	30,0 g glicose, 3,0 g NaNO ₃ , 1,0 g KH ₂ PO ₄ , 0,5 g KCl, 0,5 g MgSO ₄ .7H ₂ O e 0,1 g FeSO ₄ .7H ₂ O
M-5 ^(*)	10,0 g glicose, 8,0 g extrato de levedura, 1,0 g peptona, 2,5 g gelatina, 1,0 g CaCO ₃ e 5,0 g NaCl
Adams ^(*)	glicose (10,0 g/L), extrato de levedura (2,0 g/L), KH ₂ PO ₄ (1,0 g/L) e MgSO ₄ .7H ₂ O.
Khanna ^(*)	10,0 g glicose, 1,0 g extrato de levedura e 50,0 mL solução de sais, este é composto de 20,0 g NH ₄ NO ₃ , 13,0 g KH ₂ PO ₄ , 3,6 g MgSO ₄ .7H ₂ O, 0,1 g KCl, 0,08 g ZnSO ₄ .H ₂ O, 0,14 g MnSO ₄ .H ₂ O, 0,07 g Fe ₂ (SO ₄) ₃ .6H ₂ O e 0,06 g CuSO ₄ .5H ₂ O
SR ^(*)	10,0 g glicose, 4,5 g extrato de levedura, 0,2 g peptona e 50,0 mL solução de sais, na qual é composta de 3,0 g KH ₂ PO ₄ , 2,4 g MgSO ₄ .7H ₂ O e 10,0 g NH ₄ H ₂ PO ₄
Voguel ^(*)	10,0 g glicose, 0,5 mL solução de biotina e 20,0 mL solução de sais, na qual é composta de 150,0 g Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .5H ₂ O, 250,0 g KH ₂ PO ₄ , 10,0 g MgSO ₄ .7H ₂ O, 100 g NH ₄ NO ₃ , 5,0 g CaCl ₂ .2H ₂ O, 2,0 mL CHCl ₃ e 5,0 mL solução traços de elementos, que é composta por 50,0 g C ₆ H ₈ O ₇ , 50,0 g ZnSO ₄ .7H ₂ O, 50,0 g NH ₄ Fe(SO ₄) ₂ .12H ₂ O, 2,4 g CuSO ₄ .5H ₂ O, 0,5 g MnSO ₄ .H ₂ O, 0,5 g NaMnO ₄ .2H ₂ O e 10,0 mL CHCl ₃
M615 ^(**)	50 g dextrose 332 mL leite de soja e 10 g CaCO ₃
Sódio-Caseinato ^(**)	0,2 g glicose, 0,05 g K ₂ HPO ₄ , 0,02 g MgSO ₄ .7H ₂ O, 0,02 g caseína e 0,002 g FeCl ₃
TSB ^(**)	17 g produto da digestão enzimática da caseína, 3,0 g produto da digestão enzimática do farelo de soja, 5,0 g de NaCl e 2,5 g dextrose
TSB 5% ^(**)	0,85 g produto da digestão enzimática da caseína, 0,15 g produto da digestão enzimática do farelo de soja, 0,25 g de NaCl e 0,12 g dextrose

* meio utilizado para o crescimento do *Streptomyces violaceolatus*** meio utilizado para o crescimento do *Streptomyces sp.*

Dentre os meios naturais estão: batata dextrose (BD), soro de leite, soro de soja, manipueira, soro de leite + manipueira e Farmal.

O meio líquido BD foi preparado utilizando 80 mL de água destilada, 2 g de dextrose e 20 mL de caldo de batata para cada 100 mL de meio, sendo o caldo de batata preparado da seguinte maneira: 200 g de batata foram descascadas, picadas em cubos e cozidas em 500 mL de água; após 30 minutos a água resultante do cozimento foi filtrada e utilizada no preparo do

caldo, na qual foi transferida para uma proveta de 500 mL e o volume completado com água destilada.

O meio soro de leite é composto pelo resíduo da produção do queijo; o meio soro de soja é composto pelo resíduo da produção do tofu (queijo de soja), o meio manipueira é composto pelo resíduo da produção da farinha de mandioca, o meio soro de leite + manipueira é composto pelos dois resíduos acima descritos e o meio Farmal é composto pelo resíduo da produção do amido de milho.

3.3.3. Fermentação

Todos os meios de cultura, sólido ou líquido, antes de serem utilizados para a incubação do micro-organismo foram submetidos à esterilização em autoclave vertical a 120°C e alta pressão por 20 minutos.

O processo de fermentação foi realizado por meio da transferência do micro-organismo em meio de cultura sólido para o meio de cultura líquido, este procedimento foi realizado utilizando uma alça de platina, na qual uma alçada do micro-organismo em meio de cultura sólido foi transferido para um tubo com água destilada estéril, resultando em uma suspensão de esporos do micro-organismo. Em seguida, esta suspensão foi adicionada nos frasco Erlenmeyer contendo o meio de cultura líquido. Foi convencionalmente adotado um volume de meio de cultura correspondente a 30% do volume do frasco Erlenmeyer, assim, para a fermentação realizada em frascos Erlenmeyers de 125 mL foi necessária a adição de 37,5 mL de meio de cultura. Além disso, o volume de suspensão de micro-organismo foi ajustado de acordo com a quantidade de meio de cultura utilizado, respeitando a proporção de 1 mL da suspensão de micro-organismo para cada 37,5 mL de meio de cultura.

Posteriormente, os frascos Erlenmeyers inoculados, dentro de uma câmara de fluxo laminar estéril, foram submetidos à fermentação sob agitação em mesa agitadora a 28°C e 150 rpm ou mantidos no modo estático.

Adicionalmente, em alguns casos foram realizadas pequenas variações experimentais em relação aos meios de cultura, condições de fermentação e volumes de meio, de acordo com a finalidade específica de cada experimento.

3.3.4. Procedimento de extração do corante

Para ambos os microrganismos selecionados neste trabalho, após o processo de fermentação, o meio de cultura líquido contendo os micélios foi centrifugado a fim de separar os resíduos sólidos do meio líquido, sendo o sobrenadante submetido à extração.

Para a extração do corante roxo produzido pelo *Streptomyces violaceolatus* foram utilizados dois diferentes métodos: extração em fase sólida (SPE) e extração com resina de troca iônica. E para a extração do corante vermelho produzido pelo *Streptomyces sp.* também foi utilizado o método de extração em fase sólido (SPE) e extração líquido-líquido.

3.3.4.1.Extração em Fase Sólida - SPE

A extração do corante através do procedimento de extração em fase sólida (*solid phase extraction* – SPE) foi realizada utilizando a fase estacionária C18 (Chromabond®).

O cartucho de extração, com 10 g de C18, foi previamente ativado com metanol (30 mL) e condicionado com água (30 mL), em seguida 20 mL da amostra foram aplicadas. Foi observada visualmente a retenção da coloração, em seguida, o cartucho foi lavado com água (50 mL) e extraídos com metanol ou etanol (~ 10 mL).

3.3.4.2. Extração com Resina de Troca Iônica

A extração do corante foi realizada utilizando a resina de troca iônica (DOWEX 50 – Sigma®). Nesta etapa 10g de resina foram adicionadas a uma coluna de vidro com 1,5 cm de diâmetro e 30,0 cm de altura.

A coluna foi empacotada com água deionizada, ativada com HCl 1 mol/L (10 mL) e condicionada com água deionizada (50 mL), posteriormente 20 mL da amostra foram aplicadas, onde foi observada a retenção do corante. Em seguida, a resina foi lavada com água deionizada (20 mL) e o corante extraído com NH₄OH 1 mol/L (10 mL) ou NaOH 1 mol/L (10 mL).

3.3.4.3. Extração líquido-líquido

A extração do corante através do método líquido-líquido foi realizada utilizando diferentes solventes extratores como: acetato de etila, clorofórmio e éter.

O fermentado (10 mL), previamente filtrado, foi submetido a três extrações com o solvente extrator (15 mL x 3) em funil de separação. Em seguida, as fases aquosas foram descartadas e as fases orgânicas foram reunidas e concentradas a pressão reduzida em rota evaporador, obtendo assim o extrato bruto.

3.3.5. Desenvolvimento do método cromatográfico

Foram desenvolvidas metodologias analíticas por cromatografia líquida de alta eficiência, no qual foram empregadas as colunas cromatográficas C18 de 10 cm (5µm) da Agilent® e a Luna NH₂ de 25 cm (5µm) da Phenomenex®, e as condições cromatográficas foi específica para cada amostra.

A análise do corante roxo produzido pelo *Streptomyces violaceolatus* foram realizadas com as fases móveis H₂O/MeOH adicionado de 0,1% de NH₄OH. O comprimento de onda empregado foi de 510 nm, no modo gradiente de 70-90% de MeOH com 0,1% NH₄OH em 30 min. e de 30-40 min. modo isocrático 90% de MeOH com 0,1% NH₄OH, com fluxo de 0,6 mL/min.

As análises do corante vermelho produzido pelo *Streptomyces sp.* foram realizadas com as fases móveis H₂O/MeOH adicionado de 0,1% ácido fórmico. O comprimento de onda empregado foi de 265 nm, no modo gradiente de 80-99% MeOH com 0,1% ácido fórmico em 30 min. e de 30-55 min. modo isocrático 99% MeOH com 0,1% ácido fórmico com fluxo de 0,4 mL/min.

3.3.6. Análises de Espectrometria de Massas

As análises por espectrometria de massas foram realizadas por injeção direta no Espectrômetro de Massa Triploquadropolo Varian® Modelo 1200L e no Espectrômetro de Massas Q-TOF II Micromass-UK® do Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas coordenado pelo Prof. Dr. Marcos N. Eberlin, utilizando o softer MassLynx V.4.0 para o tratamento dos espectros.

3.3.7. Análises de Espectrofotometria de UV/Visível

As análises de UV/Vis foram realizadas no Espectrofotômetro UV/Visível Ultrospec™ 5300 *pro* – Amersham Biosciences do Laboratório coordenado pelo Prof. Dr. Pietro Ciancaglini. Todas as amostras foram analisadas em cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm e varridas numa faixa de comprimento de onda de 200 a 800 nm.

Após a fermentação o meio de cultivo foi centrifugado e 1 mL do sobrenadante foi pipetado diretamente na cubeta de quartzo para obter o espectro de UV/Vis. Caso a absorvância de alguma amostra excedesse o limite

aceitável de 1, era realizado um fator de diluição para todas as amostras do mesmo experimento, permitindo assim, a comparação entre amostras.

3.3.8. Análise de Infravermelho

As análises de infravermelho foram realizadas utilizando o espectrofotômetro de infravermelho FTIR – RX Perkin Helmer® empregando o método com pastilha de KBr. A amostra foi seca previamente em *speed vac* e misturada com KBr para a produção da pastilha utilizada para análise.

3.3.9. Análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear foram realizadas no espectrômetro de ressonância de 500MHz da Bruker® DRX – 500, utilizando os solventes deuterados adequados para cada análise, como o D₂O, MeOH-*d*₄, DMSO-*d*₆ e CDCl₃. Além disso, foram utilizados tubos de vidros para quantidades de amostras acima de 5 mg de amostra e tubo shigame para quantidades de amostra abaixo desta massa.

3.3.10. Análise Termogravimétrica

A análise Termogravimétrica foi realizada pelo Analisador Termogravimétrico mod. SDT 2960 Simultaneous DTA-TGA – Tainstruments®, empregando uma rampa de temperatura de 10°C/min. em atmosfera de oxigênio. A amostra empregada neste experimento encontrava-se sólida.

3.3.11. Análises de Espectroscopia Raman

As análises de espectroscopia Raman foram realizadas sem nenhum preparo de amostra, ou seja, o laser foi diretamente incidido sobre a amostra

sólida ou líquida, obtendo o espectro. Para isto, utilizou o espectroscópio Micro Raman LabRam HR 800 - Horiba Jobin Yvon®, empregando laser de diodo operante em comprimento de onda de 632,8 nm e de 785 nm.

3.3.12. Energia Dispersiva de Raios-X (EDX)

A amostra sólida foi analisada sem nenhum preparo de amostra, empregando o espectrômetro de energia dispersiva de raios-X (IXRF System, mod. 500 Digital Processing) acoplado a um microscópio eletrônico de varredura – Zeiss mod. EVO 50).

3.3.13. Ensaio de Mutagenicidade e Citotoxicidade

Os ensaios de mutagenicidade e citotoxicidade foram desenvolvidos em conjunto com o Laboratório de Toxicologia Ambiental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, realizados pela aluna de doutorado Thalita Boldrin Zanoni sob a supervisão da Prof^a. Dr^a. Danielle Palma de Oliveira.

Ensaio de Mutagenicidade

Para a realização deste ensaio foram utilizadas linhagens de *Salmonella typhimurium* que permaneceram armazenadas em ampolas com dimetilsulfóxido (DMSO) em freezer a -70°C. Entretanto, de acordo com Umbuzeiro e colaboradores ⁵⁶, antes da realização do experimento em questão, é necessário avaliar as características genéticas específicas das linhagens, o que foi executado seguindo as recomendações descritas pelo autor. Nesta etapa, foram avaliadas: a dependência de histidina, mutação rfa, plasmídeo pKM101, plasmídeo pYG233 e deleção uvrB.

Foi avaliada também, a taxa de reversão espontânea. Para isto 100 mL de cada cultura foi vertida em uma placa com agar mínimo, meio com

condições nutricionais mínimas para o crescimento da bactéria, e mantida por 66 horas de incubação à 37°C. Em seguida, foi avaliada a taxa de reversão espontânea e os dados foram comparados com o da literatura, uma vez que pode variar de laboratório para laboratório⁵⁴.

A avaliação da atividade mutagênica do corante foi realizada utilizando o protocolo de pré-incubação, onde 100 µL das culturas de cada linhagem foram inoculadas em 20 mL de caldo nutriente e crescidas por 16 horas a 37°C sob agitação. Após crescimento, $1,0 \cdot 10^9$ células/mL de culturas foram colocadas em tubos previamente esterilizados com 100 µL da solução dos corantes em diferentes concentrações e 500 µL de tampão fosfato 0,2 M, para o ensaio na ausência de ativação metabólica. Para o ensaio na presença de ativação metabólica, 500µL da mistura S9, que é composto por um homogenato de células de fígado de rato Sprague-Dawley, pré-tratado com um indutor enzimático a fim de induzir um aumento das enzimas (P450) neste órgão, foram adicionados ao invés do tampão fosfato. Os tubos foram homogeneizados e incubados a 37°C por 30 minutos.

Após esse período foram adicionados 2,0 mL de agar de superfície, a mistura foi então homogeneizada e vertida em placa de Petri com 20 mL de agar mínimo. As placas foram incubadas invertidas, por 66 horas em temperatura de 37°C ($\pm 0,5$), sendo o teste realizado em triplicata.

Como método de comparação em cada ensaio foi empregado um controle negativo e um positivo, sendo o DMSO o controle negativo, uma vez que as células estão na presença deste solvente e nenhum dano é causado na mesma. Com relação aos controles positivos, os quais são compostos mutágenos capazes de reverter o quadro mutagênico da linhagem, foram empregados nos testes sem ativação metabólica (S9) o 4-nitroquinolina-1-óxido a 0,5 µg/placa para TA98 e TA100, a azida sódica a 5,0 µg/placa para a

linhagem TA1535 e o 2-nitrofluoreno para a linhagem YG1042 a 10,0 µg/placa. Para os testes realizados na presença de S9, os controles positivos foram: 2-aminoantraceno a 2,5 µg/placa para TA98, TA100 e YG1042 e para a linhagem TA1535 foi usado este mesmo composto, porém na concentração de 0,0625 µg/placa. A Figura 5 ilustra o esquema deste protocolo.

Figura 5: Esquema do teste *Salmonella*/microsossoma – método de pré-incubação. O número de revertentes por placa foi então avaliado utilizando-se um contador de colônias Phoenix CP600 Plus. Os testes foram feitos acompanhados da avaliação da viabilidade e da taxa de reversão espontânea das linhagens. (Fonte: Teses de Doutorado de Thalita Boldrin Zanoni)

Ensaio de Toxicidade

Avaliação da viabilidade celular utilizando ensaio “Exclusão por azul de tripano” foi realizada utilizando células HepG2 (hepatoblastoma humano). As células foram plaqueadas com $2,5 \times 10^5$ em placas de cultura de 24 poços e após 24 horas foram expostas ao composto de interesse nas seguintes concentrações: 0; 0,3; 0,5; 0,8; 1,6 e 3,3 mg/L durante os seguintes

períodos: 1, 2, 3 e 24 horas. O corante foi solubilizado em PBS (pH 7.4) que não é tóxico para as células. O controle negativo usado para o teste foi o PBS (pH 7.4) nos mesmos volumes para o qual foram adicionados os corantes aos poços da placa de cultura. Cada poço foi então lavado com 1 mL de PBS (pH 7.4), posteriormente foi adicionado 0,5 mL de tripsina em cada poço a fim de ressuspender as células, em seguida adicionou-se 0,5 mL de meio DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium) sendo o conteúdo centrifugado por 5 minutos, o sobrenadante descartado e as células então contadas um total de 100 em câmara de Neubauer de acordo com a metodologia descrita por Kassie e Knasmüller⁴⁹.

Porém, vale ressaltar que todo o procedimento foi realizado de acordo com a metodologia descrita na Dissertação de Mestrado intitulada *“Investigação das rotas de biotransformação do grupo cromóforo e avaliação toxicológica parcial dos corantes dispersos sudan III e disperso amarelo 9”* de autoria de Thalita Boldrin Zanoni, disponível no formato digital na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (www.teses.usp.br).

4. Resultados e Discussões

4.1. *Screening* dos micro-organismos

O *screening* foi realizado na micoteca do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente laboratório coordenado pelo pesquisador Dr. Itamar Soares de Melo.

Foram monitorados aproximadamente 1000 micro-organismos de diferentes espécies. O *screening* foi realizado de forma visual, onde os micro-organismos que apresentavam coloração no meio de cultura sólido preservado em placa de Petri ou em frascos do tipo penicilina com água estéril pelo método Castellani⁵⁰⁻⁵², foram selecionados para estudo.

Nesta etapa, foram selecionados 20 micro-organismos, que apresentavam algum tipo de coloração em meio de cultivo sólido. Deste, um que apresentou coloração roxa foi escolhido para estudo posterior de fermentação, isolamento e caracterização do corante. O outro micro-organismo estudado foi selecionado de forma visual após uma etapa de fermentação realizada por membros de nosso grupo de pesquisa, o qual apresentou coloração vermelha, sendo que em meio sólido este não apresenta coloração.

A fim de facilitar a compreensão dos resultados obtidos para ambos os corantes estudados, este capítulo será dividido em duas partes. Na primeira serão apresentados e discutidos os resultados obtidos para o corante roxo (*Streptomyces violaceolatus*) e na segunda parte serão apresentado e discutido todos os resultados obtidos para o corante vermelho (*Streptomyces sp.*).

4.2. Corante Roxo (*Streptomyces violaceolatus*)

4.2.1. *Isolamento e Caracterização do micro-organismo*

O primeiro micro-organismo selecionado foi isolado da rizosfera do milho pela Dr^a. Flávia Mandolesi Pereira de Melo, o qual foi identificado por

análises morfológicas, sequenciamento do gene 16s rRNA e perfil de ácidos graxos (FAME – *Fatty Acid Methyl Ester*), tendo sido caracterizado como *Streptomyces violaceolatus*, com 98,93% de similaridade. De acordo com Stackebrandt e Goebel⁵³, valores acima de 98% de similaridade indicam que a linhagem pertence a mesma espécie.

Existem poucos relatos na literatura sobre o estudo de metabólitos secundários produzidos pelo *Streptomyces violaceolatus* até o momento. De acordo com o *Dictionary of Natural Products* apenas 3 compostos da classe das Urdamycin A, foram identificadas como sendo produzidos por este micro-organismo, a Kerriamycin A, a Kerriamycin B e a Kerriamycin C, que apresentam coloração amarela, alaranjada e amarela, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4: Compostos produzidos pelo *Streptomyces violaceolatus* descritos no banco de dados *Dictionary of Natural Products*, da esquerda para a direita, tem-se o nome químico, fórmula molecular, massa molecular, descrição física e estrutura química (Fonte: *Dictionary of Natural Products*).

Nome químico	Fórmula Molecular	Massa Molecular	Descrição Física	R1	R2
Urdamycin A; 3C – cetona	C ₄₃ H ₅₄ O ₁₇	842,889	Pó amarelo
Urdamycin A	C ₄₃ H ₅₆ O ₁₇	844,905	Sólido alaranjado
Urdamycin A; 12-O-Deglycosyl	C ₃₇ H ₄₆ O ₁₅	730,761	Pó amarelo	OH

4.2.2. Ensaio de Mutagenicidade com *Salmonella*

A primeira etapa do nosso trabalho foi o estudo da toxicidade e mutagenicidade do extrato.

O teste de mutagenicidade foi realizado com *Salmonella typhimurium/microsoma*, conhecido também como Teste de Ames, é basicamente um ensaio de mutação bacteriana reversa, no qual é capaz de detectar mutações genéticas causadas por uma gama de compostos químicos⁵⁴.

Este teste emprega linhagens de *Salmonella* dependente de histidina com mutações pré-existentes, o qual impossibilita a síntese do aminoácido essencial, histidina, impossibilitando o seu crescimento. Porém, na presença de compostos que são predispostos a causar mutações genéticas, denominados de mutágenos; novas mutações podem ser geradas perto ou no local da mutação pré-existente do gene da bactéria, reativando-a, ou seja, revertendo a mutação. Caracterizando assim, o potencial mutagênico do composto testado⁵⁴.

As linhagens utilizadas, neste estudo, foram a TA98, TA100, TA1535 e YG1042. A mutação *hisG461*, presente na TA100 e TA1535 resulta da substituição de uma leucina (GAG/CTC) por uma prolina (GGG/CCC), sendo marcador para agentes mutagênicos que causam substituição de pares de bases. A mutação *hisD3052* presente na linhagem TA98 é responsável pelo deslocamento do quando de leitura pela sequência constituída de oito resíduos CG (CGCGCGCG) repetitivos⁵⁵. Já a mutação presente na linhagem YG1042 também resulta na substituição de uma leucina (GAG/CTC) por uma prolina (GGG/CCC)⁵⁶, além disso, esta linhagem é proveniente da introdução de um plasmídeo contendo os genes de acetiltransferase e nitroredutase na linhagem

TA100, sendo portanto mais sensível para análises de compostos nitro e aminas aromáticas⁵⁷.

Como já se sabe que, as bactérias não possuem a mesma capacidade metabólica do ser humano, foi realizada a ativação metabólica exógena com uma fração microsomal (S9), que induz um aumento das enzimas (P450) neste órgão. Com isto, o teste se torna mais sensível, uma vez que alguns compostos apesar de não se apresentar mutagênico podem gerar intermediários mutagênicos após metabolização⁵⁴.

Para tanto foram realizados os ensaios de mutagenicidade com as linhagens de *Salmonella* acima citadas com e sem ativação metabólica exógena (S9).

Para a realização do ensaio é necessário que o composto de interesse seja solúvel em DMSO (Dimetilsulfóxido). Assim, foi testada a solubilidade do composto colorido produzido pelo *Streptomyces violaceolatus*, partindo da concentração de 5mg/placa, dose máxima recomendada pela Sociedade Brasileira de Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese Ambiental (SBMCTA) para produtos puros. Porém se o composto de interesse não apresentar solubilidade na referida concentração, recomenda-se testar concentrações menores, a fim de alcançar a solubilidade máxima do composto a ser testado.

Para o composto roxo testado constatou que a concentração máxima foi de 1 mg/placa, que apresentou solubilidade aceitável em DMSO.

Utilizou-se, então, a dose máxima de 1mg/placa e empregou doses subsequentes em intervalos logarítmicos, sendo: 1mg/placa, 0,1 mg/placa, 0,01 mg/placa, 0,001 mg/placa e 0,0001 mg/placa.

Nestas concentrações estudadas, foram obtidos resultados negativos tanto para as linhagens de *Salmonella* de triagem TA98 e TA100, quanto para as linhagem TA1535 e YG1042, com e sem ativação metabólica exógena (S9).

As linhagens TA1535 e TA100 avaliam mutações de substituição de pares de bases, e de acordo com a Figura 6b o composto colorido não foi capaz de induzir esse tipo de mutação. A Figura 6a demonstra que o composto também não é capaz de avaliar deslocamento do quadro de leitura que é demonstrado pela avaliação mutagênica da linhagem TA98, ainda para a Figura 6a, lembrando que a linhagem TG1042 apresenta uma superprodução da enzima nitroredutase, uma vez que possui o gene produtor desta enzima, nota-se que esta não foi capaz de alterar o composto de interesse gerando um composto mutagênico, uma vez que não foi observado nenhum potencial mutagênico para o composto testado com esta linhagem.

Figura 6: Resultados negativos de mutagenicidade para o corante produzido pelo *Streptomyces violaceolatus*, a) com as linhagens TA98 e YG1042 com e sem ativação metabólica S9 e b) com as linhagens TA100 e TA1535 com e sem ativação metabólica S9.

Estes resultados sugerem que a ativação metabólica no citocromo P-450 (S9) não promove a formação de compostos mutagênicos visto que nossos resultados demonstram ausência de mutagenicidade para todas as linhagens testadas na presença de S9. Esses dados demonstram que o composto colorido produzido pelo *Streptomyces violaceolatus* não é mutagênico antes e nem depois das reações de metabolização.

Desta forma, podemos concluir que este composto colorido apresenta grande potencial para a aplicação industrial.

4.2.3. Ensaio de Toxicidade

Os testes de toxicidade foram realizados empregando a técnica de viabilidade celular com Azul de Tripiano, a qual é uma técnica clássica de avaliação de morte celular, no qual se baseia na coloração das células inviáveis, cuja membrana celular encontra-se danificada. O que não ocorre para as células viáveis que apresenta sua membrana celular íntegra. Vale ressaltar, que esta técnica detecta células que possuem danos na membrana celular, mas não é capaz de detectar células cujos danos afetarão a adesão celular ou que podem progredir para a morte celular⁵⁸.

O ensaio de toxicidade foi realizado utilizando diferentes tempos de incubação: 1, 2, 3 e 24 horas. De acordo com os gráficos apresentados na Figura 7 é possível observar que o composto colorido não apresentou efeito dose-resposta de morte das células HepG2 (*Human hepatocellular liver carcinoma cell line*) após incubação de 1, 2, 3 e 24 horas a 37° C nas concentrações testadas. Essa relação é bastante clara uma vez que, após realizar análise estatística todos os valores estão dentro da faixa aceitável ($p > 0.05$), não apresentando indução de morte celular significativa.

Figura 7: Avaliação da viabilidade celular por Azul de Tripiano do corante produzido pelo *Streptomyces violaceolatus* em cinco diferentes concentrações: 0,3 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,8 mg/mL, 1,6 mg/mL e 3,3 mg/mL, por um período de incubação de a) 1 hora à 37°C, b) 2 hora à 37°C, c) 3 hora à 37°C e d) 24 hora à 37°C.

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que o composto colorido produzido pelo *Streptomyces violaceolatus* não apresentou atividade citotóxica no teste de viabilidade celular por Azul de Tripiano. Este resultado é de grande valia, uma vez que reforça a viabilidade e possibilidade da aplicação industrial deste corante.

4.2.4. Estudo da Produção do Corante

O micro-organismo *Streptomyces violaceolatus* foi preservado em meio de cultura sólido ACA (Amido-Caseína-Agar) como demonstrado na Figura 8a.

Os meios de cultura sólido ACA foram preparados seguindo as mesmas quantidades de nutrientes descrito no item 3.3.2.2 (página 20). A primeira etapa foi submeter o *Streptomyces violaceolatus* a condições de crescimento empregando o meio de cultura líquido AC (Amido-Caseína). A transposição de crescimento do meio sólido para o meio de cultura líquido facilita o processo de extração do corante.

As fermentações foram realizadas com agitação e em modo estático. Para as fermentações realizadas em modo estático não houve a produção de coloração.

As fermentações sob agitação, após um período de 12 dias o meio de cultura AC apresentou uma coloração roxa intensa, como pode ser observado na Figura 8b.

Este resultado possibilitou a realização do escalonamento do sistema de fermentação utilizando dois diferentes procedimentos: 1º) o micro-organismo foi adicionado em um frasco Erlenmeyer contendo 50 mL de meio de cultura, após 4 dias o fermentado foi transferido para outro frasco Erlenmeyer contendo mais 300 mL de meio de cultura e novamente após 4 dias, os 350 mL foram transferidos para um frasco contendo 3,650 L, resultando em um volume total de 4L. 2º) 4 L de meio de cultura foram preparados e incubados diretamente com a suspensão de micro-organismo. Porém, apenas o segundo modo de escalonamento foi eficiente para a produção do corante em larga escala, como apresentado na Figura 8c.

Nesta etapa, verificou-se que para o segundo procedimento a produção do corante foi mais eficiente comparada ao primeiro procedimento. Isto se deve ao fato que o corante de interesse se trata de um produto do metabolismo secundário, sabendo que este é produzido principalmente após o período de crescimento, podendo estar relacionado com a escassez de nutrientes, no segundo caso a produção do corante é

favorecida. Já no primeiro caso, a produção do metabólito secundário é interrompido todas as vezes que é realizado a transferência do meio de cultivo contendo o micro-organismo para outro frasco contendo mais meio de cultivo.

Figura 8: *Streptomyces violaceolatus* a) em meio de cultura sólido ACA (Amido-Caseína-Agar), b) fermentado em 30 mL de meio de cultura líquido AC e c) fermentado em 4 L de meio de cultura líquido AC.

4.2.4.1. Monitoramento da produção do corante

Para o monitoramento da produção do corante foi utilizado um método espectroscópico. Desta forma, foi obtido um espectro de UV/Vis do meio de cultivo após 12 dias de fermentação na faixa de 200nm a 800nm, como apresentado na Figura 9a. Podemos observar na região do visível uma banda larga com comprimento de onda máximo em 530 nm. Assim, este comprimento de onda foi empregado no monitoramento dos demais experimentos realizados neste trabalho.

Figura 9: a) Espectro de UV/Vis do composto colorido com λ máx. de 530 nm, b) Acompanhamento via UV/Vis da produção do corante pelo micro-organismo em função do tempo em dias de fermentação realizado em diferentes frascos Erlenmeyers e c) Acompanhamento via UV/Vis da produção do corante pelo micro-organismo em função do tempo em dias de fermentação realizado em um único frasco Erlenmeyer s.

Para verificar o perfil de produção do corante em função dos dias de fermentação foram realizados dois ensaios distintos. Para tanto, a fermentação foi monitorada por um período de 20 dias e o aumento de coloração foi avaliado por espectrofotometria UV/Vis. Foi observado visualmente que a partir do quarto dia de fermentação o meio começou apresentar coloração, a qual foi aumentando gradativamente.

No primeiro experimento 300 mL de meio de cultura líquido AC foram preparados e fracionados em 20 frasco Erlenmeyer s (50 mL) contendo 15 mL de meio de cultura cada. Em seguida, a mesma quantidade de suspensão de micro-organismo foi adicionado em cada frasco Erlenmeyer e submetido à

fermentação sob agitação. A cada dia de fermentação um frasco Erlenmeyer foi retirado do *shaker* e o fermentado centrifugado. Posteriormente, o sobrenadante foi submetido à análise de UV/Vis. Os resultados obtidos nesta etapa estão apresentados na Figura 9b.

Como podemos observar na Figura 9b o monitoramento realizado no primeiro experimento apresentou uma variação grande da absorvância, principalmente após o 13º dia de fermentação, o que pode estar relacionado com erros experimentais.

No segundo experimento foi utilizado frasco Erlenmeyer de 1 L contendo 300 mL de meio de cultura. Para o monitoramento da produção do corante, uma alíquota de 1,5 mL do meio de cultura foi retirada, em fluxo laminar, em dias consecutivos, durante 20 dias. O meio de cultura pipetado foi centrifugado e submetido à análise de UV/Vis.

Na Figura 9c foi observado uma curva de produção mais homogênea. No entanto, a intensidade da absorvância medida para o segundo experimento foi aproximadamente duas vezes menor quando comparado com o primeiro experimento. Isto pode estar relacionado a diferentes quantidades de células transferidas para cada frasco Erlenmeyer nos dois experimentos.

Com base na curva de crescimento observada na Figura 9 foi adotado 12 dias de fermentação, como período de tempo adequado para a realização dos experimentos posteriores.

4.2.4.2. Variação do meio de cultura

Já se sabe que a produção de alguns metabólitos secundários por *Streptomyces*, principalmente antibióticos, são gerados sob stress fisiológico, como a limitada quantidade de nutrientes. Assim, a natureza e a concentração dos nutrientes presentes nos meios de cultura podem afetar diretamente a

produção de metabólitos secundários, podendo inibir ou ativar diferentes vias metabólicas, o qual pode favorecer, ou não, a produção do composto bioativo de interesse⁵⁹.

Neste sentido, para a avaliação do efeito do meio de cultivo, bem como das condições de fermentação, alguns meios de cultura foram utilizados para a fermentação sob agitação e sem agitação. Para efeito de comparação o meio AC foi empregado como referência.

Os meios de cultura sintéticos e semissintéticos empregados foram: Khanna, Voguel, Segato Rizzatti, Czapeck, M-5 e Adams (item 3.3.2.2, página 20).

Dentre os seis meios de cultura estudados, apenas o meio M-5 produziu coloração marrom, além do meio padrão AC (roxo), como apresentado na Figura 10. Porém, dentre os dois meios de cultura estudados o meio AC se mostrou mais promissor, uma vez que resultou em uma coloração mais intensa, semelhante à observada no meio de cultura sólido. Assim, o meio AC foi selecionado para a realização de estudos posteriores, de variações das fontes de carbono e nitrogênio.

Figura 10: Resultado da fermentação em diferentes meios sintéticos e semi-sintéticos no período de 12 dias com agitação. Da esquerda para a direita têm-se os meios AC, Khanna, Voguel, Segato Rizzatti, Czapeck, M-5 e Adams.

Sabe-se que os resíduos industriais são grandes preocupações para o meio ambiente, podendo afetar tanto o ecossistema aquático quanto o terrestre,

caso estes resíduos não passem por processos de tratamento antes de ser escoados para os rios, lagos e esgoto, por exemplo. Neste contexto, o interesse de (re)utilização de resíduos industriais ou subproduto no processo de fermentação para a obtenção de bioprodutos com maior valor agregado está crescendo a cada dia, uma vez que viabiliza a produção do produto em questão e possibilita o aproveitamento de matéria-prima de baixo custo, e consequentemente, diminui o impacto ambiental relacionado com o acúmulo dos dejetos⁶⁰.

Atualmente vários estudos estão fazendo uso de resíduos industriais na obtenção de produtos com relevantes utilizações nas indústrias farmacêuticas e alimentícias, como o xilitol obtido de resíduos lignocelulósicos por via biotecnológica utilizando levedura⁶¹ e a riboflavina obtida de subproduto industrial de óleos vegetais⁶².

Neste intuito, foram utilizados quatro meios de cultura denominados como naturais que são provenientes de resíduos industriais: a manipueira, resíduo da produção da farinha de mandioca; o soro de leite, resíduo da fabricação de queijo; o soro de soja, resíduo da produção do queijo de soja, conhecido como tofú e o farmal, resíduo da produção do amido de milho. Vale lembrar, que os meios foram utilizados *in natura*.

Porém, nenhum meio de cultura natural, apresentou resultado satisfatório, ou seja, nenhum meio produziu coloração nem favoreceu o crescimento do *Streptomyces violaceolatus* submetido à fermentação com agitação e sem agitação. No entanto, acreditamos que a utilização de resíduos agroindustriais como meio de cultura deve ser melhor estudada, fazendo uso, se necessário, de suplementação destes meios com outras fontes de carbono e nitrogênio.

4.2.4.3. Variação da fonte de Carbono e Nitrogênio

A biossíntese de metabólitos secundários pelos micro-organismos é dependente de vários fatores externos. Dentre eles a fonte de carbono e nitrogênio apresentam grande relevância, pois estão relacionados tanto com a disponibilidade de substrato para a síntese de metabólitos quanto com a modulação do processo enzimático, podendo ativar e estabilizar as enzimas envolvidas no processo⁶³.

Alguns açúcares, como a glicose, são comumente utilizados como fontes de carbono para o crescimento e produção de metabólitos secundários, porém a produção de alguns metabólitos é reprimida por esta fonte de carbono, por meio da inibição de alguma enzima do processo, levando a ativação de outras vias. No caso da produção da *Cephamicin C* pelo *Streptomyces clavuligerus*, a presença de glicerol inibiu a enzima cephamycin C sintetase, diminuindo a produção da *Cephamicin C*. Porém, o glicerol é uma ótima fonte de carbono para a produção do ácido clavulanico por este micro-organismo⁶⁴.

A modificação da fonte de carbono e nitrogênio do meio de cultura líquido AC, composto por 10,0 g/L de amido, 0,3 g/L de caseína e 2,0 g/L de NaNO₃, além de outros nutrientes, foi realizado trocando as quantidades em massa de amido (fonte de carbono) ou caseína e NaNO₃ (fontes de nitrogênio) por diferentes fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Assim, para a variação da fonte de carbono as 10,0 g/L de amido foram substituídas por diferentes fontes de carbono e para a variação da fonte de nitrogênio a soma da massa de caseína e NaNO₃ (2,3 g/L) foram substituídas pelas diferentes fontes de nitrogênio.

As fontes de carbono estudadas foram: glicose, frutose, maltose, sacarose, glicerina, fécula de batata, polvilho doce e karo (yoki®); e as fontes de nitrogênio foram: peptona, extrato de carne, extrato de levedura, grão de soja

moída, proteína texturizada de soja, extrato de malte, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4NO_3 e TSB (*tryptic soy broth*).

Com relação à modificação da fonte de carbono, verificou-se que dentre as oito fontes de carbono empregadas os meios com glicerina, fécula de batata e polvilho doce apresentaram coloração roxa, semelhantes ao meio AC, como apresentado na Figura 11.

Figura 11: Fermentação do *Streptomyces violaceolatus* em meio AC com diferentes fontes de carbono, da esquerda para a direita temos: AC, glicerina, Karo®, polvilho doce, fécula de batata, maltose, sacarose, frutose e glicose.

Como observado na Figura 11, é possível constatar que as fontes de carbono mais promissoras são constituídas basicamente de amido extraído de diferentes fontes. Como a Maizena® (amido de milho) a fécula de batata (amido de batata) e polvilho doce (amido de mandioca). Diferença entre as intensidades de coloração dos fermentados, podem estar relacionadas com as diferentes quantidades de amilose e amilopectina (principais constituintes do amido) presentes em cada tipo de amido.

Com a finalidade de distinguir as intensidades de coloração dos diferentes meios de cultura foram realizadas análises de UV/Vis. Os espectros obtidos para cada meio de cultivo contendo diferentes fontes de carbono estão mostrados na Figura 12a. Na Figura 12b é possível constatar a intensidade de

absorvância dos meios em 530 nm. Assim, verifica-se que o meio com fécula de batata foi o que apresentou maior intensidade de coloração, seguido pelo polvilho doce. E o glicerol apresentou intensidade semelhante ao meio AC.

Figura 12: Análise de UV/Vis dos fermentados obtidos com a modificação da fonte de carbono do meio de cultura, a) espectro de UV/Vis na região de 250-700 nm b) gráfico da absorvância em 530 nm versus fontes de carbono.

Com respeito à fonte de nitrogênio, assim como a fonte de carbono, podem afetar a produção de metabólito secundário de interesse. Brzonkalik e colaboradores⁶⁵ avaliaram o efeito da fonte de nitrogênio na produção de micotoxina pela *Alternaria alternata*, e constataram que algumas fontes de nitrogênio inorgânicas inibiram a produção desta micotoxina.

Assim, para avaliar o efeito da fonte de nitrogênio foram testadas onze fontes de nitrogênio, sendo elas: peptona, extrato de levedura, extrato de carne, TSB, proteína texturizada de soja, grão de soja moída, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4Cl , NH_4NO_3 e extrato de malte.

Verificou-se que dentre as onze fontes de nitrogênio testadas, cinco apresentaram coloração roxa, semelhante à observada para o meio AC, sendo elas: o extrato de levedura, o TSB, a proteína texturizada de soja, o extrato de carne e a grão de soja moída (Figura 13).

A fim de investigar as intensidades de coloração resultante da fermentação com diferentes fontes de nitrogênio foram efetuadas análises de UV/Vis. Com base no espectro de UV/Vis e gráfico apresentado na Figura 14, podemos inferir que os meios contendo as fontes de nitrogênio extrato de levedura e TSB foram as mais promissoras, seguida pela proteína texturizada de soja, extrato de carne e grão de soja moída. Apenas o meio com peptona apresentou intensidade menor que o meio AC de referência.

Figura 13: Fermentação do *Streptomyces violaceolatus* em meio AC com diferentes fontes de nitrogênio, da esquerda para a direita temos: AC, extrato de levedura, TSB, proteína texturizada de soja, extrato de carne, grão de soja moída e peptona.

Figura 14: Análise de UV/Vis dos fermentados obtidos com a modificação da fonte de nitrogênio do meio de cultura, a) espectro de UV/Vis na região de 250-700 nm b) gráfico da absorvância em 530 nm versus fontes de nitrogênio.

Vale lembrar que o glicerol é um subproduto da produção do biodiesel, correspondendo a 10% do volume total na produção deste combustível. Sua produção está em constante crescimento, devido principalmente a lei 11097/2005 do governo brasileiro, que estabelece a obrigatoriedade de adicionar biodiesel (atingir 5% até 2013) ao combustível de petróleo^{66, 67}.

É possível imaginar que este subproduto, assim como os outros resíduos industriais, deverá aumentar ao longo dos anos. Este aumento na produção provocará um aumento nas preocupações ambientais. Com o intuito de minimizar estes problemas vários estudos estão fazendo uso de estratégias biotecnológicas para destinar este subproduto na obtenção de novos bioprodutos de maior valor agregado, além de tornar a produção do biodiesel mais rentável⁶⁸.

Neste contexto, foi realizado um estudo para verificar o efeito da variação da concentração de glicerol na produção do corante. Para isto, foi realizado um experimento substituindo o amido do meio de cultura AC (item 3.3.2.2) por 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20% e 30% em

massa de glicerina. O meio caracterizado com 0% de glicerol corresponde ao meio AC com amido.

Para efeito de comparação das intensidades da coloração foram realizadas análises de UV/Vis dos fermentados resultantes, apresentados na Figura 15.

Este estudo mostrou que na concentração de 5% de glicerol ocorreu a produção máxima do corante roxo (Figura 15b), e em concentrações acima de 10% de glicerina não houve a produção de coloração (Figura 16). Este fato pode ser atribuído à inibição de alguma enzima responsável pelo crescimento e metabolismos do micro-organismo, ou ainda, devido à osmose reversa, o que impossibilita que o micro-organismo cresça pelo fato de estar em condições de conservação, uma vez que se faz uso do glicerol na preservação de micro-organismo a baixas temperaturas, impedindo o rompimento das células pela formação de cristais de gelo.

Figura 15: a) Espectro de UV/Vis dos meios de cultura AC contendo diferentes concentrações de glicerina. b) Absorvância do corante em 530 nm em função a concentração de glicerina no meio de cultura AC.

Figura 16: Fermentação do *Streptomyces violaceolatus* em meio de cultura AC com diferentes concentrações de glicerina como fonte de carbono. Da esquerda para a direita, tem-se 30%, 20%, 15%, 10% e 5% de glicerina.

Como foi observado na Figura 12, Figura 15 e Figura 16, o glicerol se apresenta como uma fonte de carbono promissora na obtenção do corante roxo. Desta forma, com o intuito de investigar a influência do meio com 5% de glicerol com diferentes fontes de nitrogênio, foi realizado um novo estudo para avaliar diferentes fontes de nitrogênio. Foram empregadas as mesmas fontes descritas no experimento realizado anteriormente para o meio AC, no entanto utilizando como fonte de carbono o glicerol na concentração de 5%.

Dentre as onze diferentes fontes de nitrogênio estudadas, verificou-se que seis apresentaram coloração roxa, sendo os meios com peptona, extrato de levedura, extrato de carne, TSB, proteína texturizada de soja e grão de soja moída, além do meio AC, sem amido e com 5% de glicerol (Figura 17).

Dentre as fontes de nitrogênio que não foram promissoras para a produção de coloração estão o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4Cl , NH_4NO_3 e extrato de malte. Portanto, verifica-se inibição da produção de corante na presença de sais inorgânicos, semelhante ao resultado observado para a produção de micotoxina pela *Alternaria alternata*⁶⁵.

Figura 17: Fermentação do *Streptomyces violaceolatus* em meio AC modificado com 5% de glicerol utilizando diferentes fontes de nitrogênio, da esquerda para a direita temos: AC, peptona, extrato de levedura, extrato de carne, TSB, proteína texturizada de soja, grão de soja moída.

Como pode ser observado na Figura 17 existe uma pequena variação na intensidade de coloração dos meios de cultura contendo diferentes fontes de nitrogênio. A fim de comprovar a intensidade de coloração dos diferentes meios de cultura foram realizadas medidas UV/Vis (Figura 18).

Figura 18: a) Espectro de UV/Vis dos meios de cultura líquido AC com glicerol com diferentes fontes de nitrogênio, os quais apresentaram coloração roxa. b) Gráfico da absorvância do corante em 530 nm versus as diferentes fontes de nitrogênio utilizadas no meio de cultura.

A Figura 18b apresenta o gráfico de intensidade da absorvância em 530 nm dos fermentados em função das fontes de nitrogênio utilizadas, os quais apresentaram coloração roxa. Observamos que o meio líquido contendo

extrato de levedura apresentou maior intensidade, seguido dos meios com peptona e extrato de carne. Os meios com TSB, proteína texturizada de soja e grão de soja moída apresentaram intensidades de coloração abaixo do meio de referência AC.

Com relação à variação da fonte de nitrogênio, podemos inferir que a fonte de nitrogênio mais promissora foi o extrato de levedura, o qual apresentou resultados satisfatórios para ambas as fontes de carbono testadas, amido e glicérol.

4.2.4.4. Estudo do efeito da radiação luminosa na produção do corante

Na maioria dos organismos a luz, bem como a temperatura, são sinais cruciais do meio ambiente para o desenvolvimento de processos regulatórios e fisiológicos^{69,70}. Por conseguinte, a capacidade de perceber e reagir à luz é evolutivamente conservada pelos micro-organismos, que são capazes de produzir metabólitos secundários, como os corantes, como mecanismo de defesa⁷¹. Para o fungo *Fusarium*, já foi relatado que a luz é um sinalizador para a produção de carotenóides, pois este possui um foto-receptor que induz a produção deste metabólito secundário⁷².

Neste contexto, foi realizado um estudo sobre o efeito da radiação luminosa durante a fermentação do *Streptomyces violaceolatus*. O experimento consistiu em submeter o *Streptomyces violaceolatus* a fermentação em meio de cultura AC sob radiação luminosa ambiente e sob radiação luminosa induzida 24 horas, empregando uma lâmpada Grolux®, o qual simula a luz natural. O experimento foi realizado sob agitação constante.

Após 12 dias de fermentação foi observado que a intensidade de coloração do meio de cultura sob radiação luminosa foi menor quando comparada a intensidade de coloração do meio AC sob radiação luminosa

ambiente. Além disso, a tonalidade do meio se mostrou um pouco diferente (Figura 19).

Com base neste resultado podemos sugerir que a produção do corante roxo pelo *Streptomyces violaceolatus* não está diretamente relacionado com um mecanismo de defesa contra a radiação luminosa, uma vez que a radiação luminosa não estimulou a produção do corante.

Figura 19: Avaliação do efeito da radiação luminosa na fermentação do *Streptomyces violaceolatus*. a) em meio de cultura AC sem radiação de luz e com radiação de luz após 12 dias, respectivamente. b) ampliação da Figura a.

A observação feita acima com respeito à intensidade da coloração dos meios de cultivo foi corroborada com a análise de UV/Vis mostrada na Figura 20, na qual se pode constatar a maior absorvância do fermentado obtido sem a radiação luminosa, que está relacionado com a intensidade da cor.

Figura 20: Análise de UV/Vis do fermentado do *Streptomyces violaceolatus* com e sem radiação luminosa a) espectro de UV/Vis e b) gráfico da absorvância em 530 nm versus indução da radiação luminosa.

4.2.4.5. Dependência de O₂

A presença de oxigênio no meio de cultivo é de extrema importância para a maioria dos processos fermentativos, por ser responsável pela respiração aeróbica de alguns micro-organismos.

Como observado anteriormente, a fermentação no modo estático não produziu o corante. Assim, como o objetivo de avaliar o efeito da aeração no meio de cultivo para a produção do corante roxo, foi realizado um estudo utilizando diferentes volumes de meio de cultura em frasco Erlenmeyer idênticos, o qual deve refletir no nível de aeração e, conseqüentemente na concentração de oxigênio disponível⁶⁸.

Para tanto, utilizou-se frasco Erlenmeyer de 125 mL com 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% e 80% do seu volume referente ao meio de cultura AC, em seguida foram submetidos a agitação em mesa agitadora orbital à 150 rpm por 12 dias.

A Figura 21 apresenta os frascos após 12 dias de fermentação, com exceção do último frasco, 80% de meio cultura, os demais frascos apresentaram

a produção do corante. Porém, foi realizado análise de UV/Vis, o qual comprova que os mais oxigenados, ou seja, com menos volume de meio de cultura, apresentaram maior produção do corante (Figura 22b).

Figura 21: Avaliação da dependência de oxigênio na fermentação do *Streptomyces violaceolatus* com a utilização de diferentes volumes de meio de cultura, da esquerda para a direita temos: 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% e 80% do volume do frasco Erlenmeyer correspondente ao meio de cultura.

Figura 22: a) Espectros dos fermentados do *Streptomyces violaceolatus* submetido à fermentação utilizando diferentes volumes de meio de cultura para a avaliação da dependência de oxigênio, b) Gráfico da intensidade da absorvância em 530 nm versus volume de meio de cultura.

Entretanto, quando analisamos os espectros de UV/Vis, o fermentado do frasco com 80% do volume de meio de cultura apresentou um perfil diferente dos demais espectros obtidos. Assim, acreditamos que a baixa concentração de oxigênio dissolvido no meio favoreceu a produção de outro

metabólito secundário, que apresenta absorvância máxima em comprimento de onda de 350 nm.

Neste ponto, é possível justificar a diferença na intensidade de absorvância obtida entre os experimentos realizados para o monitoramento da produção do corante (item 4.2.4.1, página 40), uma vez que o experimento realizado em frasco Erlenmeyer s de 50 mL com 15 mL de meio de cultura é mais passível de uma melhor aeração que o experimento realizado em frasco Erlenmeyer s de 1 L com 300 mL de meio de cultura, devido principalmente ao pequeno volume de meio de cultura presente no frasco Erlenmeyer .

4.2.4.6. Adição de Ferro

O ferro é um elemento essencial para o metabolismo e crescimento dos micro-organismos e apesar de ser encontrado em grande abundância na crosta terrestre a disponibilidade deste elemento é muito baixa, devido a baixa solubilidade do Fe (III) em pH fisiológico, que corresponde a uma concentração menor que $1,0 \cdot 10^{-7} \text{M}$. Porém, para metabolizar o ferro os micro-organismo biossintetizam moléculas denominadas de sideróforos que são capazes de quelar o ferro, tornando-o solúvel e sendo capaz de transportá-lo para dentro da célula^{73,74}.

Segundo estudo realizado por Ohshima e colaboradores⁷⁵, foi observado que a produção do corante denominado *neopurpuratin* (Figura 23a), um complexo de ferro de coloração roxa, aumentava gradativamente com o aumento da concentração de sulfato de ferro adicionado no meio de cultura, sendo um fator essencial na otimização da produção do mesmo.

Além deste sideróforo, vários outros foram caracterizados e elucidados. Porém a observação chave foi feita por Garibaldi e Neilands em 1956, sobre o modo de ação desses sideróforos como fatores de crescimento, quando

demonstraram que a produção de Ferricromo A foi reforçada pelo crescimento do micro-organismo *Ustilago sphaerogena* em meio deficiente de ferro⁷⁴. Concomitantemente, as ferrioxaminas e ferrimicinas foram descobertas pelo grupo de pesquisa do Zurich e Ciba, dentre elas a desferrioxamina B (Figura 23b)⁷⁴.

Figura 23: Estruturas dos sideróforos: (a) neopurpuratin e (b) desferrioxaminas (desferrioxamina B – R₁ = H e R₂ = CH₃).

Com o objetivo de avaliar a influência do ferro no meio de cultura para a produção do corante pelo *Streptomyces violaceolatus* foi adicionado sulfato de ferro antes e após a fermentação. Foram avaliadas cinco concentrações diferentes de sulfato de ferro II no meio de cultura: 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 mg/mL.

A adição de sulfato de ferro antes da fermentação foi realizada durante o preparo do meio de cultura, antes do processo de esterilização em autoclave. Após 12 dias de fermentação não foi possível distinguir visualmente a diferença de intensidade da coloração entre os meios contendo diferentes concentrações de sulfato de ferro (Figura 24). No entanto, foi realizada análise de UV/Vis e o gráfico da absorvância em 530 nm versus a concentração de sulfato de ferro adicionado está apresentado na Figura 26.

Figura 24: Fermentação do *Streptomyces violaceolatus* em meio de cultura AC com adição de ferro antes da fermentação em diferentes concentrações, da esquerda para a direita temos: 0,1 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 2,0 mg/L e 5,0 mg/L.

A adição de sulfato de ferro após a fermentação foi realizada da seguinte maneira: após 12 dias de fermentação, a mesma foi interrompida e o fermentado foi centrifugado para separar os micélios; ao sobrenadante foram adicionadas as diferentes concentrações de sulfato de ferro, resultando em um mesmo fator de diluição final. Em seguida, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV/Vis, onde foram obtidas as absorvâncias em 530 nm apresentadas no gráfico da Figura 25.

Ambos os experimento foram realizados em duplicata e os resultados apresentados no gráfico da Figura 25 corresponde à média aritmética entre as absorvância obtida para cada concentração de sulfato de ferro.

No gráfico apresentado na Figura 25, podemos verificar que a adição de ferro antes da fermentação favoreceu a produção do corante em todas as concentrações testadas, uma vez que todas apresentaram absorvância maior que o branco que corresponde ao meio AC sem adição de ferro. Porém, a produção do corante não foi linear com relação à concentração de ferro, sendo o meio com 2,0 mg de ferro a concentração que apresentou maior produção do corante.

Figura 25: Gráfico da absorvância em 530 nm versus a concentração de ferro adicionada no meio de cultura AC antes (colunas escuras) e após (colunas claras) a fermentação.

Já para a adição de ferro após 12 dias de fermentação não foi observado variações muito significativas da absorvância dos fermentados, como pode ser observado na Figura 25.

Figura 26: a) Fermentação do *Streptomyces violaceolatus* em meio de cultura AC com adição de ferro após a fermentação em diferentes concentrações, da esquerda para a direita temos: 0,1 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L, 2,0 mg/L e 5,0 mg/L, b) espectros de UV/Vis dos fermentados obtidos após a adição de ferro.

4.2.4.7. Adição de Aminoácidos

Os aminoácidos são adicionados no meio de cultura como fontes de nitrogênio, e assim como sais inorgânicos, possuem cargas na sua estrutura, o que dificulta o seu transporte pela membrana. No entanto, a síntese protéica é limitada pela capacidade de permeases para transportar os aminoácidos para dentro da célula. Apesar disto, a adição de aminoácidos no meio de cultura pode resultar em experiência positiva, uma vez que pode servir como intermediário de reação na biossíntese de metabólito secundário⁶³.

Para tanto, foi realizada a adição de cinco diferentes aminoácidos nos meios de cultura AC padrão (com amido) e AC com glicerol como fonte de carbono, dentre eles estão a L-lisina, Ácido glutâmico, L-glutamina, L-asparagina e L-serina nas concentrações de 1,0 mg/L e 0,1 g/L.

Figura 27: Gráfico da absorbância em 530 nm versus aminoácidos adicionados no meio de cultura, a) adição de aminoácido no meio de cultura AC e b) adição de aminoácido no meio AC com glicerol como fonte de carbono. Para ambos, colunas escuras e colunas claras correspondem, respectivamente, a concentração de aminoácido de 1,0 mg/L e 0,1 g/L.

Como pode ser observado na Figura 27a, a adição dos aminoácidos no meio AC padrão não favoreceu o aumento da produtividade do corante, uma vez que a absorbância foi maior para o meio de referência AC.

Já para a adição destes mesmos aminoácidos no meio AC com glicerol, a adição de 1,0 mg/L dos aminoácidos L-lisina, L-glutamina e L-asparagina proporcionou um aumento na intensidade da absorvância dos respectivos fermentados e, conseqüentemente favoreceu para a produtividade do corante. Porém nenhum resultado satisfatório foi observado para os aminoácidos Ácido glutâmico e L-serina, nem mesmos para os aminoácidos na concentração de 0,1 g/L.

Com relação ao perfil dos espectros de UV/Vis, os meios com amido apresentaram perfis semelhantes quando se utilizou 0,1 g/L de aminoácido no meio de cultura. Porém, quando se utilizou 1,0 mg/L de aminoácido no meio de cultura verificou que o meio com L-serina apresentou uma banda em 350nm, que é inexistente nos meios com outros aminoácidos (Figura 28).

Figura 28: Espectro de UV/Vis na região de 250 a 700 nm dos fermentados com a adição de diferentes concentrações de aminoácidos no meio de cultura AC, a) 1,0 mg/L e b) 0,1 g/L.

Nota-se que a banda em 350nm observada no espectro do fermentado em meio AC com L-serina também foi observada nos meios AC com glicerol com a adição de 1,0 mg/L e 0,1 g/L de aminoácido (Figura 29), porém é possível verificar que os meios com 0,1 g/L de ácido glutâmico e L-glutamina apresentaram a banda em 350nm muito mais intensa. Estes resultados sugerem que a adição de aminoácidos nos meios AC padrão com L-serina e AC

com glicerol favoreceram a rota biossintética de um outro metabólito secundário.

Vale lembrar, que esta banda em 350 nm observada neste experimento também já havia sido verificada no experimento de dependência de O₂ (item 4.2.4.5, página 55) utilizando 80% de meio de cultura no frasco Erlenmeyer.

Figura 29: Espectro de UV/Vis na região de 250 a 700 nm dos fermentados com a adição de aminoácidos, a figura a e b correspondem, respectivamente, a concentração de 1,0 mg/L e 0,1 g/L de aminoácido adicionado no meio de cultura AC com glicerol.

4.2.5. Estabilidade ao pH

A estabilidade ao pH é um fator muito importante para ser avaliado, uma vez que o objetivo do presente trabalho é avaliar a potencialidade de corantes naturais para serem aplicados em alimento, cosméticos e medicamentos.

Foi realizado um experimento onde o composto colorido produzido pelo micro-organismo, inicialmente com pH~7,0 após 12 dias de fermentação, foi submetido a diferentes condições ácido-base resultando em valores de pH distintos, podendo assim, avaliar a faixa de estabilidade desta coloração.

Foi observado que em valores de pH ácido (pH<6) houve a mudança de coloração de roxo para vermelho, em valores de pH neutro (pH~7) a coloração

permanece e em valores de pH básico ($\text{pH} > 10,0$) há a mudança de coloração de roxo para o azul (Figura 11).

Figura 30: Acompanhamento da coloração em função do pH, 1) 1,2; 2) 2,4; 3) 3,4; 4) 4,3; 5) 5,4; 6) 6,0; 7) 7,4; 8) 8,0; 9) 9,1; 10) 10,0; 11) 11,2; 12) 12,0 e 13) 12,5.

Para cada valor de pH foi realizada a leitura do meio colorido em espectrofotômetro UV/Vis e verificou-se que com o aumento do pH ocorreu o deslocamento do comprimento de onda máximo para maior comprimento de onda, deslocamento batocrômico. Este resultado condiz com a coloração resultante, pois a solução obtida em meio alcalino apresenta coloração azul, portanto absorve na região do vermelho, como se pode observar na ampliação da região de 400 a 600 nm da Figura 12.

Figura 31: Gráfico da absorvância em função do comprimento de onda do composto colorido em diferentes valores de pH.

4.3. Extração do corante

4.3.1. Extração com cartucho SPE – C18

Com a extração realizada com cartucho SPE foi obtido o extrato bruto em fase metanólica ou etanólica e estes foram submetidos à secagem em *speedvac*. Portanto, como verificou que a extração utilizando o etanol era tão eficiente quanto à extração com metanol, optou-se por utilizar o etanol, uma vez que não apresenta propriedades tóxicas nem cancerígenas.

Foi realizada a extração de 20 mL do fermentado e verificou-se após a secagem resultou em 23 mg de extrato bruto. A solubilidade deste extrato foi testada em diferentes solventes orgânicos, porém constatou que o composto foi insolúvel em todos os solventes testados. O extrato bruto apresentou solubilidade apenas em água. No entanto, para a realização das análises posteriores o extrato foi solubilizado em H₂O/MeOH 1:1, resultando em uma concentração máxima de 2,0 mg/mL.

O extrato foi submetido à análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) resultando no cromatograma da Figura 32.

Figura 32: Cromatograma obtido da amostra extraída com cartucho SPE-C18 nos comprimentos de onda de 270nm, 500nm e 530nm, correspondente às cores preta, vermelha e azul, respectivamente.

Posteriormente, foram realizadas análises preliminares de espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear (RMN) deste extrato a fim de verificar o perfil de massas existentes e algumas características dos grupos químicos presentes.

A Figura 33 apresenta o espectro de massas por *electrospray* obtido do extrato bruto extraído com cartucho C18. Nota-se a presença de sinais com diferença de 162 u (unidade de massa).

Figura 33: Espectro de massas do extrato bruto obtido da fermentação do *Streptomyces violaceolatus*, extraído com cartucho SPE-C18.

A diferença de 162 u é característica da molécula de glicose. Os sinais de m/z 365 e 381, são referentes ao monossacarídeo sodiado $[M+Na]^+$ e potassiado $[M+K]^+$, respectivamente. Os sinais de m/z 365, 527, 689 são referentes aos oligossacarídeos que é atribuído ao amido (polímero de glicose), o qual estava presente no meio de cultura. A Figura 34 ilustra a clivagem das moléculas de hexose. Portanto, de acordo com o espectro de massas pode-se concluir que a extração com cartucho SPE com fase C18 não foi específico para a extração do composto colorido produzido pelo *Streptomyces violaceolatus*, uma vez que parte da composição do meio de cultura também ficou retida na fase estacionária do cartucho SPE.

Figura 34: Estrutura de um oligossacarídeo.

Com relação à espectrometria de massas por *electrospray*, o potencial de ionização das moléculas é um fator importante, pois a ionização de uma determinada molécula mais ionizável pode ser favorecida suprimindo os sinais de outros compostos presentes na amostra. Neste caso, a ionização do amido é mais favorecida do que a ionização do corante roxo, dificultando a visualização do mesmo por *electrospray*.

4.3.2. Extração com resina de troca iônica

Com a extração com resina de troca iônica foi obtido extrato de coloração semelhante com a do extrato obtido com cartucho SPE, porém com solubilidades distintas. Primeiramente, ao extrair da coluna o composto

colorido retido, observou que este apresentava coloração mais avermelhada. Após algumas horas ocorreu a precipitação do composto colorido e, ao verificar o pH da solução extraída constatou que esta se apresentava levemente ácido (pH~4,0). Este dado observado é coerente, pois já havia sido observado na variação do pH que em pH ácido o composto colorido mudava de coloração, tendendo ao vermelho.

O próximo passo foi a separação do precipitado por meio da centrifugação. Este foi seco no *speed vac* e submetido à análise de espectrometria de massas (Figura 35), constatando que os sinais referentes ao amido contido no meio de cultura não está mais presente. Portanto, comprova que a extração em resina de troca iônica apresentou uma maior eficiência na extração do corante quando comparada à extração com cartucho SPE-C18, sendo as análises posteriores realizadas com os extratos obtidos por este método de extração.

Figura 35: Espectro de massas do extrato bruto obtido por extração em resina de troca iônica. A seta vermelha representa a diferença de 22 Da.

4.4. Análises realizadas com extrato bruto obtido com a extração com resina

Após a obtenção do extrato bruto verificou que este não era solúvel em metanol, no entanto, foi realizado teste de solubilidade em diversos outros solventes, dentre eles: o clorofórmio, a acetona, a acetonitrila, o acetato de etila, o DMSO. O extrato não apresentou solubilidade em nenhum solvente orgânico. Apenas na solução alcalina de 0,1% NH_4OH . Desta forma, as análises espectroscópicas foram realizadas utilizando solução aquosa levemente alcalina.

Este extrato foi submetido à análise cromatográfica empregando a coluna com fase estacionária C18 e NH_2 , utilizando como solvente $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ com 0,1% hidróxido de amônio, no modo gradiente de 0-30 min. de 70-90% de MeOH 0,1% NH_4OH e modo isocrático de 30-40 min. com 90% de MeOH 0,1% NH_4OH . Podemos verificar com o cromatograma da Figura 36, que os compostos não tiveram interação com a coluna, não sendo possível a separação e purificação do corante roxo.

Figura 36: Cromatograma obtido da amostra extraída com resina de troca iônica em coluna C18.

4.4.1. Análise de Espectrometria de Massas

O extrato bruto nesta etapa foi submetido a uma análise por espectrometria de massas por inserção direta empregando um espectrômetro de massas Q-TOF II Micromass-UK®.

O espectro de massa obtido para o extrato bruto está apresentado na Figura 37. Podemos verificar a presença de um conjunto de sinais de massas alta, na região de m/z 1300, e sinais mais intensos com m/z 860, 703, 633 e 419.

Figura 37: Espectro de massas do extrato bruto obtido no espectrômetro Q-TOF.

Em seguida, foram realizadas análises de espectrometria de massas sequencial (MS/MS) para os sinais de m/z 1278, 1250, 875, 703 e 633, resultando nos espectros apresentados na Figura 38.

amostra jac vermelho, 1277

jac-ver-01-cid 01 17 (0.405) Sm (Mn, 3x3.00); Cm (2:53)

TOF MSMS 1278.00ES+
224

jac-ver-01-cid 02 7 (0.162) Sm (Mn, 3x3.00); Cm (5:61)

TOF MSMS 1250.00ES+
45.6

jac-ver-01-cid 04 19 (0.381) Sm (Mn, 3x3.00); Cm (8:52)

TOF MSMS 875.00ES+
92.7

jac-ver-01-cid 05 8 (0.194) Sm (Mn, 3x3.00); Cm (6:29)

TOF MSMS 703.00ES+
40.6

jac-ver-01-cid 03 8 (0.153) Sm (Mn, 3x3.00); Cm (8:32)

TOF MSMS 633.00ES+
154

Figura 38: MS/MS dos sinais de m/z 1278, 1250, 875, 703 e 633.

Podemos verificar com as análises de MS/MS que a maioria dos íons fragmentos gerados são consequência da perda de 418 u. Esta perda sugere a eliminação de um composto neutro de 418 u o qual dever ser levado em consideração para a atribuição estrutural do corante roxo Além disso, os íons de m/z 419 $[M+H]^+$ e 441 $[M+Na]^+$ são observados nos espectro da Figura 35 e no espectro da Figura 38.

Porém, foi feita uma busca no banco de dados “*Dictionary of Natural Products*” por compostos produzidos por *Streptomyces* e massa molecular na faixa de 418-419 u e nenhum composto foi encontrado.

4.4.2. Ressonância Magnética Nuclear

Devido a baixa de solubilidade da amostra, como já mencionado anteriormente, a análise de RMN foi realizada utilizando uma solução de 1,0 mol/mL de NaOH em D₂O. O espectro obtido está apresentado na Figura 39.

Figura 39: RMN¹ do extrato bruto obtido com a extração com resina de troca iônica, o solvente utilizado foi o D₂O (com NaOH) e a análise foi realizada em espectrômetro de 500 MHz.

Como podemos observar no espectro obtido da Figura 39 nenhum sinal característico na região de hidrogênios aromáticos foi observado e os sinais presentes na região de 1,0-3,7 ppm não apresentam resolução suficiente que possibilita a análise das multiplicidades.

4.4.3. Análise de Infravermelho (FTIR)

A amostra, previamente seca no *speed vac*, foi analisada por infravermelho, a fim de verificar bandas características de grupos funcionais presentes na amostra. Para tanto, foi utilizada a metodologia de preparo de amostra em pastilha de KBr. A Figura 40 apresenta o espectro obtido.

Figura 40: Espectro de infravermelho obtido da amostra extraída com resina de troca iônica, utilizando pastilha de KBr.

No espectro da Figura 40 a banda larga e intensa em 3400 cm^{-1} é característica de estiramento da ligação O-H ou N-H. Neste caso, atribuí-se o modo normal de vibração relacionado ao estiramento simétrico e assimétrico de grupos O-H, uma vez que se verifica a banda em frequências mais baixas e com elevada largura, sugerindo a presença de ligações de hidrogênio intra-molecular ou inter-molecular, referente a álcool ou ácido carboxílico.

Com relação à banda em 2923 cm^{-1} , esta pode estar relacionada com o estiramento da ligação C-H sp^3 .

A região de 1700 cm^{-1} a 1600 cm^{-1} é característica do estiramento do grupo carbonílico (C=O). Como se trata de um composto colorido, este grupo pode estar conjugado com duplas ligações como no caso de quinonas, por exemplo, provocando o deslocamento deste sinal. Além disso, esta carbonila pode ser característica de ácido carboxílico, uma vez que possui banda de estiramento O-H. Ainda para esta região, de 1700 cm^{-1} a 1600 cm^{-1} , esta pode ser atribuída ao estiramento da ligação C=C, uma vez que acredita estar presente na molécula.

4.4.4. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman tem se mostrado uma técnica fundamental para a caracterização espectroscópica de vários compostos, com a vantagem de ser uma técnica não destrutiva, possibilitando desde análises de biomoléculas a compostos inorgânicos, como por exemplo, análise de carotenóides em sistemas biológicos⁷⁶ e análise de corantes orgânicos naturais e sintéticos presentes em obras de arte⁷⁷.

Uma desvantagem desta técnica é a possível presença de fotoluminescência em alguns compostos dependendo do comprimento de onda incidente, o que pode levar a uma sobreposição ao espalhamento Raman. Como a relação de intensidade do espalhamento Raman e luminescência pode ser de até 10^6 , a presença de processos radioativos pode limitar o uso da técnica. Este efeito pode ser observado, por exemplo, em obras de arte envernizada com pinturas a óleo⁷⁸.

A Figura 41 apresenta o espectro Raman obtido da amostra sólida. É possível constatar que existe a presença de fluorescência, o qual dificulta a visualização e atribuição dos modos normais de vibração. No entanto, foi possível identificar os principais picos como evidenciado no espectro.

Figura 41: Espectro de Raman da amostra sólida utilizando laser operante em 632,8 nm.

Dependendo da simetria da molécula, os modos normais de vibração aparecem no espectro de absorção na região do infravermelho (FTIR) e podem também ser ativas no Raman.

Foi realizadas várias tentativas de obtenção do espectro Raman para amostras líquidas em diferentes pH, utilizando laser incidente operante tanto em 632,8 nm como em 785,0 nm. Em ambas as análises foi possível detectar somente luminescência, como mostrado na Figura 42.

Figura 42: Luminescência resultante da análise Raman das amostras líquidas.

4.4.5. EDX – Energia dispersiva de raios-X

Com intuito de analisar os elementos presentes na amostra, o extrato obtido com resina de troca iônica foi submetida à análise de energia dispersiva de raios-X (EDS), cujo espectro é mostrado na Figura 43.

No espectro de EDX os picos na região de energia de 0,3 keV, 0,5 keV, 1,0 keV, 1,5 keV e 2,8 keV são atribuídos aos átomos de carbono, oxigênio, sódio, alumínio e cloro, respectivamente.

Os sinais referentes ao sódio e cloro são atribuídos ao processo de extração, o qual fez uso de HCl e NaOH. E o sinal de energia em 1,5 keV atribuído ao alumínio é devido a composição do porta-amostra, podendo ser confirmado com o espectro apresentado na Figura 44 referente ao porta-amostra.

Portanto, apenas os sinais referentes à absorção de energia dos átomos de carbono e oxigênio são relacionados aos elementos presentes na amostra analisada.

Figura 43: Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) em keV, para a amostra A.

Figura 44: Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDS) em keV, para o porta-amostra.

4.4.6. Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise de termogravimétrica foi realizada utilizando 7,4874 mg da amostra, em atmosfera de oxigênio. Foi empregada uma rampa de 10°C/min., atingindo temperatura máxima de 800°C.

O gráfico da Figura 45 apresenta os resultados obtidos da perda de massa em porcentagem (% massa) e da derivada da massa pela temperatura (dm/dT) em função da temperatura.

Figura 45: Análise Termogravimétrica. Gráfico de TGA (preto) e sua derivada, DTG (vermelho).

Na curva de TGA (Figura 45, em preto) podemos observar várias perdas de massas ao longo da rampa de temperatura de 0°C a 800°C. Com o auxílio da DTG (Figura 45, em vermelho) é possível verificar o início e o término de cada etapa.

O primeiro sinal observado teve início em 24°C e término em 73°C, este pode ser atribuído à umidade da amostra. Em seguida, verifica um sinal pouco intenso com início em 113°C e término em 148°C atribuído a perda de água de hidratação. Consecutivamente, observamos uma banda larga na faixa de 211°C a 324°C, que também pode estar relacionado com a perda de água de hidratação, porém, pode ser atribuída a liberação de água formada através de hidroxilas presentes na amostra, uma vez que já foi relatada na espectroscopia de FTIR a presença deste grupo.

O sinal de alta intensidade iniciado em 437°C e terminado em 467°C é atribuído à evolução de CO e, conseqüentemente, o sinal iniciado em 480°C e finalizado em 535°C está relacionado à oxidação do CO e/ou formação de CO₂.

Resultando no final da rampa de temperatura apenas 3,57% de massa da amostra.

A análise de TGA aliado a outras técnicas como FTIR e espectrometria de massas pode auxiliar na identificação do material e mecanismos de degradação. Neste sentido, na análise de FTIR foi possível observar bandas características de carbonilas, que pode estar relacionado à perda de CO e CO₂ observada na TGA, além disso, na análise de espectrometria de massas observa que alguns sinais como, por exemplo, o m/z 1277, 859 e 441, o qual perdem 28u, que é característico da perda de CO e se tratando da decomposição térmica em atmosfera de oxigênio este pode gerar CO₂ e, na análise de EDX constatou-se que há a presença apenas de carbono e oxigênio na amostra, condizendo com as suposições feitas.

4.5. Corante Vermelho (*Streptomyces sp.*)

4.5.1. Isolamento do micro-organismo

O outro micro-organismo estudado neste trabalho foi a *Streptomyces sp.*, o qual foi isolada da rizosfera do eucalipto. Este microrganismo apresentou um alto potencial para a produção de um corante vermelho.

Diferentemente da estratégia de triagem empregada no estudo anterior para o corante roxo produzido pelo *Streptomyces violaceolatus*. A identificação da produção de coloração pelo *Streptomyces sp.* foi encontrado ao acaso por membros de nosso grupo de pesquisa. Na busca por novos metabólitos bioativos o *Streptomyces sp.* foi submetido à fermentação e foi verificado que este produzia coloração vermelha no meio de cultura líquido BD, enquanto que no meio de cultura sólido TSBA 5% esta coloração não era observada. Este

fato é bastante interessante e nos revela que a triagem visual pode ser falha em alguns casos.

Devido a esta observação, iniciou-se o estudo da variação do meio de cultura para a fermentação deste micro-organismo e em seguida, foram realizadas análises espectrofotométricas e espectrométricas para a identificação e caracterização deste composto colorido, semelhante ao aplicado para o corante roxo.

4.6. Variação do meio de cultura

Como pode ser observado na Figura 46a, o *Streptomyces sp.* não apresenta coloração no meio de cultura sólido TSBA 5%, porém ao submeter este microrganismo a fermentação em meio de cultura líquido BD (batata-dextrose), foi observado uma intensa coloração vermelha (Figura 46b).

Figura 46: a) Eucalpto-12 em meio de cultura sólido TSBA 5% e b) Eucalpto-12 em meio de cultura líquido BD após 12 dias de fermentação com agitação.

Em seguida, foi realizado um estudo de variação do meio de cultura. Para este estudo foram utilizados os seguintes meios de cultura: Czapeck⁴²,

AC⁴¹, M615⁴⁸, Sódio-Caseinato e TSB (ver composição no item 3.3.2.2 página 20).

Dentre os meios de cultura líquido utilizado, os meios Czapeck e Sódio-Caseinato, começaram a apresentar coloração após 4 dias de fermentação com agitação de 150 rpm (Figura 47), utilizando o meio BD como referência.

Também foi avaliado o efeito da agitação sobre a produção do corante. Foram fermentados dois frascos Erlenmeyers de 125 mL, um sobre agitação constante e o outro em modo estático sobre a bancada. Após 12 dias de fermentação não foi observado nenhuma coloração no meio de cultura em modo estático. Este resultado é semelhante ao observado para o corante roxo.

Figura 47: Fermentação do Eucalipto-12 com diferentes meios de cultura líquido, da esquerda para a direita, temos: Sódio-Caseinato, BD e Czapeck.

A fim de constatar a eficiência de produção do corante vermelho em cada meio de cultura, foram realizadas análises de UV/Vis, a qual está apresentada na Figura 48.

Figura 48: a) Espectro de UV/Vis na região de 300 a 700 nm dos fermentados do Eucalipto-12 obtido com diferentes meios de cultura, b) gráfico da intensidade da absorvância em 490 nm versus diferentes meios de cultura utilizados para fermentação.

Posteriormente, foi realizado um estudo da variação da fonte de carbono dos meios de cultura BD, Czapeck e Sódio-Caseinato. As fontes de carbono inicialmente presente nos meios BD, Czapeck e Sódio-Caseinato eram: glicose, sacarose e glicose, respectivamente (ver item 3.3.2.2, página 20). Estas fontes de carbono foram substituídas por amido. Os resultados obtidos nesta etapa estão mostrados na Figura 49, o qual ilustra os dados de UV/Vis.

Figura 49: a) Espectro de UV/Vis na região de 300 a 700 nm dos fermentados do Eucalypto-12 obtido com a modificação das fontes de carbono presentes em cada meio de cultura por amido, b) gráfico da absorvância em 490 nm versus diferentes meios de cultura utilizando amido como fonte de carbono.

Com base nos dados apresentados na Figura 49, podemos constatar que tanto o meio BD quanto o meio Sódio-Caseinato empregando amido como fonte de carbono, apresentaram uma menor produção do corante vermelho frente aos mesmos meios com as fontes de carbono originais. Porém para o meio Czapeck a mudança da fonte de carbono sacarose para amido apresentou um aumento maior que 25% na produção do corante. Apesar deste resultado satisfatório, o meio Czapeck apresentou a menor produção do corante quando comparado com os outros meios testados, como por exemplo, o meio BD.

Portanto, podemos inferir que os meios BD e Sódio-Caseinato são os meios mais promissores para a produção do corante vermelho.

4.7. Extração

A extração do composto de coloração vermelha produzido pelo *Streptomyces sp.*, denominada Eucalypto-12, foi testada utilizando dois métodos de extração: um em fase sólida (SPE) e outro por extração líquido-líquido.

A extração em fase sólida utilizando fases estacionárias C18, amino, DEA não foram eficientes na retenção do composto colorido.

Por outro lado, a extração líquido-líquido com acetato de etila, se apresentou muito eficiente para a extração do corante vermelho. Para a extração de 20 mL do fermentado no meio de cultura BD, foram obtidos 3,9 mg de extrato bruto. Projetando mais ou menos 200 mg por litro de fermentado.

4.8. Isolamento do corante

Após a obtenção do extrato bruto o corante vermelho foi isolado empregando o fracionamento cromatográfico utilizando coluna de sílica gel (0.035-0.070mm, 60A) e fase móvel acetato de etila/hexano (1:1). Foram obtidas 46 frações no total, as frações de 14 a 20 foram reunidas por semelhança em placa de TLC empregando a cromatografia de camada delgada. Estas frações reunidas foram utilizadas para a realização das análises posteriores de caracterização estrutural.

Também foi desenvolvido um método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) para análise do extrato bruto e das frações reunidas obtidas da coluna de sílica. Foram empregadas as seguintes condições cromatográficas: fase móvel A: H₂O 0,1% ácido fórmico e B: MeOH 0,1% ácido fórmico, modo gradiente de 80-99% de B em 30 min. e modo isocrático com 99% de B de 30-50 min. com fluxo de 0,6 mL/min. e comprimento de onda de 265 nm, utilizando a coluna C₁₈ 10 cm x 5 µm da Agilent®.

A Figura 50 ilustra o cromatograma de LC-UV obtido do extrato bruto e a Figura 51 apresenta o cromatograma de LC-UV das frações reunidas.

Figura 50: Cromatograma de CLAE do extrato bruto obtido pela fermentação do Eucalipto-12 em meio de cultura BD.

Figura 51: Cromatograma de CLAE das frações reunidas obtido pela fermentação do Eucalipto-12 em meio BD.

Como pode ser verificado no cromatograma da Figura 50, obtido do extrato bruto, foram observados uma pequena diversidade de compostos na sua composição, além disso, verifica-se um sinal de grande intensidade com tempo de retenção igual a 28 min.

O cromatograma observado na Figura 51, referente as frações reunidas, sugere que o processo de purificação por cromatografia foi bastante eficiente, pois foi observado somente um pico com tempo de retenção em 28 minutos.

4.9. Caracterização estrutural do corante vermelho

4.9.1. Espectrometria de massas

Para a realização das análises de espectrometria de massas foi utilizado o espectrômetro de massas Triploquadropolo Varian® Modelo 1200L, empregando a fonte de ionização *electrospray*.

A Figura 52 apresenta os espectros obtidos no modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-) para as frações reunidas obtidas do fracionamento cromatográfico.

Figura 52: Espectro de massas das frações reunidas obtidas do fracionamento do extrato bruto produzido pelo *Streptomyces* sp., a) modo positivo e b) modo negativo.

O espectro de massas (ESI+) da Figura 52a, apresenta como sinal principal o íon de m/z 601 no modo positivo. Também foi observado um sinal de m/z 623, o qual foi atribuído ao aduto de sódio $[M+Na]^+$ do íon m/z 601. No espectro (ESI-) apresentado na Figura 52b, foi observado o sinal de m/z 599, no modo negativo, com base nos espectros de massas obtidos em modo

positivo e negativo podemos inferir que a massa molecular do composto de interesse é igual a 600 u.

Com dados de Espectrometria de Massas, nosso próximo passo foi a busca no banco de dados “*Dictionary of Natural Products*” por compostos de massa molecular na faixa de 600-601 u tendo como fonte biológica *Streptomyces*. Cruzando estas informações foram encontrados oito compostos. Dentre eles apenas um, denominado *Balmoralmycin* (Figura 53), apresenta como característica física coloração vermelha, semelhante à coloração observada no extrato. A Tabela 5 apresenta os resultados da busca no banco de dados.

Tabela 5: Resultado da busca realizada no banco de dados “*Dictionary of Natural Products*” por compostos produzidos por *Streptomyces* com massa molecular na faixa de 600-601 u.

Nome Químico	Fórmula Molecular	Descrição física
Antibiotic C 104; 6-Hydroxy (<i>Balmoralmycin</i>)	C ₃₅ H ₃₆ O ₉	Pó vermelho escuro
Aquayamycin; 12b-O-(2,3,6-Trideoxy- β-L-erythro-hexopyranoside)	C ₃₁ H ₃₆ O ₁₂	Sólido alaranjado pálido
Milbemycin α1; 26-(Propanoyloxy)	C ₃₄ H ₄₈ O ₉	Pó amorfo
Milbemycin IV; 22α, 28-Dihydroxy, O5-Me	C ₃₅ H ₅₂ O ₈	-
Milbemycin IV; 6,22α-Dihydroxy, O5-Me	C ₃₅ H ₅₂ O ₈	-
Nocardamine	C ₂₇ H ₄₈ N ₆ O ₉	Cristal
Polyoxin H	C ₂₃ H ₃₂ N ₆ O ₁₃	Cristal
Streptolydigin	C ₃₂ H ₄₄ N ₂ O ₉	Cristalino

Neste contexto, foram realizadas outras análises espectroscópicas com o objetivo de confirmar a estrutura da *Balmoralmycin* (Figura 53) para o composto vermelho obtido da fermentação do Eucalipto-12.

Figura 53: Estrutura da *Balmoralmycin*.

A análise de RMN¹H foi realizada no espectrômetro de RMN Brucker® DRX-500MHz utilizando o solvente CDCl₃. O espectro obtido das frações reunidas está apresentado na Figura 54.

Figura 54: Espectro de RMN¹H obtido das frações reunidas em CDCl₃, 500 MHz.

Figura 55: Ampliação do espectro de RMN obtido das frações reunidas.

Podemos conferir de acordo com o espectro de RMN ampliado (Figura 55) a presença de sinais desblindados na região de hidrogênios aromáticos, insaturados e ligados a oxigênio, o qual se faz presente na estrutura da *Balmoralmycin*.

Ao comparar os dados obtidos com dados presentes na literatura, publicados por Bindseil e colaboradores³⁸, pode-se corroborar a estrutura proposta, uma vez que os principais sinais apresentam deslocamentos químicos semelhantes. A Tabela 6 descreve os dados obtidos experimentalmente e os dados descritos na literatura, de acordo com a numeração apresentada na estrutura da *Balmoralmycin* (Figura 53).

Tabela 6: Dados de RMN obtido experimentalmente para as frações reunidas do Eucalipto-12 e dados descritos na literatura por Bindseil, et al.

Posição	δH (experimental)	δH (literatura)	δC (experimental)	δC (literatura)
1	-	-	159.1	163.3*
2	-	-	-	141.9
3	7.86 (d)	8.06 (br s)	133.2	132.9
4	7.74 (d)	8.06 (br s)	118.7	118.6
4a	-	-	137.5	137.5
5	-	-	-	186.8**
5a	-	-	-	132.9
6	-	-	-	159.1*
6a	-	-	-	129.3
7	6.95 (br s)	7.18 (s)	116.6	116.5
8	-	-	-	125.8
8-Me	2,35 (s)	2.36 (s)	21.5	21.8
9	7.54 (s)	7.93 (s)	115.2	115.0
9a	-	-	129.0	125.5
10	8.48 (s)	9.23 (s)	117.3	117.9
11	-	-	156.0	157.3*
11a	-	-	109.3	116.7
12	-	-	187.6	188.0**
12a	-	-	116.3	109.4
1'	4.84 (d)	5.23 (br d)	71.6	71.9
2'	2.19~2.07 (m)	2.16~1.96 (m)	-	40.8
3'	3.92 (m)	4.46 (m)	70,7	70.3
4'	4,64 (m)	5.42 (t)	78,0	78.6
5'	3.60 (m)	3.89 (m)	74.6	74.8
6'	1.45-1.55 (m)	1.51 (d)	-	18.1
1''	-	-	166.1	166.8
2''	5.84 (d)	6.09 (d)	119.5	119.4
3''	7.22 (dd)	7.60 (dd)	145.5	145.5
4''	5,25 (t)	6.22 (dd)	130.1	128.4
5''	6.20 (m)	6.09 (m)	128.7	144.9
6''	2.19~2.07 (m)	2.16~1.96 (m)	-	32.7
7''	1.27~1.13 (m)	1.36~1.14 (m)	-	28.2
8''	1.27~1.13 (m)	1.36~1.14 (m)	-	31.1
9''	1.27~1.13 (m)	1.36~1.14 (m)	-	22.3
10''	0.79 (m)	0.85 (t)	-	13.7

* não definido, podem estar trocados entre si.

** não definido, podem estar trocados entre si.

Algumas variações nos deslocamentos presentes nos dados obtidos experimentalmente quando comparado com o dados da literatura é atribuído ao diferente solvente deuterado utilizado. O autor Bindseil e colaboradores³⁸

fizeram uso do solvente piridina- d_5 , e no presente trabalho foi utilizado acetona- d_6 .

Foram realizadas também análises de RMN bidimensional HMQC (Figura 56) e HMBC (Figura 57), no qual pudemos confirmar os deslocamentos químicos referentes aos carbonos ligados diretamente aos hidrogênios e o acoplamento entre os átomos de hidrogênio e seus átomos de carbonos vizinhos.

Figura 56: Mapa de contornos HMQC para as frações reunidas.

Figura 57: Mapa de contornos HMBC para as frações reunidas.

Figura 58: Deslocamentos de hidrogênio (vermelho) e carbono (azul) atribuídos para a *Balmoralmycin*.

Com a análise de HMBC verificou o acoplamento presentes entre os átomos de hidrogênio e carbono, confirmando a vizinhança dos hidrogênios e consequentemente partes da estrutura da *Balmoralmycin*, como mostrado na Figura 59.

Figura 59: Acoplamento entre os átomos de hidrogênio e carbono-13 obtidos por HMBC, no qual as setas rosa, verde e laranja representam acoplamento 2J , 3J e 4J , respectivamente.

Assim, com os dados acima apresentados é possível confirmar a estrutura do corante vermelho, correspondendo a *Balmoralmycin*.

4.9.2. Espectroscopia de Infravermelho

Foi realizada análise de espectrofotometria de infravermelho das frações reunidas, para tanto, utilizou-se o método de pastilha de KBr para o preparo da amostra.

O espectro de FTIR resultante está mostrado na Figura 60, os quais podem verificar bandas características em 3447 cm^{-1} , que está relacionado às vibrações de estiramentos da ligação O-H das hidroxilas presentes na molécula; bandas em 2924 cm^{-1} e 2854 cm^{-1} atribuída à vibração de estiramento assimétrico e simétrico, respectivamente, da ligação C-H alifático; sinal em 1700 cm^{-1} característico da vibração de estiramento da ligação C=O de carbonila; sinal em 1559 cm^{-1} correspondente a vibração das ligações duplas conjugadas e sinal em 1266 cm^{-1} característico da vibração de deformação da ligação C-O. Estes dados estão condizentes com os dados presentes na literatura³⁸, corroborando novamente a estrutura proposta.

Figura 60: Espectro de FTIR das frações reunidas obtida do Eucalipto-12.

5. Conclusões

Com base nos dados obtidos neste trabalho, podemos concluir que com diferentes linhagens de actinobactérias é possível a obtenção de diferentes corantes naturais. Assim, as actinobactérias aparecem como uma fonte promissora para a obtenção de vários corantes naturais com grande potencial biotecnológico.

O estudo realizado com o *Streptomyces violaceolatus*, possibilitou a identificação de um corante roxo com grande potencial de aplicação industrial. O corante roxo foi produzido tanto em pequena escala como em grande escala (*scale-up*) com um rendimento médio de 200 mg por litro. Outro fato relevante observado para este corante é o baixo potencial citotóxico e mutagênico.

A produção do corante roxo foi obtida em diferentes condições de fermentação e em diferentes meios naturais e sintéticos. Onde foi observado que o meio Amido-Caseína foi o mais eficiente na produção do corante roxo, principalmente quando suplementados com glicerina, polvilho doce e fécula de batata como fontes de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio, os quais produziram coloração mais intensa.

No entanto, não foi possível a caracterização estrutural do corante roxo pelos métodos espectroscópicos empregados neste trabalho. Estudos posteriores serão realizados com este objetivo.

Para o *Streptomyces* sp., foi observada uma coloração vermelha no meio de cultivo. Estudos sobre a influencia do meio de cultivo e condições de fermentação também foram realizados. Foram observados que os meios de cultivo BD e Sódio-Caseinato foram os mais promissores na produção deste corante.

De acordo com os dados espectroscópicos obtidos para o corante vermelho excretado pelo *Streptomyces* sp. O mesmo foi atribuído como sendo o composto *Balmoralmycin*. Os dados espectroscópicos obtidos estão de acordo

com os dados descritos na literatura. Este composto é um policetídeo que, além de apresentar coloração vermelha e ser promissor na produção de corantes naturais, apresenta atividade antimicrobiana.

A obtenção do corante vermelho neste trabalho revela que a estratégia de *screening* para a identificação de micro-organismos produtores de corantes deve ser mais elaborada do que a adotada neste trabalho. Haja visto que o *Streptomyces* sp. não produziu coloração vermelha em meio sólido, indicando que o meio de preservação e cultivo são fatores extremamente relevantes para a produção de corantes.

6. Referências

- ¹ Hari, R. K.; Patel, T. R. E Martin, A. M. – An Overview of pigment production in biological systems : function, biosynthesis, and applicaion in food industry. *Food Rev. Intern.*, 10, 1:49-70, **1994**.
- ² Cardon, D. - Colours in Civilizations of the World and Natural Colorants: History under tension. - In Bechtold, T. e Mussak, R. (ed.) Handbook of natural colorants. *John Wiley & Sons Ltd*, 21-26, **2009**.
- ³ Guaratini, C. C. I. e Zanoni, M. V. B. – Corantes Têxteis. *Quim. Nova*, 23, 1:71-78, **2000**.
- ⁴ Zarkogianni, M.; Mikropoulou, E.; Varella, E. e Tsatsaroni, E. – Colour and fastness of natural dyes: revival of traditional dyeing techniques. *Color. Technol.*, 127, 18-27, **2010**.
- ⁵ Perkin, W. H. - The origin of the coal-tar colour industry, and the contributions of Hofmann and his Pupils. *J. Chem. Soc., Trans.*, 69, 596-637, **1896**.
- ⁶ Biertümpfel, A. e Wurl, G. - Dye Plants in Europe. - In Bechtold, T. e Mussak, R. (ed.) Handbook of natural colorants. *John Wiley & Sons Ltd*, 39-51, **2009**.
- ⁷ Downham, A. e Collins, P. – Colouring our foods in the last and next millennium. *Int. J. Food Science and Techon.*, 35, 5-22, **2000**.
- ⁸ Pintea, A. M. – Synthetic Colorants. In Socaciu, C. (ed.) Food colorants: chemical and functional properties. *CRCpress*, 603-616, **2007**.
- ⁹ Jacobson, G.; Wasileski, J. – Production of Food Colorants by Fermentation. – In. Gabelman, A. (ed.) Bioprocess production of flavor, fragrance, and color ingredients. John Wiley & Sons, NY, 205-37, **1994**.
- ¹⁰ Frick, D. – The coloration of food. *Rev. Prog. Color*, 33, 15-32, **2003**.
- ¹¹ ANVISA_Resolução - CNNPA nº 44, de 1977, Publicada DOU - Seção I, 01/02/78 e 24/04/78. URL: <http://portal.anvisa.gov.br>
- ¹² Claxton, L. D; *Food Chem. Tox.* 43, 4-56, **2005**.
- ¹³ Sztandera, L.; Trachtman, M.; Bock, C.; Velga, J. e Garg, A. - Soft Computing in the Design of Nontoxic Chemicals. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 43, 189-198, **2003**.
- ¹⁴ Polônio, M. L. T. e Peres, F. – Consumo de Aditivos Alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. – *Cad. Saúde Pública*, 25, 8:1653-1666, **2009**.
- ¹⁵ Scotter, M. - Emerging and persistent issues with artificial food colours: natural colour additives as alternatives to synthetic colours in food and drink. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 3, 28-39, **2011**.
- ¹⁶ Dufossé, L. – Pigments from microalgae and microorganism: source of food colorants. In Socaciu, C. (ed.) Food colorants: chemical and functional properties. *CRCpress*, 400-426. **2007**.
- ¹⁷ Aberoumand, A. - A Review Article on Edible Pigments Properties and Sources as Natural Bicolorants in Foodstuff and Food Industry. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 6, 1:71-78, **2011**.
- ¹⁸ Francis, F. J. – A new group of food colorants. *Trends in food Sciecncce & Technology*, 3, 27-30, **1992**.
- ¹⁹ Valduga, E.; Tatsch, P. O.; Tiggemann, L.; Treichel, H.; Toniazzo, G.; Zeni, J. e Di Luccio, M. – Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. *Quim. Nova*, 32, 9:2429-2436, **2009**.
- ²⁰ Mapari, S. A. S.; Meyer, A. S., Thrane, U. e Frisvad, J. C. - Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale. *Microbial Cell Factories*, 8:24, **2009**.
- ²¹ Mapari, S. A. S.; Nielsen, K. F.; Larsen, T. O.; Frisvad, J. C.; Meyer, A. S. e Thrane, U. – Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants – *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 231-238, **2005**.
- ²² Dufossé, L. – Microbial Production of Food Grade Pigments. – *Food Technology and Biotechnology*, 44, 3:313-321, **2006**.

- ²³ Mapari, S. A. S.; Hansen, M. E.; Meyer, A. S. e Thrane, U. - Computerized Screening for Novel Producers of *Monascus*-like Food Pigments in *Penicillium* Species. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 9981-9989, **2008**.
- ²⁴ Mapari, S. A. S., Thrane, U. e Meyer, A. S. - Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? *Trends in Biotechnology*, 28, 300-307, **2010**.
- ²⁵ Demain, A. L. - Small bugs, big business: The economic power of the microbe. *Biotechnology Advances* 18, 499-514, **2000**.
- ²⁶ Brakhage, A. A. e Schroeckh, V. - Fungal secondary metabolites - Strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genetics and Biology*, 48, 15-22, **2011**.
- ²⁷ Goodfellow, M. e Fiedler, H. - A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98, 2:119-142, **2010**.
- ²⁸ Vaishnav, P. e Demain, A. L. - Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 29, 223-229, **2010**.
- ²⁹ Demain, A. L. - Fungal secondary metabolism: regulation and functions. In Sutton B, editor. *A century of mycology*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 233-54, **1996**.
- ³⁰ Zhu, H.; Guo, J.; Yao, Q.; Yang, S.; Deng, M. e Li, T. - *Streptomyces caeruleus* sp. nov., with dark blue diffusible pigment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 507-511, **2011**.
- ³¹ Pham, L. H.; Vater, J.; Rotard, W. e Mügge, C. - Identification of secondary metabolites from *Streptomyces violaceoruber* TŮ22 by means of on-flow LC-NMR and LC-DAD-MS. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43, 710-723, **2005**.
- ³² Niessen, W.M.A. e van der Greef, J. - Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, Principles and Applications, Marcel Dekker, New York, **1992**.
- ³³ Hoffmann, E. e Stroobant, V. - Mass spectrometry : principles and applications. - 3rd ed. John Wiley & Sons, **2007**.
- ³⁴ Lutnaes, B. F.; Strand, A.; Pétursdóttir, S. K. e Liaaen-Jensen, S. - Carotenoids of thermophilic bacteria - *Rhodothermus marinus* from submarine Icelandic hot springs. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 455-468, **2004**.
- ³⁵ Haddad, R.; Milagre, H. M. S.; Catharino, R. R. e Eberlin, M. N. - Easy Ambient Sonic-Spray Ionization Mass Spectrometry Combined with Thin-Layer Chromatography. *Anal. Chem.*, 80, 2744-2750, **2008**.
- ³⁶ Wolfender, J.-L.; Ndjoko, K. e Hostettmann, K. - Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites. *Journal of Chromatography A*, 1000, 437, **2003**.
- ³⁷ Frisvad, J. C.; Smedsgaard, J.; Larsen, T. O. E Samson, R. A. - Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Studies in Mycology* (Utrecht) 49, 201-242, **2004**.
- ³⁸ Bindseil, K. U., Hug, P., Peter, H. H. e Petersen, F. e Roggo, B. E. - Balmoralmycin, a New Angucyclinone, and Two Related Biosynthetic Shunt Products Containing a Novel Ring System. *J. Antibiotics*, 48, 6:457-461, **1995**.
- ³⁹ de Melo, Flávia Mandolesi Pereira - Bioprospecção de Actinobactérias Rizosféricas de Milho (*Zea Mays* L.) com atividade antifúngica. Tese de Doutorado, disponível no site: www.teses.usp.br, **2009**.
- ⁴⁰ Zhang, J. e Greasham, R. - Chemically defined media for commercial fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol*, 51, 407-421, **1999**.
- ⁴¹ M. Kontro, M.; Lignell, L.; Hirvonen, M. -R. e Nevalainen, A. - pH effects on 10 *Streptomyces* spp. growth and sporulation depend on nutrients. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 32-38, **2005**.
- ⁴² Krzyśko-Lupicka, T.; Strof, W.; Kubś, K.; Skorupa, M.; Wieczorek, P.; Lejczak, B. e Kafarski, P. - The ability of soil-borne fungi to degrade organophosphonate carbon-to-phosphorus bonds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 48: 549-552, **1997**.

- 43 Peralta, R.M.; Terenzi, H.F.; Jorge, J.A. - β -D-glycosidase activities of *Humicola grisea*: biochemical and kinetic characterization of a multifunctional enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1033, 243-249, **1990**.
- 44 Adams, P.R. - Mycelial amylase activities of thermophilic species of *Rhizomucor*, *Humicola* and *Papulaspora*. *Mycopathologia*, 112, 35-37, **1990**.
- 45 Khanna, P., Sundari, S.S and Kumar, N.J. - Production, isolation and partial purification of xylanases from an *Aspergillus sp.* - *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 242, **1995**.
- 46 Rizzatti, A.C.S.; Jorge, J. A.; Terenzi, H.F.; Rechia, C.G.V. and Polizeli, M.L.T.M. - Purification and Properties of a thermostable extracellular b-D-xylosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. - *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 26, 156-160, **2001**.
- 47 Vogel, H.F. - Distribution of Lysine Pathways Among Fungi: Evolutionary Implications. *The American Naturalist*, 98, 435-446, **1964**.
- 48 Ujikawa, K. - Antibióticos antifúngicos produzidos por actinomicetos do Brasil e sua determinação preliminar nos meios experimentais. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, 39, 2:149-158, **2003**.
- 49 Kassie, F. e Knasmuller, S. - Genotoxic effects of allyl isothiocyanate (AITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Chem. Biol. Interact.* 127, 163-180, **2000**.
- 50 Castellani, A. - The viability of some pathogenic fungi in sterile distilled water. *J. Trop. Med. Hyg.* 42: 225-226, **1939**.
- 51 Castellani, A. - Further research on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. *Mycopathol. et Mycol. Appl.* 20:1-2, **1963**.
- 52 Castellani, A. A Maintenance and Cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *Jour. Trop. Med. Hyg.* 70:181-184, **1967**.
- 53 Stackebrandt, E. e Goebel, B. M. - Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Intern. J. System. Bacter.*, 44, 4:846-849, **1994**.
- 54 Mortelmans, K. e ZEIGER, E. - The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455, 29-60, **2000**.
- 55 Maron, D. M. e AMES, B. N. - Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mut.Res.*, 113, 173-215, **1983**.
- 56 Umbuzeiro, G. A. e Vargas, V. M. - Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos, p.83 em *Mutagênese Ambiental*, **2003**.
- 57 Hagiwara, Y.; Watanabe, M.; Oda, Y.; Sofuni, T.; Nohmi, T. - Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. *Mutation Research*, 291, 171-180, **1993**.
- 58 Salvatori, D. M. F.; Ribeiro, L. R.; Fenech, M. - Teste do micronúcleo em células humanas. Em: *Mutagênese Ambiental* Canoas:Ulbra, 201-223, **2003**.
- 59 Bibb, M. J. - Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology*, 8:208-215, **2005**.
- 60 Pelizer, L. H.; Pontieri, M. H. e Moraes, I. O. - Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *J. Technol. Manag. Innov.*, 2, 1:118-127, **2007**.
- 61 Tamanini, C. e Hauly, M. C. O. - Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. *Seminário: Ciências Agrárias*, 25, 4:315-330, 2004.
- 62 Pessoa, M. L. A.; Andrade, S. A. C.; Salgueiro, A. A. e Stamford, T. L. M. - Aproveitamento de subproduto industrial de óleos vegetais para produção de riboflavina por *Candida guilliermondii* DM 6441. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 23, 3:453-458, **2003**.
- 63 Shapiro, S. - Regulation of Secondary metabolism in Actinomycetes. *CRCpress*, **1989**.
- 64 Sánchez, S.; Ruiz, B. e colaboradores - Carbon source regulation of antibiotic production. *J. Antibiotics*, 63, 442-459, **2010**.

- ⁶⁵ Brzonkalik, K.; Herrling, T.; Sylatk, C. e Neumann, A. - The influence of different nitrogen and carbon sources on mycotoxin production in *Alternaria alternata*. *Int. J. Food Microbiology*, 147, 120-126, **2011**.
- ⁶⁶ Rivaldi, J. D.; Sarroub, B. F.; Fiorilo, R. e Silva, S. S. - Glicerol de biodiesel. *Biotechnologia Ciências e Desenvolvimento*, 37, 44-51, **2007**.
- ⁶⁷ Rivaldi, J. D. e Silva, S. S. - Development of biotechnological processes using glycerol from biodiesel production. - *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* - World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., pp. 429-433, **2007**.
- ⁶⁸ Silva, S. N. R. L.; Farias, C. B. B.; Rufino, R. D.; Luna, J. M. e Sarubbo, L. A. - Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79, 174-183, **2010**.
- ⁶⁹ Miyake, T.; Mori, A.; Kii, T.; Okuno, T.; Usui, Y.; Sato, F.; Sammoto, H.; Watanabe, A. e Kariyama, M. - Light effects on cell development and secondary metabolism in *Monascus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32, 103-108, **2005**.
- ⁷⁰ Velmurugan, P.; Lee, Y. H.; Venil, C. K.; Lakshmanaperumalsamy, P.; Chae, J. C. e Oh, B. T. - Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. *J. Bioscience and Bioengineering*, 109, 4:346-350, **2010**.
- ⁷¹ Babitha, S.; Carvahlo, J. C.; Soccol, C. R. e Pandey, A. - Effect of light on growth, pigment production and culture morphology of *Monascus purpureus* in solid-state fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 11:2671-2675, **2008**.
- ⁷² Avalos, J. e Estrada, A. F. - Regulation by light in *Fusarium*. *Fungal Genetics and Biology* 47, 930-938, **2010**.
- ⁷³ Pattus, F. e Abdallah, M. A. - Siderophores and iron-transport in microorganisms. *J. Chin. Chem. Soc.* 47, 1-20, **2000**.
- ⁷⁴ Hider, R. C. e Kong, X. - Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.*, 27, 637-657, **2010**.
- ⁷⁵ Ohshima, M.; Ishizaki, N.; Handa, A. e Tonooka, Y. - Cultural conditions FOR Production of neopurpuratin, a purple-red pigment, by mixed culture of *Streptomyces propurpuratus* with *Bacillus* sp. *J. Ferment. Technol.* 61, 1:31-36, **1983**.
- ⁷⁶ Maia, L. F.; Fleury, B. G.; Lages, B. G.; Barbosa, J. P.; Pinto, A. C.; Castro, H. V.; de Oliveira, v. E.; Edwardse, H. G. M. e de Oliveira, L. F. C. - Identification of reddish pigments in octocorals by Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc*, 42, 653-658, **2011**.
- ⁷⁷ Leona, M.; Decuzzi, P.; Kubic, T. A.; Gates, G. e Lombardi, J. R. - Nondestructive Identification of Natural and Synthetic Organic Colorants in Works of Art by Surface Enhanced Raman Scattering. *Anal. Chem.*, 83, 3990-3993, **2011**.
- ⁷⁸ Civici, N.; Demko, O. e Clark, R. J. H. - Identification of pigments used on late 17th century Albanian icons by total reflection X-ray fluorescence and Raman microscopy. *Journal of Cultural Heritage*, 6, 157-164, **2005**.