



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

AMANDA MARIA DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO
BIOPIGMENTO DE *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422**

RECIFE
2020

AMANDA MARIA DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO
BIOPIGMENTO DE *Amocolatopsis* sp. UFPEDA 3422**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, do Centro de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Microbiologia, Bioprocessos e Bioprodutos.

Orientador: Prof^a Dr^a Gláucia Manoella de Souza Lima

Co-orientador: Prof^a Dr^a Janete Magali de Araújo

**RECIFE
2020**

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Amanda Maria da
Otimização, caracterização e atividade biológica do biopigmento de *Amycolatopsis*
sp. UFPEDA 3422 / Amanda Maria da Silva. - 2020.

116 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima.

Coorientadora: Profa. Dra. Janete Magali de Araújo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Recife,
2020.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Pigmentos. 2. Bactérias. 3. Actinomicetos. 3. I. Lima, Gláucia
Manoella de Souza (orientadora). II. Araújo, Janete Magali de
(coorientadora). III. Título.

547.97

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-155

AMANDA MARIA DA SILVA

**OTIMIZAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO
BIOPIGMENTO DE *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, do Centro de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Microbiologia, Bioprocessos e Bioprodutos.

Aprovada em: 19/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dra. Ana Beatriz Sotero Siqueira
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dra. Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco

**RECIFE
2020**

Aos meus pais, Lenilton (*in memorian*) e Eliete, por todo incentivo, persistência e dedicação
em me mostrar que sempre podemos nos superar.

A minha avó Cecília (*in memorian*), que sempre me incentivou a alçar voos altos, em busca
da minha felicidade, dedico!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua infinita bondade, por ter me ajudado a chegar até aqui e superar mais essa etapa da minha vida, me dando forças dia a dia pra enfrentar os desafios.

Aos meus pais, Lenilton e Eliete, por tudo que fizeram e fazem por mim e pela minha educação, por todo incentivo, carinho, abraços e orações. Vocês sempre foram minha maior inspiração.

Ao meu irmão, Lenilton júnior, por todo companheirismo, apoio, sorrisos, incentivo e colaboração em toda essa jornada, e por acreditar em mim mesmo nos momentos mais difíceis.

A minha avó Cecília, por ter sido abrigo para mim em todas as vezes em que eu me sentia sem forças. Eu te amo e vou sentir muitas saudades sempre.

A minha família por todo apoio e compreensão de minha ausência, nos diversos momentos em que gostaria de estar perto, mas que não foi possível.

Ao meu namorado, Arthur Travassos, por toda colaboração, paciência, parceria, abraços e incentivo que me foi dado em todos os momentos, muito obrigada amor.

A minha orientadora, Professora Gláucia Manoella, por toda confiança, generosidade, paciência, disponibilidade e orientação, muito obrigada!

A minha co-orientadora, Professora Janete Magali, por toda generosidade em compartilhar seus conhecimentos, confiança e zelo, muito obrigada!

Aos amigos e técnicos da coleção de micro-organismos UFPEDA, Marcela Sobral (Marcelita), Fátima Regina (Fafá), Allana Gouveia e Luís Carlos, por toda colaboração, amizade, incentivo e generosidade demonstrada para comigo.

Aos meus companheiros do laboratório de genética: Ana, Luana, Pedro, Richardson, Bruna, Michele, Diego, Gaby, Suelen, Vinícius, Amanda, Paulo, Eva, Katy e Patriky por todo companheirismo, risadas, colaboração nos experimentos e pelas conversas que tornavam o dia a dia mais leve.

Aos amigos do departamento de antibióticos, em especial a Iranildo, Laís e Mary, pelo companheirismo, colaboração nos experimentos, paciência, disponibilidade e risadas compartilhadas, vocês são demais.

Aos professores Willames de Albuquerque, Beate Saegesser, Jaciana Aguiar, Thiago Aquino, Alexandre Góes, por toda colaboração dada na construção deste trabalho, paciência e disponibilidade. Muito obrigada!

Agradeço ainda a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento desta pesquisa.

Aos amigos que a Biomedicina e o estágio me deram, Sueden Oliveira, Isabela Ribeiro, Anita Bezerra, João Pedro, Cássio Salgado, Linaldo, Letícia e Jarbas, por todo companheirismo, compreensão e conversas cheias de risos, obrigada por se fazerem próximos mesmo distantes.

A todos os meus amigos, pelos abraços, carinho e companheirismo, vocês são muito importantes pra mim.

Enfim, a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho, meu muito obrigada!

RESUMO

Biopigmentos produzidos por micro-organismos são considerados uma alternativa aos pigmentos sintéticos para utilização em diversos setores industriais. As Actinobactérias são produtoras de uma variedade de pigmentos e o gênero *Amycolatopsis*, pertencente a este filo, representa um produtor potencial ainda pouco relatado. Desse modo, este trabalho teve por objetivo otimizar e caracterizar a produção de pigmento por *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422 bem como avaliar a atividade biológica deste, a fim de verificar suas possíveis aplicações biotecnológicas. Na identificação do micro-organismo foram utilizadas análises morfológicas e biologia molecular (16S rRNA). Para produção do pigmento, o micro-organismo foi cultivado em fermentação submersa no meio de cultura Hickey-Tresner (HT), a 37° C, 48 h. A otimização da produção foi realizada utilizando planejamento fatorial em três níveis de variação, com as variáveis: concentração carbono/ concentração de nitrogênio (6:1; 6:2; 6:3; 10:1; 10:2; 10:3; 14:1; 14:2 e 14:3) e agitação (120, 150 e 180 rpm). O pigmento foi extraído a partir da biomassa com adição de solvente acetato de etila (3:1 v/p) e analisado por espectro de luz UV. Com o pigmento obtido foram realizados ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante, fitotóxica, citotóxica, e elucidação da estrutura química. O pigmento bruto extraído apresenta picos de absorção em 470 nm e 540 nm. A maior produção de pigmento (121,4 UA_{540 nm} e 134,65 UA_{470 nm}) foi obtida com 10 g de glicose, 3 g de triptona e 150 rpm. A maior concentração de biomassa obtida foi 56,4 g/L. Após a purificação foram obtidas duas frações do pigmento, uma vermelha (fração A) com pico de absorção em ~535 nm e ombro em ~500 nm e outra violácea enegrecida (fração B) com pico em ~550 nm. A fração A apresentou CMI de 250 µg/mL para *Staphylococcus aureus* e a fração B de 1000 µg/mL para *Pseudomonas aeruginosa*. As frações apresentaram EC₅₀ (125 µg/mL) na atividade antioxidante total e demonstraram atividade antioxidante no método DPPH (2,2-difenil-1-picrylhidrazil), com EC₅₀ de 1000 µg/mL (fração A) e 250 µg/mL (fração B). No ensaio ABTS (2,20-azino-bis ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico), a fração A apresentou percentual de remoção de 19,7% (500 µg/mL) e a fração B de 57,01% (1000 µg/mL). As frações A e B apresentaram baixo efeito fitotóxico em sementes de pepino e alface e não apresentaram citotoxicidade frente as linhagens celulares L929, Vero, HeLa, HT-29 e MCF-7 na concentração de 50 µg/mL. Os resultados sugerem a possibilidade de aplicação biotecnológica do pigmento produzido por *Amycolatopsis* sp. em diversas áreas de interesse comercial e podem subsidiar pesquisas futuras.

Palavras-chave: Biocorante; Actinobactéria; Pseudonocardaceae.

ABSTRACT

Biopigments produced by microorganisms are considered an alternative to synthetic pigments for use in several industrial sectors. Actinobacteria are producers of a variety of pigments and the genus *Amycolatopsis*, belonging to this phylum, represents a potential producer that is still underreported. Thus, this work aimed to optimize and characterize the pigment production by *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422 and to evaluate its biological activity, in order to verify its possible biotechnological applications. In the identification of the microorganism, morphological analyzes and molecular biology (16S rRNA) were used. To produce the pigment, the microorganism was cultured in submerged fermentation in the Hickey-Tresner (HT) culture medium, at 37° C, 48 h. The optimization of production was carried out using factorial planning in three levels of variation, with the variables: carbon concentration / nitrogen concentration (6:1; 6: 2; 6: 3; 10: 1; 10: 2; 10: 3; 14: 1; 14: 2 and 14: 3) and agitation (120, 150 and 180 rpm). The pigment was extracted from the biomass, with the addition of ethyl acetate solvent (3:1 v/w) and analyzed by UV light spectrum. With the obtained pigment, tests were carried out to evaluate the antimicrobial, antioxidant, phytotoxic, cytotoxic activity and elucidation of the chemical structure. The extracted crude pigment shows absorption peaks at 470 nm and 540 nm. The highest pigment production (121.4 AU_{540 nm} and 134.65 UA_{470 nm}) was obtained with 10 g of glucose, 3 g of tryptone and 150 rpm. The highest concentration of biomass obtained was 56.4 g / L. After purification, two pigment fractions were obtained, one red (fraction A) with an absorption peak at ~ 535 nm and shoulder at ~ 500 nm and another blackish violet (fraction B) with a peak at ~550 nm. Fraction A showed an MIC of 250 µg/mL for *Staphylococcus aureus* and fraction B of 1000 µg / mL for *Pseudomonas aeruginosa*. The fractions showed EC₅₀ (125 µg / mL) in total antioxidant activity and demonstrated antioxidant activity in the DPPH method (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil), with EC₅₀ of 1000 µg/mL (fraction A) and 250 µg/mL (fraction B). In the ABTS test (2.20-azino-bis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), fraction A showed a removal percentage of 19.7% (500 µg /mL) and fraction B of 57.01% (1000 µg /mL). Fractions A and B showed low phytotoxic effect on cucumber and lettuce seeds and did not show cytotoxicity against the cell lines L929, Vero, HeLa, HT-29 and MCF-7 at a concentration of 50 µg / mL. The results suggest the possibility of biotechnological application of the pigment produced by *Amycolatopsis* sp. in several areas of commercial interest and may support future research.

Keywords: Biocolorant; Actinobacteria; Pseudonocardaceae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática do Ciclo de desenvolvimento de actinobactérias.....	31
Figura 2 -	Esquema representativo do experimento para determinação da concentração mínima inibitoria e da concentração mínima bactericida	47
Figura 3 -	Fisiologia do isolado de <i>Amycolatopsis</i> UFPEDA 3422. 1. Perfil da utilização de fonte de carbono: A – Myo-inositol; B – D-maltose; C – Dextrina; D – D-trehalose; 2. Efeito da temperatura no crescimento microbiano: A – 4 °C; B – 45 °C; C – 37 °C; 3. Efeito do pH no crescimento microbiano: A – pH 4; B – pH 5; C – pH 9; D – pH 10; 4. Crescimento em diferentes concentrações de NaCl. Verso: A – 1% de NaCl; B – 3% de NaCl; C – 5% de NaCl; D – 7% de NaCl; E – 10% de NaCl; 5. Crescimento em diferentes concentrações de NaCl. Verso. A – 1% de NaCl e B – 3% de NaCl e 6. Atividade antimicrobiana: A – Rifampicina; B – Vancomicina; C- Ác. Nalidíxico; D – Gentamicina; E – Tobramicina; F – Cefoxitina; G – Estreptomicina	59
Figura 4 -	Extrato bruto de pigmento vermelho extraído com o auxílio de acetato de etila a partir da biomassa de <i>Amycolatopsis</i> sp. UFPEDA 3422	61
Figura 5 -	Biomassa do micro-organismo <i>Amycolatopsis</i> sp. UFPEDA 3422 produzida em função da proporção de C/N nas rotações 120 rpm, 150 rpm e 180 rpm. As médias foram comparadas entre si, pelo intervalo de confiança. Os resultados representados com letras iguais na mesma relação de concentração de carbono e nitrogênio não diferem entre si ($p < 0,05$)	62
Figura 6 -	Produção de pigmento por <i>Amycolatopsis</i> sp. UFPEDA 3422, relativo a rotação de 120 rpm com pico de absorção no comprimento de onda de 540 nm. Sendo observada uma elevação na produção no centro do gráfico na presença de 14 g de glicose e 1 e 3 g de triptona	65
Figura 7 -	Produção de pigmento por <i>Amycolatopsis</i> sp. UFPEDA 3422, relativo a rotação de 150 rpm com pico de absorção no comprimento de onda de 540 nm. Sendo observada elevação da produção no centro do gráfico na presença de 10 g de glicose e 3 g de triptona	66
Figura 8 -	Produção de pigmento por <i>Amycolatopsis</i> sp. UFPEDA 3422, relativo a rotação de 180 rpm com pico de absorção no comprimento de onda de 540	

	nm. Sendo observado elevação da produção no centro do gráfico na presença de 10 g de glicose e 1 g de triptona66
Figura 9 -	Produção de pigmento por <i>Amycolatopsis</i> sp. UFPEDA 3422, relativo a rotação de 120 rpm (470 nm). Sendo observada uma elevação na produção no centro do gráfico na presença de 6 g de glicose e 1g de triptona67
Figura 10 -	Produção de pigmento por <i>Amycolatopsis</i> sp. UFPEDA 3422, relativo a rotação de 150 rpm (470 nm) apresentando uma elevação da produção do pigmento no centro do gráfico quando na presença de 10 g de glicose e 3 g de triptona68
Figura 11 -	Produção de pigmento por <i>Amycolatopsis</i> sp. UFPEDA 3422, relativo a rotação de 180 rpm (470 nm). Sendo observada uma elevação da produção no centro do gráfico quando o micro-organismo é cultivado na presença de 10 g de glicose e 1 g de triptona68
Figura 12 -	Cromatografia em coluna (1) e CCD das frações obtidas (2 e 3) do pigmento produzido por <i>Amycolatopsis</i> sp. UFPEDA 342271
Figura 13 -	Espectro de infravermelho do pigmento (extrato bruto) produzido por <i>Amycolatopsis</i> sp. Espectro completo (A) e picos detalhados (B)74
Figura 14 -	Picos apresentados pela fração A do pigmento após análise da cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas75
Figura 15 -	Picos apresentados pela fração B do pigmento após análise da cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas76
Figura 16 -	Fitotoxicidade da fração A (acima) e fração B (meio) do pigmento produzido por <i>Amycolatopsis</i> sp. UFPEDA 3422 sobre sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>) comparadas com o controle (abaixo) 84
Figura 17 -	Fitotoxicidade da fração A (a esquerda) e fração B (a direita) do pigmento produzido por <i>Amycolatopsis</i> sp. sobre sementes de pepino (<i>Cucumis sativus</i>) comparadas com o controle (abaixo) 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Pigmentos microbianos em uso ou com potencial para a utilização como corantes alimentares (Adaptado de Sen et al., 2019)23
Tabela 2 -	Parâmetros da otimização da produção de pigmentos42
Tabela 3 -	Aspectos bioquímicos e fisiológicos observados na caracterização de <i>Amycolatopsis</i> sp. UFPEDA 3422 comparados com outras espécies do gênero <i>Amycolatopsis</i> apontados como similares a partir da análise molecular. Dados comparados com a caracterização das espécies presentes em Goodfellow (2012) e demais autores referenciados54
Tabela 4 -	Resultados da produção de pigmentos e biomassa produzidos por <i>Amycolatopsis</i> sp. UFPEDA 3422 no ensaio de otimização por meio de planejamento fatorial, utilizando as variáveis X_1 (concentração de carbono de 6, 10 e 14 g/L, correspondente aos níveis -1, 0 e +1 respectivamente), X_2 (concentração de nitrogênio 1, 2 e 3 g/L) e X_3 (variação da rotação 120, 150 e 180 rpm). Sendo a maior produção de pigmentos pelo micro-organismo observada no experimento de número 15.....63
Tabela 5 -	Resultados dos picos cromatográficos referentes à fração A do pigmento obtido de <i>Amycolatopsis</i> sp. UFPEDA 342274
Tabela 6 -	Resultados dos picos cromatográficos referentes à fração B do pigmento obtido de <i>Amycolatopsis</i> sp. UFPEDA 3422 76
Tabela 7 -	Resultados da atividade antimicrobiana das frações A e B do pigmento produzido por <i>Amycolatopsis</i> sp. UFPEDA 3422 frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas 77
Tabela 8 -	Resultados da atividade antioxidante e conteúdo de fenol total apresentados pelas frações A e B do pigmento produzido por <i>Amycolatopsis</i> sp. UFPEDA 342280
Tabela 9-	Resultados do ensaio de fitotoxicidade das frações A e B do pigmento realizado com as sementes de Alface (<i>Lactuca sativa</i>) e Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)83
Tabela 10 -	Atividade citotóxica das das frações A e B do pigmento produzido por <i>Amycolatopsis</i> sp. sobre as linhagens de células cancerígenas86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HT	Hickey-Tresner
CMI	Concentração Máxima Inibitória
CMB	Concentração Máxima Bacteriana
UFPEDA	Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
rRNA	Ácido Ribonucléico Ribossomal
UV	Ultra-Violeta
UV-Vis	Ultra-Violeta Visível
nm	Nanometro
UA	Unidade de Absorbância
EC ₅₀	Concentração de Eficiência
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ABTS	(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))
µg	microgramas
mgAGE	miligramas de equivalente Ácidos Gálico
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CGMS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectro de Massas
pH	Potencial hidrogeniônico
SVS/MS	Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde
US\$	Dólares Norte Americanos
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ISP-1	International Streptomyces Medium 1
ISP-2	International Streptomyces Medium 2
ISP-9	International Streptomyces Medium 9
µL	Microlitro
°C	Graus celsius
mL	Mililitro
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
ng	Nanograma
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
µM	Micromolar
rpm	Rotações por minuto
RMN	Ressonância Magnética
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
DMEM	Meio de Cultura Dubecco's modificado do Meio Eagle
RPMI	Meio do Instituto Roswell Park Memorial
UDO	Unidade de Densidade Ótica
EROS	Espécies reativas de oxigênio
TES	Tris-EDTA-Sacarose
TE	Tris-EDTA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Objetivo Geral.....	18
1.1.2 Objetivos Específicos	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 HISTÓRICO	19
2.2 PIGMENTOS	20
2.3 APLICAÇÕES DE PIGMENTOS NATURAIS	27
2.4 ACTINOBACTÉRIAS	29
2.4.1 Identificação de Actinobactérias	32
2.5 GÊNERO <i>Amycolatopsis</i>	33
2.6 FATORES QUE INFLUENCIAM NO CRESCIMENTO MICROBIANO	35
3 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 IDENTIFICAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO	37
3.1.1 Reativação do micro-organismo e análise microscópica	37
3.1.2 Caracterização bioquímica do micro-organismo	37
3.1.2.1 Avaliação da degradação das fontes de carbono	37
3.1.2.2 Avaliação da degradação do Tween	37
3.1.2.3 Avaliação da degradação da gelatina.....	38
3.1.2.4 Perfil metabólico de utilização de fonte de carbono.....	38
3.1.2.5 Avaliação do crescimento em diferentes pH	38
3.1.2.6 Avaliação do crescimento em diferentes temperaturas	39
3.1.2.7 Tolerância a cloreto de sódio (NaCl).....	39
3.1.2.8 Perfil de susceptibilidade a antibióticos	40
3.1.3 Identificação molecular do micro-organismo	40
3.2 PRODUÇÃO DE PIGMENTOS EM CULTIVO SUBMERSO	41

3.2.1 Otimização da produção de pigmentos.....	42
3.3 OBTENÇÃO DE BIOMASSA	42
3.3.1 Extração do pigmento	42
3.4 ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA UV-VISÍVEL	43
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E PARÂMETROS CINÉTICOS	43
3.6 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO PIGMENTO	44
3.6.1 Cromatografia em coluna “Flash” e cromatografia em camada delgada (CCD)	45
3.6.2 Análise de espectroscopia por Infravermelho (IV) transformada de Fourier	45
3.6.3 Parâmetros de análise em GC-MS	45
3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO PIGMENTO....	46
3.7.1 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)	46
3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	48
3.8.1 Atividade Antioxidante Total	48
3.8.2 Atividade de eliminação de radicais DPPH.....	48
3.8.3 Atividade de eliminação de cátions radicais ABTS	49
3.9 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS	50
3.10 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	50
3.10.1 Ensaio de fitotoxicidade	50
3.10.2 Ensaio de citotoxicidade	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1 IDENTIFICAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO	53
4.2 PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E ANÁLISE EM ESPECTROFOTÔMETRO UV-VIS DO PIGMENTO.....	60
4.3 OBTENÇÃO DA BIOMASSA, OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PIGMENTO, PARÂMETROS CINÉTICOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	61
4.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA	71
4.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	71

4.4.2 Análise de espectroscopia por Infravermelho (IV) transformada de Fourier	72
4.4.3 Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (GCMS) ...	74
4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	76
4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	79
4.7 ENSAIO DE FITOTOXICIDADE.....	82
4.8 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	85
5 CONSIDERAÇÕES	88
6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	89
REFERÊNCIAS.....	90
APÊNDICE A - Curva padrão de ácido ascórbico.....	112
APÊNDICE B - Curva padrão do ácido Gálico.....	112
APÊNDICE C - Tabela decodificada dos Resultados da produção de pigmentos e biomassa produzida por <i>Amycolatopsis</i> sp. UFPEDA 3422 no ensaio de otimização por meio de planejamento fatorial, utilizando as variáveis X₁ (concentração de carbono de 6, 10 e 14 g/L, correspondente aos níveis -1, 0 e +1 respectivamente), X₂ (concentração de nitrogênio 1, 2 e 3 g/L) e X₃ (variação da rotação 120, 150 e 180 rpm). Sendo a maior produção de pigmentos pelo micro-organismo observada no experimento de número 15.....	112
ANEXO A - Composição dos Meios de Cultura e Soluções Tampão	114

1 INTRODUÇÃO

Pigmentos são substâncias, de origem natural ou sintética, cuja finalidade é conferir ou intensificar a coloração do produto. Os termos ‘corante’ e ‘pigmento’ são geralmente empregados como sinônimos. Entretanto, pigmentos tem por característica a insolubilidade no meio, enquanto corante apresenta comportamento contrário (ABEROUMAND, 2011). Os carotenoides, por exemplo, podem ser considerados corantes em óleos e pigmentos na presença de água. Desse modo, o termo pigmento é empregado de maneira geral para substâncias coloridas.

Estruturalmente diversos, os pigmentos possuem diferentes funções biológicas e compreendem insumos necessários a diferentes áreas de produção, sendo amplamente utilizados como colorantes e mais recentemente como agente na proteção solar (YANG et al., 2015; WOO et al., 2014). Estes compostos são amplamente empregados em indústrias têxteis, farmacêuticas e em especial nas alimentícias.

De modo geral, são reconhecidas duas categorias de pigmentos: os pigmentos sintéticos e os naturais. Os pigmentos naturais apresentam vantagens significativas frente a pigmentos sintéticos, os quais têm demonstrado alta toxicidade e efeitos nocivos à saúde humana, incluindo reações alérgicas e potenciais efeitos mutagênicos e carcinogênicos (em células epiteliais) (CARO et al., 2012; LAGASHETTI et al., 2019), sendo alguns proibidos em determinados países (MENG et al., 2016).

As maiores fontes de biopigmentos ou pigmentos naturais são vegetais e micro-organismos. Contudo, os pigmentos produzidos por micro-organismos são mais vantajosos que aqueles produzidos por vegetais, em função da sua estabilidade, disponibilidade não relacionada a variações sazonais, custo-eficácia, alto rendimento e fácil obtenção (NIGAM e LUKE, 2016).

As actinobactérias apresentam grande diversidade de espécies produtoras de pigmentos, e são responsáveis por cerca de 80% dos metabólitos secundários de utilização comercial na indústria farmacêutica. A diversidade de pigmentos exibida por estes micro-organismos tem sido objeto de estudo não apenas por suas tonalidades, mas também devido a versatilidade de aplicações de seus metabólitos, como antimicrobianos, anticancerígenos, imunomoduladores e antioxidantes, que os tornam um excelente alvo para aplicações multifuncionais (PARMAR e SINGH, 2018; AZMAN; MAWANG; ABUBAKAR, 2018).

O gênero *Amycolatopsis*, pertencente ao Filo das Actinobactérias, exibe uma grande variedade de espécies produtoras de pigmentações difusíveis (branco, amarelo, verde, marrom e vermelho) ainda pouco reconhecidas na literatura, que o torna importante objeto de pesquisa para a produção otimizada de corantes naturais (GOODFELLOW et al., 2012). A investigação de pigmentos produzidos por este gênero bem como a elucidação de possíveis aplicações deste pode contribuir significativamente na substituição de pigmentos sintéticos.

Ademais, a busca por pigmentos oriundos de fontes naturais como micro-organismos, representam uma alternativa de baixo custo e de fácil obtenção, capaz de atender as demandas industriais por meio da utilização de técnicas de melhoramento e desenvolvimento, em ensaios fermentativos que aumentem a produção de pigmentos, representando assim um avanço biotecnológico. Nesse sentido, a produção e aplicação de pigmentos bacterianos como corantes naturais vem sendo investigada por vários pesquisadores, constituindo um dos campos emergentes de pesquisa para demonstrar o seu potencial em possíveis aplicações industriais (AZMAN; MAWANG; ABUBAKAR, 2018).

Assim, os corantes naturais vêm adquirindo alto valor comercial nas indústrias nutracêutica, cosmética, farmacêutica e têxteis além de apresentarem até então fontes de benefícios para a saúde, como agentes antioxidantes, anticancerígenos, antiproliferativos, imunossuppressores, antimicrobianos, antimaláricos e no tratamento de diabetes mellitus. (LI et al., 2018; AZMAN; MAWANG; ABUBAKAR, 2018).

É notável, portanto, a necessidade de explorar as novas tendências de micro-organismos e estratégias adequadas para produção comercial de pigmentos microbianos, para atender a alta demanda de pigmentos provenientes de fontes naturais e com baixa toxicidade (NIGAM e LUKE, 2016).

Nesse sentido faz-se necessário o estudo destes pigmentos produzidos por organismos como *Amycolatopsis* sp. otimizando a produção, investigando a atividade biológica bem como avaliando a toxicidade e características destes compostos, a fim de constatar possíveis aplicações comerciais. Tendo em vista que é tecnologicamente viável preparar novos corantes de plantas ou micro-organismos conhecidos localmente e que ainda não foram investigados cientificamente, o estudo deste gênero pode contribuir de modo significativo para novas aplicações, gerando alternativas substitutivas aos corantes artificiais, utilizando micro-organismos, os constituintes mais versáteis da biotecnologia (TULI et al., 2015; WISSGOTT e BORTLIK, 1996).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral:

Otimizar a produção, caracterizar e avaliar as atividades biológicas do biopigmento produzido por *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422.

1.1.2 Objetivos Específicos:

1. Realizar a identificação do micro-organismo;
2. Avaliar o crescimento em diferentes condições de fonte de carbono e nitrogênio;
3. Otimizar a produção de pigmento vermelho por *Amycolatopsis* sp.;
4. Obter os parâmetros cinéticos da produção de pigmentos e de biomassa em cultivos submersos utilizando diferentes condições de cultivo;
5. Realizar a caracterização química do pigmento;
6. Avaliar a atividade antimicrobiana, antioxidante, fitotóxica e citotóxica do pigmento produzido por *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO

Desde o primeiro rabisco de uma pintura rupestre na parede de uma caverna até a utilização nas indústrias alimentícia, farmacêutica, têxtil e de cosméticos, a humanidade se beneficia de diversas formas dos pigmentos. Na indústria alimentícia, por exemplo, a cor é uma das primeiras características observadas pelos consumidores e que, consequentemente, impacta nas suas vendas (AZMAN; MAWANG; ABUBAKAR, 2018).

Acredita-se que os primeiros registros de sua utilização, datam do Antigo Egito onde eram utilizados para fins decorativos (YE et al., 2019). Antes da Era Moderna os pigmentos orgânicos (obtidos de fontes naturais) eram parte importante da história, estando presentes em cosméticos, na ornamentação e no tingimento de tecidos (PARMAR e SINGH, 2018). Sem dúvida, os pigmentos desempenham um importante papel na vida humana.

Até metade do séc. XIX existiam poucos pigmentos naturais relatados na literatura, estes eram pouco estudados devido à sua difícil obtenção (NAGENDRAPPA, 2010). Em 1856, entretanto, Sir William Henry Perkin, um jovem químico, ao tentar sintetizar a Quinina obteve um composto diferente: uma substância cor de malva (violeta a roxo). Esse foi o marco inicial da indústria dos corantes sintéticos e sua descoberta impactou não só a química e a ciência em geral, mas, também, estimulou a economia e se tornou instrumento de mudança social, cultura e política (NAGENDRAPPA, 2010).

A descoberta de William Perkin é considerada um marco para a indústria de pigmentos. A partir de então, vários pigmentos foram sinteticamente produzidos e utilizados para diversas finalidades. Dos milhares de pigmentos e (ou) corantes disponíveis, mais de 90% são sintéticos (NAGENDRAPPA, 2010). Entretanto, à medida que os pigmentos sintéticos foram se popularizando, efeitos nocivos à saúde foram sendo reportados incentivando a mudança de hábitos dos consumidores. Estes fatores contribuíram para uma redução considerável no número de pigmentos sintéticos permitidos por órgãos governamentais nos últimos anos (DURÁN et al., 2002; NARSING RAO; XIAO; LI, 2017).

Uma alternativa segura e eficaz aos pigmentos sintéticos são os obtidos através de fontes naturais. Os pigmentos naturais são utilizados desde os primórdios da humanidade. Registros pré-históricos indicam que os primeiros humanos utilizavam os pigmentos para fins estéticos o

que foi comprovado com achados de pigmentos e equipamentos de moagem de 350.000 anos de idade (NARSING RAO; XIAO; LI, 2017).

Historicamente, a adição de pigmentos nos alimentos remota ao antigo Egito quando comerciantes de doces adicionavam extratos naturais aos seus produtos (NARSING RAO; XIAO; LI, 2017). O uso de corantes naturais também foi reportado durante a dinastia Nara, no Japão, no século 8 onde instruções para colorir bolos de soja e de feijão azuqui foram encontradas em textos Shosoin (conjunto de documentos oficiais da época) (ABEROUMAND, 2011).

Diferentes partes das plantas como sementes, frutos, folhas e raízes foram durante muito tempo as fontes preferenciais para extração desses pigmentos e, até muito recentemente eram as principais (PARMAR e SINGH, 2018; YE et al., 2019). Porém, a produção de pigmentos a partir de vegetais sofre com alguns aspectos como a sazonalidade e o clima. Nesse aspecto, a produção de pigmentos naturais a partir de micro-organismos surge como uma alternativa. O crescimento rápido e fácil em meio de cultura relativamente baratos, a independência do clima e as diferentes tonalidades de pigmentação são algumas das vantagens que os pigmentos microbianos apresentam em relação aos pigmentos vegetais (NIGAM e LUKE, 2016; VENIL; LAKSHMANAPERUMALSAMY, 2009)

Uma alternativa frente às fontes vegetais são os pigmentos extraídos a partir de micro-organismos, como fungos e bactérias. Os pigmentos naturais obtidos a partir de micro-organismos vem despertando cada vez mais interesse da indústria uma vez que sua produção pode ser otimizada alterando parâmetros de crescimento como temperatura, componentes do meio de cultura e pH (SEHRAWAT et al., 2017) e não depende de sazonalidade como no caso dos pigmentos vegetais.

2.2 PIGMENTOS

Os pigmentos são substâncias que absorvem diferentes comprimentos de ondas, e apresentam cores variadas (AFRA, et al., 2017), podendo ainda ser definido como substância capaz de conferir cor a determinado material, sendo considerado um corante, apesar de apresentar caráter insolúvel no meio em que é incorporado (GÜRSES et al., 2016).

Amplamente utilizados em setores industriais como aditivos, agente antioxidante, entre outras funções (UDHYAKUMAR et al., 2017) os pigmentos podem ser classificados de diferentes formas. Com relação à sua fonte de obtenção podem ser denominados naturais ou sintéticos, e com relação a sua natureza são considerados orgânicos ou inorgânicos (minerais) observada sua composição química ou propriedades físicas. Os pigmentos naturais são obtidos, principalmente, de plantas e de micro-organismos (fungos, bactérias, cianobactérias), enquanto os sintéticos são produzidos quimicamente (GÜRSES et al., 2016).

De acordo com a Portaria SVS/MS 540/97 (BRASIL, 1997), considera-se corante a substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir, intensificar ou restaurar a coloração de alimentos e bebidas. Sendo estes considerados aditivos alimentares, pois não agregam valor nutricional, apenas intensificam as propriedades intrínsecas do alimento.

A diversidade de aplicações dos pigmentos, tem impulsionado o crescimento da produção destes ao longo dos anos. Conforme Manjunath e colaboradores (2017), as projeções de lucro para o mercado de corantes naturais e sintéticos até 2019 foi de cerca de US\$ 2,3 bilhões, demonstrando crescimento de aproximadamente 4,6% ao ano. Sendo crescente a demanda dos pigmentos naturais em relação aos sintéticos (MANJUNATH et al., 2017).

O uso generalizado de pigmentos sintéticos tem levantado discussões dos governos e das organizações de saúde acerca dos impactos a longo prazo na saúde humana (MUSSAGY et al., 2019; KUMAR et al., 2015a). Além disso a matéria prima (precursores) utilizada na síntese deste provoca efeitos nocivos à saúde dos trabalhadores assim como os resíduos de sua produção, gerando reações alérgicas em animais e danos ambientais pela produção de contaminantes de difícil degradação, associados a sua estrutura e a presença do grupo azólico (KUMAR et al., 2015a; OLESEN et al., 2010).

Além disso a síntese de pigmentos por meio de processos químicos representa um custo elevado a produção em larga escala, visto que a maioria desses processos está relacionado com técnicas de refinação de combustíveis fósseis (OLESEN et al., 2010). Por esses e outros fatores a procura por pigmentos naturais vem crescendo nos últimos anos.

Dentre os diferentes tipos de pigmentos naturais produzidos, as classes mais comumente encontradas são os melanoides, prodigiosina e carotenoides. Cetocarotenoides, como astaxantina ou cantaxantina, estão entre os pigmentos carotenoides de maior valor no mercado, sendo empregados como suplementos e colorantes alimentares para intensificar a cor e manter

a estética agradável de produtos como carnes, por exemplo (SARTORI e SILVA, 2014). Isoprenóides, alcalóides e flavonóides também são pigmentos bastante conhecidos, e têm sido utilizados para fragrância, sabor e cor em vários tipos de alimentos (HEER e SHARMA, 2017).

A prodigiosina e a violaceina possuem propriedades antibacterianas, antivirais e (LAPENDA et al., 2015; CAZOTO et al., 2011) e anticancerígenas além de conferir proteção UV (HOEFLER et al., 2017).

A crescente busca dos consumidores por produtos naturais intensificam o interesse da indústria no desenvolvimento de novas fontes de produção destes pigmentos, advindos de plantas ou micro-organismos. Dessa forma, ferramentas de engenharia genética e técnicas de melhoramento do processo de cultivo, capazes de criar fontes renováveis de corantes naturais vem sendo utilizadas (NOGUEIRA et al., 2017). Do mesmo modo, a sustentabilidade e a crescente consciência ambiental, sugerem cada vez mais a necessidade de adesão das indústrias à utilização de técnicas e produtos de origem natural, cujos resíduos tragam menos danos ao ambiente e a saúde, e que, portanto, possam ser empregados de forma saudável e equilibrada. (NIGAM e LUKE, 2016).

As plantas foram as principais fontes de pigmentos naturais durante muito tempo. Os flavonóides e quinonas obtidos a partir de citrinos e legumes são alguns exemplos de pigmentos de plantas com atividade antitumoral (DAI e MUMPER, 2010) porém, nos últimos anos, o interesse nos pigmentos microbianos é crescente em função das vantagens por eles oferecidas. O pigmento microbiano é mais rapidamente produzido e independe de condições sazonais e geográficas, diferentemente dos pigmentos produzidos por vegetais (VENIL; ZAKARIA; AHMAD, 2013). Alguns dos principais pigmentos obtidos a partir de micro-organismos são apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Pigmentos microbianos em uso ou com potencial para a utilização como corantes alimentares (Adaptado de Sen et al., 2019).

Id	Pigmento	Aplicação	Cor	Micro-organismo	Funções/Atividade Verificada	Status*	Referências
BACTÉRIAS							
1	Astaxantina	Alimentar	Rosa-avermelhado	<i>Agrobacterium aurantiacum</i> <i>Paracoccus carotinifaciens</i>	Antioxidante, anticâncer. Anti-inflamatória, antioxidante Anticâncer.	PP/PI	Reyes; Valim; Vercesi, 1996; Yokoyama e Miki, 1995.
2	Akashin A	Têxtil	Azul	<i>Streptomyces</i> sp. F001	Atividade citotóxica.	PP	Braesel et al., 2019
3	Rubrolone	Alimentar	Vermelho	<i>Streptomyces echinoruber</i>	Antimicrobiana. Antibiótica, antioxidante,	ED	Dharmaraj et al., 2009.
4	Undecilprodigiosina	Alimentar	Vermelho	<i>Streptomyces</i> sp.	proteção contra UV, anticâncer.	DES	Liu et al., 2005; Stankovic et al., 2012
5	Melanina	Farmacêutica	Preto	<i>Nocardiosis dassonvillei</i> <i>Nocardiosis</i> sp. / <i>Streptomyces fildesensis</i> <i>Streptomyces</i> sp. ZL-24	Antibiofilme, antimicrobiana / Fotoestimulante Antibiofilme, antioxidante.	ED	Kamarudheen; Naushad; Rao, 2019; Silva et al., 2019; Wang; Yumei; Yamei, 2019
6	Coelomicina	Medicinal	Amarelo	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Antimicrobiana.	ED	Bednarz; Kotowska; Pawlik, 2019
7	Prodigiosina	Biotecnológica	Vermelho	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticâncer, antioxidante.	ED	Sajjad et al., 2018
8	Não identificado	Têxtil	Marrom avermelhado	<i>Streptomyces torulosus</i>	Corante.	PP	Kheiralla et al., 2016
9	Licopeno	Alimentar Farmacêutica	Laranja Amarelo	<i>Arthrobacter</i> sp.	Corante.	PP	Vila et al., 2019
10	Não identificado	Medicinal	Vermelho Pálido	<i>Amycolatopsis decaplanina</i>	Antimicrobiana.	PP	Abraham e Chauhan, 2014
11	Não identificado	Alimentar Industrial	Laranja	<i>A. meditarreni</i> U32	Corante.	PP	Yang et al., 2001

Continua

Continuação

Id	Pigmento	Aplicação	Cor	Micro-organismo	Funções/Atividade Verificada	Status*	Referências
12	Cantaxantina	Alimentar	Laranja	<i>Bradyrhizobium</i> spp. <i>Lactobacillus pluvalis</i>	Antioxidante e anticâncer.	PP	Lorquin; Molouba; Dreyfus, 1997; Dufossé, 2006.
13	Granadaene	Alimentar	Laranja-avermelhado	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Antioxidante, detoxicação de espécies reativas de oxigênio.	ED	George e Nizet, 2009; Rosa-Fraile, 2006.
14	Heptil-Prodigiosina	Alimentar	Vermelho	<i>α-Proteobacteria</i>	Antiplasmodial.	ED	Lazaro et al., 2002.
15	Prodigiosina	Alimentar	Vermelho	<i>Serratia marcescens</i> , <i>Pseudoalteromonas rubra</i>	Anticâncer, clivagem do DNA, imunossupressora.	PI	Feher et al., 2008; Deorukhkar et al., 2007.
16	Ficocianina	Alimentar	Azul, Verde	<i>Pseudomonas</i> spp.	Citotoxicidade, apoptose de neutrófilos, desmotilidade ciliar, pro-inflamatória.	PI	Baron e Rowe, 1981
17	Estafiloxantina	Alimentar	Dourado	<i>Staphylococcus aureus</i>	Antioxidante e detoxicação de espécies reativas de oxigênio.	DES	Liu et al., 2005a; Liu et al., 2005b; Clauditz et al., 2006.
18	Triptantrina	Alimentar	Preto-claro, Amarelo	<i>Cytophaga/Flexibacteria</i> AM13,1 <i>Janthinobacterium lividum</i> ,	Antioxidante, anticâncer.	DES	Wagner et al., 1996
19	Violaceina	Alimentar	Roxo	<i>Pseudoalteromonas tunicate</i> , <i>Pseudoalteromonas</i> spp. <i>Chromobacterium violaceum</i>	Antioxidante, detoxicação de espécies reativas de oxigênio.	DES	Duran et al., 2012; Matz et al., 2004.
20	Xantomonadina	Alimentar	Amarelo	<i>Xanthomonas oryzae</i>	Proteção contra danos de exposição à luz.	DES	Dufossé, 2009; Rajagopal et al., 1997
21	Zeaxantina	Alimentar	Amarelo	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Flavobacterium</i> spp.,	Fotoprotetora, antioxidante.	ED	Hammond e White, 1970.

Continua

Continuação

<i>Paracoccus</i> <i>zeaxanthinifaciens</i>, <i>Sphingobacterium</i> <i>multivorum</i> FUNGOS							
Id	Pigmento	Aplicação	Cor	Micro-organismo	Funções/Atividade Verificada	Status*	Referências
22	Ankaflavina	Alimentar	Amarelo	<i>Monascus</i> sp.	Antitumoral, anti-inflamatória.	PI	Hsu et al., 2011; Dufossé, 2017
23	Antraquinona	Alimentar	Vermelho e outros tons conhecidos como Vermelho Natural	<i>Penicilium oxalicum</i> (e muitos outros fungos)	Antifúngica, virucida.	PI	Andersen et al., 1991; Agarwal et al., 2000; Venil e Lakshmanaperumalsamy, 2009
24	Azafilona	Alimentar	Vermelho	<i>Talaromyces atrovirens</i> <i>Penicillium purpurogenum</i>	Antioxidante, anticâncer Antioxidante.	ED	Dufossé, 2017; Gao; Yang; Qin, 2013; Venkatachalam et al., 2016; Patil; Sivanandhan; Thakare, 2015; Padmapriya e Murugesan, 2016.
25	β -caroteno	Alimentar	Laranja amarelado	<i>Blakeslea trispora</i> , <i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>Mucor circinelloides</i> , <i>Neurospora crassa</i> , <i>Phycomyces</i> , <i>Blakesleeanus</i>	Anticâncer, antioxidante, supressão da síntese de colesterol.	PI	Dufossé, 2009; Dufossé, 2017; Lopes et al., 2009; Lopes et al., 2009.
26	Cantaxantina	Alimentar	Laranja, rosa	<i>Monascus</i> spp.	Antioxidante, anticâncer.	DES	Dufossé, 2018; Dufossé, 2005.
27	Cicloprodigiosina	Alimentar	Vermelho	<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i> <i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>Blakeslea trispora</i>	Antiplasmodial, anticâncer.	ED	Kim; Hayashi; Shibata, 1999; Yamamoto et al., 1999
28	Licopeno	Alimentar	Vermelho	<i>Fusarium sporotrichioides</i> , <i>Blakeslea trispora</i>	Antioxidante, anticâncer.	PP/ED	Di Mascio et al., 1989; Giovannucci et al., 2002
29	Monascorubramina	Alimentar	Vermelho	<i>Monascus</i> spp.	Anticâncer.	PI	Blanc et al., 1994; Dufossé, 2018

Continua

Continuação

Id	Pigmento	Aplicação	Cor	Micro-organismo	Funções/Atividade Verificada	Status*	Referências
30	Naftoquinona	Alimentar	Vermelho sangue intenso	<i>Cordyceps unilateralis</i>	Anticâncer, antibacteriana, tripanocidal.	PP	Dufossé, 2017; Prathumpai et al., 2006; Nematollahi; Aminimoghadamfarouj; Wiart, 2012; Unagul et al., 2005
31	Riboflavina	Alimentar	Amarelo	<i>Ashbya gossypi</i>	Anticâncer, antioxidante, proteção contra doenças cardiovasculares.	PI	Dufossé et al., 2018; Unagul et al., 2005; Hong et al., 2008; Powers, 2003
32	Rubropunctatina	Alimentar	Laranja	<i>Monascus</i> sp.	Anticâncer.	PI	Zheng et al., 2010
33	Astaxantina	Alimentar	Rosa-avermelhado	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> formalmente conhecida como <i>Phaffia rhodozyma</i>	Antioxidante, fotoprotetora, anticâncer, anti-inflamatória.	ED	Ramirez et al., 2000
34	Melanina	Alimentar	Preto	<i>Saccharomyces neoformans</i> var. <i>nigricans</i>	Antimicrobiana, antibiofilme e antioxidante.	DES	Vinarov et al., 2003
35	Torularodina	Alimentar	Laranja-Vermelho	<i>Rhodotorula</i> spp.	Antioxidante, antimicrobiana.	ED	Kot et al., 2016; Zoz et al., 2015; Yadav et al., 2017

*Status industrial (adaptado de Dufossé): ED, Estágio de desenvolvimento; PI, Produção industrial; PP, Projeto de pesquisa; DES, Desconhecido

Na industrial têxtil, de cosméticos e farmacêutica os pigmentos microbianos já vêm sendo empregados satisfatoriamente (RAO et al., 2017) sendo considerados substâncias promissoras para o tratamento de neoplasias, bem como potenciais agentes antioxidantes, citotóxicos, antimicrobianos de sua natureza biodegradável (MANIKPRABHU e LINGAPPA, 2014; TULI et al., 2015; AFRA et al., 2017).

Desse modo, os chamados biopigmentos entram em mercados antes dominados por pigmentos obtidos por síntese química. Contudo, para que se tornem os substituintes majoritários aos componentes sintéticos, os materiais produzidos biologicamente devem oferecer vantagens em sua utilização, no custo de produção e/ou estarem em conformidade com as normas e legislações vigentes. As três principais categorias emergentes de biopigmentos deste mercado são carotenoides, xantofilas e melanina (VALDUGA et al., 2009b).

As características apresentadas pelos pigmentos naturais são variadas e positivas. O valor nutricional é mais uma das vantagens apresentadas pela utilização destas moléculas, visto que, a adição de corantes como o betacaroteno, enriquecem os alimentos com a atividade provitamínica A, auxiliando no fortalecimento do sistema imunológico e reduzindo a susceptibilidade a doenças degenerativas (VALDUGA et al., 2009a). Acrescente-se ainda que pigmentos de fontes biológicas ou microbianas possuem estabilidade ao calor leve e ao pH 11, que são propriedades desejáveis a moléculas com a função a que se destinam na indústria (HEER e SHARMA, 2017).

Sendo assim, existe um crescente interesse no desenvolvimento de processos para a produção de pigmentos de fontes naturais devido ao grave problema de segurança com muitos produtos que utilizam corantes artificiais que, ainda, vem sendo amplamente utilizados em gêneros alimentícios, processos de fabricação cosmética e farmacêutica (MANIVASAGAN, 2013; DORNELAS et al., 2017).

2.3 APLICAÇÕES DE PIGMENTOS NATURAIS

As cores desempenham importante papel no cotidiano. De acordo com Dufossé (2016) os pigmentos tem sido utilizados pela sociedade desde a pré-história. Alimentos, fármacos, cosméticos e produtos em geral utilizam de cores para atrair a atenção de consumidores, sendo a cor fator de influência na escolha e aceitação destes. Conferir cor aos mais variados produtos é apenas uma das diversas aplicações dos pigmentos, visto que, estes

também podem apresentar atividade antioxidante, anticancerígena e antibacteriana (MANIVASAGAN et al., 2018; MUSSAGY et al., 2019).

A clorofila que auxilia na fotossíntese e a hemoglobina que transporta o oxigênio por todo o nosso corpo são apenas alguns dos pigmentos que possuem impacto direto nas nossas vidas. Dessa maneira pode-se afirmar que, de certa forma, pigmentos também influenciam na vida na Terra (NARSING RAO; XIAO; LI, 2017).

Uma das principais aplicações dos pigmentos é na indústria alimentícia como aditivo alimentar. Um pigmento é adicionado ao alimento com o objetivo de: a) suprir a cor perdida durante o processamento; b) realçar a cor já existente; c) minimizar as diferenças entre os lotes ou d) para fornecer cor aos alimentos incolores (ABEROUMAND, 2011), ou seja, deixar o alimento apresentável e desejável para os consumidores.

Para a legislação brasileira, aditivo alimentar é qualquer “substância intencionalmente adicionada ao mesmo com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, desde que não prejudique seu valor nutritivo” (BRASIL, 1965).

De maneira geral, apesar de estruturalmente diversos e provenientes de diferentes fontes, os pigmentos utilizados na indústria alimentícia podem ser agrupados em pequenas classes sendo os tetrapirróis, os tetraterpenos e os flavonóides os mais importantes (ABEROUMAND, 2011). A clorofila é o membro mais importante dos tetrapirróis, sendo encontrada em plantas superiores. Dentre os tetraterpenos, os carotenoides, produzidos por plantas e micro-organismos (geralmente vermelho, laranja ou amarelo), são os principais e desempenham importante papel na absorção de luz, na transferência de energia durante a fotossíntese e na proteção do sistema fotossintético contra danos foto-oxidativos (HENRIQUEZ et al., 2016), além de neutralizar radicais livres (agindo como antioxidantes), prevenir o dano oxidativo às células e possuir ação anti-inflamatória. Muitos estudos tem demonstrado sua relação com a diminuição do risco de desenvolvimento de câncer (MUSSAGY et al., 2019; CHO et al., 2018). As diferentes atividades apresentadas por este grupo estão relacionadas a presença de grupos funcionais de polaridade diferentes e ao número de suas ligações duplas conjugadas.

Pigmentos tetrapirrolícos, como a clorofila (a e b) produzido por vegetais são empregados como corantes de alimentos e também apresentam ação antioxidante, pois devido a porfirina presente em sua estrutura esta tem a capacidade de doar átomos de hidrogênio e eliminar radicais livres (SUPARMI et al., 2016). Adicionalmente, a clorofila tem sido relacionada a proteção contra o câncer, sendo proposta com agente quimiopreventivo na dieta, além de apresentar propriedade antígeno-tóxica e imunomoduladora. Esse efeito tem sido a

forma como a clorofila se liga firmemente a substâncias com potencial cancerígeno no lúmen intestinal impedindo sua absorção. (VAŇKOVÁ et al., 2018). A clorofila e os carotenoides são os pigmentos mais abundantes da natureza (ABEROUMAND, 2011).

Flavonóides, como as antocianinas, pigmento natural produzidas por algumas espécies vegetais, são utilizadas como aditivo alimentar (MANJUNATH et al., 2017), e apresentam relatos de eficiência no tratamento de doenças cardiovasculares e circulatórias, demonstrando efeitos positivos na oxidação de proteínas de baixa densidade além de capacidade antioxidante e redução dos níveis de biomarcadores de doenças cardiovasculares (REIS et al., 2016). Além disso, são consideradas importantes agentes no tratamento de doenças crônicas e neurodegenerativas, apresentando atividade anti-inflamatória associada a sua estrutura química (REIS et al., 2016).

Pigmentos melanóides produzidos por micro-organismos possuem capacidade de quelar ions metálicos, fornecem rigidez estrutural para parede celular, além de desempenhar importante papel contra radiação UV, trocadores de cátions, transportadores de fármacos. entre outras propriedades. Estes ainda tem a capacidade de fortalecer paredes celulares em plantas, e são relatadas sua ação como antimicrobiano e antitumoral (EL-NAGGAR et al., 2017).

Além disso, pigmentos naturais extraídos de bactérias demonstram atividade inibitória contra outras bactérias de importância clínica como *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus pyogenes* (LAPENDA et al., 2015). A proteção de melanócitos e queratinócitos contra a indução de quebra por peróxido de hidrogênio apresentada pela melanina (pigmento extraído de algumas bactérias do gênero *Streptomyces*) é um importante mecanismo antioxidante (EL-NAGGAR e EL-EWASY, 2017). Outra importante propriedade dos pigmentos naturais é a capacidade citotóxica contra células tumorais. Recentemente observou-se, pela primeira vez, atividade antitumoral *in vitro* moderada de pigmento extraído de *Arthrobacter* sp. contra células cancerígenas do esôfago (AFRA et al., 2017).

2.4 ACTINOBACTÉRIAS

As actinobactérias são um grupo ecologicamente diverso de micro-organismos, amplamente distribuído em variados ambientes naturais. De aspecto filamentoso, são bactérias Gram-positivas que apresentam elevado conteúdo de guanina – citosina (G+C) em seu DNA genômico, variando de menos de 50% em poucas espécies para mais de 70% em alguns gêneros (LEWIN et al., 2016). São conhecidas pelas suas habilidades únicas de formação de esporos e

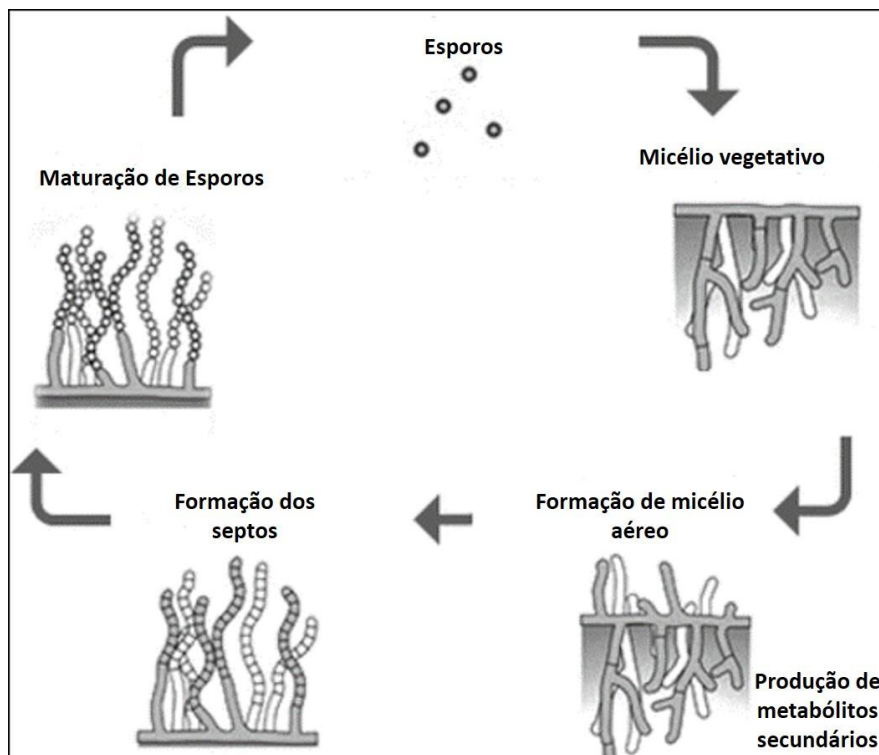
estruturas miceliais, que contribuíram para que esta fosse identificada inicialmente como pertencentes ao reino dos fungos. Esses micro-organismos, foram anteriormente denominados actinomicetos (do grego, “*aktis*”, irradiado; “*mykes*”, fungo) (GOODFELLOW, 2012).

Contudo, o conhecimento da estrutura genética e da composição química celular desses organismos a partir da década de 50 evidenciou sua natureza procariótica retirando-os completamente do Reino Fungi por apresentar diversas semelhanças com as bactérias tais como a composição da parede celular e a síntese de metabólitos característicos de procariotos (GOODFELLOW, 2012; WOSTEN e WILLEY 2000; EMBLEY e STRACKEBRANDT 1994; LECHEVALIER e LECHEVALIER 1967).

Podem exibir uma grande variedade morfológica desde cocóide (*Micrococcus*) até cocobacilo (*Arthrobacter*) e podem ser altamente diferenciadas quanto ao micélio ramificado. São fisiologicamente e metabolicamente ativas, sendo fonte de produção de várias enzimas extracelulares e uma grande variedade de metabólitos secundários (AZUMA, 2011). Segundo Raju e colaboradores (2010), a maioria dos antibióticos em uso atualmente são oriundos de produtos naturais de actinobacterias e fungos.

Micro-organismos heterotróficos importantes na decomposição de matéria orgânica, apresentam ciclo de vida normalmente disposto em duas etapas de crescimento. A primeira, a fase vegetativa, iniciada quando o esporo se estabelece em um substrato sólido, e origina as primeiras hifas (tubos germinativos). O micélio denominado “primário” ou “vegetativo”, penetra no substrato com o auxílio de enzimas extracelulares e se propagam ao longo de sua superfície, é uma característica que distingue as actinobactérias de outras eubactérias. Na fase reprodutiva (segunda etapa) há o aparecimento do micélio aéreo e o seu crescimento pode ser afetado pela composição do meio de cultura, temperatura, presença de compostos específicos, e outros elementos estimulantes. Ao final, há o aparecimento das estruturas reprodutivas. A produção de metabólitos secundários e a diferenciação morfológica, são dadas em resposta ao esgotamento de nutrientes (MANTECA e SANCHEZ 2010; FLARDH e BUTTNER, 2009; SRINIVASAN; LAXMAN; DESHPANDE, 1991) (Figura 1).

Figura 1. Representação esquemática do Ciclo de desenvolvimento de actinobacterias.



Fonte: adaptado de Hamed et al., 2017

Em muitas espécies, a última etapa visualmente observável do ciclo de vida é a deposição de pigmentos nos esporos em maturação. Este pigmento é cinza em *Streptomyces coelicolor* e verde em *Streptomyces venezuelae*. Essa pigmentação é considerada uma manifestação fenotípica da esporulação microscópica (JANI et al., 2015). De acordo com Verma e colaboradores (2013) e Ludwig e colaboradores (2012), o filo engloba seis classes, *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptorales*, *Rubrobacteria* e *Thermoleophilia*, mais de 55 famílias, 240 gêneros e milhares de espécies.

Desde de sua primeira descrição, no final do século XIX, as actinobacterias despertaram o interesse do meio científico e, desde dos anos 70, tem sido fontes de desenvolvimento de compostos bioativos importantes (CUNHA et al., 2009; PANDEY; GHIMIRE; AGRAWAL, 2004; GOODFELLOW e CROSS 1984), sendo consideradas uma fonte amplamente subestimada de moléculas com aplicação relevante em medicina, farmacêutica e indústrias de alimentos, agricultura e biorremediação ambiental (DORNELAS et al., 2017).

Dentre os grupos de actinobactérias, o gênero *Streptomyces* figura entre os mais importantes são utilizados para a produção de diversos metabólitos bioativos, como agentes antitumorais, imunossupressores e antibióticos (KUMARI et al., 2016).

Em actinobactérias, a síntese e extração de pigmentos escuros, melanina ou melanoide, são considerados, um critério útil para estudos taxonômicos (ARAI E MIKAMI 1972; DASTAGER et al., 2006). Pesquisas recentes constataram forte atividade anticancerígena de pigmento extracelular de melanina extraído de *Streptomyces glaucescens* NEAE-H (El-NAGGAR; El-EWASY, 2017) e do pigmento amarelo extraído de *Streptomyces griseoauranticus* JUACT 01 (PRASHANTHI; SURYAN; VARALAKSHMI, 2015). Atividade antioxidante e antibacteriana também já foram reportadas de pigmentos extraídos de bactérias do gênero *Streptomyces* sp. (RADHAKRISHNAN et al., 2016).

O grupo das actinobacterias é responsável pela maioria dos compostos bioativos extraídos de micro-organismos, incluindo anticarcinogênicos, anti-helmínticos e antifúngicos (BARKA et al., 2016). Estima-se que dos 23.000 metabólitos secundários produzidos por micro-organismos, cerca de 10.000 são produzidos por actinobacterias e, destes, 7.600 produzidos por espécies do gênero *Streptomyces* (BÉRDY, 2005; SHARMA; FULKE; CHAUBEY, 2019).

Com relação aos antibióticos, cerca de 2/3 são extraídos de actinobactérias e, destes, aproximadamente 75% são obtidos de espécies do gênero *Streptomyces* sp. (JANARDHAN et al., 2014). Com a crescente resistência aos antibióticos atualmente conhecidos, os gêneros raros de actinobacterias, como o gênero *Amycolatopsis*, constituem uma alternativa viável para a bioprospecção de novos compostos.

2.4.1 Identificação de Actinobactérias

No domínio Bacteria, o Filo Actinobacteria é considerado, dentre as 18 principais linhagens, uma das maiores unidades taxonômicas sendo composto por 5 subclasses, 6 ordens e 14 subordens (LUDWIG et al., 2012).

Tradicionalmente, as principais características utilizadas para a identificação das actinobacterias a nível de gênero e espécie são a micromorfologia e a quimiotaxonomia. A micromorfologia relaciona-se com a estrutura micelial (micélio aéreo e vegetativo), a morfologia da cadeia de esporos bem como seu comprimento e a presença de pigmentos melanóides (BARKA et al., 2016). Já a quimiotaxonomia está associada a fatores como, por exemplo, a estrutura química do petídeo-glicano da parede celular, e classifica os organismos mediante tais semelhanças e diferenças (BARKA et al., 2016).

Para uma precisa identificação morfológica o micro-organismo precisa ser cultivável e manipulável sob condições laboratoriais e isso nem sempre ocorre. Actinobactérias marinhas, por exemplo, isoladas de lugares incomuns como as profundezas do mar, costumam ter o cultivo e a manipulação em laboratório dificultadas devido à sua exigência nutricional e condições físicas necessária ao seu desenvolvimento e, por isso, demandam a utilização de outras técnicas de identificação (DHAKAL et al., 2017). Nesses casos uma alternativa que vem sendo utilizada é a incrementação do meio de cultivo com os sedimentos marinhos do local de isolamento (DHOLAKIYA et al., 2017).

Variadas técnicas moleculares vêm sendo empregadas recentemente para complementar a identificação e a classificação morfológica. A sequência do gene 16S do RNAr é uma delas uma vez essa região possui características únicas que permite, até certo ponto, a diferenciação entre os grupos de actinobactérias (BARKA et al., 2016). Contudo, este sequenciamento quando utilizado para diferenciar espécies intimamente relacionadas, pode apresentar limitações devido a sua similaridade com alguns outros genes como, por exemplo, o 23S (NOUIOUI et al., 2018). Nesse contexto, a identificação taxonômica se torna um pouco complexa, exigindo a utilização, também, de técnicas morfológicas e fisiológicas.

2.5 GÊNERO *Amycolatopsis*

O gênero *Amycolatopsis* pertence ao Filo Actinobacteria sendo considerado raro e, até o momento, constituído de aproximadamente 76 espécies reconhecidas e quatro subespécies (WANG et al., 2018; PENG et al., 2019; <http://www.bacterio.net/amycolatopsis.html>). As espécies de *Amycolatopsis* podem ser agrupadas em três grandes subclados (SÁNCHEZ-HIDALGO et al., 2018): mesofílicos ou termofílicos moderados, representado por *A. orientalis*; os termofílicos, representado por *A. methanolica* e os mesofílicos representado por *A. taiwanensis*, sendo a maioria das espécies pertencentes aos subclados representados por *A. orientalis* e *A. methanolica* (TANG et al., 2016).

As espécies *A. orientalis* são comumente relacionadas com a produção de antibióticos, enquanto que as espécies *A. methanolica* demonstram potencial biotecnológico para a produção de aminoácidos aromáticos e biorremediação (TANG et al., 2016).

As actinobactérias pertencentes ao gênero *Amycolatopsis*, de acordo com o Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (GOODFELLOW et al., 2012), são aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, Gram-positivas, sendo catalase-positiva que formam estruturas

miceliais ramificadas que se fragmentam em elementos em forma de haste e apresentam pigmentação difusível de coloração variada: Branco, vermelho e marrom (GOODFELLOW et al., 2012).

As hifas aéreas, quando formadas, podem ser estéreis ou se diferenciar em cadeias de estruturas produtoras de esporos de paredes lisas de quadradas a elipsoidais. Morfologicamente, cepas de *Amycolatopsis* demonstram fragmentação regular a ocasional tanto no micélio aéreo quanto no micélio vegetativo (que fica aderido ao substrato) ou até em ambos. Não há registros de formação de esclerócios, vesículas de esporos ou até de sinêmio (estruturas tipicamente fúngicas). Algumas cepas chegam a produzir longas cadeias de estruturas produtoras de esporos lisas, quadradas e elipsóides tanto no micélio aéreo quanto no vegetativo (GOODFELLOW et al., 2012).

Algumas cepas de *Amycolatopsis* demonstram um grau incomum de variação morfológica, como exemplificado pela formação de cadeias curtas de esporos ovais e de superfície lisa no micélio vegetativo de *Amycolatopsis taiwanensis* KCTC19116T e a produção de pseudo-esporângios globosos e de superfície lisa por *Amycolatopsis decaplanina* DSM44594T. Entretanto, não foram observados esporos dentro ou fora dos pseudoesporângios (STACKEBRANDT et al., 2004).

Sendo um micro-organismo ubíquo, pode ser encontrado em diversos habitats, muitas de suas espécies têm sido isoladas de solos e material vegetal, apesar de seu papel ainda não está definido.

Vários representantes como *A. mediterranei* (YANG et al., 2001), *A. niigatensis* (DING; HIROSE; YOKOTA, 2007), *A. panacis* (PENG et al., 2019), produzem metabólitos secundários de interesse médico, biotecnológico e industrial (EVEREST e MEYERS, 2011; DING et al., 2019). A produção de compostos com ação antimicrobiana e citotóxica como a pradimicina-IRD (ALMEIDA et al., 2019), tetraciclina atípica (LUKEŽIČ et al., 2019), e dipirimicina A e B a partir de isolados do gênero *Amycolatopsis* (IZUTA et al., 2018) vem sendo reportadas na literatura, bem como, compostos com atividade antioxidante e antiproliferativa como o 1-metóxi-3-metil-8-hidroxi-antraquinona (KUMAR et al., 2017).

Devido a variedade de pigmentações exibidas pelas colônias do gênero esta é uma das propriedades utilizadas para a caracterização da espécie. Contudo estudos acerca da produção de pigmentos por *Amycolatopsis* ainda são escassos na literatura, sendo reconhecidos um número reduzido de espécies produtoras como, por exemplo, *A. decaplanina* (ABRAHAM E CHAUHAN, 2014), *A. meditarrenei* (YANG et al., 2001) e *A. thermoflava* (CHUN et al.,

1999). Nesse contexto, a pesquisa por produtores de metabólitos secundários e de pigmentos se torna importante para a descoberta de novos compostos bioativos.

2.6 FATORES QUE INFLUENCIAM NO CRESCIMENTO MICROBIANO

O crescimento microbiano (fungos e bactérias) ocorre com o aumento do número de células e, dessa forma, se refere à quantidade e não ao tamanho delas (TORTORA et al., 2012).

Fatores físicos (temperatura, umidade, agitação durante o crescimento) e químicos (fonte de carbono, nitrogênio, fósforo, elementos traços) podem provocar alterações no crescimento microbiano e, ao alterá-los, pode-se influenciar diretamente na produção de metabólitos de interesse (ALI et al., 2018; AFSHARI et al., 2015). Quando os micro-organismos são cultivados para uma determinada finalidade (produção de metabólitos secundários, por exemplo) qualquer pequena modificação nas condições de cultivo ou composição do meio de cultura pode resultar em um grande impacto na qualidade e na quantidade dos metabólitos secundários produzidos (BÜHLER et al., 2013; MANIKKAM et al., 2015). Para atingir tal objetivo, pesquisas são realizadas alterando parâmetros de crescimento.

A modificação de parâmetros de crescimento para otimização da produção de bioativos por micro-organismos é a uma área de estudos bastante difundida (MANIKKAM et al., 2015). A produção de pigmentos a partir de micro-organismos pode ser potencializada com a utilização de uma variedade de técnicas de fermentação (estado sólido ou submerso), modificações químicas, uso de resíduos agroindustriais, técnicas de modificação genética, entre outras (HEIDER et al., 2014; SINGH et al., 2013).

A temperatura de crescimento, a duração do cultivo, o pH e a composição do meio de cultura (fonte nutricional) bem como a forma de cultivo (em estado líquido ou sólido) são parâmetros comumente relacionados com a produção de metabólitos. De modo que, alterando os parâmetros corretos pode-se otimizar estatisticamente a produção de um determinado bioativo (METWALLY et al., 2017). Um bom micro-organismo produtor de pigmentos deve ser capaz de utilizar uma grande variedade de fontes de carbono (C) e nitrogênio (N), ser tolerante a variações de pH, de temperatura e de concentrações de minerais (KUMAR et al., 2015a).

O material nutriente que permite o crescimento dos micro-organismos deve conter componentes em quantidade suficientes para que o desenvolvimento ocorra e a quantidade de

células aumente. Dentre os principais nutrientes empregados em formulações de meios de cultura, o carbono e o nitrogênio desempenham papel fundamental. O carbono é o esqueleto estrutural da matéria viva, sendo necessário para a constituição de todos os compostos orgânicos presentes na célula, enquanto que o nitrogênio é constituinte de proteínas e dos ácidos nucleicos (DNA e RNA) junto com um pouco de enxofre e fósforo (TORTORA et al., 2012).

Assim, é de esperar que a modificação da proporção de carbono/nitrogênio no meio de cultura influencie o desenvolvimento do micro-organismo e, conseqüentemente, na produção do metabólito de interesse. A influência dessa modificação é observada tanto no cultivo de bactérias quanto no cultivo de fungos (MEIDUTE et al., 2008). No cultivo de fungos produtores de pigmentos (como *Monascus* sp., por exemplo), as fontes de carbono/nitrogênio são essenciais para o crescimento micelial, sendo a glicose a melhor fonte de carbono para a produção de pigmentos (KUMAR et al., 2015a). Com relação à fonte de nitrogênio, a amônia e a peptona proporcionam bom crescimento fúngico e maior concentração de pigmentos (KUMAR et al., 2015a).

Para encontrar a fonte e a melhor proporção de carbono/nitrogênio que favoreça a produção de pigmentos, é necessário um estudo qualitativo e quantitativo do crescimento do micro-organismo. Em alguns casos, a depender das condições de cultivo, fontes diferentes de carbono e nitrogênio podem resultar em diferentes resultados de produção de pigmentos (SUBHASREE et al., 2011). Acredita-se que altas concentrações de carbono de alta energia, pode inibir a produção de alguns metabólitos secundários, inclusive os pigmentos (PITLOVANCIV; CARIS; PORTO, 2006). A influência de fontes alternativas de C e N como resíduos agro-industriais também é alvo de pesquisas (SEHRAWAT et al., 2017).

Além disso fatores como o tipo de fermentação também pode produzir efeito direto sobre a produção do metabólito de interesse. Geralmente a produção de pigmentos é realizada sob duas formas de fermentação: a fermentação sólida e a submersa. A fermentação em estado sólido é reportada como sendo a mais produtiva por demandar menor investimento e apresentar maior rendimento, enquanto que a fermentação submersa gera resíduos líquidos que precisam ser eliminados (SEHRAWAT et al., 2017). Contudo a fermentação submersa apresenta como vantagem facilidade de recuperação do metabólito de interesse.

Desse modo, a investigação dos melhores parâmetros de crescimento que vise à produção de biomassa e/ou de pigmentos é de fundamental importância para alcançar o rendimento máximo do metabólito de interesse pelo micro-organismos nas melhores condições possíveis.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 IDENTIFICAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO

3.1.1 Reativação do micro-organismo e análise microscópica

A linhagem *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422, pertencente à Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE (UFPEDA) (isolada da rizosfera da Caatinga) foi reativada em meio ISP-1, sob agitação 200 rpm por cinco dias. Após esse período, o micro-organismo foi semeado em placa de Petri contendo meio ISP-2 e incubado por mais cinco dias, a 37°C. Posteriormente, foi realizada a análise da micromorfologia das linhagens segundo técnica de Shirling e Gottlieb (1966) para avaliação das estruturas características destas bactérias, como esporos, formação e tipos de hifas.

3.1.2 Caracterização bioquímica do micro-organismo

3.1.2.1 Avaliação da degradação das fontes de carbono

A avaliação da degradação das fontes de carbono, foi realizada utilizando como meio base o ágar bennett's modificado (1g de extrato de levedura; 1g de extrato de carne; 2g de triptona; 10g de glicerol; 15g de ágar para 1.000 mL de água) (JONES, 1949) sendo este suplementado separadamente com a fonte de carbono. Foram empregadas como fontes a guanina (0,4%), hipoxantina (0,4%), amido (0,1%), xilana (0,4%) e L-tirosina (0,5%). Em seguida uma aliquota de 15µL da suspensão da actinobacterias foi depositada sobre o meio de cultura para a formação dos spots para crescimento do micro-organismo. As placas contendo o inóculo foram incubadas por 14 dias a 37° C. A degradação do composto foi observada pela formação do halo de degradação ao redor das colônias após a adição de cristais de iodo sobre as placas após agitação. A sublimação do iodo permite a visualização dos halos de degradação e provoca o enegrecimento do meio. O experimento foi realizado em triplicata.

3.1.2.2 Avaliação da degradação do Tween

A degradação do tween foi avaliada utilizando como base o meio Sierra's (SIERRA, 1957) adicionando-se 1% (v/v) de Tween 20 e 80 (separadamente). Em seguida uma aliquota de 15 µL da suspensão da actinobactéria foi depositada sobre o meio de cultura. As placas

contendo o inóculo foram incubadas por 14 dias a 37° C. A degradação do composto foi observada pela formação do halo de degradação ao redor das colônias após a adição de cristais de iodo sobre as placas após agitação. O experimento foi realizado em triplicata.

3.1.2.3 Avaliação da degradação da gelatina

Para avaliar a degradação da gelatina foi utilizado o meio Gordon (GORDON et al., 1974) ao qual foi adicionado 0,4% e 1% de gelatina, respectivamente. Em seguida foi adicionada uma aliquota de 15 µL da suspensão da actinobactéria a superfície da placa, as quais foram incubadas por 14 dias a 37° C, sendo o halo de degradação revelado após a adição de cristais de iodo. O experimento foi realizado em triplicata.

3.1.2.4 Perfil metabólico de utilização de fonte de carbono

A capacidade de metabolização de uma única fonte de carbono e produção de ácido a partir deste foi avaliada utilizando-se os seguintes açúcares: dextrina, D-trehalose, manitol, D-maltose, Myo-inositol, D-xilose, L-arabinose, L-rhamnose, adonitol, manose, glicose, sacarose, D-lactose, D-sorbitol e D-celobiose.

Inicialmente foram preparadas e autoclavadas soluções de cada carboidrato na concentração de 1 % (p/v), as quais foram posteriormente adicionadas ao meio de cultivo ágar ISP-9 (previamente autoclavado) utilizado como base nutricional (SHIRLING; GOTTLIEB, 1966) somado ao indicador vermelho de fenol na concentração de 0,025%. Em seguida o meio de cultivo corresponde a cada fonte de carbono foi distribuído em tubos de ensaio. O micro-organismo foi inoculado em estrias na superfície dos tubos de ensaio com o auxílio de uma alça bacteriológica. As placas foram incubadas por 10 dias a 37° C. A leitura dos ensaios foi realizada utilizando como critério o crescimento ou não do micro-organismo e a presença ou ausência de produção de ácidos a partir da modificação do pH do meio de cultura e consequente modificação da coloração do meio. O experimento foi realizado em triplicata.

3.1.2.5 Avaliação do crescimento em diferentes pH

Para avaliar a tolerância da actinobactéria a diferentes faixas de pH foi realizado o cultivo do micro-organismo no pH 4, 5,9 e 10 obtidos a partir da combinação das soluções tampão A (KH_2PO_4 -0,2 M) e B (K_2HPO_4 - 0,2 M) nas proporções (199,7mL de solução A e 0,3

mL de solução B, pH 4; 197,3mL de solução A e 2,7 mL de solução B, pH=5; 1,4mL de solução A e 198,6 mL de solução B, pH=9 e 0,1mL de solução A e 199,9 mL de solução B, pH=10) adicionado ao meio de cultura.

Inicialmente foi preparado o meio de cultivo glicose extrato de levedura ágar e em seguida lhe foi adicionado a solução tampão na proporção correspondente ao pH desejado. Para cada 200 mL de solução tampão foi adicionado 200 mL de meio de cultivo. Em seguida uma alíquota de 50 µL de uma suspensão do micro-organismo foi depositada sobre o meio de cultura e espalhada com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 37° C durante 10 dias. O resultado foi considerado positivo quando observado crescimento do micro-organismo. O experimento foi realizado em triplicata.

3.1.2.6 Avaliação do crescimento em diferentes temperaturas

O crescimento do micro-organismo em variadas temperaturas foi observado utilizando-se como substrato o meio de cultura glicose extrato de levedura ágar (5g extrato de levedura; 20g glicose; 20g ágar). O micro-organismo foi semeado com auxílio de uma alça bacteriológica e as placas foram incubadas a 4 °C, 25 °C, 37 °C e 45 °C durante 10 dias. O resultado foi considerado positivo quando houve o crescimento da cultura. O experimento foi realizado em triplicata.

3.1.2.7 Tolerância a cloreto de sódio (NaCl)

Para verificar a tolerância ao teor de cloreto de sódio (NaCl), a actinobactéria foi inoculada no meio de cultura glicose extrato de levedura ágar (5g extrato de levedura; 20g glicose; 20g ágar) com diferentes concentrações de NaCl. Inicialmente foi preparado o meio glicose extrato de levedura ágar o qual foi posteriormente suplementado com soluções de NaCl nas concentrações de 1%, 3%, 5%, 7% e 10%. O micro-organismo foi semeado sobre as placas de Petri com o auxílio de uma alça bacteriológica (crescimento em tapete). As placas contendo o micro-organismo foram incubadas a 37 °C durante 10 dias. Foi considerado resultado positivo o crescimento visível do micro-organismo. O experimento foi realizado em triplicata.

3.1.2.8 Perfil de susceptibilidade a antibióticos

O perfil de resistência a antibióticos foi verificado utilizando-se a técnica de difusão em disco descrita por Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966) utilizando o meio de cultura Glicose Extrato de Levedura Ágar. Inicialmente 12 mL do meio de cultura Glicose Extrato de Levedura Ágar foi vertido em placas de Petri e em seguida 50 µL da suspensão (em solução salina 0,9%) da actinobactéria foi semeada com o auxílio de uma alça de Drigalsky. Posteriormente foram depositados sobre a superfície das placas discos dos antibióticos: ácido nalidixico (30 µg); vancomicina (30 µg); rifampicina (5 µg); estreptomicina (10 µg); gentamicina (10 µg); tobramicina (10 µg) e cefoxitina (30 µg). Os resultados foram interpretados de acordo com a CLSI (2017). O experimento foi realizado em triplicata.

3.1.3 Identificação molecular do micro-organismo

Para a realização da identificação molecular o micro-organismo selecionado foi cultivado em meio líquido em seguida foi centrifugado para a realização da extração do DNA através do Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega). A extração do DNA total foi realizada segundo a metodologia de Sambrook e colaboradores (1989) seguida da amplificação do gene DNA 16S.

Para a extração do DNA o micro-organismo foi cultivado em meio líquido ISP-2 durante 18 a 20 horas a 37°C e 150 rpm. Passado o período de crescimento a amostra foi centrifugada para a obtenção da biomassa. A biomassa obtida após centrifugação foi tratada com 1,5 mL de tampão TES e centrifugada a 9168 xG por 3 minutos, sendo novamente ressuspendida em 0,5 mL do mesmo tampão adicionado de 150 µL de lisozima (10mg.mL⁻¹) e posteriormente colocadas em banho maria por 60 minutos a 37° C. Em seguida 400 µL de Clorofil foram adicionados a amostra e o microtubo foi novamente centrifugada a 9168 xG por 3 minutos. Posteriormente 600 µL do sobrenadante foram transferidos para um tubo tipo eppendorf identificado, ao qual foi adicionado 50 µL de acetato de potássio (7,5 mol.L⁻¹, pH 5,2) e 60 µL de isopropanol P.A. A amostra foi então congelada por duas horas para a precipitação do DNA. Após este período a amostra foi centrifugada a 6360 xG por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Ao pellet obtido foi adicionado 400 µL de etanol a 70% seguido de centrifugação a 9168 xG por 3 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e o pellet deixado durante alguns minutos para a secagem em temperatura ambiente.

Em seguida foi adicionado 100 µL de tampão TE e colocado em banho maria a 65° C durante 60 minutos. A avaliação da integridade do DNA foi realizada utilizando gel de agarose 0,8%.

Posteriormente foi realizada a amplificação do DNA por PCR, utilizando oligonucleotídeos universais 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3 (WEISBURG et al., 1991).

Para as amplificações foram utilizados volume final de 50 µL contendo 10 a 50 ng de DNA, 5 pmols de cada oligonucleotídeo, 200 µM de dNTP, 1,5 µM de MgCl₂, 1X tampão, 1 U Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies). A reação de PCR foi realizada em termociclador programado para realizar desnaturação inicial 94° C por 4 min, 30 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão (94°C/30 s, 63°C/1 min e 72° C/7 min, respectivamente). Após a amplificação, 5 µL da reação de PCR foi avaliado por eletroforese em gel de agarose (1,2% p/v) a 3 volts/cm-1 em tampão TBE 1x e corado com Sybr safe (Invitrogen Life Technology). O produto de amplificação foi sequenciado e a sequência comparada com todas as sequências no Genbank, utilizando o software Blast do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov). As sequências serão alinhadas usando o software Clustal.

3.2 PRODUÇÃO DE PIGMENTOS EM CULTIVO SUBMERSO

Para a produção de pigmentos inicialmente foi preparada uma suspensão do micro-organismo em solução salina 0,9%, em seguida 0,1 mL desta suspensão foi aplicada sobre placas de Petri contendo meio ISP-2 e espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas durante 5 dias, e em seguida foram perfurados com um auxílio de um perfurador esterilizado blocos de gelose de 6 mm de diâmetro da cultura crescida, posteriormente os blocos foram adicionados a frascos erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultura ISP-2 (5 blocos por erlenmeyer) (SHIRLING e GOTTLIEB, 1966). Os frascos foram mantidos sobre agitação durante 48h a 37° C e 150 rpm. Posteriormente foram retirados 5 mL destes frascos e adicionados a frascos erlenmeyers contendo 50 mL do meio de cultura HT modificado (Milieu Hickey-Tresner), o qual foi definido em estudos anteriores como mais adequado para a produção do pigmento, sendo mantido sob agitação por 48h, 37 °C e 150 rpm. Após o tempo de cultivo foram medidos o pH, a biomassa e concentração de pigmentos.

3.2.1 Otimização da produção de pigmentos

Para a otimização da produção do pigmento foi realizado o cultivo submerso do micro-organismo no meio HT (Milieu Hickey-Tresner) descrito por Waksman (1961), modificado (substituindo a dextrose por glicose como fonte de carbono) pré selecionado em estudos anteriores, onde foi realizada a avaliação da influência das variáveis carbono, nitrogênio e rotação na produção do pigmento. Para avaliar a influência das concentrações carbono: nitrogênio, foram realizadas modificações nas proporções de glicose e triptona no meio de cultura (6:1; 6:2 e 6:3; 10:1; 10:2 e 10:3; 14:1; 14:2 e 14:3). A influência da rotação na produção do pigmento foi avaliada realizando-se o cultivo do micro-organismo em diferentes rotações (120, 150 e 180 rpm) durante 48h. A fermentação foi executada seguindo um delineamento fatorial em três níveis de variação (3^3) (Tabela 2) utilizando a metodologia de superfície de resposta. Foram realizados vinte e sete experimentos, incluindo combinações das variáveis e repetição do ponto central. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Ao final da fermentação, em cada ensaio, foram avaliados o pH, biomassa e a concentração do pigmento (VALDUGA et al., 2009a).

Tabela 2. Parâmetros da otimização da produção de pigmentos.

Níveis de variação	Carbono (g/L)	Nitrogênio (g/L)	Rotação (rpm)
	X ₁	X ₂	X ₃
+1	14	3	180
0	10	2	150
-1	6	1	120

3.3 OBTENÇÃO DE BIOMASSA

Após o período de fermentação em meio líquido, o caldo fermentado junto as células da actinobacteria foi transferido para tubos tipo falcons (50 mL) e centrifugado a 10000 rpm por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. A biomassa obtida foi então pesada e reservada a 4° C até o momento da extração dos pigmentos sempre mantidas ao abrigo da luz.

3.3.1 Extração do pigmento

A partir da biomassa úmida obtida na fermentação foi realizada a extração do pigmento conforme Azimi e colaboradores (2017) com modificações quanto à proporção de solvente e

biomassa. O solvente acetato de etila foi adicionado à biomassa úmida (3:1 v/p) em frascos do tipo falcons, e mantido sob agitação, *overnight*, em agitador mecânico, para a extração do pigmento das células. Esse processo foi repetido até obtenção da biomassa isenta de cor. Posteriormente para a separação da biomassa, o material foi centrifugado e o pigmento extraído foi coletado com o auxílio de um pipetador automático, transferido para frascos previamente esterilizados e analisado em espectro UV visível. Além disso, a solubilidade do pigmento foi avaliada em diferentes solventes incluindo metanol, etanol, clorofórmio e água.

3.4 ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA UV-VISÍVEL

Para determinar o comprimento de onda máxima de absorção do pigmento foi realizada a varredura espectrofotométrica UV-Vis na faixa de 200-900 nm (diluindo-se quando necessário). A leitura foi realizada em espectrofotômetro Hewlett-Packard, (modelo 8453), utilizando como branco o solvente puro, acetato de etila P.A. A concentração do pigmento foi expressa em unidades de absorbância (UA).

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E PARÂMETROS CINÉTICOS

Para a análise da produção de biomassa e de pigmento por *Amycolatopsis* sp. na fermentação submersa foram utilizados os valores dos pontos isolados, média e desvio padrão correspondentes a produção em cada variável, empregando análise de variação ANOVA no software EXCEL®. Para avaliar diferenças significativas, foi empregado o teste de Tukey, com significância de $p < 0,05$.

Para a construção das fórmulas gerais que melhor descrevem a relação entre os fatores analisados e a produção do pigmento, foi utilizada análise de regressão, sendo considerado cada ponto da triplicata.

As análises foram realizadas admitindo o valor de y equivalente a produção do pigmento e as variáveis de entrada x, como sendo as diferentes concentrações de glicose (6g, 10g, 14g) de triptona (1g, 2g, 3g) e as variações na rotação (120 rpm, 150 rpm e 180 rpm). A produção de pigmento observada na presença destas variáveis, foi tratada em relação ao comprimento de onda apresentado pelo pigmento extraído.

Em seguida os coeficientes significativos obtidos foram utilizados para estabelecer relação entre os parâmetros analisados e a resposta obtida em cada condição avaliada.

Os parâmetros cinéticos de produção foram aplicados conforme descritos por Bühler e colaboradores (2013). Para a avaliação da produtividade máxima de biomassa e a produtividade máxima de pigmentos em determinado espaço de tempo.

Para determinação da produtividade máxima de células (biomassa) foi considerada a seguinte fórmula, onde:

$$P_{\text{CÉLULAS}} = \frac{(X_{\text{MÁX } t}) - (X_{t_0})}{t - t_0}$$

$P_{\text{células}}$: produtividade máxima de crescimento (formação de células) no instante de tempo $(t - t_0)(g.h^{-1})$;

$X_{\text{MÁX } t}$: máxima formação de biomassa no instante de tempo t ;

X_{t_0} : formação de biomassa no tempo t_0 ;

t : tempo para atingir o valor máximo biomassa;

t_0 : tempo inicial do cultivo.

Em seguida a produção máxima de pigmentos foi determinada utilizando-se a fórmula:

$$P_M = \frac{(UDO_{\text{MÁX } t}) - (UDO_{t_0})}{t - t_0}$$

Sendo:

P_M : produtividade máxima de formação de pigmentos no instante de tempo $(UDO.h^{-1})$;

$UDO_{\text{MÁX } t}$: máxima quantidade de pigmento no instante de tempo t ;

UDO_{t_0} : quantidade de pigmento no tempo t_0 ;

t : tempo para atingir o valor máximo de UDO;

t_0 : tempo inicial do cultivo.

3.6 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO PIGMENTO

Para a realização da caracterização serão utilizadas as técnicas de Cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada (CCD), Espectroscopia RAMAN, Cromatografia

líquida de alta eficiência (CLAE), Ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e ^{13}C), Cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa (GC-MS), determinação do percentual de Carbono, Nitrogênio, Hidrogênio e Oxigênio.

3.6.1 Cromatografia em coluna “Flash” e cromatografia em camada delgada (CCD)

Inicialmente, o pigmento foi solubilizado em acetato de etila e aplicado na cromatofolha contendo Sílica Gel 60 F254 (Merck), 60mm x 100mm, para determinação do melhor sistema eluente. O cromatograma foi analisado em lâmpada UV de 365 nm e o valor do Fator de Retenção (R_f) foi determinado (RAMONEDA, 2000). Para realizar a purificação, o pigmento extraído foi submetido a cromatografia em coluna utilizando como substância adsorvente a sílica gel 60. Posteriormente as frações coletadas foram concentradas sob pressão reduzida a 40°C e em seguida analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), na intenção de contestar seu grau de pureza. As frações obtidas na cromatografia em coluna foram analisadas através de infravermelho e Cromatografia Gasosa acoplada ao espectro de massa (GC-MS).

3.6.2 Análise de espectroscopia por Infravermelho (IV) transformada de Fourier

O espectro IV do pigmento extraído de *Amycolatopsis* sp. parcialmente purificado, foi obtido usando um espectrofotômetro. As amostras foram colocadas em suportes de KBr para sua análise na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , com 132 scans e a resolução foi ajustada em 4 cm^{-1} .

3.6.3 Parâmetros de análise em GC-MS

As frações obtidas do pigmento foram submetidas a análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa. Os espectros de massa obtidos para cada composto foram comparados com dados da biblioteca do equipamento para fins de tentativa de identificação. As análises cromatográficas foram realizadas tendo como parâmetros: Temperatura de injetor e da interface de 280°; modo de injeção Splitless, Pressão interna da coluna de 40KPa, Fluxo da coluna de 0,8 ml/min, com Velocidade linear de 32 cm/seg, razão de Split de 1/5 e Fluxo total de 5,8 ml/min. A Temperatura inicial de 70° por 4 min com Taxa de aumento de 4°/min até 280° por 15 min. Foi utilizada uma coluna VB-5 (30 m de comprimento x 0,25 mm diâmetro x 0,25 μm diâmetro interno). No espectro de massas foram adotados os seguintes parâmetros:

Varredura de 30 até 450 m/z, Detector de impacto eletrônico (IE) 70 eV, Velocidade de scan de 1000 e Tempo de análise de 71,50 min.

3.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO PIGMENTO

A avaliação da atividade antimicrobiana do pigmento foi determinada frente as linhagens de: *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416, *Staphylococcus epidermidis* UFPEDA 58, *Propionibacterium acnes* UFPEDA 187, *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Enterococcus faecalis* UFPEDA 138, *Klebsiella pneumoniae* UFPEDA 396 e *Escherichia coli* UFPEDA 224, utilizando-se placas de 96 poços. Para determinação da concentração mínima inibitória (CMI) seguida da determinação da concentração mínima bactericida (CMB) em placas de Petri. Sendo os testes realizados em duplicata de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) documento M100 (CLSI, 2017) para bactérias.

3.7.1 Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

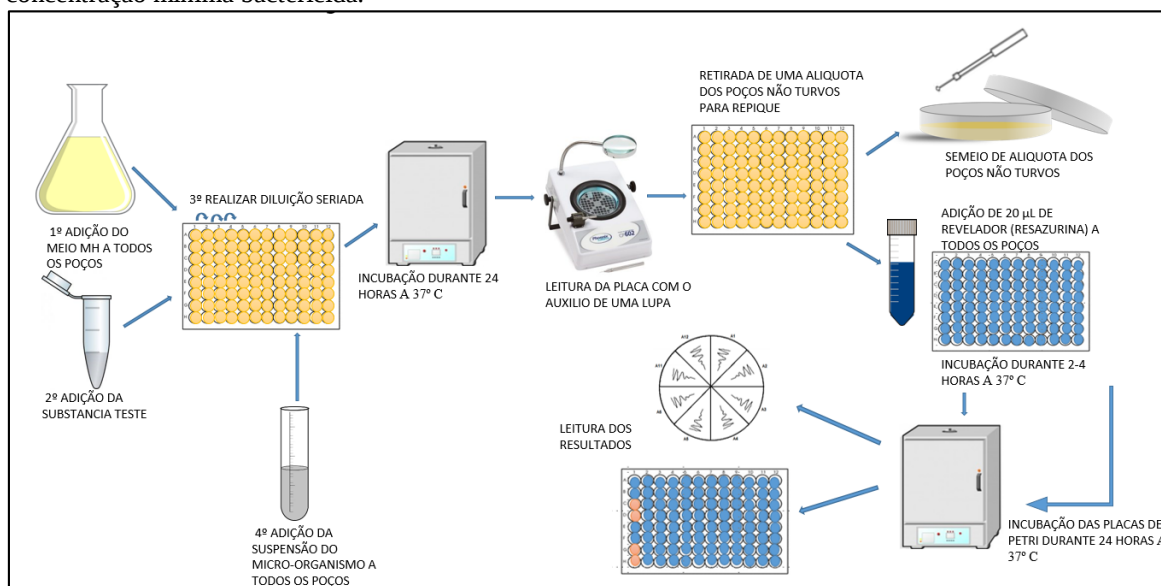
Para a determinação da concentração mínima inibitória foi utilizada a técnica de microdiluição em placas multipoços, conforme o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017). As frações do pigmento extraído e concentrado em rotaevaporador foram solubilizadas em etanol, na concentração de 10 mg/mL para a realização dos testes. Foram preparadas suspensões das bactérias com densidade de 0,5 de acordo com a escala de McFarland, as quais foram aferidas com o auxílio de espectrofotômetro no comprimento de 625 nm, até atingirem valores de absorbância entre 0,08 e 0,01 correspondente $1,5 \times 10^8$ UFC utilizando os micro-organismos citados da Coleção de Micro-organismos UFPEDA do Departamento de Antibióticos. A suspensão bacteriana obtida foi diluída em solução salina a 0,9% para obtenção de uma suspensão na concentração de $1,5 \times 10^6$.

Para a confecção da placa foram distribuídos 180 µL de meio de cultura líquido (caldo MH) em cada poço da primeira coluna e 100 µL nos demais poços até a nona coluna. Em seguida, foram adicionados 20 µL da amostra do pigmento nos poços da coluna 1 a partir da qual foi realizada a microdiluição sucessivamente até a coluna 9, obtendo-se concentrações decrescentes (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,9 µg/mL). Após diluição, foi adicionado a cada poço 10 µL do inóculo microbiano padronizado. Na coluna 10 foi realizado

o controle positivo do inóculo, havendo apenas o meio de cultura adicionado do inóculo. Na coluna 11 foi realizado o controle de esterilidade do meio de cultivo, não havendo adição do inóculo, e na coluna 12 foi realizado o controle do antibiótico, sendo utilizada a gentamicina para as bactérias. As microplacas foram depositadas em estufa a 37 °C por 18-24 horas.

Finalizado o tempo de cultivo as microplacas foram observadas em lupa e uma alíquota de 10 µL do conteúdo dos poços que não apresentaram turvação foi semeada em placa de Petri contendo meio MH sólido, para comprovação da inibição do crescimento do micro-organismo (CMB). As placas de Petri semeadas foram incubadas em estufa a 37° C por 24 h. Em seguida, as microplacas foram reveladas com a adição de 20 µL de resazurina (corante indicador de oxido-redução) a 0,01% e incubadas por 1-4 horas para observar a mudança de coloração nos poços. Após o tempo de revelação a manutenção da cor azul foi interpretada como inibição do crescimento microbiano, enquanto o desenvolvimento da cor rosa, indicou a ocorrência de crescimento (Figura 2). Sendo a CMI a menor concentração da substância teste capaz de inibir parcialmente o crescimento do micro-organismo, e a CMB a menor concentração da substância com atividade bactericida de até 99,9% em determinado intervalo de tempo (CLSI, 2017). Os valores da CMI e CMB foram obtidos pela observação conjunta dos resultados obtidos da microplaca e da placa de petri. Cada ensaio foi realizado em duplicata.

Figura 2. Esquema representativo do experimento para determinação da concentração mínima inibitória e da concentração mínima bactericida.



Fonte: A autora.

3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.8.1 Atividade Antioxidante Total

A investigação da atividade antioxidante total das frações A e B do pigmento produzido por *Amycolatopsis* sp. foi determinada em função do ácido ascórbico, de acordo com a metodologia descrita por Sanjukta e colaboradores (2015). Foi utilizado o volume de 0,5 mL de cada fração nas concentrações de 1000 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL; 15,62 µg/mL; 7,81 µg/mL e 3,9 µg/mL adicionado a 3,0 mL de solução de fosfomolibdênio (3 mol/L de ácido sulfúrico, 0,1 mol/L de sódio fosfato e 0,03 mol/L), sendo incubado em banho maria a 95 °C, durante 90 minutos. Em seguida as amostras foram postas em repouso até retornarem à temperatura ambiente. As soluções foram então transferidas para uma cubeta e as absorbâncias medidas em espectrofotômetro de UV-VIS a 615 nm. Foi utilizado como branco uma solução composta de 1,0 mL de água e 3 mL da solução de molibdato de amônio. Como padrão foi construída uma curva com ácido ascórbico (7,81 - 500 µg/mL), obtendo a equação: $Y = 0,0032x + 0,1058$, $R^2 = 0,9977$ (Apêndice 1).

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em forma de média aritmética. A atividade antioxidante total foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$ATT (\%) = \left[\frac{(As - Ab)}{(Aaa - Ab)} \right] \times 100$$

Onde:

Ab = Absorbância em branco;

As = Absorbância da amostra;

Aaa = Absorbância do Ácido Ascórbico.

3.8.2 Atividade de eliminação de radicais DPPH

A capacidade de sequestro de radicais livres pelas frações do pigmento foi medida usando o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), conforme descrito por Alexandre e colaboradores (2017), com modificações. Inicialmente foi realizada diluições seriadas de cada fração para obtenção de diferentes concentrações do pigmento (1000 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL; 15,62 µg/mL; 7,81 µg/mL e 3,9 µg/mL). Em seguida foram utilizados 0,5 mL de cada fração nas diferentes concentrações e a estes foram adicionados 2,0 mL da solução de DPPH 1 mM em metanol. Após o tempo de incubação de 25

minutos à temperatura ambiente, protegido da luz, as absorbâncias foram medidas a 517 nm em espectrofotômetro. Utilizou-se como controle a solução de DPPH adicionada ao etanol, sendo o metanol utilizando como branco. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em média aritmética. O sequestro de radicais DPPH foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$\text{Efeito de eliminação(\%)} = \left[\frac{(Ac - As)}{(Ac)} \right] \times 100$$

Onde:

Ac = Absorbância do controle;

As = Absorbância da Amostra.

3.8.3 Atividade de eliminação de cátions radicais ABTS

Para determinar a atividade de eliminação de cátions radicais ABTS (*2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)*) foi utilizado o método proposto por Alexandre e colaboradores (2017), com modificações na proporção de diluição do radical ABTS. Inicialmente, foi preparada uma solução estoque de ABTS a 7 mM, utilizando etanol como diluente, e uma solução de persulfato de potássio a 140 mM. Para a preparação do radical ABTS foram reunidos 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL da solução de persulfato de potássio. A mistura foi mantida ao abrigo da luz à temperatura ambiente durante 16 horas. Em seguida, 1,0 mL desta mistura foi diluído em etanol até uma absorbância de 0.70 nm ± 0.05 nm a 734 nm mensuradas em espectrofotômetro. Posteriormente, foi realizada a diluição seriada das frações do pigmento (1000 µg/mL; 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL; 15,62 µg/mL; 7,81 µg/mL e 3,9 µg/mL) e um volume de 30 µL de cada fração do pigmento foi misturado a 3,0 mL de solução ABTS, a mistura foi deixada em repouso durante 6 minutos. Como controle, foi utilizada a solução ABTS e como branco utilizou-se etanol. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em forma de média aritmética. O efeito de eliminação percentual foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{Efeito de eliminação (\%)} = ((Ac - As)/(Ac)) \times 100$$

Onde:

Ac = Absorbância da solução ABTS sem amostra;

As = Absorbância da amostra.

3.9 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS

O teor de fenóis total foi determinado de acordo com metodologia descrita por Tavares e colaboradores (2018) com modificações (proporção do reagente). O ensaio foi realizado adicionando-se 1,0 mL da solução de Folin (1:10 v/v) a 0,5 mL de cada fração do pigmento (fração A e B) na concentração de 250 µg/mL. Em seguida a mistura foi mantida em repouso durante 10 minutos a temperatura ambiente protegidos da luz, posteriormente 1,5 mL de Na₂CO₃ a 7,5% foi adicionado. Posteriormente, os sistemas foram novamente incubados protegidos da luz a 25 °C, durante 120 minutos. Transcorrido o tempo de incubação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 765 nm. Foi utilizada como branco Água destilada. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em forma de média aritmética. Para indicar a concentração de fenóis totais foi construída uma curva de calibração de absorbância em função da concentração de ácido gálico (Apêndice 2), a qual apresentou a equação linear: $y = 0,0012x + 0,1784$ com $R^2 = 0,9929$. A concentração de fenóis foi indicada em equivalente de ácido gálico (mgAGE/g de pigmento).

3.10 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

A avaliação da toxicidade das frações do pigmento foi realizada por meio de ensaio de fitotoxicidade e citotoxicidade.

3.10.1 Ensaio de fitotoxicidade

A avaliação da fitotoxicidade foi realizada utilizando sementes comerciais de alface (*Lactuca sativa*) e de pepino (*Cucumis sativus*), adquiridas no Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco na cidade do Recife (CEASA/PE). Inicialmente as sementes foram lavadas com água destilada durante 5 minutos. Em seguida foram desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio a 1% durante 20 minutos e novamente lavadas com água destilada para a remoção do excesso de hipoclorito. As sementes foram então deixadas sobre papel filtro a temperatura ambiente para reduzir a umidade.

As frações do pigmento foram diluídas em solução contendo 1% de DMSO, 1% de tween e água destilada esterilizada, realizando-se diluições seriadas para a obtenção das concentrações de 1000 µg, 500 µg, 250 µg, 125 µg, 62,5 µg, 31,25 µg e 15,6 µg/ml.

Para a realização do ensaio foram utilizadas placas de petri (9 cm) contendo papel filtro previamente esterilizadas. Foram inoculados 4 mL de cada concentração teste sobre o papel filtro em cada placa e, em seguida, foram depositadas 10 sementes por placa com o auxílio de uma pinça esterilizada. Posteriormente, as placas foram vedadas com papel filme e incubadas em estufas com demanda de oxigênio (BOD) durante 120 horas a 30°C. O experimento foi conduzido em triplicata e as medições do comprimento das raízes foram realizadas utilizando paquímetro digital, e expressas em milímetros. A metodologia foi realizada de acordo com Lizano-Fallas e colaboradores (2017) com modificações nas condições de cultivo das sementes.

Após o período de incubação foram observadas três variáveis: o número de sementes germinadas (SG%) o tamanho de crescimento das raízes (CR%) e o índice de germinação (IG %).

$$\text{Germinação relativa da raiz (\%)} = \left(\frac{n^{\circ} \text{ de sementes germinadas no extrato}}{n^{\circ} \text{ de sementes germinadas no controle}} \right) \times 100$$

$$\text{Compr. relativo da raiz (\%)} = \left(\frac{\text{Média do comprimento da raiz extrato}}{\text{média do comprimento da raiz controle}} \right) \times 100$$

$$IG = \frac{(\% \text{ Germinação da semente}) \times (\% \text{ crescimento da raiz})}{100}$$

3.10.2 Ensaio de citotoxicidade

A avaliação da atividade citotóxica das frações do pigmento foi realizada por meio do método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983).

As linhagens celulares L929 (fibroblasto de camundongos), Vero (células epiteliais renais de macaco verde africano), HeLa (carcinoma cervical humano), HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano) e MCF-7 (adenocarcinoma de mama humana) foram mantidas em meio de cultura DMEM ou RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado e 1 % de solução de antibióticos (penicilina e estreptomicina) sendo mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂ e 95% de umidade.

Para a realização do ensaio, as células foram inicialmente plaqueadas (10⁵ células/mL) em placas de 96 poços e incubadas por 24 h e em seguida 10 µL das frações do pigmento foram adicionadas aos poços na concentração final de 50 µg/mL. Foi utilizado como padrão o

medicamento paclitaxel (10 $\mu\text{g/mL}$). Após 72 h de reincubação foi adicionado 25 μL de MTT (5 mg/mL) procedido de incubação durante 3 h. Em seguida, o meio de cultura com o MTT foi aspirado e 100 μL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm.

Os experimentos foram realizados em quadruplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism 7.0 demo*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO

A actinobactéria utilizada para a produção de pigmentos foi previamente identificada como pertencente ao gênero *Amycolatopsis* sp. apresentando 97,4% de similaridade com o gênero, de acordo com a análise da sequência 16S rRNA realizada. Os resultados obtidos indicam similaridade aumentada com aproximadamente 10 espécies do gênero *Amycolatopsis* sendo as nove mais próximas: *Amycolatopsis saalfeldensis*, *Amycolatopsis echigonensis*, *Amycolatopsis albidoflavus*, *Amycolatopsis halotolerans*, *Amycolatopsis niigatensis*, *Amycolatopsis pretorienses*, *Amycolatopsis rhabdoformis*, *Amycolatopsis sulphurea* e *Amycolatopsis nigrescens* conforme apresentado na tabela 3.

Com relação aos ensaios bioquímicos realizados, o isolado, identificado como *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422, apresentou capacidade de degradação do amido, hipoxantina, xilana, L-tirosina, tween 20, tween 80, gelatina 0,4 % e 1%, além da produção de ácido a partir de Dextrina, D-trehalose, D-maltose, Adonitol, Manose. Além disso, o isolado apresenta crescimento nas diferentes faixas de pH (4, 5, 9, 10) e nas temperaturas de 25°C, 37°C e 45°C com tolerância a 1%, 3%, 5% e 7% de NaCl. Apresentando perfil de sensibilidade intermediária a vancomicina (30 µg), sensibilidade a Estreptomicina (10 µg), e de resistência a Gentamicina (10 µg), Tobramicina (TOB 10), Ácido Nalidíxico (30 µg), Rifampicina (5 µg) e Cefoxitina (CFO 30). Os resultados obtidos nos ensaios bioquímicos são demonstrados na tabela 1 e comparados com as espécies tipo apontadas com maior similaridade.

O índice de similaridade obtido nas análises moleculares inferior a 98% impossibilita a conclusão da identificação espécie tipo, devido a estreita relação entre as espécies. Além disso, nos resultados obtidos nos ensaios bioquímicos, o micro-organismo estudado apresentou diferenças em propriedades morfológicas e fisiológicas em relação as espécies apontadas com alto grau de similaridade pela sequência de 16S rRNA. A tabela 1 reúne os aspectos observados na caracterização bioquímica do micro-organismo e das espécies consideradas filogeneticamente próximas de *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422.

Tabela 3. Aspectos bioquímicos e fisiológicos observados na caracterização de *Amycolatopsis sp.* UFPEDA 3422 comparados com outras espécies do gênero *Amycolatopsis* apontados como similares a partir da análise molecular. Dados comparados com a caracterização das espécies presentes em Goodfellow, 2012 e demais autores referenciados.

	<i>Amycolatopsis sp.</i> (UFPEDA 3422) ¹	<i>Amycolatopsis</i> <i>saalfeldensis</i> ²	<i>Amycolatopsis</i> <i>echigonensis</i> ³	<i>Amycolatopsis</i> <i>albido flavus</i> ⁴	<i>Amycolatopsis</i> <i>halotolerans</i> ⁵	<i>Amycolatopsis</i> <i>niigatensis</i> ⁶	<i>Amycolatopsis</i> <i>pretorienses</i> ⁷	<i>Amycolatopsis</i> <i>rhabdoformis</i> ⁸	<i>Amycolatopsis</i> <i>sulphurea</i> ⁹	<i>Amycolatopsis</i> <i>nigrescens</i> ¹⁰
Degradação de fontes de Carbono										
Amido	+	-	-	+	-	NR	-	-	V	-
Hipoxantina	+	-	NR	+	+	NR	+	+	V	+
Guanina	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	+	NR	+
Xilana	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	+	NR	-
L-tirosina	+	+	NR	+	+	NR	+ ^W	NR	+	+
Degradação de tween										
Tween 20	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	+
Tween 80	+	+	NR	NR	NR	NR	NR	+	NR	+
Degradação da Gelatina										
0,4%	+	+	+	+	+	+ ^W	+	-	+	NR
1%	+	+	+	+	+	+ ^W	+	-	+	NR
Produção de ácido										
Dextrina	+	NR	NR	-	NR	NR	+	NR	+	+
D-trehalose	+	NR	NR	+	-	NR	+	NR	+	NR
Manitol	-	+	-	-	+	+	-	NR	+	+
D-maltose	+	NR	NR	V	-	NR	+	-	+	NR
Myo-inositol	-	+	+	+	+	-	+	NR	+	+
D-xilose	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+
L-arabinose	-	+	+	+	-	NR	+	NR	-	+
L-rhamnose	-	+	+	-	-	+	+	NR	-	+
Adonitol	+	NR	+	+	+	+	-	NR	-	NR

Continua

Continuação

Manose	+	NR	-	+	+	-	+	+	NR	+
Glicose	-	+	+	-	-	+	+	NR	NR	+
Sacarose	-	+	NR	+	+	NR	+	NR	+	-
D-lactose	-	NR	+	+	-	-	+	-	-	+
D-sorbitol	-	NR	V	-	-	+	+	NR	-	+
D-celobiose	-	NR	NR	+	+	NR	+	+	-	+

Crescimento em diferentes Ph

pH 4	+	-	-	+	NR	-	NR	+	NR	-
pH 5	+	+	-	+	NR	-	NR	+	NR	+
pH 9	+	-	+	+	NR	+	NR	+	NR	+
pH 10	+	-	+	+	NR	+	NR	-	NR	-

Crescimento em temperaturas variadas

4 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37 °C	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
45 °C	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-

Tolerância ao NaCl

1%	+	+	+	+	+	+	+	NR	+	+
3%	+	NR	+	+	+	+	+	NR	+	+
5%	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
7%	+	-	+	+	+	+	-	NR	+	-
10%	-	-	-	-	-	-	-	NR	-	-

Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos

Ácido Nalidíxico (30 µg)	Resistente	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Resistente	NR	Resistente
--------------------------	------------	----	----	----	----	----	----	------------	----	------------

Continua

Continuação

Vancomicina (30 µg)	Intermediário	Sensível	Sensível (50 µg /mL)	Resistente (0,25 µg)	NR	NR	NR	NR	Resistente (0,25 µg)	Resistente
Rifampicina (5 µg)	Resistente	Sensível (30µg)	NR	Resistente	NR	NR	NR	NR	NR	Sensível
Estreptomicina (10 µg)	Sensível	Sensível	Sensível (100 µg /mL)	Resistente	NR	NR	NR	Sensível	NR	Resistente
Gentamicina (10 µg)	Resistente	NR	NR	Resistente (5µg)	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Tobramicina (TOB 10)	Resistente	NR	Sensível (50 µg /mL)	Resistente (8µg)	NR	NR	NR	NR	Resistente (8µg)	NR
Cefoxitina (CFO 30)	Resistente	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

Espécies: *Amycolatopsis sp.* (UFPEDA 3422)¹; *Amycolatopsis saalfeldensis*² (CARLSOHN et al., 2007); *Amycolatopsis echigonensis*³ (DING et al., 2007); *Amycolatopsis albidoflavus*⁴ (EVEREST et al., 2011; LEE et al., 2006; LABEDA et al., 2003); *Amycolatopsis halotolerans*⁵ (LEE et al., 2006); *Amycolatopsis niigatensis*⁶ (EVEREST et al., 2011; DING et al., 2007); *Amycolatopsis pretorienses*⁷ (LABEDA et al., 2003); *Amycolatopsis rhabdoformis*⁸ (SOUZA et al., 2015); *Amycolatopsis sulphurea*⁹ (LEE et al, 2006); *Amycolatopsis nigrescens*¹⁰ (CAMAS et al., 2013; GROTH et al., 2007). Legenda: + (resultado positivo); - (resultado negativo); NR (não reportado na literatura); V (resultado variável); +^w (fracamente positivo).

A região 16S rRNA apresenta aproximadamente 1500 pb, sendo uma região considerada bastante importante na caracterização de micro-organismos. Contudo de acordo com Nouioui et al., (2018), as árvores do gene 16S rRNA frequentemente não são suficientes para distinguir gêneros intimamente relacionados especialmente em casos de identificação de novas espécies, sendo difícil a identificação de componentes do gênero das actinobacterias complexos, tais como *Amycolatopsis*, *Arthrobacter*, *Micromonospora* (CARRO et al., 2018), *Nocardioide*s e *Streptomyces* (GOODFELLOW et al., 2012) utilizando dados taxonômicos de estudos polifásicos.

Ademais o gênero *Amycolatopsis* é considerado ainda um gênero raro, sendo reportadas poucas espécies até o momento (GAO et al., 2019) o que dificulta sua identificação. Além disso algumas espécies do gênero apresentam múltiplas cópias do gene 16S rRNA e essas sequências em alguns casos são maiores para alguns pares inter-espécies que em correspondentes intra-espécies o que pode influenciar na classificação filogenética (SÁNCHEZ-HIDALGO et al., 2018; TANG et al., 2016).

As espécies apontadas com maior índice de similaridade com o isolado frequentemente também apresentam índice de similaridade elevada com outras espécies do gênero. As espécies *A. niigatensis* e *A. echigonensis*, por exemplo, são filogeneticamente relacionadas com a espécie *A. halotolerans* (LEE et al., 2006) As duas espécies são muito próximas filogeneticamente (EVEREST e MEYERS, 2011). *A. halotolerans* apresenta similaridade de 97,5% com *A. ultimotia* (LEE, 2009). *A. pretorienses* apresentou 98,82% de similaridade com a espécie *A. silviterrae* (JAMJAN et al., 2018) e 98,99% com a espécie *A. stemonae* (KLYKLEUNG et al., 2015).

A. nigrescens possui semelhanças genéticas com outras recentemente descobertas como *A. magusensis* (CAMAS et al., 2013), *A. cihanbeyliensis* (TATAR et al., 2013) e *A. xuchangensis* (HUANG et al., 2016) com uma similaridade filogenética de 97,1%, 96,7% e 98,1%, respectivamente. A proximidade entre as espécies do gênero e a dificuldade de identificação destas acaba por subsidiar, por diversas vezes, a classificação de um isolado como nova espécie e/ou a reclassificação de alguns organismos modificando suas relações filogenéticas (ZHI et al., 2009). Assim, a determinação do genoma completo do micro-organismo pode contribuir na identificação de uma nova espécie, complementando a avaliação restrita de sequências conservadas. (TANG, et al., 2016).

O isolado descrito como *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422 tolera níveis de 7% de NaCl e pode crescer a 45 °C, esse nível de tolerância ao NaCl é considerado alto, podendo ser

comparado à actinobacterias isoladas de ambientes marinhos (WANG; ZHOU; ZHANG, 2016). O perfil fisiológico apresentado pela actinobactéria é indicativo de adaptação a ambientes em condições estressantes, como o crescimento a 45 °C, o que pode ser explicado pelo fato da cepa ter sido isolada de solo rizosférico da Caatinga, bioma que apresenta altas temperaturas e clima seco. Esse tipo adverso de bioma possui uma ampla biodiversidade inexplorada e actinobacterias isoladas deste em outros estudos demonstraram ser fontes de metabólitos secundários de interesse biotecnológico e médico (RODRIGUES et al., 2018; SOARES JR et al., 2012).

Estudo desenvolvido por Soares Júnior e colaboradores (2012) em solos da Caatinga e do continente antártico, em busca de micro-organismos produtores de enzimas de interesse, demonstrou a produção de um metabólito secundário de interesse farmacêutico a partir de uma espécie de *Streptomyces sp.* As condições hostis desse tipo de bioma podem selecionar atividades metabólicas diferenciais, fazendo com que os organismos residentes sejam fontes promissoras de bioprospecção (SOARES JR et al., 2012).

No que diz respeito às características macroscópicas, o isolado *Amycolatopsis sp.* UFPEDA 3422 apresenta uma variedade de colorações quando cultivado em diferentes substratos, apresentando micélio aéreo bem desenvolvido, de coloração branca a branca alaranjada e reverso de cor vermelha quando cultivado em meio ISP-2 e HT. Além disso, o pigmento produzido por este não é difundido para o meio, estando associado à sua biomassa.

Entre as espécies que apresentaram maior índice de similaridade com o isolado UFPEDA 3422, poucas são as que também apresentam produção de pigmento. As espécies *A. saalfeldensis*, *A. niigatensis*, *A. echigonensis*, *A. halotolerans*, por exemplo, não produzem pigmentos difusíveis relatados na literatura (LEE, 2006; CARLSOHN et al., 2007; DING; HIROSE; YOKOTA, 2007).

Relacionada a *A. pretoriensis* foi relatada uma fraca produção de pigmentos e o desenvolvimento de um micélio aéreo branco a branco alaranjado (LABEDA et al., 2003). *A. rhabdoformis*, por sua vez apresenta micélio aéreo e vegetativo branco, não havendo relatos de produção de pigmento (SOUZA et al., 2015). Em contrapartida, conforme Groth e colaboradores (2007) a espécie *A. nigrescens* exibe coloração alaranjada na colônia e *A. nigrescens* produz um pigmento escuro preto avermelhado.

A espécie *A. sulphurea* possui colônia cor amarelo a amarelo-esverdeado acinzentado (LECHEVALIER et al., 1986; PENG et al., 2019) sendo escassos os relatos respeito desta na

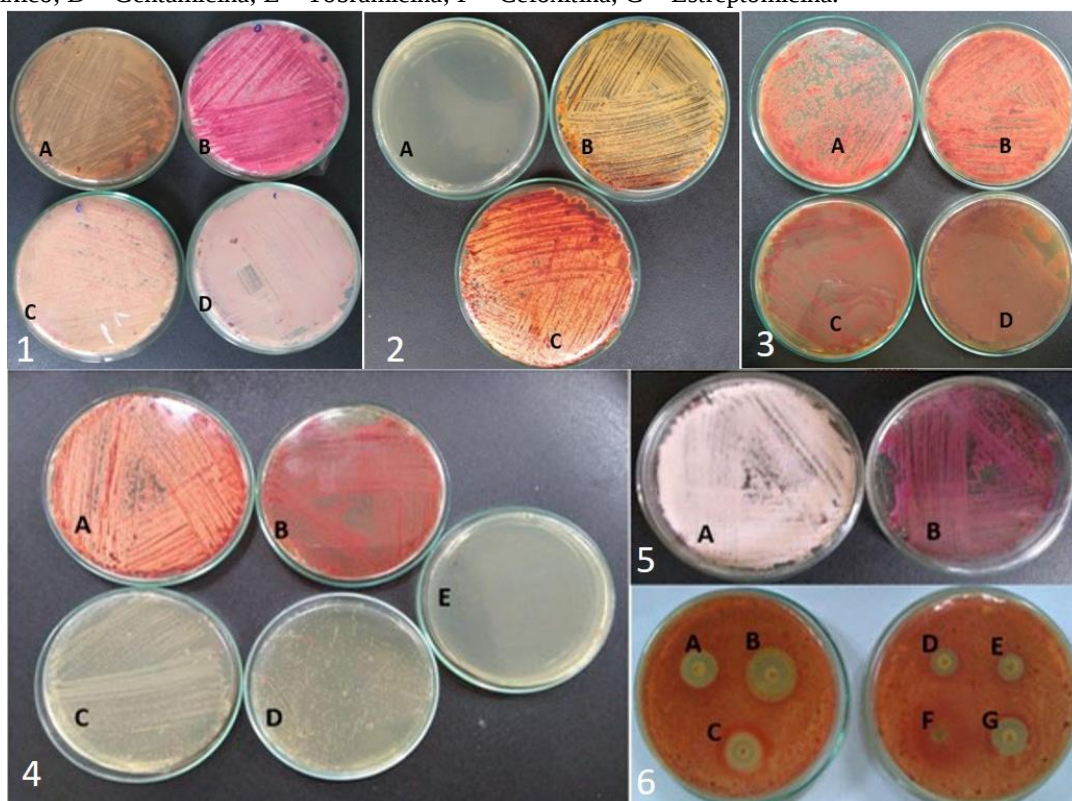
literatura. Pouco se sabe sobre a produção de pigmento por esta espécie, sendo seu potencial biotecnológico ainda desconhecido, o que dificulta comparações.

Dadas as semelhanças e estreitas diferenciações entre as espécies do gênero, a combinação de fatores e informações fornecidas pela identificação morfofisiológica vem a contribuir na identificação destes micro-organismos, fornecendo alternativas para intervenção biotecnológica na produção de biomoléculas de interesse por meio destes. Assim a realização de ensaios que revelem o perfil do micro-organismo pode fornecer informações importantes a cerca da produção de seus metabólitos.

Os ensaios morfofisiológicos e genéticos realizados para identificação da espécie produtora de pigmentos denominada *Amycolatopsis* sp. 3422 não foram suficientes para a conclusão da espécie a qual este está relacionado, contudo apresentam importantes características associadas ao gênero.

Alguns dos resultados obtidos nas provas de caracterização bioquímica de *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422 estão representados na figura 3.

Figura 3. Fisiologia do isolado de *Amycolatopsis* UFPEDA 3422. **1.** Perfil da utilização de fonte de carbono: A – Myo-inositol; B – D-maltose; C – Dextrina; D – D-trehalose; **2.** Efeito da temperatura no crescimento microbiano: A – 4 °C; B – 45 °C; C – 37 °C; **3.** Efeito do pH no crescimento microbiano: A – pH 4; B – pH 5; C – pH 9; D – pH 10; **4.** Crescimento em diferentes concentrações de NaCl. Verso: A – 1% de NaCl; B – 3% de NaCl; C – 5% de NaCl; D – 7% de NaCl; E – 10% de NaCl; **5.** Crescimento em diferentes concentrações de NaCl. Verso. A – 1% de NaCl e B – 3% de NaCl e **6.** Atividade antimicrobiana: A – Rifampicina; B – Vancomicina; C- Ác. Nalidíxico; D – Gentamicina; E – Tobramicina; F – Cefoxitina; G – Estreptomicina.



Fonte: A autora.

4.2 PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO E ANÁLISE EM ESPECTROFOTÔMETRO UV-VIS DO PIGMENTO

O pigmento produzido por *Amycolatopsis* sp. não é difundido para o meio de cultivo durante o processo de fermentação, sendo extraído a partir da sua biomassa. A utilização do acetato de etila como solvente, no processo de extração, proporcionou a remoção do pigmento das células após 24h de contato sob agitação.

Contudo o esgotamento da coloração da biomassa se dá de maneira mais rápida após a adição de etanol, mesmo mantido em repouso, desse modo o etanol representa uma alternativa a extração do pigmento a partir da biomassa. Além disso, o pigmento extraído apresenta insolubilidade em água, sendo solúvel em solventes orgânicos como o acetato de etila, etanol, metanol e clorofórmio.

A produção de pigmentos por micro-organismos pode representar uma estratégia de sobrevivência em ambientes estressantes ou de proteção contra radiação UV (KUSHWAHA et al., 2014). Azimi e colaboradores (2017) também realizaram a extração de pigmentos utilizando como solvente o acetato de etila.

Pigmentos carotenoides, em geral, são moléculas lipossolúveis, e apresentam elevado grau de solubilidade em solventes orgânicos, dessa maneira sua extração utilizando estes solventes orgânicos é geralmente mais fácil. Além disso, estes pigmentos tendem a ser insolúveis em água, excetuando-se apenas quando ligados a proteínas. (GENTILI et al., 2013).

O pigmento bruto extraído apresenta coloração vermelha (Figura 4) e demonstra a existência de dois picos de absorção diferentes, sendo um pico visualizado a 470 nm e outro a 540 nm. Contudo, o pico apresentado em 540 nm é superior ao observado em 470 nm. Conforme Órdenes-Aenishanslins e colaboradores (2016) pigmentos carotenoides geramente absorvem entre 400 e 500 nm aproximadamente. De acordo com Heo e colaboradores (2018), absorbâncias entre 380-490 nm correspondem a coloração de amarelo a alaranjado, enquanto que absorção entre 490-595 corresponde a coloração vermelha.

Em estudo semelhante, Vendruscolo e colaboradores (2013), pesquisaram a produção de pigmentos extraídos de biomassa de *Monascus ruber* (fungo amplamente utilizado para produção de pigmentos naturais) e observaram a formação de picos na região de 470 nm correspondente a uma coloração laranja e outro pico de 510 nm correspondente a uma coloração vermelha.

Ainda, Herraéz et al., (2019), verificou a produção do pigmento prodigiosina de coloração vermelha por *Serratia marcescens*, demonstrando pico de absorção máxima em 535 nm e ombro a aproximadamente 515 nm. Demonstrando assim valores de absorção próximos ao observado no pigmento produzido por *Amycolatopsis* sp. 3422.

Figura 4. Extrato bruto de pigmento vermelho extraído com o auxílio de acetato de etila a partir da biomassa de *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422.



Fonte: A autora.

4.3 OBTENÇÃO DA BIOMASSA, OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PIGMENTO, PARÂMETROS CINÉTICOS E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

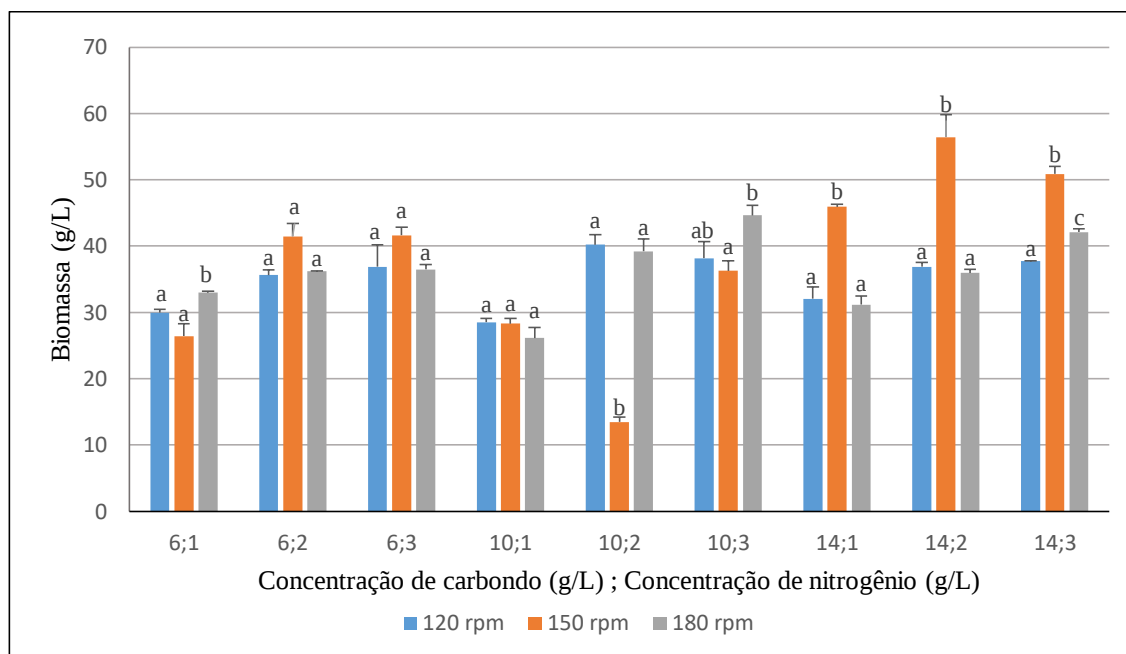
A maior concentração de biomassa obtida após o planejamento fatorial foi de 56,4 g/L ($1,175 \text{ g.h}^{-1}$) quando o micro-organismo foi cultivado na presença de 14 g da fonte de carbono (glicose) e 2g da fonte de nitrogênio (triptona) utilizando a rotação de 150 rpm.

Em contrapartida na concentração de carbono e nitrogênio correspondente aos pontos centrais do planejamento (10g de glicose e 2 g de triptona e 150 rpm) foi observada a menor produção de biomassa, 13,4 g/L ($0,27 \text{ g.h}^{-1}$). Desse modo, pode-se concluir que as alterações realizadas por meio do planejamento fatorial nas concentrações de glicose e triptona interferiram no desenvolvimento celular.

O maior desenvolvimento da biomassa do micro-organismo foi influenciado não apenas pela concentração de glicose e triptona disponível no meio de cultivo, mas também pela rotação utilizada. A produção de biomassa na rotação de 150 rpm apresentou-se de modo geral significativamente maior do que a apresentada nas demais rotações. Os valores de biomassa produzidos nas rotações de 120 e 180 rpm são estatisticamente semelhantes, sendo o crescimento do micro-organismo equivalente nestas condições. Assim sendo, pode-se perceber que a combinação dos fatores estudados é determinante sobre a formação de massa celular.

A biomassa obtida nos ensaios fermentativos, nas diferentes condições avaliadas, está representada na **Figura 5**.

Figura 5. Biomassa do micro-organismo *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422 produzida em função da proporção de C/N nas rotações 120 rpm, 150 rpm e 180 rpm. As médias foram comparadas entre si, pelo intervalo de confiança. Os resultados representados com letras iguais na mesma relação de concentração de carbono e nitrogênio não diferem entre si ($p < 0,05$).



De acordo com Zhao e colaboradores (2019), o desenvolvimento de maior biomassa associada a presença de maior quantidade de carbono, pode ser justificado pelo fato da glicose ser uma fonte de fácil assimilação. Dessa forma, a concentração elevada de glicose possibilita o maior desenvolvimento celular (SAID; BROOKS; CHISTI, 2014). Do mesmo modo, a velocidade de agitação está relacionada com a produção de biomassa, uma vez que esta proporciona não apenas a homogeneização dos nutrientes como também afeta a disponibilidade de oxigênio. Entretanto, velocidade de agitação muito elevada pode resultar na inibição do crescimento celular em decorrência da intensidade da força de agitação (LV et al., 2017).

Há de se considerar que o oxigênio dissolvido no cultivo é limitado pela taxa de absorção específica pelas células e sofre interferência de fatores como composição do meio de cultura, viscosidade, tensão superficial, concentração de soluto e morfologia do micro-organismo (VIANA MARQUES et al., 2011). Dessa forma, a produtividade dos metabólitos está intimamente relacionada ao processo fermentativo, incluindo os nutrientes envolvidos e suas condições de cultivo (ALI et al., 2018).

Observa-se ainda que pH do meio de cultivo apresentou pouca variação durante o ensaio de produção do pigmento. Entretanto, comumente o pH do meio de cultura pode refletir em alterações nos metabólitos produzidos pelo micro-organismo em função da influência que exerce sobre fatores como função da membrana plasmática, morfologia e estrutura celular, estado iônico dos substratos, a solubilidade dos sais e a absorção de diversos nutrientes (AFSHARI et al., 2015).

No que se refere a produção de pigmentos, o maior valor médio foi observado na presença de 10 gramas da fonte de carbono (glicose) e 3 gramas da fonte de nitrogênio (triptona) agitados a 150 rpm, 37° C, após cultivo por 48 horas. Nestas condições foi observada a elevação máxima nos dois picos de absorção apresentados pelo pigmento (121,4 UA_{540 nm} e 134,65 UA_{470 nm}) equivalenbte a 2,52 UDO.h⁻¹ e 2,80 UDO.h⁻¹, respectivamente. A matriz do planejamento fatorial completo e as repostas obtidas estão expressas na **tabela 4**.

Tabela 4. Resultados da produção de pigmentos e biomassa produzidos por *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422 no ensaio de otimização por meio de planejamento fatorial, utilizando as variáveis X₁ (concentração de carbono de 6, 10 e 14 g/L, correspondente aos níveis -1, 0 e +1 respectivamente), X₂ (concentração de nitrogênio 1, 2 e 3 g/L) e X₃ (variação da rotação 120, 150 e 180 rpm). Sendo a maior produção de pigmentos pelo micro-organismo observada no experimento de número 15.

Nº do experimento	Variáveis			Biomassa (g/L)	pH	Pigmento Produzido UA	
	X ₁	X ₂	X ₃			540 nm	470 nm
1	-1	-1	-1	29,9	7,0	0,96	0,70
2	-1	0	-1	35,6	7,0	0,19	0,04
3	-1	+1	-1	36,8	7,3	0,64	0,45
4	0	-1	-1	28,5	7,2	0,54	0,33
5	0	0	-1	40,2	7,0	0,20	0,09
6	0	+1	-1	38,1	7,5	0,75	0,42
7	+1	-1	-1	32,0	7,0	1,05	0,50
8	+1	0	-1	36,8	7,0	0,84	0,50
9	+1	+1	-1	37,7	7,5	0,97	0,53
10	-1	-1	0	26,4	7,0	31,25	11,80
11	-1	0	0	41,4	7,0	13,06	4,99
12	-1	+1	0	41,6	7,3	15,30	2,87
13	0	-1	0	28,3	7,0	86,50	43,10
14	0	0	0	13,4	7,5	34,69	46,00

Continua

Continuação

15	0	+1	0	36,2	7,2	121,40	134,65
16	+1	-1	0	45,9	7,0	24,70	13,10
17	+1	0	0	56,4	7,3	35,70	22,45
18	+1	+1	0	50,8	7,4	78,55	63,65
19	-1	-1	+1	33,0	6,9	0,51	0,34
20	-1	0	+1	36,2	7,0	0,85	0,56
21	-1	+1	+1	36,4	7,2	0,31	0,07
22	0	-1	+1	26,1	6,8	1,18	1,68
23	0	0	+1	39,2	7,5	0,20	0,15
24	0	+1	+1	44,6	7,2	0,21	0,12
25	+1	-1	+1	31,1	7,0	0,33	0,24
26	+1	0	+1	35,9	7,4	0,78	0,51
27	+1	+1	+1	42,1	7,6	0,24	0,19

De acordo com os resultados, a condição em que se verifica maior desenvolvimento celular não representa a melhor condição para obtenção do pigmento, não havendo, portanto, correlação direta entre o maior valor de biomassa produzida e a produção do pigmento realizada pelo micro-organismo. Assim, a elevada concentração de carbono e nitrogênio favorece a produção de biomassa, porém aparentemente dificulta a formação de pigmento.

Bhatia e colaboradores (2016) observaram redução da biomassa acompanhada de maior produção de undecilprodigiosina (pigmento vermelho) na presença do furfural, o qual pode ser originado a partir da conversão bioquímica da glicose (ALLEN et al., 2010) induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio que prejudicam o desenvolvimento celular (SILVA et al., 2017).

Além disso, os resultados obtidos demonstram que diferentes concentrações grama/litro de carbono e nitrogênio apresentaram influência de modo distinto sobre a produção do pigmento em cada condição de rotação utilizada. As modificações propostas no planejamento fatorial provocaram alterações na intensidade dos picos de absorção apresentados pelo pigmento, de modo que algumas combinações produziram maior concentração do pigmento absorvido a 540 nm e outras elevaram o pico de absorção de 470 nm.

Dentre as condições testadas as que resultaram no aumento da concentração de pigmento absorvido no comprimento de onda de 540 nm foram: 14 g/L de glicose e 1 e 3 g/L

de triptona com taxa de rotação de 120 rpm; 10 g/L de glicose e 3 g/L de triptona na rotação de 150 rpm e 10 g/L de glicose e 1 g/L de triptona na rotação de 180 rpm.

A produção de pigmento relativa a cada experimento: 120rpm (Figura 6), 150 rpm (Figura 7) e 180 rpm (Figura 8) no comprimento de onda de 540 nm está representada nas figuras a seguir.

Figura 6. Produção de pigmento por *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422, relativo a rotação de 120 rpm com pico de absorção no comprimento de onda de 540 nm. Sendo observada uma elevação na produção no centro do gráfico na presença de 14 g de glicose e 1 e 3 g de triptona.

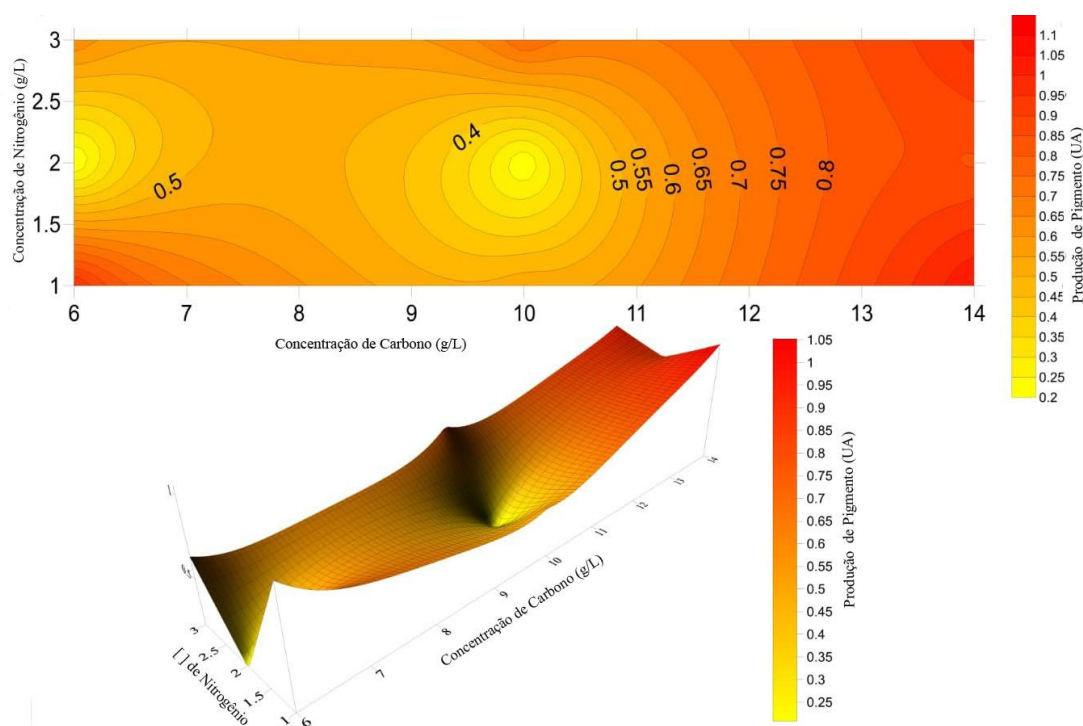


Figura 7. Produção de pigmento por *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422, relativo a rotação de 150 rpm com pico de absorção no comprimento de onda de 540 nm. Sendo observada elevação da produção no centro do gráfico na presença de 10 g de glicose e 3 g de triptona.

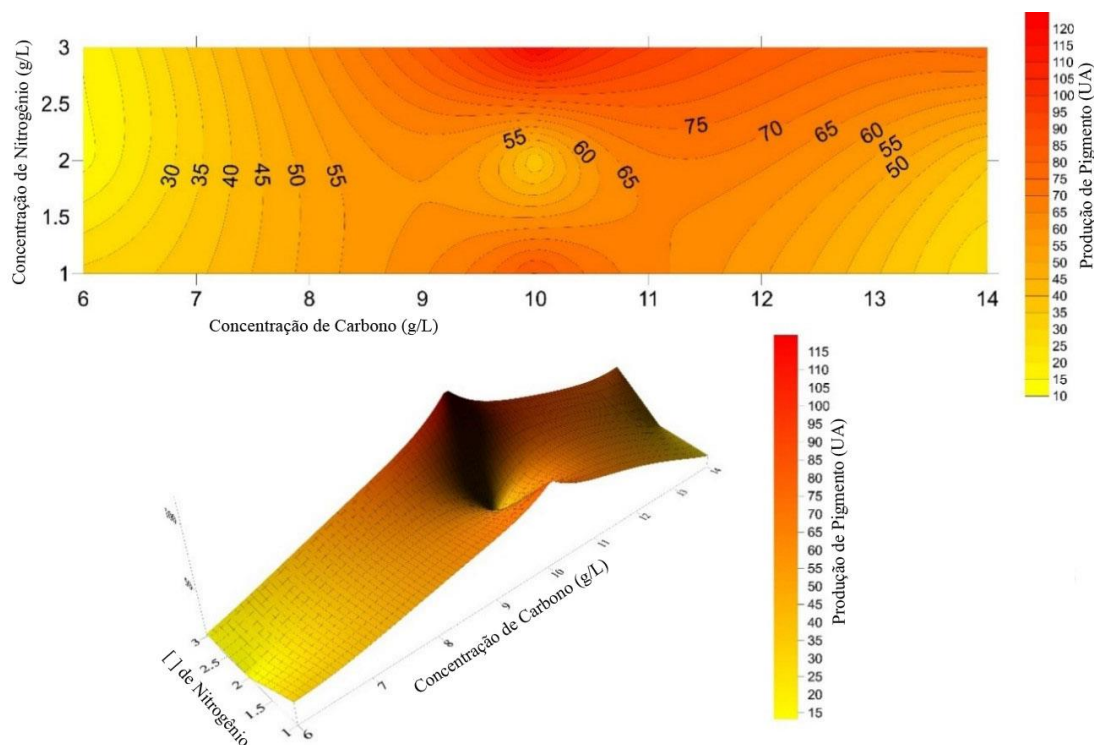
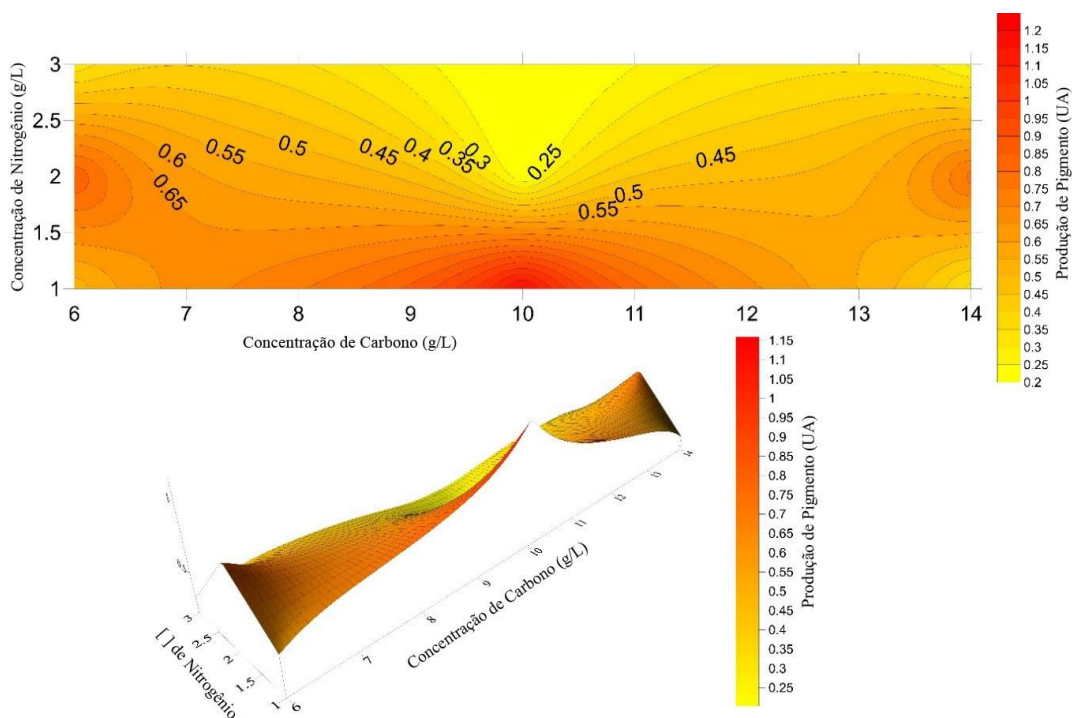


Figura 8. Produção de pigmento por *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422, relativo a rotação de 180 rpm com pico de absorção no comprimento de onda de 540 nm. Sendo observado elevação da produção no centro do gráfico na presença de 10 g de glicose e 1 g de triptona.



O pigmento produzido apresentou elevação do pico de 470 nm quando o cultivo do micro-organismo foi realizado utilizando-se 6 g/L de glicose e 1g/L de triptona na rotação de 120 rpm, na concentração de 10g/L de glicose e 3g/L de triptona a 150 rpm, e 10 g/L de glicose e 1g/L de triptona a 180rpm.

A produção de pigmento relativa a variações na concentração de carbono e nitrogênio nas rotações de 120rpm, 150 rpm e 180 rpm a 470 nm está representada nas figuras 9, 10 e 11 respectivamente.

Figura 9. Produção de pigmento por *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422, relativo a rotação de 120 rpm (470 nm). Sendo observada uma elevação na produção no centro do gráfico na presença de 6 g de glicose e 1g de triptona.

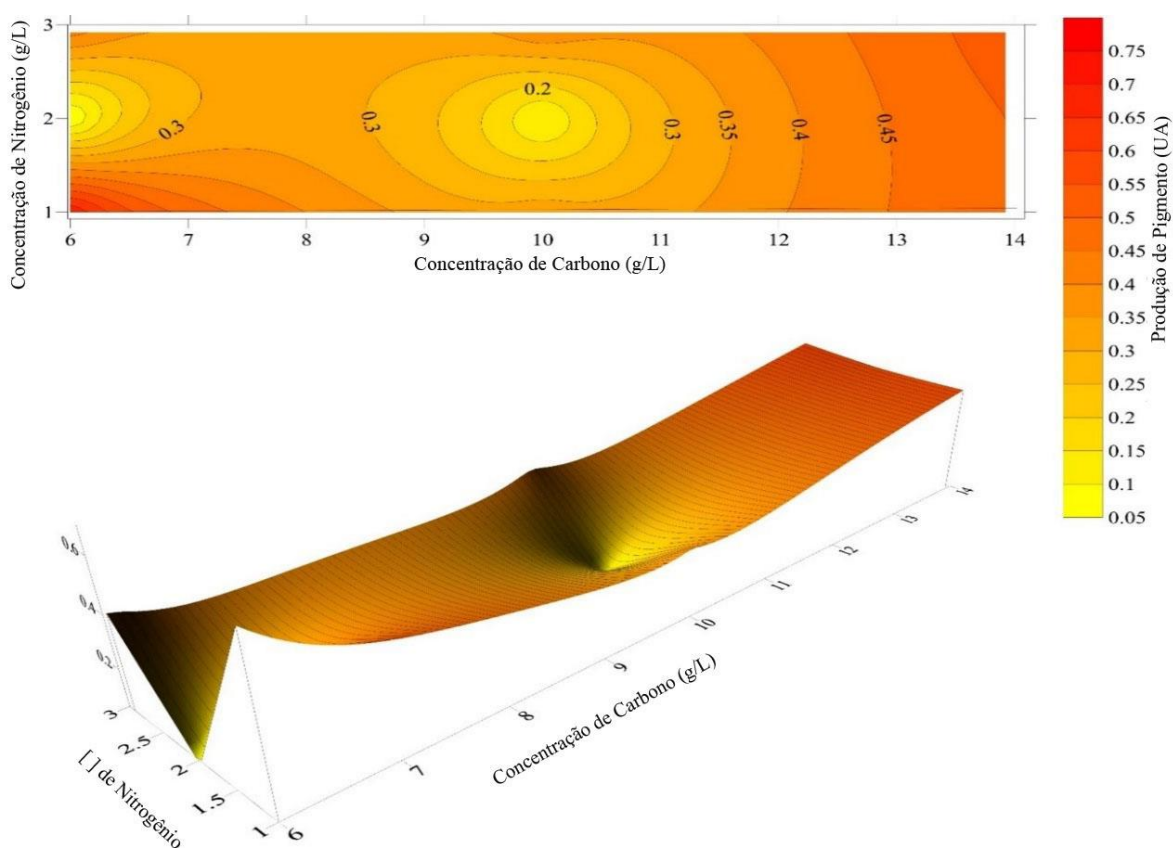


Figura 10. Produção de pigmento por *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422, relativo a rotação de 150 rpm (470 nm) apresentando uma elevação da produção do pigmento no centro do gráfico quando na presença de 10 g de glicose e 3 g de triptona.

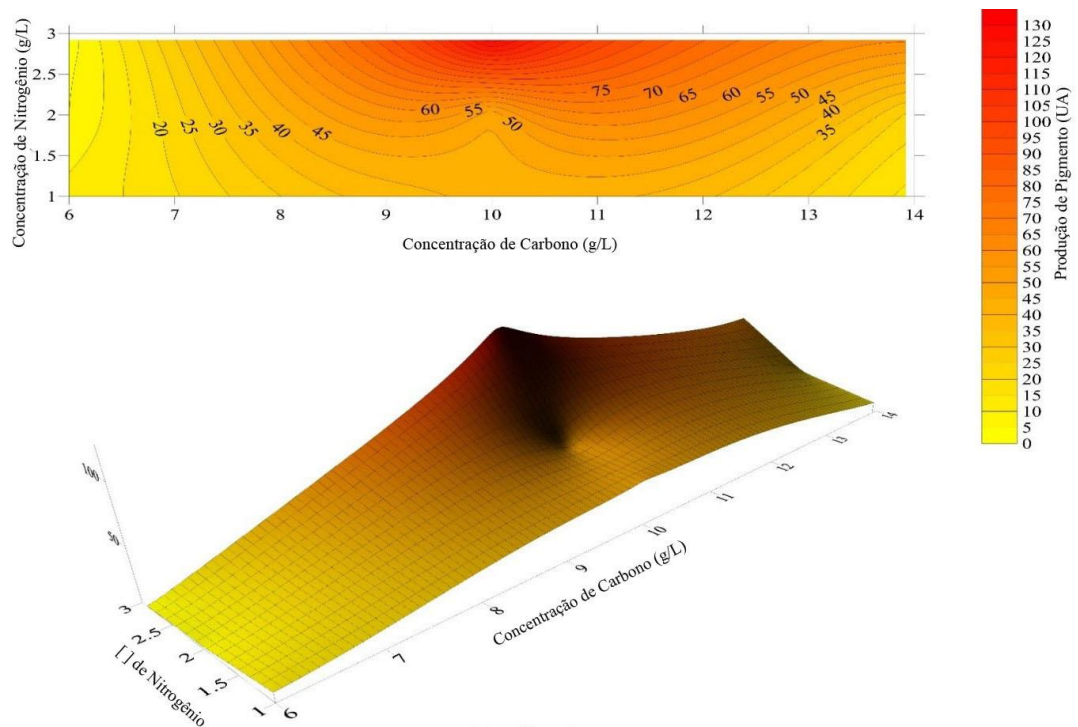
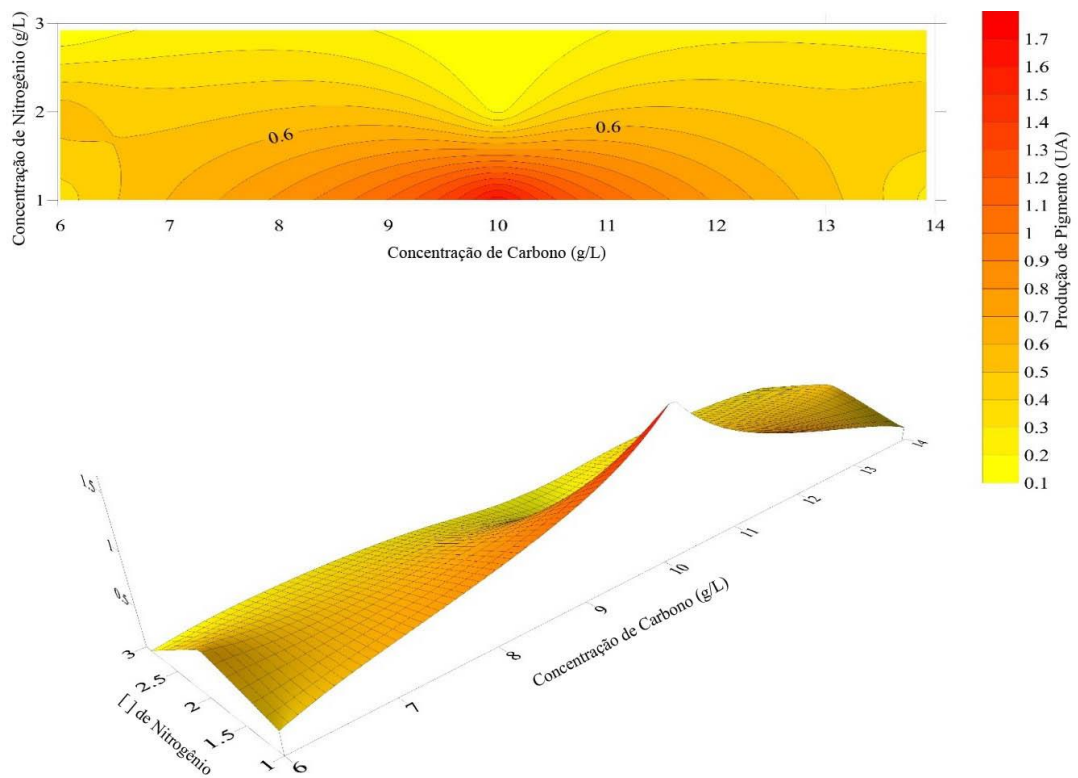


Figura 11. Produção de pigmento por *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422, relativo a rotação de 180 rpm (470 nm). Sendo observada uma elevação da produção no centro do gráfico quando o micro-organismo é cultivado na presença de 10 g de glicose e 1 g de triptona.



A concentração de pigmento constatada nos dois comprimentos de onda foi estatisticamente semelhante apenas quando o micro-organismo foi cultivado a 150 rpm. Nesta rotação todas as combinações de concentração de carbono e nitrogênio resultaram em produção de pigmento significativamente superior as demais ($p < 0,05$, de acordo com o teste de Tukey) nos dois comprimentos de onda. Observa-se, portanto, que, a produção do pigmento é fortemente condicionada ao fator rotação, sendo prejudicada quando esta é modificada para mais (180 rpm) ou para menos (120 rpm). Contudo, de modo geral, a maior concentração de pigmento é observada no comprimento de 540 nm nas diferentes rotações, sendo os resultados significativamente maiores que os observados no comprimento de 470 nm.

A máxima produção de pigmentos aqui obtida foi encontrada nos pontos axiais do planejamento sobre a linha limite da concentração de nitrogênio (Figura 6). De acordo com as correlações apresentadas entre as variáveis e a resposta a equação geral que melhor descreve a produção de pigmentos por *Amycolatopsis* sp. no comprimento de 540 nm é a equação 1, produzida a partir dos dados da rotação de 150 rpm, onde os parâmetros relativos a concentração de carbono, nitrogênio e rotação apresentam valores de coeficientes positivos. Os coeficientes significativos encontrados nesta condição são: a (0,106703), b (0,036585) e c (0,015584), sendo o valor do R^2 ajustado o mais representativo. A relação entre as variáveis envolvidas na produção pode então ser determinada conforme a equação geral 1:

$$\ln y = aC + bN + cRot \text{ (Equação 1)}$$

Sendo: $y = e^{aC+bN+cRot}$, Onde: C é a quantidade de fonte de carbono (glicose), N a quantidade de fonte de nitrogênio (triptona) e Rot é a taxa de rotação utilizada na produção, sendo a, b e c constantes determinadas por meio do estudo de regressão em base de dados ANOVA.

Do mesmo modo, a equação geral 2 é a que melhor representa a produção de pigmentos absorvido no comprimento de 470 nm:

$$\ln Y = a \ln C + b \ln N + c \ln rot \text{ (Equação 2)}$$

Sendo: $y = C^a \cdot N^b \cdot Rot^c$, onde a variável Y equivale a produção de pigmento, C a concentração da fonte de carbono (glicose) e N a concentração da fonte de nitrogênio (triptona) e Rot a taxa de rotação utilizada na produção.

Contudo, os coeficientes obtidos na equação 2 são menores que zero, resultando em valores de $y=0$. Dessa maneira a equação que melhor satisfaz a produção do pigmento é a equação 1.

A influência negativa da elevação da rotação na produção de pigmentos pode ser explicada a partir da sua relação com a taxa de aeração do micro-organismo em cultivo, pois, devido aos choques do meio de cultura líquido com a parede do recipiente, grande bolhas de ar são quebradas em pequenas bolhas ocasionando a redução do tamanho de agregados miceliais e favorecendo o acesso das células ao oxigênio (AFSHARI et al., 2015; JAFARI et al., 2007), o que resulta em maior crescimento celular porém por vezes provoca declínio da produção de pigmentos e ruptura celular. Conforme Lv e colaboradores (2017) velocidades de agitação maiores ou menores acarretaram um declínio na produção de pigmentos amarelos por *Monascus purpureus*.

Afshari e colaboradores (2015) obtiveram a melhor produção de pigmento amarelo proveniente de *Penicillium acuelatum* ATCC 10409 (1,38 g/L) em cultivo realizado a 150 rpm com temperatura de crescimento de 30 °C e pH 6.5. Em contrapartida a maior concentração de biomassa encontrada pelo autor (11,12 g/L) foi obtida na rotação de 100 rpm, não havendo correlação direta entre o aumento da produção de pigmento e a concentração de biomassa. Esse resultado corrobora com os aqui encontrados.

Com relação ao efeito da concentração de nitrogênio, os resultados aqui encontrados demonstram que este constituiu importante fator para a otimização da produção de pigmento, sendo esta fortemente relacionada a proporção carbono nitrogênio.

A fonte de nitrogênio presente no meio de cultura pode ser orgânica ou inorgânica. Nitrogênio inorgânico é rapidamente metabolizado pelo micro-organismo e promove um rápido crescimento, porém não favorece o acúmulo de metabólitos além de inibir a produção de antibióticos (MANIKKAM et al., 2015; DHAWAN et al., 2005). Em contrapartida, fontes orgânicas de nitrogênio (como a peptona utilizada na fermentação de *Amycolatopsis sp.*) são consideradas fontes sustentáveis e auxiliam o acúmulo de produtos (BAOXIN; XIANGJING; WENSHENG, 2011).

Shi e colaboradores (2015), utilizando peptona como fonte de nitrogênio para a produção de pigmentos por *Monascus anka* observaram a predominância de pigmentos amarelos em detrimento dos vermelhos. Ainda a fonte de nitrogênio utilizada pode refletir em alterações sobre a coloração e a localização do pigmento. Quando o glutamato monossódico é utilizado como fonte de nitrogênio, altos valores de pH promovem a transformação de pigmentos intracelulares em pigmentos extracelulares derivados do vermelho (OROZCO e KILIKIAN, 2008).

Guo e colaboradores (2014) otimizaram a produção de pigmentos melanóides por meio de uma série de fermentações utilizando meio de cultura específico, maximizando a concentração obtida em cerca de 8,6 vezes, evidenciando que a otimização dos parâmetros e fatores de meios de cultura bem como as condições de fermentação de micro-organismos podem produzir melhores resultados na produção de pigmentos (XIONG; TU; TU, 2008).

Bühler e colaboradores (2013), em experimento com *Monascus ruber*, utilizando biorreator, alcançaram produção máxima de pigmento vermelho de 8,28 UA_{510 nm} após 60 horas de cultivo e 7,26 UA_{470 nm} de pigmento laranja após 72 horas de cultivo. Em outro estudo, Terán Hilares e colaboradores (2018) pesquisando a produção de pigmentos vermelhos por *Monascus ruber* utilizando como substrato hidrolisado do bagaço da cana de açúcar, obtiveram produção máxima de 18,71 AU_{490nm}. As diferenças nos comprimentos de onda observados podem estar relacionadas a estrutura das moléculas constituintes do pigmento (GÜRSES et al., 2016).

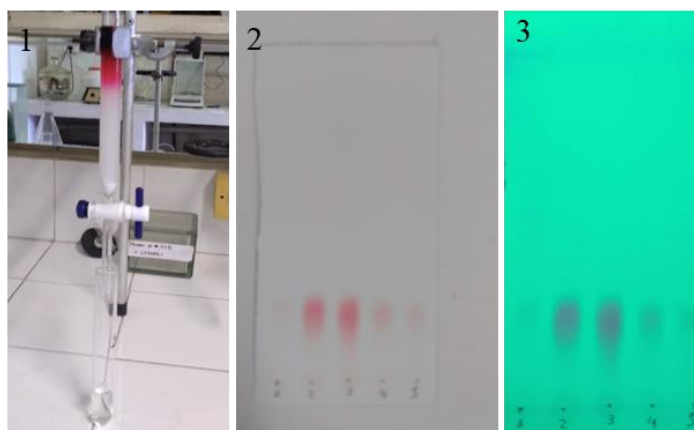
Os resultados obtidos reforçam, portanto, que a produção de pigmentos pode ser controlada pela limitação do substrato, podendo a composição dos pigmentos estar atrelada aos nutrientes disponíveis, como fonte de nitrogênio e carbono. Assim, a seleção do substrato sólido ou líquido apropriado possui um papel importante no desenvolvimento de processos fermentativos (ATLI; YAMAC; YILDIZ, 2013).

4.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

4.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Na realização da cromatografia em camada delgada foi obtido como melhor sistema eluente hexano/acetato de etila 7:3 (v/v) apresentando R_f de 0,40 (Figura 12).

Figura 12. Cromatografia em coluna (1) e CCD das frações obtidas (2 e 3) do pigmento produzido por *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422.



Fonte: A autora

Foram obtidas 13 frações a partir da coluna, sendo as frações equivalentes reunidas após a realização de cromatograma. Desse modo foram obtidas duas frações ao final da coluna sendo uma com coloração vermelha (Fração A) e outra violácea enegrecida (Fração B). A fração A foi obtida por um sistema eluente Hexano/acetato de etila 7:3 (Rf: 0,40), já a Fração B com a adição de etanol. O Rf da fração B foi calculado utilizando o sistema eluente diclorometano/metanol 9:1 (v/v), sendo visualizada uma mancha pouco definida, cujo Rf: 0,45. Após a purificação das frações, a fração A apresentou pico de absorção a aproximadamente 535 nm e ombro em 500 nm, enquanto a fração violácea enegrecida (fração B) apresentou pico na região de 550 nm.

Lapenda e colaboradores (2015), encontraram um Rf de 0,59 para o pigmento (prodigiosina) extraído de *Serratia marcescens* UFPEDA 398, utilizando como sistema eluente clorofórmio/metanol/ácido acético 5:30:65 (v:v) seguido por clorofórmio/metanol/acetona 4:2:3 (v:v). É válido salientar, porém, que diferentes sistemas eluentes produzem diferentes perfis de migração. Assim a comparação entre os valores encontrados no fator de retenção é inconclusiva no que diz respeito a identificação de componentes, sendo necessárias a combinação de demais técnicas para a identificação do composto.

4.4.2 Análise de espectroscopia por Infravermelho (IV) transformada de Fourier

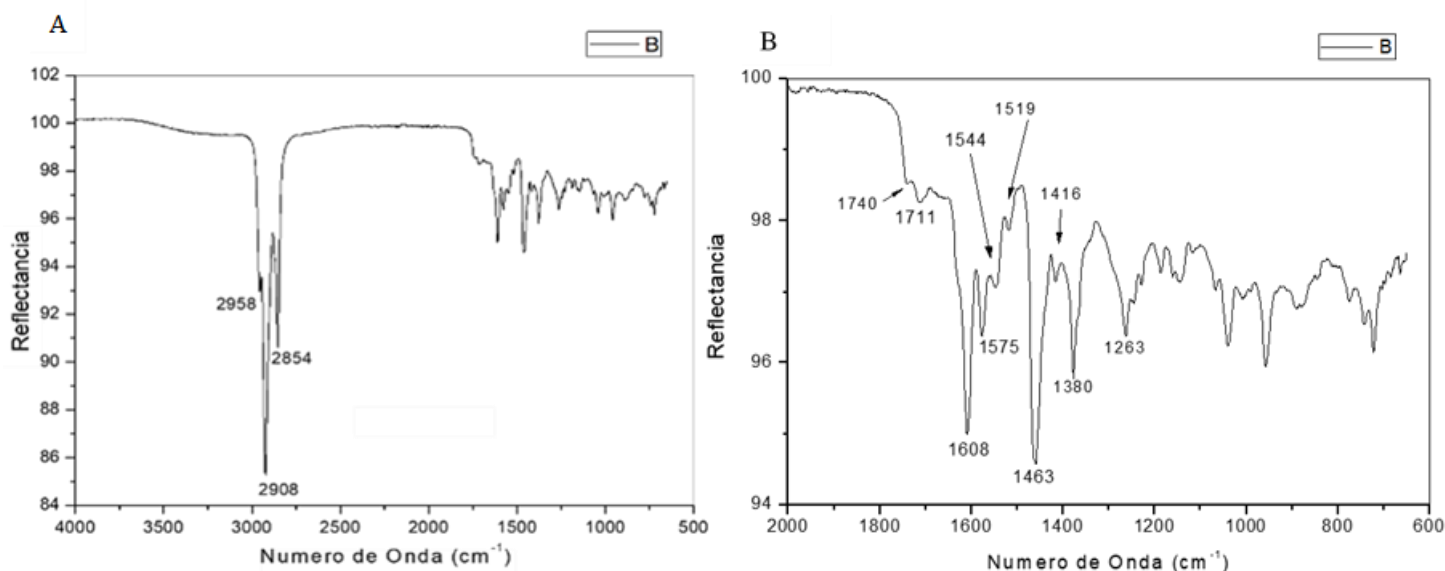
O pigmento bruto produzido por *Amycolatopsis* sp. apresentou as seguintes bandas no espectro de infravermelho: 2958 cm^{-1} , 2908 cm^{-1} (3000–2800 cm^{-1}) característica da presença de grupamento alquil (AMIN et al., 2018), 2950 cm^{-1} característica de elongações da ligação C-H (ÓRDENES-AENISHANSLINS et al., 2016), 2854 cm^{-1} correspondente a ligação C-C (ASNANI; RYANDINI; SUWANDRI, 2016), 1740 cm^{-1} corresponde a ligação C=O éster (ASNANI; RYANDINI; SUWANDRI, 2016). Além desses também foram apresentados sinais na região de 1711 cm^{-1} corresponde a ligação C=O cetona (ASNANI; RYANDINI; SUWANDRI, 2016), 1608 cm^{-1} , 1575 cm^{-1} (região de 1550-1640) corresponde a ligação N-H secundária (ASNANI; RYANDINI; SUWANDRI, 2016) bem como 1544 cm^{-1} correspondente a presença de N-H no modo de flexão (AMIN et al., 2018). Foi observado ainda deformação a 1519 cm^{-1} , 1463 cm^{-1} correspondente a ligação $-\text{CH}_2-$ (ASNANI; RYANDINI; SUWANDRI, 2016), 1416 cm^{-1} corresponde a $\alpha\text{-CH}_2$ (aldeído) (UDHYAKUMAR et al., 2017). 1380 cm^{-1} referente ao grupamento C-O (METWALLY et al., 2017) e 1263 cm^{-1} . Picos na região de 1243 a 1305 apontam a existência de ligações tipo C-O grupamento anidro (El-NAGGAR, El-EWASY, 2017).

Órdenes-Aenishanslins e colaboradores (2016), também verificaram a presença de uma banda próxima a 1750 cm^{-1} em pigmento vermelho. A presença desse grupo pode ser resultante da oxidação do licopeno/zeaxantina ou luteína e pode resultar na formação de carotenoides como astaxantina e cantaxantina (cetocarotenoides vermelhos/laranja). Sendo o oxigênio incorporado em qualquer um dos limites duplos $\text{C}=\text{C}$ ou por oxidação do grupo OH na estrutura do carotenoide nesse processo de oxidação (ARATHI, et al., 2015). Em cantaxantina observa-se dois grupos carbonil e uma diacetona (ZHENG et al, 2013).

Algumas bandas apresentadas no espectro do pigmento produzido por *Amycolatopsis*, foram associadas a grupos funcionais presentes em pigmentos já relatados na literatura. O sinal apresentado a 1519 cm^{-1} foi reportado também por Kushwaha e colaboradores (2014), em análise de pigmento de coloração laranja, produzido por *Planococcus maritimus*. Neha e colaboradores (2017) reportaram a existência do radical $-\text{CH}_2-$ em pigmento vermelho produzido por *Bacillus subtilis*. Este radical é observado em β -caroteno, sendo padrão na região de $1450,68\text{ cm}^{-1}$. Parlog (2011) associaram a presença deste radical a pigmentos de licopeno. Em contrapartida, Órdenes-Aenishanslins e colaboradores (2016) apontam que bandas típicas entre 1200 e 1300 cm^{-1} correspondem as ligações $\text{C}-\text{C}$.

Elumalai e colaboradores (2014), ao analisar o pigmento astaxantina produzido por *Haematococcus pluvialis* identificaram o grupo funcional cetona e a presença de hidroxila, os quais descreveram corresponder aos principais grupos para identificação da astaxantina. Além disso o grupo metila e alceno podem estar relacionados aos ésteres de astaxantina, e segundo Elumalai e colaboradores (2014) o grupo metila encontrado no pico de 1385 cm^{-1} seria o responsável pela forma de guarda-chuva na cadeia alifática e anéis aromáticos em uma das formas apresentadas pela astaxantina. As bandas apresentadas pelo pigmento são ilustradas na figura 15. Estas informações fornecem dados importantes sobre o pigmento, como os principais grupos funcionais presentes em sua estrutura, porém não são suficientes para a elucidação total da molécula.

Figura 13. Espectro de infravermelho do pigmento (extrato bruto) produzido por *Amycolatopsis* sp. Espectro completo (A) e picos detalhados (B).



4.4.3 Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (GCMS)

Os resultados obtidos na cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa na tentativa de identificação das frações, apontam a existência de sete (7) picos na fração A (Figura 14). Os picos 1 e 2, foram identificados como compostos equivalentes, assim como os picos 3, 4 e 6. Dessa maneira verifica-se a existência de 4 picos distintos (1,3,5 e 7), os quais são correlacionados com compostos pertencentes a biblioteca do equipamento, conforme tabela 5.

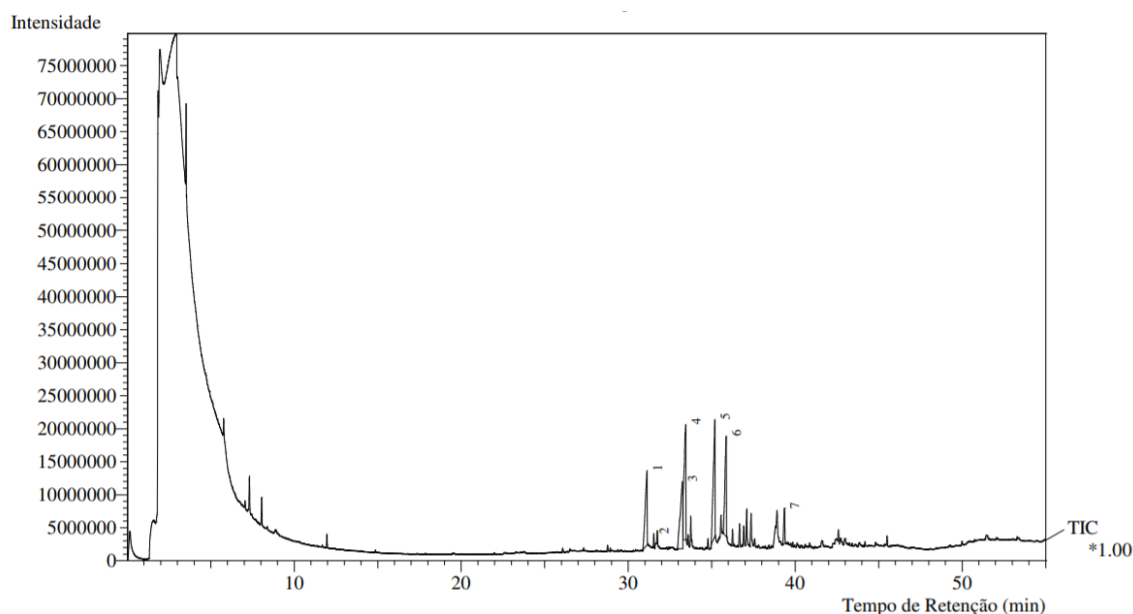
Tabela 5. Resultados dos picos cromatográficos referentes à fração A do pigmento obtido de *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422.

Pico	TR	Composto	PM	Fórmula	SI
1	31.125	Ácido Tetradecanóico	228	$C_{14}H_{28}O_2$	92
3	33.233	Ácido Pentadecanóico	242	$C_{15}H_{30}O_2$	94
5	35.183	Ácido n-Hexadecanóico	256	$C_{16}H_{32}O_2$	92
7	39.358	Ácido Octadecanóico	284	$C_{18}H_{36}O_2$	93

Os compostos identificados com alto índice de similaridade correspondem a ácidos graxos saturados de cadeia longa. O ácido Tetradecanóico (ácido mirístico), o ácido Pentadecanóico, o ácido n-hexadecanóico (ácido palmítico) e o ácido octadecanóico (ácido esteárico). A presença de ácidos graxos saturados encontrada na análise do pigmento, pode estar

relacionada a natureza química do composto ou as ligações e interações apresentadas em sua estrutura.

Figura 14. Picos apresentados pela fração A do pigmento após análise da cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas.



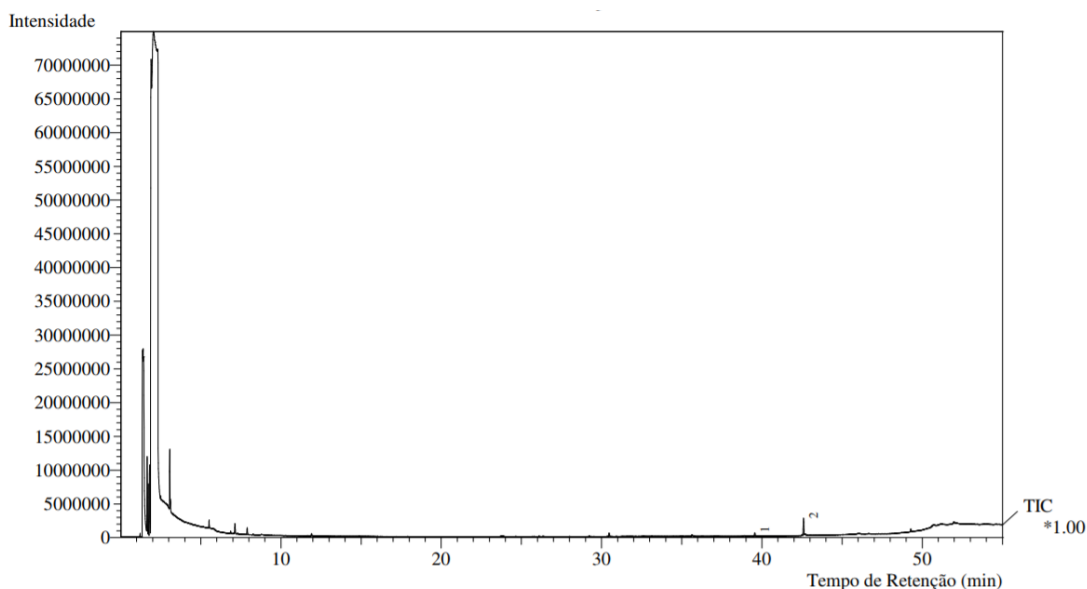
Balraj e colaboradores (2014), em análise de pigmento produzido por bactéria isolada do mar, verificaram a presença de grupo metil ester corroborando com os resultados encontrados por Weber e colaboradores (2004) os quais reportaram a identificação de um complexo de ácido graxo poli-insaturado substituído por um grupo hidroxila e um aldeído sendo apontado como um novo pigmento poliênico (Laetipórico) produzido por basidiomiceto. Elumalai e colaboradores (2014) em análise do pigmento astaxantina produzido por *Haematococcus pluvialis* por meio de cromatografia gasosa descreveram a presença de ácidos graxos poli-insaturados e saturados, sendo o ácido Hexadecanóico o de maior área em relação aos demais. Foram relatados ainda o heptadecano, nonadecano, ciclopentano, 5-octadecanol, 2-Hexadecanol e 1-Docosanol entre outros. Alguns pigmentos carotenoides podem se apresentar na sua forma livre ou em sua forma esterificada, estando ligados a grandes cadeias de ácidos graxos (GENTILI et al., 2013). Elumalai e colaboradores (2014) ao estudar a produção do pigmento astaxantina verificaram que este pode apresentar-se esterificado justificando a presença de ácidos graxos saturados ou insaturados.

Na fração B, foi observada a existência de dois (2) picos (Figura 15), os quais apresentam similaridade com alguns compostos conforme tabela 6, abaixo:

Tabela 6. Resultados dos picos cromatográficos referentes à fração B do pigmento obtido de *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422.

Pico	TR	Composto	PM	Fórmula	SI
1	39.558	Tetradecanamida	227	C ₁₄ H ₂₉ NO	93
2	42.592	9-Octadecenamida	281	C ₁₈ H ₃₅ NO	89

Figura 15. Picos apresentados pela fração B do pigmento após análise da cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas.



Haddad e colaboradores (2017), identificaram ácido 5-hexadecanóico, ácido Octadecanóico e 1,2-benzeno ácido dicarboxílico em cromatograma de pigmento carotenoide laranja, extraído de *Rhodococcus rhodochrous*.

4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Nos ensaios para a determinação da atividade antimicrobiana foram utilizadas as frações do pigmento produzido por *Amycolatopsis* sp. e os resultados obtidos estão expressos na tabela 7.

Tabela 7. Resultados da atividade antimicrobiana das frações A e B do pigmento produzido por *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422 frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Substâncias Teste (µg/mL)		Micro-organismos						
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (UFPEDA 416)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (UFPEDA 58)	<i>Propionibacterium acnes</i> (UFPEDA 187)	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFPEDA 02)	<i>Enterococcus faecalis</i> (UFPEDA 138)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (UFPEDA 396)	<i>Escherichia coli</i> (UFPEDA 224)
Fração A	CMI	>1000	>1000	>1000	250	1000	>1000	>1000
	CMB	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
Fração B	CMI	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
	CMB	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

* Valores assinalados como >1000 representam possibilidade de ação antimicrobiana acima das concentrações testadas.

As duas frações do pigmento apresentaram ação antimicrobiana. A fração do pigmento com coloração vermelha (Fração A) apresentou efeito bacteriostático frente aos micro-organismos *S. aureus* (UFPEDA 02) e *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138) com concentração mínima inibitória de 250 µg/ mL e 1000 µg/ mL respectivamente. Contudo a fração não obteve atividade frente a *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), *Staphylococcus epidermidis* (UFPEDA 58), *Propionibacterium acne* (UFPEDA 187), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396) e *Escherichia coli* (UFPEDA 224).

A fração B, entretanto, apresentou atividade frente a *Pseudomonas aeruginosa* com concentração mínima inibitória e bactericida equivalente a 1000 µg /mL, mas não apresentou atividade frente aos outros micro-organismos avaliados.

Diversos fatores podem estar relacionados a ação antimicrobiana das frações do pigmento produzido por *Amycolatopsis* sp. Dentre eles, pode-se citar a forma de interação da molécula com a parede celular do micro-organismo. Uma vez que os melhores resultados foram observados frente a micro-organismos Gram positivos a composição da parede pode estar influenciando nos resultados.

Ademais, de acordo com Suryawanshi et al., (2014), pigmentos microbianos costumam apresentar melhores resultados frente à micro-organismos Gram positivos, sendo geralmente menos efetivos quando utilizados frente a Gram negativos. Uma das hipóteses para esse comportamento é a capacidade da camada lipopolissacarídica de resistir à penetração de substâncias inibitórias (Suryawanshi et al., 2016).

Além disso, a ação antimicrobiana de pigmentos vem sendo correlacionada à capacidade destas moléculas de promover alterações na membrana celular bacteriana. Essas alterações estão, geralmente, relacionadas a alta capacidade de transporte de elétrons que pode provocar alterações no pH da célula, de modo que ao provocar estas alterações a molécula do pigmento pode lesar a célula bacteriana (HERRÁEZ et al., 2019).

A atividade da fração B frente a *Pseudomonas aeruginosa*, representa uma característica importante associada ao pigmento, dada a dificuldade de seleção de agentes ativos frente a este micro-organismo.

Yolmeh e colaboradores (2016), também encontraram melhores resultados antimicrobianos de pigmento frente a micro-organismos Gram positivos. Ao utilizar pigmento extraído de *Rhodotorula glutinis* frente a algumas bactérias, observaram a maior sensibilidade frente a *Salmonella enteritidis* (maior concentração mínima inibitória) e a concentração mínima bactericida frente a *Escherichia coli* (YOLMEH et al., 2016). Em outro estudo, Lapenda e colaboradores (2015), verificaram atividade antimicrobiana do pigmento vermelho produzido

por *Serratia marcescens* UFPEDA 398 frente a *S. aureus*, *E. faecalis* (UFPEDA 138), *S. pyogenes* (UFPEDA 07), apresentando resultado também frente a *S. aureus* resistente a oxacilina na concentração de 1 µg/mL, porém não obteve resultado frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

Herráez e colaboradores (2019), avaliaram a atividade antimicrobiana de pigmento prodigiosina extraído da bactéria *Serratia marcescens* obtendo resultados de Concentração Mínima Inibitória (CMI) frente a *S. aureus* (4 µM), *E. faecalis* (2 µM), *E. coli* (2 µM) e *P. aeruginosa* (8 µM).

O pigmento bruto laranja isolado de *Rhodococcus rhodochrous* por Haddad e colaboradores (2017), apresentou atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar (100 µL de suspensão metanólica do pigmento) para *Staphylococcus aureus* (21mm de halo de inibição) e *Candida albicans* (35 mm de halo de inibição).

Manimala e colaboradores (2014), em avaliação do potencial antimicrobiano de pigmento carotenoide extraído de *Sporobolomyces* sp. verificaram atividade do extrato do pigmento bruto (100 µl/ml) frente a *Escherichia coli* (29 mm de halo de inibição), *S. aureus* (26 mm de halo de inibição), *S. faecalis* (22 mm), *B. subtilis* (23 mm), *Enterococcus* sp (19 mm). e *Pseudomonas aeruginosa* (21 mm).

4.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante do pigmento foi determinada por meio dos ensaios de Antioxidante total, DPPH, ABTS e fenol total. De acordo com os resultados, ambas as frações do pigmento apresentam atividade antioxidante. As frações A e B apresentaram capacidade de redução de 50 % dos radicais livres (EC_{50}) na concentração de 125µg/mL no ensaio de atividade antioxidante total.

No método de DDPH a EC_{50} foi obtida na concentração de 1000 µg/mL para a Fração A e 250 µg/mL para a fração B. O maior percentual de remoção do radical ABTS foi encontrado na concentração de 500 µg/mL para a fração A e 1000 µg/mL para a fração B (Tabela 8).

Tabela 8. Resultados da atividade antioxidante e conteúdo de fenol total apresentados pelas frações A e B do pigmento produzido por *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422

Amostras	Atividade antioxidante total	DPPH	ABTS (%)	FENOL TOTAL (mgAGE/g)
	EC ₅₀	EC ₅₀		
FRAÇÃO A	125µg/mL± 0,056	1000 µg/mL± 0,27	19,7 ± 2,99	147 ± 2,35
FRAÇÃO B	125µg/m L± 0,12	250 µg/mL± 0,32	57,01± 0,66	183,6 ± 2,35

Os resultados evidenciam que as frações do pigmento apresentam atividade antioxidante, o que representa importante fator para sua aplicação biotecnológica, uma vez que componentes com ação antioxidante apresentam efeito positivo na eliminação de espécies reativas de oxigênio. As espécies reativas de oxigênio são geradas normalmente em decorrência das atividades celulares e do metabolismo do oxigênio no organismo, contudo o acúmulo dessas substâncias pode comprometer componentes celulares importantes como DNA, RNA e proteínas podendo causar dentre desordens inflamatórias, artrite, entre outros (RADHAKRISHNAN et al., 2016; LEE et al., 2014).

Além disso, a produção de compostos fenólicos pelas frações do pigmento produzido por *Amycolatopsis* sp. confirmam que o pigmento possui a capacidade de doação de H⁺ pelas frações.

Conforme Kumar e colaboradores (2015b), a capacidade antioxidante dos compostos naturais esta normalmente associada a presença de vitaminas (A, C e E), flavonoides ou outros compostos fenólicos, os quais geralmente possuem alta capacidade de doação de H⁺ ou alta capacidade de absorção de radicais livres. Além disso compostos fenólicos impedem a formação de espécies reativas de oxigênio estando a atividade antioxidante de compostos naturais atrelada a sua estrutura e distribuição de grupos funcionais.

O potencial antioxidante pode, ainda, estar relacionado ao teor de compostos fenólicos e flavonoides (os grupos hidroxila de componentes fenólicos conferem capacidade de eliminação de radicais livres a compostos orgânicos) (MANI et al., 2015), ao número de duplas ligações conjugadas ou ainda à presença de cetogrupos e anéis de ciclopentano em carotenoides (KUMAR et al., 2015b; KECALI et al., 2013).

De acordo com Zoz e colaboradores (2015) em carotenoides, quanto maior a cadeia, maiores são as propriedades antioxidantes. Carotenoides que apresentam onze ligações duplas

são comumente relacionados a melhor ação na captura de oxigênio singlete (ZAIDI et al., 2013; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2019).

Assim sendo, frequentemente para se determinar a atividade antioxidante são empregadas mais de uma técnica. O radical DPPH tem sido amplamente utilizado para investigar compostos com potencial antioxidante, capazes de promover a eliminação do radical livre estável 1,1-difenil 2-picrilhidrazil seja pela transferência de elétron ou transferência de um átomo de hidrogênio para a molécula (LEE et al., 2014).

A atividade de eliminação de radicais livres ABTS expressa a capacidade da amostra em reagir com o radical, doando-lhe um um átomo de hidrogênio. Dessa forma o radical ABTS é reduzido na presença de um agente oxidante (SHALABY et al., 2013)

No ensaio realizado com o reagente Folin Ciocalteu's busca-se estimar a quantidade total de compostos que possuem o grupo fenólico e presença da hidroxila. O reagente reage com a hidroxila do grupo fenólico formando um complexo azul que pode ser mensurado espectrofotometricamente (TAN et al., 2018).

Os antioxidantes naturais representam uma alternativa viável aos convencionais em função da sua melhor aceitação pelos consumidores (MANIMALA et al., 2014). De acordo com Zoz e colaboradores (2015), pigmentos como astaxantina, licopeno e torularodina apresentam forte atividade antioxidante.

Radhakrishnan e colaboradores (2016) observaram que a atividade antioxidante avaliada pelo método de DPPH do pigmento extraído de *Streptomyces* sp D25 extraído do deserto aumentava a medida que a concentração também aumentava sendo o percentual máximo de remoção de radicais livres alcançado de 35,63% na concentração de 500 µg/ mL. Em outro estudo, Dholakiya e colaboradores (2017), obtiveram captura de 55% dos radicais livres DPPH na concentração de 1000 µg/ mL de pigmento melanóide extraído de actinobactérias isolada de ambiente marinho, o extrato atingiu atividade máxima na concentração de 2000 µg/ mL.

Mani e colaboradores (2015), encontraram EC₅₀ na concentração de 1620 µg/ mL de pigmento produzido por *Fusarium* sp. Ainda segundo a autora a redução nos níveis de DPPH podem ser correlacionadas com o número de grupos hidrogênio disponíveis. Arivizhivendhan e colaboradores (2018), por sua vez, demonstraram atividade de captura do radical DPPH e

ABTS pelo pigmento prodigiosina (pigmento carotenóide) na concentração de até 10 µg/ mL, obtendo uma redução de cerca de 99%.

A ação antioxidante de pigmentos de origem natural abre possibilidades ao mercado de cosméticos e produtos de proteção solar, visto que a interação entre os raios ultravioleta e as estruturas celulares também promove o surgimento de EROS, a incorporação de componentes com capacidade de captura desses agentes nas formulações pode reduzir danos causados ao tecido cutâneo após exposição solar (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2019).

4.7 ENSAIO DE FITOTOXICIDADE

No ensaio de fitotoxicidade as sementes de alface (*Lactuca sativa*) demonstraram maior sensibilidade a presença do pigmento que as sementes de pepino (*Cucumis sativus*). Todavia, os menores índices de germinação (23 % e 21,18 %) só foram verificados nas concentrações mais elevadas (1000 µg/ mL) de ambas as frações A e B respectivamente. Nas sementes de pepino foi observada uma redução de 87,45% e 78,38% no índice de germinação nas frações A e B, respectivamente em relação controle. Os resultados obtidos no ensaio de fitotoxicidade estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Resultados do ensaio de fitotoxicidade das frações A e B do pigmento realizado com as sementes de Alface (*Lactuca sativa*) e Pepino (*Cucumis sativus*).

Sementes	Concentração da amostra (µg/mL)	FRAÇÃO A			FRAÇÃO B		
		Germinação relativa da raiz (%)	Comprimento relativo da raiz (%)	Índice de germinação (%)	Germinação relativa da raiz (%)	Comprimento relativo da raiz (%)	Índice de germinação (%)
Alface	1000	50,00 ± 7,86 a	46,45 ± 2,31 a	23,31 ± 4,80 a	37,04 ± 6,42 a	58,16 ± 1,30 a	21,18 ± 2,97 a
	500	50,00 ± 7,86 a	46,44 ± 1,38 a	23,17 ± 2,96 a	55,56 ± 0,00 b	63,66 ± 6,65 abc	41,92 ± 5,57 ab
	250	61,11 ± 7,86 ab	56,89 ± 4,37 ab	34,93 ± 7,14 ab	83,33 ± 7,86 c	88,67 ± 3,82 cd	73,74 ± 3,78 c
	125	66,67 ± 0,00 a	63,75 ± 6,97 abc	52,31 ± 9,22 abc	100,00 ± 0,00 c	94,28 ± 6,03 cde	88,81 ± 1,71 d
	62,5	88,89 ± 0,00 c	60,49 ± 7,39 abc	53,77 ± 6,57 bc	94,44 ± 7,86 cd	85,17 ± 3,86 cd	80,29 ± 3,04 cd
	31,25	94,44 ± 7,86 bcd	55,04 ± 1,14 b	53,48 ± 5,52 bc	88,89 ± 0,00 c	110,27 ± 2,34 e	100,03 ± 4,92 de
	15,12	88,89 ± 6,42 bcd	62,82 ± 0,49 c	46,03 ± 4,53 bc	100,00 ± 0,00 c	98,45 ± 0,62 de	103,89 ± 7,08 de
Pepino	1000	82,76 ± 7,31 abcd	19,23 ± 1,29 d	12,55 ± 1,01 a	87,93 ± 7,31 cd	24,34 ± 5,94 f	21,62 ± 7,00 ab
	500	100,00 ± 5,97 cd	25,64 ± 1,14 dc	25,24 ± 2,99 a	89,66 ± 5,97 c	37,17 ± 4,09 f	36,37 ± 4,07 ab
	250	103,45 ± 0,00 d	60,32 ± 8,10 abc	62,40 ± 8,38 bc	100,00 ± 5,97 cd	63,76 ± 6,33 abc	62,43 ± 1,56 c
	125	103,45 ± 0,00 d	69,82 ± 2,66 bc	68,71 ± 7,72 bc	96,55 ± 5,97 cd	88,86 ± 5,39 cd	73,15 ± 8,53 bcd
	62,5	96,55 ± 5,97 cd	72,99 ± 4,46 bc	71,89 ± 9,72 bcd	96,55 ± 5,97 cd	96,53 ± 2,78 d	94,19 ± 2,59 de
	31,25	96,55 ± 5,97 cd	82,47 ± 1,94 c	80,98 ± 4,13 cd	100,00 ± 5,97 cd	107,56 ± 8,89 de	105,38 ± 0,86 e
	15,12	103,45 ± 0,00 d	72,31 ± 4,74 bc	71,89 ± 9,02 bcd	100,00 ± 0,00 c	95,91 ± 7,43 cde	99,22 ± 7,68 cde

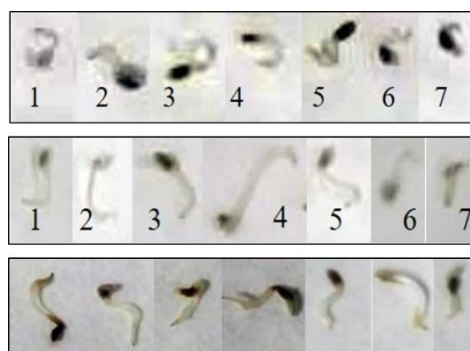
*Valores com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de intervalo de confiança ($\alpha=0,05$).

O comprimento relativo da raiz das sementes de alface apresentou uma redução de até 50% nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em relação ao controle no tratamento realizado com a fração A, enquanto na presença da fração B houve redução máxima de até 40% (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O mesmo comportamento foi observado para as sementes de pepino sendo as concentrações acima de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ as que demonstram maior redução no comprimento relativo da raiz. Da mesma maneira, o menor percentual de germinação relativa da raiz foi observado na concentração de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ das frações para as sementes de alface ($\leq 50\%$), em ambos os tratamentos. Adicionalmente, ambas as frações do pigmento não reduziram o índice de germinação relativa da raiz nas sementes de pepino, em concentrações inferiores a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

De acordo com os resultados, pode-se perceber que, de uma maneira geral, as frações do pigmento não apresentaram efeito fitotóxico sobre a germinação das sementes em concentrações inferiores a 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figuras 16 e 17) observando-se melhores resultados nas sementes do pepino. Sendo a redução dos parâmetros analisados observada apenas nas maiores concentrações testadas. Embora as sementes de alface tenham demonstrado maior redução dos índices que as sementes de pepino, esse efeito pode ser justificado pelo fato destas serem consideradas mais sensíveis a quaisquer alterações no meio.

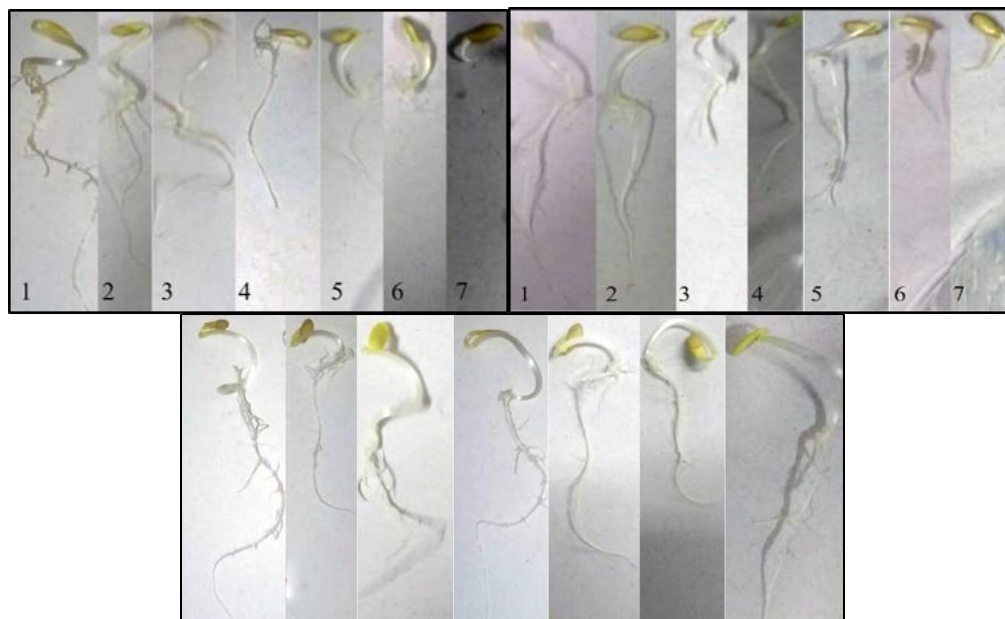
A baixa fitotoxicidade apresentada pelas frações do pigmento indica que este não é prejudicial a estes organismos vegetais, contudo análises genotóxicas complementares podem contribuir para uma verificação mais aprofundada a cerca destes efeitos.

Figura 16. Fitotoxicidade da fração A (acima) e fração B (meio) do pigmento produzido por *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422 sobre sementes de alface (*Lactuca sativa*) comparadas com o controle (abaixo).



Fonte: A autora.

Figura 17. Fitotoxicidade da fração A (a esquerda) e fração B (a direita) do pigmento produzido por *Amycolatopsis* sp. sobre sementes de pepino (*Cucumis sativus*) comparadas com o controle (abaixo).



Fonte: A autora.

Além disso, substâncias que apresentam propriedades antioxidantes são consideradas também fitoprotetoras, visto que estas ajudam a manter sob controle os níveis de espécies reativas de oxigênio, os quais podem causar danos ao vegetal quando produzidos em excesso (DE SOUSA et al., 2017).

A redução do índice de germinação das sementes em concentrações elevadas das frações pode estar relacionada a inibição de hormônios endógenos como ácido giberélico e ácido endolacético, associados ao crescimento do vegetal (IGHODARO; AGUNBIADE; AKINTOBI, 2010). Essa relação foi evidenciada em alguns pigmentos que apresentam componentes flavonoides. A redução no índice de germinação indica a ocorrência de mudanças nas reações metabólicas, o que pode significar alterações no desenvolvimento do vegetal (MERINO et al., 2018)

4.8 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

As frações do pigmento e o diluente utilizado não apresentaram citotoxicidade frente as linhagens testadas. Os resultados estão expressos na **tabela 10**.

Tabela 10. Atividade citotóxica das das frações A e B do pigmento produzido por *Amycolatopsis* sp. sobre as linhagens de células cancerígenas.

Produtos testes	% de inibição ± EPM				
	L929	Vero	HeLa	HT-29	MCF-7
Fração A – 50 µg/mL	5,22 ± 1,33	7,49 ± 1,43	1,27 ± 0,19	16,99 ± 4,65	0,00 ± 0,00
Fração B - 50 µg/mL	0,00 ± 0,00	4,49 ± 0,94	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Diluyente 10% - 0,05%	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	5,21 ± 0,90	0,00 ± 0,00
Paclitaxel - 10µg/mL	26,96 ± 1,28	59,86 ± 2,42	96,17 ± 0,62	95,63 ± 0,70	59,86 ± 2,42

EPM – erro padrão médio

Os resultados apresentados pelas frações revelam que estas são seguras quanto a utilização em linhagens celulares, não apresentando caráter tóxico frente a células normais avaliadas, bem como para linhagens tumorais. A ausência desta ação tóxica contribui de forma significativa para o delineamento de possíveis áreas de aplicação do pigmento produzido por *Amycolatopsis* sp. 3422. Abrindo possibilidades de sua utilização na indústria alimentar e de cosméticos, por exemplo, visto que este é um dos requisitos observados na incorporação de novos corantes nestes mercados, sendo necessárias ainda a realização de ensaios complementares, como genotoxicidade.

De maneira geral muitos pigmentos naturais apresentam atividade antitumoral. Srilekha et al. (2018), em estudo da avaliação da citotoxicidade de pigmento extraído de *Salinicoccus* sp. pelo método de MTT verificou ação citotóxica deste frente a linhagem celular MCF-7 com inibição de 85.36% na concentração de 125 µg/mL.

Prashanthi e colaboradores (2015), avaliaram a citotoxicidade de pigmento amarelo extraído com etanol e acetato de etila de *Streptomyces griseoaurantiacus* JUACT 01 para HeLa utilizando a mesma metodologia e verificou IC₅₀ na concentração de 1,8 µg/mL após 72h de incubação.

Em estudos realizados por Gong et al., (2018) a astaxantina e o β- caroteno não apresentaram efeito de inibição significativa de células da linhagem MCF-7. Contudo ainda segundo o autor a luteína, apresentou efeito citotóxico para essa linhagem nas concentrações de 0,5 e 1 µM, com redução da viabilidade celular para cerca de 60%, contudo esse efeito não foi apresentado para células normais. A luteína protege células da linhagem HT-29 contra estresse oxidativo promovido por Deoxynivalenol (KRISHNASWAMY; DEVARAJ; PADMA, 2010). Do mesmo modo, Rezaeeyan et al., (2017), verificou atividade antitumoral em pigmento produzido por *Kocuria* sp, para células MCF-7 com IC₅₀ de 1 mg/mL.

Ainda, Shukla e Varalakshmi (2018) verificaram a atividade citotóxica de pigmento PY3 produzido por *Pseudomonas stutzeri* sendo a viabilidade celular inversamente

proporcional a concentração e o tempo de tratamento com o pigmento, neste ensaio a viabilidade celular apresentou redução < 50% após 72h de exposição a 20µg/mL do pigmento. Apresentando IC₅₀ na concentração de 12,5 para células HeLa mas sem efeitos citotóxicos para linfócitos normais. Os autores verificaram fragmentação do DNA nas células tratadas sendo indicativo de células apoptóticas.

Os resultados apresentados pelo pigmento produzido por *Amycolatopsis* sp. 3422 são diferentes dos reportados para outros pigmentos naturais produzidos por micro-organismo, sendo estes geralmente tóxicos para linhagens tumorais.

Embora a propriedade antitumoral seja uma das mais requisitadas no mundo das biomoléculas, a não apresentação desta não chega a representar um problema para biopigmentos devido a sua ampla possibilidade de aplicação.

5 CONSIDERAÇÕES

Os resultados obtidos a cerca da produção de pigmentos por *Amycolatopsis* sp. apontam que este constitui uma alternativa promissora a produção de pigmentos naturais, sendo este processo eficiente e passível de regulação por alterações de parâmetros de condições de cultivo, como proporção de carbono/nitrogênio e rotação, resultando em uma otimização da produção deste quando utilizado meio de cultura HT com concentração de glicose ajustada para 10 g/L e concentração de triptona de 3 g/L com taxa de rotação de 150 rpm, sendo observada a produção de um pigmento vermelho. Embora não tenha sido possível realizar a identificação da espécie, *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422 demonstrou elevada capacidade de produção de pigmentos. Além disso, o pigmento vermelho produzido pelo micro-organismo apresentou duas frações bem definidas com picos de absorção na região de 535 nm (fração A de coloração vermelha) e 550 nm (fração B, violácea enegrecida), além de apresentarem sinais correspondentes aos demonstrados por outros pigmentos naturais advindos de outros micro-organismos nas análises de RMN e infravermelho, contudo os resultados obtidos ainda não são suficientes para caracterização da classe a que o pigmento pertence. Além disso, o potencial antioxidante demonstrado por ambas as frações, bem como o caráter não tóxico frente a células animais e organismos vegetais, e ação antimicrobiana, sugerem que o pigmento representa um forte candidato a aplicações na indústria alimentícia, dentre outras, sendo necessários maiores estudos sobre a aplicação deste. Desse modo, sendo a obtenção de pigmentos por vias microbianas vantajosa frente a produção de pigmentos sintéticos, e dada a viabilidade dos processos necessários para sua extração, *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422 configura uma alternativa ambientalmente correta e viável economicamente a obtenção de pigmentos naturais.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Diante dos resultados obtidos compõe perspectivas deste projeto a realização das seguintes etapas: Realização do sequenciamento do genoma completo do isolado *Amycolatopsis* sp.; Determinação do perfil de ácidos graxos de parede; Investigação do efeito da temperatura e do pH sobre o pigmento; Análise das frações por ressonância magnética nuclear (RMN); Determinação da caracterização em espectro de massa de alta resolução.

Com este estudo, espera-se obter resultados que forneçam subsídios para a otimização do processo de produção do pigmento isolado do *Amycolatopsis* sp e determinação de sua atividade biológica bem como aplicações biotecnológicas. Os resultados obtidos a partir desta pesquisa servirão para contribuir com a investigação do potencial biotecnológico dos corantes naturais em detrimento dos artificiais visando introduzir uma nova perspectiva para a comunidade científica. Adicionalmente, pretende-se realizar a divulgação dos resultados tanto em congressos nacionais como internacionais e ainda nas comunidades que fazem uso da espécie, além de publicá-los em revistas internacionais com um bom fator de impacto na área de biotecnologia.

REFERÊNCIAS

- ABEROUMAND A. A review article on edible pigments properties and sources as natural biocolorants in foodstuff and food industry. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v.6, p.71–78, 2011.
- ABRAHAM, J.; CHAUHAN, R. Evaluation of Antimicrobial Compounds from *Amycolatopsis decaplanina* JAR8 against Various Pathogens. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research** v. 28, n. 31, p. 166–171, 2014.
- AFRA, S., MAKHDOUMI, A., MATIN, M. M., & FEIZY, J. A novel red pigment from marine *Arthrobacter* sp. G20 with specific anticancer activity. **Journal of applied microbiology**, v. 123, n. 5, p. 1228-1236, 2017.
- AFSHARI, M.; SHAHIDI, F.; MORTAZAVI, S. A.; TABATABAI, F.; ES'HAGHI, Z. Investigating the influence of pH, temperature and agitation speed on yellow pigment production by *Penicillium aculeatum* ATCC 10409. **Natural Product Research**, v. 29, n. 14, p. 1300–1306, 2015.
- AGARWAL, S.K., SINGH, S.S., VERMA, S., KUMAR, S. Antifungal activity of anthraquinone derivatives from *Rheum emodi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, p. 43-46, 2000.
- ALEXANDRE, E.M.C., ARAUJO, P., DUARTE, M.F., FREITAS, V., PINTADO, M. & SARAIVA, J.A. High-pressure assisted extraction of bioactive compounds from industrial fermented fig by-product. **Journal of Food Science and Technology**, 54, 2519–2531, 2017.
- ALI, S.; NAJEEB, M.; LAGHARI, A. T.; SALAHUDDIN, M.; MAJEED, A. Production of Microbial Metabolites and Optimization of Key Factors Involving Their Hyperproduction in Batch Culture (Review). **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v. 5, n. 5, p. 80–88, 2018.
- ALLEN, S. A.; LANCTOT, A.; MCCAFFERY, J. M.; SLININGER, P. J.; LIU, Z. L.; CLARK, W.; GORSICH, S. W.; CAI, Z. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 2, 2010.
- ALLEY, M. C., SCUDIERO, D.A., MONKS, A., HURSEY, M. L., CZERWINSKI, M. J., FINE, D. L., ABBOTT, B. J., MAYO, J. G., SHOEMAKER, R. H., BOYD, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v. 48, p. 589- 601, 1988.
- ALMEIDA, L. C. DE; BAUERMEISTER, A.; REZENDE-TEIXEIRA, P.; SANTOS, E. A. DOS; MORAES, L. A. B. DE; MACHADO-NETO, J. A.; COSTA-LOTUFO, L. V. Pradimicin-IRD exhibits antineoplastic effects by inducing DNA damage in colon cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 168, n. March, p. 38–47, 2019.
- AMARAL, A. B.; SILVA, M. V., LANNES, S. C. S. Lipid oxidation in meat: mechanisms and protective factors – a review. **Food Science and Technology**, v. 38, n. suppl 1, p. 1–15, 2018.

AMIN, S., RASTOGI, R. P., SONANI, R. R., RAY, A., SHARMA, R., & MADAMWAR, D. Bioproduction and characterization of extracellular melanin-like pigment from industrially polluted metagenomic library equipped *Escherichia coli*. **Science of the Total Environment**, n. 635, p. 323-332, 2018.

ANDERSEN, D.O., WEBER, N.D., WOOD, S.G., HUGHES, B.G., MURRAY, B.K., NORTH, J.A. In vitro virucidal activity of selected anthraquinones and anthraquinone derivatives. **Antiviral Research**, v. 16, p. 185–96, 1991.

ARAI, T., MIKAMI, Y. Chromogenicity of streptomyces. **Applied microbiology**, v. 23, n. 2, p. 402-406, 1972.

ARATHI, B. P.; SOWMYA, P. R. R.; VIJAY, K.; BASKARAN, V.; LAKSHMINARAYANA, R. Metabolomics of carotenoids: The challenges and prospects - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 105–117, 2015.

ARIVIZHIVENDHAN, K. V.; MAHESH, M.; BOOPATHY, R.; SWARNALATHA, S.; REGINA MARY, R.; SEKARAN, G. Antioxidant and antimicrobial activity of bioactive prodigiosin produces from *Serratia marcescens* using agricultural waste as a substrate. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 7, p. 2661-2670, 2018.

ASNANI, A.; RYANDINI, D.; SUWANDRI. Screening of Marine Actinomycetes from Segara Anakan for Natural Pigment and Hydrolytic Activities. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 107, n. 1, p. 0–9, 2016.

ATLI, B., YAMAC, M., YILDIZ, Z. Optimization of Submerged Fermentation Conditions for Lovastatin Production by the Culinary-Medicinal Oyster Mushroom, *Pleurotus ostreatus* (Higher Basidiomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 15, n. 5, p.487–495, 2013.

AZIMI, S.; BASEI SALEHI, M.; BAHADOR, N. Isolation and Identification of *Streptomyces ramulosus* from Soil and Determination of Antimicrobial Property of its Pigment. **Modern Medical Laboratory Journal**, v. 1, n. 1, p. 36–41, 2017.

AZMAN, A.; MAWANG, C.; ABUBAKAR, S. Bacterial pigments: The bioactivities and as an alternative for therapeutic applications. **Natural Product Communications**, v. 13, n. 12, p. 1747-1754, 2018.

AZUMA, M. V. P.; Actinobactérias Com Potencial Biotecnológico Isoladas Da Região Entre-Marés Da Ilha Do Mel, PR, Brasil. **Dissertação de Mestrado**. Programa de Pós- graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. Curitiba, PR, 2011.

BALRAJ, J., PANNERSELVAM, K., JAYARAMAN, A. Isolation of pigmented marine bacteria *Exiguobacterium* sp. from peninsular region of india and a study on biological activity of purified pigment. **International Journal of Scientific E Technology Research**, v. 3, n. 3, p. 375–384, 2014.

BAOXIN, Z., XIANGJING, W., WENSHENG, Z. Optimization of fermentation medium for enhanced production of milbemycin by a mutant of *Streptomyces bingchenggensis* BC-X-1

using response surface methodology. **African Journal of Biotechnology**, v. 37, p. 7225-7235, 2011.

BARKA, E. A.; VATSA, P.; SANCHEZ, L.; GAVEAU-VAILLANT, N.; JACQUARD, C.; KLENK, H.-P.; CLEMENT, C.; OUHDOUCH, Y.; WEZEL, P. VAN. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of *Actinobacteria*. **American Society for Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 1–43, 2016.

BARON, S.S., ROWE, J.J. Antibiotic action of pyocyanin. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 20, p. 814–820, 1981.

BAUER, A. W., KIRBY, W. M. M., SHERRIS, J. C., TURCK, M., Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493–496, 1966.

BAUERMEISTER, A., CALIL, F. A., das CL PINTO, F., MEDEIROS, T. C., ALMEIDA, L. C., SILVA, L. J., MORAES, L. A., Pradimicin-IRD from *Amycolatopsis* sp. IRD-009 and its antimicrobial and cytotoxic activities. **Natural product research**, p. 1-8, 2018.

BEDNARZ, B.; KOTOWSKA, M.; PAWLIK, K. J. Multi-level regulation of coelimycin synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 3, p. 6423–6434, 2019.

BÉRDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1-26, 2005.

BHATIA, S. K.; LEE, B. R.; SATHIYANARAYANAN, G.; SONG, H. S.; KIM, J.; JEON, J. M.; KIM, J. H.; PARK, S. H.; YU, J. H.; PARK, K.; YANG, Y. H. Medium engineering for enhanced production of undecylprodigiosin antibiotic in *Streptomyces coelicolor* using oil palm biomass hydrolysate as a carbon source. **Bioresource Technology**, v. 217, p. 141–149, 2016.

BLANC, P.J., LORET, M.O., SANTERRE, A.L., PAREILLEUX, A., PROMÉ, D., PROMÉ, J.C., et al. Pigments of *Monascus*. **Journal of Food Science**, v. 59, p. 862–865, 1994.

BRAESEL, J.; CLARK, C. M.; KUNSTMAN, K. J.; EUSTÁQUIO, A. S.; GREEN, S. J.; MAIENSCHNIG, M.; MURPHY, B. T. Genome sequence of marine-derived *Streptomyces* sp strain. **American Society for Microbiology** v. 8, n. 19, p. 1–2, 2019.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. **Decreto nº 55871 que modifica o decreto nº 50.040 de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos**. 26 de Março de 1965. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/DECRETO%2BN%25C2%25BA%2B55.871%252C%2BDE%2B26%2BDE%2BMAR%25C3%2587O%2BDE%2B1965.pdf/59b8704c-52f4-481d-8baa-ac6edadf6490>. Acesso em: 14 de ago de 2019.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. Aprovação de Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares – definições, classificação e emprego. **Portaria nº 540 de 27 de outubro de 1997**. Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/PORTARIA_540_1997.pdf/3c55fd22-d503-4570-a98b-30e63d85bdad Acesso em: 30 de maio de 2018.

BÜHLER, R. M. M.; DUTRA, A. C.; VENDRUSCOLO, F.; MORITZ, D. E.; NINOW, J. L. *Monascus pigment* production in bioreactor using a co-product of biodiesel as substrate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, p. 9–13, 2013.

CAMAS, M.; SAHIN, N.; SAZAK, A.; SPRÖER, C.; KLENK, H. P. *Amycolatopsis magusensis* sp. nov., isolated from soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART4, p. 1254–1260, 2013.

CARLSOHN, M. R.; GROTH, I.; TAN, G. Y. A.; SCHÜTZE, B.; SALUZ, H. P.; MUNDER, T.; YANG, J.; WINK, J.; GOODFELLOW, M. *Amycolatopsis saalfeldensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a medieval alum slate mine. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 7, p. 1640–1646, 2007.

CARO, Y.; ANAMALE, L.; FOUILLAUD, M.; LAURENT, P.; PETIT, T.; DUFOSSE, L. Natural hydroxyanthraquinoid pigments as potent food grade colorants: an overview. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 2, n. 5, p. 174–193, 2012.

CARRO, L., NOUIOUI, I., SANGAL, V., MEIER-KOLTHOFF, J. P., TRUJILLO, M. E., and MONTERO-CALASANZ, M., Del, C., et al. Genome-based classification of micromonosporae with a focus on their biotechnological and ecological potential. **Scientific Reports**, v.8, p.525, 2018.

CAZOTO, L.L., MARTINS, D., RIBEIRO, M.G., DURAN, N. and NAKAZATO, G. Antibacterial activity of violacein against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **J Antibiot** 64, 395-397, 2011.

CHO, K. S., SHIN, M., KIM, S., & LEE, S. B. Recent advances in studies on the therapeutic potential of dietary carotenoids in neurodegenerative diseases. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, p. 1-12, 2018.

CHUN, J.; KIMT, B.; KYUNG, Y.; SEONGT, C.; LEE, D.; BAE, K. S.; LEE, K.; KANG, S.; HAHN, Y. C.; GOODFELLOW, M. *Amycolatopsis thermoflava*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 1 999, p. 1369–1373, 1999.

CLAUDITZ, A., RESCH, A., WIELAND, K.P., PESCHEL, A., GÖTZ, F. Staphyloxanthin plays a role in the fitness of *Staphylococcus aureus* and its ability to cope with oxidative stress. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 4950–4953, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 27th Edition. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA. 2017.

CUNHA, I. G. B; SOBRINHO, T. J. S. P.; SILVA, R. D.; AMORIM, E. D.; ARAUJO, J. D. Influência do meio de cultura na produção de metabólitos bioativos do endófito *Streptomyces* sp. EBR49-A UFPEDA. **Rev. Bras. Farm**, v. 90, n. 2, p. 120-123, 2009.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.

DASTAGER, S. G., Li, W. J., DAYANAND, A., Tang, S. K., TIAN, X. P., ZHI, X. Y., & JIANG, C. L.. Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*. **African journal of biotechnology**, v. 5, n. 11, 2006.

DE SOUSA, A. et al. Metalaxyl effects on antioxidant defenses in leaves and roots of *Solanum nigrum* L. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. November, p. 1–13, 2017.

DEORUKHKAR, A.A., CHANDER, R., GHOSH, S.B., SAINIS, K.B. Identification of a red-pigmented bacterium producing a potent antitumor N- alkylated prodigiosin as *Serratia marcescens*. **Research in Microbiology**. v. 158 p. 399–404, 2007.

DHAKAL, D.; POKHREL, A. R.; SHRESTHA, B.; SOHNG, J. K. Marine rare actinobacteria: Isolation, characterization, and strategies for harnessing bioactive compounds. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

DHARMARAJ, S., ASHOKKUMAR, B., DHEVENDARAN, K. Fermentative production of carotenoids from marine actinomycetes. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 1, p. 36–41, 2009.

DHAWAN, S., LAL, R., HANSPAL, M., & KUHAD, R. C. Effect of antibiotics on growth and laccase production from *Cyathus bulleri* and *Pycnoporus cinnabarinus*. **Bioresource technology**, v. 96, n.12, 1415-1418, 2005.

DHOLAKIYA, R. N.; KUMAR, R.; MISHRA, A.; MODY, K. H.; JHA, B. Antibacterial and antioxidant activities of novel actinobacteria strain isolated from Gulf of Khambhat, Gujarat. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. DEC, p. 1–16, 2017.

DI MASCIO, P., KAISER, S., SIES, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.274, p. 532–538, 1989.

DING, L.; HIROSE, T.; YOKOTA, A. *Amycolatopsis echigonensis* sp. nov. and *Amycolatopsis niigatensis* sp. nov., novel actinomycetes isolated from a filtration substrate. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 8, p. 1747–1751, 2007.

DING, T.; YANG, L.-J.; ZHANG, W.-D.; SHEN, Y.-H. The secondary metabolites of rare actinomycetes: chemistry and bioactivity. **RSC Advances**, v. 9, n. 38, p. 21964–21988, 2019.

DORNELAS, J. C. M., ABREU, C. S., FIGUEIREDO, J. E. F., MARRIEL, I. Characterization and phylogenetic affiliation of Actinobacteria from tropical soils with potential uses for agro-industrial processes. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, 2017.

DUFOSSE L. Microbial production of food grade pigments. **Food Technol Biotechnol**. v. 44 p.313–323., 2006.

DUFOSSÉ, L. **Current and potential natural pigments from microorganisms (bacteria, yeasts, fungi, microalgae).** Handbook on natural pigments in food and beverages: industrial applications for improving food color. Cambridge: Woodhead Publishing, p. 337-52, 2016.

DUFOSSÉ, L. **Current carotenoid production using microorganisms.** In: SINGH, O.V., editor Bio-pigmentation and Biotechnological Implementations, 1st ed. Hoboken, NJ: John Wiley E Sons, p. 87–106, 2017.

DUFOSSÉ, L. **Microbial Pigments From Bacteria, Yeasts, Fungi, and Microalgae for the Food and Feed Industries.** In: Grumezescu A M, Holban AM, editors. Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes. Handbook of Food Bioengineering, Vol. 7. Amsterdam: Elsevier p. 113–32, 2018.

DUFOSSÉ, L. Pigments, **Microbial Encyclopedia of Microbiology**, San Diego, CA: Elsevier, p. 457–471, 2009.

DUFOSSÉ, L. Red colourants from filamentous fungi: are they ready for the food industry? **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 69, p. 156–161, 2017.

DUFOSSÉ, L., GALAUP, P., YARON, A., ARAD, S.M., BLANC, P., MURTHY, K.N.C., et al. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p. 389–406, 2005.

DURAN, M., PONEZI, A.N., FALJONI-ALARIO, A., TEIXEIRA, M.F., JUSTO, G.J., DURAN N. Potential applications of violacein: a microbial pigment. **Medicinal Chemistry Research**, v. 21, p. 1524–1532, 2012.

DURÁN, N., TEIXEIRA, M. F., De CONTI, R., & ESPOSITO, E. Ecological-friendly pigments from fungi. **Critical reviews in food science and nutrition**, 42: 53-66, 2002.

EL-NAGGAR, N. El-Ahmady.; EL-EWASY, S. M. Bioproduction, characterization, anticancer and antioxidant activities of extracellular melanin pigment produced by newly isolated microbial cell factories *Streptomyces glaucescens* NEAE-H. **Scientific reports**, v. 7, p. 1-19, 2017.

ELUMALAI, S., SANTHOSE, B., KANNA, RAJESH G. Extraction of carotenoid and thin layer chromatography (TLC), GC-MS, FT-IR and HPLC analysis of pharmaceutically important pigment astaxanthin from a new strain of *Haematococcus pluvialis*. **Weekly Science Research Journal**, v.2(8), p.2321-7871, 2014.

EMBLEY T. M.; STACKEBRANDT E. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. **Ann Rev Microbiol** 48: 257-289, 1994.

EVEREST, G. J.; MEYERS, P. R. Evaluation of the antibiotic biosynthetic potential of the genus *Amycolatopsis* and description of *Amycolatopsis circi* sp. nov., *Amycolatopsis equina* sp. nov. and *Amycolatopsis hippodromi* sp. nov. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 2, p. 300–311, 2011.

FEHER, D., BARLOW, R.S., LORENZO, P.S., HEMSCHEIDT, T. A 2-substituted prodiginine, 2-(p-hydroxybenzyl) prodigiosin, from *Pseudoalteromonas rubra*. **Journal of Natural Products**, v. 71 p, 1970–1972, 2008.

FLARDH K.; BUTTNER M. J. Streptomyces morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. **Nat Rev Microbiol** 7: 36-49, 2009.

GAO, H.; MURUGESAN, B.; HOSSBACH, J.; EVANS, S. K.; STARK, W. M.; SMITH, M. C. M. Integrating vectors for genetic studies in the rare Actinomycete *Amycolatopsis marina*. **BMC Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2019.

GAO, J.M., YANG, S.X., QIN, J.C. Azaphilones: chemistry and biology. **Chemical Reviews**, v. 113, p. 4755–4811, 2013.

GENTILI, A.; CARETTI, F.; BELLANTE, S.; VENTURA, S.; CANEPARI, S.; CURINI, R. Comprehensive profiling of carotenoids and fat-soluble vitamins in milk from different animal species by LC-DAD-MS/MS hyphenation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 8, p. 1628–1639, 2013.

GEORGE, Y. L.; NIZET, V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. **Trends Microbiology** v. 17, p. 406–413, 2009.

GIOVANNUCCI, E., RIMM, E.B., LIU, Y., STAMPFER, M.J., WILLETT, W.C. A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, p. 391–398, 2002.

GOODFELLOW M.; CROSS T. Classification. In GOODFELLOW M, WILLIAMS ST and MORDARSKI M. (eds.), **The Biology of the Actinomycetes**, Academic Press, Londres. p. 7-164, 1984.

GOODFELLOW, M., KÄMPFER, P., BUSSE, H. J., TRUJILLO, M. E., SUZUKI, K. I., LUDWIG, W., WHITMAN, W. B. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Five The Actinobacteria, Part A**. Springer New York, 2012.

GONG, X., SMITH, J., SWANSON, H., RUBIN, L. Carotenoid lutein selectively inhibits breast cancer cell growth and potentiates the effect of chemotherapeutic agents through ROS-mediated mechanisms. **Molecules**, v. 23 n.4, p. 905, 2018.

GORDON, R. E., BARNETT, D. A., HANDERHAN, J. E., PANG, C. H. *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica* and the nocardin strain. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 24, p. 54-63, 1974.

GORDON, R. E., MIHM, J. M. The type species of the genus *Nocardia*. **Journal of General Microbiology**, v. 27, p.1-10, 1962.

GROTH, I.; TAN, G. Y. A.; GONZÁLEZ, J. M.; LAIZ, L.; CARLSOHN, M. R.; SCHÜTZE, B.; WINK, J.; GOODFELLOW, M. *Amycolatopsis nigrescens* sp. nov., an actinomycete isolated from a Roman catacomb. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 513–519, 2007.

- GUO, J.; RAO, Z.; YANG, T.; MAN, Z.; XU, M.; ZHANG, X. High-level production of melanin by a novel isolate of *Streptomyces kathirae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 357, n. 1, p. 85–91, 2014.
- GÜRSES, A., AÇIKYILDIZ, M., GÜNES, K., GÜRSES, M. S., Dyes and Pigments: Their Structure and Properties In: **SpringerBriefs in Molecular Science**. Springer, p. 13-28, 2016.
- HADDAD, MAHDIEH; AGHAEI, S.; ZARGAR, M. Antimicrobial and Antioxidant Activity of Carotenoid Pigment Produced by Native *Rhodococcus* spp. Isolated From Soil. **International Journal of Molecular and Clinical Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 809–816, 2017.
- HAMEDI, J., POORINMOHAMMAD, N., & PAPIRAN, R. Growth and Life Cycle of Actinobacteria. In **Biology and Biotechnology of Actinobacteria** (pp. 29-50). Springer, Cham, 2017.
- HAMMOND, R.K., WHITE, D.C. Inhibition of carotenoid hydroxylation in *Staphylococcus aureus* by mixed-function oxidase inhibitors. **Journal of Bacteriology**, 1970.
- HEER, K.; SHARMA, S. Microbial pigments as a natural color: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 8, n. 5, p. 1913, 2017.
- HEIDER, S. A., PETERS-WENDISCH, P., WENDISCH, V. F., BEEKWILDER, J., BRAUTASET, T. Metabolic engineering for the microbial production of carotenoids and related products with a focus on the rare C50 carotenoids. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 10, p. 4355-4368, 2014.
- HENRÍQUEZ, V., ESCOBAR, C., GALARZA, J., GIMPEL, J. Carotenoids in Microalgae. **Subcellular Biochemistry**, n. 79, p. 219-237, 2016.
- HEO, Y. M.; KIM, K.; KWON, S. L.; NA, J.; LEE, H.; JANG, S.; KIM, C. H.; JUNG, J.; KIM, J. J. Investigation of filamentous fungi producing safe, functional water-soluble pigments. **Mycobiology**, v. 46, n. 3, p. 269–277, 2018.
- HERRÁEZ, R.; MUR, A.; MERLOS, A.; VIÑAS, M.; VINUESA, T. Using prodigiosin against some gram-positive and gram-negative bacteria and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 25, p. 1-8, 2019.
- HOEFLER, B. C., STUBBENDIECK, R. M., JOSYULA, N. K., MOISAN, S. M., SCHULZE, E. M., & STRAIGHT, P. D. A link between linearmycin biosynthesis and extracellular vesicle genesis connects specialized metabolism and bacterial membrane physiology. **Cell chemical biology**, v. 24, n. 10, p. 1238-1249. e7, 2017.
- HONG, M.Y., SEERAM, N.P., ZHANG, Y., HEBER, D. Anticancer effects of Chinese red yeast rice versus monacolin K alone on colon cancer cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 19, p. 448–458, 2008.
- HSU, L.C., HSU, Y.W., LIANG, Y.H., KUO, Y.H., PAN, T.M. Antitumor and antiinflammatory properties of ankaflavin and monaphilone A from *Monascus purpureus* NTU 568. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 59, p. 1124–1130, 2011.

HUANG, J. R.; MING, H.; LI, S.; ZHAO, Z. L.; MENG, X. L.; ZHANG, J. X.; TANG, Z.; LI, W. J.; NIE, G. X. *Amycolatopsis xuchangensis* sp. nov. and *Amycolatopsis jiguanensis* sp. nov., isolated from soil. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 109, n. 11, p. 1423–1431, 2016.

IGHODARO, O. M.; AGUNBIADE, S. O.; AKINTOBI, O. Phytotoxic and anti-microbial activities of flavonoids in *Ocimum gratissimum*. **Life Science Journal**, v. 7, n. 3, p. 45–48, 2010.

IZUTA, S.; KOSAKA, S.; KAWAI, M.; MIYANO, R.; MATSUO, H.; MATSUMOTO, A.; NONAKA, K.; TAKAHASHI, Y.; OMURA, S.; NAKASHIMA, T. Dipyrimicin A and B, microbial compounds isolated from *Amycolatopsis* sp. K16-0194. **Journal of Antibiotics**, v. 71, n. 5, p. 535–537, 2018.

JAFARI, A. R., SARRAFZADEH, M. H., ALEMZADEH, I., VOSOUGHI, M. Effect of stirrer speed and aeration rate on the production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*. **Journal of Biological Sciences**, v.7, p.270–275, 2007.

JAMJAN, W.; SURIYACHADKUN, C.; TANASUPAWAT, S.; SAKAI, K.; TASHIRO, Y.; OKUGAWA, Y.; TONGPIM, S. *Amycolatopsis silviterrae* sp. nov., isolated from forest soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 5, p. 1455–1460, 2018.

JANARDHAN, A., KUMAR, A. P., VISWANATH, B., SAIGOPAL, D. V., NARASIMHA, G. Production of bioactive compounds by Actinomycetes and their antioxidant properties. **Biotechnology Research Internacional**, v.2014, 2014.

JANI, C. TOCHEVA, E. I., MCAULEY, S., CRANEY, A., JENSEN, G. J., & NODWELL, J. *Streptomyces*: a screening tool for bacterial cell division inhibitors. **Journal of biomolecular screening**, v. 20, n. 2, p. 275-284, 2015.

JONES, K. L. Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characterstic. **Journal of Bacteriology**, v. 57, p.141-145, 1949.

KAMARUDHEEN, N.; NAUSHAD, T.; RAO, K. V. B. Biosynthesis, characterization and antagonistic applications of extracellular melanin pigment from marine *Nocardiopsis* sps. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 53, n. 2, p. 112–20, 2019.

KECELI, T. M.; ERGINKAYA, Z.; TURKKAN, E.; KAYA, U. Antioxidant and antibacterial effects of carotenoids extracted from *Rhodotorula glutinis* strains. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 42–46, 2013.

KHEIRALLA, Z. H.; HEWEDY, M. A.; MOHAMMED, H. R.; DARWESH, O. M. Isolation of pigment producing actinomycetes from rhizosphere soil and application it in textiles dyeing. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 7, n. 5, p. 2128–2136, 2016.

KIM, H.S., HAYASHI, M., SHIBATA, Y. Cycloprodigiosin hydrochloride obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans* is a potent antimalarial agent. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, p. 532–534, 1999.

KLYKLEUNG, N.; TANASUPAWAT, S.; PITTAYAKHAJONWUT, P.; OHKUMA, M.; KUDO, T. *Amycolatopsis stemonae* sp. nov., isolated from a Thai medicinal plant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 3894–3899, 2015.

KOT, A. M., BŁAZEJAK, S., KURCZ, A., GIENTKA, I., KIELISZEK, M. *Rhodotorula glutinis*—potential source of lipids, carotenoids, and enzymes for use in industries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 6103–6117, 2016.

KRISHNASWAMY, R.; DEVARAJ, S.N.; PADMA, V.V. Lutein protects HT-29 cells against Deoxynivalenol-induced oxidative stress and apoptosis: Prevention of NF-kappaB nuclear localization and down regulation of NF-kappaB and Cyclo-Oxygenase-2 expression. **Free Radic. Biol. Med.** v.49, p.50–60, 2010.

KUMAR, A.; SHANKAR VISHWAKARMA, H.; SINGH, J.; KUMAR, M. Microbial pigments: production and their applications in various industries. **International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 2015, n. 1, p. 203–212, 2015a.

KUMAR, C.G., MONGOLLA, P., CHANDRASEKHAR, C., POORNACHANDRA, Y., SIVA, B., BABU, K. S., RAMAKRISHNA, K.V.S. Anti-proliferative and antioxidant activities of 1-methoxy-3-methyl-8-hydroxy-anthraquinone, a hydroxyanthraquinoid extrolite produced by *Amycolatopsis thermoflava* strain SFMA-103. **Microbiology and Biotechnology Letters**, v. 45, p. 200–208, 2017.

KUMAR, Y.; YADAV, D. N.; AHMAD, T.; NARSAIAH, K. Recent trends in the use of natural antioxidants for meat and meat products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 6, p. 796–812, 2015b.

KUMARI, R., SINGH, P., LAL, R. Genetics and genomics of the genus *Amycolatopsis*. **Indian Journal of Microbiology**, v.3, p. 233–246, 2016.

KUSHWAHA, K., SAXENA, J., TRIPATHI, B. K., AGARWAL, M. K. Detection of carotenoids in psychrotrophic bacteria by spectroscopic approach. **Journal of BioScience and Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 253–260, 2014.

LABEDA, D. P.; DONAHUE, J. M., WILLIAMS, N. M., SELLS, S. F., HENTON, M. M. *Amycolatopsis kentuckyensis* sp. nov., *Amycolatopsis lexingtonensis* sp. nov. and *Amycolatopsis pretoriensis* sp. nov., isolated from equine placentas. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1601–1605, 2003.

LAGASHETTI, A. C., DUFOSSÉ, L., SINGH, S. K., & SINGH, P. N. Fungal pigments and their prospects in different industries. **Microorganisms**, 7(12), 604, 2019.

LAPENDA, J. C.; SILVA, P. A.; VICALVI, M. C.; SENA, K. X. F. R.; NASCIMENTO, S. C. Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 399–406, 2015.

LAZARO J. E., NITCHEU J., PREDICALA R.Z., MANGALINDAN G. C., NESSLANY F., MARZIN, D., et al. Heptyl prodigiosin, a bacterial metabolite, is antimalarial in vivo and non-mutagenic in vitro. **Journal of Natural Toxins**, v. 11 p, 367–377, 2002.

LECHEVALIER H. A, LECHEVALIER M. P. Biology of actinomycetes. **Ann Rev Microbiol** 21:71-100, 1967.

LECHEVALIER, M. P.; PRAUSER, H.; LABEDA, D. P.; RUAN, J.-S. Two New Genera of Nocardioform Actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 29–37, 1986.

LEE, D. R.; LEE, S. K.; CHOI, B. K.; CHENG, J.; LEE, Y. S.; YANG, S. H.; SUH, J. W. Antioxidant activity and free radical scavenging activities of *Streptomyces* sp. strain MJM 10778. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 12, p. 962–967, 2014.

LEE, S. D. *Amycolatopsis jejuensis* sp. nov. and *Amycolatopsis halotolerans* sp. nov., novel actinomycetes isolated from a natural cave. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 56, n. 3, p. 549-553, 2006.

LEE, S. D. *Amycolatopsis ultiminotia* sp. nov., isolated from rhizosphere soil, and emended description of the genus *Amycolatopsis*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1401–1404, 2009.

LEE, S. D.; HAH, Y. C. *Amycolatopsis albidoflavus* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 645–650, 2001.

LEWIN, G. R., CARLOS, C., CHEVRETTE, M. G., HORN, H. A., MCDONALD, B. R., STANKEY, R. J., ... & CURRIE, C. R. Evolution and ecology of Actinobacteria and their bioenergy applications. **Annual review of microbiology**, v. 70, p. 235-254, 2016.

LI, D., LIU, J., WANG, X., KONG, D., DU, W., LI, H., ... & ZHAO, K. Biological Potential and Mechanism of Prodigiosin from *Serratia marcescens* subsp. *lawsoniana* in human choriocarcinoma and prostate cancer cell lines. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, n. 11,p. 1-21, 2018.

LIU, R., CUI, C.B., DUAN, L., GU, Q.Q., ZHU, W.M. Potentin Vitro anticancer activity of metacycloprodigiosin and undecylprodigiosin from a sponge-derived actinomycete *Saccharopolyspora* sp. nov. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, p. 1341–1344, 2005.

LIZANO-FALLAS, V.; MASÍS-MORA, M.; ESPINOZA-VILLALOBOS, D.; LIZANO-BRENES, M.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E. Removal of pesticides and ecotoxicological changes during the simultaneous treatment of triazines and chlorpyrifos in biomixtures. **Chemosphere**, v. 182, p. 106–113, 2017.

LOPES, S.C.P., BLANCO, Y.C., JUSTO, G.Z., NOGUEIRA, P.A., RODRIGUES, F.L.S, et al. Violacein extracted from *Chromobacterium violaceum* inhibits Plasmodium growth in vitro and in vivo. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 2149–2152, 2009.

LORQUIN J.; MOLOUBA F.; DREYFUS, B. L. Identification of the carotenoid pigment canthaxanthin from photosynthetic *Bradyrhizobium* strains. **Applied Environmental Microbiology** v. 63 p.1151–4, 1997.

LUDWIG, W., EUZÉBY, J., SCHUMANN, P., BUSSE, H. J., TRUJILLO, M. E., KÄMPFER, P., WHITMAN, W. B. **Road map of the phylum Actinobacteria**. In: Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. Springer New York, p.1-28, 2012.
LUKEŽIČ, T. et al. Engineering Atypical Tetracycline Formation in *Amycolatopsis sulphurea* for the Production of Modified Chelocardin Antibiotics. **ACS Chemical Biology**, v. 14, n. 3, p. 468–477, 2019.

LV, J.; ZHANG, B. B.; LIU, X. D.; ZHANG, C.; CHEN, L.; XU, G. R.; CHEUNG, P. C. K. Enhanced production of natural yellow pigments from *Monascus purpureus* by liquid culture: The relationship between fermentation conditions and mycelial morphology. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 124, n. 4, p. 452–458, 2017.

MANI, V. M.; SHANMUGA PRIYA, M.; DHAYLINI, S.; PREETHI, K. Antioxidant and Antimicrobial Evaluation of Bioactive Pigment from *Fusarium* sp Isolated from Stressed Environment. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, v. 4, n. 6, p. 1147–1158, 2015.

MANIKKAM, R.; VENUGOPAL, G.; RAMASAMY, B.; KUMAR, V. Effect of critical medium components and culture conditions on antitubercular pigment production from novel *Streptomyces* sp D25 isolated from Thar desert, Rajasthan. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 6, p. 015–019, 2015.

MANIKPRABHU, D., LINGAPPA, K. Synthesis of silver nanoparticles using the *Streptomyces coelicolor* klmp33 pigment: an antimicrobial agent against extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli*. **Materials Science and Engineering**, v. 45, p. 434-437, 2014.

MANIMALA, M. R. A.; MURUGESAN, R. In vitro antioxidant and antimicrobial activity of carotenoid pigment extracted from *Sporobolomyces* sp. isolated from natural source. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 6, n. 2, p. 649–653, 2014.

MANIVASAGAN, P., VENKATESAN, J., SIVAKUMAR, K., E KIM, S. K. Actinobacterial melanins: current status and perspective for the future. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 10, p. 1737-1750, 2013.

MANIVASAGAN, P.; BHARATHIRAJA, S.; SANTHA MOORTHY, M.; MONDAL, S.; SEO, H.; DAE LEE, K.; OH, J. Marine natural pigments as potential sources for therapeutic applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 745–761, 2018.

MANJUNATH J. S.; GEETHALEKSHMIAND, P. R.; MINI, C. Natural pigments as potential food colourants: a review. **Trends in Biosciences**, v. 10, n. 21, p. 4057-4064, 2017.

MANTECA A.; SANCHEZ J. *Streptomyces* developmental cycle and secondary metabolite production. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology** 1: 560-566, 2010.

MATZ, C., DEINES, P., BOENIGK, J., ARNDT, H., EBERL, L., KJELLEBERG, S., et al. Impact of violacein producing bacteria on survival and feeding of bacteriovorans nanoflagellates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1593–1599, 2004.

MEIDUTE, S.; DEMOLING, F.; BÅÅTH, E. Antagonistic and synergistic effects of fungal and bacterial growth in soil after adding different carbon and nitrogen sources. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2334–2343, 2008.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J.; STINCO, C. M.; MAPELLI-BRAHM, P. Skin carotenoids in public health and nutricosmetics: The emerging roles and applications of the UV radiation-absorbing colourless carotenoids phytoene and phytofluene. **Nutrients**, v. 11, p. 1-41, 2019.

MENG, J.; QIN, S.; ZHANG, L.; YANG, L. Designing of a novel gold nanodumbbells SERS substrate for detection of prohibited colorants in drinks. **Applied Surface Science**, v. 366, p. 181–186, 2016.

METWALLY, R. A.; EL-SERSY, N. A.; SIKAILY, A. EL; GHOZLAN, H. A.; SABRY, S. A. Statistical optimization and characterization of prodigiosin from a marine *Serratia rubidaea* RAM-Alex. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 11, n. 3, p. 1259–1266, 2017.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55–63, 1983.

MUSSAGY, C. U.; WINTERBURN, J.; SANTOS-EBINUMA, V. C.; PEREIRA, J. F. B. Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 3, p. 1095–1114, 2019.

NAGENDRAPPA, G. Sir William Henry Perkin: the man and his ‘mauve’. **Resonance**, v. 15, n. 9, p. 779-793, 2010.

NARSING RAO, M. P.; XIAO, M.; LI, W.-J. Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications. **Frontiers in microbiology**, v. 8, n.e, p. 1-13, 2017.

NEHA, T.; SHISHIR, T.; ASHUTOSH, D. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) profiling of red pigment produced by *Bacillus subtilis* PD5. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 27, p. 1507–1512, 2017.

NEMATOLLAHI, A., AMINIMOGHADAMFAROUJ, N., WIART, C. Reviews on 1, 4-naphthoquinones from *Diospyros* L. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 14, p. 80–88, 2012.

NIGAM, P. S.; LUKE, J. S.; Food additives: production of microbial pigments and their antioxidant properties. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 93-100, 2016.

NOGUEIRA, M., ENFISSI, E. M., VALENZUELA, M. E. M., MENARD, G. N., DRILLER, R. L., EASTMOND, P. J., ... E FRASER, P. D. Engineering of tomato for the sustainable production of ketocarotenoids and its evaluation in aquaculture feed. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 41, p. 10876-10881, 2017.

NOUIOUI, I.; CARRO, L.; GARCÍA-LÓPEZ, M.; MEIER-KOLTHOFF, J. P.; WOYKE, T.; KYRPIDES, N. C.; PUKALL, R.; KLENK, H. P.; GOODFELLOW, M.; GÖKER, M. Genome-based taxonomic classification of the phylum actinobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 1–119, 2018.

OLESEN, I., ALFNES, F., RØRA, M. B., E KOLSTAD, K. Eliciting consumers' willingness to pay for organic and welfare-labelled salmon in a non-hypothetical choice experiment. **Livestock Science**, v. 127, n. 2, p. 218-226, 2010.

ÓRDENES-AENISHANSLINS, N.; ANZIANI-OSTUNI, G.; VARGAS-REYES, M.; ALARCÓN, J.; TELLO, A.; PÉREZ-DONOSO, J. M. Pigments from UV-resistant Antarctic bacteria as photosensitizers in Dye Sensitized Solar Cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 162, p. 707–714, 2016.

OREN, A. Correction of the name *Amycolatopsis albidoflavus* to *Amycolatopsis albidiflava* corrig. Request for an opinion. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4284, 2017.

OROZCO, S. F. B., KILIKIAN, B. V. Effect of pH on citrinin and red pigments production by *Monascus purpureus* CCT3802. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.263–268, 2008.

PADMAPRIYA, C., MURUGESAN, R. Characterization of methanolic extract of red pigment from *Penicillium purpurogenum* and its antioxidant activity. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 10, p. 1505–1511, 2016.

PANDEY B.; GHIMIRE P.; AGRAWAL V. P. **Studies on the antibacterial activity of the actinomycetes isolated from the Khumbu Region of Nepal**. In Programme and Abstract Book for the International Conference on the Great Himalayas: Climate, Health, Ecology, Management and Conservation, Tripureswore, Kathamandu, p. 12-15, 2004.

PARLOG, R. M., **Metabolomic studies applied on different seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties**. Tese (Doutorado), Wageningen University, Holanda, 2011.

PARMAR, R. S.; SINGH, C. A comprehensive study of eco-friendly natural pigment and its applications. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 13, n. November 2017, p. 22–26, 2018.

PATIL, S., SIVANANDHAN, G., THAKARE, D. Effect of physical and chemical parameters on the production of Red exopigment from *Penicillium purpurogenum* isolated from spoilt onion and study of its antimicrobial activity. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, p.599–609, 2015.

PENG, G.; XIONG, D. SEN; LI, L. C.; HU, J. Y.; BAO, S.; CHEN, Y. W.; LI, Y. Q.; XU, L. H.; MIAO, C. P.; ZHAO, L. X. *Amycolatopsis panacis* sp. nov., isolated from *Panax notoginseng* rhizospheric soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 567–571, 2019.

PITLOVANCIV, A.; CARIS, M.; PORTO, L. Condições de cultivo e produção de pigmentos

por *Chromobacterium violaceum*. **Biotemas**, v. 19, n. 1, p. 13–18, 2006.

POWERS, H.J. Riboflavin (vitamin B-2) and health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.77, p.1352–1360, 2003.

PRATHUMPAI, W., PHIMMAKONG, K., SRIKITIKULCHAI, P., WONGSA, P. Kinetic study of naphthoquinone and key metabolite production of *C. unilateralis* BCC1869. **Thailand Journal of Biotechnology**, v.7, p. 39–43, 2006.

PRASHANTHI, K., SURYAN, S., VARALAKSHMI, K. N. In vitro Anticancer Property of Yellow Pigment from *Streptomyces griseoaurantiacus* JUACT 01. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n.6, p. 869-876, 2015.

RADHAKRISHNAN, M.; GOPIKRISHNAN, V.; VIJAYALAKSHMI, G.; KUMAR, V. In vitro antioxidant activity and antimicrobial activity against biofilm forming bacteria by the pigment from Desert soil *Streptomyces* sp D25. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 6, p. 148–150, 2016.

RAJAGOPAL, L., SUNDARI, C.S., BALASUBRAMANIAN, D., SONTI, R.V. The bacterial pigment Xanthomonadin offers protection against photodamage. **FEBS Letters**, v. 415, p.125–128, 1997.

RAJU, R., PIGGOTT, A. M., BARRIENTOS DIAZ, L. X., KHALIL, Z., E CAPON, R. J. Heronapyrroles A– C: Farnesylated 2-Nitropyrroles from an Australian Marine-Derived *Streptomyces* sp. **Organic letters**, v. 12, n. 22, p. 5158-5161, 2010.

RAMIREZ, I., NUNEZ, M.L., VALDIVIA, R. Increased astaxanthin production by a *Phaffia rhodozyma* mutant grown on date juice from *Yucca fillifera*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p.187–190, 2000.

RAMONEDA, B.M. Caracterização y Purificación de um principio Activo de Origen Bacteriano com actividade antitumoral. **Tese (Doutorado em farmacia)**, Universidade de Barcelona. Barcelona, 2000.

RAO, N., PRABHU, M., XIAO, M., E LI, W. J. Fungal and bacterial pigments: Secondary metabolites with wide applications. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1113, 2017.

REIS, J. F., MONTEIRO, V. V. S., de SOUZA GOMES, R., do CARMO, M. M., da COSTA, G. V., RIBERA, P. C., & MONTEIRO, M. C. Action mechanism and cardiovascular effect of anthocyanins: a systematic review of animal and human studies. **Journal of translational medicine**, v.14 n. 1, p. 1-16, 2016.

REZAEYAN, Z., SAFARPOUR, A., AMOOZEGAR, M. A., BABAVALLIAN, H., TEBYANIAN, H., & SHAKERI, F. High carotenoid production by a halotolerant bacterium, *Kocuria* sp. strain QWT-12 and anticancer activity of its carotenoid. **EXCLI journal**, v. 16, p.840, 2017.

REYES, F. G., VALIM, M. F., VERCESI, A. E. Effect of organic synthetic food colours on mitochondrial respiration. **Food Addit Contam**, v 13, p. 5–1, 1996.

RODRIGUES, J. P.; PROVA, S. S.; MORAES, L. A. B.; IFA, D. R. Characterization and mapping of secondary metabolites of *Streptomyces* sp. from caatinga by desorption electrospray ionization mass spectrometry (DESI-MS). **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 27, p. 7135–7144, 2018.

ROSA-FRAILE, M. Granadaene: proposed structure of the group B *Streptococcus* polyenic pigment. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72 p. 6367–6370, 2006.

SAID, F. M.; BROOKS, J.; CHISTI, Y. Optimal C:N ratio for the production of red pigments by *Monascus ruber*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 9, p. 2471–2479, 2014.

SAJJAD, W., SAJJAD, A., AZIZ, I., AZAM, S. S., HASAN, F., SHAH, A. A. Antiproliferative, antioxidant and binding mechanism analysis of prodigiosin from newly isolated radio-resistant *Streptomyces* sp. strain WMA-LM31. **Molecular biology reports**, v. 45, n. 6, p. 1787–1798, 2018.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SÁNCHEZ-HIDALGO, M.; GONZÁLEZ, I.; DÍAZ-MUÑOZ, C.; MARTÍNEZ, G.; GENILLOU, O. Comparative genomics and biosynthetic potential analysis of two lichen-isolated *Amycolatopsis* strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. MAR, p. 1–16, 2018.

SANJUKTA, S.; RAI, A. K.; MUHAMMED, A.; JEYARAM, K.; TALUKDAR, N. C. Enhancement of antioxidant properties of two soybean varieties of Sikkim Himalayan region by proteolytic *Bacillus subtilis* fermentation. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 650–658, 2015.

SARTORI, A. G. D. O., & SILVA, M. V. D. Main food sources of carotenoids, according to the purpose and degree of processing, for beneficiaries of the 'Bolsa Família' in Brazil. **Food Science and Technology**, v. 34 n. 2, 408–415, 2014.

SEHRAWAT, R.; PANESAR, P. S.; SWER, T. L.; KUMAR, A. Response surface methodology (RSM) mediated interaction of media concentration and process parameters for the pigment production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under solid state fermentation. **Pigment and Resin Technology**, v. 46, n. 1, p. 14–20, 2017.

SEN, T.; BARROW, C. J.; DESHMUKH, S. K. Microbial Pigments in the Food Industry—Challenges and the Way Forward. **Frontiers in nutrition**, v. 6, n. 7, 2019.

SHALABY, E. A.; SHANAB, S. M. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, v. 42, n. 5, p. 556–564, 2013.

SHARMA, S.; FULKE, A. B.; CHAUBEY, A. Bioprospection of marine actinomycetes: recent advances, challenges and future perspectives. **Acta Oceanologica Sinica**, v. 38, n. 6, p. 1–17, 2019.

SHI, K., SONG, D., CHEN, G., PISTOLOZZI, M., WU, Z. Q., and QUAN, L.: Controlling composition and color characteristics of *Monascus pigments* by pH and nitrogen sources in submerged fermentation. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 120, p. 145-154, 2015.

SHIRLING, E. B; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 313-340, 1966.

SHRESTHA, B., DHAKAL, D., DARSANDHARI, S., PANDEY, R. P., POKHREL, A. R., JNAWALI, H. N., SOHNG, J. K. Heterologous production of clavulanic acid intermediates in *Streptomyces venezuelae*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 22, n. 4, p. 359-365, 2017.

SHUKLA, M., & VARALAKSHMI, K. N. Apoptosis induction in cancer cell lines by the carotenoid Fucoxanthinol from *Pseudomonas stutzeri* JGI 52. **Indian journal of pharmacology**, v. 50, n. 3, p.116. 2018.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.23, p.15-22, 1957.

SILVA, C.; SANTOS, A.; SALAZAR, R.; LAMILLA, C.; PAVEZ, B.; MEZA, P.; HUNTER, R.; BARRIENTOS, L. Evaluation of dye sensitized solar cells based on a pigment obtained from Antarctic *Streptomyces fildesensis*. **Solar Energy**, v. 181, n. January, p. 379–385, 2019.

SINGH, S. K., HOYOS-VILLEGAS, V., RAY, J. D., SMITH, J. R., FRITSCHI, F. B. Quantification of leaf pigments in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) based on wavelet decomposition of hyperspectral features. **Field Crops Research**, v. 149, p. 20-32, 2013.

SOARES JR, F. L.; MELO, I. S.; DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F. D. Cellulolytic bacteria from soils in harsh environments. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 2195–2203, 2012.

SOUZA, W. R.; SILVA, R. E.; GOODFELLOW, M.; BUSARAKAM, K.; FIGUEIRO, F. S.; FERREIRA, D.; RODRIGUES-FILHO, E.; MORAES, L. A. B.; ZUCCHI, T. D. *Amycolatopsis rhabdoformis* sp. nov., an actinomycete isolated from a tropical forest soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 1786–1793, 2015.

SRINIVASAN M. C.; LAXMAN R. S.; DESHPANDE M. V. Physiology and nutritional aspects of actinomycetes: an overview. **World J Microbiol Biotechnol** 7: 171-184, 1991.

SRILEKHA, V., KRISHNA, G., MAHENDER, P., CHARYA, M. S. Investigation of in vitro cytotoxic activity of pigment extracted from *Salinicoccus* sp. isolated from Nellore sea coast. **Journal of Marine Medical Society**, v. 20, n.1, p. 31, 2018.

STACKEBRANDT, E.; KROPPESTEDT, R. M.; WINK, J.; SCHUMANN, P. Reclassification of *Amycolatopsis orientalis* subsp. *lurida* Lechevalier et al. 1986 as

Amycolatopsis lurida sp. nov., comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 267–268, 2004.

STANKOVIC, N., RADULOVIC, V., PETKOVIC, M., VUCKOVIC, I., JADRANIN, M., VASILJEVIC, B., et al. *Streptomyces* sp. JS520 produces exceptionally high quantities of undecylprodigiosin with antibacterial, antioxidative, and UV-protective properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 1217–1231, 2012.

SUBHASREE, R. S., VIDYALAKSHMI, R.; CHANDRA MOHAN, V.; DINESH BABU, P. Effect of carbon and nitrogen sources on stimulation of pigment production by *Monascus purpureus* on Jackfruit seeds. **International Journal of Microbiology Research**, v. 2, n. 2, p. 184–187, 2011.

SUPARMI, S.; FASITASARI, M.; MARTOSUPONO, M.; MAGIMBULUDE, J. C. Comparisons of curative effects of chlorophyll form *Sauropus androgynus* L. merr leaf extract and Cu-Chlorophyllin on sodium nitrate-induced oxidative stress in rats. **Journal of Toxicology**, v. 2016, p. 1-7, 2016.

SURYAWANSHI R. K.; PATIL C. D.; BORASE H. P.; SALUNKE B. K.; PATIL S. V. Studies on production and biological potential of prodigiosin by *Serratia marcescens*. **Appl Biochem Biotechnol**. n. 173, p. 1209–1221, 2014.

SURYAWANSHI, R. K., PATIL, C. D., KOLI, S. H., HALLSWORTH, J. E., & PATIL, S. V. Antimicrobial activity of prodigiosin is attributable to plasma-membrane damage. **Natural product research**, n. 31, v. 5, p. 572-577, 2016.

TAN, L. T. H., CHAN, K. G., CHAN, C. K., KHAN, T. M., LEE, L. H., & GOH, B. H. Antioxidative potential of a *Streptomyces* sp. MUM292 isolated from mangrove soil. **BioMed research international**, v. 2018, p. 1-13, 2018.

TANG, B., XIE, F., ZHAO, W., WANG, J., DAI, S., ZHENG, H., DING, X., CEN, X., LIU, H., YU, Y., ZHOU, H., ZHOU, Y., ZHANG, L., GOODFELLOW, M., ZHAO, G. P. A systematic study of the whole genome sequence of *Amycolatopsis methanolica* strain 239^T provides an insight into its physiological and taxonomic properties which correlate with its position in the genus. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 169–186, 2016.

TATAR, D.; SAZAK, A.; GUVEN, K.; CETIN, D.; SAHIN, N. *Amycolatopsis cihanbeyliensis* sp. nov., a halotolerant actinomycete isolated from a salt mine. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. PART10, p. 3739–3743, 2013.

TAVARES, D. G., BARBOSA, B. V. L., FERREIRA, R. L., DUARTE, W. F., CARDOSO, P. G. Antioxidant activity and phenolic compounds of the extract from pigment-producing fungi isolated from Brazilian caves. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 16, p. 148-154, 2018.

TERÁN HILARES, R.; SOUZA, R. A. DE; MARCELINO, P. F.; SILVA, S. S. DA; DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I.; SANTOS, J. C. Sugarcane bagasse hydrolysate as a potential feedstock for red pigment production by *Monascus ruber*. **Food Chemistry**, v. 245, p. 786–791, 2018.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L., **Microbiologia**. 10 ed. Editora: Artmed, 2012.

TULI, H. S. CHAUDHARY, P., BENIWAL, V., SHARMA, A. K., Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 8, p. 4669-4678, 2015.

UDHYAKUMAR, K., RAMALINGAM, S., SARAVANAN, R., DHEEBA, B. Extraction of Actinomycetes (*Streptomyces* sp.) Pigment and Evaluation of its Anticancer Property on HeLa Cell Line. **Der Pharma Chemica**, v. 9, n. 24, p. 106–113, 2017.

UNAGUL, P., WONGSA, P., KITTA KOOP, P., INTAMAS, S., SRIKITIKULCHAI, P., TANTICHAROEN, M. Production of red pigments by the insect pathogenic fungus *Cordyceps unilateralis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p.135–140, 2005.

VALDUGA, E., VALÉRIO, A., TREICHEL, H., JÚNIOR, A. F., DI LUCCIO, M. Kinetic and stoichiometric parameters in the production of carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) in synthetic and agroindustrial media. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 157, n. 1, p. 61-69, 2009a.

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

VAŇKOVÁ, K.; MARKOVÁ, I.; JAŠPROVÁ, J.; DVOŘÁK, A.; SUBHANOVÁ, I.; ZELENKA, J., ... MUCHOVÁ, L; VITEK, L. Chlorophyll-mediated changes in the redox status of Pancreatic cancer cells are associated with its anticancer effects. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v.2018, p. 1-10, 2018.

VENDRUSCOLO, F.; LUISE MÜLLER, B.; ESTEVES MORITZ, D.; OLIVEIRA, D. DE; SCHMIDELL, W.; LUIZ NINOW, J. Thermal stability of natural pigments produced by *Monascus ruber* in submerged fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 278–284, 2013.

VENIL, C. K.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. An Insightful Overview on Microbial Pigment, Prodigiosin. **Electronic Journal of Biology**, v. 5, n. 3, p. 49–61, 2009.

VENIL, C. K.; ZAKARIA, Z. A.; AHMAD, W. A. Bacterial pigments and their applications. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1065-1079, 2013.

VENKATACHALAM, M., SING, A.S.C., CARO, Y., DUFOSSÉ, L., FOUILLAUD, M. **Optimization of fermentation conditions for fungal growth and production of red pigments from *Talaromyces albobiverticillius* using response surface methodology**. In Conference: 8th International Congress of Pigments in Food – “Coloured foods for health benefits”. Cluj-Napoca (2016).

VERMA, M.; LAL, D.; KAUR, J.; SAXENA, A.; KAUR, J.; ANAND, S.; LAL, R. Phylogenetic analyses of phylum Actinobacteria based on whole genome sequences. **Research in microbiology**, v. 164, n. 7, p. 718-728, 2013.

VIANA MARQUES, D. A.; PESSOA-JÚNIOR, A.; LIMA-FILHO, J. L.; CONVERTI, A.; PEREGO, P.; PORTO, A. L. F. Extractive fermentation of clavulanic acid by *Streptomyces* DAUFPE 3060 using aqueous two-phase system. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 1, p. 95–103, 2011.

VILA, E.; HORNERO-MÉNDEZ, D.; AZZIZ, G.; LAREO, C.; SARAIVIA, V. Carotenoids from heterotrophic bacteria isolated from Fildes Peninsula, King GIOVANNUCCI Island, Antarctica. **Biotechnology Reports**, v. 21, n. 2018, p. 1-7, 2019.

VINAROV, A., ROBUCHEVA, Z., SIDORENKO, T., DIRINA, E. Microbial biosynthesis and making of pigment melanin. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, v. 68, p. 325–326, 2003.

WAGNER, D., OBLER, I., BEIL, W., LANG, S., MEINERS, M., LAATSCH, H. Integrated approach to explore the potential of marine microorganisms for the production of bioactive metabolites. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 74, p. 207–238, 1996.

WAKSMAN, S. A. Classification, identification and descriptions of genera and species. **The actinomycetes**, v. 2, 1961.

WANG, J.; LEIVA, S.; HUANG, J.; HUANG, Y. *Amycolatopsis antarctica* sp. Nov., isolated from the surface of an Antarctic brown macroalga. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 2348–2356, 2018.

WANG, L.; LI, YUMEI; LI, YAMEI. Metal ions driven production, characterization and bioactivity of extracellular melanin from *Streptomyces* sp. ZL-24. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 521–530, 2019.

WANG, S.; ZHOU, Y.; ZHANG, G. *Nocardioides flavus* sp. Nov., isolated from marine sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5275–5280, 2016.

WEBER, A.P., OESTERHELT, C., GROSS, W., BRÄUTIGAM, A., IMBODEN, L.A., KRASSOVSKAYA, I., LINKA, N., TRUCHINA, J., SCHNEIDERREIT, J., VOLL, H., VOLL, L.M., ZIMMERMANN, M., JAMAI, A., RIEKHOF, W.R., Yu, B., GARAVITO, R.M. and BENNING, C. EST- analysis of the thermo-acidophilic red microalga *Galdieriasulphuraria* reveals potential for lipid A biosynthesis and unveils the pathway of carbon export from rhodoplasts. **Plant Molecular Biology**, v.55, p.17–32, 2004.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. **Journal of Bacteriology**, p. 697-703, 1991.

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

- WOO, P. C., LAM, C. W., TAM, E. W., LEE, K. C., YUNG, K. K., LEUNG, C. K., YUEN, K. Y. The biosynthetic pathway for a thousand-year-old natural food colorant and citrinin in *Penicillium marneffe*. **Scientific reports**, 4, 6728, 2014.
- WOSTEN H. A. B.; WILLEY, J. M. Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air. **Microbiology** 146: 767-773, 2000.
- XIONG, Z., TU, X., TU, G. Optimization of medium composition for actinomucin X2 production by *Streptomyces* spp JAU4234 using response surface methodology. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p.729–734, 2008.
- YADAV, K. S., PRABHA, R. Production of intracellular carotenoid pigment from wild strains of *Rhodotorula*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, p. 679–683, 2017.
- YAMAMOTO, C., TAKEMOTO, H., KUNO, K., YAMAMOTO, D., TSUBURA, A., KAMATA, K., et al. Cycloprodigiosin hydrochloride, a new H(+)/Cl(–) symporter, induces apoptosis in human and rat hepatocellular cancer cell lines in vitro and inhibits the growth of hepatocellular carcinoma xenografts in nude mice. **Hepatology**, v.30, p. 894–902, 1999.
- YANG, L.; ZHANG, W.; CHIAO, J.; ZHAO, G.; JIANG, W. An eukaryotic-type serine/threonine protein kinase involved in the carbon source-dependent pigment biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* U32. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 284, n. 2, p. 357–362, 2001.
- YANG, Y., LIU, B., DU, X., LI, P., LIANG, B., CHENG, X., ... E WANG, S. Complete genome sequence and transcriptomics analyses reveal pigment biosynthesis and regulatory mechanisms in an industrial strain, *Monascus purpureus* YY-1. **Scientific reports**, v. 5, p. 8331, 2015.
- YE, K. X.; FAN, T. T.; KEEN, L. J.; HAN, B. N. A Review of Pigments Derived from Marine Natural Products. **Israel Journal of Chemistry**, v. 59, n. 5, p. 327–338, 2019.
- YOKOYAMA, A.; MIKI, W. Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing bacterium *Agrobacterium aurantiacum*. **FEMS Microbiology Letters**, v.128 n.2, 139-144, 1995.
- YOLMEH, M., HAMED, H., KHOMEIRI, M. Antimicrobial activity of pigments extracted from *Rhodotorula glutinis* against some bacteria and fungi. **Zahedan Journal of Research in Medical Sciences**, v. 18, p. 1-10, 2016.
- ZAIDI, A., LI, H., SLIWKA, H. R., PARTALI, V., ERNST, H., MELO, T. B. Energy and electron transfer reactions of polyenic acids with variable chain lengths. **Tetrah**, v. 69, p.219-227, 2013.
- ZHAO, Y., GUO, L., XIA, Y., ZHUANG, X., E CHU, W. Isolation, Identification of Carotenoid-Producing *Rhodotorula* sp. from Marine Environment and Optimization for Carotenoid Production. **Marine Drugs**, v.17, n.3, p.161, 2019.

ZHENG, Y. F.; BAE, S. H.; KWON, M. J.; PARK, J. B.; CHOI, H. D.; SHIN, W. G.; BAE, S. K. Inhibitory effects of astaxanthin, β -cryptoxanthin, canthaxanthin, lutein, and zeaxanthin on cytochrome P450 enzyme activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 78–85, 2013.

ZHENG, Y., XIN, Y., SHI, X., Y. Anticancer effect of rubropunctatin against human gastric carcinoma cells BGC-823. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, p.1169–1177, 2010.

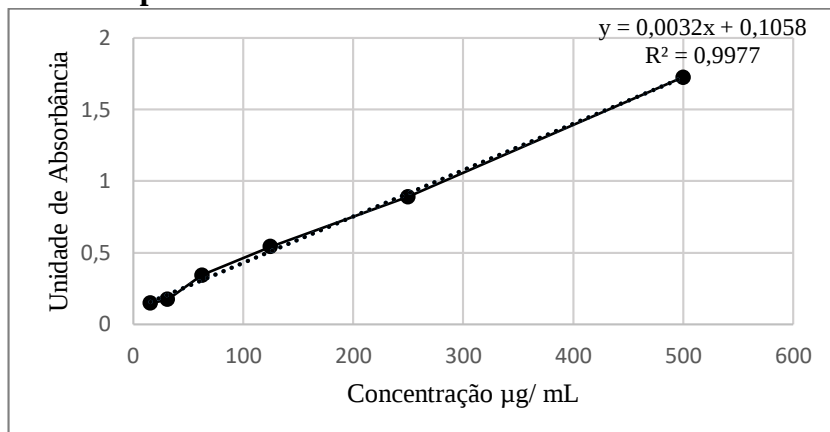
ZHI, X. Y.; LI, W. J.; STACKEBRANDT, E. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 589–608, 2009.

ZOZ, L.; CARVALHO, J. C.; SOCCOL, V. T.; CASAGRANDE, T. C.; CARDOSO, L. Torularhodin and torulene: Bioproduction, properties and prospective applications in food and cosmetics - A review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 2, p. 278–288, 2015.

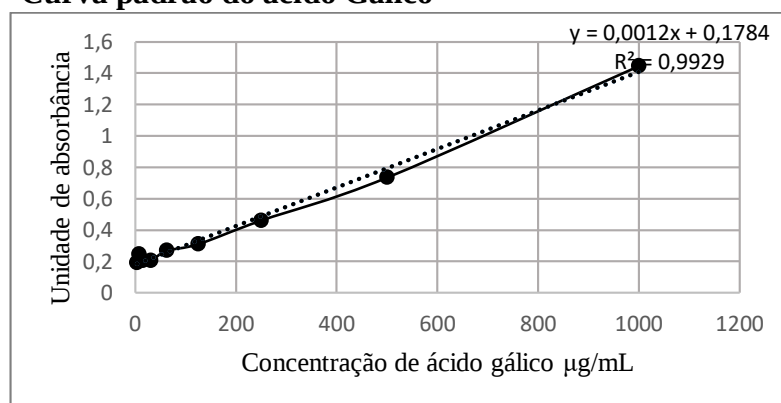
ZUCCHI, T. D.; TAN, G. Y. A.; BONDA, A. N. V.; FRANK, S.; KSHETRIMAYUM, J. D.; GOODFELLOW, M. *Amycolatopsis granulosa* sp. nov., *Amycolatopsis ruanii* sp. nov. and *Amycolatopsis thermalba* sp. nov., thermophilic actinomycetes isolated from arid soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, n. 6, p. 1245–1251, 2012.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Curva padrão de ácido ascórbico



APÊNDICE B - Curva padrão do ácido Gálico



APÊNDICE C - Tabela decodificada dos Resultados da produção de pigmentos e biomassa produzida por *Amycolatopsis* sp. UFPEDA 3422 no ensaio de otimização por meio de planejamento fatorial, utilizando as variáveis X_1 (concentração de carbono de 6, 10 e 14 g/L, correspondente aos níveis -1, 0 e +1 respectivamente), X_2 (concentração de nitrogênio 1, 2 e 3 g/L) e X_3 (variação da rotação 120, 150 e 180 rpm). Sendo a maior produção de pigmentos pelo micro-organismo observada no experimento de número 15.

Nº do experimento	Variáveis			Biomassa (g/L)	pH	Pigmento Produzido UA	
	Concentração de Glicose (g/L)	Concentração de Triptona (g/L)	Rotação (rpm)			540 nm	470 nm
1	6	1	120	29,9	7,0	0,96	0,70
2	6	2	120	35,6	7,0	0,19	0,04
3	6	3	120	36,8	7,3	0,64	0,45
4	10	1	120	28,5	7,2	0,54	0,33
5	10	2	120	40,2	7,0	0,20	0,09
6	10	3	120	38,1	7,5	0,75	0,42

Continua

Continuação

7	14	1	120	32,0	7,0	1,05	0,50
8	14	2	120	36,8	7,0	0,84	0,50
9	14	3	120	37,7	7,5	0,97	0,53
10	6	1	150	26,4	7,0	31,25	11,80
11	6	2	150	41,4	7,0	13,06	4,99
12	6	3	150	41,6	7,3	15,30	2,87
13	10	1	150	28,3	7,0	86,50	43,10
14	10	2	150	13,4	7,5	34,69	46,00
15	10	3	150	36,2	7,2	121,40	134,65
16	14	1	150	45,9	7,0	24,70	13,10
17	14	2	150	56,4	7,3	35,70	22,45
18	14	3	150	50,8	7,4	78,55	63,65
19	6	1	180	33,0	6,9	0,51	0,34
20	6	2	180	36,2	7,0	0,85	0,56
21	6	3	180	36,4	7,2	0,31	0,07
22	10	1	180	26,1	6,8	1,18	1,68
23	10	2	180	39,2	7,5	0,20	0,15
24	10	3	180	44,6	7,2	0,21	0,12
25	14	1	180	31,1	7,0	0,33	0,24
26	14	2	180	35,9	7,4	0,78	0,51
27	14	3	180	42,1	7,6	0,24	0,19

ANEXO

ANEXO A - Composição dos Meios de Cultura e Soluções Tampão

Clorofil

Clorofórmio	24,0 mL
Álcool isoamílico	1,0 mL

Glicose extrato de levedura ágar

Extrato de levedura.....	5g
Glicose.....	20g
Ágar.....	20g
Água destilada	1000 mL

Hickey-Tresner (HT) - Modificado (WAKSMAN, 1961)

Dextrose	10,0 g
Extrato de Levedura.....	1,0 g
Extrato de Carne	1,0 g
Casitone ou Tryptone.....	2,0 g
CaCl ₂ .7H ₂ O	0,02 g
H ₂ O	1000 mL
(pH 7,3)	

International Streptomyces Project Medium 9 (ISP9) - Meio mínimo para fonte de carbono (SHIRLING E GOTTLIEB, 1966)

(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64 g
KH ₂ PO ₄	2,38 g
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O.....	5,65 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g
Solução de sais Pridham e Gottlieb*.....	1 mL
Ágar	15 g
Água destilada.....	1000 mL
pH 6,8 ± 0,2	

*Solução de sais Pridham e Gottlieb:

CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,64 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,11 g
MnCl ₂ .4H ₂ O.....	0,79 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,15 g
Água destilada.....	100 mL

OBS: As soluções de carbono (açúcares) devem ser preparadas e autoclavadas separadamente, sendo incorporadas na concentração de 1% (p/v).

International Streptomyces Project Medium 2 (ISP2) (SHIRLING E GOTTLIEB, 1966)

Extrato de levedura	4,0 g
Extrato de malte	10,0 g
Dextrose	4,0 g
Água destilada	1000 mL
(pH 7,2)	

Meio Ágar Bennet's modificado

Extrato de levedura.....	1 g
Extrato de Carne.....	1 g
Triptona	2 g
Glicerol.....	10 g
Ágar.....	15 g
pH 7,2 ± 0,2	

Meio Gordon (Gordon et al., 1974)

KH ₂ PO ₄	9,1 g
Na ₂ HPO ₄	9,5 g
Extrato de levedura	0,1 g
Ágar	15g
Água destilada.....	1000 mL
pH 6,8	

Solução de gelatina: autoclavar separadamente gelatina em água destilada e adicionar ao meio para concentração de 0,4% e 1%.

Meio Müller-Hinton (MH)

Extrato de carne	5,0 g
Peptona bacteriológica	17,5 g
Amido	15,0 g
(pH 7,0)	

Meio Sierra's - Degradação de Tweens (Sierra, 1957)

Peptona bacteriana.....	10 g
NaCl.....	5 g
CaCl ₂ .H ₂ O	0,1 g
**Solução de Tween	10 mL
Ágar.....	15 g
Água destilada qsp.....	1000 mL
pH 7,4	

**Autoclavar separadamente o Tween em água destilada. Utilizar 10 mL da solução para concentração final de 1,0 % (v/v).

Tampão TE

Tris-HCl (pH 8,0)	10,0 mM.L ⁻¹
EDTA (pH 8,0)	1,0 mM.L ⁻¹

Tampão TES

Tris-HCl (pH 8,0)	25 mM.L ⁻¹
EDTA (pH 8,0)	10 mM.L ⁻¹
Sacarose	50 mM.L ⁻¹