



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

SIMONE APARECIDA DE LIMA SCARAMUSSA

**ESTUDO DA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA VIOLACEÍNA
PRODUZIDA POR *Janthinobacterium* sp.**

CAMPINAS – SP

2024

SIMONE APARECIDA DE LIMA SCARAMUSSA

**ESTUDO DA CINÉTICA DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA VIOLACEÍNA
PRODUZIDA POR *Janthinobacterium* sp.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas.

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA SIMONE APARECIDA DE LIMA SCARAMUSSA, ORIENTADA PELO PROF. DR. JULIANO LEMOS BICAS.

CAMPINAS – SP

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

Sca71e Scaramussa, Simone Aparecida de Lima, 1998-
Estudo da cinética de extração e purificação da violaceína produzida por
Janthinobacterium sp. / Simone Aparecida de Lima Scaramussa. – Campinas,
SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Juliano Lemos Bicas.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Colorantes naturais. 2. Pigmento azul. 3. Processamento Downstream. I.
Bicas, Juliano Lemos. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Study of extraction kinetics and purification of violacein produced
by *Janthinobacterium* sp.

Palavras-chave em inglês:

Natural colorants

Blue pigment

Downstream processing

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestra em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Juliano Lemos Bicas [Orientador]

Elizabeth Bilsland

Valéria de Carvalho Santos Ebinuma

Data de defesa: 23-04-2024

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3287-6467>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9840462295951116>

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas
(Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP)

Titular: Prof^a Dr^a Elizabeth Bilsland
(Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP)

Titular: Prof^a Dr^a Valéria de Carvalho Santos Ebinuma
(Universidade Estadual de São Paulo – UNESP)

Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação e na Secretaria do Programa da Unidade.

AGRADECIMENTOS

Em cada etapa desta jornada existiram diversas pessoas que tornaram meu caminho mais leve e feliz, que me encorajaram e vibraram com cada passo e conquista. À estas pessoas, devo minha mais genuína gratidão.

Agradeço aos meus pais que, apesar de toda dificuldade da vida e familiar, nunca deixaram de me incentivar e acreditar no meu potencial. Agradeço à minha mãe que, mesmo à milhares de quilômetros de distância, nunca deixou eu me sentir só, e agradeço ao meu pai que nunca mediu esforços para me amparar, apoiar e lutar pelos meus sonhos junto comigo. Este título também carrega o seu suor e dedicação.

Agradeço a minha sobrinha Maria Eloiza que têm sido meu maior ponto de apoio e companhia, e por todo seu cuidado e carinho.

Agradeço ao meu orientador, Professor Dr. Juliano Lemos Bicas, por ter me acolhido como orientanda, pelo seu apoio, ensinamentos, atenção e, principalmente, por sua paciência ao longo deste mestrado.

Agradeço aos meus colegas de laboratório que me acolheram e me fizeram sentir em casa. Em especial à Caroline e ao Éder que me auxiliaram e compartilharam seus conhecimentos e experiências, facilitando grandemente minha jornada, além, é claro, da amizade e do companheirismo. Agradeço ao Rafael pelos abraços quentinhos, e à Jenny, Gustavo, Talita, Tiago e Santa Maria, pelo apoio, companheirismo e pelas boas conversas e risadas ao longo deste tempo.

Agradeço à Professora Dr. Taícia Pacheco Fill, do Instituto de Química, pelos ensinamentos, pelo apoio nas análises e pela atenção e carinho. Agradeço aos técnicos Bianca, Nadir e, especialmente, à Izilda pelo carinho, colo e pelos cafés quentinhos.

Agradeço a UNICAMP e a todos os professores da Faculdade de Engenharia de Alimentos-FEA, dos quais, ao compartilhar seus conhecimentos, contribuíram muito para este trabalho.

Por fim, agradeço a todos os meus amigos de longa data, especialmente Elayne e Rebertty, que me motivaram a chegar até aqui, os quais também tenho imensa admiração e gratidão. Aos meus amigos mais recentes, especialmente à Nathalia e ao Gabriel, que me amparam e me proporcionam ótimos momentos. E a todos que, de forma direta ou indiretamente, me apoiaram e me ajudaram.

O presente trabalho foi financiado pela CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (131621/2022-0), com apoio da FAPESP (2023/06147-5).

RESUMO

Biocolorantes naturais têm ganhado grande destaque nos últimos anos devido à tendência emergente dos consumidores de buscarem por produtos contendo ingredientes e aditivos mais naturais, ambientalmente amigáveis e sustentáveis, bem como por estes biocolorantes serem frequentemente associados à diversas atividades biológicas de interesse. Desta forma, tornou-se crescente a procura por colorantes naturais alternativos, especialmente os de tons azulados, por serem escassos na natureza e por possuírem limitadas opções destes biocolorantes que sejam estáveis nas condições de processamento. Neste contexto, este trabalho investigou as etapas de extração e isolamento da violaceína e seus derivados. Mais particularmente, foram avaliadas as cinéticas de extração por maceração empregando-se ferramentas de Planejamento Experimental (Design of Experiments – DOE) para a determinação da influência de diferentes concentrações de etanol (54,5 a 99,5%) e diferentes razões biomassa/solvente (1,72 a 58,28 g/L) na recuperação total e no rendimento de recuperação da violaceína. Logo após, utilizando-se das condições previamente definidas a partir do DOE, seguiu-se com a avaliação do efeito de extrações sequenciais e da aplicação de diferentes temperaturas (30, 50, 70 e 90°C) e potências de ultrassom (125, 250, 375 e 500 W) na recuperação total e no rendimento de recuperação da violaceína. Por fim, objetivou-se a purificação da violaceína e da deoxiviolaceína isoladas do extrato utilizando-se de técnicas de HPLC semi-preparativo. A cinética de extração da violaceína demonstrou que o equilíbrio de recuperação é atingido rapidamente, sendo fixado o tempo de extração em 60s em vórtex para garantir que a máxima concentração foi obtida em cada extração. Os ensaios de DOE indicaram que maiores concentrações de solvente e maiores razões biomassa/solvente favoreceram a recuperação total da violaceína, enquanto que menores razões biomassa/solvente e concentrações de etanol entre 50-75% e 65-90% favoreceram o rendimento de recuperação e a seletividade de extração, respectivamente. Desta forma, foi considerado o etanol em 70% como a concentração ideal do solvente de extração, enquanto que razões biomassa/solvente de 30 g/L foi considerado ideal para a obtenção de maiores rendimentos de recuperação, e razões de 55 g/L foi considerado ideal para obtenção de maiores teores de recuperação total. Quanto à extração sequencial, observou-se que o rendimento total de pigmento (violaceína + deoxiviolaceína) foi em média de 3,10 mg/g biomassa úmida, sendo 89,96% desse valor recuperado logo na primeira extração ao utilizar 30 g/L de biomassa úmida ou de 69,75% ao utilizar 55 g/L de biomassa úmida. Além disso, o conteúdo total de pigmento é composto em média por 93,39% de violaceína e 6,61% de deoxiviolaceína. A aplicação de diferentes temperaturas e potências do processador ultrassônico não se justificam na extração da violaceína, uma vez que não melhoraram

significativamente a eficiência de recuperação. Metodologias capazes de isolar a violaceína (100%) e a deoxiviolaceína (96,22%) por técnicas de HPLC semi-preparativo empregando-se somente etanol e água como solventes foram desenvolvidas, resultando em purezas dos extratos isolados similar ou superior (>99,55%) ao padrão comercial da violaceína (98,28%). Desta forma, o presente projeto apresentou novas abordagens a jusante das etapas de *downstream* para a violaceína e a deoxiviolaceína, biocolorantes dos quais apresentam um alto potencial de uso farmacológico ou para aplicação como colorantes naturais em alimentos, cosméticos e tecidos. Além disso, o presente projeto contribui para a busca de meios mais sustentáveis e economicamente viáveis de produção de novos aditivos naturais para a indústria.

Palavras-chave: colorantes naturais, pigmento azul, processamento *downstream*.

ABSTRACT

Natural biocolorants have gained great prominence in recent years due to the emerging trend of consumers looking for products containing more natural, environmentally friendly and sustainable ingredients and additives, as well as because these biocolorants are often associated with various biological activities of interest. Thus, the demand for alternative natural colorants has become increasing, especially those with bluish tones, because they are scarce in nature and have limited options of these biocolorants that are stable under processing conditions. In this context, this work investigated the stages of extraction and isolation of violacein and its derivatives. More particularly, the kinetics of extraction by maceration were evaluated using Design of Experiments (DOE) tools to determine the influence of different ethanol concentrations (54.5 to 99.5%) and different biomass/solvent ratios (1.72 to 58.28 g/L) on total recovery and recovery yield of violacein. Soon after, using the conditions previously defined from the DOE, the effect of sequential extractions and the application of different temperatures (30, 50, 70 and 90°C) and ultrasound powers (125, 250, 375 and 500 W) on the total recovery and recovery yield of violacein was evaluated. Finally, the objective was to purify violacein and deoxyviolacein isolated from the extract using semi-preparative HPLC techniques. The extraction kinetics of violacein demonstrated that the recovery equilibrium is reached quickly, and the extraction time is set at 60s vortexing to ensure that the maximum concentration was obtained in each extraction. The DOE assays indicated that higher solvent concentrations and higher biomass/solvent ratios favored the total recovery of violacein, while lower biomass/solvent ratios and ethanol concentrations between 50-75% and 65-90% favored the recovery yield and extraction selectivity, respectively. Thus, ethanol at 70% was considered as the ideal concentration of the extraction solvent, while biomass/solvent ratios of 30 g/L were considered ideal for obtaining higher recovery yields, and ratios of 55 g/L were considered ideal for obtaining higher levels of total recovery. Regarding the sequential extraction, it was observed that the total pigment yield (violacein + deoxyviolacein) was on average 3.10 mg/g wet biomass, with 89.96% of this value recovered in the first extraction when using 30 g/L of wet biomass or 69.75% when using 55 g/L of wet biomass. In addition, the total pigment content is composed on average of 93.39% violacein and 6.61% deoxyviolacein. The application of different ultrasonic processor temperatures and powers is not justified in the extraction of violacein, since they did not significantly improve the recovery efficiency. Methodologies capable of isolating violacein (100%) and deoxyviolacein (96.22%) by semi-preparative HPLC techniques using only ethanol and water as solvents were developed, resulting in purities of the isolated extracts similar to or higher (>99.55%) than the commercial standard of violacein

(98.28%). Thus, the present project presented new downstream approaches for violacein and deoxyviolacein, biocolorants of which have a high potential for pharmacological use or for application as natural colorants in food, cosmetics and fabrics. In addition, this project contributes to the search for more sustainable and economically viable means of producing new natural additives for the industry.

Keywords: natural colorants, blue pigment, *downstream processing*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos colorantes naturais azuis regulamentados pela FDA para aplicação industrial em alimentos ou cosméticos.....	24
Figura 2. Vias de biossíntese da violaceína.....	25
Figura 3. Fluxograma de etapas do presente projeto.....	41
Figura 4. Processador ultrassônico QSonica.....	46
Figura 5. Caldo de cultivo fermentado rico em violaceína, obtido por fermentação do meio Y5F com <i>Janthinobacterium</i> sp. após cultivo a 25°C por 120 h.....	51
Figura 6. Varredura de absorção em espectro UV-vis do padrão analítico da violaceína.....	52
Figura 7. Cinética de recuperação total (a) e cinética do rendimento de recuperação (b) dos pigmentos azuis, ambas quantificadas por espectrofotometria.....	53
Figura 8. Gráfico de Pareto com as variáveis significativas (a) e gráfico de erro relativo das predições do modelo comparadas às respostas experimentais (b) para a recuperação total dos pigmentos azuis quantificados por espectrofotometria.....	55
Figura 9. Curva de contorno para a recuperação total dos pigmentos azuis quantificados por espectrofotometria.....	56
Figura 10. Gráfico de Pareto com as variáveis significativas (a) e gráfico de erro relativo das predições do modelo comparadas às respostas experimentais (b) para o rendimento de recuperação dos pigmentos azuis quantificados por espectrofotometria.....	58
Figura 11. Curva de contorno para o rendimento de recuperação dos pigmentos azuis quantificada por espectrofotometria.....	59
Figura 12. Gráfico de distribuição dos resultados de recuperação total dos pigmentos azuis quantificados por HPLC vs. espectrofotômetro.....	61
Figura 13. Gráfico de Pareto com as variáveis significativas (a) e gráfico de erro relativo das predições do modelo comparadas às respostas experimentais (b) para a recuperação total dos pigmentos azuis quantificados por HPLC analítico.....	64
Figura 14. Curva de contorno para a recuperação total de violaceína quantificada por HPLC.....	64

Figura 15. Gráfico de Pareto com as variáveis significativas (a) e gráfico de erro relativo das predições do modelo comparadas às respostas experimentais (b) para o rendimento de recuperação dos pigmentos azuis quantificados por HPLC analítico.....	66
Figura 16. Curva de contorno para o rendimento de recuperação dos pigmentos azuis quantificados por HPLC analítico.	67
Figura 17. Gráfico de Pareto com as variáveis significativas (a) e gráfico de erro relativo das predições do modelo comparadas às respostas experimentais (b) para a porcentagem de violaceína em relação a concentração total de pigmentos do extrato.....	69
Figura 18. Curva de contorno para a porcentagem de violaceína em relação a concentração total de pigmentos do extrato.....	70
Figura 19. Extrações sequenciais da violaceína e da deoxiviolaceína utilizando-se concentrações de biomassa úmida de 30 g/L (A) e 55g/L (B), e volume de solvente em cada ciclo de 30 mL.....	75
Figura 20. Extratos brutos obtidos nos ensaios de extração sequencial utilizando-se concentrações de biomassa úmida de 30 g/L (A) e 55 g/L (B).	76
Figura 21. Efeito da temperatura na extração da violaceína e da deoxiviolaceína.....	78
Figura 22. Cinética de rendimento de recuperação do extrato de violaceína utilizando-se processador ultrassônico e quantificada por espectrofotometria.....	80
Figura 23. Cinética de rendimento de recuperação do extrato de violaceína utilizando-se processador ultrassônico e quantificada por HPLC analítico.....	80
Figura 24. Cromatogramas do extrato bruto obtidos em HPLC semi-preparativo (A), e cromatogramas do extrato bruto (B) e do padrão analítico (C) obtidos em HPLC analítico. ..	82
Figura 25. Cromatograma em HPLC analítico dos extratos isolados da violaceína (A) e da deoxiviolaceína (B) obtidos após purificação em HPLC semi-preparativo.	84
Figura 26. Extratos isolados da violaceína (A) e da deoxiviolaceína (B) e suas respectivas estruturas químicas.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Purificação da violaceína empregando diferentes métodos cromatográficos.	32
Tabela 2. Matriz do delineamento experimental de extração da violaceína.	43
Tabela 3. Combinação dos extratos obtidos nos ensaios de extração sequencial ES-2.	45
Tabela 4. Coeficientes de regressão para a recuperação total dos pigmentos azuis quantificados por espectrofotometria.	55
Tabela 5. ANOVA para a recuperação total de pigmentos azuis quantificados por espectrofotometria.	56
Tabela 6. Coeficientes de regressão para o rendimento de recuperação dos pigmentos azuis quantificados por espectrofotometria.	58
Tabela 7. ANOVA para o rendimento de recuperação dos pigmentos azuis quantificados por espectrofotometria.	58
Tabela 8. Resultados de recuperação total e rendimento de recuperação dos pigmentos azuis quantificados por HPLC analítico e espectrofotômetro.	62
Tabela 9. Coeficientes de regressão para a recuperação total dos pigmentos azuis quantificados por HPLC analítico.	63
Tabela 10. ANOVA para a recuperação total dos pigmentos azuis quantificados por HPLC analítico.	64
Tabela 11. Coeficientes de regressão para o rendimento de recuperação dos pigmentos azuis quantificados por HPLC analítico.	66
Tabela 12. ANOVA para o rendimento de recuperação dos pigmentos azuis quantificados por HPLC analíticos.	67
Tabela 13. Coeficientes de regressão para a porcentagem de violaceína em relação a concentração total de pigmentos do extrato.	69
Tabela 14. ANOVA para a porcentagem de violaceína em relação a concentração total de pigmentos do extrato.	70
Tabela 15. Resultados preditos e experimentais obtidos nas análises de validação dos modelos.	73

Tabela 16. Combinação dos extratos obtidos nas extrações sequenciais empregando-se concentrações de etanol 70% e 55g/L de biomassa úmida.....77

Tabela 17. Porcentagem de pureza do padrão analítico e das amostras obtidas nos diferentes ensaios.87

LISTA DE ABREVIATURAS

DOE – Design of Experiments

EtOH – Etanol

Bio – biomassa úmida

FDA - Food and Drug Administration;

HPLC - High performance liquid chromatography

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

NB - Nutrient Broth, Caldo Nutriente

PTFE – Politetrafluoretileno

UV-vis – Espectro ultravioleta e visível

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivos Gerais	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1. Corantes e pigmentos naturais: visão geral.....	21
3.2. Produção biotecnológica de biocolorantes naturais e biocolorantes naturais azuis...	22
3.3. A violaceína: biossíntese e produção	24
3.4. Estudos das etapas de recuperação e purificação para a violaceína.....	27
3.4.1. Extração da violaceína.....	27
3.4.2. Purificação da Violaceína.....	30
3.5. Propriedades físico-químicas e biológicas da violaceína.....	34
3.6. Estudos de estabilidade da violaceína.....	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1. Microrganismos e reagentes	42
4.2. Produção da violaceína e obtenção da biomassa	42
4.3. Estudos da extração da violaceína	43
4.3.1. Estudos da cinética de extração por maceração.....	43
4.3.2. Estudo do efeito de extrações sequenciais.....	44
4.3.3. Estudo da temperatura do solvente no processo de extração.....	45
4.3.4. Estudo do efeito de aplicação de ultrassom ao processo de extração.....	46
4.4. Concentração do extrato	47
4.5. Purificação da violaceína e deoxiviolaceína.....	47
4.6. Avaliação da pureza das amostras e da seletividade de extração nas diferentes etapas	47
4.7. Condições Analíticas	48
4.7.1. Quantificação da violaceína por espectrofotometria	48
4.7.2. Quantificação da violaceína por HPLC analítico	49
4.8. Análises estatísticas	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1. Produção da violaceína	51
5.2. Extração da violaceína	51
5.2.1. Estudo da cinética de extração em tubos agitados.....	52
5.2.1.1. <i>Validação do método</i>	72

5.2.2.	Estudo do efeito de extrações sequenciais.....	73
5.2.3.	Estudo da temperatura do solvente no processo de extração.....	78
5.2.4.	Estudo do efeito de aplicação de ultrassom ao processo de extração.....	79
5.3.	Isolamento da violaceína e seus derivados	82
5.4.	Avaliação da pureza das amostras nas diferentes etapas	86
5.5.	Condições Analíticas	88
5.5.1.	Curvas de calibração da violaceína por espectrofotometria	88
5.5.2.	Curvas de calibração da violaceína por HPLC analítico	89
6.	CONCLUSÃO	91
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93

1. INTRODUÇÃO

Os compostos que conferem cor são amplamente aplicados industrialmente para conferir, restaurar ou manter a coloração desejável de um produto, visto que a cor é normalmente o primeiro parâmetro sensorial a ser notado pelo receptor e, portanto, desempenha um papel muito importante nas decisões de compra do consumidor. Neste sentido, a cor pode potencialmente influenciar em até 85% na aceitação ou rejeição de um produto e, uma vez que a sua impressão afeta diretamente a percepção de sabor, odor e qualidade de um alimento, a aplicação adequada dos aditivos de cor e a sua segurança são de fundamental importância para a indústria, em especial a alimentícia (SIMON et al., 2017).

O emprego global de corantes e pigmentos em 2018 foi de quase 9,7 milhões de toneladas (SÁNCHEZ-MUÑOZ et al., 2019), com perspectiva de alcançar cerca de 14,5 milhões de toneladas até 2032 (CERASANA, 2023). Entretanto, a grande maioria destes corantes são ainda de origem sintética, dos quais são cada vez mais atribuídos à efeitos teratogênicos e cancerígenos (MOHAMMADI et al., 2022). Ademais, a produção destes corantes por via química ainda envolve precursores de matrizes fósseis com alta toxicidade e baixa biodegradabilidade, conferindo riscos tanto para a saúde do consumidor quanto para o trabalhador, bem como os resíduos gerados na cadeia produtiva são nocivos ao meio ambiente (NIGAM; LUKE, 2016).

Em contra partida, a produção de colorantes naturais, especialmente por via biotecnológica, confere algumas vantagens ao produto, como método de produção em condições mais brandas, utilização de fontes renováveis e virtualmente ininterruptas de produção, não geram resíduos potencialmente tóxicos, além do que, os colorantes obtidos possuem um apelo comercial por geralmente serem biodegradáveis, atóxicos e frequentemente associados à efeitos benéficos a saúde (UMAR; DARWISH; ALENEZI, 2024), o que torna os processos biotecnológicos uma alternativa atrativa ao extrativismo e aos processos por síntese química.

Somado a isto, nos últimos anos intensificaram-se os debates a respeito do impacto do estilo de vida humano no desafio à preservação do meio ambiente e da vida, promovendo maiores conscientizações sobre sustentabilidade e o consumo de alimentos e produtos ecologicamente corretos, de rótulo limpo, mais saudáveis e seguros, visando uma maior qualidade de vida e a promoção da saúde. Essa tendência resultou em uma aversão por parte dos consumidores na aplicação de corantes sintéticos, principalmente em alimentos e bebidas, refletindo no aumento da demanda de produtos industriais contendo ingredientes e colorantes

naturais, impulsionando também a inovação e o desenvolvimento de novos pigmentos naturais passíveis de aplicação industrial (DUFOSSE, 2018; NIGAM; LUKE, 2016).

Nesta perspectiva, diversos biocolorantes bacterianos, fúngicos e de microalgas têm sido extensivamente investigados (DUFOSSE, 2018), com destaque para os compostos de tons azulados, pois, apesar de serem encontrados em diversos organismos, estes são considerados raros na natureza e possuem limitadas opções de forma estável para aplicação industrial, até mesmo para alguns corantes sintéticos. Além disso, a maior disponibilidade destes compostos completaria o espectro de cores primárias naturais já usadas industrialmente, ampliando significativamente as possibilidades de aplicações destes biocolorantes, podendo serem empregados de forma isolada ou em combinação com outros biocolorantes de cores primárias já existentes em grande escala (SANTOS; BICAS, 2021).

Dentre os biocolorantes estudados por nosso grupo de pesquisa encontra-se a violaceína, um metabólito secundário de cor azul-púrpura produzido principalmente por bactérias Gram-negativas, como a *Crhombacterium violaceum* e a *Janthinobacterium* sp., sendo sintetizada por meio da condensação oxidativa de duas moléculas do precursor L-triptofano, seguindo uma via catalisada por cinco enzimas sucessivas codificadas por um operon *vioABEDC*, a qual também produz um subproduto majoritário, a deoxiviolaceína (XU et al., 2022).

Estes compostos são frequentemente associados a um alto potencial farmacológico, como a propriedades antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, anticancerígena, antioxidante, entre outros, além de ganharem grande notoriedade por ser um biocolorante natural com alto potencial para aplicação em alimentos, cosméticos e tecidos, uma vez que possuem relativa estabilidade frente a diferentes condições de processo (pH, altas temperaturas, presença de íons metálicos, etc), além de possuírem uma boa capacidade tintorial (AHMED et al., 2021; CHOI et al., 2021, 2015; DURÁN et al., 2022; DURÁN et al., 2016, 2021; PARK et al., 2021).

Todavia, embora a violaceína tenha sido descoberta há mais de um século (BOISBAUDRAN, 1882; LICHSTEIN; SAND, 1945) e que suas propriedades farmacológicas são estudadas até os dias atuais, alguns fatores críticos limitam a ampliação de pesquisas com este composto, como o seu alto custo, que se encontra em torno de R\$ 3,8 mil por miligrama de violaceína grau analítico (Violacein CAS nº 548-54-9, Sigma-Aldrich); os baixos rendimentos na sua produção e a necessidade de maiores estudos acerca da sua segurança, toxicidade e estabilidade frente a diferentes condições de processo.

Ante o exposto, são crescentes na literatura as buscas por estratégias para aumentar a produtividade e diminuir o custo de produção da violaceína. Desta forma, considerando que o

estudo das etapas posteriores à fermentação da violaceína é também de suma importância para viabilizar a produção da mesma, visto que a utilidade de um biocolorante para a indústria é ditada não somente por suas propriedades inerentes, mas também pela capacidade de produzi-lo e recupera-lo em larga escala para aplicação industrial, bem como pela capacidade obtê-lo dentro dos padrões de pureza exigidos pelos órgãos reguladores, o que torna, portanto, a extração, purificação e concentração destes colorantes microbianos um grande desafio tecnológico para as indústrias (AHMAD, VENIL, ARULDASS, 2015), deste modo, este projeto tem como objetivo estudar as etapas de *downstream* para violaceína.

Em suma, este estudo visou obter condições ideais de recuperação da violaceína a partir da avaliação de diferentes técnicas de extração, bem como, possui como objetivo obter a violaceína e a deoxiviolaceína isoladas e puras para futuros estudos de aplicação. Ressalta-se também a proposta contribuir para a busca de meios mais sustentáveis e economicamente viáveis de produção de novos aditivos naturais para a indústria, uma vez que foram empregados neste projeto solventes atóxicos e biodegradáveis e técnicas de extração e purificação já usadas industrialmente, o que torna o processo facilitado e competitivo, fornecendo um colorante microbiano natural de cor azul atraente para as indústrias, ampliando o espectro de colorantes naturais para uso comercial, além de contribuir para a promoção da saúde devido às suas vastas propriedades medicinais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Estudar a recuperação e purificação da violaceína produzida por *Janthinobacterium* sp. em fermentação submersa.

2.2. Objetivos específicos

- I. Produzir a violaceína por fermentação submersa com *Janthinobacterium* sp. em condições previamente definidas;
- II. Avaliar a cinética de recuperação da violaceína empregando DOE, tendo como parâmetros a variação da concentração de etanol na solução hidroalcoólica e da razão biomassa/solvente;
- III. Avaliar o efeito de extrações sequenciais da violaceína nas condições previamente otimizadas;
- IV. Avaliar a eficiência de aplicação de diferentes temperaturas ao processo de extração da violaceína nas condições previamente otimizadas;
- V. Avaliar a eficiência de aplicação prévia de diferentes potências do processador ultrassônico na extração da violaceína nas condições previamente otimizadas;
- VI. Purificar e isolar a violaceína e a deoxiviolaceína recuperada empregando técnicas de HPLC-semi-preparativo;
- VII. Quantificar e avaliar a pureza da violaceína obtida nas diferentes etapas empregando HPLC analítico;
- VIII. Obter a violaceína e a deoxiviolaceína isoladas para futuros estudos de aplicação.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Corantes e pigmentos naturais: visão geral

Diversos compostos naturais que conferem cor têm sido utilizados desde a antiguidade para aumentar o valor estético de diversos produtos, especialmente em alimentos e bebidas, visto que estas substâncias são capazes de conferir, revitalizar ou intensificar a cor natural destes produtos (GÜRSES et al., 2024). Tais substâncias podem ser de origem inorgânica (84% do total), sendo classificados como pigmentos, ou de origem orgânica (16% do total), sendo classificados como corantes e pigmentos (YADAV et al., 2023).

Os corantes são solúveis no meio de aplicação, geralmente em água e solvente orgânico, sendo dispersos a nível molecular na solução, conferindo a cor por absorção seletiva de luz. Por outro lado, os pigmentos são insolúveis no meio de aplicação, sendo dispersos como partículas, e essencialmente não são afetados quimicamente pelo veículo ou meio no qual são incorporados, conferindo a cor por absorção seletiva e/ou dispersão da luz (GÜRSES et al., 2016). No presente trabalho iremos utilizar dos termos “biocolorantes” ou “pigmentos” para se referir a corantes orgânicos naturais.

A cor conferida pelos biocolorantes à uma solução está diretamente ligada às propriedades eletrônicas das moléculas cromóforas que estes compostos contêm, as quais são responsáveis pela absorção de radiações eletromagnéticas nas regiões UV e visível do espectro. Neste caso, o grupo de moléculas covalentemente insaturadas (por exemplo $C=C$, $C\equiv C$, $C=O$, $C\equiv N$, $N=N$, etc) compõe o conjunto dos cromóforos que originam a cor do composto a depender da faixa do comprimento de onda em que a luz é absorvida (varia entre 380-740 nm, do violeta ao vermelho, respectivamente), sendo a cor visualizada correspondente ao comprimento de onda da luz não absorvida pela substância (GÜRSES et al., 2016).

Além disso, o comprimento de onda e a intensidade máxima de absorção da luz podem ser alterados ou aumentados pela presença de grupos covalentemente saturados, denominados auxocromos, como por exemplo NH_2 , OH , SH , halogênios, entre outros, os quais estendem a conjugação do cromóforo por meio de ressonância. Da mesma maneira, a presença de dois ou mais grupos cromóforos conjugados também pode influenciar nas propriedades de absorção da luz destes compostos (GÜRSES et al., 2016).

Desta forma, considerando que os pigmentos naturais são capazes de absorver a luz em determinados comprimentos de onda e que a sua cor observada é, portanto, a cor dos fótons não absorvidos pela molécula, para a percepção da cor azul o biocolorante deve absorver a luz vermelha, ou seja, absorver a luz na região entre 560 e 700 nm. Todavia, moléculas naturais com configurações eletrônicas capazes de absorver fótons nesta região de maiores

comprimentos de onda são mais complexas e ocorrem com pouca frequência, o que torna os pigmentos azuis tão incomuns na natureza. Normalmente essas moléculas possuem ligações duplas conjugadas, sistemas de anéis aromáticos, heteroátomos e cargas iônicas, como grupos cromóforos e auxocromos (NEWSOME; CULVER; VAN BREEMEN, 2014).

Todavia, apesar da baixa disponibilidade, os biocolorantes naturais azuis podem ser obtidos por extração de flores, frutas e vegetais, ou por produção biotecnológica através da fermentação de fungos, bactérias e microalgas (SANTOS; BICAS, 2021). Ante o exposto, o próximo tópico abordará sobre a produção de biocolorantes naturais azuis.

3.2. Produção biotecnológica de biocolorantes naturais e biocolorantes naturais azuis

A síntese dos biocolorantes naturais por via biotecnológica apresenta algumas vantagens quando comparadas à produção por extrativismo e à síntese química, tais como produção potencialmente de menor custo, possibilidade do uso de resíduos agroindustriais como uma fonte barata de substratos, maior rendimento e sistemas de extração mais suaves e econômicos, além do que a produção não é limitada a fatores sazonais ou geográficos (SÁNCHEZ-MUÑOZ et al., 2019; SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019).

Os processos fermentativos são considerados ainda de fácil escalabilidade, podendo ser maximizados por meio de técnicas estatísticas de otimização das condições de processo e de extração do produto, e pelo uso de ferramentas da engenharia genética e de regulação do *quórum sensing* das estirpes produtoras destes biocolorantes (MOHAMMADI et al., 2022; SÁNCHEZ-MUÑOZ et al., 2019). Somado a isto, os biocolorantes obtidos por via biotecnológica, quando comparados de modo geral aos obtidos por extração de vegetais, possuem uma maior estabilidade ao calor, a exposição à luz e a variação de pH; podendo serem também atóxicos e biodegradáveis (NIGAM; LUKE, 2016).

Outra característica importante é que, normalmente, a produção de biocolorantes está relacionada a estratégias de defesa dos microrganismos, com a finalidade de melhorar sua capacidade de competição por recursos naturais com outros organismos do meio, ou para autoproteção de sistemas oxidativos, como luz UV e radicais livres (SÁNCHEZ-MUÑOZ et al., 2019), o que confere a estes compostos atividades biológicas de interesse, tais como atividades antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, antiviral, anti-inflamatória, antidiabética, antiobesidade, além de efeitos neuro-protetores, cardioprotetores, entre outros (MEJIA et al., 2020; SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019).

Todavia, ainda existem algumas desvantagens no emprego de alguns colorantes naturais quando comparados aos corantes sintéticos, pois eles não são tão brilhantes e estáveis, possuem

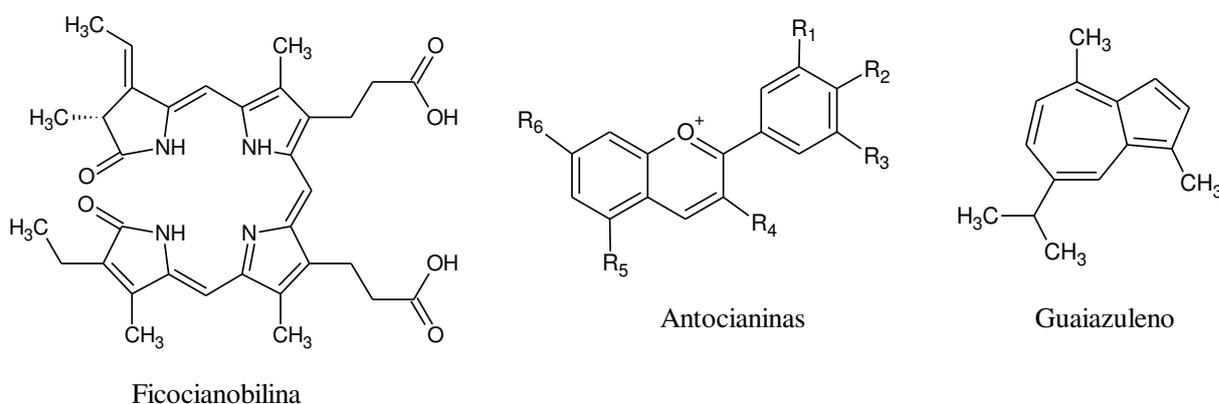
uma força de tingimento menor e podem interagir com alimentos, conferindo aromas e sabores indesejáveis ao produto, alterando suas características organolépticas. Ademais, alguns pigmentos fúngicos podem ainda ser contaminados com micotoxinas prejudiciais à saúde humana (MEJIA et al., 2020; SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019).

Diante disto, é crescente os estudos acerca da melhoria da segurança, estabilidade e funcionalidade dos biocolorantes naturais, assim como do emprego de tecnologias emergentes na produção, recuperação, purificação e aplicação destes compostos, com o intuito de se conseguir produções maximizadas e biocolorantes passíveis de utilização industrial. Paralelamente, entidades regulamentadoras, como a Food and Drug Administration (FDA), buscam definir padrões de identidade e qualidade dos corantes naturais, a fim de se garantir a segurança e confiabilidade destes produtos, facilitando seu crescimento no mercado e expandindo as oportunidades econômicas das indústrias (SIMON et al., 2017).

Dentre os biocolorantes naturais obtidos por via biotecnológica que já são regulamentados pela FDA, os principais para a indústria alimentícia são os carotenoides (β -caroteno, licopeno, astaxantina e cantaxantina), a riboflavina e os pigmento *Monascus* e Arpink Red, dos quais apresentam coloração amarela, laranja, rosa e/ou vermelha (MOHAMMADI et al., 2022; NIGAM; LUKE, 2016). Com relação aos colorantes azuis, somente a ficocianina (cromóforo ficocianobilina ligado a uma proteína) produzida pela cianobactéria *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* possui regulamentação pela FDA para aplicação em alimentos. Contudo, apesar de apresentar altos rendimentos de produção, a ficocianina é um pigmento estável somente em uma estreita faixa de pH (5,0 a 7,5 em 25°C), possuindo também baixa estabilidade térmica e possibilidades de contaminações, caso não haja condições ideais de cultivo, levando a padrões insatisfatórios de higiene para uso em alimentos e produtos farmacêuticos (MEJIA et al., 2020; SANTOS; BICAS, 2021).

Outros pigmentos azuis, mas que são obtidos por extração vegetal, também são regulados pela FDA para uso em alimentos, como os compostos da classe das antocianinas. No entanto, devido à instabilidade perante a diferentes condições de pH, temperatura, luz, oxigênio, íons metálicos e enzimas, as possibilidades de sua aplicação industrial são bastante limitadas (MEJIA et al., 2020; SANTOS; BICAS, 2021). Do mesmo modo, o guaiazuleno, um composto derivado do azuleno e obtido por extração da camomila (*Matricaria sp.*), é aprovado para uso somente em cosméticos, apesar de ser altamente sensível a foto-oxidação (SANTOS; BICAS, 2021). Os biocolorantes naturais azuis citados estão mostrados na Figura 1.

Figura 1. Estrutura química dos biocolorantes naturais azuis regulamentados pela FDA para aplicação industrial em alimentos ou cosméticos.



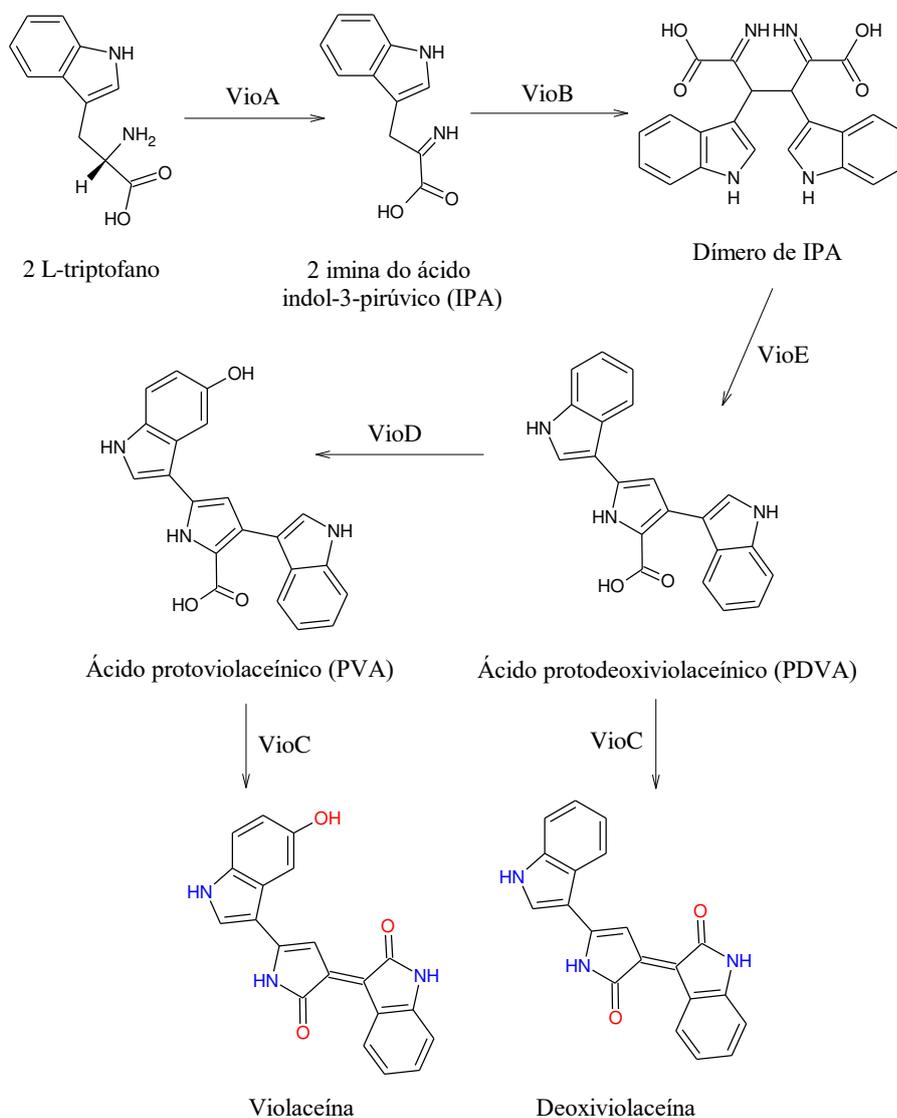
Fonte: Adaptado ChemSpider (<https://www.chemspider.com/>)

Estes exemplos refletem o grande potencial de inovação no setor e a necessidade de investigação de novas fontes de biocolorantes naturais azuis que sejam estáveis às condições de processo e armazenamento, que sejam passíveis de produção em larga escala e que sejam seguros do ponto de vista toxicológico. Além do que, demonstram que o uso de biocolorantes microbianos azuis já é uma realidade industrial, ressaltando o potencial comercial de novas fontes de biocolorantes naturais azuis, como por exemplo a violaceína.

3.3. A violaceína: biossíntese e produção

A violaceína é um metabólito secundário de caráter hidrofóbico (CHOI et al., 2021), produzido principalmente por bactérias Gram-negativas, sendo sintetizada por meio da condensação oxidativa de duas moléculas do precursor L-triptofano, seguindo uma via catalisada por cinco enzimas sucessivas (*vioABEDC*) (XU et al., 2022). A violaceína é usualmente co-produzida com a deoxiviolaceína, um subproduto majoritário sintetizado paralelamente à violaceína, como mostrado na Figura 2, a qual normalmente é produzida em concentrações entre 10-20% nos produtores bacterianos naturais da violaceína (CHOI et al., 2015), estando presente inclusive no padrão comercial da violaceína (Violacein CAS nº 548-54-9, pureza acima de 98%, composto por uma mistura de no mínimo 85% de violaceína e 15% de deoxiviolaceína, Sigma-Aldrich).

Figura 2. Vias de biossíntese da violaceína. Duas moléculas de L-triptofano são condensadas e oxidadas para formar violaceína através da catálise de L-triptofano oxidase (VioA), policetídeo sintase (VioB), prodeoxiviolaína sintase (VioE), triptofano hidroxilase (VioD) e monooxigenase (VioC).



Nos últimos anos houve um aumento nos esforços para a obtenção de cepas bacterianas naturais ou geneticamente modificadas e nos estudos no tocante a otimização dos processos de produção, visando a superprodução da violaceína e seus derivados. Revisões atuais reúnem os produtores naturais de violaceína, sendo que os principais microrganismos reportados pertencem aos gêneros *Chromobacterium*, *Janthinobacterium*, *Duganella*, *Pseudoalteromonas*, *Collimonas* e outras bactérias psicotrópicas isoladas principalmente da Antártida, as quais

exibiram produções de até 3,7 g/L de violaceína. Já os produtores recombinantes de violaceína relatados são cepas de *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Citrobacter freundii* e *Yarrowia lipolytica*, das quais expressam produções de até 5,4 g/L de pigmento (AHMED et al., 2021; CHOI et al., 2021; PARK et al., 2021; DURÁN et al., 2016).

Dentre os produtores naturais da violaceína, embora a *Chromobacterium violaceum* seja a espécie mais estudada e conhecida, a *Janthinobacterium lividum* é a espécie utilizada para a obtenção comercial da violaceína (Violacein Sigma-Aldrich), visto que a *J. lividum* é classificada no nível de biossegurança mais baixo (NB-1), enquanto que a *C. violaceum* possui um risco biológico moderado (NB-2). Neste sentido, estudos anteriores de nossa equipe de pesquisa avaliaram a produção de violaceína por cepas de *Janthinobacterium sp.* isoladas de arroz cozido, visando obter as melhores condições de crescimento e de produção desta estirpe. (ISHIMOTO, 2021).

Enquanto isso, investigações sobre a otimização das condições de cultivo da violaceína demonstraram que fatores como fonte de carbono (glicerol, frutose e caldo nutriente), fontes de nitrogênio (triptofano, triptona, extrato de levedura e extrato de carne bovina), pH entre 6-7, temperatura entre 20-25°C; agitação estática até a 200 rpm à depender da espécie, e a oxigenação do meio, são fatores que favorecem a super produção da violaceína (FREDIANSYAH et al., 2022; ISHIMOTO, 2021; KANELLI et al., 2018; SASIDHARAN et al., 2015; VENIL et al., 2016; HOSHINO, 2011; WANG et al., 2009).

Outra estratégia abordada para aumentar a produtividade e diminuir o custo de produção da violaceína é a utilização de subprodutos/resíduos agrícolas como uma fonte de carbono mais baratas e renováveis. Neste sentido, produções otimizadas da violaceína utilizando-se de farelo de soja (1,504 g/L de violaceína) (GOHIL et al., 2022), farelo de trigo, farelo de colza e o farelo de soja (25; 75 e 85 mg/L de violaceína, respectivamente) (CASSARINI et al., 2022) foram recentemente descritas. Além disso, produções da violaceína a partir de resíduos sólidos de abacaxi, açúcar mascavo, bagaço de cana e melaço (0,07; 0,08; 0,8 e 0,05 g/L de violaceína, respectivamente) também foram bem sucedidas (AHMAD et al., 2012).

Ademais, foi observado também que, utilizando-se apenas resíduos líquidos de abacaxi, a ampliação na escala de produção aumentou significativamente os rendimentos de produção da violaceína devido ao controle rigoroso dos parâmetros de processo, sendo reportados valores de 5,79 e 16,26 g/L para biorreatores de 5 e 50L, respectivamente (AHMAD, VENIL, ARULDASS, 2015; ARULDASS et al., 2015). Diante destes cenários, ao passo que produções de baixo custo e em maiores escalas são alcançadas, os estudos das etapas posteriores a fermentações se tornam de suma importância para tornar a violaceína comercialmente

competitiva, uma vez que são necessários o emprego de técnicas capazes de se obter elevados rendimentos de recuperação e purificação da violaceína, que sejam economicamente viáveis e de baixo impacto ambiental e toxicológico. Neste sentido, estudos das etapas de *downstream* para a violaceína estão descritos no próximo tópico.

3.4. Estudos das etapas de recuperação e purificação para a violaceína

Como a violaceína é um metabólito secundário sintetizado por reações sequenciais e multi-enzimáticas, inevitavelmente há a produção de alguns derivados além da deoxiviolaceína, como proviolaceína e prodeoxiviolaceína, e, uma vez que esses metabólitos secundários estão ligados intracelularmente ao microrganismo, faz-se necessário o emprego de técnicas para maximizar o rendimento de recuperação e purificação da violaceína e seus derivados. Desta forma, as etapas de extração, purificação e concentração da violaceína também são um grande desafio tecnológico para as indústrias (HUANG et al., 2023; AHMAD; VENIL; ARULDASS, 2015).

De forma geral, as etapas que englobam a extração e purificação da violaceína envolvem, inicialmente, uma centrifugação do caldo de cultivo para separação do sobrenadante e da biomassa contendo o pigmento, seguido da ressuspensão desta biomassa em solventes orgânicos, principalmente etanol, metanol, acetona e acetato de etila em concentrações absolutas, com a finalidade de se extrair a violaceína intracelular, podendo esta etapa estar ou não associada à métodos mecânicos de ruptura celular, como ultrassom e maceração. Posteriormente, o sobrenadante rico em violaceína é recuperado por nova centrifugação ou por filtração em membranas e, comumente, o solvente é evaporado sob pressão reduzida para futuras análises. O extrato bruto obtido é então purificado por diversas técnicas, como cristalização e, principalmente, por diferentes métodos de cromatografias líquidas, empregando variadas fases estacionárias e diversos eluentes como fase móvel. Já a concentração da violaceína é normalmente realizada por técnicas de evaporação rotativa em escala laboratorial.

3.4.1. Extração da violaceína

Recentemente, ao avaliar a extração da violaceína produzida por *Y. lipolytica*, onde a recuperação do pigmento foi realizada em um recipiente de camisa dupla aquecido a 28°C, empregando-se o solvente etanol absoluto (96%), sob agitação de 200 rpm por 1 hora cada extração, sendo realizado um total de três extrações sequenciais, foi observado que o conteúdo total de pigmento produzido era de 2,2 g/L (violaceína + deoxiviolaceína), sendo que cerca de 92% do conteúdo total de pigmento foi extraído nos primeiros 8 minutos de processo, além do

que, o extrato resultante da primeira extração era composto por 61,7% de deoxivioleína em relação ao conteúdo total de pigmentos. Em contrapartida, a segunda e terceira extração eram compostas majoritariamente de violeína (55,7 e 100%, respectivamente). Ademais, foi observado também que a mistura de 1:1:1 dos extratos obtidos nas três extrações continham uma proporção de cerca de 50% de violeína e 50% de deoxivioleína, o que não está de acordo com o descrito em dados anteriores na literatura, uma vez que a violeína é sempre relatada estando em maiores proporções em relação ao conteúdo total de pigmentos (NEMER et al., 2023). Todavia, este estudo indica que pode haver uma seletividade de extração destes biocolorantes, uma vez que a deoxivioleína (menor polaridade) demonstrou possuir maior afinidade pelo etanol do que a violeína (maior polaridade), o que abre espaço para novos estudos neste sentido.

Outrossim, buscando maximizar o rendimento de extração da violeína de cepas da levedura *Y. lipolytica* geneticamente modificada, Kholany et al. (2020) avaliaram a efetividade de vários compostos surfactantes e não-surfactantes na extração da violeína e demonstraram que surfactantes, como o Tween 20, apresentam um rendimento de extração superior ao etanol, sendo relatado recuperações de 8 µg violeína/mg biomassa úmida ao utilizar as seguintes condições de processo: razão biomassa solvente de 0,025 (g/mL); concentração do solvente de 250 mmol/L; tempo de extração de 240 min; agitação de 50 rpm e temperatura ambiente. Porém, devido à baixa seletividade de extração do Tween 20, necessitou-se empregar etapas adicionais de separação das proteínas contaminantes, utilizando-se de sistemas aquosos bifásicos formados por Tween 20 e líquidos iônicos (colínio), além de uma etapa de retro-extração do surfactante, utilizando-se solventes orgânicos (2-metil-tetra-hidrofurano) (KHOLANY et al., 2020).

Seguindo este mesmo raciocínio, estes pesquisadores avaliaram ainda a combinação de soluções aquosas do surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio (SDS) com o líquido iônico cloreto de tetrabutylamônio ([N₄₄₄₄]Cl), associado a diferentes temperaturas (20-30°C) e diferentes concentrações do solvente na extração da violeína. Foi relatado rendimentos máximos de 4,1 mg violeína/g biomassa ou 103,1 µg violeína/mL solvente quando utilizados uma razão biomassa solvente de 1:1 (p/v); concentração do solvente de 0,2 M; tempo de extração de 30 min; agitação de 1000 rpm e temperatura de 25°C, além de ser observado uma resposta negativa ao aumento da temperatura de extração. Contudo, também fez-se necessário a aplicação das etapas de extração de retorno do surfactante durante a sua purificação devido ao grande arraste de proteínas contaminantes pelo surfactante, sendo empregado neste caso uma mistura do solvente metanol e timol (SCHAEFFER et al., 2019). Tais etapas

adicionais podem ser desvantajosas para a indústria, em razão do aumento do custo de produção e da maior demanda de produtos/equipamentos.

Da mesma maneira, outro estudo investigou o efeito de diferentes solventes orgânicos em concentrações absolutas associados a técnicas de ultrassom (UA) e micro-ondas (MA) assistidas com parâmetros de extração fixados, a fim de se obter a melhor condição de extração da violaceína produzida por *C. violaceum*. Foi observado que as maiores recuperações totais são obtidas ao utilizar os solventes metanol (102,7 e 86,0 µg de violaceína/mg extrato por UA e MA, respectivamente), acetona (76,7 e 65,5 µg de violaceína/mg extrato por UA e MA, respectivamente), etanol (64,3 e 56,4 µg de violaceína/mg extrato por UA e MA, respectivamente) e que baixos teores de recuperação total são obtidos ao utilizar o acetato de etila (5,4 e 9,3 µg de violaceína/mg extrato por UA e MA, respectivamente) (valores para a soma de violaceína + deoxiviolaceína) (PERIZ et al., 2020). No entanto, os solventes metanol e acetona são tóxicos e possuem uso restrito na indústria, o que também os tornam desvantajosos para aplicação. Adicionalmente, o uso de outros solventes diferentes de água e etanol pode anular o objetivo de obter um pigmento natural para fins regulatórios perante a legislação, uma vez que a maioria dos solventes orgânicos não são naturais ou possuem alto grau de toxicidade (SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019).

Ademais, diferentes métodos de extração da violaceína foram encontrados na literatura, todavia, nestes estudos não foram avaliados o grau de melhoria na eficiência de recuperação da violaceína. Por exemplo, foram realizadas extrações da violaceína produzida por diferentes cepas de *Janthinobacterium* através da lise celular utilizando-se de ciclos de congelamento e descongelamento com posterior ressuspensão da biomassa em etanol (WU et al., 2023). A recuperação da violaceína produzida por *E. coli* modificada diretamente do caldo de cultivo também foi realizada. Neste caso, o solvente acetato de etila associado a esferas de vidro (175 mg, 0,5mm de diâmetro) foram adicionados ao meio fermentado (0,6mL caldo: 1,2mL solvente), com o intuito acelerar a lise celular e o processo de extração, sendo registrado um teor de recuperação total de 710 mg/L de violaceína (RODRIGUES et al., 2013).

Além disso, também foram realizadas extrações utilizando-se um tratamento prévio da biomassa de *C. violaceum* a partir da adição de solução salina tamponada com fosfato, associada à centrifugações em baixas temperaturas dessa mistura, com posterior coleta dos pellets e extração da violaceína utilizando-se etanol (SUBRAMANIAM; RAVI; SIVASUBRAMANIAN, 2014). Da mesma forma, extrações foram realizadas a partir da adição de NaCl (0,5 M) e butanol (200 mL) ao meio de cultivo (1,5 L) com incubação a 65°C por 15 min, seguindo-se de centrifugação para a obtenção da fase rica em violaceína (ALEM et al.,

2020). Extrações também foram realizadas partir da adição de dodecil sulfato de sódio 10% à biomassa, seguindo-se de agitação por 5 dias em temperatura ambiente, adição de solução água-butanol (1:2 v/v) e posterior centrifugação para coleta do butanol rico em violaceína (ARIF et al., 2017).

Desta forma, conforme observado na literatura, os processos de extrações para a violaceína descritos não seguem uma metodologia padronizada, tampouco metodologias direcionadas a aumentar o grau de eficiência e de rendimento da recuperação da violaceína, além do que, ainda são escassos os estudos que avaliem as etapas de *downstream* para a violaceína, em especial trabalhos que visam otimizar e avaliar a cinética de extração da violaceína e seus derivados. Ressalta-se ainda que não foram encontrados trabalhos que avaliassem o efeito da aplicação de diferentes temperaturas e de diferentes potências de ultrassom ao processo de extração da violaceína, como proposto no presente projeto.

3.4.2. Purificação da Violaceína

Referente às etapas de purificação da violaceína, recentemente um estudo otimizou a mistura de solventes capazes de separar e purificar a violaceína e deoxiviolaceína em um extrato bruto usando cromatografia em coluna aberta, sendo a extração realizada como descrito na seção anterior. Foram avaliados diversos solventes orgânicos, como ciclohexano, etanol, metanol, acetato de etila, acetonitrila e trietilamina, os quais foram inicialmente testados em ensaios de migração em placas de TLC, sendo selecionados os solventes acetato de etila e ciclohexano. A fase estacionária consistia em sílica 60 saturada em ciclohexano, com posterior drenagem do solvente após o empacotamento da coluna (4cm x 50cm). O analito (200 mg) foi então percolado na coluna com o eluente (acetato de etila: ciclohexano) em diferentes razões (65:35 v/v; 40:60 v/v e 80:20 v/v, nesta sequência) até a completa separação/purificação da violaceína e da deoxiviolaceína, possibilitando a coleta dos pigmentos de forma isolada (NEMER et al., 2023).

Outro estudo reporta a obtenção de violaceína pura a partir de uma cepa recombinante de *E. coli* para produção heteróloga deste biopigmento, sendo purificada através da cristalização do extrato bruto da violaceína, exibindo cristais com 99,8% de pureza. Para tal, o extrato bruto obtido de extrações sequenciais da biomassa com etanol absoluto foi filtrado em membranas de 0,22 µm, seco sob pressão reduzida e solubilizado novamente em acetona fervente. Na sequência, um volume de água Milli-Q em ebulição foi adicionado a essa mistura, sendo armazenada a 20°C por 24 horas para a formação dos cristais. Os cristais foram recuperados

por filtração em membranas de celulose regeneradas de 0,2 μm , sendo lavados com água purificada e secos a 80°C, obtendo-se então os cristais puros (RODRIGUES et al., 2013).

Rettori e Durán (1998) revelam também um método de purificação do extrato bruto de violaceína (750mg) obtido por extração com etanol absoluto, sendo a purificação realizada por meio do emprego inicial de extrator Soxhlet, utilizando dos solventes clorofórmio, éter etílico e etanol, nesta sequência, sendo a última fração coletada, evaporada sob pressão reduzida e cristalizada em metanol/água, resultando-se em um cristal semi-purificado. Por fim, os cristais foram percolados em HPLC preparativo para uma purificação final, com fase móvel em metanol/água (75:25 v/v) e como fase estacionária a coluna preparativa Delta Pak C18. As frações coletadas foram novamente evaporadas sob pressão reduzida e secas a 100°C por 24 horas, resultando em 1 mg de violaceína pura (RETTORI; DURÁN, 1998).

Outrossim, os demais métodos que relataram maiores purezas de extratos violaceína (violaceína + deoxiviolaceína) (>91%), utilizaram de diferentes métodos de cromatografias líquidas em colunas, com diversos solventes como fase móvel e diferentes fases estacionárias, como mostrado na Tabela 1.

Embora os métodos descritos por Rettori e Durán (1998) e Rodrigues et al. (2013) sejam normalmente os mais citados nos estudos subsequentes que realizam etapas de purificação da violaceína, estes métodos não são tão viáveis de reprodução industrial, uma vez que empregam solventes tóxicos e em altas temperaturas, além de demandar diversas etapas de processo. Metodologias mais facilitadas e competitivas podem ser desenvolvidas a partir da utilização apenas de técnicas de HPLC preparativo e solvente atóxicos, como proposto no presente projeto.

Vale ressaltar que os métodos de rompimento celular e os solventes de extração empregados também influenciam significativamente na pureza do extrato bruto e, conseqüentemente, na necessidade de maiores etapas do processo de purificação para a obtenção de um extrato puro. Desta forma, a utilização de técnicas de extração que favoreçam a permeabilização seletiva dos compostos alvos e não a completa lise celular é bastante desejável, uma vez que resultam em extratos brutos com uma pureza inicial mais elevada.

No próximo tópico serão revisadas as propriedades físico-químicas e biológicas da violaceína que levaram este biocolorante natural ao foco de pesquisas científicas nos últimos anos, bem como serão revisados os estudos acerca da sua estabilidade frente a diferentes condições ambientais e de processo.

Tabela 1. Purificação da violaceína empregando diferentes métodos cromatográficos.

Microrganismo	Método de Extração	Método de Purificação	Fase Estacionária	Fase Móvel	Grau de Pureza	Referência
<i>C. violaceum</i>	Extração do pellet por ultrassom assistida (15 min), seguido de agitação em vórtex por (2 min), utilizando-se de metanol como solvente extrator.	Cromatografia em coluna aberta	Sílica gel 60-120 mesh.	Metanol 5% em diclorometano.	94%	Gohil et al. (2022).
<i>C. violaceum</i>	Vesículas de membrana externa contendo a violaceína foram isoladas do meio de cultivo, e a violaceína extraída com acetato de etila em dois ciclos de extração.	HPLC semi-preparativo	Coluna Gemini C18 (5µm, 250 x 10mm).	Gradiente de acetonitrila e água, fluxo de 3,0mL/min.	-	Batista et al. (2020).
<i>Iodobacter</i> sp. 7Mant.	Extração por sonicação utilizando-se etanol absoluto como solvente.	1 - Cromatografia FPLC 2 - O extrato purificado em (1) foi rotoevaporado, liofilizado, ressuspensão em acetona, mantido a -20°C e centrifugado para retirada de mais impurezas. Seguiu-se de novo ciclo de evaporação rotativa e liofilização.	1- Coluna PF-30C18AQ-F0-220	1- Etanol 70%.	97%	Atalah et al. (2020).
<i>C. violaceum</i>	Ressuspensão do pellet em etanol absoluto por 1 h, seguindo-se de sonicação por 6 min.	1- Cristalização 2- Cromatografia em coluna aberta 3- HPLC semi-preparativo	2- não mencionado 3- Coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm, 10 µm)	1- Metanol: água (30:70 v/v); 2- Metanol: água em ordem crescente de polaridade; 3- Metanol: água (35:65 v/v).	91%	Venegas et al. (2019).
<i>E. coli modificadas</i>	Ressuspensão do pellet em acetona 90% v/v, seguindo-se de filtração da suspensão para obtenção do extrato bruto.	Cromatografia em coluna	Sílica gel.	1- Acetato de etila e éter de petróleo: para deoxiviolaceína 1:1 (v/v); para violaceína 4:6; 1:1; 6:4 (v/v).	~ 100%.	Bilsland et al. (2018).
<i>J. lividium</i>	Extração do pellet com agitação por 15 min utilizando-se metanol absoluto como solvente extrator.	Cromatografia flash	Sílica gel 60 (0,040-0,063mm).	Clorofórmio e etanol.	>95%	Masuelli et al. (2016).

<i>Chromobacterium</i> sp.	Extração do pellet por agitação utilizando-se etanol absoluto como solvente extrator (repetido 2x).	Cromatografia em coluna aberta	1- Sílica gel; 2- Extrato semi-purificado em (1) foi eluido novamente em sílica gel; 3- Extrato parcialmente purificado em (2) foi eluido em coluna de alumina.	1- Acetato de etila (0-40%) em hexano; 2 – Acetato de etila 100%; 3- Metanol (0-10%) em clorofórmio. A fração em 10% de metanol foi concentrada e seca para obtenção dos cristais puros de violaceína.	12,8mg/L da violaceína pura.	Sasidharan et al. (2015).
<i>C. violaceum</i>	Ressuspensão da biomassa em metanol absoluto, seguindo-se de centrifugação para obtenção do extrato bruto rico em violaceína.	Cromatografia em coluna empacotada	Sílica gel	Metanol e água (70:30 v/v).	-	Suryawanshi et al. (2015).
<i>C. violaceum</i>	O caldo de cultivo foi misturado com acetato de etila (1:4 v/v), e acetona para extração das células, sendo o extrato separado da biomassa usando um funil de separação.	1- Cromatografia líquida a vácuo; 2- Cromatografia em camada fina preparativa.	1- Sílica gel 60 (0,04-0,063mm), coluna 7 x 5cm; 2 - Sílica gel 60 contendo gesso, placas 20 x 20 cm.	1-Clorofórmio, clorofórmio:acetona em ordem crescente de polaridade; 2- Clorofórmio e acetona (50:50 v/v).	-	Ahmad; Venil; Aruldass, (2015); Aruldass et al. (2015)
<i>E. coli</i> modificada	Extração com etanol absoluto.	Cromatografia flash	Sílica gel 60 (0,04-0,063mm).	Etanol 70%.	-	Rodrigues et al. (2012).

3.5. Propriedades físico-químicas e biológicas da violaceína

A violaceína é um derivado indol natural [3-(1,2-dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona], que possui uma molécula formada por três unidades estruturais, as quais compreendem um 5-hidroxi indol, um oxindol e uma 2-pirrodilona. Enquanto isso, a deoxiviolaceína possui uma estrutura química similar a violaceína, contendo somente uma hidroxila a menos em sua molécula (AHMED et al., 2021; DURÁN et al., 2022).

Tais estruturas envolvendo anéis pirrólicos conjugados com anéis benzênicos atribui à violaceína e deoxiviolaceína uma alta capacidade de doação de elétrons e hidrogênio, e de absorção de radiação UV de alta energia, assim como permitem sua interação com diferentes membranas biológicas, conferindo à estas moléculas distintas atividades biológicas (PARK et al., 2021). Outrossim, a violaceína é um pigmento natural com massa molar de 343,34 Da, que apresenta caráter hidrofóbico, possuindo o coeficiente de partição octanol-água com o valor $\text{LogP}_{ow} = 3,34$, sendo muito solúvel em metanol, etanol e dimetilsulfóxido, e insolúvel em água, além de apresentar forte absorbância na região visível do espectro devido à sua estrutura de alta ressonância (DURÁN et al., 2022, 2021).

Tais propriedades físico-químicas da violaceína atendem a regra dos cinco de Lipinski, a qual prevê que substâncias com potencial farmacológico que possuem: não mais que cinco doadores de ligação hidrogênio (número total de ligações OH e NH); não mais que dez aceptores de ligação hidrogênio (átomos de N e O); massa molecular menor de 500 Da e um coeficiente de partição octanol-água (LogP) menor que 5, apresentam uma maior solubilidade e permeabilidade e, conseqüentemente, uma maior absorção pelo organismo, possibilitando a aplicação destes fármacos por via oral em humanos (LIPINSKI et al., 2001).

Neste sentido, diversas propriedades biológicas têm sido atribuídas à violaceína e a deoxiviolaceína na literatura nos últimos anos. Alguns artigos de revisão recentes reúnem estudos que demonstram o potencial farmacológico destes compostos, indicando seu uso como antibacteriano, antifúngico, anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatório, antiviral, fotoprotetor, imunomodulador, antileishmania, antiprotozoário, nematicida, tripanocida, antiulcerogênico e nefroprotetor. Ademais, a violaceína vêm ganhando grande notoriedade por ser um pigmento natural com alto potencial para aplicação em alimentos, cosméticos e tecidos (AHMED et al., 2021; CHOI et al., 2015, 2021; DURÁN et al., 2016, 2021, 2022; PARK et al., 2021).

Dentre essas atividades de interesse, a violaceína é frequentemente associada a efeitos antioxidantes, os quais também podem estar associados às suas demais funções biológicas.

Neste sentido, buscando compreender seu mecanismo antioxidante, Cao e colaboradores (2007) calcularam o modelo de densidade eletrônica da violaceína, sendo observado que a violaceína tem uma forte capacidade de doação de elétrons, mas uma fraca capacidade de transferência de átomos de hidrogênio, sendo a banda N7-H7 responsável pela atividade antioxidante. Contudo, seus isômeros coplanares exibem uma forte capacidade de doação de átomos de hidrogênio, bem como sua capacidade de doação de elétrons (CAO et al., 2007). Além disso, como o principal alvo de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são as membranas biológicas, foi demonstrado também que a violaceína apresentou propriedades anti-peroxidação lipídica em modelos de membranas biológicas (microsomas de fígado de rato e lipossomas de fosfatidilcolina de ovo) com valores de IC₅₀ entre 10 e 33 µM (KONZEN et al., 2006).

Referente à atividade antibacteriana, o mecanismo de ação da violaceína sob cepas bacterianas Gram-positivas foi elucidado recentemente, sendo comprovado que este pigmento é capaz de romper a membrana citoplasmática das bactérias, por meio da interação direta com lipossomas produzidos com fosfolipídeos bacterianos e comerciais, promovendo uma perturbação da sua estrutura e aumento da permeabilidade celular, resultando no vazamento de conteúdos intracelulares, como a liberação de adenosina 5-trifosfato (ATP) tanto em células vegetativas como em células estacionárias, mesmo em baixas concentrações inibitórias mínimas da violaceína (MIC de 0,8µM para *Bacillus subtilis* e 1,6 µM para *Staphylococcus aureus*) (CAUZ et al., 2019).

Estes danos à membrana celular foram evidenciados também em cepas antibiótico-resistentes (MRSA) ou cepas não antibiótico-resistentes de *S. aureus*, sendo demonstrado que o vazamento de proteínas, K⁺ e ATP das células resultou em um desequilíbrio osmótico e consequente morte celular, utilizando-se valores de MIC para a violaceína de 3,9 µg/mL (ARULDASS et al., 2018). A capacidade de inserção da violaceína em mono e bicamadas lipídicas (membranas modelo de fosfolipídios zwitteriônica) foram confirmadas por Gupta; Ghosh, (2023), sendo demonstrado que a interação seletiva lipídio-violaceína, impulsionada pelo aumento da cadeia hidrofóbica do lipídio, altera a organização molecular dos lipídios na membrana e é uma pista para o efeito prejudicial da violaceína nas membranas de células bacterianas.

Contudo, embora alguns estudos relatem a atividade antimicrobiana da violaceína sob cepas de bactérias Gram-negativas multirresistentes, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* e *Acinetobacter baumannii*, com valores de MIC que variam entre 0,5 a 16 µg/mL (ASENCIO et al., 2014), e também sob cepas de *Salmonella Typhimurium*, *Vibrio cholerae*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, com valores de

MIC entre 15,6 e 31,7 µg/mL (SUBRAMANIAM; RAVI; SIVASUBRAMANIAN, 2014), a sua atividade antimicrobiana é mais expressiva contra as bactérias Gram-positivas, mostrando significativa atividade contra diferentes bactérias do gênero *S. aureus* e MRSA, dentre outras, com valores de MIC entre 3,9 e 15,6 µg/mL (ARULDASS et al., 2015, 2018), além de valores de MIC entre 6,25 e 25 µg/mL para cepas de *S. aureus* resistentes associadas a mastite bovina (CAZOTO et al., 2011).

A violaceína também pode atuar de forma sinérgica com diversos antibióticos comerciais, como os da classe das tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, gentamicina, vancomicina, cloranfenicol, polimixina-B, azitromicina e outros (SUBRAMANIAM; RAVI; SIVASUBRAMANIAN, 2014), bem como com nanopartículas de prata (ARIF et al., 2017; GAO et al., 2019; NAKAZATO et al., 2019) e outros compostos. Todavia, em hipótese do consumo diário da violaceína como biocolorante alimentar, por exemplo, estudos mais aprofundados sobre a possibilidade da violaceína gerar resistência a antibióticos devem ser considerados.

Em termos de atividade antifúngica, apesar de os mecanismos de ação ainda não terem sido completamente elucidados, estudos sugerem que a violaceína interfira no desenvolvimento de hifas e na formação de biofilmes fúngicos devido à indução da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (DURÁN et al., 2022). Contudo, novos estudos precisam ser realizados para se comprovar o(s) mecanismo(s) antifúngico(s) deste pigmento.

Entretanto, a violaceína já se demonstrou eficaz contra vários fungos e leveduras de importância clínica, como *Candida tropicalis*, *C. albicans*, *Aspergillus flavus*, *Cryptococcus gastris* e *Trichophyton rubrum*, com valores de MIC de entre 2 e 32 µg/mL, exibindo também efeitos contra fungos fitopatogênicos, como *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Penicillium expansum*, com valores de MIC entre 2 e 4 µg/mL. Além do que, para quatro das oito cepas testadas, a violaceína apresentou valores de MIC maiores do que para os antifúngicos comerciais testados (Bavistin e Amphotericin B) (SASIDHARAN et al., 2015). Somado a isto, a violaceína demonstrou ter maiores efeitos inibitórios sobre as cepas de *C. albicans* e *A. niger* (MIC de 4,375 e 8,75 µg/mL, respectivamente) do que o medicamento controle Fluconazol (MIC de 25,0 e 50 µg/mL, respectivamente) (DIKE-NDUDIM; UGENYI; NDUBUEZE, 2021).

Outras atividades biológicas importantes relatadas na literatura são o potencial imunomodulador e anti-inflamatório da violaceína. Avaliações *in vivo* em modelos animais (ratos albinos Wistar) demonstraram que a administração por via oral de 40 mg/kg de peso corporal de violaceína apresentou efeitos imunomoduladores, anti-anafiláticos, analgésicos e

antipiréticos tão eficazes quanto os controles positivos avaliados (dexametasona, cromoglicato dissódico, indometacina/morfina e paracetamol, respectivamente), sendo estas atividades associadas a uma modulação dos mediadores inflamatórios pela violaceína (ANTONISAMY; IGNACIMUTHU, 2010). Efeitos gastroprotetores da violaceína (40 mg/kg pc) contra úlcera induzida em ratos albinos Wistar também se demonstraram tão eficazes quanto o controle positivo omeprazol, o que indica o potencial uso da violaceína como uma ferramenta gastroprotetora natural (ANTONISAMY et al., 2014).

Propriedades anti-inflamatórias também foram evidenciadas ao avaliar a capacidade *in vivo* da violaceína de modular a inflamação aguda e crônica em camundongos, sendo comprovado que a violaceína (3,5 mg/kg pc via intraperitoneal) suprimiu a expressão de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo a inflamação aguda. Enquanto isso, a inflamação crônica em curso (encefalomielite autoimune experimental) foi desenvolvida na sua forma leve em resposta ao tratamento com a violaceína, sendo esse efeito associado também à modulação positiva de células T reguladoras. Em ambos os casos foram verificados ainda a regulação positiva de citocinas anti-inflamatórias (VERINAUD et al., 2015).

O potencial uso farmacológico da violaceína como um neuroprotetor contra doenças neurodegenerativas, como a esclerose lateral amiotrófica (ELA), também são descritos. A avaliação da violaceína (300 nmol/kg/semana pc) em modelos animais induzidos a ELA causou um atraso significativo na sobrevivência, preservou parcialmente o peso corporal e a massa muscular sóleo e melhorou a integridade da junção neuromuscular. Essa redução da morte de neurônios motores e da reatividade neuroglial também foi relacionada à modulação de mediadores inflamatórios pela violaceína (OLIVERA-BRAVO et al., 2022). Avaliações *in silico* demonstraram ainda uma potencial aplicação da violaceína contra AVC isquêmico, sendo tal atividade relacionada principalmente à sua alta capacidade anti-inflamatória, antioxidante e imunomoduladora (VERMA; PANDEY, 2017).

Dentre as atividades biológicas atribuídas a violaceína, a atividade antitumoral é mais extensivamente investigada na literatura. A avaliação *in vitro* e/ou *in vivo* evidenciou que a violaceína é um produto natural com elevado potencial para promover a morte de diversas linhagens de células tumorais humanas, como carcinomas de bexiga (NERONI et al., 2022); linhagens celulares de carcinomas de pulmão, hepatocelular, de cólon, de pâncreas, de mama, adenocarcinoma cervical e em melanomas (DAHLEM et al., 2022); de células tumorais da cabeça e do pescoço (MASUELLI et al., 2016); células cancerígenas do pulmão e do cérebro (MEHTA et al., 2015); em linhagens celulares de câncer do cólon, carcinoma escamoso de cabeça e pescoço e carcinoma ductil de mama, sendo essa atividade citotóxica aumentada sob

hipoxia (HASHIMI, XU, WEI, 2015); em células tumorais de pele (fibrossarcomas) (MOJIB et al., 2011) e em tumores ascítico de Ehrlich (BROMBERG et al., 2010), entre outros. A violaceína também foi capaz de prevenir a recorrência da doença por antagonizar processos celulares que contribuem para a invasão metastática das células cancerígenas (OLIVEIRA et al., 2022; FARIA et al., 2022; GONÇALVES et al., 2016; MEHTA et al., 2015; PLATT et al., 2014).

Os valores de IC_{50} para as células tumorais normalmente variam entre 0,03 a 5,0 μM , enquanto que para células não cancerosas os efeitos citotóxicos da violaceína se encontram em valores de IC_{50} entre 5 a 12 μM (LEAL et al., 2015; BROMBERG et al., 2005, 2010; MELO et al., 2000), o que indica a toxicidade seletiva para as células cancerígenas. Além disso, a violaceína possui mecanismos de indução da morte celular específico para diferentes células tumorais devido a variação dos ambientes celulares nas diferentes linhagens testadas.

Todavia, os principais mecanismos de ação sugeridos nestes estudos foram a apoptose celular devido a uma hiperpolarização da membrana mitocondrial, levando a danos na mitocôndria (LEAL et al., 2015); à indução da geração de EROs nas células de câncer, o que desencadeia a apoptose através da ativação da cascata de caspases (BROMBERG et al., 2010), a qual também pode estar associada ao aumento do cálcio (Ca^{2+}) intracelular e ativação de enzimas fosfolipases, proteases e endonucleases, levando a danos irreversíveis à membranas, organelas e cromatina; além da liberação do citocromo c mitocondrial no citosol (DE CARVALHO et al., 2006). São relatados ainda que a morte celular de células cancerígenas foi promovida pela reprogramação dinâmica de enzimas MAP quinases e a alterações estruturais causadas pelo estresse do retículo endoplasmático, colapso/linearização do complexo de Golgi e o aparecimento de núcleos em forma de “ferradura” (QUEIROZ et al., 2012).

Por fim, com relação aos estudos de genotoxicidade da violaceína, ensaios de micronúcleos realizados em células HeLa (adenocarcinoma cervical humano) indicam que a violaceína não possui atividade genotóxica em concentrações entre 150 e 300 nM (ALEM et al., 2020). Além disso, a análise histopatológica do fígado e do rim de camundongos indicaram que doses diárias de violaceína de até 1000 $\mu g/Kg$ por 35 dias foram bem tolerados e não causaram hematotoxicidade, hepatotoxicidade ou toxicidade renal, o que sugere a ausência de toxicidade para os principais órgãos vitais (BROMBERG et al., 2010). Avaliações de toxicidade também demonstraram que a violaceína se encontra na classe de toxicidade 4, apresentando dose letal mediana (LD_{50}) de 500 mg/Kg, sugerindo que doses abaixo de 300 mg/Kg possuem uma potencial segurança para os humanos (VERMA; PANDEY, 2017).

3.6. Estudos de estabilidade da violaceína

A estabilidade de um biopigmento é uma característica de extrema importância para fins de aplicação industrial, pois indica a manutenção da sua cor e/ou propriedades biológicas durante toda a sua cadeia produtiva. Neste sentido, alguns estudos avaliaram a estabilidade da violaceína em diferentes condições de processo.

Os fatores ambientais mais importantes que afetam a estabilidade da violaceína são a temperatura, exposição a luz visível e radiação ultravioleta (UV). Estudos recentes, demonstraram que o pó seco da violaceína obtida de *E. coli* modificada e seca por evaporador rotativo, apresentou maior estabilidade quando armazenado em temperaturas de -80, -20, 0 e 4°C por até 30 dias no escuro. Todavia, após armazenamento a 20°C por 30 dias a preservação do pigmento (concentração final de violaceína em relação a sua concentração inicial) caiu para 70,5%. Além disso, quando comparado a preservação do pigmento estocado por 30 dias no escuro ou exposto a luz visível e a radiação ultravioleta, a taxa de preservação da violaceína diminuiu para 89%, 15,2% e 5,1%, respectivamente (HUANG et al., 2023).

A avaliação do pó de violaceína produzida por *C. violaceum* e obtido por pulverização em *spray dryer* demonstrou ainda que o pigmento é estável na faixa de pH de 1-11 e em temperaturas entre 25-60°C após armazenamento de 28 dias, diminuindo a intensidade da cor somente quando é exposto à luz fluorescente por longos períodos (condições mais estáveis de armazenamento, dentro da faixa estudada: 25-30°C, pH 7, sob abrigo da luz) (VENIL et al., 2015). Avaliações do extrato de violaceína obtido de *C. violaceum* também demonstraram que a cor azul foi mantida em pHs entre 1-12, havendo mudança de cor para tons esverdeados somente em pHs 13 e 14 (AMORIM; GOMES; GOUVEIA, 2022).

Corroborando a estes estudos, outra avaliação sobre a estabilidade da violaceína produzida por *C. violaceum*, sendo o extrato seco obtido por secagem à 60°C por 3 dias do extrato bruto rotaevaporado, demonstrou que o biocolorante apresentou preservação do pigmento de mais de 80% após exposição de 30 dias à luz estando em pHs entre 5-9, e cerca 65% de preservação após o mesmo período de exposição à luz, estando em pH 2. Adicionalmente, uma alta taxa de preservação (acima de 97%) foi evidenciado após tratamentos térmicos entre 40-100°C por até 2 horas. Por outro lado, na presença de íons metálicos alcalinos (Al, Mg, Ca) a violaceína demonstrou maior estabilidade, enquanto que na presença de metais de transição houve maiores degradações (Cu) ou precipitações (Pb) deste biopigmento. A violaceína apresentou ainda resistência à presença de baixas concentrações de hidróperóxido (H₂O₂), porém, na presença de agentes oxidantes (KNO₄), houve uma mudança da cor azul-

púrpura para uma cor laranja claro-marrom, e na presença de agentes redutores (Na_2SO_3) o biopigmento apresentou mudança para a cor azul escuro-amarelado (AHMAD et al., 2012).

Além disso, colaborando com este estudo, foi mostrado que o aumento da concentração de agentes oxidantes (H_2O_2 e NaClO) diminui a estabilidade da violaceína, enquanto que a presença e o aumento da concentração de agentes redutores (Na_2SO_3 , ácido ascórbico e BHT) resultaram em um efeito positivo na preservação da violaceína, ambos após 30 dias de incubação. Outrossim, na presença de alguns ingredientes alimentares, como xilose, sucrose e glicose, a preservação da violaceína também tende a ser mais acentuada após o mesmo período de incubação. Já na presença de frutose, NaCl e ácido cítrico a preservação da violaceína tende a ser mais moderada ou baixa (HUANG et al., 2023).

Todavia, vale ressaltar que a estabilidade da violaceína, e até mesmo suas atividades biológicas, podem apresentar resultados diferentes a depender dos microrganismos pelo qual a violaceína foi produzida, da forma como foi extraída e se houve etapas de purificação, visto que os extratos brutos e, principalmente os microencapsulados, podem conter moléculas ou estruturas que protegem a violaceína de fatores externos, como temperatura e luz visível, ou de fatores inerentes ao meio, como pH e a presença de outros compostos.

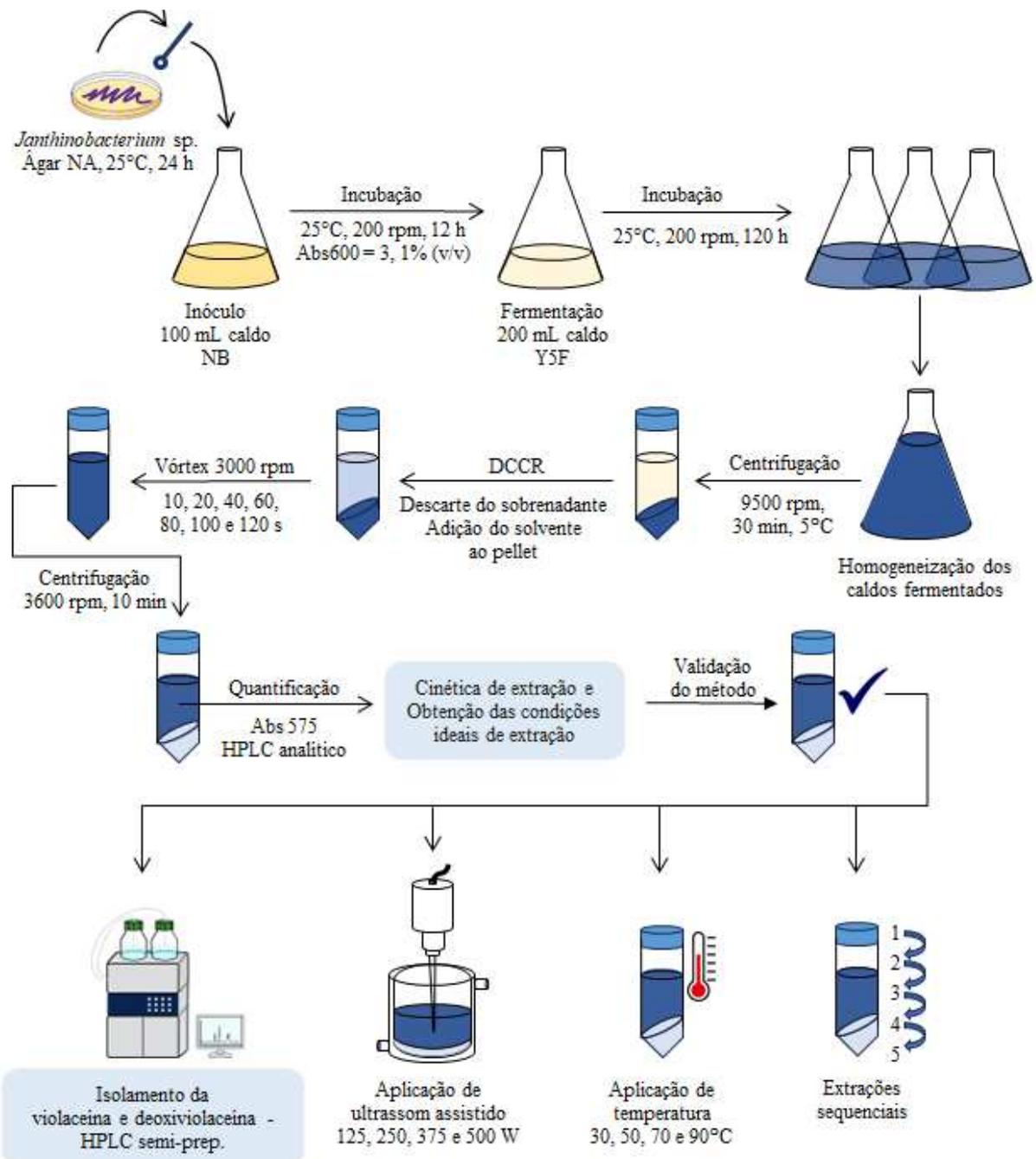
Ante o exposto ao logo desta revisão, é crescente na literatura o interesse de aplicação da violaceína em diversos setores, como em alimentos (VENIL et al., 2015), cosméticos (DURÁN et al., 2021; SURYAWANSHI et al., 2015), fibras e tecidos (GAO et al., 2019; KANELLI et al., 2018; KHAKSAR; RIGI; MIRDAMADIAN, 2021; LEE et al., 2022; OSMAN; SETU, 2018; ROSLI; SETU, 2018; VENIL et al., 2016), embalagens de celulose bacteriana (AMORIM; GOMES; GOUVEIA, 2022), biossensores para detecção de poluentes ambientais (GUO et al., 2021; HUI et al., 2020, 2022b, 2022a) e, especialmente, aplicações no setor farmacêutico para a produção de nanocarreadores (nano-folhas e microcápsulas), visando a entrega controlada, redução da toxicidade e obtenção de atividades antimicrobianas e anticancerígenas aumentadas da violaceína (KANELLI et al., 2022, 2023; BERTI et al., 2019, 2020, 2022; (BATISTA et al., 2020b; CHOI et al., 2020; ARIF et al., 2017; BERNI et al., 2013; FAKHR, 2012; MARTINS et al., 2010; MELO et al., 2003).

Portanto, estudos com foco na melhoria de produção, recuperação, purificação e veiculação estável da violaceína, visando a obtenção de processos de menor custo e passíveis de escalonamento de produção, tendem a atrair ainda mais o interesse da indústria e da academia por tal composto. Neste sentido, o presente trabalho teve como foco a avaliação das etapas de recuperação e isolamento/purificação da violaceína.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto é composto por duas etapas, conforme ilustrado na Figura 3: estudos de recuperação da violaceína por técnicas de extração com ou sem associação a diferentes temperaturas e aplicação de ultrassom, além de estudos de isolamento da violaceína e deoxiviolaceína por técnicas de HPLC semi-preparativo.

Figura 3. Fluxograma de etapas do presente projeto.



4.1. Microrganismos e reagentes

A linhagem de *Janthinobacterium sp.* utilizada neste projeto foi isolada a partir de arroz cozido deteriorado no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Brasil (acesso ao patrimônio genético nº A7880EF, certificado em Anexo) (ISHIMOTO, 2021). O solvente etanol de grau analítico foi obtido pela empresa Anidrol, e de grau HPLC pela empresa Dinâmica. O padrão de violaceína de grau analítico (Sigma-Aldrich, CAS nº 548-54-9, pureza >98% (violaceína (mín. 85%) e deoxiviolaceína) foi adquirido na empresa Sigma Aldrich, Alemanha.

4.2. Produção da violaceína e obtenção da biomassa

Conforme preconizado por Ishimoto (2021), a cepa de *Janthinobacterium sp.* foi inicialmente repicada em placas de Petri contendo meio sólido Ágar Nutriente (NA, Nutrient Ágar) a uma concentração de 8g/L, sendo incubada em estufa bacteriológica à 25°C por 24h. Logo após, o inóculo foi obtido a partir da transferência de uma alçada de células das colônias obtidas anteriormente para um Erlenmeyer contendo 100 mL do meio líquido caldo nutriente (NB, Nutrient Broth), na mesma concentração já citada. O inóculo foi incubado à 25°C, sob agitação de 200 rpm overnight, até a obtenção da concentração celular no valor de 3 na leitura de absorbância em espectrofotômetro à densidade óptica de 600 nm.

A fermentação foi iniciada pela adição de 1% do inóculo (v/v), em relação ao volume total do meio fermentativo, o qual é composto por 5g/L de extrato de levedura (do inglês Yeast Extract Broth) e 10g/L de frutose, sendo denominado por “Y5F”. A fermentação foi realizada em Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL do meio de cultivo, com incubação em *shaker* orbital a 25°C, sob agitação de 200 rpm por 120h (ISHIMOTO, 2021).

Ao término da incubação, os caldos de cultivo fermentados foram transferidos para um Erlenmeyer de 2 L e homogeneizados a fim de se obter uma padronização do meio. Na sequência, o caldo fermentado foi transferido para tubos de centrífugas de 250 mL e a biomassa contendo a violaceína foi então recuperada por centrifugação (9500rpm, por 30min à 5°C). O sobrenadante foi descartado e a biomassa úmida (pellet) foi utilizada nos ensaios de extração. Vale ressaltar que o pellet foi utilizado imediatamente após sua recuperação, sem passar por etapas congelamento da biomassa, a fim de se evitar possíveis interferências da lise celular ocasionada pela formação de cristais de gelo nos estudos de extração da violaceína.

4.3. Estudos da extração da violaceína

4.3.1. Estudos da cinética de extração por maceração

Os ensaios de extração foram conduzidos de acordo com o desenho experimental (DOE) obtido seguindo-se a metodologia de delineamento do tipo Composto Central Rotacional – DCCR 2². As variáveis independentes escolhidas foram a concentração do solvente etanol em água (X_1) e a razão da biomassa e do solvente (p/v, g de biomassa úmida e L do solvente de extração, X_2), sendo realizados, portanto, 4 ensaios fatoriais, 4 ensaios axiais e 3 ensaios nos pontos centrais, totalizando-se 11 ensaios (Tabela 2) (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Tabela 2. Matriz do delineamento experimental de extração da violaceína.

Ensaio	Parâmetros			
	X_1		X_2	
	Código	Etanol (%)	Código	Bio:Sol (p/v)
1	-1	61,0	-1	10
2	+1	93,0	-1	10
3	-1	61,0	+1	50
4	+1	93,0	+1	50
5	-1,41	54,5	0	30
6	+1,41	99,5	0	30
7	0	77,0	-1,41	1,72
8	0	77,0	+1,41	58,28
9	0	77,0	0	30
10	0	77,0	0	30
11	0	77,0	0	30

Para os ensaios de extração, quantidades variadas de biomassa úmida (obtida conforme explicado em 4.2) foram pesadas em tubos Falcon de 50 mL e ressuspensas em 30 mL de solvente, a fim de atender as proporções biomassa:solvente apresentadas na Tabela 3. Seguiu-

se de agitação em Vórtex a 3000 rpm e em temperatura ambiente, sendo coletadas alíquotas após 20, 40, 60, 80, 100 e 120 segundos de agitação, com o intuito de se avaliar a cinética de extração da violaceína e identificar o tempo em que se atingiu a máxima saturação do solvente com a violaceína para cada razão de biomassa e solvente avaliados. Por fim, as amostras foram submetidas a nova centrifugação (3600 rpm por 10 min) para coleta do sobrenadante rico em violaceína e posterior quantificação em espectrofotômetro (seção 4.7.1). O ponto 0 foi realizado a partir da adição do solvente na biomassa, seguindo-se da imediata leitura em espectrofotômetro, sem realizar agitação ou centrifugação prévias. Ao término dos ensaios de extração, a cinética de recuperação da violaceína foi avaliada, sendo selecionado um tempo em comum para todos os ensaios, neste caso 60 segundos, e as amostras foram submetidas a quantificação por HPLC analítico, como descrito na seção 4.7.2.

Os resultados foram tratados no software Protimiza Experimental Design (<http://experimental-design.protimiza.com.br>), e os parâmetros estatisticamente significativos à um nível de confiança de 90% (p-valor < 0,10) foram utilizados para a construção de um modelo, conforme Equação 1. As análises de variância (ANOVA) e as superfícies respostas foram realizados empregando-se o mesmo software.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 \quad \text{Eq. 1.}$$

Em que Y é a concentração de violaceína em termos de mg violaceína/L de extrato ou o rendimento de recuperação da violaceína em termos de mg violaceína/g biomassa úmida; X_1 e X_2 são a concentração do etanol e a razão biomassa/solvente, respectivamente, e β_n são os coeficientes de regressão associados a X_1 (1), X_2 (2) e suas combinações.

Após a obtenção das condições escolhidas de recuperação da violaceína, foram realizados ensaios de extração em triplicatas nestas dadas condições para validação das respostas obtidas. Neste caso, foram selecionadas duas concentrações de biomassas: 30 g/L e 55 g/L de biomassa úmida, sendo fixados os valores de etanol 70% e tempo de extração de 60 segundos. As amostras foram analisadas tanto por espectrofotômetro (seção 4.7.1) quanto por HPLC analítico (seção 4.7.2).

4.3.2. Estudo do efeito de extrações sequenciais

A fim de verificar a quantidade total de violaceína na biomassa, extrações sequenciais foram realizadas empregando-se as condições próximas ao ponto de maior rendimento de recuperação (ES-1: 30 g/L de biomassa, etanol 70% e tempo de 60 segundos de extração) ou

ao ponto de maior recuperação total de violaceína (ES-2: 55 g/L de biomassa, etanol 70% e tempo de 60 segundos de extração). Após cada sequência de extração, o solvente contendo a violaceína foi separado da biomassa, a qual passou por nova extração com a mesma quantidade de solvente fresco. O experimento também foi conduzido nas mesmas condições já descritas (tubos Falcon de 50 mL, volume de solvente de 30 mL e agitação de 3000 rpm em temperatura ambiente), sendo as análises realizadas em triplicatas.

Os extratos ricos em violaceína foram recuperados por centrifugação (3600 rpm por 10 min) e as amostras obtidas foram analisadas por HPLC analítico (seção 4.7.2). Para o último caso (ES-2), as amostras de cada extração sequencial foram avaliadas isoladamente e em misturas de igual volume, com um volume total de 2 mL para cada combinação, como demonstrado na Tabela 3. Além disso, o extrato resultante da primeira extração em ES-1 foi utilizado para as análises de purificação da violaceína e seus derivados (seção 4.5).

Tabela 3. Combinação dos extratos obtidos nos ensaios de extração sequencial ES-2.

Extratos combinados	Código	Volume de cada extrato (mL)
1 + 2	M ₁	1
1 + 2 + 3	M ₂	0,67
1 + 2 + 3 + 4	M ₃	0,5
1 + 2 + 3 + 4 + 5	M ₄	0,4

4.3.3. Estudo da temperatura do solvente no processo de extração

Posteriormente, foram realizados ensaios aplicando-se diferentes temperaturas no solvente de extração, com o intuito de se verificar uma melhoria no rendimento de recuperação da violaceína. Para isso, foram utilizadas as mesmas condições ideais de análises descritas anteriormente (30 g/L de biomassa úmida, etanol 70%, tubos Falcon de 50 mL com volume inicial de 30 mL de solvente), no entanto, neste caso o solvente foi deixado em banho maria por cerca de 15 minutos até atingir a temperatura de análise (50, 70 e 90 ± 0,5 °C), para então ser adicionado à biomassa e agitado em Vórtex à 3000 rpm por 60 segundos. Foi verificado também que o etanol 70% em temperatura ambiente encontrava-se a 30 ± 0,5°C. Os extratos ricos em violaceína foram recuperados por centrifugação (3600 rpm por 10 min) e as amostras

obtidas também foram analisadas por HPLC analítico (seção 4.7.2). As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.4. Estudo do efeito de aplicação de ultrassom ao processo de extração

Por fim, com a finalidade de avaliar se há uma melhoria no rendimento de recuperação da violaceína com o emprego de tratamento ultrassônico (permeabilização), foram realizadas extrações da violaceína utilizando-se o processador ultrassônico (QSonica LLC, modelo Q500, potência 500W, frequência 20kHz) (Figura 4). Neste caso, a extração foi conduzida conforme as condições ideais anteriormente descritas (30 g/L de biomassa úmida e etanol 70%), sendo agora utilizados de diferentes potências de agitação em ultrassom (25, 50, 75 e 100% da potência total, o que equivale a 125, 250, 375 e 500 W, respectivamente), e os ensaios foram realizados em béquer encamisado de 150 mL com um volume inicial de solvente de 80 mL, e com circulação de água para resfriamento à 10°C utilizando-se de banho maria para tal. Para obtenção da cinética de extração da violaceína por ultrassom assistido, foram coletadas alíquotas periodicamente em cada ensaio de extração (2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 25, 30 e 40 min). O ponto 0 também foi realizado a partir da adição do solvente na biomassa, seguindo-se da leitura em espectrofotômetro, sem realizar agitação ou centrifugação prévias.

Os experimentos foram realizados em triplicata e os extratos ricos em violaceína foram recuperados por centrifugação (3600 rpm por 10 min) para posterior quantificação em espectrofotômetro, como descrito na seção 4.7.1. Após obtenção da cinética de extração da violaceína por ultrassom, alguns pontos amostrais (2, 10, 25 e 40 min) foram selecionados para quantificação em HPLC analítico (seção 4.7.2).

Figura 4. Processador ultrassônico QSonica.



Fonte: Site Qsonic (<https://www.sonicator.com/>).

4.4. Concentração do extrato

Os extratos de violaceína obtidos nas diferentes etapas foram concentrados em gás nitrogênio e o material resultante, denominado extrato bruto concentrado, foram utilizados nos ensaios de quantificação por HPLC analítico, como detalhado mais a diante (seção 4.7.2). Para a análise de purificação o extrato resultante da primeira extração na ES-1 (seção 4.3.2) também foi seco em nitrogênio. A secagem do extrato por gás nitrogênio foi realizada com o intuito de se minimizar as possíveis degradações do extrato pelo efeito de elevadas temperaturas, no caso do emprego de evaporação rotativa, e de possíveis oxidação, visto que o N₂ é um gás inerte e não interage com a amostra. Vale ressaltar também que todas as amostras foram armazenadas ao abrigo da luz e congeladas à -18°C antes do processo de secagem.

4.5. Purificação da violaceína e deoxiviolaceína

O extrato bruto concentrado foi suspenso em etanol grau HPLC, deixados em banho ultrassônico por 10 minutos para melhor solubilização e, na sequência, o extrato foi filtrado em filtro PTFE hidrofóbico, com diâmetro do filtro 13 mm e do poro de 0,22 µm, sendo transferido para vials de vidro âmbar. Para o ensaio de purificação, 300 µL deste extrato foi injetado em HPLC Shimadzu semi-preparativo, equipado com uma bomba LC-10AD, um detector SPD-10A UV-VIS e um coletor de frações FRC-10A. A coluna Phenomenex Luna Phenyl Hexyl (250 × 10 mm, 5 µm) foi utilizada para a separação cromatográfica. Para a análise, a metodologia desenvolvida e otimizada em escala analítica (HPLC-DAD), conforme descrito na seção 2.7.2, foram ajustadas para a escala preparativa (ARAÚJO, 2018).

O gradiente de eluição ocorreu utilizando uma fase móvel A, composta por água ultrapura, e uma fase móvel B, composta por etanol, com taxa de fluxo de 3,8 mL/min. O perfil do eluente foi: 0-4 min gradiente de 30% até 40% de B; 4-8 min gradiente de 40% até 50% de B; 8-17 min gradiente de 50% até 90% de B; 17-22 min gradiente mantido em 90% de B; 22-26 min gradiente de 90% até 30% de B e então o sistema retornou para as condições iniciais, 26-29 min gradiente mantido em 30% de B. O tempo total da corrida foi de 29 min, sendo o software *LabSolutions Shimadzu* utilizado para a aquisição de dados, controle de instrumentos e processamento. A pureza do extrato em termos de % violaceína, antes e após o processo de purificação foi avaliada por HPLC analítico, como descrito na seção 4.6.

4.6. Avaliação da pureza das amostras e da seletividade de extração nas diferentes etapas

A pureza dos pigmentos azulados (violaceína e deoxiviolaceína) presentes nas amostras obtidas nos diferentes ensaios realizados e no padrão analítico foram estimadas pela somatória

da área dos picos de interesse (violaceína + deoxiviolaceína) com relação à somatória da área dos demais picos de cada cromatograma (Equação 2), exceto os picos do solvente (picos presentes na amostra de solvente etanol - branco), considerando-se leitura a 254 nm e a 575 nm. Já a seletividade de extração da violaceína foi determinada pela concentração de violaceína em relação a somatória das concentrações de violaceína e deoxiviolaceína determinadas a 575 nm (Equação 3).

$$\% \text{ Pureza} = \left(\frac{\text{Área dos picos da violaceína+deoxiviolaceína}}{\text{Área de todos os picos}} \right) * 100 \quad \text{Eq. 2.}$$

$$\% \text{ Seletividade} = \left(\frac{\text{Concentração da violaceína}}{\text{Concentração da violaceína+deoxiviolaceína}} \right) * 100 \quad \text{Eq. 3.}$$

4.7. Condições Analíticas

4.7.1. Quantificação da violaceína por espectrofotometria

Os extratos ricos em violaceína provenientes dos experimentos anteriores foram quantificados em termos de absorvância em 575nm (Abs_{575} – comprimento de onda máximo de absorção da violaceína), em cubetas de vidro de 1 × 1 cm usando um espectrofotômetro (DU-640TM, Beckman Coulter Inc.). Quando necessário, as amostras foram diluídas utilizando-se o solvente na mesma concentração usada para a extração.

Diferentes concentrações do padrão analítico de violaceína (1 a 12,5 mg/L) foram utilizadas para construir uma curva de calibração, a fim de se expressar os resultados em termos de mg de violaceína/L. O padrão foi diluído em etanol grau analítico em concentração absoluta (99,5%). Adicionalmente, também foram elaboradas curvas de calibração para verificar se haveria variação nas equações quando diferentes concentrações do etanol fossem empregadas na solubilização (caso houvesse, determinar fator de correção para os ensaios do DCCR - seção 4.3.1). Contudo, neste último ensaio, as curvas foram feitas com um o extrato bruto concentrado, visto que o padrão de violaceína possui um alto custo e a intenção seria apenas detectar possíveis variações nas equações quando uma mesma amostra fosse diluída em soluções hidroalcoólicas de diferentes concentrações.

As respostas avaliadas nestes estudos foram a recuperação total de violaceína em termos de mg violaceína/L de extrato, conforme Equação 4, e o rendimento da recuperação da violaceína em termos de mg violaceína/g biomassa úmida, conforme Equação 5.

$$\text{Recuperação Total [mg vio / L extrato]} = \left(\frac{\text{Abs } 575\text{nm}}{A} \pm B \right) * \text{diluição} \quad \text{Eq. 4.}$$

$$\text{Rendimento [mg vio / g biomassa úmida]} = \frac{\text{mg violaceína}}{\text{L extrato}} * \left(\frac{1}{\frac{\text{g biomassa úmida}}{\text{L}}} \right) \quad \text{Eq. 5.}$$

Onde A é o coeficiente angular e B o coeficiente linear da equação da curva de calibração para a violaceína quantificada por espectrofotometria, conforme apresentado na seção 5.5.1.

4.7.2. Quantificação da violaceína por HPLC analítico

As amostras obtidas nos experimentos anteriores também foram monitoradas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). A análise foi realizada conforme preconizado por Rodrigues e colaboradores (2012), com modificações. Neste caso, os extratos brutos concentrados foram suspensos em etanol grau HPLC em concentração absoluta, deixados em banho ultrassônico por 10 minutos para melhor solubilização e, na sequência, as amostras foram filtradas em filtro PTFE hidrofóbico, com diâmetro do filtro 13 mm e do poro de 0,22 µm, sendo transferidas para vials de vidro âmbar.

Para a análise, 10µL das amostras foram injetadas em uma coluna C18 (Hypersil ODS, 5µm, 150 x 4,6mm) mantida a 30°C e instalada em um HPLC LC-20AT (SHIMADZU) equipado com módulo de comunicação CBM-20A, SPD-M20A, detector de arranjo de diodo (DAD) e com amostrador automático SIL-20A, com UV-vis 254nm. Para a eluição, foram utilizadas a fase móvel A, composta por água ultrapura, e a fase móvel B, composta por etanol grau HPLC, com taxa de fluxo de 0,7 mL/min. O perfil do eluente foi: 0-4 min gradiente de 30% até 40% de B; 4-8 min gradiente de 40% até 50% de B; 8-17 min gradiente de 50% até 90% de B; 17-22 min gradiente mantido em 90% de B; 22-26 min gradiente de 90% até 30% de B e então o sistema retornou para as condições iniciais, 26-29 min gradiente mantido em 30% de B. O tempo total da corrida foi de 29 min, sendo o software *LabSolutions Shimadzu* utilizado para a aquisição de dados, controle de instrumentos e processamento. A detecção da matriz de diodos foi realizada entre 200 e 700 nm, sendo as amostras injetadas em triplicata e avaliadas em 254 e 575 nm. A violaceína e a deoxiviolaceína foram identificadas por comparação do tempo de retenção com o padrão analítico.

Diferentes concentrações do padrão analítico de violaceína (1 a 100 mg/L) foram utilizadas para construir uma curva de calibração, com a finalidade de se expressar os resultados

em termos de mg de violaceína/L e mg de deoxiviolaceína/L. As concentrações de cada analito foram calculadas a partir da porcentagem da sua área de pico multiplicada pela concentração do padrão calculada em cada ponto da curva, sendo considerado também a correção da pureza do padrão. O padrão foi diluído em etanol grau HPLC e injetados nas mesmas condições das amostras.

As respostas avaliadas por este método foram: a recuperação total de violaceína (mg violaceína/L de extrato, Equação 4) e recuperação total de deoxiviolaceína (mg deoxiviolaceína/L de extrato, Equação 4), sendo em ambos os casos os valores dos coeficientes angulares e lineares da curva de calibração para a violaceína e para a deoxiviolaceína quantificada por HPLC analítico apresentados na seção 5.1.2; o rendimento de recuperação da violaceína (mg violaceína/g biomassa úmida, Equação 5) e o rendimento de recuperação da deoxiviolaceína (mg de deoxiviolaceína/g biomassa úmida, Equação 5).

4.8. Análises estatísticas

Todos os dados experimentais realizados em triplicata foram avaliados pelo teste de comparação múltipla – Teste de Tukey (p-valor < 0,10), no software Sisvar, e os resultados expressos em média \pm desvio padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção da violaceína

Após o processo fermentativo, o caldo de cultivo e a biomassa rica em violaceína apresentaram cor azul-púrpura escura bastante pronunciada, como pode visto na Figura 5.

Figura 5. Caldo de cultivo fermentado rico em violaceína, obtido por fermentação do meio Y5F com *Janthinobacterium* sp. após cultivo a 25°C por 120 h.

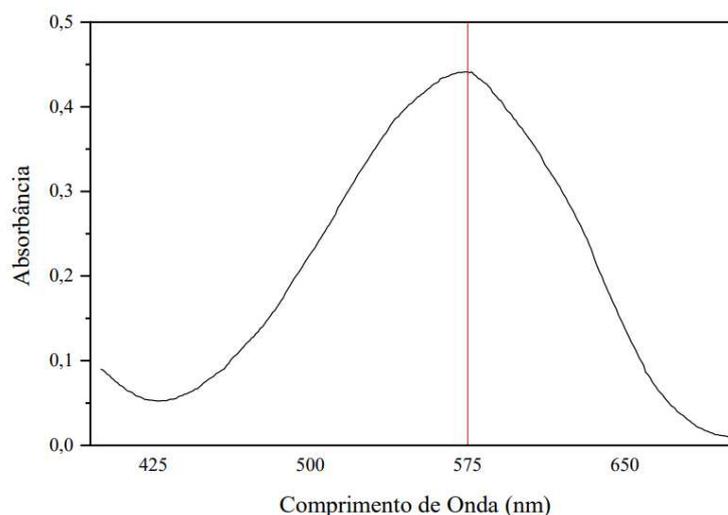


Fonte: O próprio autor.

5.2. Extração da violaceína

As concentrações de violaceína e deoxiviolaceína obtidas neste estudo foram determinadas conforme curvas de calibração descritas na seção 5.5. Foi realizado também a varredura de absorção em espectro UV-VIS, de 400 a 700 nm, e a máxima absorção foi observada em 575 nm (Figura 6), sendo esse o comprimento de onda utilizado para quantificação da violaceína, tanto por espectrofotômetro quanto por HPLC analítico. Os resultados de cada um dos ensaios específicos de extração estão apresentados a seguir.

Figura 6. Varredura de absorção em espectro UV-vis do padrão analítico da violaceína.

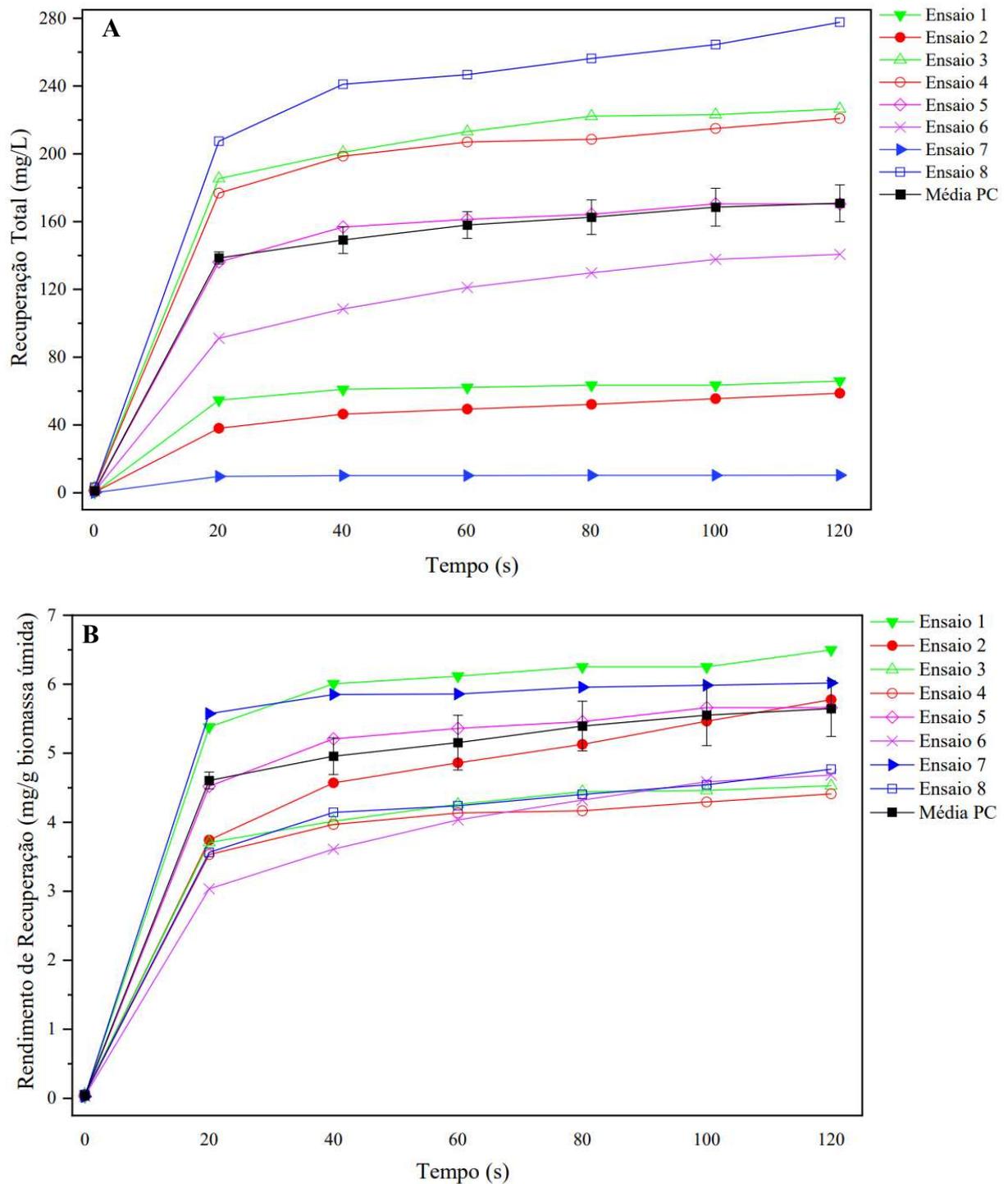


5.2.1. Estudo da cinética de extração em tubos agitados

Sabe-se que na literatura não existe uma única metodologia padronizada de extração da violaceína, contudo, os processos comumente descritos envolvem a recuperação por processos de maceração da biomassa com solventes orgânicos, especialmente metanol e etanol em concentrações absolutas, sendo os maiores teores de recuperação total obtidos para o metanol (PERIZ et al., 2020). Desta forma, considerando que o metanol possui polaridade superior ao etanol (0,796 contra 0,680), e que soluções aquosas de etanol 80% possui polaridade intermediária de 0,738 (REICHARDT, 1979), além do que, o etanol é um solvente menos tóxico e ambientalmente amigável em relação ao metanol (FDA; CDER, 2017), avaliamos se diferentes concentrações de etanol em água poderiam resultar em maiores teores de recuperação total quando comparadas a extração com etanol absoluto, visto que a mistura acarreta em um aumento da polaridade do solvente (REICHARDT, 1979). Além disso, a razão de sólido/líquido é outro efeito importante a ser considerado, uma vez que este fator pode afetar a taxa de transferência de massa e a difusão no analito no solvente (LUNA et al, 2020).

Neste sentido, com base no delineamento experimental (Tabela 2), foram realizados 11 ensaios empregando-se diferentes concentrações de soluções hidroalcoólicas (% EtOH) associadas a diferentes razões de biomassa úmida/solvente (g/L bio). Para cada ensaio foram avaliadas as cinéticas de recuperação total (Figura 7A) e de rendimento de recuperação (Figura 7B) da violaceína e da deoxiviolaceína, a fim de se obter um sistema mais exaustivo de extração. Os ensaios do ponto central estão apresentados como a média do ponto central (Média PC) com suas respectivas barras de erro. No texto usaremos os termos “pigmentos azuis” ou “pigmentos azulados” para se referir ao conteúdo de violaceína junto à deoxiviolaceína.

Figura 7. Cinética de recuperação total (a) e cinética do rendimento de recuperação (b) dos pigmentos azuis, ambas quantificadas por espectrofotometria. Ensaio 1: 61% EtOH e 10 g/L bio; Ensaio 2: 93% EtOH e 10 g/L bio; Ensaio 3: 61% EtOH e 50 g/L bio; Ensaio 4: 93% EtOH e 50 g/L bio; Ensaio 5: 54,5% EtOH e 30 g/L bio; Ensaio 6: 99,5% EtOH e 30 g/L bio; Ensaio 7: 77% EtOH e 1,72 g/L bio; Ensaio 8: 77% EtOH e 58,2 g/L bio; Média PC: 77% EtOH e 30 g/L bio. Cinéticas representadas com a mesma cor possuem a mesma % EtOH.



Uma análise mais detalhada sobre o efeito da razão de biomassa úmida/solvente e concentração de etanol serão apresentadas adiante no texto. Porém, uma observação mais cuidadosa da Figura 7 já permite identificar que o aumento da recuperação total dos pigmentos azuis foi diretamente proporcional ao aumento da razão biomassa úmida/solvente, sendo, portanto, obtidos os maiores teores para os ensaios 8 (58,28 g/L), 3 e 4 (50 g/L), respectivamente. Concentrações intermediárias foram verificadas para os ensaios do ponto central e para os ensaios 5 e 6 (30g/L), respectivamente, enquanto que as recuperações totais mais baixas foram obtidas para os ensaios 1, 2 (10g/L) e 7 (1,72g/L), respectivamente. Já no caso da concentração de etanol, foi observado que, fixando-se os níveis de razão biomassa úmida/solvente, foram obtidos maiores teores totais de pigmentos azulados para etanol 61% (ensaios 1 e 3) do que para etanol 93% (ensaios 2 e 4) nos ensaios fatoriais, bem como, nos ensaios axiais a recuperação foi maior para etanol 54,5% (ensaio 5) em comparação a etanol 99,5% (ensaio 6). Contudo, a diferença entre os valores para cada nível fixado foi baixa, além do que, maiores considerações foram feitas a partir dos resultados obtidos por quantificação em HPLC analítico, como discutido mais adiante.

Em contrapartida, o aumento do rendimento de recuperação dos pigmentos azuis foi inversamente proporcional ao aumento da razão biomassa úmida/solvente, sendo as maiores respostas observadas para as menores razões de biomassa/solvente. Maiores rendimentos de recuperação para os ensaios empregando-se concentrações mais baixas de etanol também foram verificadas, como pode ser visto na Figura 7B.

Com base nos resultados nota-se que, com poucas exceções e desprezando pequenas oscilações, 60 segundos de extração é tempo suficiente para assegurar que o equilíbrio de recuperação dos pigmentos azulados foi estabelecido para ambas as respostas avaliadas. Por este motivo, fixamos este tempo para os testes de extração posteriores. Além disso, para melhor avaliação dos dados, os resultados obtidos neste referido tempo foram tratados no software Protimiza Experimental Design, e os parâmetros estatisticamente significativos à um nível de confiança de 90% (p -valor $< 0,10$) foram utilizados para a construção de um modelo.

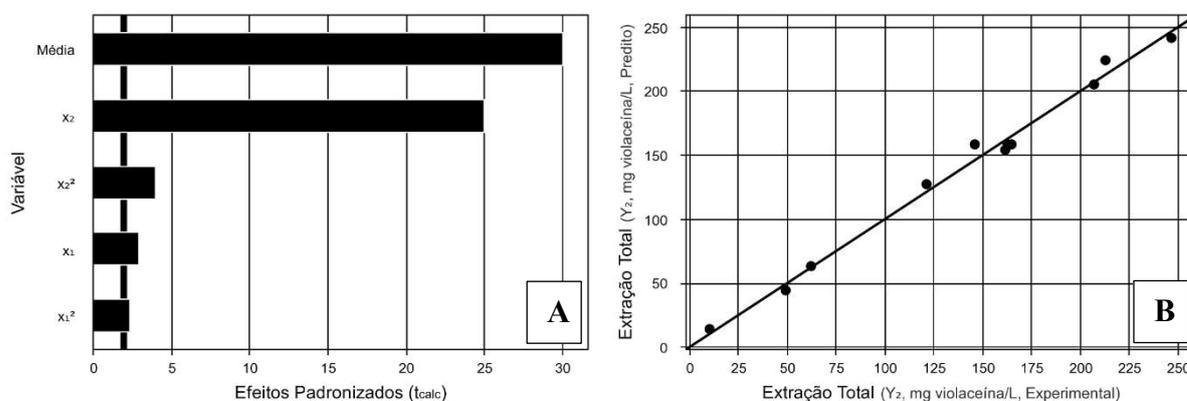
Para a resposta de recuperação total dos pigmentos azuis, o modelo ajustado incluiu os coeficientes de regressão linear e quadráticos da concentração do solvente (X_1) e da razão biomassa úmida/solvente (X_2), o qual é representado pela Equação 6. Os valores dos coeficientes de regressão (Tabela 4), o gráfico de Pareto com as variáveis significativas (Figura 8A) e o gráfico referente ao erro relativo das predições do modelo comparadas às respostas experimentais (Figura 8B) estão apresentados logo abaixo.

$$\text{Recuperação total [mg/ L]} = 158,01 - 9,46X_1 - 8,86X_1^2 + 80,41X_2 - 15,28X_2^2 \quad \text{Eq.6.}$$

Tabela 4. Coeficientes de regressão para a recuperação total dos pigmentos azuis quantificados por espectrofotometria.

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	158,01	5,26	30,05	< 0,0001
X ₁	-9,46	3,22	-2,94	0,0260
X ₁ ²	-8,87	3,83	-2,31	0,0600
X ₂	80,41	3,22	24,98	< 0,0001
X ₂ ²	-15,29	3,83	-3,99	0,0072
X ₁ · X ₂	Não estatisticamente significativo			

Figura 8. Gráfico de Pareto com as variáveis significativas (a) e gráfico de erro relativo das predições do modelo comparadas às respostas experimentais (b) para a recuperação total dos pigmentos azuis quantificados por espectrofotometria.



A Tabela 5 apresenta os resultados da análise variância (ANOVA) para este modelo. Observa-se que o F-calculado da regressão foi 51 vezes maior que o F-tabelado (3,18), bem como o F-calculado para o teste de falta de ajuste foi 13,2 vezes menor que o F-tabelado (9,24), o que indica que o modelo está bem ajustado aos dados experimentais. Além disso, o coeficiente de determinação (R^2) foi satisfatório, mostrando que as variáveis estatisticamente significativas do modelo explicam 99,09% da variação da recuperação total dos pigmentos azuis, e o p-valor para a regressão foi < 0,0001. Portanto, o modelo obtido foi considerado adequado para a

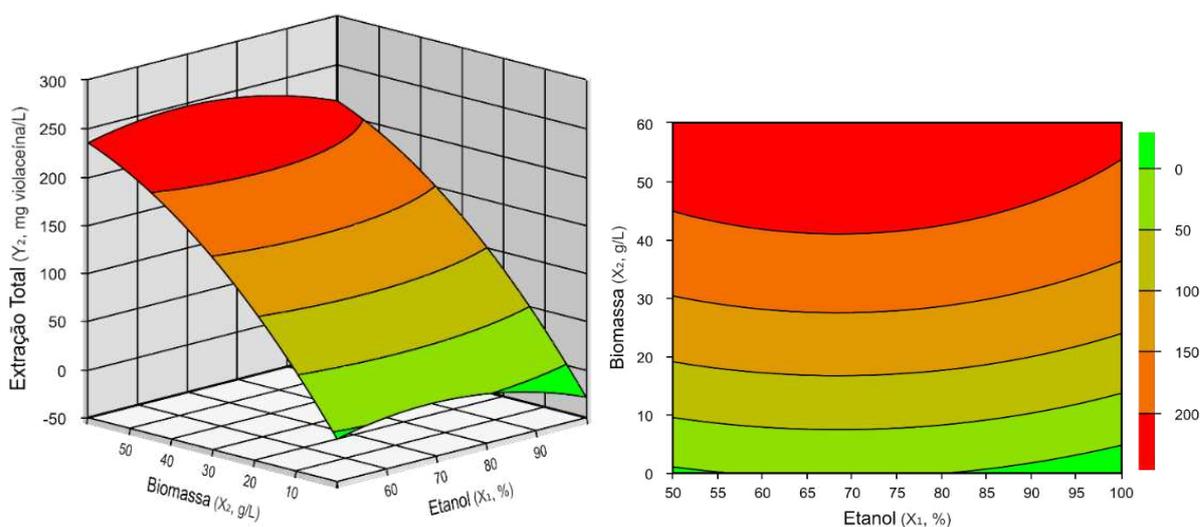
predição da recuperação total dos pigmentos azulados, sendo a sua representação gráfica apresentada na Figura 9.

Tabela 5. ANOVA para a recuperação total de pigmentos azuis quantificados por espectrofotometria.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F-calculado	p-valor
Regressão	53885,0	4	13471,5	162,4	< 0,0001
Resíduos	497,6	6	82,9		
Falta de Ajuste	283,7	4	70,9	0,7	0,67499
Erro Puro	213,9	2	107,0		
Total	54383,6	10			
$R^2 = 99,08\%$				$F\text{-tab}_{(4,6)} = 3,18$	$F\text{-tab}_{(4,2)} = 9,24$

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio

Figura 9. Curva de contorno para a recuperação total dos pigmentos azuis quantificados por espectrofotometria.



A partir da análise da Figura 9, pode-se concluir que, de fato, o aumento da concentração de biomassa úmida apresentou maior efeito positivo na recuperação total dos pigmentos azulados. Esse efeito também pode ser verificado pelo coeficiente linear de X_2 (Eq. 6), visto que este foi o maior valor positivo (+80,41) dentre os coeficientes obtidos. Este resultado já era esperado, uma vez que quanto maior a razão biomassa úmida/solvente, maior a quantidade de violaceína e deoxiviolaceína disponível para ser extraída (até se atingir a completa saturação do

solvente). Ademais, a recuperação total dos pigmentos azuis se demonstrou bastante robusta para toda a faixa de concentração de solvente estudada (54,5 a 99,5% etanol), de forma que grandes variações na concentração de etanol resultaram em uma pequena variação na resposta. Os efeitos positivos máximos foram obtidos em $X_1 = -0,4375$ (etanol 70%) e $X_2 = 1,41$ (58,2 g/L biomassa úmida).

Por outro lado, ao analisar a resposta de rendimento de recuperação dos pigmentos azulados, o modelo ajustado obtido incluiu os coeficientes de regressão linear da concentração do solvente (X_1) e da razão biomassa úmida/solvente (X_2), o coeficiente de regressão quadrático de X_2 e o coeficiente de interação X_1 e X_2 , cuja equação está representada logo abaixo (Equação 7). Os valores dos coeficientes de regressão (Tabela 6), o gráfico de Pareto com as variáveis significativas (Figura 10A) e o gráfico do erro relativo das predições do modelo comparadas às respostas experimentais (Figura 10B) estão apresentados a seguir.

$$\text{Rendimento [mg/g biomassa úmida]} = 5,10 - 0,41X_1 - 0,22 X_1^2 - 0,61X_2 + 0,28 X_1.X_2 \quad \text{Eq.7.}$$

A Tabela 7 apresenta os resultados da análise variância para o modelo. Neste caso, o valor de F-calculado da regressão foi somente 3,9 vezes maior que o F-tabelado (3,18), enquanto que o F-calculado para o teste de falta de ajuste foi 92,4 vezes menor que o F-tabelado (9,24), indicando também que o modelo está ajustado aos dados experimentais. A porcentagem de variação explicada (R^2) também foi satisfatória (89,16%), e o p-valor para a regressão foi $< 0,01$. Desta forma, apesar de não tão bem ajustado como no caso da recuperação total (Eq. 6), o modelo obtido foi satisfatório para a predição do rendimento de recuperação dos pigmentos azulados, sendo a sua representação gráfica mostrada na Figura 11.

Tabela 6. Coeficientes de regressão para o rendimento de recuperação dos pigmentos azuis quantificados por espectrofotometria.

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	5,10	0,13	38,47	< 0,0001
X₁	-0,41	0,11	-3,65	0,0107
X₁²	-0,22	0,13	-1,72	0,1359
X₂	-0,61	0,11	-5,46	0,0016
X₂²	Não estatisticamente significativo			
X₁ · X₂	0,28	0,16	1,79	0,1232

Figura 10. Gráfico de Pareto com as variáveis significativas (a) e gráfico de erro relativo das predições do modelo comparadas às respostas experimentais (b) para o rendimento de recuperação dos pigmentos azuis quantificados por espectrofotometria.

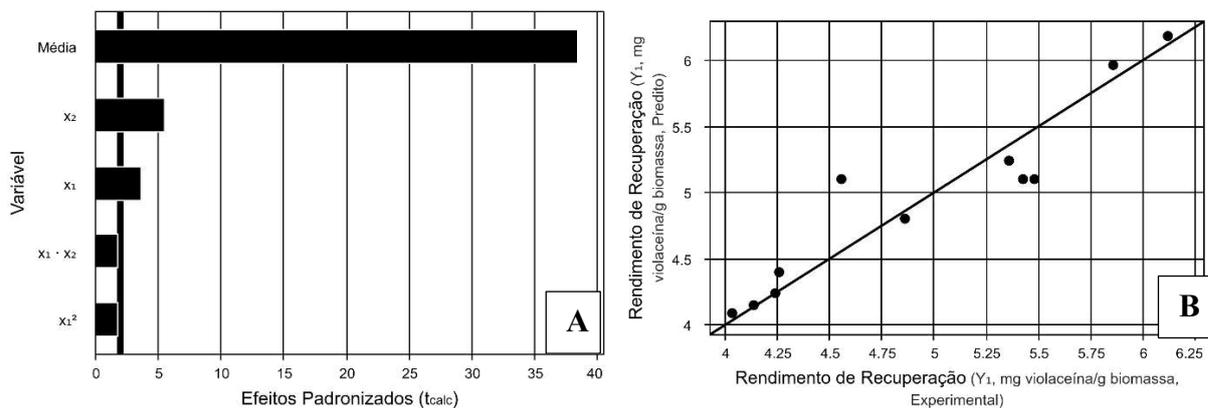
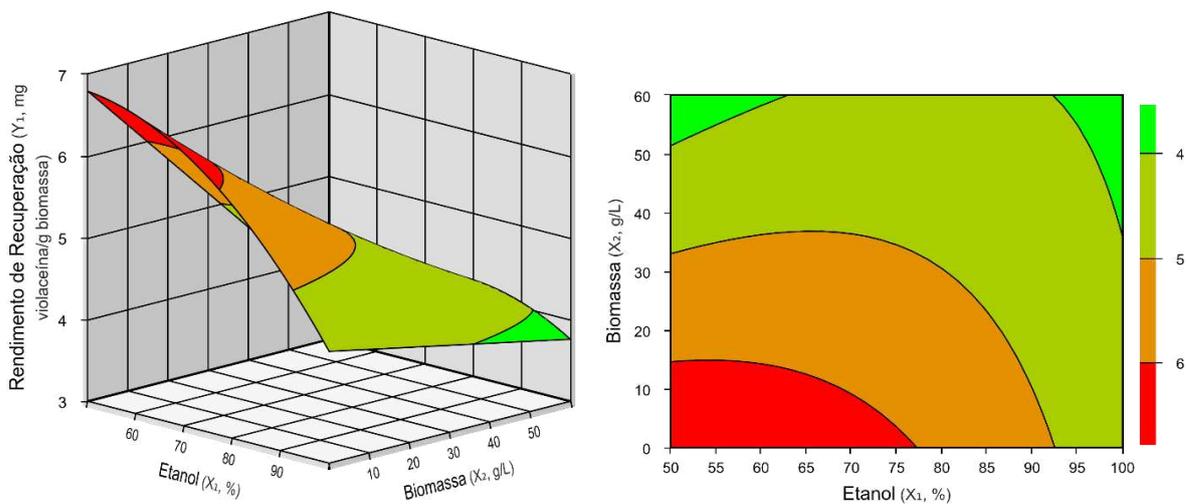


Tabela 7. ANOVA para o rendimento de recuperação dos pigmentos azuis quantificados por espectrofotometria.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F-calculado	p-valor
Regressão	4,9	4	1,2	12,3	0,00468
Resíduos	0,6	6	0,1		
Falta de Ajuste	0,1	4	0,0	0,1	0,98884
Erro Puro	0,5	2	0,3		
Total	5,5	10			
$R^2 = 89,16\%$				$F\text{-tab}_{(4,6)} = 3,18$	$F\text{-tab}_{(4,2)} = 9,24$

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio

Figura 11. Curva de contorno para o rendimento de recuperação dos pigmentos azuis quantificada por espectrofotometria.



Assim, a partir da análise da Figura 11, podemos confirmar que o aumento do rendimento de recuperação dos pigmentos azulados foi inversamente proporcional ao aumento da razão biomassa úmida/solvente (X_2) e ao aumento da concentração de etanol (X_1), como foi observado na Figura 7B. Esses efeitos podem ser verificados também pelos coeficientes lineares de X_1 e X_2 (Eq. 7), dados que seus valores negativos, -0,41 e -0,61, respectivamente, indicam que quanto maior é o aumento da razão biomassa úmida/solvente e da concentração do solvente, menor é o rendimento de recuperação da violaceína e da deoxiviolaceína, sendo o efeito de X_2 mais significativo que o efeito de X_1 . Já no caso da concentração da solução hidroalcoólica, os valores de máximo rendimento de recuperação se encontram em concentrações de etanol entre 50-75%. Desta forma, os efeitos positivos máximos foram obtidos em X_1 e $X_2 = -1,41$ (etanol 54,5% e 1,72 g/L biomassa úmida).

Ressalta-se que o efeito obtido para concentração de biomassa (X_2) também já era esperado, uma vez que baixas razões de biomassa/solvente permitem uma maior superfície de contato entre a biomassa e o solvente, além de maior quantidade do solvente em relação aos pigmentos, o que diminui a propensão a saturação do solvente com violaceína e a deoxiviolaceína e mantém um maior gradiente de concentração dos pigmentos azulados entre a biomassa e o solvente. Todavia, maximizar o rendimento de extração nem sempre é vantajoso, principalmente do ponto de vista industrial e econômico, devido a maior quantidade de solvente empregada para tratar cada grama de biomassa (maior gasto com solvente em si e, posteriormente, com sua remoção). Assim, a escolha entre priorizar recuperação total ou rendimento de extração deve ser feita com uma avaliação caso a caso, considerando as diversas características do processo e do produto.

Posteriormente, para uma avaliação mais detalhada, as amostras obtidas em 60 segundos de extração foram também quantificadas em termos de concentração de violaceína e deoxiviolaceína por HPLC analítico, cujos resultados estão apresentados na Tabela 8. Foram calculados, a partir das curvas de calibração (sessão 5.5.2), a concentração de recuperação total e de rendimento de recuperação para a violaceína e para a deoxiviolaceína isoladamente, sendo o valor da concentração total e do rendimento total do extrato considerada como a somatória de ambas as concentrações (violaceína + deoxiviolaceína). Estão expressos também as porcentagens de concentração da violaceína (% Vio) e da deoxiviolaceína (% Deoxi) em relação a concentração total do extrato. Para efeito de comparação, os resultados de concentração total e rendimento total do extrato quantificados por espectrofotômetro também estão demonstrados na Tabela 8.

Os resultados obtidos com estes novos dados foram novamente tratados no software Protimiza Experimental Design, e os parâmetros estatisticamente significativos à um nível de confiança de 90% (p -valor $< 0,10$) foram utilizados para a construção de um modelo, da mesma forma que feito anteriormente para os dados obtidos com espectrofotômetro (Eq. 6 e 7), sendo a comparação entre estes resultados apresentadas na discussão a seguir.

Antes de dar prosseguimento à análise dos modelos obtidos com os dados de violaceína e deoxiviolaceína quantificados em HPLC analítico, vale uma discussão acerca das diferenças encontradas entre este método e o anterior. Neste caso, foi observado que os resultados obtidos pelo método de quantificação em espectrofotometria foram sempre superestimados em relação aos obtidos por quantificação em HPLC analítico, sendo os maiores erros relativos obtidos para os ensaios empregando-se menores concentrações de etanol e maiores razões de biomassa úmida/solvente, como pode ser observado no gráfico de distribuição dos resultados de recuperação total obtidos por ambos os métodos (Figura 12).

Os pontos muito acima da linha de regressão linear, os quais representam os resultados mais inflacionados, são referentes aos ensaios 3 (etanol 61% e 50 g/L biomassa), ensaio 5 (etanol 54,5% e 30 g/L biomassa) e ensaio 8 (etanol 77% e 58,20 g/L biomassa), com uma média de erro relativo de 80,5%. De forma geral, há uma forte correlação linear entre ambos resultados e o coeficiente angular desta curva indica que, na média, os dados em espectrofotômetro estão superestimados em cerca de 55%.

Essa disparidade entre as quantificações pode estar relacionada a pequena variação na leitura de absorbância ao usar diferentes concentrações do solvente etanol (discutido na sessão 5.5.1), bem como a presença de partículas em suspensão nestas amostras ou a erros inerentes as diluições dos extratos. Estudos anteriores já relataram que, a partir da análise paralela dos

extratos obtidos de cepas recombinantes com produção heteróloga de violaceína ou deoxiviolaceína comparadas as soluções destes compostos purificados, foram verificados que as medições espectrofotométricas superestimam fortemente os níveis da violaceína em até 680% e da deoxiviolaceína em até 320% (RODRIGUES et al., 2013).

Além disso, revisões reportam também que, devido as diferenças entre os coeficientes de extinção molar usados para a quantificação de extratos da violaceína em espectrofotômetro, os quais variam entre 10,96 e 74,3 L/g.cm em etanol (570-575 nm), os rendimentos de recuperação reivindicados na literatura são bastante inconsistentes (CHOI et al., 2021; DURÁN et al., 2016). Fato este que não ocorre para quantificações em HPLC analítico, uma vez que o coeficiente de extinção é calculado pela lei de Beer utilizando-se a violaceína pura de grau HPLC (RETTORI; DURÁN, 1998). Desta forma, apesar de os dados em espectrofotômetro terem sido importantes para a presente discussão, os ensaios subsequentes basearam-se apenas em quantificações por HPLC analítico.

Figura 12. Gráfico de distribuição dos resultados de recuperação total dos pigmentos azuis quantificados por HPLC vs. espectrofotômetro (■).

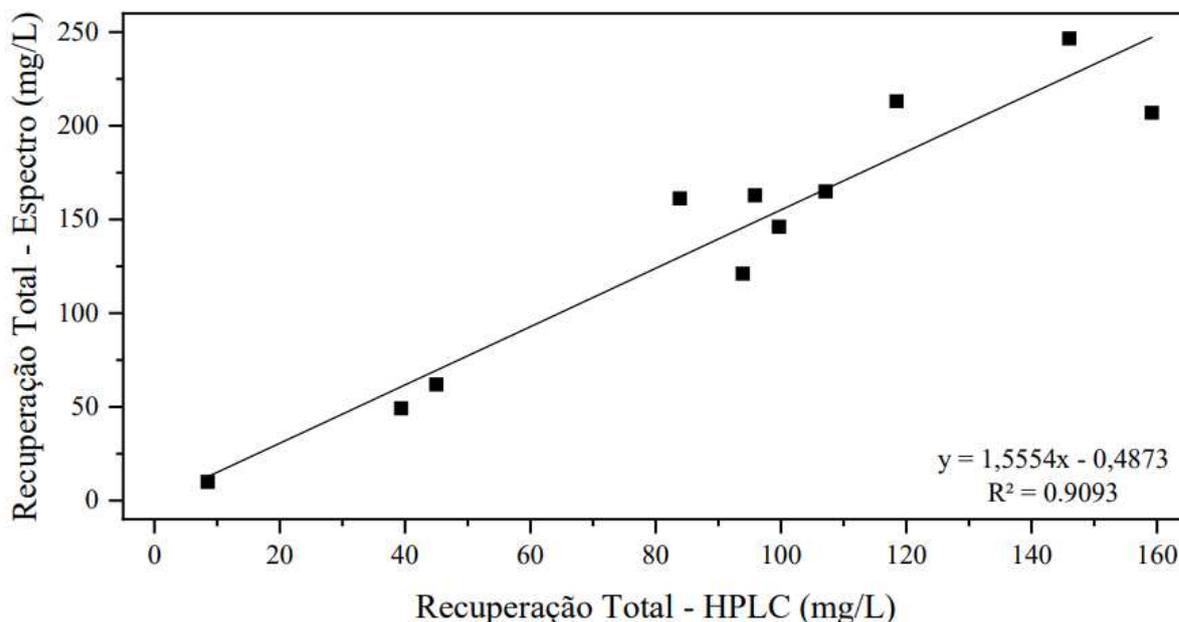


Tabela 8. Resultados de recuperação total e rendimento de recuperação dos pigmentos azuis quantificados por HPLC analítico e espectrofotômetro.

Ensaio	Cód.	Etanol (%)	Cód.	Bio:Sol (g/L)	Recuperação Total (mg / L extrato)				Rendimento de Recuperação (mg / g biomassa úmida)				% Vio	% Deoxi
					HPLC			Espectro	HPLC			Espectro		
					Violaceína	Deoxivio.	Conc. Total	Conc. Total	Violaceína	Deoxivio.	Rend. Total	Rend. Total		
1	-1	61	-1	10	41,78	3,19	44,97	62,10	4,12	0,31	4,43	6,12	92,91	7,09
2	1	93	-1	10	36,48	2,88	39,37	49,38	3,59	0,28	3,87	4,86	92,67	7,33
3	-1	61	1	50	108,76	9,68	118,43	213,12	2,17	0,19	2,37	4,26	91,83	8,17
4	1	93	1	50	146,47	12,73	159,19	206,99	2,93	0,25	3,18	4,14	92,00	8,00
5	-1,41	54,5	0	30	76,62	7,21	83,83	161,35	2,55	0,24	2,78	5,36	91,40	8,60
6	+1,41	99,5	0	30	86,39	7,48	93,87	121,15	2,88	0,25	3,13	4,03	92,03	7,97
7	0	77	-1,41	1,72	7,89	0,58	8,47	10,08	4,59	0,34	4,92	5,86	93,13	6,87
8	0	77	+1,41	58,28	133,77	12,24	146,01	246,74	2,30	0,21	2,51	4,24	91,62	8,38
9	0	77	0	30	88,47	7,35	95,82	162,93	2,94	0,24	3,19	5,42	92,33	7,67
10	0	77	0	30	99,14	7,96	107,10	164,98	3,29	0,26	3,56	5,48	92,56	7,44
11	0	77	0	30	92,21	7,44	99,65	146,13	3,06	0,25	3,31	4,56	92,53	7,47

A análise mais detalhada dos resultados obtidos por quantificação em HPLC analítico estão apresentadas a seguir. Nos textos subsequentes continuaremos utilizando dos termos “pigmentos azuis” ou “pigmentos azulados” para se referir ao conteúdo de violaceína somado ao da deoxiviolaceína.

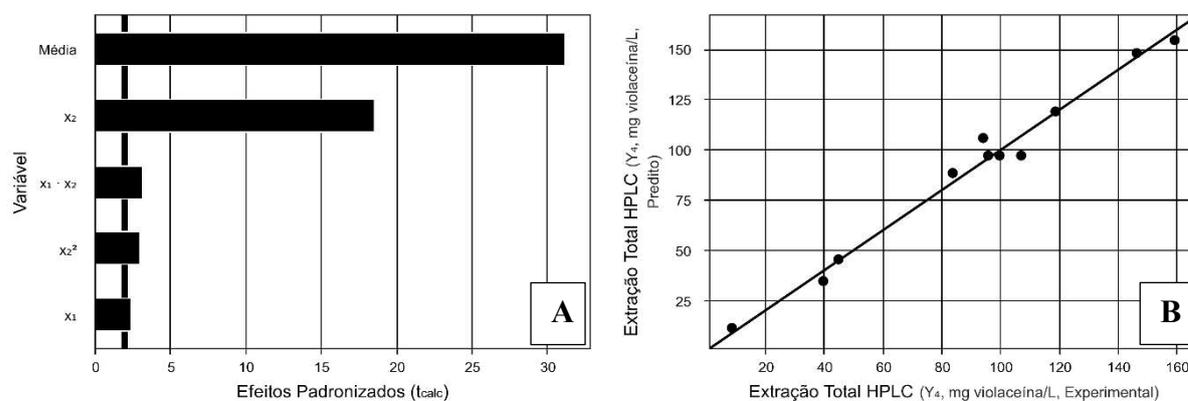
Para a resposta de recuperação total dos pigmentos azulados quantificados por HPLC analítico, o modelo ajustado incluiu os coeficientes de regressão linear da concentração do solvente (X_1) e da razão biomassa úmida/solvente (X_2), o coeficiente de regressão quadrático de X_2 e o coeficiente de interação X_1 e X_2 , sendo o modelo representado pela Equação 8. Os valores dos coeficientes de regressão (Tabela 9), o gráfico de Pareto com as variáveis significativas (Figura 13A) e o gráfico referente ao erro relativo das predições do modelo comparadas às respostas experimentais (Figura 13B) estão mostrados logo abaixo.

$$\text{Recuperação Total [mg / L]} = 96,96 + 6,17X_1 + 48,48X_2 - 8,73X_2^2 + 11,59.X_1.X_2 \quad \text{Eq.8.}$$

Tabela 9. Coeficientes de regressão para a recuperação total dos pigmentos azuis quantificados por HPLC analítico.

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	96,96	3,11	31,18	< 0,0001
X₁	6,17	2,62	2,36	0,0565
X₁²	Não estatisticamente significativo			
X₂	48,48	2,62	18,52	< 0,0001
X₂²	-8,73	2,98	-2,93	0,0262
X₁ · X₂	11,59	3,70	3,13	0,0203

Figura 13. Gráfico de Pareto com as variáveis significativas (a) e gráfico de erro relativo das predições do modelo comparadas às respostas experimentais (b) para a recuperação total dos pigmentos azuis quantificados por HPLC analítico.



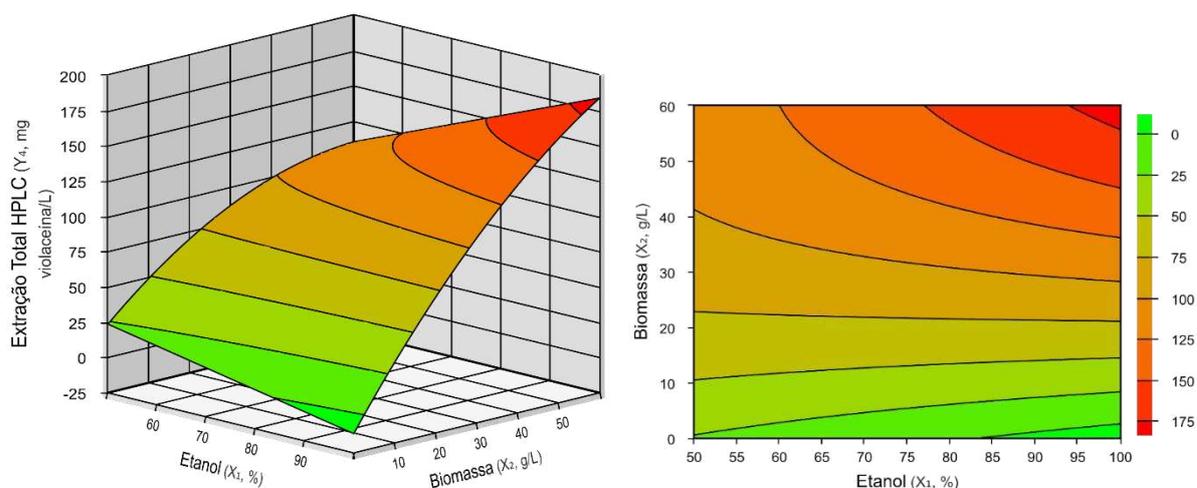
A Tabela 10 apresenta os resultados da análise variância para este modelo. Neste caso, observa-se que o F-calculado da regressão foi 28,87 vezes maior que o F-tabelado (3,18) e que o F-calculado para o teste de falta de ajuste foi 4,62 vezes menor que o F-tabelado (9,24), o que indica que o modelo está bem ajustado aos dados experimentais. Além disso, o coeficiente de determinação (R^2) foi satisfatório, mostrando que as variáveis estatisticamente significativas do modelo explicam 98,39% da variação da recuperação total da violaceína e da deoxiviolaceína, bem como o p-valor para a regressão foi $< 0,0001$. Portanto, o modelo obtido foi considerado adequado para a predição da recuperação total dos pigmentos azulados quantificados por HPLC analítico, sendo a sua representação gráfica apresentada na Figura 14.

Tabela 10. ANOVA para a recuperação total dos pigmentos azuis quantificados por HPLC analítico.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F-calculado	p-valor
Regressão	20112,0	4	5028,0	91,8	0,00002
Resíduos	328,8	6	54,8		
Falta de Ajuste	262,8	4	65,7	2,0	0,36076
Erro Puro	65,9	2	33,0		
Total	20440,7	10			
$R^2 = 99,39\%$				$F\text{-tab}_{(4,6)} = 3,18$	$F\text{-tab}_{(4,2)} = 9,24$

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio

Figura 14. Curva de contorno para a recuperação total de violaceína quantificada por HPLC.



Ao analisar a curva de contorno da Figura 14, percebemos uma alteração significativa nos efeitos de concentração do solvente (X_1) para a recuperação total dos pigmentos azulados quantificados por HPLC (Eq. 8) quando comparadas aos efeitos de X_1 para a mesma resposta obtida por quantificação em espectrofotômetro (Eq. 6). O coeficiente linear de X_1 que antes era negativo (-9,46) agora é positivo (+6,17), indicando que o aumento na concentração do solvente implica no aumento da recuperação total da violaceína e da deoxiviolaceína. Além do mais, agora verifica-se um efeito de interação entre concentração do solvente e da biomassa ($X_1.X_2$), com um coeficiente positivo de +11,59, o que representa que há um aumento na recuperação total em resposta ao aumento de ambos os fatores.

Contudo, o maior efeito continua sendo o da razão biomassa úmida/solvente (X_2), dado o seu o coeficiente linear positivo de +48,48. Assim, o modelo prevê que a recuperação máxima ocorre em X_1 e $X_2 = +1,41$ (etanol 99,5% e 58,2 g/L biomassa úmida). Tais alterações podem ser justificadas pelas diferenças entre as quantificações por ambas as técnicas, visto que os maiores erros relativos foram observados para a faixa de concentração do solvente e da razão biomassa úmida/solvente onde houve maior alteração dos efeitos destas variáveis, como discutido anteriormente na Figura 12.

Enquanto isso, para o rendimento de recuperação dos pigmentos azulados, o modelo ajustado incluiu os coeficientes de regressão linear e quadráticos da razão biomassa úmida/solvente (X_2), o coeficiente de regressão quadrático da concentração do solvente (X_1) e o coeficiente de interação desses fatores. O modelo está representado pela Equação 9. Os valores dos coeficientes de regressão (Tabela 11), o gráfico de Pareto com as variáveis

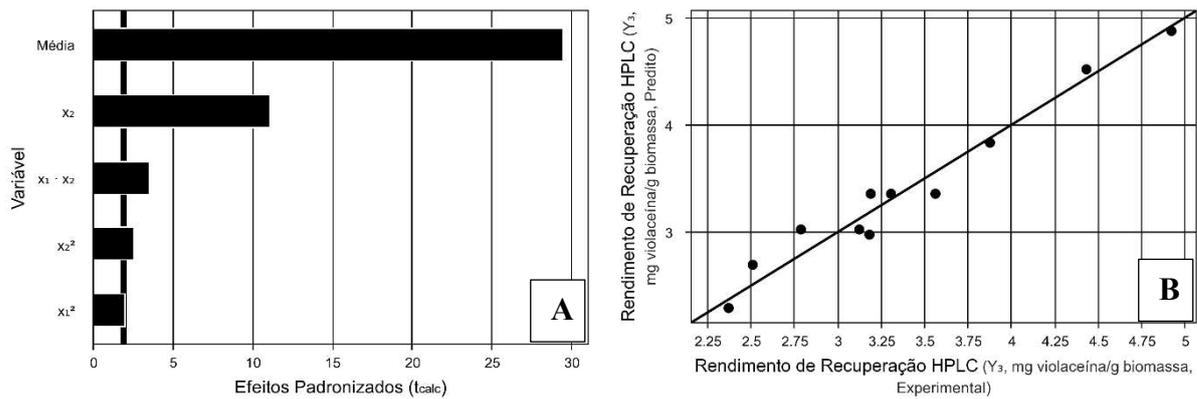
significativas (Figura 15A) e o gráfico do erro relativo das previsões do modelo comparadas às respostas experimentais (Figura 15B) estão mostrados a seguir.

$$\text{Rendimento [mg/gbiomassa úmida]} = 3,35 - 0,17X_1^2 - 0,77X_2 + 0,21X_2^2 + 0,34X_1 \cdot X_2 \quad \text{Eq.9.}$$

Tabela 11. Coeficientes de regressão para o rendimento de recuperação dos pigmentos azuis quantificados por HPLC analítico.

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	3,35	0,11	29,48	< 0,0001
X_1	Não estatisticamente significativo			
X_1^2	-0,17	0,08	-2,01	0,0913
X_2	-0,77	0,07	-11,08	< 0,0001
X_2^2	0,21	0,08	2,58	0,0415
$X_1 \cdot X_2$	0,34	0,10	3,47	0,0132

Figura 15. Gráfico de Pareto com as variáveis significativas (a) e gráfico de erro relativo das previsões do modelo comparadas às respostas experimentais (b) para o rendimento de recuperação dos pigmentos azuis quantificados por HPLC analítico.



A Tabela 12 apresenta os resultados da análise de variância (ANOVA) para este modelo. Para esta resposta, o valor de F-calculado da regressão foi 11,79 vezes maior que o F-tabelado (3,18), enquanto que o F-calculado para o teste de falta de ajuste foi 8,4 vezes menor que o F-tabelado (9,24), indicando também que o modelo está ajustado aos dados experimentais. A porcentagem de variação explicada (R^2) também foi satisfatória (96,15%), e o p-valor para a regressão foi $\ll 0,10$. Portanto, podemos concluir que o modelo obtido foi adequado para a

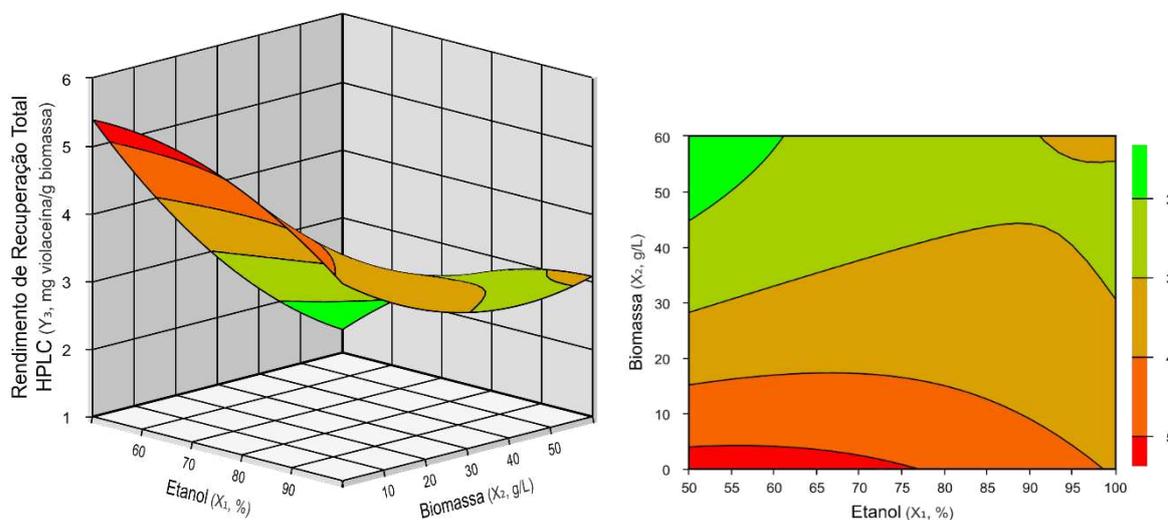
predição do rendimento de recuperação dos pigmentos azulados quantificados por HPLC analítico, sendo a sua representação gráfica mostrada na Figura 16.

Tabela 12. ANOVA para o rendimento de recuperação dos pigmentos azuis quantificados por HPLC analíticos.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F-calculado	p-valor
Regressão	5,8	4	1,5	37,5	0,00022
Resíduos	0,2	6	0,0		
Falta de Ajuste	0,2	4	0,0	1,1	0,51847
Erro Puro	0,1	2	0,0		
Total	6,1	10			
$R^2 = 96,15\%$				$F\text{-tab}_{(4,6)} = 3,18$	$F\text{-tab}_{(4,2)} = 9,24$

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio

Figura 16. Curva de contorno para o rendimento de recuperação dos pigmentos azuis quantificados por HPLC analítico.



Ao observarmos a Figura 16, percebemos que, quando comparados aos resultados obtidos por quantificação em espectrofotometria, apesar da pequena alteração na curva de contorno, a resposta máxima para o rendimento de recuperação continua sendo em X_1 e $X_2 = -1,41$ (54,5% etanol e 1,72 g/L biomassa), e que a concentração ideal de etanol ainda está na faixa de 50 a 75%, bem como o efeito linear negativo para a razão biomassa úmida/solvente (X_2) também continua sendo o coeficiente mais significativo (-0,77). Efeitos de interações entre

X_1 e X_2 também são observados, sendo o segundo maior coeficiente (+0,34) obtido, o que implica em um aumento ou diminuição no rendimento de recuperação em decorrência do aumento ou diminuição de ambos os termos.

Ao avaliar o rendimento de extração da violaceína produzida por *Y. lipolytica* utilizando-se o surfactante Tween 20, também foi observado que menores razões de biomassa/solvente (5 e 12,5 g/L) resultaram em maiores rendimentos de recuperação da violaceína, assim como maiores razões de biomassa úmida/solvente (35 e 50 g/L) não melhoraram significativamente o rendimento de extração, sendo selecionado pelos autores a concentração intermediária de 25 g células úmidas/L solvente para prosseguir com os demais estudos de extração, em razão do maior custo benefício do uso de concentrações intermediárias de biomassa (KHOLANY et al., 2020). Não foram encontrados estudos que avaliassem diferentes concentrações de etanol na extração da violaceína e da deoxiviolaceína.

Por fim, outra resposta avaliada pelas curvas de contorno foi a seletividade de extração da violaceína em virtude da variação da razão biomassa úmida/solvente e, principalmente, da concentração do solvente. Esta avaliação só foi possível com os dados de HPLC analítico, o qual separa e quantifica individualmente a violaceína e a deoxiviolaceína. Assim, as porcentagens de violaceína (% Vio) em relação a concentração total de pigmentos do extrato foram tratadas e os parâmetros estatisticamente significativos à um nível de confiança de 90% (p -valor $< 0,10$) foram utilizados para a construção de um modelo.

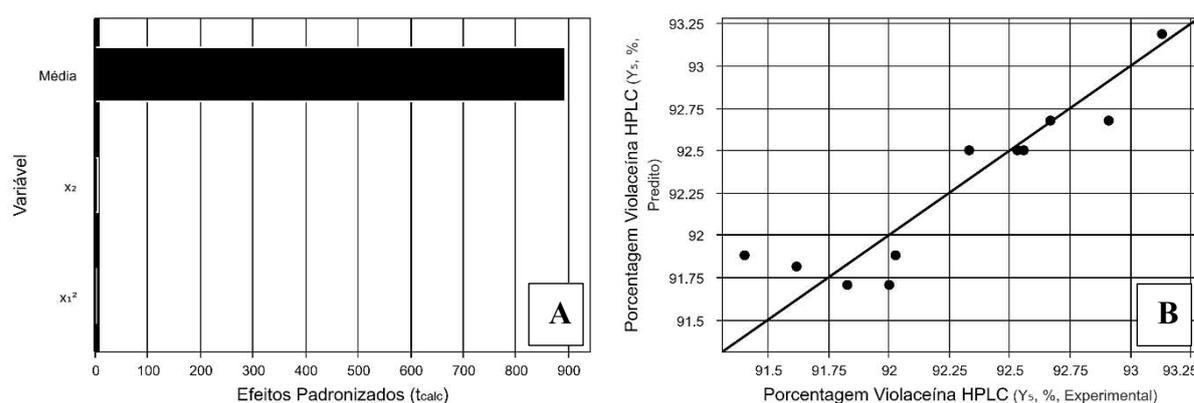
O modelo ajustado obtido incluiu o coeficiente de regressão linear da razão biomassa úmida/solvente (X_2) e o coeficiente de regressão quadrático da concentração solvente (X_1), sendo o modelo representado pela Equação 10. Os valores dos coeficientes de regressão (Tabela 13), o gráfico de Pareto com as variáveis significativas (Figura 17A) e o gráfico referente ao erro relativo das predições do modelo comparadas às respostas experimentais (Figura 17B) estão apresentados a seguir.

$$\text{Seletividade [\% violaceína]} = 92,50 - 0,31X_1^2 - 0,49X_2 \quad \text{Eq.10.}$$

Tabela 13. Coeficientes de regressão para a porcentagem de violaceína em relação a concentração total de pigmentos do extrato.

Fatores	Efeito	Erro Padrão	t calculado	p-valor
Média	92,50	0,10	894,30	< 0,0001
X₁		Não estatisticamente significativo		
X₁²	-0,31	0,10	-3,13	0,0139
X₂	-0,49	0,09	-5,58	0,0005
X₂²		Não estatisticamente significativo		
X₁ · X₂		Não estatisticamente significativo		

Figura 17. Gráfico de Pareto com as variáveis significativas (a) e gráfico de erro relativo das previsões do modelo comparadas às respostas experimentais (b) para a porcentagem de violaceína em relação a concentração total de pigmentos do extrato.



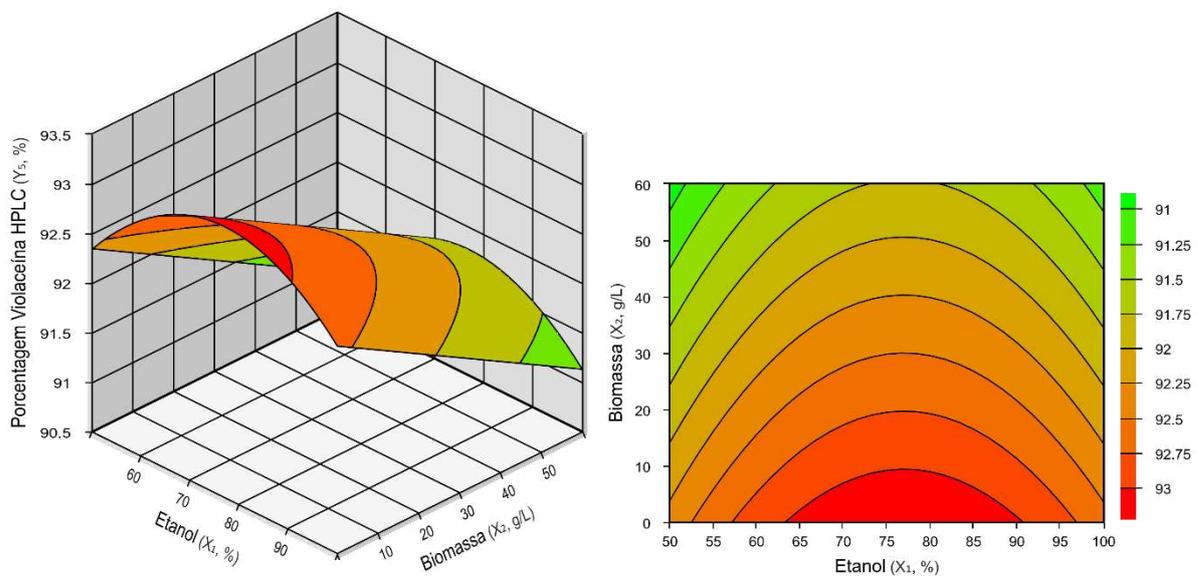
A Tabela 14 apresenta os resultados da análise variância para este modelo. Neste caso, o F-calculado da regressão foi 6,59 vezes maior que o F-tabelado (3,11), e o F-calculado para o teste de falta de ajuste foi 1,94 vezes menor que o F-tabelado (9,33), o que indica que o modelo está ajustado aos dados experimentais. O coeficiente de variação explicada (R^2), embora tenha sido o menor dentre os obtidos neste estudo (83,66%), também pôde ser considerado satisfatório, bem como o p-valor para a regressão foi < 0,001. Desta forma, o modelo obtido foi considerado adequado para a predição da porcentagem de violaceína em relação à concentração total de pigmentos do extrato. O gráfico do modelo está apresentado na Figura 18.

Tabela 14. ANOVA para a porcentagem de violaceína em relação a concentração total de pigmentos do extrato.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F-calculado	p-valor
Regressão	2,5	2	1,2	20,5	0,00071
Resíduos	0,5	8	0,1		
Falta de Ajuste	0,5	6	0,1	4,8	0,18121
Erro Puro	0,0	2	0,0		
Total	3,0	10			
$R^2 = 83,66\%$				$F\text{-tab}_{(2,8)} = 3,11$	$F\text{-tab}_{(6,2)} = 9,33$

SQ: soma dos quadrados; GL: graus de liberdade; QM: quadrado médio

Figura 18. Curva de contorno para a porcentagem de violaceína em relação a concentração total de pigmentos do extrato.



A partir da análise da Figura 18 nota-se que houve uma maior seletividade de extração para a violaceína utilizando-se concentrações de etanol (X_1) entre 65 a 90%, sendo o efeito máximo obtido em $X_1 = 0$ (etanol 77%). O coeficiente quadrático negativo de X_1 (-0,31), indica uma variação inversamente proporcional ao quadrado deste fator parametrizado, tendo esse efeito negativo anulado em $X_1 = 0$, como foi observado. Já o coeficiente linear negativo para X_2 (-0,49), indica que quanto menor é a razão biomassa úmida/solvente maior é a seletividade de extração para a violaceína.

Apesar da baixa variação entre as porcentagens de violaceína obtidas (91,40 a 93,13%), a resposta de seletividade de extração é bastante plausível, visto que a violaceína possui uma

maior polaridade quando comparada a deoxiviolaceína, uma vez que ela contém uma hidroxila a mais em sua estrutura química, o que resulta em uma maior interação da violaceína com soluções hidroalcoólicas (maior polaridade) do que com o etanol absoluto (menor polaridade) (REICHARDT, 1979). Caso houvesse uma maior concentração de deoxiviolaceína no extrato do presente estudo, o efeito na diferença dos valores de seletividade de extração poderia ser mais evidente.

Este argumento pode ser respaldado ao avaliar a recuperação da violaceína produzida por *Y. lipolytica*, onde, após realizar três extrações sequenciais empregando-se etanol absoluto (96%) como solvente extrator, foi mostrado que a mistura de 1:1:1 dos extratos obtidos nos três ciclos de extração continha aproximadamente 50% de violaceína e 50% de deoxiviolaceína, e que, ao avaliar os extratos isoladamente, o extrato resultante da primeira recuperação era composto de 61,7% de deoxiviolaceína, enquanto que os extratos da segunda e a terceira extração continham 55,7 e 100% de violaceína, respectivamente (NEMER et al., 2023). À vista disso, devido a maior concentração de deoxiviolaceína produzida pela levedura, conseqüentemente houve uma maior extração diferencial entre os pigmentos, possibilitando evidenciar a maior afinidade da deoxiviolaceína pelo etanol absoluto em comparação à violaceína, o que corrobora com o observado no presente estudo.

Em resumo, diante do exposto ao longo desta seção, buscando um equilíbrio entre maiores respostas de rendimento de recuperação e a razão de biomassa úmida/solvente em que se atinja uma maior saturação do solvente com a violaceína e a deoxiviolaceína, optou-se por testar dois cenários: um utilizando-se de concentração intermediária de biomassa úmida, ou seja 30 g/L (ou $X_2 = 0$), pois, embora resulte em valores médios de rendimento de recuperação e de recuperação total, essa razão biomassa úmida/solvente permite uma maior recuperação do conteúdo total de pigmento em uma única etapa de extração, o que pode ser de maior vantagem do ponto de vista industrial e econômico; e outro utilizando-se de uma maior razão biomassa úmida/solvente, ou seja 55 g/L (ou $X = +1,25$), por resultar em uma maior recuperação total do pigmento, apesar de implicar em uma perda da violaceína e da deoxiviolaceína na primeira etapa de extração, a qual poderia ser compensada por extrações sequenciais da biomassa (conforme testado e discutido adiante).

Além disso, após verificarmos que, a partir da observação da biomassa logo após a extração, os ensaios realizados com 1,72 e 10 g/L resultaram em biomassas branca acinzentadas, indicando extração completa da violaceína e da deoxiviolaceína, e que os ensaios com 30 g/L resultaram em biomassas branca azuladas, indicando que ainda haviam pigmentos remanescente nas células, escolhemos seguir para as etapas de estudos do efeito de aplicação

de temperatura e de ultrassom no processo de extração da violaceína empregando-se 30 g/L de biomassa úmida, visto que o intuito das próximas análises é avaliar se a aplicação de métodos físicos e mecânicos de ruptura celular (temperatura e ultrassom) melhoram a eficiência do rendimento de recuperação da violaceína e da deoxiviolaceína.

Ademais, considerando os dados discutidos até o momento, foi selecionado a concentração de etanol 70% para as próximas etapas de estudo de extração da violaceína, visto que essa concentração se encontra dentro da faixa dos maiores resultados de rendimento de recuperação da violaceína quantificada por espectrometria e por HPLC analítico, bem como encontra-se na faixa de maior seletividade de extração da violaceína, além de ser o maior ponto predito para o modelo de recuperação total quantificada por espectrofotômetro e estar próxima a concentração ideal para recuperação total quando consideramos os dados quantificados por HPLC analítico. Outrossim, ainda há o conveniente da solução em etanol 70% ser uma concentração padronizada e amplamente empregada em laboratórios de microbiologia.

Por fim, ao observar todos os resultados obtidos ao longo desta seção percebemos que, como o equilíbrio de extração foi atingido rapidamente, o que indica que houve pouca limitação de transferência de massa da violaceína e da deoxiviolaceína pela parede celular da *Janthinobacterium* sp., estas moléculas possuem alta afinidade pelo solvente empregado, resultando em uma permeabilização seletiva dos compostos e não em uma lise celular do microrganismo. Esta permeabilização seletiva é bastante desejável, uma vez que pode resultar em maiores purezas do extrato, como foi observado e discutido na seção 5.4., além de colaborar com a viabilidade do processo de extração, já que o tempo necessário para se atingir a máxima recuperação dos compostos alvos torna-se bastante curto.

5.2.1.1. Validação do método

A partir das análises das superfícies respostas obtidas foi possível determinar as melhores condições de extração da violaceína e da deoxiviolaceína. A validação do método foi realizada, portanto, com concentração de etanol de 70% ($X_1 = -0,4375$) e razão biomassa úmida/solvente de 30 g/L ($X_2 = 0$) e 55 g/L ($X_2 = +1,25$), sendo os valores preditos pelos modelos e as respostas experimentais mostrados na Tabela 15. Foram validados a recuperação total (mg/L de extrato), o rendimento de recuperação (mg/g biomassa úmida) e a seletividade de extração (% violaceína), cujos erros de ajuste (valor experimental subtraído do valor predito) e o erro relativo à atividade predita (porcentagem do erro de ajuste dividido pelo valor predito) também estão mostrados na Tabela 15, sendo que para este último caso o erro relativo descreve o quanto o resultado experimental está acima ou abaixo do resultado predito.

Tabela 15. Resultados preditos e experimentais obtidos nas análises de validação dos modelos.

	Resposta	Conc. Biomassa (g/L)	Resultado Experimental	Resultado Prevista	Erro de Ajuste	Erro Relativo (%)
Espectrofotômetro	Recuperação	30	131,75 ± 8,88	160,45	-28,71	-17,89
	Total (mg/L)	55	180,35 ± 1,31	237,09	-56,74	-23,93
	Rendimento de Recuperação	30	4,37 ± 0,30	5,12	-0,75	-16,59
	(mg/g biomassa)	55	3,28 ± 0,02	4,36	-1,08	-24,84
HPLC analítico	Recuperação	30	86,02 ± 0,98	94,26	-8,24	-8,74
	Total (mg/L)	55	112,42 ± 7,10	134,88	-22,46	-16,65
	Rendimento de recuperação	30	2,85 ± 0,04	3,47	-0,62	-17,81
	(mg/g biomassa)	55	2,04 ± 0,13	2,66	-0,62	-23,39
	Seletividade de	30	93,22 ± 0,06	92,44	0,78	0,85
	Extração (%)	55	92,38 ± 0,17	91,83	0,55	0,60

Apesar da existência de desvios entre os resultados preditos e os experimentais, pode-se considerar que os resultados obtidos nas análises de validação foram satisfatórios levando em conta que são processos que envolvem microrganismos, havendo, portanto, variações na produção da violaceína nas diferentes bateladas de fermentação realizadas. Além desta variação inerente ao processo, há ainda a variação do modelo, que se soma à anterior.

5.2.2. Estudo do efeito de extrações sequenciais

Extrações sequenciais foram realizadas para avaliar a quantidade de extrações necessárias para se recuperar o conteúdo total de pigmentos, bem como para se obter o valor da carga total de violaceína e deoxiviolaceína produzidas pelas células. A análise foi realizada utilizando-se etanol 70% e razões biomassa/solvente de 30 g/L (Figura 19A) e 55 g/L (Figura 19B), com agitação de 60s em vórtex para cada extração. Os resultados estão expressos em termos de rendimento de recuperação nos extratos isolados (mg/g biomassa úmida), concentração dos extratos combinados (mg/L de extrato), conteúdo de pigmentos azuis acumulado depois de cada ciclo de extração (mg), sendo nestes casos considerados a carga total

de pigmentos como a somatória da violaceína e da deoxiviolaceína. Estão mostrados também a porcentagem de violaceína em relação ao conteúdo total de pigmento. Os extratos brutos obtidos em cada extração estão mostrados na Figura 20.

Com base nos dados mostrados na Figura 19, podemos observar que foram necessárias quatro extrações consecutivas para se recuperar o conteúdo total de violaceína e deoxiviolaceína quando utilizado menores razões de biomassa/solvente (30 g/L), enquanto que, para maiores razões de biomassa/solvente (55 g/L), foi necessário um ciclo adicional de extração. No primeiro caso, a carga pigmentar total obtida foi $2,99 \pm 0,05$ mg de pigmentos azuis (extrato obtido a partir de 0,9 g de biomassa e 30 mL de solvente), com um rendimento total de $3,26 \pm 0,08$ mg/g biomassa úmida, sendo cerca de 89,96% desse valor recuperado logo na primeira extração, seguindo-se de recuperações de 8,99%; 0,98% e 0,08% na segunda, terceira e quarta extração, respectivamente.

Já para o segundo caso, o conteúdo total de pigmentos azulados obtido foi de $4,84 \pm 0,05$ mg (extrato obtido a partir de 1,65 g de biomassa e 30 mL de solvente), com um rendimento total de $2,93 \pm 0,04$ mg/g biomassa úmida, sendo que as recuperações mais significativas foram observadas para a primeira e segunda extração sequencial, com valores de 69,75% e 25,34% do total, respectivamente. Enquanto isso, a terceira, quarta e quinta extração foram responsáveis por recuperar 5,03%; 0,76% e 0,12% do pigmento total presente na biomassa, respectivamente. A diferença dos rendimentos totais obtidos nestes ensaios pode ser explicada pelas variações de produção do pigmento pelo microrganismo em cada batelada de fermentação realizada. A média do rendimento total de violaceína e deoxiviolaceína produzida foi de 3,10 mg/g biomassa úmida.

Diante disso, se priorizarmos os maiores rendimentos de extração (neste caso, empregando 30 g/L de biomassa), somente uma extração é suficiente para obtermos 90% ou mais do conteúdo total de pigmento, enquanto que, se priorizarmos maiores teores de recuperação total (neste caso, empregando 55 g/L de biomassa), faz-se necessário o emprego de duas extrações sequenciais para obtermos mais de 90% do total da carga pigmentar, mas em contrapartida, o conteúdo de pigmento acumulado em duas extrações é bem maior para 55g/L de biomassa ($4,55 \pm 0,12$ mg) em comparação a uma única extração com 30g/L de biomassa ($2,65 \pm 0,11$ mg).

Figura 19. Extrações sequenciais da violaceína e da deoxiviolaceína utilizando-se concentrações de biomassa úmida de 30 g/L (A) e 55g/L (B), e volume de solvente em cada ciclo de 30 mL. Rendimento de recuperação dos extratos isolados (mg/g biomassa úmida) (■), concentração dos extratos combinados (mg/L) (●), conteúdo de pigmento acumulado (mg) (○) e porcentagem de violaceína (%) (△). Os valores estão expressos como média ± desvio padrão.

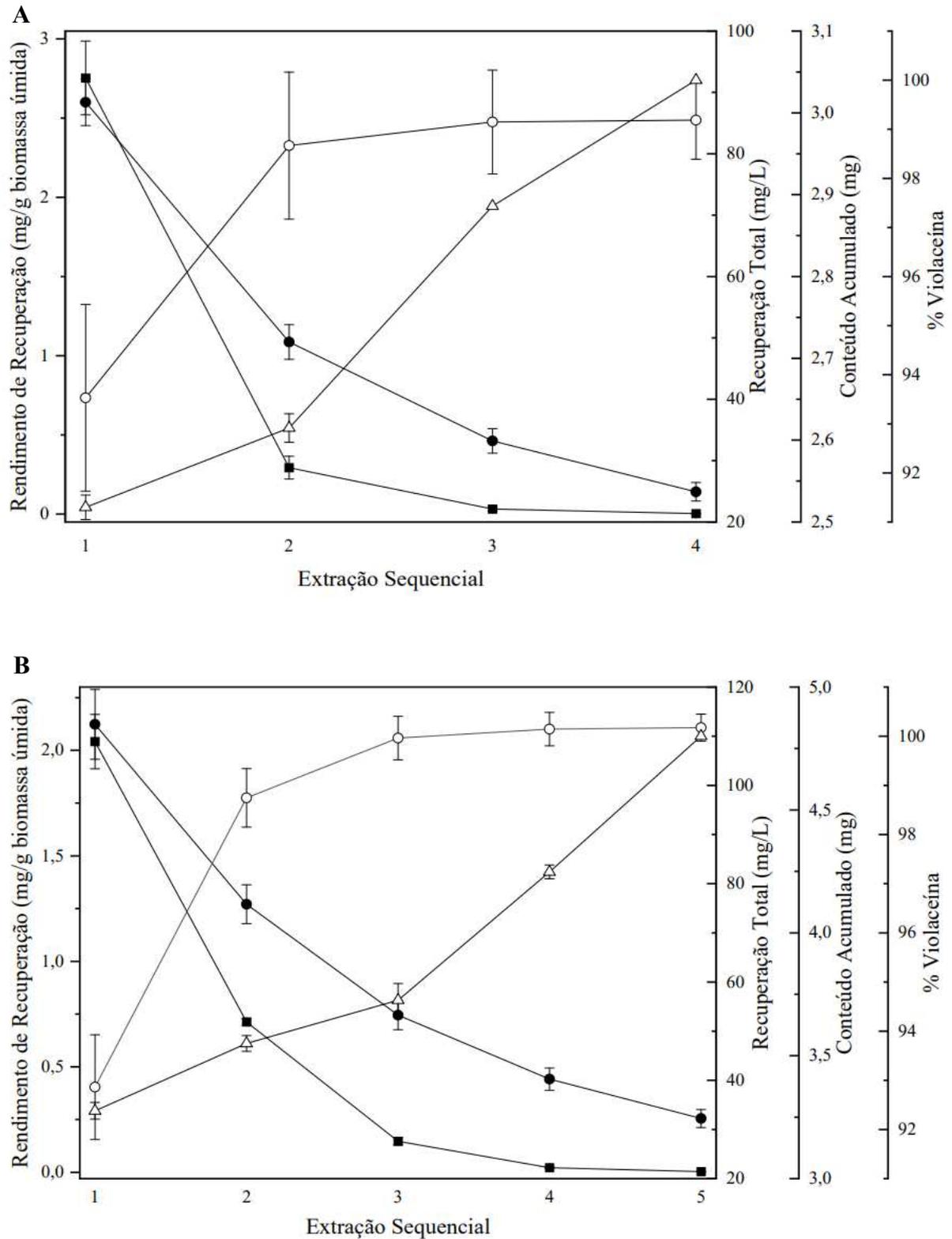
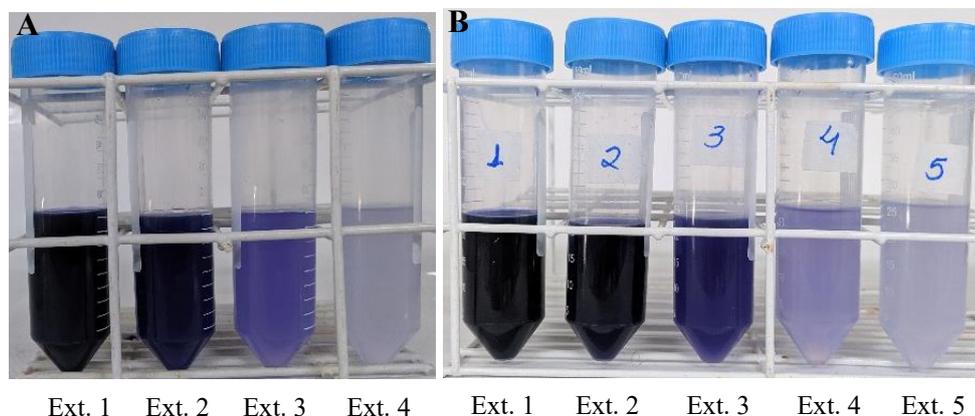


Figura 20. Extratos brutos obtidos nos ensaios de extração sequencial utilizando-se concentrações de biomassa úmida de 30 g/L (A) e 55 g/L (B).



Fonte: O próprio autor.

Por outro lado, embora o conteúdo total de pigmento acumulado aumente após cada ciclo de extração, com valores iniciais e finais de $2,65 \pm 0,11$ mg e $2,99 \pm 0,05$ mg, respectivamente, ao utilizar 30 g/L de biomassa úmida, e valores iniciais e finais de $3,37 \pm 0,21$ mg e $4,84 \pm 0,12$ mg, respectivamente, ao se utilizar 55 g/L de biomassa, os seus respectivos valores de recuperação total nos extratos combinados diminuem significativamente como resultado do efeito de diluição do solvente, apresentando decréscimos dos valores de $88,39 \pm 3,80$ mg/L para $24,92 \pm 1,51$ mg/L e de $112,42 \pm 7,10$ mg/L para $32,23 \pm 1,82$ mg/L, respectivamente.

Outro ponto a ser considerado é que, apesar do decréscimo do valor de recuperação total do pigmento, após a segunda extração utilizando-se de 55g/L de biomassa a recuperação total dos extratos combinados é de $75,82 \pm 3,96$ mg/L de pigmento azuis, enquanto que após a primeira extração empregando-se 30g/L de biomassa a recuperação total é de $88,39 \pm 3,80$ mg/L, sendo estes teores bastante próximos. Diante destes cenários, estudos econômicos complementares podem ser futuramente realizados para uma melhor avaliação de qual concentração de biomassa e quantos ciclos de extração teriam um maior custo/benefício para a recuperação total da violaceína. Neste caso, do ponto de vista industrial e econômico, fatores como a facilidade de produção da biomassa, o volume total de solvente utilizados e a quantidade de baterias necessárias para remoção deste solvente devem ser consideradas, além é claro, da avaliação do impacto ambiental do descarte da biomassa com possíveis pigmentos residuais.

Avaliações de extrações sequenciais para recuperação da violaceína por outros estudos também demonstraram que a maior parte da quantidade total do pigmento é extraída na primeira etapa de processo. Por exemplo, para extrações empregando-se etanol absoluto (96%) e

agitações de 200 rpm, foram observados que 92% da concentração total da violaceína foi recuperada logo nos primeiros oito minutos da primeira extração, sendo o restante do pigmento recuperado na segunda extração (tempo total para cada extração de 1 hora) (NEMER et al., 2023). Do mesmo modo, mais de 93% do conteúdo total da violaceína foi recuperado na primeira etapa de extração quando utilizado o Tween 20 como solvente, com concentração de biomassa de 25 g/L, agitação de 50 rpm e tempo de 30 min para cada extração consecutiva realizada (KHOLANY et al., 2020).

Ademais, a partir da análise da mistura de igual volume dos extratos obtidos nas cinco extrações sequenciais de ES-2 (M₄) (Tabela 16), pode ser visto que o extrato bruto obtido no presente projeto é composto por 93,39% de violaceína e 6,61% de deoxiviolaceína, o que é bastante interessante, uma vez que a porcentagem de deoxiviolaceína nos extratos brutos obtidos de cepas bacterianas naturais são sempre reportados em torno de 10 a 20% (CHOI et al., 2015). Isto também pode ser verificado para o padrão comercial da violaceína, o qual também é produzido por cepas de *Janthinobacterium* e é composto por pelo menos 85% de violaceína e 15% de deoxiviolaceína (Sigma-Aldrich).

No entanto, maiores concentrações de violaceína no extrato bruto pode ser de grande vantagem, visto que a violaceína normalmente é descrita com maiores propriedades antimicrobianas, antifúngicas (WANG et al., 2012) e anticancerígena (BILSLAND et al., 2018) do que a deoxiviolaceína.

Tabela 16. Combinação dos extratos obtidos nas extrações sequenciais empregando-se concentrações de etanol 70% e 55g/L de biomassa úmida. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão.

Extratos Combinados	Rendimento de Recuperação (mg / g biomassa úmida)			%	%
	Violaceína	Deoxiviolaceína	Conc. Total		
M ₁	1,29 \pm 0,06	0,10 \pm 0,10	1,40 \pm 0,07	92,55	7,45
M ₂	0,96 \pm 0,04	0,07 \pm 0,00	1,03 \pm 0,04	93,13	6,87
M ₃	0,74 \pm 0,03	0,05 \pm 0,00	0,80 \pm 0,03	93,31	6,69
M ₄	0,59 \pm 0,01	0,04 \pm 0,00	0,64 \pm 0,01	93,39	6,61

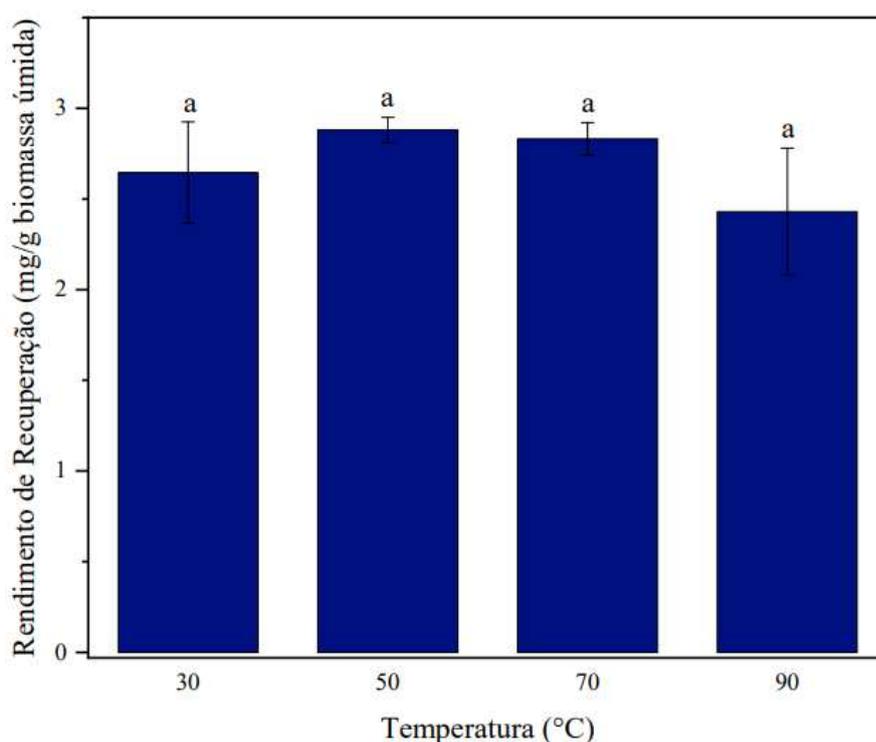
Em conclusão, considerando os cenários avaliados (30 ou 55 g/L de biomassa úmida), mais de 95% da violaceína e da deoxiviolaceína originalmente presentes na biomassa foram

recuperados após a segunda extração em ambos os casos, contudo, o processo empregando-se uma menor concentração de biomassa (30 g/L) foi mais eficiente para o rendimento de recuperação total dos pigmentos na primeira extração, sendo essa a concentração utilizada para as próximas etapas de estudo da recuperação da violaceína e da deoxiviolaceína.

5.2.3. Estudo da temperatura do solvente no processo de extração

Considerando que o aumento da temperatura pode tornar as paredes celulares mais permeáveis e diminuem a viscosidade e a tensão superficial do solvente, aumentando, por sua vez, a solubilidade e a difusão dos compostos a serem extraídos, o que favorece o processo de recuperação dos compostos de interesse (LUNA et al, 2020), foram realizados ensaios aplicando-se diferentes temperaturas ao sistema de extração a fim de se investigar uma possível melhoria no rendimento de recuperação da violaceína e da deoxiviolaceína. Os ensaios foram realizados utilizando-se etanol 70% e 30 g/L de biomassa úmida em temperatura ambiente ($30 \pm 0,5$ °C) e em temperaturas de 50, 70 e $90 \pm 0,5$ °C. Os resultados estão expressos em termos de rendimento de recuperação (mg/g biomassa úmida), como mostrado na Figura 21.

Figura 21. Efeito da temperatura na extração da violaceína e da deoxiviolaceína. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão, seguidos das letras minúsculas (a). Letras iguais indicam que as amostras não se diferiram estatisticamente entre si (p -valor $< 0,10$) conforme o teste de Tukey.



Apesar de ser verificado um pequeno impacto positivo no rendimento de recuperação destes pigmentos azulados ao empregar temperatura de 50 e 70°C no processo de extração, não houve diferença estatisticamente significativa entre as condições testadas. Desta forma, a aplicação de temperaturas elevadas para a extração da violaceína e da deoxiviolaceína não se justificam. Todavia, procedimentos de extração em temperatura ambiente são desejáveis, dado que estas são condições mais brandas de processo e, conseqüentemente, demandam um menor custo energético de produção destes pigmentos azuis, além de conferirem baixo risco de manipulação do solvente.

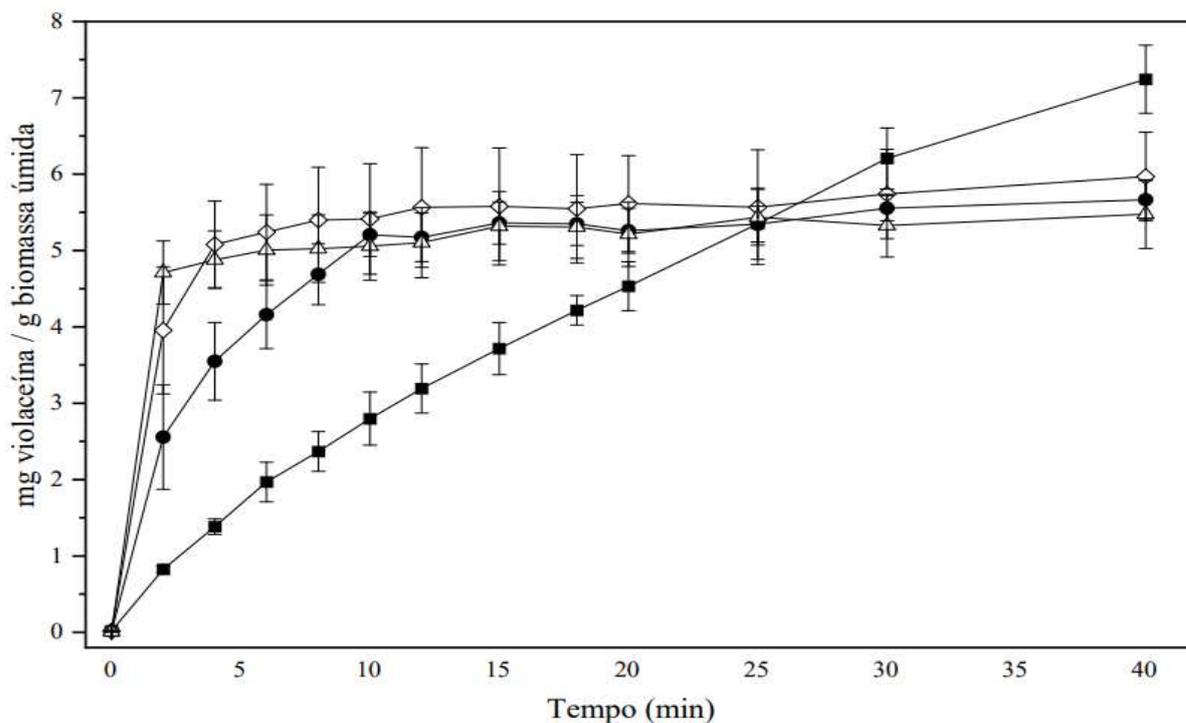
Resultados semelhantes ao do presente estudo foram observados ao analisar o efeito da temperatura na extração da violaceína usando surfactante aniônico sintonizável como solvente extrator, embora tenham sido avaliadas a aplicação de temperaturas somente entre 20 e 30°C (SCHAEFFER et al., 2019). A avaliação da extração da violaceína por técnicas de micro-ondas assistido, a qual também promove um aumento de temperatura do meio, demonstrou que os solventes metanol e acetona foram mais eficientes do que o etanol para recuperação da violaceína, porém, quando comparado este método com técnicas de extração por ultrassom assistido, a aplicação de micro-ondas assistido se mostrou menos promissora para a extração da violaceína (PERIZ et al., 2020).

Outras abordagens relatam a extração da violaceína diretamente do caldo de cultivo, a qual foi realizada a partir da adição de soluções de NaCl e butanol ao meio de cultivo, seguindo-se de incubação a 65°C por 15 min da mistura (ALEM et al., 2020), bem como também são reportadas associações de ciclos de congelamento e descongelamento da biomassa com o solvente etanol para promover a lise celular e recuperar a violaceína (WU et al., 2023), contudo, nestes estudos não são avaliados o grau de melhoria da eficiência de recuperação da violaceína por estes métodos. Ademais, não foram encontrados trabalhos que avaliassem aplicação de altas temperaturas na extração da violaceína.

5.2.4. Estudo do efeito de aplicação de ultrassom ao processo de extração

Por fim, foram realizados ensaios empregando-se tratamento ultrassônico ao processo de extração da violaceína e da deoxiviolaceína, o qual também permite uma permeabilização celular através de processos de cavitação, podendo promover, portanto, uma melhoria na eficiência de recuperação dos pigmentos. A princípio foram analisadas a cinética de extração do pigmento aplicando-se potências de 125, 250, 375 e 500W para identificar o tempo de saturação do solvente com a violaceína e a deoxiviolaceína (Figura 22).

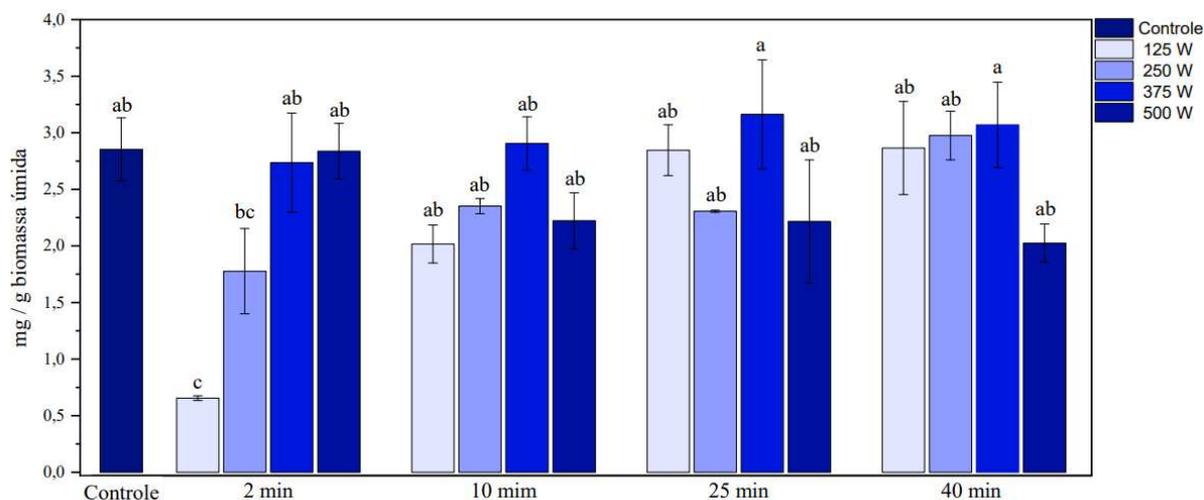
Figura 22. Cinética de rendimento de recuperação dos pigmentos azulados utilizando-se processador ultrassônico e quantificada por espectrofotometria. Potências de 125W (■); 250W (●); 375W (◇) e 500W (△). Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão.



Como base nos resultados obtidos, podemos observar que para as maiores potências de ultrassom o equilíbrio de extração foi estabelecido rapidamente, sendo atingido a saturação do solvente nos primeiros 2 min (500W) ou 4 min (375W) de processo. Potências intermediárias (250W) alcançaram a estabilidade de extração após 10 min de processo, enquanto que para menores potências, o tempo de máxima recuperação foi aos 40 min. Desta forma, posteriormente as amostras dos tempos de 2, 10, 25 e 40 minutos de extração foram analisados por HPLC (Figura 23).

Após avaliação dos dados obtidos, verificamos que ao atingir a máxima recuperação do extrato de violaceína em cada potência de ultrassom testada, os resultados não diferiram estaticamente da máxima recuperação da violaceína obtida pelos ensaios de extração por maceração em vórtex (controle), embora seja notado um leve aumento na quantificação da violaceína em alguns ensaios, principalmente ao empregar potência de 375W, como pode ser visto na Figura 23.

Figura 23. Cinética de rendimento de recuperação dos pigmentos azulados utilizando-se processador ultrassônico e quantificada por HPLC analítico. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão, seguidos das letras minúsculas (a-c). Letras diferentes indicam que as amostras diferiram estatisticamente entre si (p -valor $> 0,10$) conforme o teste de Tukey.



Apesar da ausência de efeito positivo com relação ao aumento do rendimento de recuperação da violaceína e da deoxiviolaceína, estes dados são bastante interessantes, visto que demonstram que ao utilizar técnicas de extração por ultrassom assistido, não são necessários o emprego de longos tempos de extração, especialmente quando usados potências máximas do sonicador, como normalmente é o observado na literatura. Somado a isto, menores tempo de processo implicam em um menor custo energético na produção da violaceína, o que também é de suma importância para viabilizar a produção em larga escala deste biopigmento.

Recentemente, alguns estudos descreveram a obtenção de sistemas de recuperação “rápido e simples” da violaceína ao realizar processos de extração por ultrassom com potência de 200 W e tempo de 2 h (HUANG et al., 2023). Processos similares de extração (200 W/2 h) também foram descritos por Xu e colaboradores (2022), assim como, associações de ultrassom assistido e vórtex também são relatadas na literatura (CHENG et al., 2022; GOHIL et al., 2022). Contudo, nestes trabalhos não foram avaliadas a eficiência de extração da violaceína. Além do mais, não foram encontrados na literatura trabalhos que avaliassem a cinética de recuperação da violaceína e/ ou comparassem diferentes potências ao utilizar técnicas de ultrassom assistido.

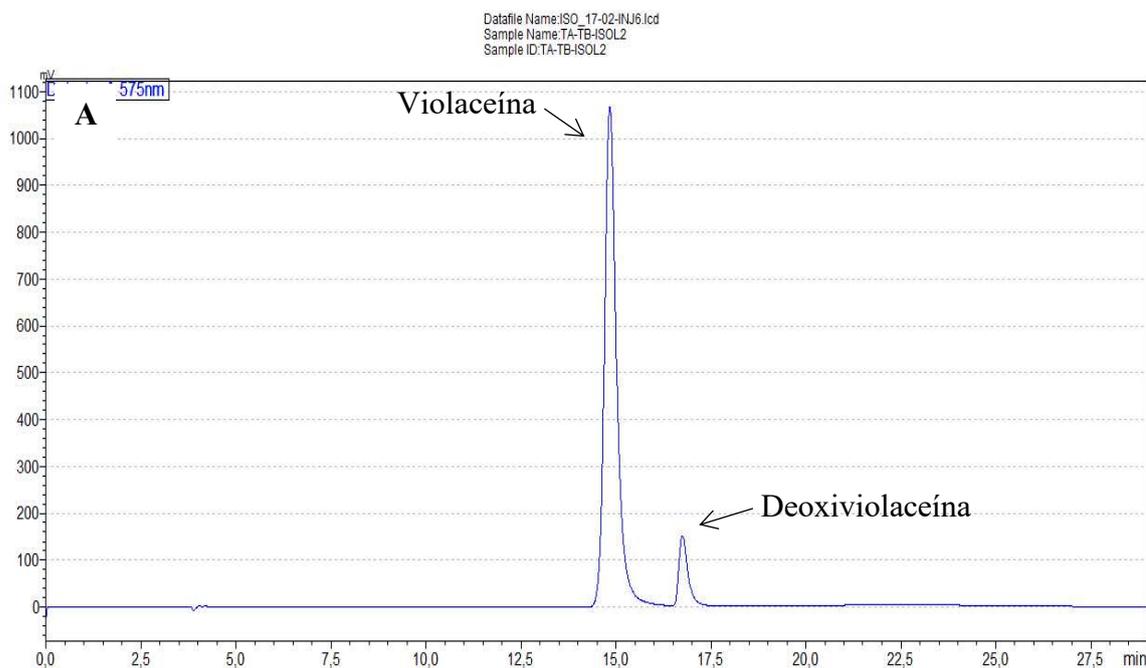
Todavia, comparações entre diferentes solventes orgânicos de extração com parâmetros fixados de ultrassom assistido (não descritos) foram reportados. Neste caso, os solventes metanol e acetona foram mais eficientes para a extração da violaceína do que o etanol, além de serem verificadas maiores quantificações ao utilizar o ultrassom assistido em comparação ao micro-ondas assistido, como já comentado anteriormente (PERIZ et al., 2020).

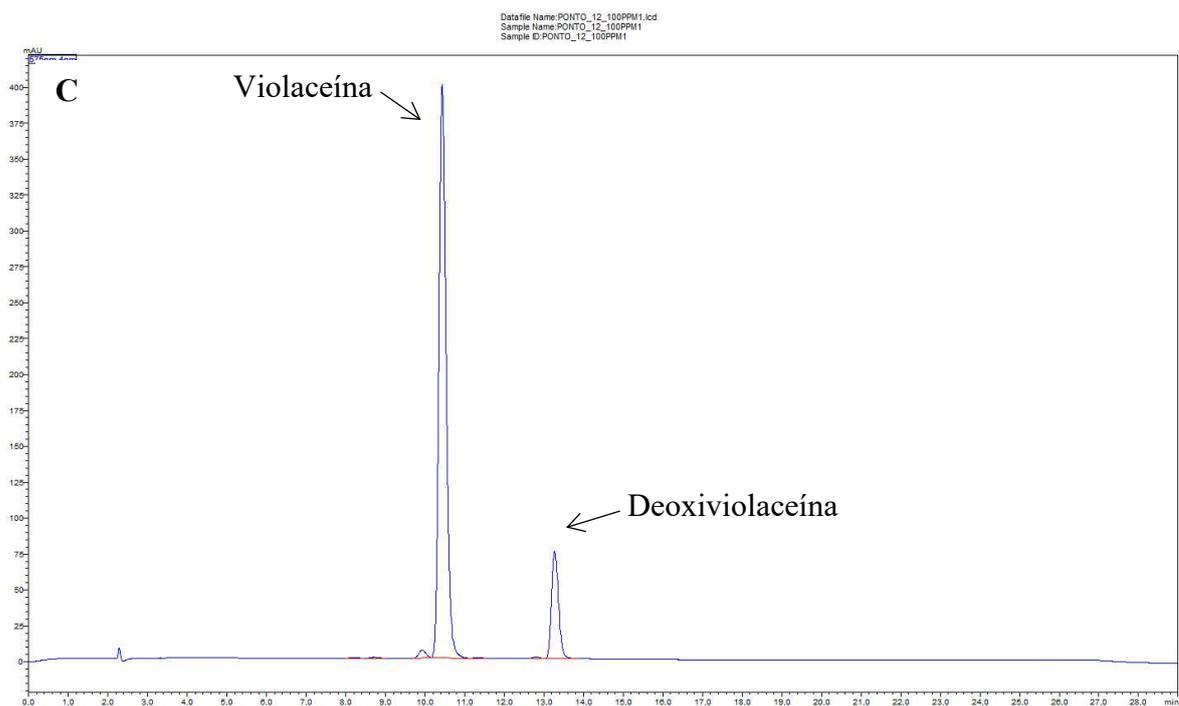
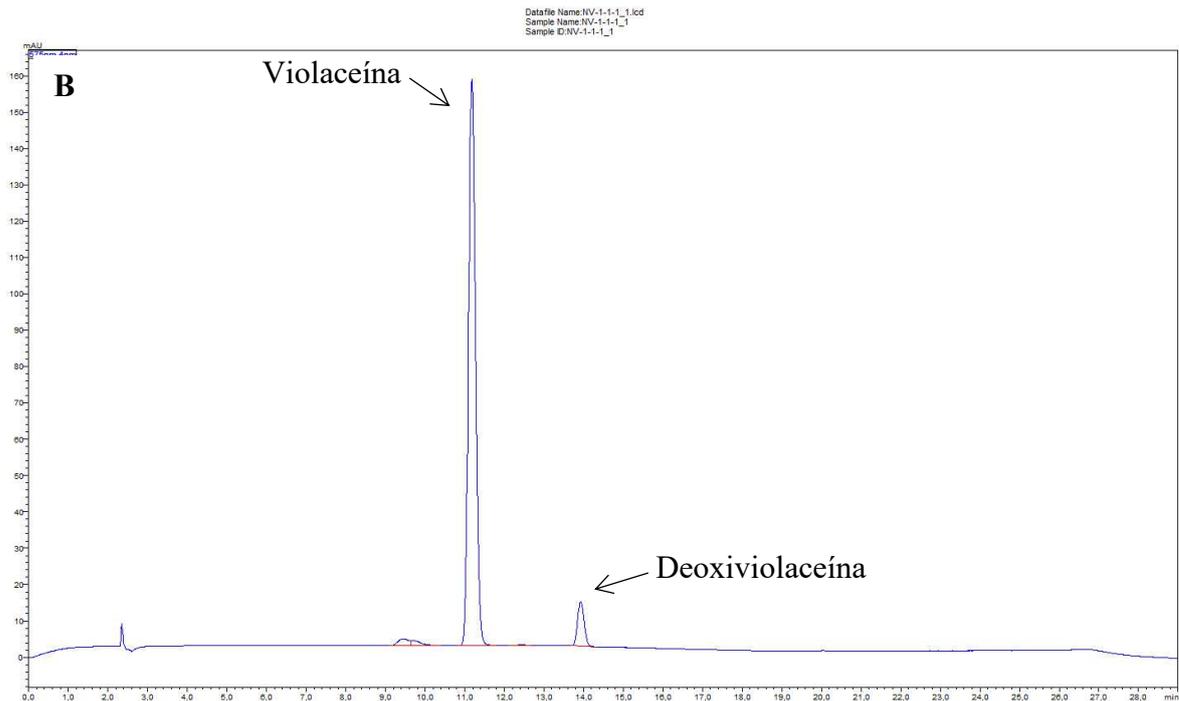
5.3. Isolamento da violaceína e seus derivados

A fim de se obter a violaceína e a deoxiviolaceína isoladas para futuros estudos de aplicação, foram realizados ensaios de separação cromatográfica em HPLC semi-preparativo. Para tal, a metodologia desenvolvida e otimizada para a análise do extrato em escala analítica (HPLC-DAD), conforme descrito na sessão 2.6.2., foram ajustadas para a escala preparativa como descrito na sessão 2.5. Neste caso, extrato bruto foi eluído com um gradiente de fase móvel composta por etanol e água ultrapura, sendo a vazão da fase móvel ajustada para 3,8 mL/min e a quantidade da amostra injetada foi ajustada para 300 µL.

Por meio da comparação dos cromatogramas obtidos nas condições preparativas (Figura 24A) e analíticas para o extrato bruto (Figura 24B) e para o padrão analítico (Figura 24C), podemos afirmar que houve reprodução do método desenvolvido. Após o processo de isolamento, as frações coletadas foram secas e ressuspensas em 10 mL de etanol, sendo analisadas novamente em HPLC analítico para determinação da pureza obtida.

Figura 24. Cromatogramas do extrato bruto obtidos em HPLC semi-preparativo (A), e cromatogramas do extrato bruto (B) e do padrão analítico (C) obtidos em HPLC analítico.





Após a quantificação, foi observado que o extrato isolado de violaceína continha 17,46 mg/L de violaceína (ou 0,1746 mg de violaceína), sendo composto por violaceína virtualmente pura, sem sinais de deoxiviólacéina (Figura 25A). Enquanto isso, o extrato isolado da deoxiviólacéina continha 2,89 mg/L de deoxiviólacéina (ou 0,0289 mg de deoxiviólacéina) e

0,11 mg/L de violaceína, tendo, portanto, uma pureza de 96,22% de deoxiviolaceína (Figura 25B). Os extratos isolados estão mostrados na Figura 26.

Figura 25. Cromatograma em HPLC analítico dos extratos isolados da violaceína (A) e da deoxiviolaceína (B) obtidos após purificação em HPLC semi-preparativo.

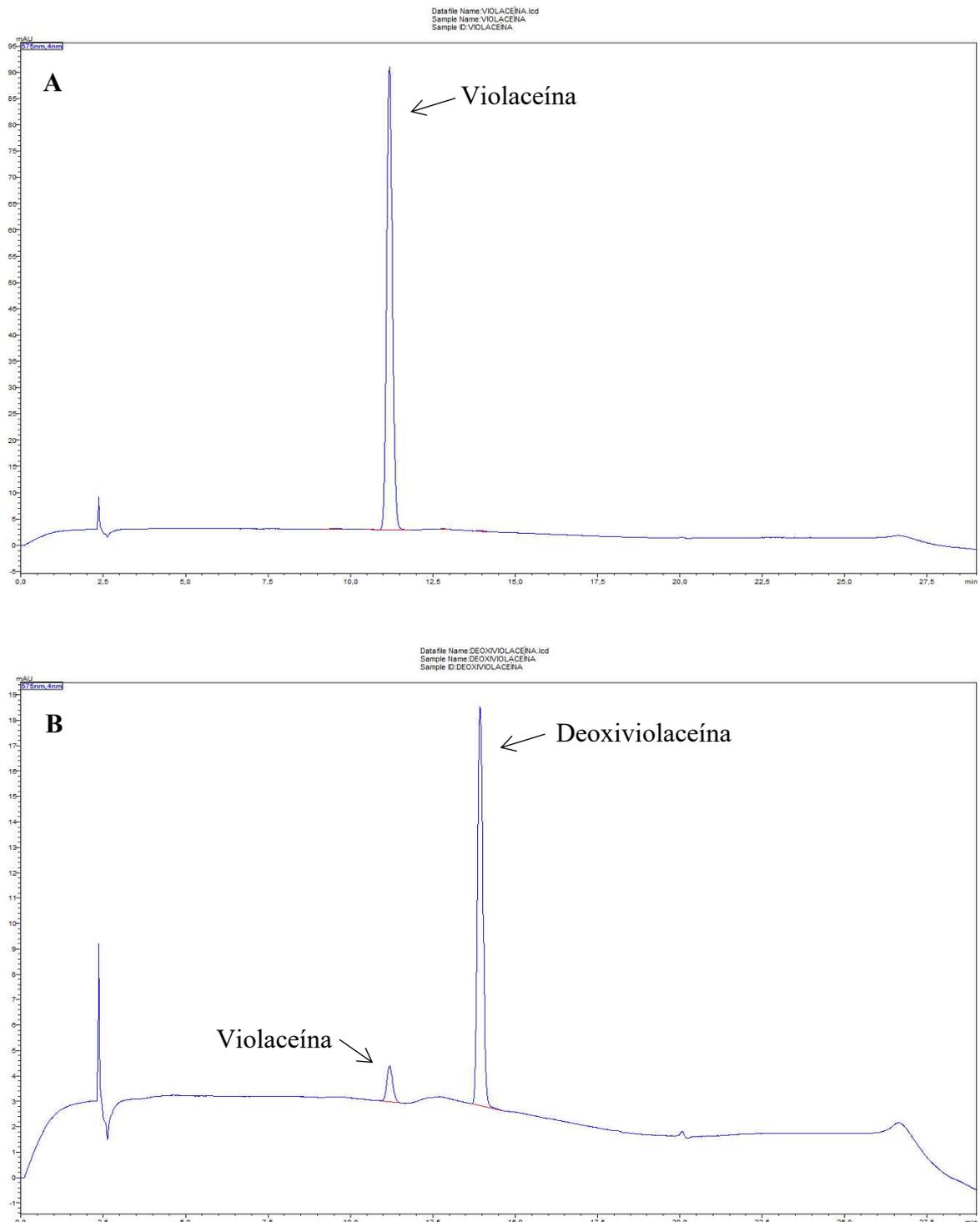
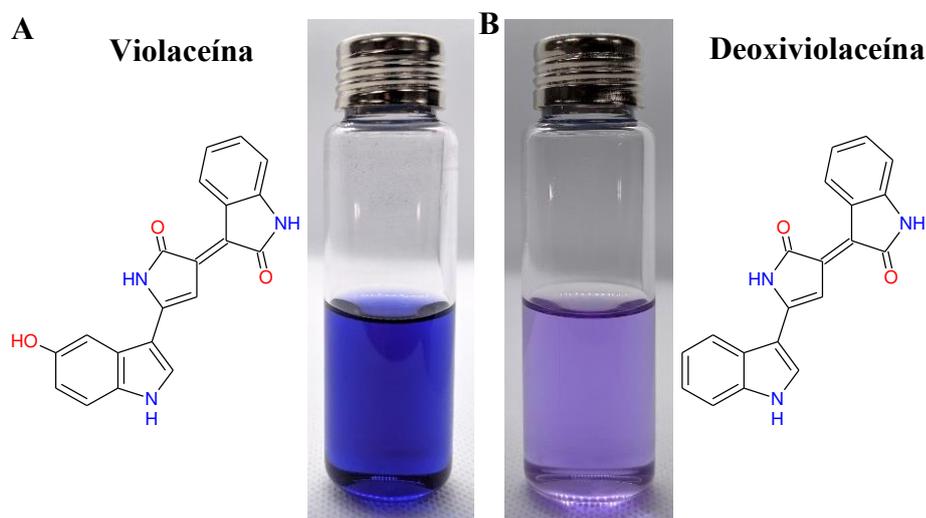


Figura 26. Extratos isolados da violaceína (A) e da deoxiviolaceína (B) e suas respectivas estruturas químicas.



Com base na Figura 26, podemos notar que a cor azul pronunciada do extrato bruto é decorrente da violaceína, sendo a deoxiviolaceína responsável pelo subtom púrpura. Na literatura os extratos brutos de violaceína são normalmente descritos como possuindo tonalidades violetas/púrpuras, muito provavelmente por conterem maiores porcentagens de deoxiviolaceína em sua composição, como mencionado anteriormente, levando a uma maior percepção da cor violeta.

O isolamento da violaceína e da deoxiviolaceína também foi realizado em coluna aberta com sílica 60 como fase estacionária, sendo otimizados a misturas dos solventes acetonitrila e ciclohexano para a fase móvel, e desenvolvido um protocolo de separação destes compostos. Neste trabalho também é possível notar a cor azul para a violaceína e púrpura para a deoxiviolaceína (NEMER et al., 2023). Outros estudos também utilizaram técnicas de HPLC semi-preparativo, porém são destinados a uma avaliação qualitativa de purificação da violaceína, e não com intuito de isolar os compostos, como foi realizado no presente estudo. Além do mais, foram utilizados para a fase móvel solventes diferentes de etanol ou água, como acetonitrila e água (BATISTA et al., 2020) ou metanol e água (VENEGAS et al., 2019), o que não é tão vantajoso para fins regulatórios perante a legislação devido a maior toxicidade destes solventes, além de possuírem uso restrito na indústria (SEN; BARROW; DESHMUKH, 2019).

Desta forma, métodos capazes de isolar e/ou purificar a violaceína e a deoxiviolaceína utilizando-se somente de etanol e água como fase móvel são de grande relevância para contribuir com viabilidade de comercialização destes pigmentos para aplicação em alimentos,

cosméticos, tecidos ou fármacos. Outrossim, a obtenção destes compostos isolados e puros podem potencializar as investigações de suas aplicações, além de auxiliar em maiores estudos de diferenciação das suas bioatividades e/ou toxicidade.

5.4. Avaliação da pureza das amostras nas diferentes etapas

Por fim, os extratos obtidos em cada etapa foram avaliados quanto a sua pureza nos comprimentos de onda de 254 e 575 nm, a fim de se verificar a presença de contaminantes no extrato. Na Tabela 21, estão apresentados a média da porcentagem de pureza do padrão analítico e das amostras obtidas nos ensaios realizados a partir do delineamento DCCR (média dos 11 ensaios), das amostras obtidas nos ensaios de extração sequencial ES-1 (30 g/L biomassa, etanol 70%) e ES-2 (55 g/L biomassa, etanol 70%), das amostras dos extratos combinados de ES-2, das amostras dos testes de aplicação de temperatura e ultrassom, e dos extratos isolados ricos em violaceína e deoxiviolaceína obtidos por HPLC semi-preparativo. As porcentagens de pureza foram calculadas considerando o somatório da área dos picos de interesse (violaceína + deoxiviolaceína) em relação ao somatório das áreas de todos os picos obtidos nos cromatogramas, exceto os picos referente ao solvente, como descrito na seção 4.6.

Curiosamente, não foram identificados picos significativos além da violaceína e da deoxiviolaceína nos extratos em todos os ensaios realizados, o que reforça que o processo empregado para a extração destes pigmentos favoreceu a permeabilidade seletiva dos compostos e não a lise celular, resultado em extratos brutos mais puros. Apesar dos resultados apresentarem diferença estatística entre si, as porcentagens obtidas indicam um elevado grau de pureza dos extratos em todas as análises realizadas, visto que um padrão isolado deve conter no mínimo 90% de pureza (ARAÚJO, 2018). Ressaltasse ainda, que os extratos isolados de violaceína e deoxiviolaceína resultaram em uma pureza acima do padrão analítico.

Outros estudos que realizaram ensaios de purificação da violaceína a partir de HPLC semi-preparativo associados a técnicas de cristalização e de cromatografia em coluna aberta reportam purezas da violaceína de 91%, sendo a extração da violaceína realizada por maceração com etanol absoluto por 1 h, seguido por sonicação por 6 min (VENEGAS et al., 2019). Ademais, a pureza obtida para a violaceína é similar aos métodos frequentemente reproduzidos na literatura, como cristalização em metanol e água em ebulição (99,8% de pureza) (RODRIGUES et al., 2013). Vale ressaltar que seriam necessárias análises complementares, como HPLC-MS/MS e RMN para confirmar a pureza das amostras, embora os dados obtidos forneçam estimativas bastante confiáveis.

Tabela 17. Porcentagem de pureza do padrão analítico e das amostras obtidas nos diferentes ensaios. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão, seguidos das letras minúsculas (a-l) para comparação entre todos os resultados, e de letras maiúsculas (A-B) para a comparação dos resultados obtidos dentro de cada grupo de ensaio. Letras diferentes indicam que as amostras diferiram estatisticamente entre si (p-valor $>$ 0,10) conforme o teste de Tukey.

Ensaio		Comprimento de Onda	
		254 nm	575 nm
Padrão Analítico		98,00 \pm 0,23 ^{cde}	98,28 \pm 0,18 ^b
Média DCCR		97,70 \pm 0,41 ^{de}	97,56 \pm 0,23 ^{bcd}
ES-1 30 g/L	1	98,68 \pm 0,06 ^{bcd B}	97,81 \pm 0,11 ^{bc B}
	2	99,07 \pm 0,15 ^{ab AB}	97,54 \pm 0,14 ^{bcd B}
	3	98,82 \pm 0,79 ^{bc B}	98,33 \pm 0,31 ^{b AB}
	4	100,00 \pm 0,00 ^{a A}	99,46 \pm 0,72 ^{a A}
ES-2 55 g/L	1	96,89 \pm 0,54 ^{hijk B}	96,78 \pm 0,29 ^{defg A}
	2	96,49 \pm 0,22 ^{ghij B}	96,89 \pm 0,13 ^{defg A}
	3	95,16 \pm 0,30 ^{l B}	96,82 \pm 0,17 ^{defg A}
	4	96,58 \pm 1,13 ^{fghi B}	97,02 \pm 0,29 ^{cdef A}
	5	100,00 \pm 0,00 ^{a A}	97,47 \pm 0,74 ^{cde A}
Extratos Combinados	M ₁	95,55 \pm 0,30 ^{ijkl A}	96,46 \pm 0,16 ^{efg A}
	M ₂	95,31 \pm 0,25 ^{kl A}	96,33 \pm 0,07 ^{g A}
	M ₃	95,51 \pm 0,21 ^{ijkl A}	96,64 \pm 0,34 ^{efg A}
	M ₄	95,23 \pm 0,07 ^{kl A}	96,39 \pm 0,04 ^{fg A}
Temperatura (°C)	30	97,17 \pm 0,08 ^{efgh A}	96,63 \pm 0,12 ^{efg A}
	50	95,94 \pm 0,08 ^{ijkl B}	96,86 \pm 0,03 ^{defg A}
	70	95,72 \pm 0,31 ^{ijkl B}	96,78 \pm 0,03 ^{defg A}
	90	96,01 \pm 0,22 ^{ijkl B}	96,90 \pm 0,06 ^{defg A}
Ultrassom (W)	125	97,77 \pm 0,21 ^{de A}	97,97 \pm 0,31 ^{bc A}
	250	97,47 \pm 0,10 ^{efg B}	98,01 \pm 0,21 ^{bc A}
	375	97,56 \pm 0,11 ^{ef B}	97,91 \pm 0,17 ^{bc A}
	500	97,81 \pm 0,11 ^{de A}	98,19 \pm 0,10 ^{b A}
Extratos Isolados	Violaceína	98,32	99,55
	Deoxiviolaceína	100	100

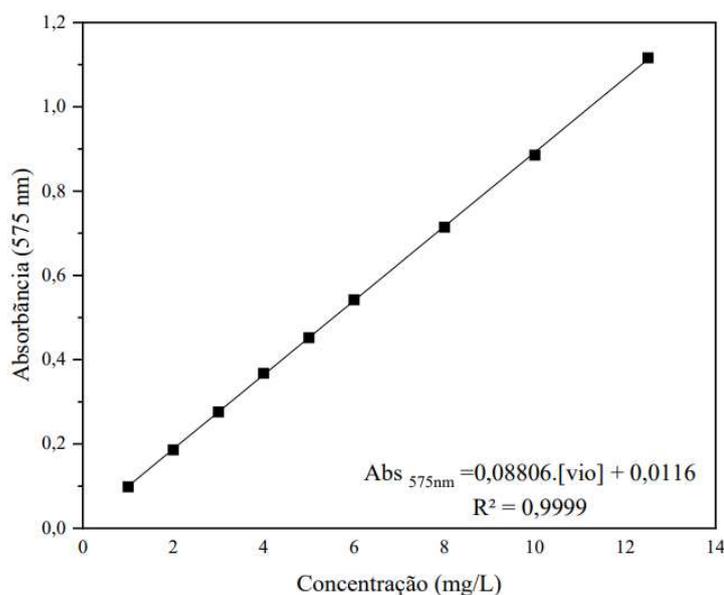
Média DCCR: média dos 11 ensaios realizados no DOE; ES-1: extração sequencial com 30 g/L biomassa e etanol 70%; ES-2: extração sequencial com 55 g/L biomassa e etanol 70%.

5.5. Condições Analíticas

5.5.1. Curvas de calibração da violaceína por espectrofotometria

Uma curva de calibração foi construída a partir de diferentes concentrações do padrão analítico da violaceína, a fim de se expressar os resultados em termos de mg de violaceína/L. O padrão foi diluído em etanol grau analítico em concentração absoluta (99,5%) (Figura 29).

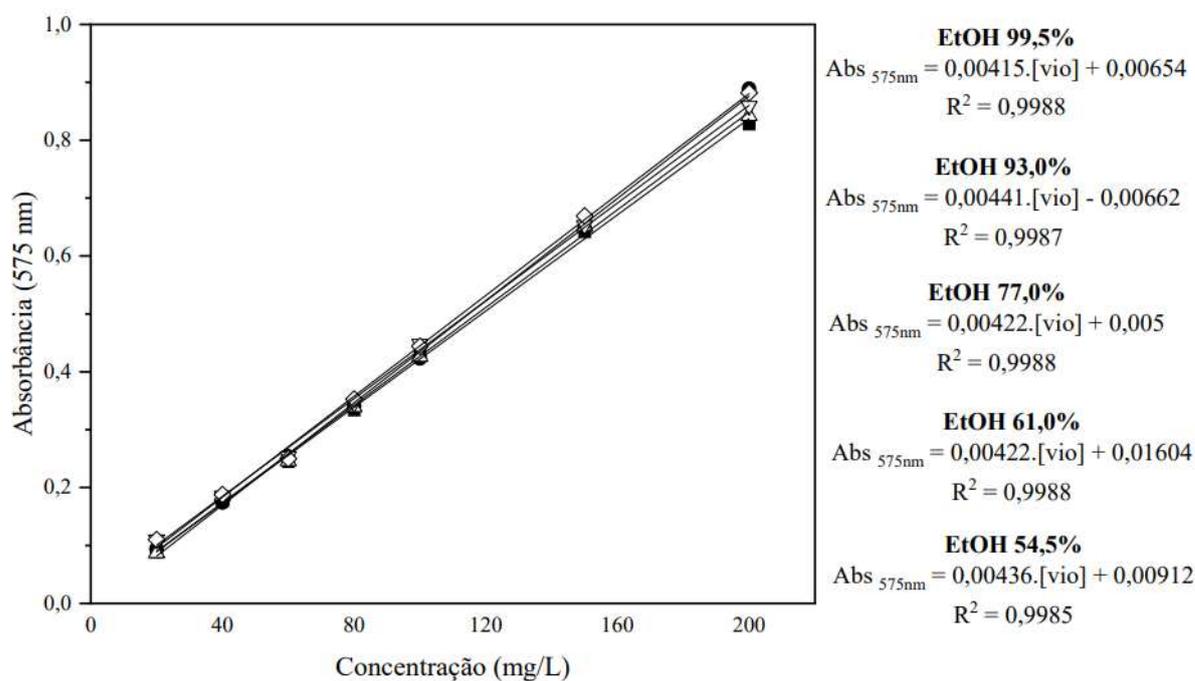
Figura 29. Curva de calibração do padrão analítico em espectrofotômetro.



A curva obtida apresentou linearidade bastante satisfatória, descrevendo com precisão a concentração de violaceína da faixa de trabalho avaliada.

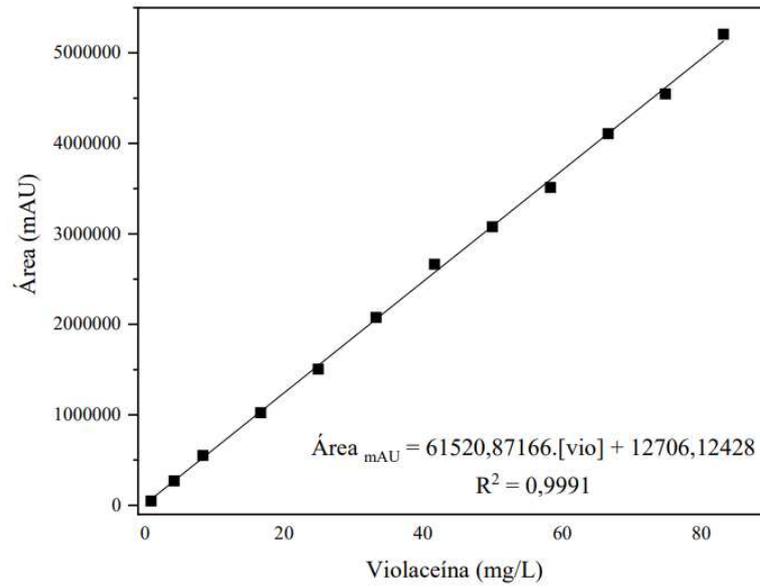
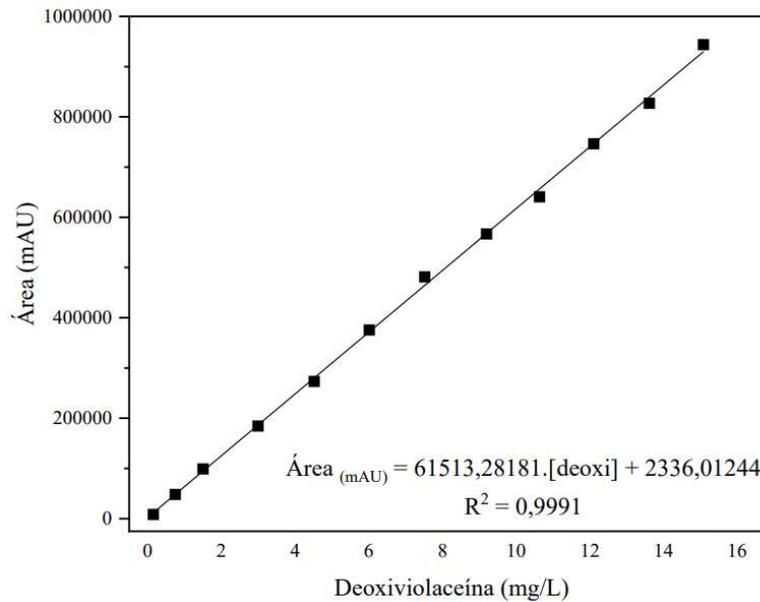
Foram realizados também testes de curvas de calibração do extrato bruto concentrado para verificar a variação na quantificação da violaceína empregando-se as diferentes concentrações do solvente etanol utilizadas para os ensaios do DCCR (sessão 4.3.1) (Figura 30). Com base nos resultados, podemos notar que as variações entre as quantificações foram baixas, especialmente para a faixa de menores leituras de absorbância, a qual foi utilizada para a leitura da maioria das amostras. Para além disso, o pico de absorção entre as diferentes concentrações de etanol também apresentou pouca variação, sendo os comprimentos de onda máximos observados em 575, 576, 579, 579 e 578 nm para etanol 99,5; 93,0; 77,0; 61,0 e 54,5%, respectivamente. Desta forma, consideramos adequada a quantificação por espectrofotometria utilizando-se somente a curva de calibração construída com diluições em etanol absoluto (99,5%).

Figura 30. Curva de calibração das amostras em espectrofotômetro. Concentrações solvente: EtOH 99,5% (■); EtOH 93,0% (●); EtOH 77,0 % (▲); EtOH 61,0% (▼) e EtOH 61,0% (◇).



5.5.2. Curvas de calibração da violaceína por HPLC analítico

Diferentes concentrações do padrão analítico de violaceína (1 a 100 mg/L) também foram utilizadas para construção de uma curva de calibração para a quantificação da violaceína e da deoxiviolaína, a fim de se expressar os resultados em termos de mg de violaceína/L (Figura 31) ou mg deoxiviolaína/L (Figura 32). O padrão foi diluído em etanol grau HPLC (99,9%) e injetados nas mesmas condições das amostras. As concentrações de cada analito foram calculadas a partir da porcentagem da sua área de pico multiplicada pela concentração teórica do padrão em cada ponto da curva, sendo considerado também a correção da pureza do padrão. Ambas as curvas de calibração obtidas apresentaram linearidade bastante satisfatória, descrevendo com precisão a concentração de violaceína da faixa de trabalho avaliada.

Figura 31. Curva de calibração do padrão analítico para a violaceína em HPLC analítico.**Figura 32.** Curva de calibração do padrão analítico para a deoxiviolaceína em HPLC analítico.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho objetivou o desenvolvimento de processos capazes de recuperar e isolar a violaceína e a deoxiviolaceína empregando-se somente etanol e água como solventes, visando a obtenção de metodologias mais viáveis de aplicação industrial. Além disso, apesar de muitos trabalhos avaliarem as etapas de *upstream* e de fermentação da violaceína, bem como suas atividades biológicas, são poucos os trabalhos que se propõem a avaliar somente as etapas de *downstream* para a produção da violaceína. Portanto, este estudo contribui para a produção de conhecimento científico e desenvolvimento tecnológico a jusante das etapas de *downstream* da violaceína.

A partir da avaliação do DOE, podemos concluir que maiores concentrações do solvente etanol (99,5%) favorecem a recuperação total da violaceína, enquanto que menores concentrações favorecem o rendimento de recuperação (etanol 50-75%) e a seletividade de extração da violaceína (etanol 65-90%), sendo escolhido etanol 70% como contração ideal de extração. Já para a concentração de biomassa, maiores razões de biomassa/solvente (58,28 g/L) favorecem a recuperação total de violaceína e, em contrapartida, menores razões (1,72 g/L) favorecem o rendimento de recuperação da violaceína.

Todavia, buscando um equilíbrio entre máximos rendimentos de recuperação e maior viabilidade econômica, foram consideradas concentração intermediárias de biomassa (30 g/L ou 55 g/L) para estudos subsequentes de extração da violaceína. Foi verificado que empregando-se 30 g/L de biomassa, somente uma única extração foi suficiente para recuperar 90% do conteúdo total de pigmento originalmente presente nas células, com conteúdo acumulado de 2,65 mg de pigmentos azuis e uma concentração de recuperação total após um ciclo de extração de 88,39 mg/L de extrato. Em contrapartida, utilizando-se 55 g/L de biomassa, duas extrações sequenciais foram necessárias para recuperar mais de 95% da carga pigmentar total, com um conteúdo acumulado de 4,55 mg de pigmento azuis e uma concentração de recuperação total dos extratos combinados após dois ciclos de extração de 75,82 mg/L de extrato. Foram observados também, que o rendimento de recuperação de pigmento (violaceína + deoxiviolaceína) foi em média de 3,10 mg/g biomassa úmida, sendo que 93,39% desse conteúdo é composto por violaceína e 6,61% é composto por deoxiviolaceína. Desta forma, estudos econômicos e de impacto ambiental adicionais devem ser realizados para avaliar qual concentração de biomassa e quantos ciclos de extração teriam, de fato, um maior custo/benefício para a extração da violaceína e da deoxiviolaceína.

A aplicação de diferentes temperaturas (50, 70 e 90°C) e diferentes potências do processador ultrassônico (125, 250, 375 e 500 W) não melhoraram significativamente a

eficiência de recuperação da violaceína e da deoxiviolaceína. Contudo, apesar da ausência de efeito positivo, estes resultados podem ser considerados bastante interessantes, uma vez que demonstram a necessidade de um menor custo energético para extração efetiva destes pigmentos azulados.

Metodologias capazes de isolar a violaceína (100%) e a deoxiviolaceína (96,22%) por técnicas de HPLC semi-preparativo empregando-se somente etanol e água como solventes também foram desenvolvidas. Ademais, os extratos isolados de violaceína (99,55%) e deoxiviolaceína (100%) apresentaram pureza similar ou superior ao padrão comercial da violaceína (98,28%).

A avaliação da pureza dos extratos obtidos nos diferentes ensaios de extração demonstrou que os processos empregados não resultaram em grandes variações na pureza dos extratos brutos obtidos, o que, somado ao fato de que em todos os casos o equilíbrio de recuperação foi facilmente alcançado, indica que houve pouca limitação à transferência de massa da violaceína e da deoxiviolaceína pelas células e que o solvente de extração utilizado favoreceu a permeabilidade seletiva dos compostos alvos, resultando em extratos brutos mais puros.

Desta forma, o presente trabalho mostra novas abordagens de extração da violaceína e da deoxiviolaceína utilizando-se de diferentes concentrações de etanol, bem como da avaliação de aplicação de diferentes temperaturas e potências de ultrassom no processo de extração, o que não foi relatado anteriormente na literatura. Além disso, o projeto cumpriu com o objetivo de obter a violaceína e a deoxiviolaceína isolada para futuros estudos de aplicação. Outrossim, os processos apresentados contribuem para a busca de meios mais sustentáveis e economicamente viáveis de produção de novos aditivos naturais para a indústria.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, W. A.; VENIL, C. K.; ARULDASS, C. A. Production of Violacein by *Chromobacterium violaceum* Grown in Liquid Pineapple Waste: Current Scenario. p. 45–58, 2015. DOI: 10.1007/978-3-319-23183-9_3.

AHMAD, W. A.; YUSOF, N. Z.; NORDIN, N.; ZAKARIA, Z. A.; REZALI, M. F. Production and characterization of violacein by locally isolated *Chromobacterium violaceum* grown in agricultural wastes. *Em: Applied Biochemistry and Biotechnology*, p. 1220–1234, 2012. DOI: 10.1007/s12010-012-9553-7.

AHMED, A.; AHMAD, A.; LI, R.; AL-ANSI, W.; FATIMA, M.; MUSHTAQ, B. S.; BASHARAT, S.; LI, Y.; BAI, Z. Recent advances in synthetic, industrial and biological applications of violacein and its heterologous production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, Korean Society for Microbiolog and Biotechnology, 2021. a. DOI: 10.4014/jmb.2107.07045.

ALEM, D.; MARIZCURRENA, J. J.; SARAIVIA, V.; DAVYT, D.; MARTINEZ-LOPEZ, W.; CASTRO-SOWINSKI, S. Production and antiproliferative effect of violacein, a purple pigment produced by an Antarctic bacterial isolate. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 36, n. 8, 2020. DOI: 10.1007/s11274-020-02893-4.

AMORIM, L. F. A.; GOMES, A. P.; GOUVEIA, I.C. Design and Preparation of a Biobased Colorimetric pH Indicator from Cellulose and Pigments of Bacterial Origin, for Potential Application as Smart Food Packaging. *Polymers*, v. 14, n. 18, 2022. DOI: 10.3390/polym14183869.

ANTONISAMY, P.; IGNACIMUTHU, S. Immunomodulatory, analgesic and antipyretic effects of violacein isolated from *Chromobacterium violaceum*. *Phytomedicine*, v. 17, n. 3–4, p. 300–304, 2010. DOI: 10.1016/j.phymed.2009.05.018.

ANTONISAMY, P.; KANNAN, P.; ARAVINTHAN, A.; DURAI PANDIYAN, V.; VALAN ARASU, M.; IGNACIMUTHU, S.; ABDULLAH AL-DHABI, N.; KIM, J. H. Gastroprotective activity of violacein isolated from *Chromobacterium violaceum* on indomethacin-induced gastric lesions in rats: investigation of potential mechanisms of action. *Scientific World Journal*, 2014. DOI: 10.1155/2014/616432.

ARAÚJO, É. de V. Isolamento, caracterização e determinação de alcaloides triptoquialanina a e triptoquialanina c produzidos pelo fungo *Penicillium digitatum* durante infecção no hospedeiro citros. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2018.

ARIF, S.; BATOOL, A.; KHALID, N.; AHMED, I.; JANJUA, H. A. Comparative analysis of stability and biological activities of violacein and starch capped silver nanoparticles. *RSC Advances*, v. 7, n. 8, p. 4468–4478, 2017. DOI: 10.1039/C6RA25806A.

ARULDASS, C. A.; MASALAMANY, S. R. L.; VENIL, C. K.; AHMAD, W. A. Antibacterial mode of action of violacein from *Chromobacterium violaceum* UTM5 against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 6, p. 5164–5180, 2018. DOI: 10.1007/s11356-017-8855-2.

ARULDASS, C. A.; RUBIYATNO; VENIL, C. K.; AHMAD, W. A. Violet pigment production from liquid pineapple waste by *Chromobacterium violaceum* UTM5 and evaluation of its bioactivity. **RSC Advances**, v. 5, n. 64, p. 51524–51536, 2015. DOI: 10.1039/c5ra05765e.

ASENCIO, G.; LAVIN, P.; ALEGRÍA, K.; DOMÍNGUEZ, M.; BELLO, H.; GONZÁLEZ-ROCHA, G.; GONZÁLEZ-ARAVENA, M. Antibacterial activity of the Antarctic bacterium *Janthinobacterium* sp. SMN 33.6 against 2 multi-resistant Gram-negative bacteria. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 1–5, 2014. DOI: 10.1016/j.ejbt.2013.12.001.

ATALAH, J.; BLAMEY, L.; MUÑOZ-IBACACHE, S.; GUTIERREZ, F.; URZUA, M.; ENCINAS, M. V.; PÁEZ, M.; SUN, J.; BLAMEY, J. M. Isolation and characterization of violacein from an Antarctic *Iodobacter*: a non-pathogenic psychrotolerant microorganism. **Extremophiles**, v. 24, n. 1, p. 43–52, 2020. DOI: 10.1007/s00792-019-01111-w.

BATISTA, J. H.; LEAL, F. C.; FUKUDA, T. T. H.; ALCOFORADO D. J.; ALMEIDA, F.; PUPO, M. T.; DA SILVA NETO, J. F. Interplay between two quorum sensing-regulated pathways, violacein biosynthesis and VacJ/Yrb, dictates outer membrane vesicle biogenesis in *Chromobacterium violaceum*. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 2432–2442, 2020. DOI: 10.1111/1462-2920.15033.

BILSLAND, E. et al. Antiplasmodial and trypanocidal activity of violacein and deoxyviolacein produced from synthetic operons. **BMC Biotechnology**, v. 18, n. 1, 2018. DOI: 10.1186/s12896-018-0428-z.

BOISBAUDRAN, L. D. Matière colorante se formant dans la colle de farine. **Comp Rend Acad Sci**, v. 93, p. 562–563, 1882.

BROMBERG, N.; JUSTO, G. Z.; HAUN, M.; DURÁN, N.; FERREIRA, C. V. Violacein cytotoxicity on human blood lymphocytes and effect on phosphatases. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 449–454, 2005. DOI: 10.1080/14756360500273052.

BROMBERG, N.; DREYFUSS, J. L.; REGATIERI, C. V.; PALLADINO, M. V.; DURÁN, N.; NADER, H. B.; HAUN, M.; JUSTO, G. Z. Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. **Chemico-Biological Interactions**, v. 186, n. 1, p. 43–52, 2010. DOI: 10.1016/j.cbi.2010.04.016.

CAO, W.; CHEN, W.; SUN, S.; GUO, P.; SONG, J.; TIAN, C. Investigating the antioxidant mechanism of violacein by density functional theory method. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 817, n. 1–3, p. 1–4, 2007. DOI: 10.1016/j.theochem.2007.04.022.

CASSARINI, M.; CRÔNIER, D.; BESAURY, L.; RÉMOND, C. Protein-Rich Agro-Industrial Co-products are Key Substrates for Growth of *Chromobacterium vaccinii* and its Violacein Bioproduction. **Waste and Biomass Valorization**, 2022. DOI: 10.1007/s12649-022-01798-7.

CAUZ, A. C. G.; CARRETERO, G. P. B.; SARAIVA, G. K. V.; PARK, P.; MORTARA, L.; CUCCOVIA, I. M.; BROCCHI, M.; GUEIROS-FILHO, F. J. Violacein targets the cytoplasmic membrane of bacteria. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, n. 4, p. 539–549, 2019. DOI: 10.1021/acsinfecdis.8b00245.

CAZOTO, L. L.; MARTINS, D.; RIBEIRO, M. G.; DURÁN, N.; NAKAZATO, G. Antibacterial activity of violacein against *Staphylococcus aureus* isolated from Bovine Mastitis. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, n. 5, p. 395–397, 2011. DOI: 10.1038/ja.2011.13.

CERASANA. **Estudo de Mercado: Pigmentos**. 2023.

CHENG, K. C.; HSIAO, H. C.; HOU, Y. C.; HSIEH, C. W.; HSU, H. Y.; CHEN, H. Y.; LIN, S. P. Improvement in Violacein Production by Utilizing Formic Acid to Induce Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum*. **Antioxidants**, v. 11, n. 5, 2022. DOI: 10.3390/antiox11050849.

CHOI, S. Y.; LIM, S.; YOON, K. H.; LEE, J. I.; MITCHELL, R. J. Biotechnological Activities and Applications of Bacterial Pigments Violacein and Prodigiosin. **Journal of Biological Engineering**, BioMed Central Ltd, 2021. DOI: 10.1186/s13036-021-00262-9.

CHOI, S. Y.; YOON, K. H.; LEE, J. I.; MITCHELL, R. J. Violacein: Properties and production of a versatile bacterial pigment. **BioMed Research International**, Hindawi Publishing Corporation, 2015. DOI: 10.1155/2015/465056.

DAHLEM, C.; CHANDA, S.; HEMMER, J.; SCHYMIK, H. S.; KOHLSTEDT, M.; WITTMANN, C.; KIEMER, A. K. Characterization of Anti-Cancer Activities of Violacein: Actions on Tumor Cells and the Tumor Microenvironment. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 2022. DOI: 10.3389/fonc.2022.872223.

DE CARVALHO, D. D.; COSTA, F. T. M.; DURAN, N.; HAUN, M. Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 8, p. 1514–1521, 2006. DOI: 10.1016/j.tiv.2006.06.007.

DIKE-NDUDIM, J.N.; UGENYI, L.C.; NDUBUEZE, C. W. Assessment of antifungal potentials of violacein extract from *Chromobacterium violaceum* isolated from domestic and recreational water sources in Owerri, Imo State, Nigeria. **World Journal of Advanced Research and Reviews**, v. 10, n. 3, p. 168–172, 2021. DOI: 10.30574/wjarr.2021.10.3.0243.

DUFOSSÉ, L. Microbial Pigments From Bacteria, Yeasts, Fungi, and Microalgae for the Food and Feed Industries. *Em: Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes*: Elsevier, p. 113–132, 2018. DOI: 10.1016/b978-0-12-811518-3.00004-1.

DURÁN, N.; CASTRO, G. R.; PORTELA, R. W. D.; FÁVARO, W. J.; DURÁN, M.; TASIC, L.; NAKAZATO, G. Violacein and its antifungal activity: comments and potentialities. **Letters in Applied Microbiology**, John Wiley and Sons Inc, 2022. DOI: 10.1111/lam.13760.

DURÁN, N. et al. Multi-target drug with potential applications: violacein in the spotlight. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Springer Science and Business Media B.V., 2021. DOI: 10.1007/s11274-021-03120-4.

DURÁN, N.; JUSTO, G. Z.; DURÁN, M.; BROCCHI, M.; CORDI, L.; TASIC, L.; CASTRO, G. R.; NAKAZATO, G. Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: A review. **Biotechnology Advances**, Elsevier Inc., 2016. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.06.003.

FARIA, Alessandra V. S.; FONSECA, Emanuella M. B.; FERNANDES-OLIVEIRA, Patrícia de S.; DE LIMA, Tanes I.; CLERICI, Stefano P.; JUSTO, Giselle Z.; SILVEIRA, Leonardo R.;

DURÁN, Nelson; FERREIRA-HALDER, Carmen V. Violacein switches off low molecular weight tyrosine phosphatase and rewires mitochondria in colorectal cancer cells. **Bioorganic Chemistry**, v. 127, 2022. DOI: 10.1016/j.bioorg.2022.106000.

FDA; CDER. **Q3C-Tables and List Guidance for Industry Q3C-Tables and List Guidance for Industry Q3C-Tables and List Guidance for Industry 1**. 2017. Disponível em: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>.

FREDIANSYAH, A.; MANUHARA, Y. S. W.; KRISTANTI, A. N.; LUQMAN, A.; WIBOWO, A. T. Fermentation in Minimal Media and Fungal Elicitation Enhance Violacein and Deoxyviolacein Production in Two *Janthinobacterium* Strains. **Fermentation**, v. 8, n. 12, p. 714, 2022. DOI: 10.3390/fermentation8120714.

GAO, A.; CHEN, H.; HOU, A.; XIE, K. Efficient antimicrobial silk composites using synergistic effects of violacein and silver nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 103, 2019. DOI: 10.1016/j.msec.2019.109821.

GOHIL, N.; BHATTACHARJEE, G.; GAYKE, M.; NARODE, H.; ALZHRANI, K. J.; SINGH, V. Enhanced production of violacein by *Chromobacterium violaceum* using agro-industrial waste soybean meal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 2, p. 1121–1133, 2022. DOI: 10.1111/jam.15277.

GONÇALVES, P. R.; ROCHA-BRITO, K. J. P.; FERNANDES, M. R. N.; ABRANTES, J. L.; DURÁN, N.; FERREIRA-HALDER, C. V. Violacein induces death of RAS-mutated metastatic melanoma by impairing autophagy process. **Tumor Biology**, v. 37, n. 10, p. 14049–14058, 2016. DOI: 10.1007/s13277-016-5265-x.

GUO, Y.; HUI, C. Y.; LIU, L.; CHEN, M. P.; HUANG, H. Y. Development of a bioavailable Hg(II) sensing system based on MerR-regulated visual pigment biosynthesis. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-92878-6.

GUPTA, R.; GHOSH, S. K. Discerning perturbed assembly of lipids in a model membrane in presence of violacein: Effects of membrane hydrophobicity. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1865, n. 4, 2023. DOI: 10.1016/j.bbamem.2023.184130.

GÜRSES, A.; AÇIKYILDIZ, M.; GÜNEŞ, K.; GÜRSES, M. S. Dyes and Pigments: Their Structure and Properties. p. 13–29. DOI: 10.1007/978-3-319-33892-7_2.

GÜRSES, A.; AÇIKYILDIZ, M.; GÜNEŞ, K.; ŞAHİN, E. Natural dyes and pigments in food and beverages. *Em: Renewable Dyes and Pigments*, Elsevier, 2024. p. 49–76. DOI: 10.1016/B978-0-443-15213-9.00013-2.

HASHIMI, S. M.; XU, T.; WEI, M. Q. Violacein anticancer activity is enhanced under hypoxia. **Oncology Reports**, v. 33, n. 4, p. 1731–1736, 2015. DOI: 10.3892/or.2015.3781.

HOSHINO, T. Violacein and related tryptophan metabolites produced by *Chromobacterium violaceum*: biosynthetic mechanism and pathway for construction of violacein core. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 6, p. 1463–1475, 2011. DOI: 10.1007/s00253-011-3468-z.

HUANG, C.; CHU, X.; HUI, W.; XIE, C; XU, X. Study on extraction and characterization of new antibiotics violacein from engineered *E. coli* VioABCDE-SD. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 2023. DOI: 10.1002/bab.2454.

HUI, C.Y.; GUO, Y; LI, H; GAO, C. Xi.; YI, J. Detection of environmental pollutant cadmium in water using a visual bacterial biosensor. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 2022. a. DOI: 10.1038/s41598-022-11051-9.

HUI, C. Y.; GUO, Y.; LIU, L.; ZHANG, N. X.; GAO, C. X.; YANG, X. Q.; YI, J. Genetic control of violacein biosynthesis to enable a pigment-based whole-cell lead biosensor. **RSC Advances**, v. 10, n. 47, p. 28106–28113, 2020. DOI: 10.1039/d0ra04815a.

HUI, C.Y.; GUO, Y.; ZHU, D. L.; LI, L. M.; YI, J; ZHANG, N.X. Metabolic engineering of the violacein biosynthetic pathway toward a low-cost, minimal-equipment lead biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 214, 2022. b. DOI: 10.1016/j.bios.2022.114531.

ISHIMOTO, C. K. Estudo exploratório da produção de corantes microbianos azulados para possíveis aplicações em alimentos. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Campinas, Campinas - SP. Disponível em: <http://lattes.cnpq.br/8853150110393247>.

KANELLI, M. et al. A Machine Learning-optimized system for on demand, pulsatile, photo- and chemo-therapeutic treatment using near-infrared responsive MoS₂-based microparticles in a breast cancer model, 2023.

KANELLI, M.; MANDIC, M.; KALAKONA, M.; VASILAKOS, S.; KEKOS, D.; NIKODINOVIC-RUNIC, J.; TOPAKAS, E. Microbial production of violacein and process optimization for dyeing polyamide fabrics with acquired antimicrobial properties. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUL, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01495.

KANELLI, M.; SALEH, B.; WEBSTER, T. J.; VOUYIOUKA, S.; TOPAKAS, E. Co-Encapsulation of Violacein and Iron Oxide in Poly(lactic acid) Nanoparticles for Simultaneous Antibacterial and Anticancer Applications. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 18, n. 3, p. 729–739, 2022. DOI: 10.1166/jbn.2022.3305.

KHAKSAR, F.; RIGI, G.; MIRDAMADIAN, S. H. Creation of a violacein pigment hybrid with silver and titanium dioxide nanoparticles to produce multifunctional textiles with antimicrobial properties. **Nanomedicine Research Journal**, v. 6, n. 1, p. 60–72, 2021. DOI: 10.22034/nmrj.2021.01.007.

KHOLANY, M.; TRÉBULLE, P.; MARTINS, M.; VENTURA, S. P. M.; NICAUD, J. Marc; COUTINHO, J. A. P. Extraction and purification of violacein from *Yarrowia lipolytica* cells using aqueous solutions of surfactants. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 95, n. 4, p. 1126–1134, 2020. DOI: 10.1002/jctb.6297.

KONZEN, M; DE MARCO, D.; CORDOVA, C. A. S.; VIEIRA, T. O.; ANTÔNIO, R. V.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Antioxidant properties of violacein: Possible relation on its biological function. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 24, p. 8307–8313, 2006. DOI: 10.1016/j.bmc.2006.09.013.

LEAL, A. M. De S.; DE QUEIROZ, J. D. F.; DE MEDEIROS, S. R. B.; LIMA, T. K. De S.; AGNEZ-LIMA, L. F. Violacein induces cell death by triggering mitochondrial membrane

hyperpolarization in vitro Signaling and cellular microbiology. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, 2015. DOI: 10.1186/s12866-015-0452-2.

LEE, J.; BAE, J.; YOUN, D. Y.; AHN, J.; HWANG, W.T.; BAE, H.; BAE, P. K.; KIM, I. D. Violacein-embedded nanofiber filters with antiviral and antibacterial activities. **Chemical Engineering Journal**, v. 444, 2022. DOI: 10.1016/j.cej.2022.136460.

LICHSTEIN, H. C.; VAN DE SAND, V. F. Violacein, an Antibiotic Pigment Produced by *Chromobacterium Violaceum*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 76, n. 1, p. 47–51, 1945. DOI: 10.1093/infdis/76.1.47.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development q settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**. Disponível em: www.elsevier.com/locate/drugdeliv.

LUNA, S. L. R.; RAMÍREZ-GARZA, R. E.; SALDÍVAR, S. S. O. Environmentally Friendly Methods for Flavonoid Extraction from Plant Material: Impact of Their Operating Conditions on Yield and Antioxidant Properties. **Scientific World Journal**, Hindawi Limited, 2020. DOI: 10.1155/2020/6792069.

MASUELLI, L. et al. Violacein, an indole-derived purple-colored natural pigment produced by *Janthinobacterium lividum*, inhibits the growth of head and neck carcinoma cell lines both in vitro and in vivo. **Tumor Biology**, v. 37, n. 3, p. 3705–3717, 2016. a. DOI: 10.1007/s13277-015-4207-3.

MEHTA, T.; VERCRUYSSSE, K.; JOHNSON, T.; EJIOFOR, A. O; MYLES, E.; QUICK, Q. A. Violacein induces p44/42 mitogen-activated protein kinase-mediated solid tumor cell death and inhibits tumor cell migration. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 1, p. 1443–1448, 2015. DOI: 10.3892/mmr.2015.3525.

MEJIA, E. G; ZHANG, Q.; PENTA, K.; EROGLU, A.; LILA, M. A. The Colors of Health: Chemistry, Bioactivity, and Market Demand for Colorful Foods and Natural Food Sources of Colorants. 2020. DOI: 10.1146/annurev-food-032519.

MOJIB, N.; NASTI, T. H.; ANDERSEN, D. T.; ATTIGADA, V. R.; HOOVER, R.B.; YUSUF, N.; BEJ, A. K. The antiproliferative function of violacein-like purple violet pigment (PVP) from an Antarctic *Janthinobacterium* sp. Ant5-2 in UV-induced 2237 fibrosarcoma. **International Journal of Dermatology**, v. 50, n. 10, p. 1223–1233, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-4632.2010.04825.x.

MOHAMMADI, M.; AHANGARI, H.; MOUSAZADEH, S.; HOSSEINI, S. M.; DUFOSSÉ, L. Microbial pigments as an alternative to synthetic dyes and food additives: a brief review of recent studies. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, 2022. DOI: 10.1007/s00449-021-02621-8.

NAKAZATO, G.; GONÇALVES, M. C.; NEVES, M. DAS. DAS; KOBAYASHI, R. K.T.; BROCCHI, M.; DURÁN, N. Violacein@Biogenic Ag system: synergistic antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. **Biotechnology Letters**, v. 41, n. 12, p. 1433–1437, 2019. DOI: 10.1007/s10529-019-02745-8.

NEMER, G.; LOUKA, N.; BLANDIN, P. R.; MAROUN, R. G.; VOROBIEV, E.; ROSSIGNOL, T.; NICAUD, J. M.; GUÉNIN, E.; KOUBAA, M. Purification of Natural Pigments Violacein and Deoxyviolacein Produced by Fermentation Using *Yarrowia lipolytica*. **Molecules**, v. 28, n. 11, 2023. DOI: 10.3390/molecules28114292.

NERONI, B.; ZINGAROPOLI, M. A.; RADOCCIA, G.; CIARDI, M. R.; MOSCA, L.; PANTANELLA, F.; SCHIPPA, S. Evaluation of the anti-proliferative activity of violacein, a natural pigment of bacterial origin, in urinary bladder cancer cell lines. **Oncology Letters**, v. 23, n. 4, 2022. DOI: 10.3892/ol.2022.13252.

NEWSOME, A. G.; CULVER, C. A.; VAN BREEMEN, R. B. Nature's Palette: The Search for Natural Blue Colorants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 28, p. 6498–6511, 2014. DOI: 10.1021/jf501419q.

NIGAM, P. S. LUKE, J. S. Food additives: Production of microbial pigments and their antioxidant properties. **Current Opinion in Food Science**, Elsevier, 2016. DOI: 10.1016/j.cofs.2016.02.004.

OLIVEIRA, P. F. DE S.; FARIA, A. V. S.; CLERICI, S. P.; AKAGI, Erica M.; CARVALHO, H. F.; JUSTO, Giselle Z.; DURÁN, N.; FERREIRA-HALDER, C. V. Violacein negatively modulates the colorectal cancer survival and epithelial–mesenchymal transition. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 123, n. 7, p. 1247–1258, 2022. DOI: 10.1002/jcb.30295.

OLIVERA-BRAVO, S et al. Neuroprotective effects of violacein in a model of inherited amyotrophic lateral sclerosis. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-06470-7.

OSMAN, S. H.; SETU, S. A. Fabrication of Nylon-66 Membranes Coated with Violacein Pigment for Wound Dressing Application. **eProceedings Chemistry**, v. 3, n. 3, 2018.

PARK, H. A.; PARK, S. A.; YANG, Y. H.; CHOI, K. Y. Microbial synthesis of violacein pigment and its potential applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, Taylor and Francis, 2021. DOI: 10.1080/07388551.2021.1892579.

PLATT, D.; AMARA, S.; MEHTA, T.; VERCUYSSÉE, K.; MYLES, E. L.; JOHNSON, T.; TIRIVEEDHI, V. Violacein inhibits matrix metalloproteinase mediated CXCR4 expression: Potential anti-tumor effect in cancer invasion and metastasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 455, n. 1–2, p. 107–112, 2014. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.10.124.

QUEIROZ, K. C. S. et al. Violacein Induces Death of Resistant Leukaemia Cells via Kinome Reprogramming, Endoplasmic Reticulum Stress and Golgi Apparatus Collapse. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0045362.

REICHARDT, C. Empirical Parameters of Solvent Polarity as Linear Free-Energy Relationships. **Angewandte Chemie International Edition in English**, 1979. DOI: 10.1002/anie.197900981.

RETTORI, D.; DURA, N. Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*, 1998.

RODRIGUES, A. L.; GÖCKE, Y.; BOLTEN, C.; BROCK, N. L.; DICKSCHAT, J. S.; WITTMANN, C. Microbial production of the drugs violacein and deoxyviolacein: Analytical development and strain comparison. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 4, p. 717–720, 2012. DOI: 10.1007/s10529-011-0827-x.

RODRIGUES, A. L. et al. Systems metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of the antitumor drugs violacein and deoxyviolacein. **Metabolic Engineering**, v. 20, p. 29–41, 2013. DOI: 10.1016/j.ymben.2013.08.004.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. 3. ed. Campinas, SP.

ROSLI, N.; SETU, S. A. Polyvinyl-alcohol/polyvinyl-pyrrolidone membranes coated with violacein pigments as antibacterial agent for wound dressing application. **eProceedings Chemistry**, v. 3, n. 4, 2018.

SÁNCHEZ-MUÑOZ, S.; MARIANO-SILVA, G.; LEITE, M. O.; MURA, F. B.; VERMA, M. L.; DA SILVA, S. S.; CHANDEL, A. K. Production of fungal and bacterial pigments and their applications. *Em: Biotechnological Production of Bioactive Compounds*, Elsevier, 2019. p. 327–361. DOI: 10.1016/B978-0-444-64323-0.00011-4.

SANTOS, M. C. Dos; BICAS, J. L. Natural blue pigments and bikaverin. **Microbiological Research**, Elsevier GmbH, 2021. DOI: 10.1016/j.micres.2020.126653.

SASIDHARAN, A.; SASIDHARAN, N. K.; AMMA, D. B. N. S.; VASU, R. K.; NATARAJA, A. V.; BHASKARAN, K. Antifungal activity of violacein purified from a novel strain of *Chromobacterium* sp. NIIST (MTCC 5522). **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 10, p. 694–701, 2015. DOI: 10.1007/s12275-015-5173-6.

SCHAEFFER, N.; KHOLANY, M.; VELOSO, T. L. M.; PEREIRA, J. L.; VENTURA, S. P. M.; NICAUD, J. M.; COUTINHO, J. A. P. Temperature-responsive extraction of violacein using a tuneable anionic surfactant-based system. **Chemical Communications**, v. 55, n. 59, p. 8643–8646, 2019. DOI: 10.1039/c9cc03831k.

SEN, T.; BARROW, C. J.; DESHMUKH, S. K. Microbial pigments in the food industry—challenges and the way forward. **Frontiers in Nutrition**, Frontiers Media S.A., 2019. DOI: 10.3389/fnut.2019.00007.

SILVA, M. S.; STUCHI M. P. DA; VIDAL, E. C.; HAUN, M.; DUR, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in v79 cells. **In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal**, v. 36, p. 539–543, 2000. DOI: 10.00+0.00.

SIMON, J. E.; DECKER, E. A.; FERRUZZI, M. G.; GIUSTI, M. M.; MEJIA, C. D.; GOLDSCHMIDT, M.; TALCOTT, S. T. Establishing Standards on Colors from Natural Sources. **Journal of Food Science**, Blackwell Publishing Inc., 2017. DOI: 10.1111/1750-3841.13927.

SUBRAMANIAM, S.; RAVI, V.; SIVASUBRAMANIAN, A. Synergistic antimicrobial profiling of violacein with commercial antibiotics against pathogenic micro-organisms. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 1, p. 86–90, 2014. DOI: 10.3109/13880209.2013.815634.

PERIZ, Ç. D.; ULUSOY, S.; TINAZ, G.; SEKERLER, T. Antibacterial and Anticancer Activities of Violacein Extracted Through Ultrasound-Assisted Extraction Method, **Akademik Gıda**, v. 18, n. 3, p. 241-246, 2020. DOI: 10.24323/akademik-gida. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/348847957>.

SURYAWANSHI, R. K.; PATIL, C. D.; BORASE, H. P.; NARKHEDE, C. P.; STEVENSON, A.; HALLSWORTH, J. E.; PATIL, S. V. Towards an understanding of bacterial metabolites prodigiosin and violacein and their potential for use in commercial sunscreens. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 37, n. 1, p. 98–107, 2015. DOI: 10.1111/ics.12175.

UMAR, A.; DARWISH, D. B. E.; ALENEZI, M. A. Fungal pigments: Secondary metabolites and their application. *Em: Fungal Secondary Metabolites*, Elsevier, 2024. p. 173–195. DOI: 10.1016/B978-0-323-95241-5.00009-5.

VENEGAS, F.A.; KÖLLISCH, G.; MARK, K.; DIEDERICH, W. E.; KAUFMANN, A.; BAUER, S.; CHAVARRÍA, M.; ARAYA, J. J.; GARCÍA-PIÑERES, A. J. The Bacterial Product Violacein Exerts an Immunostimulatory Effect Via TLR8. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-50038-x.

VENIL, C. K.; YUSOF, N. Z.; ARULDASS, C. A.; AHMAD, W. A. Application of violet pigment from *Chromobacterium violaceum* UTM5 in textile dyeing. **Biologia (Poland)**, v. 71, n. 2, p. 121–127, 2016. DOI: 10.1515/biolog-2016-0031.

VENIL, C. K.; ARULDASS, C. A.; ABD HALIM, M. Ha.; KHASIM, A. R.; ZAKARIA, Z. A.; AHMAD, W. A.. Spray drying of violet pigment from *Chromobacterium violaceum* UTM 5 and its application in food model systems. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 102, p. 324–329, 2015. DOI: 10.1016/j.ibiod.2015.02.006.

VERINAUD, L. et al. Violacein treatment modulates acute and chronic inflammation through the suppression of cytokine production and induction of regulatory T cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0125409.

VERMA, S.; PANDEY, A.K. An *In-silico* Approach to Explore the Possible Multifunctional Neuroprotective Efficacy of Violacein against Ischemic Stroke. **Journal of In Silico & In Vitro Pharmacology**, v. 3, n. 2, 2017. DOI: 10.21767/2469-6692.100017.

WANG, H.; JIANG, P.; LU, Y.; RUAN, Z.; JIANG, R.; XING, X-H.; LOU, K.; WEI, D. Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain of *Duganella* sp. B2. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 2–3, p. 119–124, 2009. DOI: 10.1016/j.bej.2008.11.008.

WANG, H.; WANG, F.; ZHU, X.; YAN, Y.; YU, X.; JIANG, P.; XING, X. H. Biosynthesis and characterization of violacein, deoxyviolacein and oxyviolacein in heterologous host, and their antimicrobial activities. **Biochemical Engineering Journal**, v. 67, p. 148–155, 2012. DOI: 10.1016/j.bej.2012.06.005.

WU, X.; KAZAKOV, A. E.; GUSHGARI-DOYLE, S.; YU, X.; TROTTER, V.; STUART, R. K.; CHAKRABORTY, R. Comparative Genomics Reveals Insights into Induction of Violacein Biosynthesis and Adaptive Evolution in *Janthinobacterium*. Disponível em: <https://journals.asm.org/journal/spectrum>.

XU, X.; CHU, X.; DU, B.; HUANG, C.; XIE, C.; ZHANG, Z.; JIANG, L. Functional characterization of a novel violacein biosynthesis operon from *Janthinobacterium* sp. B9-8. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, n. 8, 2022. DOI: 10.1007/s00253-022-11929-8.

YADAV, S.; TIWARI, K. S.; GUPTA, C.; TIWARI, M. K.; KHAN, A.; SONKAR, S. P. A brief review on natural dyes, pigments: Recent advances and future perspectives. **Results in Chemistry**, v. 5, p. 100733, 2023. DOI: 10.1016/j.rechem.2022.100733.

ANEXO



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº A7880EF

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A7880EF**
 Usuário: **UNICAMP**
 CPF/CNPJ: **46.068.425/0001-33**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Janthinobacterium sp.

Título da Atividade: **Produção do pigmento violaceína por Janthinobacterium sp.**

Equipe

Caroline Kie Ishimoto	UNICAMP
Juliano Lemos Bicas	UNICAMP
Simone Aparecida de Lima Scaramussa	UNICAMP

Data do Cadastro: **20/09/2022 09:39:21**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **12:45** de **07/03/2023**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**