



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Graduação de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

LARISSA ALVES DE TOLEDO SOUSA

**Avaliação da condição de agitação na produção de corante por
*Streptomyces carpaticus***

Araraquara, SP

2024

LARISSA ALVES DE TOLEDO SOUSA

**AVALIAÇÃO DA CONDIÇÃO DE AGITAÇÃO NA
PRODUÇÃO DE COLORANTE POR *STREPTOMYCES*
*CARPATICUS***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Engenheiro(a) de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro de Baptista Neto.

Araraquara, SP

2024

S725a

Sousa, Larissa Alves de Toledo.
Avaliação da condição de agitação na produção de corante
por *Streptomyces carpaticus* / Larissa Alves de Toledo Sousa. –
Araraquara, 2024.
66 f. : il.

Orientador: Álvaro de Baptista Neto

Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Bioprocessos
e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

1. Colorantes microbianos. 2. kLa. 3. Iodometria.
4. *Streptomyces carpaticus*. 5. Transferência de oxigênio.
I. Baptista Neto, Álvaro de. orient. II. Título.

Dedico,

À minha mãe, Renata (*in memoriam*),
minha maior incentivadora e melhor amiga,
a quem devo todo o meu amor. É como se eu
fechasse os olhos e ainda pudesse sentir seu
abraço e colo de mãe.

Ao meu amado pai e porto seguro,
Alexandre.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, agradeço a Deus, Senhor e criador de toda ciência. A Virgem Santíssima, que intercede por mim e não me deixa esmorecer.

À mamãe, Renata (in memoriam), meu “bixinho”, amor que ultrapassa este tempo e espaço, meu anjo da guarda e intercessora, quem sempre me incentivou, amou e fez o impossível para meu crescimento. Minha companheira, uma honra ser sua filha, obrigada por tudo, mamãe! Como sofro a sua ausência...

Ao papai, Alexandre, que sempre foi meu ponto de apoio nos momentos mais difíceis e incertos. Que sempre fez de tudo por nós, que nunca desanima e sempre tem uma palavra amorosa para nos apoiar e incentivar. Te amo!

À vovó Vera, meu “carunchinho”, minha companheira nessa vida, que sempre faz tudo com muito amor e dedicação, que sempre me apoia, meu lar.

Às minhas irmãs, Thaís e Marina, que fazem dessa dura jornada da vida ser mais leve e engraçada, minhas parceiras que amo tanto! Tantas boas histórias para contar...

Ao meu amado, Lucas, o ser humano mais doce e generoso que conheço, que privilégio dividir a vida ao seu lado, obrigada por toda ajuda, por todo apoio e incentivo, que sempre me ajuda a erguer a cabeça mesmo quando tudo parece não ter saída.

À minha amiga e alma gêmea Heloisa, que me entende, me apoia e que sempre fará o melhor brownie do mundo! Minha parceira de todos os momentos, que saudades tenho da nossa convivência diária. Obrigada por tudo!

Aos meus amigos da “Panelinha Formada”, que fizeram da graduação mais engraçada e leve. Parceiros de estudos, de risadas e que proporcionaram os momentos mais legais que vivi na graduação! Obrigada por tudo!

Ao meu professor e orientador Álvaro, a todos meus professores de graduação. Obrigada por todo o ensinamento, sem dúvidas, não estaria onde estou sem a nobre missão de vocês!

Ao meu parceiro de experimentos André, ao técnico Mateus Scontrì, que me auxiliaram na parte prática de determinação do k_{La} .

À UNESP, pela oportunidade de ter estudado em uma das melhores universidades do país.

A todos que me ajudaram de forma direta e indireta!

RESUMO

Os colorantes de origem microbiana emergem como uma alternativa ascendente aos colorantes sintéticos, impulsionados pela crescente preocupação com a saúde e o meio ambiente. Além disso, os colorantes microbianos apresentam diversas vantagens, tais como propriedades farmacológicas, atividade antibiótica, anticancerígena, imunossupressora, antifúngica, bactericida, antitumoral e antioxidante, além de sua produção ser mais sustentável comparada aos sintéticos. Conforme apontado pelo *Global Info Research*, no ano de 2020, prevê-se um crescimento de US\$ 1620 milhões nos próximos anos no mercado de colorantes microbianos. As bactérias do gênero *Streptomyces* são amplamente reconhecidas pela produção de metabólitos secundários, incluindo colorantes. Nesse contexto, é crucial estabelecer as condições ideais para essa produção. Em processos biotecnológicos, o estudo da transferência de oxigênio (k_{LA}) assume grande relevância, uma vez que tais bactérias são aeróbicas. Os métodos usuais para determinar o k_{LA} frequentemente requerem sensores específicos e condições operacionais mais robustas. O presente projeto tem como objetivo determinar o k_{LA} em cultivo de *Streptomyces carpaticus*, durante a produção de colorante, utilizando a técnica da iodometria em agitador, que consiste em uma abordagem mais simples e que dispensa o uso de sensores. Foram investigadas rotações de 100, 150 e 200 rotações por minuto (rpm), e os resultados indicaram uma relação entre a rotação, o k_{LA} e a concentração celular. Observou-se que o aumento da agitação resultou em um crescimento nos valores de k_{LA} , concentração celular e de produto das demais analisadas, sendo a rotação de 200 rpm a mais eficaz, apresentando resultados com baixa dispersão nas análises envolvidas, gerando uma concentração celular média de 1,463 g/L e k_{LA} médio de 10,4909 h⁻¹. Conforme os resultados obtidos no presente projeto, é evidente a necessidade de mais estudos sobre a produção de colorantes por *Streptomyces carpaticus*, dada a escassez de literatura existente e a importância de aprofundar a compreensão sobre esse tema.

Palavras-chave: colorantes microbianos; k_{LA} ; iodometria; *Streptomyces carpaticus*; transferência de oxigênio.

ABSTRACT

Microbial origin colorants are emerging as a rising alternative to synthetic colorants, driven by growing concerns about health and the environment. Additionally, microbial colorants present various advantages such as pharmacological properties, antibiotic, anticancer, immunosuppressive, antifungal, bactericidal, antitumoral, and antioxidant activities, besides their production being more sustainable compared to synthetics. According to Global Info Research, a growth of \$1620 million is expected in the coming years in the microbial colorant market by 2020. *Streptomyces* bacteria are widely recognized for the production of secondary metabolites, including colorants. In this context, it is crucial to establish ideal conditions for this production. In biotechnological processes, the study of oxygen transfer (k_{La}) assumes great relevance since such bacteria are aerobic. The usual methods for determining k_{La} often require specific sensors and more robust operational conditions. This project aims to determine k_{La} in *Streptomyces carpaticus* cultivation during colorant production using the iodometry technique in a shaker, which is a simpler approach that does not require sensor use. Rotations of 100, 150, and 200 rotations per minute (rpm) were investigated, and the results indicated a relationship between rotation, k_{La} , and cell concentration. It was observed that increased agitation resulted in growth in k_{La} values, cell concentration, and product concentration of other analyzed factors, with 200 rpm rotation being the most effective, showing results with low dispersion in the analyses involved, generating an average cell concentration of 1.463 g/L and an average k_{La} of 10.4909 h⁻¹. According to the results obtained in this project, there is a clear need for further studies on colorant production by *Streptomyces carpaticus*, given the scarcity of existing literature and the importance of deepening understanding on this topic.

Keywords: microbial colorants; k_{La} ; iodometry; *Streptomyces carpaticus*; oxygen transfer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resistências vinculadas à dissolução do oxigênio.....	9
Figura 2 – Fluxo de funcionamento de um espectrofotômetro.	14
Figura 3 - Espectro eletromagnético.	15
Figura 4 - Placa selecionada apresentando melhor aspecto de esporulação.	20
Figura 5 - Esquema dos procedimentos realizados.....	21
Figura 6 - Procedimento para o teste de temperatura.	22
Figura 7 - Esquema do procedimento para o teste de rotação.....	23
Figura 8 - Biomassa obtida após procedimento de massa seca.	24
Figura 9 - Colônias selecionadas pelo screening morfológico.	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Colorantes produzidos por diferentes microrganismos.	6
Tabela 2 - Concentração celular por massa seca [g/L].	30
Tabela 3 – Concentração de produto (420 nm) [uABS].	30
Tabela 4 - Concentração celular por massa seca [g/L].	31
Tabela 5 – Concentração de Produto [uABS].	31
Tabela 6 - Volumes e concentrações molares de tiosulfato na execução do "branco".	34
Tabela 7 – Quantidade de número de moles de tiosulfato de sódio para a rotação de 100 rpm.	35
Tabela 8 – Quantidade de número de moles de tiosulfato de sódio para a rotação de 150 rpm.	35
Tabela 9 – Quantidade de número de moles de tiosulfato de sódio para a rotação de 200 rpm.	36
Tabela 10 - Ir e n_{sulfito} para a rotação de 100 rpm.	37
Tabela 11 - Ir e n_{sulfito} para a rotação de 150 rpm.	37
Tabela 12 - Ir e n_{sulfito} para a rotação de 200 rpm.	38
Tabela 13 - M_{sulfito} para a rotações de 100, 150 e 200 rpm.	39
Tabela 14 - Valores de $\Delta M_{\text{sulfito}}$, ΔM_{O_2} e N_{O_2} para a rotação de 100 rpm.	40
Tabela 15 - Valores de $\Delta M_{\text{sulfito}}$, ΔM_{O_2} e N_{O_2} para a rotação de 150 rpm.	40
Tabela 16 - Valores de $\Delta M_{\text{sulfito}}$, ΔM_{O_2} e N_{O_2} para a rotação de 200 rpm.	41
Tabela 17 - Valores de $k_L a$ para as rotações de 100, 150 e 200 rpm.	42
Tabela 18 - Valores de $k_L a$ e de concentração celular por massa seca para as rotações de 100, 150 e 200 rpm.	44
Tabela 19 - Valores de $k_L a$ e de concentração de produto para as rotações de 100, 150 e 200 rpm.	45

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva característica do método <i>gassing-in e gassing-out</i>	12
Gráfico 2 - k_{La} como coeficiente angular.....	13
Gráfico 3 - k_{La} x Rotação.....	43
Gráfico 4 - Análise dos valores de k_{La} e de concentração celular por massa seca para as rotações de 100, 150 e 200 rpm.....	44
Gráfico 5 - Análise dos valores de k_{La} e de concentração de produto para as rotações de 100, 150 e 200 rpm.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BOD	Câmara incubadora
Cs	Concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida
Cs*	Concentração de saturação de oxigênio dissolvido na fase líquida
DCC	Delineamento Composto Central
$\Delta M_{\text{sulfito}}$	Variação molar de sulfito
ΔM_{O_2}	Variação molar de oxigênio
I ₀	Iodo inicial
I _r	Iodo residual
KI	Iodeto de potássio
KIO ₃	Iodato de potássio
k _{La}	Coeficiente de transferência volumétrico de oxigênio
M _{sulfito}	Concentração molar do sulfito
Mt	Média da concentração molar de Na ₂ S ₂ O ₃
Na ₂ S ₂ O ₃	Tiosulfato de sódio
N _{O2}	Velocidade de transferência de oxigênio
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	JUSTIFICATIVA	2
2.	OBJETIVOS	3
2.1.	OBJETIVO GERAL	3
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1.	COLORANTES	4
3.1.1.	Colorantes naturais	4
3.1.2.	Colorantes sintéticos	4
3.2.	COLORANTES MICROBIANOS	5
3.3.	<i>Streptomyces sp.</i>	7
3.3.1.	<i>Streptomyces carpaticus</i>	8
3.4.	TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO	8
3.4.1.	Taxa de transferência de oxigênio	9
3.5.	COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO (k_{La})	10
3.6.	MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE k_{La}	10
3.6.1.	Método do sulfito	11
3.6.2.	Método <i>gassing-in</i> e <i>gassing-out</i>	11
3.6.3.	Método do balanço de oxigênio	13
3.7.	ESPECTROFOTOMETRIA	14
3.8.	MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA E ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO CELULAR	15
3.9.	TITULOMETRIA	16
3.10.	IODOMETRIA	17
4.	METODOLOGIA	19

4.1.	LISTA DE MATERIAIS	19
4.2.	EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	19
4.3.	MICRORGANISMO.....	19
4.4.	CULTIVO DE <i>Streptomyces carpaticus</i>	20
4.4.1.	Diluição seriada	20
4.4.2.	Screening morfológico	21
4.5.	CULTIVO EM SHAKER.....	21
4.5.1.	Reativação	21
4.5.2.	Teste de temperatura	21
4.5.3.	Teste de rotação	22
4.6.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PRODUTO	23
4.7.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS.....	23
4.8.	DETERMINAÇÃO DO k_{La}	24
4.8.1.	Iodometria para determinação da concentração de sulfito de sódio	24
4.8.2.	Cálculos para a determinação do k_{La}	25
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1.	TESTE DE TEMPERATURA.....	29
5.1.1.	Screening morfológico	29
5.1.2.	Absorbância e massa seca	30
5.2.	TESTE DE ROTAÇÃO.....	31
5.3.	DETERMINAÇÃO DO k_{La}	32
5.4.	RELAÇÃO ENTRE k_{La} , CONCENTRAÇÃO CELULAR E CONCENTRAÇÃO DE PRODUTO	44
6.	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

A coloração emerge como um dos primeiros critérios sensoriais humanos em relação a alimentos, vestuário, cosméticos e fármacos (Morales-Oyervides *et al.*, 2020). Nesse sentido, tem-se buscado a obtenção de colorantes destinados a esses produtos mencionados, com o intuito de aprimorar a sua estética e, por conseguinte, a sua aceitação no consumo. Essa busca tem conduzido ao uso generalizado de colorantes sintéticos, devido ao seu baixo custo e eficácia na função a que se destinam. No entanto, tais colorantes acarretam impactos deletérios no ambiente, poluindo os corpos hídricos e prejudicando os ecossistemas que neles habitam (Mendes *et al.*, 2015). Ademais, o emprego desses colorantes sintéticos também está associado a efeitos toxicológicos em seres humanos, como reações alérgicas e potencial carcinogênico (Tuli *et al.*, 2014).

Frente a essa problemática, os consumidores têm demonstrado crescente preocupação com aspectos relacionados à saúde e ao meio ambiente (Martins, 2019). Assim, a demanda por colorantes provenientes de fontes naturais tem aumentado, conforme evidenciado pelos dados apresentados pela *Global Info Research*, que prevê um crescimento de 5,4% ao ano no mercado mundial de colorantes naturais. Essa projeção resultará, ainda segundo a mesma base de informações, em um valor de US\$ 1620 milhões nos próximos anos (Oliveira *et al.*, 2021).

Os colorantes naturais, por sua vez, referem-se àqueles derivados de variadas fontes orgânicas que detêm a capacidade de produzi-los. Exemplares destas fontes orgânicas produtivas incluem plantas, microrganismos e insetos (Lima, 2018). Esses colorantes naturais não apenas oferecem vantagens para a saúde, mas também são provenientes de fontes que são consideradas limpas e seguras (De Mejia, 2020). Neste âmbito, estão inclusos os colorantes obtidos por via biotecnológica, os quais tem se destacado entre as diversas fontes de colorantes naturais disponíveis, uma vez que permite um controle refinado e aprimoramento do processo biotecnológico, além de ser independente de condições climáticas e requerer menor espaço físico. Os índices de rendimento dos processos fermentativos corroboram a superioridade da produção de colorantes por meio microbiano (Cruz Filho; Teixeira, 2013).

Os principais microrganismos produtores de colorantes compreendem: fungos, bactérias, leveduras e algas (Malik *et al.*, 2012). Dentre o grupo das bactérias, pode-se destacar os colorantes que correspondem a carotenoides, melaninas, violaceína, prodigiosina, piocianina, actinorodina e zeaxantina (Venil *et al.*, 2014). Além da vasta gama de colorantes produzidos, as bactérias apresentam atributos relevantes no que diz respeito a produção, como

é o caso, por exemplo, do ciclo de vida reduzido e da manipulação simples (Midorikawa *et al.*, 2020).

Os diversos processos de produção biotecnológica apresentam desafios referentes a otimização, sendo um fundamental parâmetro de otimização e rendimento o correspondente a taxa de transferência de oxigênio. Este parâmetro também é primordial no que se refere ao escalonamento, visando manter as condições ideais de aeração em maior escala, no que diz respeito a processos aeróbios. Além disto, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}) sempre desempenhou uma função crucial no desenho e na caracterização de processos biotecnológicos. A deficiência na transferência de oxigênio exerce um impacto substancial na eficácia do sistema, uma vez que passa a ser o fator preponderante na determinação da taxa de reação (Cerri *et al.*, 2016). No que concerne a este parâmetro, há diversas metodologias existentes para a determinação do k_{LA} , as estratégias empregadas variam conforme sejam conduzidas, sendo tais métodos divididos em químicos ou físicos. Os métodos químicos demandam uma reação na fase líquida para reduzir a concentração de oxigênio dissolvido (OD) a um nível inferior à saturação. Por sua vez, os métodos físicos se fundamentam em processos de absorção/dessorção envolvendo os fluxos líquidos ou gasosos de exaustão (Cerri *et al.*, 2016).

1.1. JUSTIFICATIVA

O presente estudo encontra sua justificativa na busca pela identificação da melhor condição de agitação dentro da faixa estudada (100, 150 e 200 rpm), para a produção do colorante microbiano derivado de *Streptomyces carpaticus*. Intrínseco a isso, está a determinação do k_{LA} , o qual almeja-se obter via método do sulfito, sendo a determinação da concentração de sulfito por iodometria, com vistas à otimização do processo e à investigação deste metabólito secundário para potenciais aplicações industriais futuras.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo determinar o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) em sistemas não aerados, durante a produção de corante pela bactéria *Streptomyces carpaticus*. Para isto, serão considerados os cultivos submersos que serão realizados nas rotações de 100 rpm, 150 rpm e 200 rpm; todas realizadas em *shaker*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinação do k_{La} em frascos agitados (sistemas não aerados);
- Determinação da influência da agitação no valor de k_{La} ;
- Avaliação da produção de corante em cultivos de *Streptomyces carpaticus* em três diferenças de frequência de agitação orbital.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. COLORANTES

Os colorantes representam um conjunto de compostos orgânicos que podem ser divididos em categorias de origem natural ou sintética (Prado, 2022). Estes compostos são dotados de um sistema de duplas ligações alternadas (conjugadas) que ostentam a capacidade de absorver seletivamente certos comprimentos de onda de radiações eletromagnéticas dentro da faixa do espectro luminoso visível. Tal absorção promove a redistribuição dos elétrons, conferindo à molécula a habilidade de expressar uma cor específica, esse segmento molecular particular é denominado cromóforo (Da Silva, 2013). Os grupos cromóforos usuais compreendem os nitro, nitroso, azo e carbonila. Estes elementos químicos veem sua coloração acentuada e/ou alterada pela presença de grupos auxocromos, tais como etila, nitro, amino, sulfônico, hidroxila, metóxi, etóxi, cloro e bromo, bem como pelos anti-auxocromos (Martins, 2019).

3.1.1. Colorantes naturais

Os colorantes de origem natural referem-se àqueles que são extraídos de diversas fontes orgânicas capazes de produzi-los. Exemplares dessas fontes naturais incluem plantas, microrganismos e insetos (Lima, 2018). Estes colorantes naturais não apenas oferecem vantagens para a saúde, mas também são provenientes de fontes consideradas limpas e seguras (De Mejia, 2020). Por outro lado, os colorantes naturais derivados de plantas enfrentam desafios de estabilidade diante de fatores como temperatura, pH, oxigênio e luz (Da Silva, 2013). Apesar dessas questões de estabilidade, a demanda crescente dos consumidores por colorantes naturais está estimulando as indústrias a buscarem inovações nesse campo (De Mejia, 2020).

3.1.2. Colorantes sintéticos

Os colorantes de origem sintética representam compostos orgânicos amplamente difundidos em diversas esferas, abrangendo setores como a indústria têxtil, farmacêutica, cosmética, de plásticos, de couros, fotográfica, automobilística, de papel e alimentícia. Desde 1856, após a pioneira síntese do primeiro colorante artificial por W. H. Perkin, na Inglaterra, esses colorantes artificiais têm substituído cada vez mais os colorantes naturais. Tal predileção tem sido justificada pelos custos de produção inferiores, pela gama infinita de possibilidades de síntese, possibilitando a inclusão de grupos cromóforos e auxocrômicos diversos, ampliando

assim a paleta de cores e tonalidades, pela pureza aprimorada, pelo rigoroso controle da fidelidade das cores e pela fixação (Zanoni; Yamanaka, 2016).

Os colorantes sintéticos predominam por sua notável estabilidade em face de diversos agentes externos, como luz, oxigênio, calor e variações de pH. Apresentam ainda uma coloração uniforme, alta capacidade de tingimento e a vantagem adicional de estarem isentos de contaminação microbiológica, tudo isso a um custo de produção relativamente baixo. Esses atributos impulsionaram significativamente sua adoção na indústria. Contudo, observa-se uma transição gradual para colorantes naturais, impulsionada por preocupações crescentes com a saúde. Dentro deste âmbito, aproximadamente meia tonelada desses compostos são descartados no meio-ambiente diariamente, devido à sua complexa estrutura e à diversidade da matriz durante o processo de tingimento. Muitos desses resíduos não são adequadamente tratados pelos métodos convencionais, o que pode resultar em séria contaminação ambiental e representar graves riscos para a flora e a fauna. Além disso, a ineficácia da legislação existente torna esse problema um desafio significativo para os cientistas ambientais e desperta grande preocupação pública (Zanoni; Yamanaka, 2016).

3.2. COLORANTES MICROBIANOS

Diversas estirpes microbianas exibem a capacidade de sintetizar uma vasta gama de colorantes, essenciais para sua homeostase celular e sobrevivência (Paniagua, 2021). Pesquisas têm evidenciado que alguns desses metabólitos possuem propriedades farmacológicas notáveis, incluindo atividade antibiótica, anticancerígena, imunossupressora, antifúngica, bactericida, antitumoral, antimalárica, inseticida e antioxidante (Paniagua, 2021; Kurbanoglu *et al.*, 2015; Zang *et al.*, 2014; Lapenda, 2010). Os colorantes microbianos devem cumprir uma série de critérios, incluindo a habilidade de utilizar uma vasta gama de fontes de carbono e nitrogênio, bem como demonstrar tolerância às condições ideais de crescimento, tais como pH e temperatura. Além disso, é essencial que apresentem um rendimento do produto satisfatório, não sejam tóxicos nem patogênicos e possam ser facilmente isolados de sua matriz celular (Babitha, 2009).

A Tabela 1 mostra os principais colorantes produzidos por microrganismos e suas respectivas cores.

Tabela 1 - Colorantes produzidos por diferentes microrganismos.

	Microrganismo	Cor
Bactérias	<i>Janthinobacterium lividum</i>	Roxo azulado
	<i>Achromobacter</i>	Creme
	<i>Bacillus sp</i>	Café
	<i>Brevibacterium sp</i>	Laranja-amarelo
	<i>Corynebacterium michiganense</i>	Cinza-creme
	<i>Pseudomonas sp</i>	Amarelo
	<i>Rhodococcus maris</i>	Vermelho-azulado
	<i>Streptomyces sp</i>	Amarelo, vermelho, azul
	<i>Serratia sp</i>	Vermelho
Fungos	<i>Aspergillus sp</i>	Vermelho-laranja
	<i>Blakeslea trispora</i>	Creme
	<i>Monascus purpureus</i>	Amarelo, laranja, vermelho
	<i>Helminthosporium catenarium</i>	Vermelho
	<i>H. gramineum</i>	Vermelho
	<i>H. cynodontis</i>	Bronze
	<i>H. avenae</i>	Bronze
	<i>Penicillium cyclopium</i>	Laranja
	<i>P. nalgovensis</i>	Amarelo
Leveduras	<i>Rhodotorula sp</i>	Vermelho
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Café
	<i>Cryptococcus sp</i>	Vermelho
	<i>Phaffia rhodozyma</i>	Vermelho
Alga	<i>Dunaliella salina</i>	Vermelho

Fonte: (Paniagua, 2021).

Os processos fermentativos que visam a produção de colorantes têm predominantemente ocorrido em meio sólido. Contudo, devido aos baixos rendimentos obtidos, a viabilidade econômica da produção em escala industrial ainda não foi alcançada (Paniagua, 2021). Como estratégia para incrementar o rendimento pigmentar, uma parcela significativa das investigações tem se concentrado em cultivos submersos. É imperativo conduzir estudos de acordo com a linhagem microbiana de interesse, uma vez que esta pode exercer uma influência considerável no rendimento, tanto em relação aos parâmetros de crescimento quanto à fase pré-extrativa do colorante em questão (Mukherjee; Singh, 2011).

3.3. *Streptomyces* sp.

As estirpes pertencentes ao gênero *Streptomyces*, inseridas na família *Actinobacteria*, representam bactérias aeróbias e Gram-positivas que se caracterizam por um crescimento filamentoso a partir de um único esporo (Hwang *et al.*, 2014). As *Streptomyces* têm sido reconhecidas como uma fonte diversificada de produtos naturais (Azerang; Sardari, 2017; Genilloud, 2017; Lapaz *et al.*, 2019; Xia *et al.*, 2020), graças ao seu metabolismo secundário complexo e robusto (Chang *et al.*, 2021). Estudos indicam que *Streptomyces* é responsável pela síntese de aproximadamente 100.000 compostos antibióticos, representando a maioria dos produtos bioativos naturais com aplicações farmacológicas ou agroquímicas (Bubici, 2018; Harir *et al.*, 2018; Abdel-Razek *et al.*, 2020).

Essas bactérias têm a capacidade de produzir uma variedade impressionante de produtos naturais, incluindo macrolídeos, tetraciclina, aminoglicosídeos, glicopeptídeos, ansamicinas e terpenos. Por exemplo, *Streptomyces hygroscopicus* é capaz de secretar cerca de 180 metabólitos distintos, com uma ampla gama de atividades biológicas (Bataeva *et al.*, 2023)

Os produtos naturais derivados de *Streptomyces* exibem uma diversidade funcional significativa, podendo atuar como agentes antimicrobianos, antivirais, citotóxicos, antitumorais, anti-hipertensivos, imunossuppressores, inseticidas, antioxidantes, promotores de crescimento de plantas e herbicidas (Singh; Khajuria, 2018; Nguyen *et al.*, 2020; Salwan; Sharma, 2020; Pham *et al.*, 2021; Sharma *et al.*, 2021). Dessa forma, os metabólitos identificados podem ser categorizados em quatro classes principais: (I) compostos com atividades regulatórias, incluindo agentes morfogenéticos, sideróforos e fatores de crescimento; (II) substâncias com atividades anti-protozoárias, antibacterianas, antifúngicas e antivirais, atuando como agentes antagonistas; (III) compostos com potencial inseticida, pesticida e herbicida, desempenhando funções agrobiológicas; e (IV) substâncias com propriedades neuroativas, imunomoduladoras, antitumorais e inibidoras de enzimas, com aplicações farmacológicas.

Streptomyces produz esses compostos como metabólitos secundários e, geralmente, a sua produção ocorre durante a fase estacionária, sendo que essa produção não é estritamente necessária para seu crescimento ou multiplicação, mas podem conferir uma vantagem competitiva aos organismos. Alguns desses metabólitos auxiliam as células bacterianas reprodutivas, capturando metais como ferro (por meio de sideróforos), protegendo-as da luz UV (mediante pigmentação), limitando a competição (através de antibióticos) e facilitando a comunicação com outras espécies. Eles também desempenham um papel crucial na mediação

de interações importantes entre microrganismos e seus hospedeiros, bem como na regulação de vias metabólicas (Bolourian; Mojtahedi, 2018; Wang *et al.*, 2019). Além disso, contribuem significativamente para a biodegradação do solo, a formação de húmus e a produção de numerosas substâncias voláteis, como a geosmina, responsável pelo aroma característico de "terra molhada" (Bataeva *et al.*, 2023).

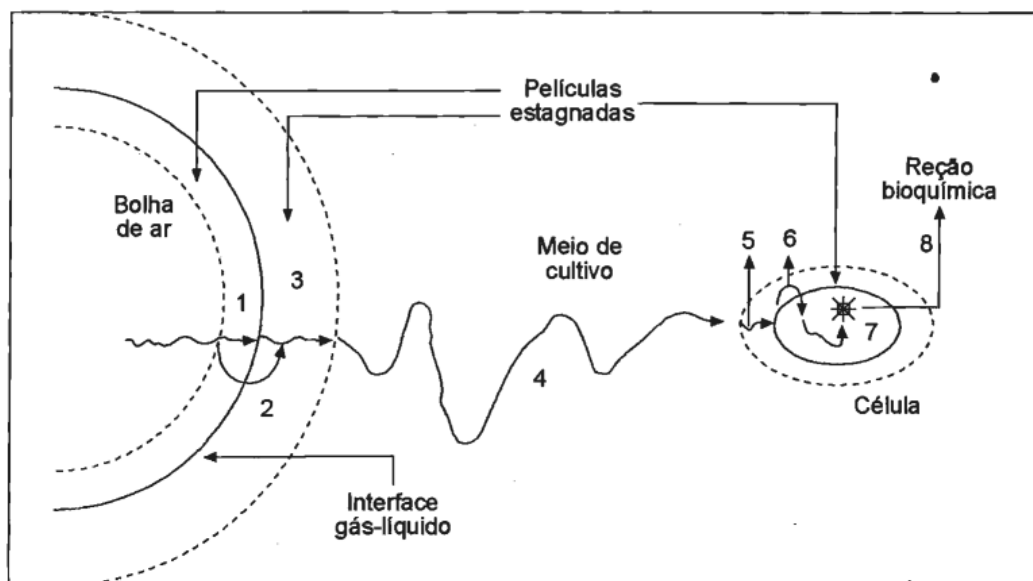
3.3.1. *Streptomyces carpaticus*

Streptomyces carpaticus é uma bactéria de origem marinha capaz de produzir colorantes com possível interesse industrial (Pontes *et al.*, 2017). Além disso, é uma significativa fonte de metabólitos secundários, entre os quais se destacam a valinomicina e colorantes de tonalidade escura em condições específicas de cultivo (Pontes *et al.*, 2017). Demonstrando habilidade para prosperar em diversos ambientes, essa espécie exibe uma morfologia que se assemelha à de fungos filamentosos, caracterizada por uma diferenciação morfológica propícia à formação de uma camada de hifas que, por sua vez, podem dar origem a uma cadeia de esporos (Martins, 2019).

3.4. TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO

A transferência de oxigênio do estado gasoso para o líquido, dentro de um bioprocessamento aeróbio, corresponde a uma etapa primordial para o sucesso deste (Lorenzini, 2012). Além disso, o que se visa é fazer com que este oxigênio dissolvido chegue às células contidas no meio de cultivo, penetre nestas células e, finalmente, seja consumido na reação (Schmidell *et al.*, 2001). Assim, é concebível que uma variedade de resistências esteja vinculada ao transporte de oxigênio desde a fase gasosa até sua utilização final. Na Figura 1 está representada as resistências potenciais associadas a este processo.

Figura 1 - Resistências vinculadas à dissolução do oxigênio.



Fonte: (Schmidell *et al.*, 2001).

Além das resistências associadas, diversos fatores podem influenciar a solubilidade de oxigênio no meio líquido, como a área superficial disponível para a transferência, a agitação do líquido e a diferença de concentração de oxigênio entre o gás e o líquido. Assim, é crucial assegurar uma entrega adequada de oxigênio através de um processo de transferência de um fluxo gasoso para o meio. Consequentemente, a estimativa precisa da taxa de transferência de oxigênio em diversas escalas e em diferentes condições operacionais desempenha um papel significativo na previsão da rota metabólica tanto para o crescimento quanto para a produção de qualquer metabólito desejado no cultivo aeróbico. Isso reveste-se de uma importância crítica para a seleção, concepção e ampliação de biorreatores (Garcia-Ochoa; Gomez, 2009).

3.4.1. Taxa de transferência de oxigênio

A taxa de transferência de oxigênio pode ser conceituada como diretamente proporcional ao gradiente de concentração, em que o coeficiente de transferência de massa volumétrico, $k_L a$, atua como a constante proporcional. A limitação do valor máximo do gradiente de concentração decorre da baixa solubilidade da maioria dos gases, notadamente o oxigênio, associados à fermentação aeróbica. Assim, a estimativa da taxa máxima de transferência de massa do gás para o líquido no biorreator pode ser alcançada pela representação na Equação 1.

$$OTR = k_L a \times (C_s^* - C) \quad [1]$$

Sendo:

- OTR (*Oxygen Transfer Rate*): taxa de transferência de oxigênio;
- $k_L a$: coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio;
- C_s^* : concentração de saturação de oxigênio na fase líquida;
- C : concentração de oxigênio na fase líquida em um determinado ponto do tempo.

Os elementos que influenciam este gradiente abrangem a solubilidade e a atividade metabólica. A concentração de saturação de oxigênio na fase líquida, representada por C_s^* , em soluções eletrolíticas, geralmente é inferior à da água pura (fenômeno conhecido como *salting-out*). A solubilidade gasosa está primordialmente associada à temperatura, pressão parcial do gás, concentração e espécie de sais presentes, bem como a reações químicas pertinentes (Garcia-Ochoa; Gomez, 2009).

3.5. COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO ($k_L a$)

O coeficiente de transferência de oxigênio ($k_L a$) é empregado para caracterizar a eficácia de transferência de oxigênio dos fermentadores. Quando o $k_L a$ é reduzido em um sistema específico, a capacidade do reator em fornecer oxigênio às células fica comprometida (Doran, 2013). Além disso, a transferência de oxigênio é fortemente afetada pela propriedade físico-química dos caldos de cultivo utilizados nos processos fermentativos. Como os líquidos de fermentação contêm quantidade e qualidades diversas de substratos, produtos, sais, surfactantes e células, a química de superfície das bolhas e, portanto, a situação de transferência de massa, tornam-se muito complexas. A maioria das correlações disponíveis para coeficientes de transferência de oxigênio foi determinada usando ar em água pura; no entanto, a presença de aditivos na água afeta significativamente o valor de $k_L a$ e é difícil realizar correções para diferentes composições líquidas, assim previsão de $k_L a$ nessas condições é problemática (Doran, 2013).

3.6. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE $k_L a$

Devido aos desafios envolvidos na utilização de correlações para prever os valores de $k_L a$ em biorreatores, os coeficientes de transferência de oxigênio são comumente estabelecidos por meio de experimentos. Estes podem ser determinados por métodos físicos e químicos (Doran, 2013).

3.6.1. Método do sulfito

O método do sulfito se fundamenta, basicamente, na pronta reação do sulfito de sódio (Na_2SO_3), um agente redutor, com o oxigênio dissolvido na solução, resultando na formação de sulfato de sódio (Na_2SO_4), sob a influência de um catalisador, geralmente um íon bivalente de cobre (Cu^{++}) ou cobalto (Co^{++}). A concentração de oxigênio dissolvido é quantificada através de um eletrodo conectado a um analisador de O_2 e registrada até a completa oxidação do sulfito de sódio a sulfato. Com o conhecimento do tempo de reação e da quantidade de sulfito adicionado, é possível calcular a taxa média de transferência de oxigênio para a fase líquida e, consequentemente, o k_La (Bustamante, 2013). A reação entre o sulfito de sódio e o oxigênio é delineada na Equação 2.

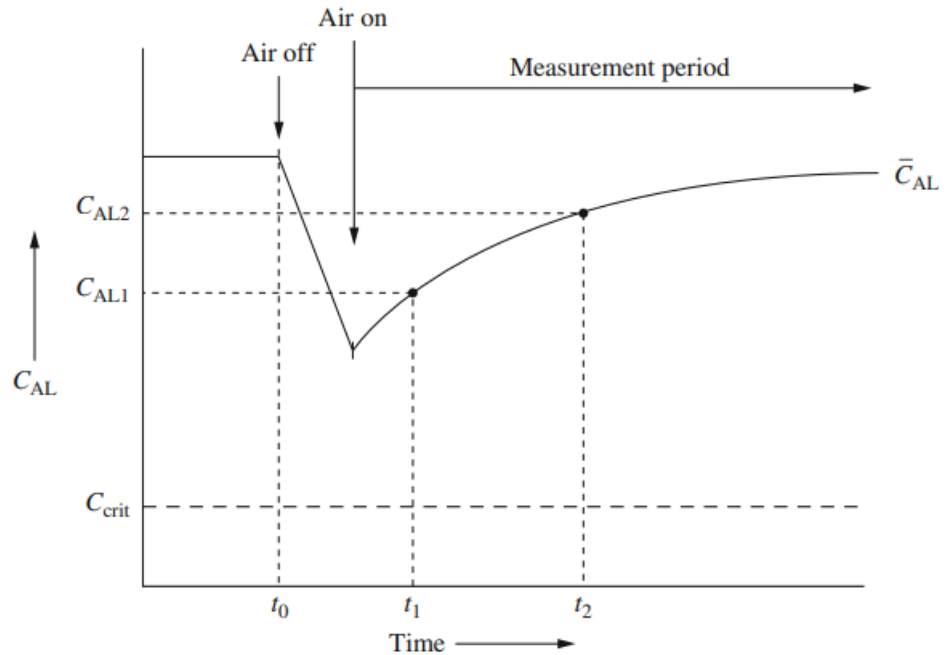


Entretanto, apesar do uso extensivo deste método, os resultados parecem variar de acordo com as condições operacionais de forma indeterminada e frequentemente resultam em valores superestimados de k_La em comparação com outras técnicas (Doran, 2013). Isso se deve à utilização de soluções salinas, o tamanho médio das bolhas é influenciado por alterações nas propriedades de coalescência do líquido, o que limita a aplicabilidade dos resultados obtidos a meios de fermentação reais (Doran, 2013).

3.6.2. Método *gassing-in* e *gassing-out*

Este método de avaliação do k_La , apresentado por Taguchi e Humphrey (1966) parte de uma abordagem física inicial, na qual se procede à remoção do oxigênio dissolvido da fase líquida por meio da insuflação de outro gás no biorreator, como, por exemplo, o nitrogênio. Posteriormente, quando a concentração de oxigênio na fase líquida atinge níveis próximos a zero, inicia-se a introdução controlada de oxigênio gasoso no meio, até que o líquido esteja completamente saturado, observando-se a mudança correspondente a um aumento, resultante na concentração de oxigênio líquido. O Gráfico 1 apresenta como se dá tal processo.

Gráfico 1 – Curva característica do método *gassing-in* e *gassing-out*.



Fonte: (Doran, 2013).

Essa variação na concentração de oxigênio dissolvido ao longo do tempo é registrada, sob a premissa de que o k_La permanece invariável, além de considerar um tempo de resposta do sensor como sendo muito rápida (Bandaiphet; Prasertsan, 2006; Cerri, 2009; Patel; Thibault, 2009). A Equação 3 representa a expressão envolvida em tal método.

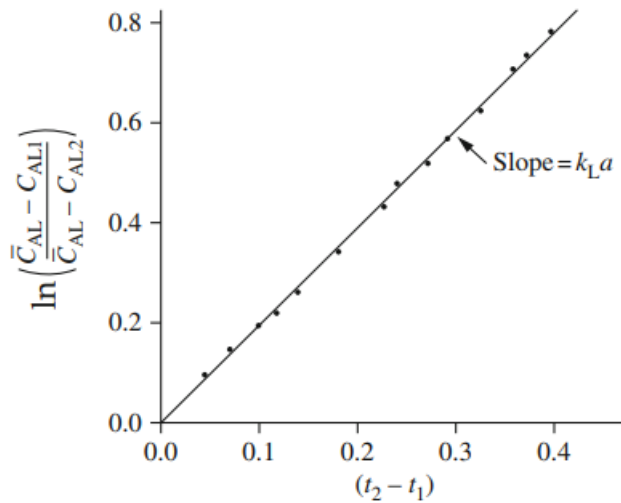
$$\ln\left(\frac{C_s}{C_{s^*}}\right) = k_L a \times t \quad [3]$$

Sendo,

- C_s : concentração de oxigênio dissolvido (OD) na fase líquida;
- C_{s^*} : concentração de saturação de oxigênio na fase líquida.

Assim, o valor de k_La corresponde ao coeficiente angular da equação, conforme ilustrado pelo Gráfico 2.

Gráfico 2 - k_La como coeficiente angular.



Fonte: (Doran, 2013).

Este é um método bastante utilizado, devido a sua simplicidade e precisão razoável em que os resultados são obtidos (Doran, 2013).

3.6.3. Método do balanço de oxigênio

O método de balanço de oxigênio em estado estacionário destaca-se como o mais confiável para estimar k_La , permitindo sua determinação por meio de uma única medição (Doran, 2013). Uma vantagem substancial é sua aplicabilidade aos fermentadores durante a operação habitual. No entanto, sua eficácia depende crucialmente da precisa medição da composição do gás de entrada e saída, vazões de gás de entrada e de saída, concentração de oxigênio dissolvido, pressão e temperatura. Falhas nessas técnicas de medição podem resultar em erros consideráveis. Para determinar k_La , são analisados os teores de oxigênio nos fluxos gasosos que entram e saem do fermentador, baseando-se em um balanço de massa em condições de estado estacionário, como mostra a Equação 4.

$$k_La = \frac{F_{O_2}^{in} - F_{O_2}^{out}}{V(C_{S^*} - C_S)} \quad [4]$$

Sendo:

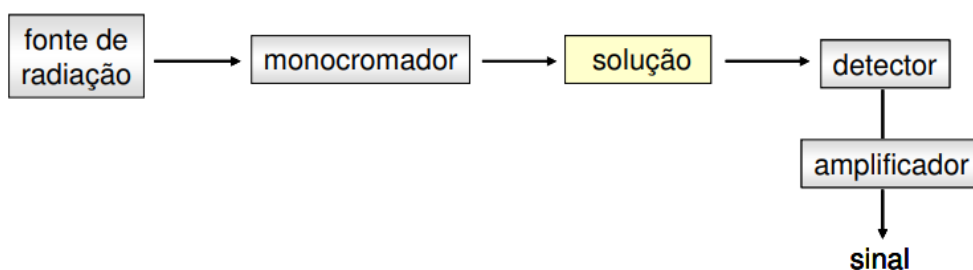
- $F_{O_2}^{in}$: Vazão molar de oxigênio na entrada do biorreator, dado em mol por hora [mol/h];
- $F_{O_2}^{out}$: Vazão molar de oxigênio na saída do biorreator, dado em mol por hora [mol/h];
- V: Volume do biorreator, dado em litros [L].

Este método demanda uma vigorosa agitação para sua execução apropriada. Além disso, se a Taxa de Consumo de Oxigênio (OUR) for consideravelmente reduzida, a discrepância na concentração de oxigênio entre as correntes gasosas de entrada e saída do processo biológico será mínima, requerendo a utilização de analisadores mais sensíveis. Em biorreatores de dimensões consideráveis e, conseqüentemente, com uma elevada força motriz (gradiente de concentração entre a interface gás-líquido e o seio do líquido), para a transferência de oxigênio é possível aproximar essa força por meio de uma média logarítmica entre os valores de concentração de oxigênio na entrada e na saída da corrente gasosa (Lorenzini, 2012).

3.7. ESPECTROFOTOMETRIA

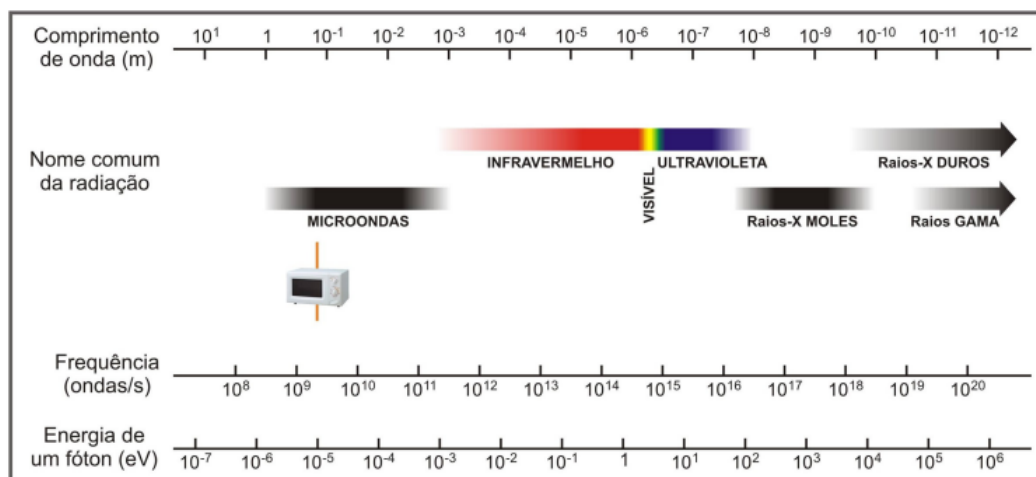
A espectrofotometria figura entre as técnicas analíticas de maior destaque para a quantificação de espécies químicas, em virtude de sua confiabilidade, instrumentalidade relativamente descomplicada e acessibilidade econômica, bem como pela diversidade de aplicações concebidas. Essa metodologia fundamenta-se na avaliação da absorção de radiação eletromagnética nas faixas visível e ultravioleta por parte de espécies químicas presentes em solução, sejam moléculas ou íons (Bergamin Filho *et al.*, 2010). O equipamento utilizado para a espectrofotometria corresponde ao espectrofotômetro, a Figura 2 esquematiza o processo envolvido no funcionamento de tal.

Figura 2 – Fluxo de funcionamento de um espectrofotômetro.



Fonte: (Bergamin Filho *et al.*, 2010).

As radiações de interesse, no âmbito da ciência, abarcam uma vasta gama de energia, desde as de alta energia, como os raios gama, até as de baixa energia, como as ondas de rádio. O termo "espectro eletromagnético" descreve o conjunto abrangente de todas essas radiações, classificadas conforme seus comprimentos de onda ou energias, como ilustrado na Figura 3 (Bergamin Filho *et al.*, 2010).

Figura 3 - Espectro eletromagnético.

Fonte: (Bergamin Filho *et al.*, 2010).

A região do espectro que se refere às radiações visíveis ao olho humano é conhecida como região visível. Para caracterizar as diferentes partes do espectro eletromagnético, são utilizadas diversas unidades, sendo comum a expressão do comprimento de onda em nanômetros (nm), particularmente nas regiões visível (Vis) e ultravioleta (UV) (Bergamin Filho *et al.*, 2010).

3.8. MÉTODO DE DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA E ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO CELULAR

O aumento da população microbiana ocorre de forma característica em cada microrganismo, por meio do processo de fissão binária, culminando na duplicação celular. Sua quantificação pode ser realizada por diferentes métodos, incluindo a contagem em placas, que registra o número de células viáveis (colônias) formadas após diluições seriadas de um inóculo. Tais quantificações podem ser realizadas por meio do procedimento de concentração por microgota ou placa cheia (Nicolau, 2014).

No que concerne a avaliação de biomassa, faz-se necessário estimar a concentração celular por meio da transmitância. Conforme as bactérias se multiplicam em uma suspensão de biomassa bacteriana, o meio se torna turvo e opaco. A massa celular produzida é diretamente proporcional ao número de células, e a turbidez pode ser utilizada para estimar esse número, correlacionando-a com a densidade óptica (DO). Após o cultivo, as amostras são separadas do meio de cultura por meio de centrifugação e diluídas em água. A transmitância é então medida utilizando um espectrofotômetro, que gera uma fonte de luz espectral contínua. Comprimentos de onda específicos são selecionados por um monocromador, passam pela amostra e a energia

radiante da luz emergente é medida, correlacionando-se com as Leis de Lambert Beer (Skoog *et al.*, 2014).

3.9.TITULOMETRIA

A titulação é um processo fundamental na química analítica, utilizado para determinar a concentração de uma substância em solução. Esse método envolve a adição controlada de um reagente de concentração conhecida, chamado de titulante, a uma solução contendo a substância a ser analisada, denominada de titulado. A determinação da concentração é realizada com base na estequiometria da reação entre o titulante e o titulado (Terra; Rossi, 2005; Vogel, 2002).

Existem diversas técnicas de titulação, sendo as mais comuns as titulações volumétricas, gravimétricas e espectrofotométricas. Nas titulações volumétricas, a concentração é determinada pela medição precisa do volume de titulante necessário para reagir completamente com o titulado. Já nas titulações gravimétricas, a concentração é calculada a partir da massa do precipitado formado pela reação entre o titulante e o titulado. Por fim, nas titulações espectrofotométricas, a concentração é determinada pela medida da absorção de luz durante a reação (Terra; Rossi, 2005; Vogel, 2002).

No contexto da análise titrimétrica, é fundamental a utilização de soluções padrão, também conhecidas como soluções padronizadas, cujas concentrações são conhecidas com precisão. A partir do volume da solução padrão utilizado na titulação e da estequiometria da reação, é possível calcular a quantidade da substância presente no titulado (Vogel, 2002).

Antigamente, o termo "análise volumétrica" era frequentemente utilizado para descrever a determinação quantitativa de substâncias por meio de titulação. No entanto, atualmente, prefere-se o uso do termo "análise titrimétrica", pois este reflete de maneira mais precisa o processo de titulação (Terra; Rossi, 2005; Vogel, 2002).

Em suma, a análise titrimétrica é um procedimento analítico essencial na química, permitindo a determinação precisa da concentração de substâncias em solução. A escolha do tipo de titulação a ser utilizada depende das propriedades específicas da substância em análise e dos objetivos da análise (Terra; Rossi, 2005; Vogel, 2002).

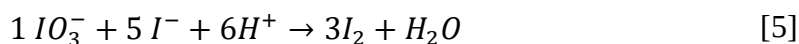
A análise titrimétrica engloba uma série de reações organizadas em quatro categorias principais, cada uma caracterizada por diferentes interações entre os reagentes. Nas três primeiras categorias, não há mudança no número de oxidação dos elementos envolvidos, enquanto a quarta categoria envolve reações de oxidação-redução, que resultam na transferência de elétrons entre os reagentes (Vogel, 2002).

- Reações de neutralização (acidimetria e alcalimetria): Incluem a titulação de bases livres ou de bases formadas pela hidrólise de sais de ácidos fracos com um ácido padrão (acidimetria), bem como a titulação de ácidos livres ou de ácidos formados pela hidrólise de sais de bases fracas com uma base padrão (alcalimetria). Essas reações resultam na formação de água. Também se incluem nessa categoria as titulações realizadas em solventes não-aquosos, principalmente compostos orgânicos (Vogel, 2002).
- Reações de formação de complexos: Nesse tipo de titulação, destaca-se o uso do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), especialmente em sua forma dissódica, como um reagente fundamental. A introdução de indicadores de íons metálicos para determinar o ponto de equivalência ampliou consideravelmente a aplicação do EDTA na titrimetria. (Vogel, 2002).
- Reações de precipitação: Envolve a formação de um precipitado pela combinação de íons, como na titulação de íons prata com soluções contendo cloreto. Essas reações não alteram o estado de oxidação dos elementos (Vogel, 2002).
- Reações de oxidação-redução: Englobam todas as reações que resultam em mudança no número de oxidação, ou seja, transferência de elétrons entre os reagentes. As soluções padrão podem ser agentes oxidantes ou redutores. Entre os principais agentes oxidantes estão o permanganato de potássio, dicromato de potássio, sulfato de cério (IV), iodo, iodato de potássio e bromato de potássio. Já os agentes redutores comuns são compostos de ferro (II) e estanho (II), tiosulfato de sódio, óxido de arsênio (III) e nitrato de mercúrio (I). Alguns agentes redutores menos utilizados são cloreto ou sulfato de vanádio (II), cloreto ou sulfato de cromo (II) e cloreto ou sulfato de titânio (III) (Vogel, 2002).

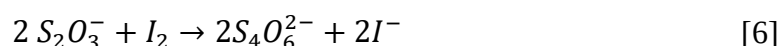
3.10. IODOMETRIA

A iodometria é um método de análise que utiliza o iodo para determinar a concentração de um analito, também conhecido como método direto. Neste método, uma quantidade medida de iodo é adicionada à solução contendo a concentração desconhecida do analito. O excesso de iodo é então titulado retroativamente com uma solução padrão de tiosulfato. O ponto final da titulação é atingido quando as soluções de iodo e tiosulfato alcançam uma concentração molar igual. A concentração molar do analito pode então ser calculada a partir do volume de iodo ou tiosulfato utilizado na titulação (Andrade, 2001).

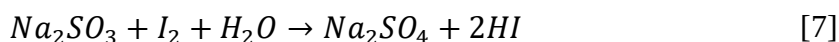
No caso da determinação da concentração de sulfito, o método se dá através da titulação de resíduo de iodo através de tiosulfato. A formação do iodo é representada pela Equação 5.



Assim, em meio ácido, o consumo do iodo ocorre de acordo com a Equação 6, com a ocorrência de consumo do iodo pelo tiosulfato.



A medição do sulfito ocorre pelo fato deste consumir iodo, de acordo com a Equação 7; assim, permitindo a determinação química de tal concentração (Vogel, 2002; Dias; Vaguete; Lima; 2016).



Este método sobressai em relação a outros devido à sua natureza direta, à clara identificação do ponto final, à resistência à influência da oxidação ou redução da solução de iodeto e à sua versatilidade para uma ampla gama de aplicações. No entanto, as principais desvantagens deste método correspondem ao tempo necessário para realizar a titulação e a influência dos íons halógenos presentes nos resultados. A iodometria apresenta-se útil para análise volumétrica, sendo utilizada na determinação de diversos compostos, como: cobre em ligas, ferro em amostras de aço e iodo em compostos orgânicos. Este método também pode ser utilizado para a determinação de sulfetos, halogenetos, cianetos e agentes oxidantes em uma amostra (Unacademy, ©2024).

Assim, no presente trabalho, o uso da iodometria será empregado na determinação da quantidade de sulfito em um intervalo de tempo estabelecido e, consequentemente, acaba sendo possível a determinação do k_{LA} pelo mesmo procedimento. O uso de tal método para esta finalidade dispensaria a utilização de eletrodo para a determinação do k_{LA} , uma vez que a presença do mesmo afetaria o escoamento. Dessa maneira, pode-se entender melhor a influência da condição de agitação na produção de colorante por *Streptomyces carpaticus*.

4. METODOLOGIA

4.1. LISTA DE MATERIAIS

- Frascos Erlenmeyer;
- Cubetas;
- Placas de Petri;
- Pipeta;
- Pipeta *Pasteur*;
- Ponteiras estéreis;
- Recipiente de alumínio;
- Proveta;
- Bureta;
- Alça de inoculação estéril;
- Alça de Drigalski;
- Tubos Falcon;
- Tubos de ensaio.

4.2. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- Mesa incubadora rotativa (*shaker*) - Tecnal TE-421;
- Espectrofotômetro – Thermo UV-Vis Genesys 10S;
- Câmara incubadora (BOD) – Solab SL-200 e SL-117;
- Estufa de secagem – Solab SL-102;
- Centrífuga de chão - CR22N Hitachi;
- Balança Analítica – Shimadzu AUW220;
- Câmara de Fluxo Laminar.

4.3. MICRORGANISMO

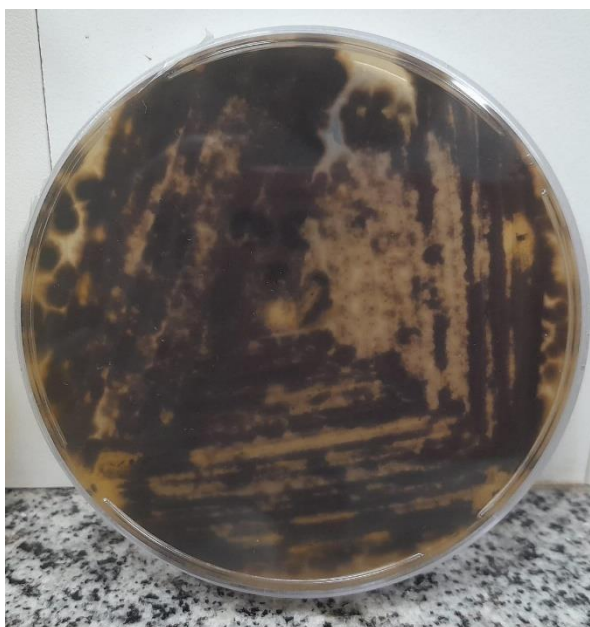
Foi utilizada uma cepa *Streptomyces carpaticus* isolada por Hernández (2002) a partir de sedimentos marinhos coletados no canal de São Sebastião, situado no litoral sul de São Paulo, Brasil. As células do microrganismo foram preservadas em criotubos e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C, contendo solução de glicerol 20% em volume.

4.4. CULTIVO DE *Streptomyces carpaticus*

A partir do criotubo de *Streptomyces carpaticus*, uma alçada do conteúdo deste foi inoculado em uma placa de Petri contendo meio sólido ISP-2M (4,0 g/L de extrato de levedura, 10,0 g/L de extrato de malte, 4,0 g/L de dextrose e 4,0 g/L de amido). Após a inoculação, a placa seguiu para incubação, em uma BOD, a 28 °C por 7 dias. Este processo foi feito em triplicata e em câmara de fluxo laminar.

Após o período de incubação, foi selecionada a placa com melhor aspecto de esporulação (Figura 4) e esta foi repicada, em tubo inclinado contendo meio sólido ISP-2M, seguindo-se os mesmos parâmetros de incubação.

Figura 4 - Placa selecionada apresentando melhor aspecto de esporulação.



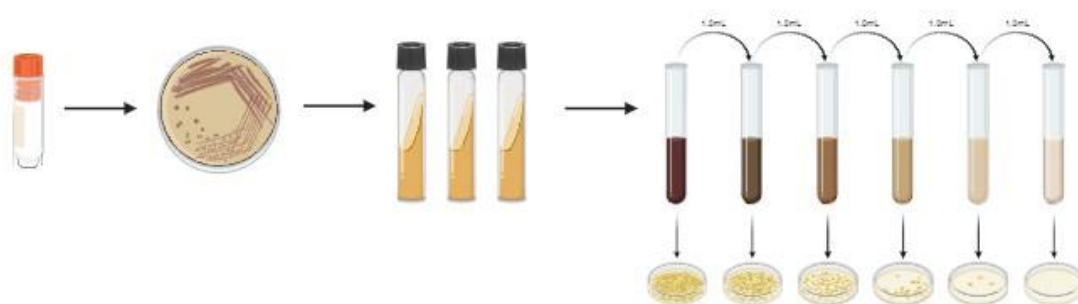
Fonte: Elaborado pela autora (2024).

4.4.1. Diluição seriada

Posteriormente ao repique, foi realizado o procedimento de diluição seriada, visando selecionar colônias. O conteúdo do tubo inclinado foi raspado com 5 mL de solução salina com auxílio de uma alça de inoculação estéril. Após a raspagem, foi retirado do tubo 1 mL e depositado em tubo Falcon contendo 9 mL de solução salina (10^{-1}), então, deste tubo Falcon, foi retirado 1 mL e passado para o tubo Falcon seguinte (10^{-2}), contendo a mesma proporção de solução salina. Este procedimento foi realizado sucessivamente até a diluição 10^{-7} . Foi retirado de cada um dos tubos diluídos 0,1 mL e, então, depositados em placa de Petri com meio sólido

ISP-2M. Tais placas foram incubadas em BOD a 28 °C por 3 dias. A Figura 5 esquematiza os procedimentos realizados.

Figura 5 - Esquema dos procedimentos realizados.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

4.4.2. *Screening* morfológico

Para a seleção das colônias provenientes das placas feitas por diluição seriada, realizou-se um *screening* morfológico para tal, levando em consideração características como: bordas, aspecto, coloração e tamanho. Após tal seleção, as colônias foram repicadas em meio sólido ISP-2M em tubo inclinado e incubadas em BOD a 28 °C por 3 dias.

4.5. CULTIVO EM SHAKER

4.5.1. Reativação

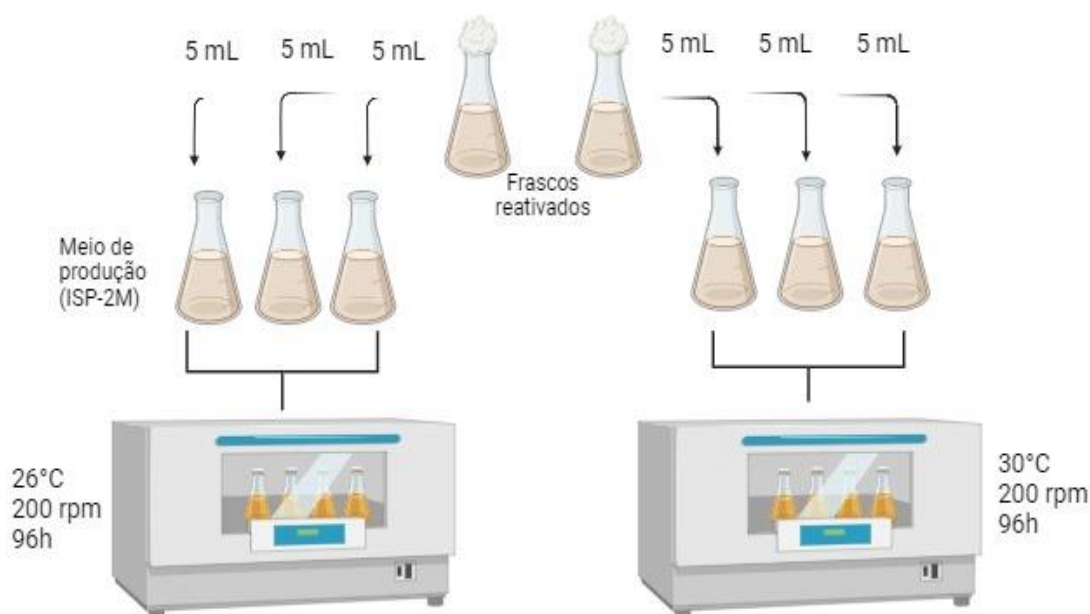
Dos tubos inclinados inoculados com as colônias selecionadas, conforme descrito no subitem 4.4.1., os mesmos foram raspados com auxílio de alça de inoculação estéril e depositados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio GYM (4 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de extrato de malte, 4 g/L de D-glucose e 2 g/L de CaCO_3). Os frascos foram colocados em *shaker* nos parâmetros de 28 °C e 200 rpm por 48 horas. O procedimento foi realizado em triplicata.

4.5.2. Teste de temperatura

Após a etapa de reativação, dentre os 3 frascos reativados, 2 foram selecionados e, de cada um destes, retirou-se o equivalente a 5 mL, porém, pelo fato de o processo ser realizado em triplicata, o volume total retirado de cada um dos frascos Erlenmeyer totalizou em 15 mL. Assim, cada 5 mL do conteúdo reativado foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 45 mL de meio líquido ISP-2M, tais frascos, agora, são os correspondentes ao meio

de produção do colorante. Então, os mesmos foram submetidos ao teste de temperatura, sendo elas 26 °C e 30 °C, em *shaker* por 96h, conforme apresenta a Figura 6.

Figura 6 - Procedimento para o teste de temperatura.



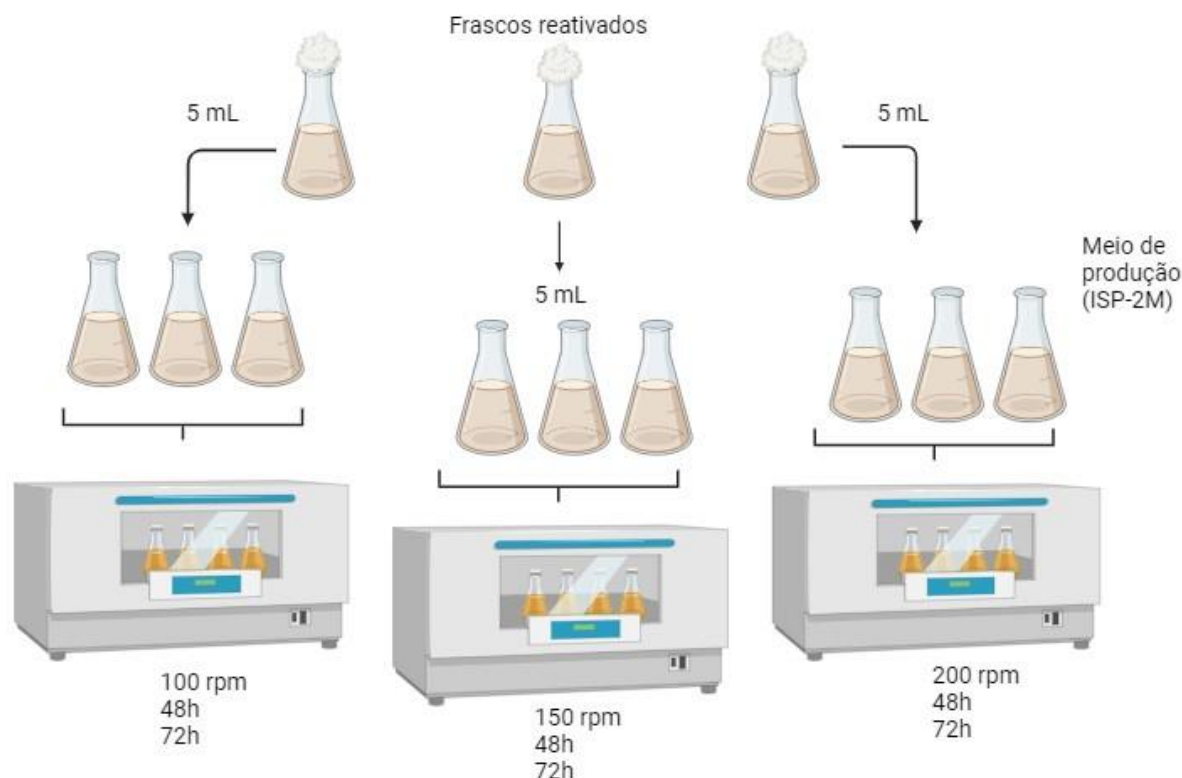
Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Decorridas as 96h do processo, foram retiradas alíquotas de cada um dos frascos, e os mesmos foram submetidos a leitura no espectrofotômetro a 420 nm e a concentração celular aferida via massa seca.

4.5.3. Teste de rotação

Após a determinação da temperatura que apresentou melhor desempenho por meio do teste descrito em 4.5.2, foi realizado o mesmo procedimento dos subitens 4.4. e 4.5.1., de repique e reativação, para que se pudesse realizar o teste de rotação entre 100, 150 e 200 rpm. É digno de nota que, na etapa de reativação, foram utilizados 3 frascos Erlenmeyer, ao invés de 2 frascos, como utilizado no item 4.5.2. A Figura 7 esquematiza o procedimento utilizado.

Figura 7 - Esquema do procedimento para o teste de rotação.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Para analisar o resultado de tal teste, foram retiradas amostras em 48h e 72h de processo, assim, estas foram analisadas pela absorvância em 420 nm e por determinação de massa seca.

4.6. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PRODUTO

A fim de determinar a produção de colorante por *Streptomyces carpaticus*, retirou-se uma alíquota do cultivo e esta foi submetida a centrifugação e aferição de absorvância no comprimento de onda correspondente a 420 nm em espectrofotômetro.

4.7. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS

Para a determinação da concentração de células produzida no processo, foi realizada tal determinação via massa seca (Figura 8). Assim, as amostras dos frascos Erlenmeyer foram depositadas em tubos Falcon de 50 mL e submetidas a centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm. Após este processo, retirou-se o sobrenadante da amostra e manteve-se apenas o precipitado, então foi adicionado 10 mL de água destilada a fim de realizar-se a ressuspensão e, então, a amostra seguiu novamente para centrífuga nos mesmos parâmetros supracitados.

Posteriormente, o sobrenadante foi retirado e o precipitado depositado em recipiente de alumínio, então, o mesmo foi colocado em estufa de secagem a 100°C até sua secagem total e, em seguida, o conteúdo foi pesado em balança analítica e dividido pelo volume adicionado de água (10 mL), assim, obteve-se o valor de concentração celular.

Figura 8 - Biomassa obtida após procedimento de massa seca.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

4.8. DETERMINAÇÃO DO k_La

Nesta seção, todo o procedimento descrito foi realizado em conjunto com o aluno André Luís Rosário Alves.

4.8.1. Iodometria para determinação da concentração de sulfito de sódio

O procedimento para a determinação do k_La via iodometria, é fundamentado na avaliação da concentração de sulfito de sódio através da titulação do iodo remanescente com tiosulfato de sódio. O iodo é gerado em meio ácido e consumido pelo tiosulfato, assim, a determinação da concentração de sulfito torna-se possível devido à sua capacidade de consumir o iodo, permitindo, então, a determinação química da concentração (VOGEL, 2002).

Para a realização deste método, empregou-se iodato de potássio como padrão primário, previamente submetido a uma secagem a 105 °C em estufa durante 3 horas (ANDRADE, 2001).

Assim, em frasco Erlenmeyer de 250 mL, foi adicionado 10 mL de solução de iodato de potássio (0,0525M); 5 mL de solução de iodeto de potássio (0,24M) e 5 mL de solução de ácido sulfúrico (20% (v/v)). O conteúdo foi titulado por tiosulfato de sódio (0,02M) (padronizado previamente com iodato de potássio) em uma bureta, até o surgimento de uma coloração amarelo-clara. Em seguida, adicionou-se solução de amido a 0,1% (p/v) como indicador, resultando em uma coloração azul escuro (ANDRADE, 2001). A titulação foi conduzida até que a cor desaparecesse, momento em que o volume utilizado de solução de tiosulfato, na bureta, foi registrado. Este primeiro momento da titulação foi considerado como o “branco”, ou seja, não houve adição de sulfito de sódio. A realização do “branco” também permitiu que fosse calculada a concentração molar de tiosulfato de sódio de acordo com o volume final da bureta.

Para que fosse possível a determinação da concentração de sulfito, preparou-se 3 frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo cada: 50 mL de água destilada, 0,4415 g de sulfito de sódio (8,83 g/L) e 0,035 g de sulfato de cobre (0,70 g/L) (CERRI, 2005). Assim, foi retirada uma amostra de 1 mL (para a determinação da concentração inicial de sulfito), de cada frasco, e tal quantia adicionada em outros 3 frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 10 mL de solução de iodato de potássio (0,0525M); 5 mL de solução de iodeto de potássio (0,24M) e 5 mL de solução de ácido sulfúrico (20% (v/v)), e prosseguiu-se com a titulação. Após tal coleta, os mesmos frascos com a quantidade que restou de solução de sulfito de sódio e sulfato de cobre, foram submetidos a uma das rotações analisadas (100, 150 e 200 rpm) em *shaker* por 2 horas. Decorrido o tempo de agitação estabelecido da solução, retirou-se mais uma alíquota correspondente, agora, a 2,5 mL e adicionou-se cada em 3 frascos Erlenmeyer contendo as mesmas proporções supracitadas de iodato de potássio, iodeto de potássio e ácido sulfúrico, para que, assim, fosse possível realizar a titulação iodométrica levando em consideração a adição do sulfito de sódio. Com isso, foi possível determinar a quantidade de sulfito de sódio consumido durante as duas horas de agitação.

4.8.2. Cálculos para a determinação do k_La

Para que o k_La seja determinado a partir da metodologia supracitada (4.8.1), é necessário dispor das concentrações molares dos compostos utilizados: iodeto de potássio, iodato de potássio, tiosulfato de sódio e sulfito de sódio. Após tal determinação, prossegue-se para a obtenção dos valores de mol de iodo inicial (I_0), que se dão, estequiometricamente, pela proporção de que 1 mol de iodato gera 3 mol de iodo. Então, é calculado os valores de mol de iodato de potássio pela Equação 8 e, após, estes são multiplicados por 3 para se obter os valores de I_0 .

$$n = V * M \quad [8]$$

Sendo:

- n: Número de moles, dado em mol [mol];
- V: Volume adicionado, dado em litros [L];
- M: Concentração molar do iodeto de potássio, dado em mol por litro [mol/L].

Após a obtenção de I_0 , é necessário encontrar os valores de mol de iodo residual (Ir), para tal, é necessário dispor dos valores da quantidade de tiosulfato de sódio registrados ao fim da titulação do “branco”, a média da concentração molar de tais quantidades, para, então, calcular a quantidade de número de moles de tiosulfato de sódio ($n_{Na_2S_2O_3}$). A Equação 9 representa tal cálculo.

$$n_{Na_2S_2O_3} = V \times Mt \times 0,001 \quad [9]$$

Sendo:

- $n_{Na_2S_2O_3}$: Quantidade de número de moles de tiosulfato de sódio, dado em mol [mol];
- V: Volume de tiosulfato registrado ao fim da titulação do “branco”, dado em mililitros [mL];
- Mt: Média da concentração molar de $Na_2S_2O_3$, dado em mol por litros [mol/L];
- 0,001: Fator de conversão de mililitros [mL] para litros [L].

Sabe-se, pela estequiometria, que 1 molécula de tiosulfato de sódio reage com 2 mol de íons iodeto, assim é possível encontrar os valores de iodo residual (Ir) do processo, levando em consideração o valor de 0,5 devido a estequiometria, conforme a Equação 10.

$$Ir = I_0 - (0,5 \times n_{Na_2S_2O_3}) \quad [10]$$

Sendo:

- Ir: Iodo residual, dado em mol [mol];
- I_0 : Iodo inicial, dado em mol [mol].

Assim, com os valores de Ir definidos, é possível encontrar os valores de moles de sulfito de sódio, devido a proporção 1:1, ou seja, Ir é igual a quantidade de número de moles de sulfito de sódio.

Em posse de tais valores, determina-se, então, a concentração molar de sulfito de sódio ($M_{sulfito}$), de acordo com as quantidades inseridas no processo de titulação ($V_{sulfito}$) (1 mL ou 2,5 mL), como apresenta a Equação 11.

$$M_{\text{sulfito}} = \frac{n_{\text{sulfito de sódio}}}{(V_{\text{sulfito}} \times 0,001)} \quad [11]$$

Sendo:

- M_{sulfito} : Concentração molar de sulfito de sódio, dado em mol por litros [mol/L];
- $n_{\text{sulfito de sódio}}$: Quantidade de número de moles de sulfito de sódio, dado em mol [mol];
- V_{sulfito} : Volume de sulfito inserido no processo de titulação, dado em mililitros [mL].

Com os valores de M_{sulfito} , faz-se necessário o cálculo da variação molar de sulfito ($\Delta M_{\text{sulfito}}$), para que seja possível a determinação da variação molar de oxigênio (ΔM_{O_2}). Para a identificação de $\Delta M_{\text{sulfito}}$, é preciso subtrair os valores de M_{sulfito} com o seu correspondente de diferente alíquota, ou seja, para melhor entendimento, é necessário subtrair a primeira triplicata da alíquota de 1 mL com a primeira de 2,5 mL, e assim por diante; restando, então, 3 valores correspondentes a $\Delta M_{\text{sulfito}}$.

Para o caso da identificação dos valores de ΔM_{O_2} , faz-se necessário multiplicar os valores de $\Delta M_{\text{sulfito}}$ por 0,5, valor este que corresponde a estequiometria envolvendo a reação do sulfito de sódio com oxigênio. Em seguida, prossegue-se os cálculos dividindo ΔM_{O_2} pelo tempo de reação no *shaker*, que corresponde a 2h, para, então, determinar a velocidade de transferência de oxigênio (N_{O_2}).

Para isso, necessita-se da concentração de saturação de oxigênio (Cs^*), sendo esta determinada pela Equação 12, conforme descrito por Cerri (2005).

$$Cs^* = He \times Y_{\text{O}_2}^e \times Pt \quad [12]$$

Sendo:

- Cs^* : Concentração de saturação de oxigênio dissolvido, dado em litros por mol [L/mol];
- He = Constante de Henry, sendo $1,557 \times 10^{-3} \text{ mmol.L}^{-1}.\text{mmHg}^{-1}$ a 30°C ;
- $Y_{\text{O}_2}^e$ = fração molar de oxigênio no gás de entrada;
- Pt = pressão total do sistema (absoluta).

Por fim, a relação para obter o k_{LA} se dá pela Equação 13.

$$k_L a = \frac{N_{O_2}}{C_{S^*}} \quad [13]$$

Sendo:

- $k_L a$: Coeficiente de transferência volumétrico de oxigênio, dado em $[h^{-1}]$;
- N_{O_2} : Velocidade de transferência de oxigênio, dado em mol por litros vezes hora $[mol/(L.h)]$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

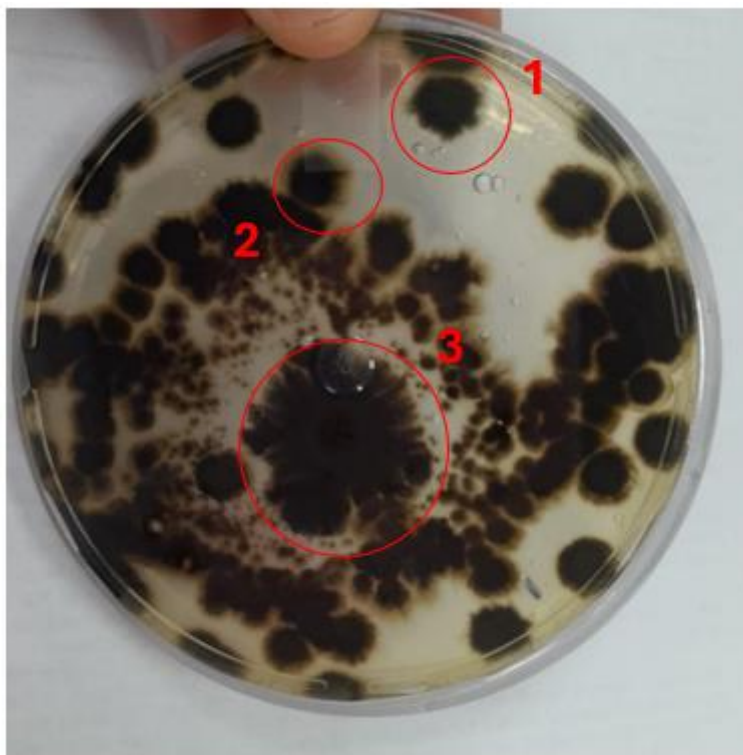
5.1. TESTE DE TEMPERATURA

5.1.1. *Screening* morfológico

Optou-se por realizar o *screening* morfológico, com o objetivo de selecionar linhagens mais produtoras, uma vez que, inicialmente, o experimento foi conduzido sem a realização do *screening*, e o resultado apresentado evidenciou uma queda da produção de colorante.

As colônias selecionadas pelo *screening* morfológico estão apresentadas na Figura 9. A diluição da placa que se encontram tais colônias corresponde a 10^{-7} .

Figura 9 - Colônias selecionadas pelo *screening* morfológico.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A descrição fenotípica de cada colônia segue abaixo:

- Colônia 1: aspecto aveludado, coloração escura na frente e no verso, tamanho regular e bordas irregulares;
- Colônia 2: aspecto aveludado, coloração escura na frente e no verso, tamanho regular e bordas irregulares com coloração clara;
- Colônia 3: aspecto aveludado, coloração escura na frente e no verso, tamanho grande e bordas irregulares.

5.1.2. Absorbância e massa seca

Após o repique das colônias supracitadas e a inserção destas em meio líquido para o teste de temperatura (26 °C e 30 °C), foi aferida a massa seca e absorbância após 96h de processo. A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos para a concentração celular por massa seca, enquanto a Tabela 3 apresenta os valores calculados para a concentração de produto via espectrofotômetro.

Tabela 2 - Concentração celular por massa seca [g/L].

	26 °C	30 °C
Média	0,629	0,374
Desvio Padrão	0,419	0,009
Erro	1,042	0,023
Intervalo de Confiança	-0,413 – 1,671	0,351 – 0,397

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Tabela 3 – Concentração de produto (420 nm) [uABS].

	26 °C	30 °C
Média	1,221	2,000
Desvio Padrão	0,247	0,291
Erro	0,614	0,722
Intervalo de Confiança	0,607 – 1,835	1,278 – 2,722

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Pode-se observar, pela Tabela 2, que, dentre os casos, o cultivo em 30 °C apresentou baixos valores de desvio padrão e de erro, acarretando um intervalo de confiança mais preciso do que o obtido para o cultivo de 26 °C. Quanto aos valores de concentração de produto, conforme apresentado pela Tabela 3, o cultivo em 30 °C apresentou uma média superior ao

obtido no cultivo em 26 °C; todavia, visualmente, em ambos os casos, não houve a formação de colorante.

Assim, determinou-se que a temperatura de 30 °C seria a mais adequada para prosseguir com o experimento.

5.2. TESTE DE ROTAÇÃO

Realizado os métodos mencionados na seção 4.3.3, a triplicata correspondente a cada rotação (100, 150 e 200 rpm) foi submetida ao *shaker* por 96h, A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos para a concentração celular por massa seca, enquanto a Tabela 5 apresenta os valores registrados de absorbância.

Tabela 4 - Concentração celular por massa seca [g/L].

	100 rpm	150 rpm	200 rpm
Média	0,370	1,360	1,463
Desvio Padrão	0,486	0,287	0,147
Erro	1,207	0,713	0,366
Intervalo de Confiança	-0,837 – 1,577	0,647 – 2,073	1,097 – 1,829

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Tabela 5 – Concentração de Produto [uABS].

	100 rpm	150 rpm	200 rpm
Média	0,933	0,992	1,190
Desvio Padrão	0,034	0,016	0,021
Erro	0,084	0,039	0,053
Intervalo de Confiança	0,849 – 1,017	0,953 – 1,031	1,137 – 1,243

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Com isto, pela Tabela 4, observa-se que, dentre as rotações consideradas para a presente pesquisa, a agitação de 200 rpm foi a que apresentou a melhor precisão quanto aos valores calculados, resultando em um baixo desvio padrão e um erro bem inferior ao calculado para as demais agitações; o que contribuiu, conseqüentemente, para um intervalo de confiança estatisticamente mais consistente, ao se fazer uma comparação com as rotações de 100 e 150 rpm. Desta maneira, pode-se considerar que o teste que melhor proporcionou valores de concentração celular por massa seca corresponde ao de 200 rpm.

Quanto à concentração de produto, conforme apresentado pela Tabela 5, nota-se que os valores obtidos se encontram abaixo do esperado, em relação à produção de colorante. A falta dessa produção, confirmada mais uma vez neste teste, sugere que o microrganismo pode ter perdido a capacidade de produzi-lo. Essa perda pode ter sido causada pelo longo período de armazenamento do criotubo no ultrafreezer, que durou mais de 2 anos devido à pandemia, durante a qual o experimento foi interrompido. Neste mesmo período de pandemia, os repiques armazenados em câmara fria também se perderam, o que acabou afetando o presente projeto, sendo necessário a reativação de um outro criotubo. É importante observar que, para actinos, a criopreservação pode afetar a produção de determinados metabólitos secundários (Taddei *et al.*, 1999).

Além disso, a falta de colorante pode também estar relacionada ao tempo de cultivo, que pode não ter sido suficiente para a produção do colorante. No estudo de Pontes (2017), a produção de colorante ocorreu em 120 horas de incubação, com agitação a 250 rpm. O tempo de cultivo está intrinsicamente relacionado ao estado estacionário de crescimento do microrganismo, sendo tal fase correspondente a incidência de produção de metabólitos secundários (Inoue, 2006). Ainda neste sentido, o entendimento relacionado ao metabolismo secundário torna-se complexo devido a sua grande diversidade, pois não se tem informações que permitem a compreensão dos mecanismos e interferentes associados (Inoue, 2006).

Dado o pequeno número de estudos sobre essa produção em *Streptomyces carpaticus*, explorar uma variedade maior de parâmetros de cultivo e utilizar ferramentas de planejamento experimental, como DCC (Delineamento Composto Central), seria interessante para um maior aprofundamento em tal âmbito, por apresentar características úteis no que concerne a busca por um ponto experimental ótimo (Mateus *et al.*, 2001).

5.3. DETERMINAÇÃO DO k_{La}

Primeiramente, a fim de determinar o k_{La} , deve-se obter o valor referente a quantidade de número de moles do iodeto de potássio, do iodato de potássio, do tiosulfato de sódio e do

sulfito de sódio. Para os dois primeiros casos, ambas as informações são obtidas através da Equação 8 apresentada no tópico de metodologia (Seção 4).

Pela estequiometria, há a relação entre o iodato de potássio e o iodo inicial (I_0), sendo uma proporção, respectivamente, de 1:3. Então, para a obtenção do valor referente ao I_0 , multiplica-se os valores de iodato por três.

Desta maneira, fazendo uso da Equação 8, obteve-se a quantidade de número de moles do iodeto de potássio (KI) e do iodato de potássio (KIO_3), respectivamente.

$$n_{KI} = (5 * 0,001) * 0,24096$$

$$n_{KI} = 0,00120 \text{ mol}$$

$$n_{KIO_3} = (10 * 0,001) * 0,00525$$

$$n_{KIO_3} = 5,25 * 10^{-5} \text{ mol}$$

Assim, é possível calcular o iodo inicial, através da relação estequiométrica:

$$I_0 = 3 * 5,25 * 10^{-5}$$

$$I_0 = 0,00016 \text{ mol}$$

Feito isto, busca-se determinar o a quantidade de número de moles do tiosulfato de sódio. Para isto, foram utilizados os valores de volume correspondentes ao “branco”, feito em triplicata, sendo que cada um resultou em um volume específico após a realização da titulação. Assim, a partir de cada um desses valores, calculou-se a concentração molar e a média desta.

Para exemplificar o procedimento, a fim de obter o a quantidade de número de mol de tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$), fez-se uso da estequiometria, uma vez que tiosulfato de sódio e I_0 apresentam uma proporção, respectivamente, de 1:2. Então, tem-se que:

$$n_{Na_2S_2O_3} = 2 * I_0$$

$$n_{Na_2S_2O_3} = 2 * 0,00016$$

$$n_{Na_2S_2O_3} = 0,00032 \text{ mol}$$

Considerando o volume da primeira triplicata, equivalente a 15,6 mL, obtém-se a concentração molar deste ensaio através da Equação 11, conforme apresentado abaixo.

$$M_{Na_2S_2O_3} = \frac{0,00032}{(15,6 * 0,001)}$$

$$M_{Na_2S_2O_3} = 0,0205 \text{ mol/L}$$

Desta maneira, repetindo-se o mesmo procedimento para os demais valores, é possível obter as respectivas concentrações molares do tiosulfato. Tais resultados estão representados na Tabela 6, juntamente com seus respectivos volumes.

Tabela 6 - Volumes e concentrações molares de tiosulfato na execução do "branco".

Volume [mL]	Concentração molar de Na₂S₂O₃ [mol/L]
15,6	0,0205
15,8	0,0203
15,9	0,0201

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Assim, calculou-se a média da concentração molar (M_t), que consistiu em 0,0203 mol/L.

Dispondo destes valores, foi possível proceder com a iodometria de acordo com as rotações analisadas (100, 150 e 200 rpm). Para demonstrar a sequência de cálculos até a obtenção do k_{LA} , serão considerados os valores para a rotação de 100 rpm.

Executando a metodologia de iodometria (Seção 4), foram realizadas 6 repetições para cada uma das rotações analisadas, sendo a primeira triplicata correspondente a alíquota de 1 mL da solução de sulfito de sódio e sulfato de cobre, sem ser sujeita a rotação; a segunda triplicata foi submetida a rotação por 2h, e sua alíquota correspondeu a 2,5 mL.

Para a determinação da quantidade de número de moles de tiosulfato de sódio (para que seja possível, posteriormente, a obtenção dos valores de I_r), agora considerando o volume final obtido na titulação das 2 triplicatas, faz-se uso da Equação 9. Assim, para a rotação de 100 rpm, considerando o volume do primeiro ensaio da primeira triplicata, tem-se:

$$n_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} = (9,6 * 0,001) * 0,0203$$

$$n_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} = 0,000195 \text{ mol}$$

Assim, repetindo-se tal cálculo para os demais volumes, obtém-se as respectivas quantidades de números de moles de tiosulfato de sódio para a rotação de 100 rpm, conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 – Quantidade de número de moles de tiosulfato de sódio para a rotação de 100 rpm.

Volume [mL]	Quantidade de número de moles de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ [mol]
9,6	0,000195
9,7	0,000197
9,8	0,000199
7,9	0,000160
7,8	0,000158
7,8	0,000158

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Seguindo o mesmo procedimento, foi possível determinar a quantidade de número de moles de tiosulfato de sódio dos ensaios realizados tanto para a rotação de 150 rpm, quanto para a de 200 rpm. A Tabela 8 fornece os resultados apresentados para o primeiro caso, enquanto a Tabela 9 apresenta os valores obtidos para a agitação de 200 rpm.

Tabela 8 – Quantidade de número de moles de tiosulfato de sódio para a rotação de 150 rpm.

Volume [mL]	Quantidade de número de moles de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ [mol]
10,6	0,000215
10,7	0,000217
10,6	0,000215
11,1	0,000225
11	0,000223
10,9	0,000221

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Tabela 9 – Quantidade de número de moles de tiosulfato de sódio para a rotação de 200 rpm.

Volume [mL]	Quantidade de número de moles de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ [mol]
11,1	0,000225
11,2	0,000227
10,9	0,000221
14,7	0,000298
14,5	0,000294
14,6	0,000296

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Dessa maneira, foi possível obter os valores de Ir através da Equação 10. Então, considerando o número de mol de tiosulfato de sódio obtido para o primeiro volume, que corresponde a 9,6 mL tem-se que:

$$Ir = 0,00016 - (0,5 \times 0,000195)$$

$$Ir = 6,25 \times 10^{-5} \text{ mol}$$

Conforme descrito na Seção 4, sabe-se que, pela estequiometria, a proporção entre Ir e sulfito de sódio é de 1:1. Logo, no caso do primeiro ensaio da primeira triplicata, o número de moles de sulfito de sódio corresponde a $6,25 \times 10^{-5}$ mol.

Aplicando o mesmo cálculo para os demais casos, têm-se os respectivos valores de Ir e moles de sulfito de sódio (n_{sulfito}) para a rotação de 100 rpm, conforme apresentado na Tabela 10.

Tabela 10 - Ir e n_{sulfito} para a rotação de 100 rpm.

Volume [mL]	Ir [mol]	n_{sulfito} [mol]
9,6	$6,25 \times 10^{-05}$	$6,25 \times 10^{-05}$
9,7	$6,15 \times 10^{-05}$	$6,15 \times 10^{-05}$
9,8	$6,05 \times 10^{-05}$	$6,05 \times 10^{-05}$
7,9	$7,98 \times 10^{-05}$	$7,98 \times 10^{-05}$
7,8	$8,08 \times 10^{-05}$	$8,08 \times 10^{-05}$
7,8	$8,08 \times 10^{-05}$	$8,08 \times 10^{-05}$

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Seguindo o mesmo procedimento, foi possível determinar o Ir e a quantidade de moles de sulfito de sódio (n_{sulfito}) dos ensaios realizados tanto para a rotação de 150 rpm, quanto para a de 200 rpm. A Tabela 11 fornece os resultados apresentados para o primeiro caso, enquanto a Tabela 12 apresenta os valores obtidos para a agitação de 200 rpm.

Tabela 11 - Ir e n_{sulfito} para a rotação de 150 rpm.

Volume [mL]	Ir [mol]	n_{sulfito} [mol]
9,6	$4,73 \times 10^{-05}$	$4,73 \times 10^{-05}$
9,7	$4,63 \times 10^{-05}$	$4,63 \times 10^{-05}$
9,8	$4,94 \times 10^{-05}$	$4,94 \times 10^{-05}$
7,9	$1,08 \times 10^{-05}$	$1,08 \times 10^{-05}$
7,8	$1,28 \times 10^{-05}$	$1,28 \times 10^{-05}$
7,8	$1,18 \times 10^{-05}$	$1,18 \times 10^{-05}$

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Tabela 12 - Ir e n_{sulfito} para a rotação de 200 rpm.

Volume [mL]	Ir [mol]	n_{sulfito} [mol]
9,6	$5,24 \times 10^{-05}$	$5,24 \times 10^{-05}$
9,7	$5,14 \times 10^{-05}$	$5,14 \times 10^{-05}$
9,8	$5,24 \times 10^{-05}$	$5,24 \times 10^{-05}$
7,9	$4,73 \times 10^{-05}$	$4,73 \times 10^{-05}$
7,8	$4,84 \times 10^{-05}$	$4,84 \times 10^{-05}$
7,8	$4,94 \times 10^{-05}$	$4,94 \times 10^{-05}$

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Em posse desses dados, obtêm-se os valores referentes a variação molar de sulfito ($\Delta M_{\text{sulfito}}$), que serão utilizados para os cálculos referentes a variação molar de oxigênio (ΔM_{O_2}) e a velocidade de transferência de oxigênio (N_{O_2}). Todavia, deve-se, inicialmente, determinar a concentração molar de sulfito (M_{sulfito}), que é determinada a partir da Equação 11.

Assim, considerando o primeiro ensaio da primeira triplicata (alíquota correspondente a 1 mL), tem-se a respectiva M_{sulfito} :

$$M_{\text{sulfito}} = \frac{6,25 * 10^{-5}}{(1 \times 0,001)}$$

$$M_{\text{sulfito}} = 0,0625 \text{ mol/L}$$

A Tabela 13 apresenta os resultados de M_{sulfito} para os demais ensaios feitos para as rotações de 100, 150 e 200 rpm; valores estes obtidos, também, através da Equação 11.

Tabela 13 - M_{sulfito} para as rotações de 100, 150 e 200 rpm.

M_{sulfito} [mol/L]		
100 rpm	150 rpm	200 rpm
0,0625	0,0473	0,0524
0,0615	0,0463	0,0514
0,0605	0,0494	0,0524
0,0319	0,0043	0,0189
0,0323	0,0051	0,0193
0,0323	0,0047	0,0197

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Conforme mencionado na Seção 4, para a obtenção de $\Delta M_{\text{sulfito}}$ é necessário subtrair o valor referente a M_{sulfito} do primeiro ensaio da primeira triplicata (alíquota de 1 mL de solução de sulfito e sulfato) com a M_{sulfito} do primeiro ensaio da segunda triplicata (alíquota de 2,5 mL da solução de sulfito e sulfato), fazendo essa mesma relação com as demais triplicatas.

Dessa maneira, considerando a situação para os dois primeiros ensaios de cada triplicata, obtém-se a respectiva $\Delta M_{\text{sulfito}}$:

$$\Delta M_{\text{sulfito}} = 0,0625 - 0,0319$$

$$\Delta M_{\text{sulfito}} = 0,03057 \text{ mol/L}$$

Com isto, pode-se calcular ΔM_{O_2} , através da estequiometria; uma vez que a relação entre sulfito de sódio e oxigênio apresenta uma proporção, respectivamente, de 2:1. Assim, para o caso apresentado acima, tem-se que:

$$\Delta M_{O_2} = 0,5 * \Delta M_{\text{sulfito}}$$

$$\Delta M_{O_2} = 0,5 * 0,03057$$

$$\Delta M_{O_2} = 0,015285 \text{ mol/L}$$

Assim, dividindo ΔM_{O_2} pelo tempo de reação no *shaker* (equivalente a 2h), obtém-se o valor referente a N_{O_2} . Então, para o caso que está sendo exemplificado, tem-se que:

$$N_{O_2} = \frac{0,015285}{2}$$

$$N_{O_2} = 0,00764 \frac{mol}{L * h}$$

Repetindo-se essa sequência de cálculos para as demais triplicatas, têm-se os valores para a rotação de 100 rpm apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Valores de $\Delta M_{\text{sulfito}}$, ΔM_{O_2} e N_{O_2} para a rotação de 100 rpm.

$\Delta M_{\text{sulfito}}$ [mol/L]	ΔM_{O_2} [mol/L]	N_{O_2} [mol/(Lxh)]
0,03057	0,015285	0,00764
0,02921	0,014607	0,00730
0,02820	0,014099	0,00705

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Seguindo a mesma sequência de cálculos, foi possível determinar o $\Delta M_{\text{sulfito}}$, o ΔM_{O_2} e o N_{O_2} dos ensaios realizados tanto para a rotação de 150 rpm, quanto para a de 200 rpm. Válido ressaltar, no entanto, que, para a agitação de 200 rpm, o tempo de reação no *shaker* foi de 1h, devido à situação de que, ao ser feito por 2h, o resultado obtido foi teoricamente divergente ao apresentar valores de k_{La} não condizentes com a rotação empregada. Portanto, para averiguar tal comportamento, os ensaios para 200 rpm foram refeitos com um tempo de agitação equivalente a uma hora.

A Tabela 15 fornece os resultados apresentados para o primeiro caso, enquanto a Tabela 16 apresenta os valores obtidos para a agitação de 200 rpm.

Tabela 15 - Valores de $\Delta M_{\text{sulfito}}$, ΔM_{O_2} e N_{O_2} para a rotação de 150 rpm.

$\Delta M_{\text{sulfito}}$ [mol/L]	ΔM_{O_2} [mol/L]	N_{O_2} [mol/(Lxh)]
0,04302	0,021509	0,01075
0,04119	0,020595	0,01030
0,04464	0,022321	0,01116

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Tabela 16 - Valores de $\Delta M_{\text{sulfito}}$, ΔM_{O_2} e N_{O_2} para a rotação de 200 rpm.

$\Delta M_{\text{sulfito}}$ [mol/L]	ΔM_{O_2} [mol/L]	N_{O_2} [mol/(Lxh)]
0,03348	0,016738	0,01674
0,03206	0,016028	0,01603
0,03266	0,016332	0,01633

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Conforme apresentado por Cerri (2005), tem-se que o valor de concentração de oxigênio dissolvido (C_s) é equivalente a 0,00156 L/mol. Desta maneira, pode-se, por fim, obter o valor referente ao $k_L a$ através da Equação 13. Portanto, para o caso exemplificado, tem-se que:

$$k_L a = \frac{0,00764}{0,00156}$$

$$k_L a = 4,8974 \text{ h}^{-1}$$

Fazendo este mesmo cálculo para as demais triplicatas, tem-se os respectivos valores de $k_L a$ para as rotações de 100, 150 e 200 rpm apresentados na Tabela 17 que também fornece informações quanto ao valor médio de $k_L a$, desvio padrão e erro.

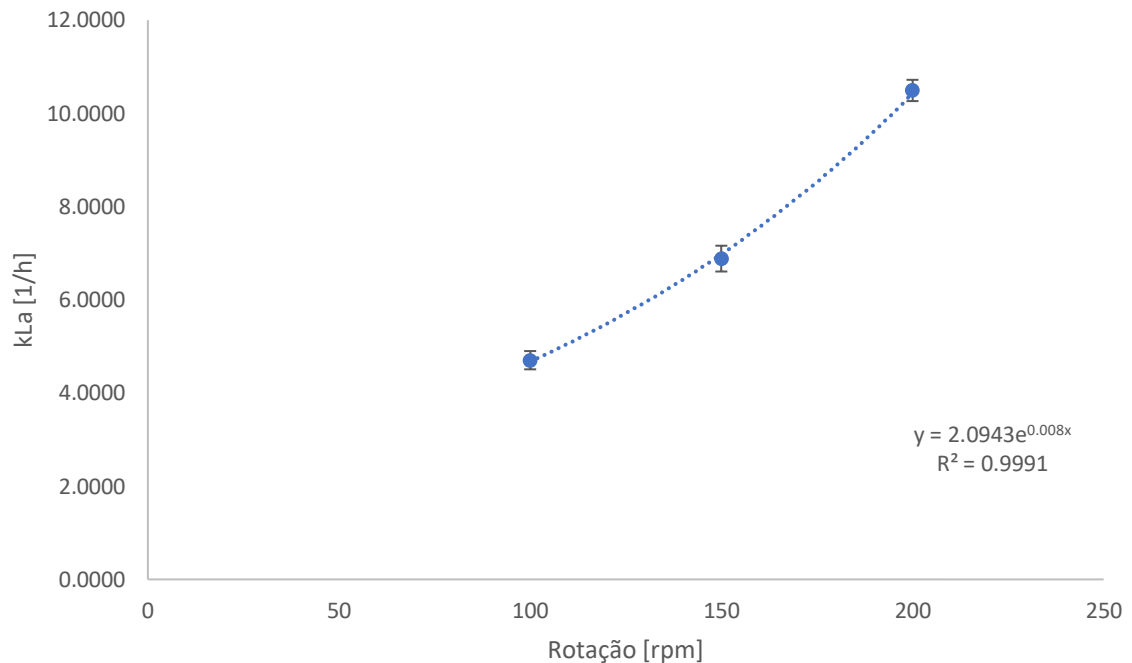
Tabela 17 - Valores de k_{La} para as rotações de 100, 150 e 200 rpm.

	$k_{La} [h^{-1}]$		
	100 rpm	150 rpm	200 rpm
	4,8974	6,8938	10,7295
	4,6816	6,6010	10,2740
	4,5189	7,1540	10,4692
Média	4,7033	6,8829	10,4909
Desvio Padrão	0,1961	0,2767	0,2285
Erro	0,4871	0,6873	0,5676
Intervalo de Confiança	4,2162 – 5,1904	6,1956 – 7,5702	9,9233 – 11,0585

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Em posse dos valores de k_{La} médio de cada rotação analisada, plotou-se o Gráfico 3, a fim de observar o comportamento apresentado.

Os valores de k_{La} obtidos pela iodometria foram plotados no Gráfico 3.

Gráfico 3 - k_{La} x Rotação.

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

O Gráfico 3 ilustra um crescimento exponencial de k_{La} conforme o aumento da frequência de agitação orbital nos frascos. Nos recipientes agitados, o aumento na área de contato efetiva é a principal causa do aumento na eficiência da transferência de oxigênio. Essa propriedade está diretamente relacionada à altura alcançada pelo líquido durante a agitação (Tianzhong *et al.*, 2010).

Em cenários desprovidos de fluxo de aeração, como no caso do *shaker*, a ausência de formação de bolhas ressalta a pertinência do método do sulfito e da determinação da taxa de consumo de sulfito por meio da iodometria. Esta circunstância, na qual a coalescência é minimizada devido à inexistência de bolhas, endossa a escolha desses métodos como uma opção específica. Além disso, esse método permite a determinação do k_{La} sem a inserção de eletrodo, o que iria interferir no escoamento do sistema.

Porém, mediante tal cenário, é válido salientar que o uso de sulfito para determinação do k_{La} superestima tais valores, uma vez que gera um meio não coalescente, o que difere da maioria dos cultivos que são coalescentes (Cerri, 2005).

Convém destacar que, os presentes resultados obtidos pelo método, foram realizados com água, e que podem apresentar um aumento no valor de k_{La} quando estes forem realizados com meio de cultivo devido a razão supracitada.

5.4. RELAÇÃO ENTRE k_{La} , CONCENTRAÇÃO CELULAR E CONCENTRAÇÃO DE PRODUTO

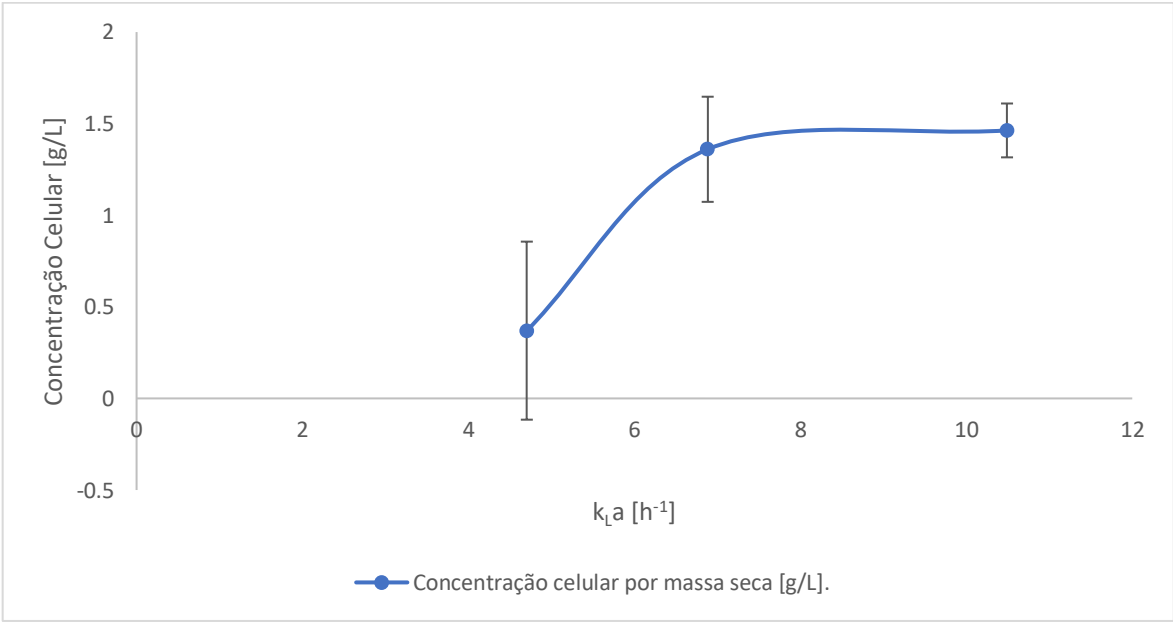
Outro aspecto interessante de se pontuar no presente trabalho é a concordância observada entre o k_{La} e o valor de concentração celular. A Tabela 18 e o Gráfico 4 apresentam os resultados de tal relação.

Tabela 18 - Valores de k_{La} e de concentração celular por massa seca para as rotações de 100, 150 e 200 rpm.

Rotação [rpm]	k_{La} [h^{-1}]	Concentração celular por massa seca [g/L].
100	4,7033	0,370
150	6,8829	1,360
200	10,4909	1,463

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Gráfico 4 - Análise dos valores de k_{La} e de concentração celular por massa seca para as rotações de 100, 150 e 200 rpm.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Analisando o Gráfico 4, percebe-se que os dados apresentaram um comportamento aproximadamente logarítmico, tendendo a uma constância de concentração celular conforme o

valor de k_{La} aumenta. Este trecho de constância, que se assemelha à fase estacionária, em que idealmente ocorreria a produção de colorante, evidencia que a concentração celular tende a atingir uma estabilização mesmo com um possível aumento da agitação; neste caso em específico.

Logo, nota-se que o valor de k_{La} é maior quando se aumenta a rotação, e o mesmo é observado em relação à concentração celular. Pelo fato de *Streptomyces carpaticus* ser uma bactéria aeróbia, fica claro a influência do k_{La} em seu cultivo. Desta forma, pode-se afirmar, neste caso, que o aumento da agitação favoreceu o crescimento celular.

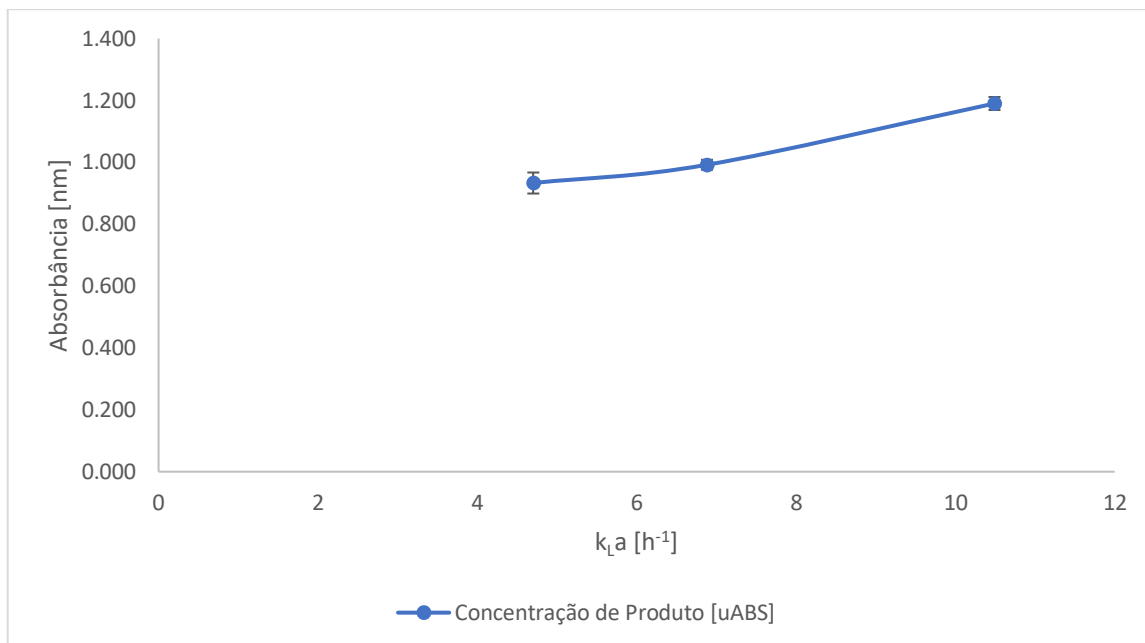
Além disto, é possível citar, também, a relação entre o k_{La} e a concentração de produto. A Tabela 19 e o Gráfico 5 apresentam os resultados de tal correlação.

Tabela 19 - Valores de k_{La} e de concentração de produto para as rotações de 100, 150 e 200 rpm.

Rotação [rpm]	k_{La} [h^{-1}]	Concentração de produto [uABS].
100	4,7033	0,933
150	6,8829	0,992
200	10,4909	1,190

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Gráfico 5 - Análise dos valores de k_{La} e de concentração de produto para as rotações de 100, 150 e 200 rpm.



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Analisando o Gráfico 5, percebe-se que os dados apresentaram um comportamento aproximadamente linear, fazendo com que o crescimento de k_{La} , conforme há o aumento de rotação, seja praticamente proporcional ao aumento da concentração de produto. O desempenho desses resultados está condizente, todavia, conforme já comentado, os valores estão abaixo do esperado; indicando, novamente, a falta de produção do colorante.

Válido ressaltar, conforme já mencionado, que dentre as possíveis justificativas para esses resultados, pode ser citada a perda da capacidade de produção pelo microrganismo.

6. CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se que a capacidade de produção de corante por *Streptomyces carpaticus* utilizada neste trabalho foi comprometida devido a algum fator que pode estar relacionado ao tempo de armazenamento ou tempo de cultivo. Assim, tem-se a necessidade de maior demanda por estudos para compreender a fundo os parâmetros e possíveis interferentes em tal produção de forma geral. Mesmo não sendo possível correlacionar a produção de corante com o k_{LA} , foi observado um comportamento concordante no que diz respeito aos valores de k_{LA} e concentração celular. Ou seja, o aumento da agitação proporcionou aumento no valor de k_{LA} e, por conseguinte, na concentração celular. Neste sentido, a rotação de 200 rpm foi a que demonstrou um melhor desempenho em termos de k_{LA} e concentração.

Os resultados obtidos para k_{LA} indicaram um crescimento exponencial, atribuível ao aumento da eficiência na transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida. Esse fenômeno é resultado do aumento das ondulações geradas pela agitação mais intensa no recipiente de mistura, facilitando uma interação mais eficaz entre o líquido e o gás, resultando em uma elevação na taxa de transferência de oxigênio (Yang *et al.*, 2013). Contudo, vale ressaltar que o aumento na agitação não necessariamente aumentará k_{LA} indefinidamente (Tianzhong *et al.*, 2010).

Além disso, o presente método pode ser utilizado em *shaker*, uma vez que foi capaz de medir o k_{LA} com valores de desvio padrão baixos e intervalo de confiança satisfatório, mesmo com a ocorrência de superestimação dos resultados intrínsecos ao método do sulfito. Juntamente a isso, o uso dessa mesma metodologia também se faz pertinente em situações de bancada, em que se deseja obter o k_{LA} onde há ausência de eletrodo e demais equipamentos mais complexos para tal aferição. Porém, mais estudos devem ser conduzidos para melhor avaliar a coalescência, uma vez que o presente trabalho não conseguiu observá-la.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAZEK, A. S.; EL-NAGGAR, M. E.; ALLAM, A.; MORSY, O. M.; OTHMAN, S. I. Microbial natural products in drug discovery. **Processes**. 2020.
- All about iodometry titration. **Unacademy**, [s.l.], © 2024. Disponível em: <<https://unacademy.com/content/upsc/study-material/chemistry/all-about-iodometry-titration/>>. Acesso em: 30 jan. 2024.
- ANDRADE, J. C. de. Determinações iodométricas. **Chemkeys**, Campinas, 2001.
- AZERANG, P.; SARDARI, S. Bioactive compound produced from Actinomycetes-*Streptomyces*. **Chemistry** 151 1507–1523. 2017
- BABITHA, S. Microbial Pigments. In: NIGAM, P. S. N.; PANDEY, A. **Biotechnology for Agroindustrial residues utilization**. Springer, 2009, p. 147
- BANDAIPHET, C.; PRASERTSAN, P. Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, $k(L)a$ in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 2, p. 216-228, 2006.
- BATAEVA, Y.; DELEGAN, Y.; BOGUN, A.; SHISHKINA, L.; GRIGORYAN, L. Whole genome analysis and assessment of the metabolic potential of *Streptomyces carpaticus* SCPM-O-B-9993, a promising phytostimulant and antiviral agent. **Preprints**, Obolensk, 2023.
- BERGAMIN FILHO, H.; KRUG, F. J.; ZAGATTO, E. A. G.; ROCHA, F. R. P. **Espectrofotometria no ultravioleta e visível**. São Paulo: Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 2010. *E-book*. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4275863/mod_resource/content/1/Apostila-espectrofotometria.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2024.
- BOLOURIAN, A.; MOJTAHEDI, Z. *Streptomyces*, shared microbiome member of soil and gut, as ‘old friends’ against colon cancer. **FEMS Microbiol. Ecol.** 2018.
- BUBICI, G. *Streptomyces spp.* as biocontrol agents against *Fusarium species*. **Cabi Reviews**, [s.l.], p. 1-15. 2018.
- BUSTAMANTE, M. C. C.; **Transferência de oxigênio e condições de cisalhamento em biorreator convencional com impelidores orelha de elefante**. 226 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2013.
- CERRI, M. O.; ESPERANÇA, M. N; BADINO, A. C.; RIBEIRO, M. P. A.; A new approach for kLa determination by gassing-out method in pneumatic bioreactors. **Journal Of Chemical Technology & Biotechnology**, [s.l.], v. 91, n. 12, p. 3061-3069, 2016.

- CERRI, M. O. **Hidrodinâmica e Transferência de Oxigênio em Três Biorreatores Airlift de Circulação Interna Geometricamente Semelhantes**. Orientador: Alberto Colli Badino Júnior. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2009.
- CERRI, M. O.; RIBEIRO, R. M. M. G.; RIBEIRO, M. P. A.; ESPERANÇA, M.; BADINO JUNIOR, A. C. Determinação do coeficiente volumétrico de oxigênio em biorreatores aerados e agitados com independência da sensibilidade do eletrodo. **XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Fortaleza, 2016.
- CHANG, T. L.; HUANG, T. W.; WANG, Y. X.; LIU, C. P.; KIRBY, R.; CHU, C. M.; HUANG, C. H. An Actinobacterial Isolate, *Streptomyces* sp. YX44, Produces Broad-Spectrum Antibiotics That Strongly Inhibit *Staphylococcus aureus*. **Microorganisms**, 9(3), 630. 2021.
- CRUZ FILHO, R. F.; TEIXEIRA, M. F. S. **Avaliação do potencial biotecnológico de colorantes produzidos por bactérias do gênero *Serratia* isoladas de substratos amazônicos**. Duque de Caxias: Espaço científico livre projetos. 1 ed. 2013. 46 p.
- DA SILVA, W. S. **Produção de colorantes fúngicos e seu uso no tingimento de tecidos**. Orientador: Juliano Lemos Bicas. 64 f. Dissertação (Pós-Graduação em Tecnologias para o desenvolvimento sustentável) – Universidade Federal de São João Del Rei. Ouro Branco, 2013.
- DE 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. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 11, n. 1. 2020.
- DIAS, S. L. P.; VAGHETTI, J. C. P.; LIMA, ÉDER C. **Química Analítica**. Porto Alegre: Grupo A, 2016. E-book. ISBN 9788582603918. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582603918/>. Acesso em: 17 jan. 2024.
- DORAN, P. M. **Bioprocess Engineering Principles**. 2ª ed. Reino Unido: Elsevier Ltd, 2013.
- GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. **Biotechnology Advances**, Madrid, v. 27, p.153-176, 2009.
- GENILLOU, O. Actinomycetes: Still a source of novel antibiotics. **Nat. Prod. Rep.** 2017.
- HERNÁNDEZ, I. L. C. **Metabólitos secundários obtidos de bactérias (*Streptomyces*) isoladas de sedimento marinho**. 2002. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.
- HARIR, M.; BENDIF, H.; BELLAHCENE, M.; FORTAS, Z.; POGNI, R. *Streptomyces* secondary metabolites. **Basic Biol. Appl. Actinobacteria** 6 99–122. 2018.
- HWANG, K. S.; KIM, H. U.; CHARUSANTI, P.; PALSSON, B. Ø.; LEE, S. Y. Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, Hørsholm, v. 32, p. 255-268, 2014.

INOUE, O. O. **Influência de diferentes limitações nutricionais sobre a produção de retamicina por *Streptomyces olindensis* ICB20**. Orientadora: Maria Cândida Reginato Facciotti. 2006. 132 f. Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

KURBANOGU, E. B.; OZDAL, M.; OZDAL, O. G.; ALGUR, O. F. Enhanced production of prodigiosin by *Serratia marcescens* MO-1 using ram horn peptone. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 46. n. 2, p. 631-637, 2015.

LAPAZ, M. I.; CISNEROS, E. J.; PIANZZOLA, M. J.; FRANCIS, I. M. Exploring the exceptional properties of *Streptomyces*: A hands-on discovery of natural products. **Am. Biol. Teach.** 81 658–664. 2019.

LAPENDA, J. C. **Produção e caracterização de prodigiosina isolada de *Serratia marcescens* UCP 1549**. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

LIMA, C. A., **Bioprospecção de fungos com potencial para a produção de colorantes naturais**. Orientador: Glauciane Danusa Coelho. 63 f. Monografia (Graduação) – Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos, Universidade de Campina Grande, Sumé, 2018. Disponível em: <<http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/jspui/bitstream/riufcg/4336/1/CAIO%20DE%20AZEVEDO%20LIMA%20%20TCC%20ENG%20DE%20BIOTECNOLOGIA%20E%20BIOPROCESSOS%202018.pdf>>. Acesso em: 13 jan. 2024.

LORENZINI, G. C.; **Estudo da transferência de oxigênio em cultivo de *Bacillus megaterium***. Orientadora: Débora Jung Luvizetto Faccin. 55 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

MARTINS, O. P.; **Estudos da elucidação estrutural do colorante verde obtido a partir do microrganismo *Streptomyces carpaticus***. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, Bioprocessos e Biotecnologia, Unesp Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2019.

MATEUS, N. B.; BARDIN, D.; CONAGIN, A. Viabilidade de uso do delineamento composto central. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, n. 6, p. 1537-1546, 2001.

MALIK K, TOKKAS J, GOYAL S. Microbial Pigments: A review. **International Journal of Microbial Resource Technology**, v. 1, n. 4, p. 361 -365, 2012.

- MENDES, C. R.; DILARRI, G.; PELEGRINI, R. T. Aplicação da biomassa *Saccharomyces cerevisiae* como agente adsorvente do colorante Direct Orange 2GL e os possíveis mecanismos de interações adsorbato/adsorvente. **Revista Matéria**, [S.l.], v. 20, p. 898-908, 2015.
- MIDORIKAWA, G. E. O.; SANTOS, L. C. Z.; DE OLIVEIRA, P. A.; FÁVARO, L. C. L. Prospecção, seleção e identificação de bactérias produtoras de colorantes. **VI Encontro de Pesquisa e Inovação da Embrapa Agroenergia: Anais**, [s.l.], 2020.
- MORALES-OYERVIDES, L.; RUIZ-SÁNCHEZ, J. P.; OLIVEIRA, J. C.; SOUSA-GALLAGHER, M. J.; MÉNDEZ-ZAVALA, A.; GIUFFRIDA, D.; DUFOSSÉ, L.; MONTAÑEZ, J. Biotechnological approaches for the production of natural colorants by *Talaromyces/Penicillium*: a review. **Biotechnology Advances**, [S.l.], v. 43, p. 107601, nov. 2020.
- MUKHERJEE, G.; SINGH, S. K. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 188-192, 2011.
- NGUYEN, C. T.; DHAKAL, D.; PHAM, V. T. T.; NGUYEN, H. T.; SOHNG, J. K. Recent advances in strategies for activation and discovery/characterization of cryptic biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*. **Microorganisms**. 2020.
- NICOLAU, P. B. **Microrganismos e crescimento microbiano**. [s.l.], Universidade Aberta. Ebook. Disponível em: <https://repositorioaberto.uab.pt/bitstream/10400.2/6137/1/UT2_Microrganismos%20e%20crescimento%20microbiano_PBN.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2024. 2014.
- OLIVEIRA, F.; HIRAI, P. R.; TEIXEIRA, M. F. S.; PEREIRA, J. F. B.; SANTOS-EBINUMA, V. C. *Talaromyces amestolkiae* cell disruption and colorant extraction using imidazolium-based ionic liquids. **Separation And Purification Technology**, [S.l.], v. 257, 2021.
- PANIAGUA, C. E. da S. **Ciência, Tecnologia e Inovação: A nova Produção do Conhecimento 2**. 2021. E-book. ISBN 978-65-5983-108-1. Disponível em: <<https://www.atenaeditora.com.br/index.php/catalogo/ebook/ciencia-tecnologia-e-inovacao-a-nova-producao-do-conhecimento-2>>. Acesso em: 14 jan. 2024.
- PATEL, N.; THIBAUT, J. Enhanced in situ dynamic method for measuring K(L)_a in fermentation media. **Biochemical Engineering Journal**. [s.l.], v. 47, n. 1-3, p. 48-54, 2009.
- PHAM, V. T. T.; NGUYEN, C. T.; DHAKAL, D.; NGUYEN, H. T.; KIM, T. S.; SOHNG, J. K. Recent Advances in the Heterologous Biosynthesis of Natural Products from *Streptomyces*. **Appl. Sci**. 2021.

- PONTES, F. D. B.; PEREIRA, J. F. B.; BAPTISTA NETO, A. Desenvolvimento do processo de produção, isolamento e purificação de colorantes produzidos por *Streptomyces carpaticus*. In: **XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**. São Carlos, 2017.
- PRADO, C. C. da S. **Colorantes alimentícios: colorantes naturais x colorantes sintéticos**. Orientadora: Renata Luz Martins. 55 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal Fluminense. Volta Redonda, 2022.
- SALWAN, R.; SHARMA, V. Bioactive compounds of *Streptomyces*: Biosynthesis to applications. **Stud. Nat. Prod. Chem.** 64 467–491. 2020.
- SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. de A; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. Vol 2. 1 ed. São Paulo: Blucher, 2001.
- SHARMA, V.; KAUR R.; SALWAN, R. *Streptomyces*: Host for refactoring of diverse bioactive secondary metabolites. **3 Biotech**. 2021.
- SINGH, S.; KHAJURIA, R. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Amsterdam: Elsevier. 2018.
- SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentos de química analítica**. 8ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2009.
- TADDEI, A.; TREMARIAS, M. M.; CAPRILES, C. H. Viability studies on Actinomycetes. **Mycopathologia**. V. 143, p. 161-164, 1999.
- TAGUCHI, H.; HUMPHREY, A. Dynamic method of the volumetric oxygen transfer coefficient in the fermentation systems. **Journal of Fermentation Technology**, v. 44, p. 881-889, 1966.
- TERRA, J.; ROSSI, A. V. Sobre o desenvolvimento da análise volumétrica e algumas aplicações atuais. **Química Nova**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 166-171, 2005.
- TIANZHONG, L.; GE, S.; JING, L.; XIANGMING, Q.; XIAOBEI, Z. Numerical simulation of flow in Erlenmeyer shaken flask. **Comput. Fluid Dyn**, v. 7, p. 157-172, 2010.
- TULI, H. S.; CHAUDHARY, P.; BENIWAL, V.; SHARMA, A. K. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. **Journal of Food Science and Technology**, [S.l.], v. 52, n. 8, p. 4669-4678. 2014.
- VENIL, C. K.; ARULDASS, C. A.; DUFOSSE, L.; ZAKARIA, Z. A.; AHMAD, W. A. Current perspective on bacterial pigments: emerging sustainable compounds with coloring and biological properties for the industry-an incisive evaluation. **RSC Advances**, v. 4, p. 39523–39529, 2014.

- VOGEL, Arthur I. **Análise Química Quantitativa**. São Paulo: Grupo GEN, 2002. *E-book*. ISBN 978-85-216-2580-3. Disponível em: <<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/978-85-216-2580-3/>>. Acesso em: 13 jan. 2024.
- WANG, L.; RAVICHANDRAN, V.; YIN, Y.; YIN J.; ZHANG Y. Natural products from mammalian gut microbiota. **Trends Biotechnol.** 37 492–504. 2019.
- XIA, H.; LI X.; LI, Z.; ZHAN, X.; MAO, X.; LI, Y. The application of regulatory cascades in *Streptomyces*: Yield enhancement and metabolite mining. **Front. Microbiol.** 2020.
- YANG, T.; HUANG, Y.; HAN, Z.; LIU, H.; ZHANG, R.; XU, Y. Novel disposable flexible bioreactor for *Escherichia coli* culture in orbital shaking incubator. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 116, n. 4, p. 452-459, 2013.
- ZANG, C.; YEH, C.; CHANG, C.; *et al.* Identification and enhanced production of prodigiosin isoform pigment from *Serratia marcescens* N10612. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical engineers**, v. 45, n. 4, p. 1133-1139, 2014.
- ZANONI, M. V. B.; YAMANAKA, H. **Colorantes: caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento**. 1ª ed. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016.