



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E
BIOPROCESSOS
MESTRADO PROFISSIONAL**

**“ESTUDOS DA ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO CORANTE VERDE
OBTIDO A PARTIR DO MICRORGANISMO *STREPTOMYCES
CARPATICUS*”**

Olímpia Paschoal Martins

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Lucas Primo

COORIENTADORA: Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso

ARARAQUARA - SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E
BIOPROCESSOS
MESTRADO PROFISSIONAL

“ESTUDOS DA ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO CORANTE VERDE
OBTIDO A PARTIR DO MICRORGANISMO *STREPTOMYCES*
***CARPATICUS*”**

Olímpia Paschoal Martins

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Lucas Primo

COORIENTADORA: Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso

ARARAQUARA - SP

2019

M386e Martins, Olímpia Paschoal.
Estudos da elucidação estrutural do corante verde obtido a partir do microrganismo *Streptomyces carpaticus* / Olímpia Paschoal Martins. – Araraquara: [S.n.], 2019.
76 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biomateriais e Bioprocessos. Área de Pesquisa em Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.

Orientador: Fernando Lucas Primo.
Coorientadora: Carmen Lúcia Cardoso.

1. Corantes. 2. Espectrometria. 3. Elucidação estrutural. 4. Biotecnologia. 5. *Streptomyces Carpaticus*. I. Primo, Fernando Lucas, orient. II. Cardoso, Carmen Lúcia, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030170P0
Esta ficha não pode ser modificada

Dedicatória

Ao Pai Celestial por seu infinito amor e bondade e pelas muitas bênçãos que derramou e continua derramando em minha vida.

Ao meu querido marido Ricardo, que teve a paciência e compreensão para aceitar minhas ausências.

Ao meu filho querido Thiago, o grande amor da minha vida que suportou minhas mudanças de humor nos momentos de dificuldade.

A minha filha amada Letícia, que durante esse período me deu a alegria de gerar dois filhos lindos o Arthur e a Alice, que tornaram meus dias muito mais iluminados.

A Daniella Romano de Carvalho, que muito mais que amiga me auxiliou em todas as etapas deste trabalho.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Lucas Primo pela oportunidade, confiança e compreensão frente as minhas limitações.

A minha coorientadora Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso, por disponibilizar o laboratório para realização do trabalho e por se colocar à disposição todas as vezes que surgiram dúvidas, compartilhando sua imensa sabedoria.

Ao Prof. Dr. Álvaro de Baptista Neto, pelo fornecimento do corante verde.

Ao funcionário do Departamento de Química Vinícius Palaretti que se preocupou com o andamento do meu trabalho, me auxiliando nas análises de RMN e colocando-se à disposição para me auxiliar na interpretação dos resultados.

A funcionária da FCFRP- USP, Jacqueline Nakau, que se mostrou uma verdadeira amiga ao doar seu tempo e se mostrar sempre solícita para tirar dúvidas e propor ações para melhoria dos meus resultados.

Ao aluno de pós graduação do laboratório de toxicologia Raul Miranda, pelo companheirismo e por ter se disposto a me auxiliar em todas as etapas do trabalho.

Ao aluno de pós graduação Renato Salviato Cicolani por compartilhar seu conhecimento me auxiliando nessa etapa final de análise de resultados.

Ao aluno de pós graduação Douglas Luís da Silva, pelo auxílio na preparação das amostras para análises de IV e realização das mesmas, assim como na interpretação do resultados, mas muito mais que isso, pelo carinho e palavras de incentivo dispendidos durante o tempo de realização desse trabalho.

Aos alunos do CNET Leonardo Barcelos, Leonardo Franchi, Daniela Silvestrini, Jayme, Maryanne, Nayara que se alegraram com a minha decisão de dar mais esse passo.

A Graciely Gobo, por ter me incentivado a aceitar esse desafio, por dividir comigo as dificuldades que foram surgindo ao longo desse período e por sempre estar disposta a me escutar.

A minha querida amiga Patrícia Gotto, que mesmo estando longe fisicamente sempre esteve ao meu lado me apoiando e me fazendo acreditar na minha capacidade e força de levar meus sonhos adiante.

A minha amiga Adriana Vilela que sempre me incentivou e confiou na minha capacidade de assumir mais esse desafio.

A minha querida amiga Daniela Romano que doou seu tempo e compartilhou suas experiências e sabedoria, que não mediu esforços para me ajudar em todos os momentos. Sem você Dani esse momento não seria possível.

Ao meu marido maravilhoso, que vem exercitando ao longo desses nossos anos de união a sua paciência para aceitar e fazer parte dos meus sonhos.

A meu filho querido, que com a sua ingenuidade, altruísmo e amor me ensina a cada dia como ser melhor e que podemos nos superar devido a nossa herança Divina.

A minha linda filha, que sempre se mostrou orgulhosa frente as minhas realizações.

Aos meus lindos netos Arthur e Alice, que chegaram para dar mais luz a minha vida e para fazer meu coração transbordar de amor.

Sou imensamente grata a todos que de maneira direta ou indireta me ajudaram a passar por mais essa etapa da minha vida.

À Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto e o Departamento de Química pela Infraestrutura fornecida.

Agradeço a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus Araraquara e ao Programa de Pós Graduação do Mestrado Profissional, por tornar possível o complemento de minha formação em uma Instituição de Qualidade.

Epígrafe

*“...Desconfie do destino, acredite em você.
Gaste mais horas realizando do que sonhando,
Fazendo do que planejando,
Vivendo do que esperando!”.*
(Caroline Tavares).

RESUMO

A exploração da cor nunca esteve tão evidente como nos dias de hoje, e muitas indústrias são direta ou indiretamente dependentes da disponibilidade de corantes artificiais. Com o crescimento da produção, consumo e utilização de produtos contendo corantes sintéticos, aumentaram também os relatos com problemas relacionados à saúde e aos danos causados no meio ambiente devido, principalmente a sua baixa biodegradabilidade, fazendo-se repensar o uso dessas substâncias. Frente ao conhecimento do público, assim como a relação à segurança ambiental e a preocupação com a saúde, os corantes naturais nesse sentido podem ser uma alternativa ao uso dos corantes sintéticos conquistando, a cada ano, uma nova fatia do mercado. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o corante verde de origem biotecnológica, obtido a partir do cultivo do microrganismo *Streptomyces carpaticus*, através de diversas técnicas espectroscópicas, para que assim possa se propor a aplicação do mesmo em indústrias têxteis, de cosméticos ou alimentícias. Foram realizadas análises para identificação do corante bem como testes para definição dos solventes de trabalho, os quais foram utilizados na preparação das amostras que foram enviadas para as diversas técnicas. Os testes iniciais realizados no corante bruto, tiveram por objetivo definir o solvente ideal para preparação das amostras para análises de Espectroscopia de UV-Vis, Fluorescência, Espectrometria de massas e Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensionais. Após análises por Infravermelho e RMN, foi possível verificar a presença de vários contaminantes, o que direcionou o trabalho para a purificação do corante. Esse trabalho incluiu extração em fase sólida (SPE), técnicas cromatográficas como colunas abertas em sílica gel e *Sephadex* LH-20. Foram realizadas análises via HPLC acoplado a Espectrometria de Massas. Os resultados experimentais obtidos através da combinação das diversas técnicas permitiram inferir características estruturais à molécula, bem como direcionar os estudos futuros buscando potenciais aplicações industriais.

Palavras-chave: corantes; espectrometria; elucidação estrutural; biotecnologia; *Streptomyces Carpaticus*

ABSTRACT

The Color exploration has never been more evident than it is today. Many industries are directly or indirectly dependent on the availability of synthetic dyes. With the growth of the production, consumption and the use of products containing synthetic dyes the number of reports about problems related to health and damage caused to the environment, mainly due to their low biodegradability have been increasing. So the use of these substance should be rethought. In the face of public knowledge, as well as environmental safety and health concerns, natural dyes in this sense can be an alternative to the use of synthetic dyes, gaining a new market share each year. The objective of this work was to characterize the green dye of biotechnological origin, obtained from the cultivation of the microorganism *Streptomyces carpaticus*, through several spectroscopic techniques, so that it can be proposed its application in the textile, cosmetic or food industries. Analyzes were performed to identify the dye as well as tests to define the working solvents, which were used in the preparation of samples that were sent to the various techniques. The initial tests carried out on the raw dye aimed to define the ideal solvent for sample preparation for analysis of UV-Vis Spectroscopy, Fluorescence, Mass Spectrometry and One and Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonance. After Infrared and NMR analysis, it was possible to verify the presence of several contaminants, which directed the work to the dye purification. This work included solid phase extraction (SPE), chromatographic techniques such as silica gel open columns and Sephadex LH-20. Mass spectrometry coupled HPLC analyzes were performed. The experimental results obtained through the combination of several techniques allowed to infer structural characteristics to the molecule, as well as to direct future studies looking for potential industrial applications.

Keywords: dyes; spectrometry; structural elucidation; biotechnology; *Streptomyces Carpaticus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Grupos cromóforos presentes em corantes orgânicos.....	22
Figura 2 - Estruturas químicas de corantes sintéticos.....	24
Figura 3 - Estruturas químicas de corantes naturais.....	26
Figura 4 - Estruturas químicas de alguns corantes naturais produzidos por microrganismos.....	29
Figura 5 - Esquema de um espectrofotômetro.....	34
Figura 6 - Esquema geral de um espectrofluorímetro.....	36
Figura 7 - Tipos de vibrações moleculares consideradas na espectroscopia de infravermelho.....	40
Figura 8 - Espectro eletrônico UV-vis do corante em diferentes solventes orgânicos.....	47
Figura 9 - Espectro de absorção em diferentes valores de pHs.....	48
Figura 10 - Espectro de emissão de fluorescência normalizado com excitação fixa em 270 nm em diferentes solventes orgânicos, fendas de resolução espectral de 10 nm e 15 nm para excitação e emissão, respectivamente.....	49
Figura 11 - Espectro de fluorescência normalizado com excitação fixa em 440 nm em diferentes solventes orgânicos, fendas de resolução espectral de 10 nm e 15 nm para excitação e emissão, respectivamente.....	49
Figura 12 - Espectro de infravermelho obtido do corante líquido e liofilizado.....	50
Figura 13 - Espectro de infravermelho obtido do corante purificado.....	50
Figura 14 - Espectro de RMN de análise de ^1H do corante verde liofilizado, dissolvido em $\text{MeOH-}d_4$, frequência 5MHz.....	52
Figura 15 - Espectro de RMN de análise de ^1H do corante verde liofilizado, dissolvido em $\text{MeOH-}d_4$, frequência 5MHz.....	53

Figura 16 - Espectro de RMN de análise de ^{13}C do corante verde liofilizado, dissolvido em $\text{MeOH-}d_4$, frequência 5 MHz.....	54
Figura 17 – Espectro de RMN de análise de ^{13}C do corante verde liofilizado, dissolvido em $\text{MeOH-}d_4$, frequência 5 MHz.....	55
Figura 18 – Sinais de RMN da α -glicose (a) e β -glicose (b).....	56
Figura 19 – Espectro de RMN de análise de ^1H do corante verde purificado, dissolvido em $\text{MeOH-}d_4$, frequência 5 MHz (faixa: 5 – 9 ppm).....	57
Figura 20 - Espectro de RMN de análise de ^1H do corante verde purificado, dissolvido em $\text{MeOH-}d_4$, frequência 5 MHz (faixa: 2 – 6 ppm).....	58
Figura 21 - Espectro de RMN de análise de ^1H do corante verde purificado, dissolvido em $\text{MeOH-}d_4$, frequência 5 MHz (faixa: 0 – 3 ppm).....	59
Figura 22 - Comparação dos espectros de massas (ESI+) do corante bruto e metanol /branco (A) e corante bruto e liofilizado (B)	61
Figura 23 - Frações da coluna de Sílica gel observadas em: (a) fora da câmara escura, (b) Hexano/Acetato de etila, (c) fração com o composto de interesse.....	63
Figura 24 - Cromatograma obtido do corante bruto extraído com cartucho SPE e aplicada em coluna de resina Sephadex com monitoramento em 450 nm.....	64
Figura 25 - Cromatograma LC-UV do corante purificado em C18 com monitoramento em 450 nm.....	64
Figura 26 - Cromatograma LC-MS do corante purificado em C18.....	65
Figura 27 - Espectro de massas referente ao tempo de 10 minutos da análise LC-MS.....	66
Figura 28 - Espectro de massas referente ao tempo de 5 minutos da análise LC-MS.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Corantes sintéticos utilizados no Brasil e na União Européia, de acordo com cada órgão institucional específico.....	25
Tabela 2 - Principais corantes naturais extraídos de plantas e animais.....	27
Tabela 3 - Tipos de <i>Streptomyces</i> , colorações e outros metabólitos produzidos.....	31
Tabela 4 - Faixas de comprimento de onda de interesse para a espectrofotometria.....	32
Tabela 5 - Relação entre as cores absorvidas e suas cores observadas com os respectivos comprimentos de onda.....	33
Tabela 6 - Regiões espectrais do infravermelho.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

¹³C – Carbono 13

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CNNPA – Comissão Nacional de Normas Padrões para Alimentos

COSY - *Correlation Spectroscopy*

DMSO – Dimetil-sulfóxido

DSMO-*d*₆ – Dimetil-sulfóxido deuterado

EtOH – Etanol

ESI – Ionização por ElectroSpray

¹⁹F – Flúor 19

FCF – Verde Rápido

FDA – *Food and Drug Administration*

¹H - Hidrogênio

HMBC - *Heteronuclear MultipleBond Coherence*

HPLC – *High Performance Liquid Cromatography*

HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

JECFA - Join FAO/WHO Expert Comminittee on Food Additives

LC – Cromatografia Líquida

m/z – razão massa/carga

mL - mililitro

mm - milímetro

MeOH – Metanol

MS – *Mass Spectroscopy*

nm - nanômetro

³¹P – Fósforo 31

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SPE - *Solid Phase Extraction*

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

µg – micrograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	20
2.1. OBJETIVO GERAL	20
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1. CORANTES E PIGMENTOS	21
3.2. CORANTES SINTÉTICOS	23
3.3. CORANTES NATURAIS	25
3.4. CORANTES PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS	27
3.5. CORANTE PRODUZIDO POR <i>STREPTOMYCES</i>	30
3.6. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	31
3.6.1. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO NO UV-VIS	32
3.6.2. ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA	35
3.6.3. A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E A ESPECTROMETRIA E MASSAS	37
3.6.4. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR - RMN	38
3.6.5. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO – IR	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. REAGENTES E MATERIAIS	41
4.2. EQUIPAMENTOS	41
4.3. MÉTODOS OU PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	42
4.3.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO UV-VIS	42
4.3.2. ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA	42
4.3.3. LIOFILIZAÇÃO	43
4.3.4. ANÁLISE DE RMN	43

4.3.5. ANÁLISE DE INFRAVERMELHO.....	43
4.3.6. CROMATOGRAFIA EM COLUNA.....	44
4.3.7. EXTRAÇÃO DO CORANTE.....	44
4.3.8. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – HPLC	44
4.3.9. ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
5.1. CARACTERÍSTICAS DO CORANTE VERDE DE <i>STREPTOMYCES CARPATICUS</i>	46
5.2. ANÁLISE DE INFRAVERMELHO.....	50
5.3. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	51
5.4. ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	60
5.5. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA – SPE	62
5.6. FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA	62
5.7. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	64
6. CONCLUSÕES	68
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1. INTRODUÇÃO

As cores sempre foram um atrativo para o homem, isso é facilmente percebido quando vemos que os corantes são utilizados desde os tempos mais primórdios. Com o passar do tempo o homem começou a procurar novos corantes e assim surgiram os corantes sintéticos. Considerando que a cor está diretamente relacionada a aceitação de um alimento por exemplo, e que se correlaciona a cor com a qualidade do produto, ela incrementa os apelos de sabor, aroma e textura. Desde a antiguidade vem se utilizando alguns métodos de colorir os alimentos para torná-los mais atraentes (FABRI; TERAMOTO, 2015). Assim, o homem passou a buscar novos corantes, não apenas os naturais, o que levou ao desenvolvimento de novos processos químicos, dando origem ao importante segmento industrial, o de corantes sintéticos.

Na primeira metade do século XX, o uso de corantes artificiais para manipular a coloração de alimentos comercializados teve um grande crescimento em virtude de mudanças econômicas, e pela descoberta de métodos de fabricação de corantes sintéticos de forma eficaz e barata. Antes dessa época o emprego por pigmentos naturais prevalecia, porém com aplicação e variação de cores limitadas (BAFANA et al., 2011).

As pesquisas de corantes artificiais foram aumentando com o passar dos anos, assim como sua produção, fazendo com que o uso de corantes naturais tivesse uma grande queda (HOLME, 2006; MOHAMMAD et al., 2013). Com o aumento da utilização de corantes sintéticos surgiram relatos sobre a ocorrência de efeitos indesejados, como alergias e toxicidade biológica, de grau moderado e mais graves, como mutagenicidade e potencial carcinogênico, o que levou a sociedade a repensar o uso indiscriminado dessas substâncias (CARVALHO et al., 2014). Além do mais, os problemas ambientais estão cada vez mais evidentes na sociedade contemporânea e as diversas alterações tanto físicas, químicas e biológicas são observados quando avaliamos a qualidade do solo, ar e água. Um dos grandes problemas do século está ligado à qualidade do corpo hídrico que está muito aquém dos padrões estabelecidos como toleráveis. O consumo de água nos processos das atividades industriais têxteis é muito alto e gera um alto volume de efluentes o que contribui para o aumento dos níveis de contaminantes em águas naturais (MENDES, et al., 2015). Dentre os corantes amplamente utilizados nas indústrias têxteis podemos citar os corantes azo sintéticos que do total utilizado tem de 10 a 15% liberados nos corpos d'água por terem um baixo grau de fixação nos tecidos (GANODERMAIERI et al., 2005). Com a liberação dessa carga orgânica há uma alteração do ecossistema, ocasionada pela turbidez da água dificultando a penetração da radiação solar, o

que gera modificações na atividade fotossintética e na solubilidade dos gases. Essa turbidez ocorre por causa da presença de compostos químicos tóxicos que compõem as moléculas dos corantes, tais como, benzeno, tolueno, etil-benzeno, naftaleno, antraceno e xileno (MENDES, et al., 2015). Esses compostos podem se acumular e causar riscos quando lançados no meio ambiente, devido aos seus efeitos tóxicos podendo permanecer no meio por até 50 anos (MENDES, et al., 2015). Esses fatores juntamente com a sua baixa biodegradabilidade podem trazer significativos problemas ambientais.

Com a preocupação crescente da sociedade com relação a saúde e ao prejuízo ambiental têm-se aumentado a procura por corantes naturais e biotecnológicos como alternativa para substituição adequada dos corantes sintéticos (CRUZ FILHO; TEIXEIRA, 2013). Assim, há um grande interesse no desenvolvimento de novos processos para a produção de corantes de origem natural por vias biotecnológicas. Nesse contexto, pesquisas mostram que a indústria de corantes naturais tem apresentado um crescimento de 5-10% em relação aos 3-5% dos obtidos por via sintética, isso associado a um aumento nas vendas de 4,6% de 2004 para 2007, enquanto o índice de aumento de venda de corantes em geral foi de 2,5% no mesmo período (CRUZ FILHO; TEIXEIRA, 2013; MENDONÇA, 2011).

O corante natural obtido por processos de cultivos de microrganismos tem chamado a atenção dentre as diferentes fontes de corantes naturais existentes, pois, possibilita o controle e aperfeiçoamento do processo biotecnológico, é independente de condições climáticas e demanda menos espaço físico. Os níveis de rendimentos dos processos fermentativos confirmam a vantagem da obtenção de pigmentos por via microbiana (CRUZ FILHO; TEIXEIRA, 2013). O fato dos pigmentos microbianos estarem associados a uma imagem de produtos naturais de boa qualidade e salutar, também faz com que a aceitação pelo consumidor seja maior, porém se faz necessária a realização das análises toxicológicas e sua comparação com os corantes sintéticos e de outras fontes naturais (CRUZ FILHO e TEIXEIRA, 2013).

Neste contexto, o corante verde cedido pelo grupo no Prof. Dr. Álvaro Baptista Neto do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, *campus* de Araraquara, obtido como subproduto da produção de Vanilomicina pelo microrganismo *Streptomyces Carpaticus*, coletado do ambiente marinho, se tornou material de estudo do grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Fernando Lucas Primo da mesma faculdade, com o intuito de propor a identificação estrutural do corante, assim como suas

características químicas e físicas para definir uma possível aplicação em indústrias têxteis, de cosméticos ou alimentícias.

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Elucidar quimicamente o corante verde de origem biotecnológica, obtido por fermentação com o microrganismo *Streptomyces carpaticus*, através de diversas técnicas espectroscópicas.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar a purificação do corante verde de origem biotecnológica, através de extração em fase sólida utilizando cartucho de SPE, técnicas cromatográficas, tais como, a cromatografia em coluna de cromatografia líquida tendo como fase estacionária Sílica gel 60 e Shepadex LH-20. Posteriormente, utilizar as técnicas de UV-visível, Espectrometria de Fluorescência, Ressonância Magnética Nuclear (^1H e ^{13}C), Infravermelho, Cromatografia Líquida, Espectrometria de Massas, para isolamento e elucidação da estrutura molecular.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. CORANTES E PIGMENTOS

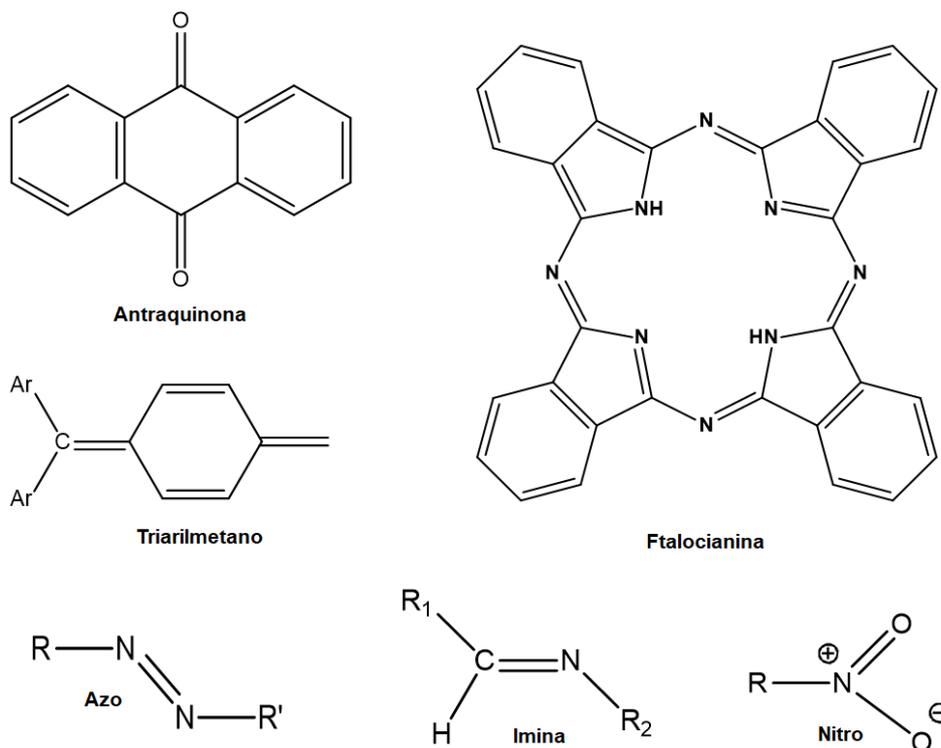
Existem substâncias que quando aplicadas a um material tem a propriedade de lhe conferir cor, essas substâncias podem ser chamadas de corantes ou pigmentos (SHIOZER; BARATA, 2007). Os termos corantes e pigmentos muitas vezes são utilizados como sinônimos, porém, apresentam uma diferença conceitual no que se refere à sua solubilidade, sendo os pigmentos insolúveis e os corantes solúveis nos meios em que serão incorporados, portanto eles podem ser diferenciados quanto à forma de aplicação (CRUZ FILHO e TEIXEIRA, 2013).

As cores sempre foram um atrativo desde a antiguidade, sendo utilizados em tecidos, cerâmicas e couros. Atualmente a maioria dos alimentos que consumimos, bem como os medicamentos que utilizamos e das roupas que vestimos são coloridas, com isso, as indústrias alimentícia, farmacêutica e têxtil acabam utilizando corantes em seus produtos, em sua grande maioria sintéticos, também conhecidos como artificiais (CARVALHO et al., 2014).

Os corantes e pigmentos tem dentre uma de suas maiores características a de absorver luz visível, isso é possível devido a sua estrutura química que possibilita transições eletrônicas para absorver radiações eletromagnéticas na região do espectro visível (400-700nm) (SARON; FELISBERTI, 2006). Existe nessas substâncias pelo menos um grupo cromóforo associado a um sistema conjugado (alternando entre ligações simples e duplas) e em sua estrutura um ou mais anéis benzênicos (IARC, 2010).

Há três partes funcionais na molécula do corante que determinam a cor: um grupo de átomos com uma ou mais ligações insaturadas que é o cromóforo, que por absorver a luz em um comprimento de onda específico é o principal responsável por determinar a cor da substância; os grupos funcionais da molécula, que são substituintes doadores ou aceptores de elétrons e determinam a solubilidade da substância e intensificam a ação do cromóforo e, conseqüentemente, a coloração do produto, chamados de auxocromo; e o cromógeno, que é a própria estrutura colorante, caracterizada normalmente por anéis aromáticos onde o cromógeno e o cromóforo estão presentes (PINAZO BELTRAN, 2015; MARTÍNEZ SUÁREZ, 2017; LEAL, 2011).

Os grupos cromóforos comuns são: nitro, nitroso, azo e carbonila. Estes compostos têm sua cor intensificada e/ou modificada por grupos auxocromos tais como etila, nitro, amino, sulfônico, hidroxila, metóxi, etóxi, cloro e bromo e pelos anti-auxocromos. Pode-se observar na Figura 1 alguns grupos cromóforos presentes em corantes orgânicos.

Figura 1 – Grupos cromóforos presentes em corantes orgânicos.

Fonte - Adaptado de IARC (2012).

Os corantes podem ser obtidos a partir de um vegetal, animal, mineral ou outra fonte e pode ser adicionado ou aplicado a uma outra substância que pode ser um alimento, medicamento, cosmético ou ao corpo humano (SHIOZER; BARATA, 2007).

A ANVISA tem como uma de suas funções a regulamentação do uso de corantes no país a Resolução CNNPA N° 44, DE 1977 tem relacionado as diversas classes de corantes com uso permitido em território nacional (ANVISA, 1977). Conforme o Decreto 55.871 de 26/03/65, art. 4º, corante é toda substância que confere ou intensifica a cor dos alimentos. E no art. 10, afirma que os corantes tolerados pelo presente decreto compreendem: corantes naturais e corantes artificiais.

Segundo a Legislação e classificação dos corantes de acordo com a Resolução - CNNPA nº 44, de 1977 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) os corantes são classificados como: Corante orgânico natural - aquele obtido a partir de vegetal, ou eventualmente, de animal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado. Corante orgânico sintético - aquele obtido por síntese orgânica mediante o emprego de processo tecnológico adequado. Corante artificial - é o corante orgânico sintético não encontrado em produtos naturais. Corante orgânico sintético idêntico ao natural - é o

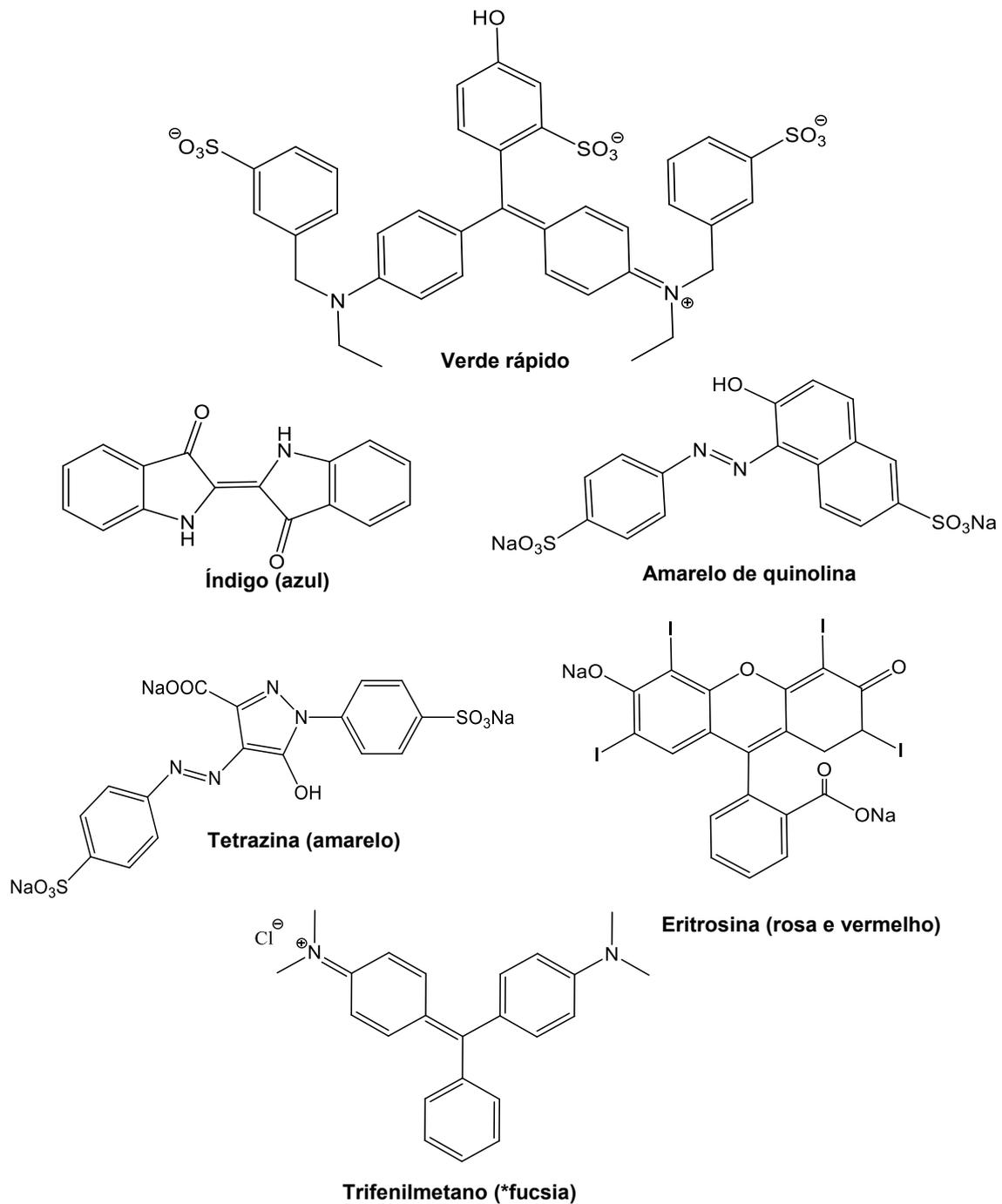
corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural. Corante inorgânico - aquele obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados a seu emprego em alimento (ANVISA, 1977).

3.2.CORANTES SINTÉTICOS

A importância dos corantes para a civilização humana é evidente e bem documentada (*Encyclopedia of Chemical Technology*, 1990). Os corantes sintéticos são extensivamente utilizados na indústria têxtil, gráfica, fotográfica e como aditivos em derivados de petróleo. Aproximadamente 10.000 diferentes corantes e pigmentos são usados industrialmente, o que representa um consumo anual de cerca de 7×10^5 ton no mundo (SPADARO et al., 1992; NIGAM; MARCHANT, 1995; NIGAM et al., 1996) e 26.500 ton somente no Brasil (GUARATINI; ZANONI, 2000).

Existem vários grupos cromóforos utilizados atualmente na síntese de corantes. No entanto, o grupo mais representativo e largamente empregado pertence à família dos corantes azos, que se caracterizam por apresentarem um ou mais grupamentos $-N=N$ ligados a sistemas aromáticos, eles representam cerca de 60 % dos corantes utilizados no mundo, sendo extensivamente utilizados no tingimento de fibras têxteis (VANDEVIVERE et al., 1999).

A partir de 1856 tivemos o surgimento dos corantes sintéticos que teve como pioneiro Willian Henry Perkin, que sintetizou a mauveína, também conhecida como anilina roxa (BERMOND, 2016). Nesse mesmo período os corantes começaram a ser utilizados de forma descontrolada como aditivos de alimentos em geleias, mostarda e ketchup, tanto na Europa quanto nos Estados Unidos e nenhum teste sobre toxicidade e efeitos adversos foi realizado, o que resultou em vários problemas de saúde (DOWHAM; COLLINS, 2000). Nos últimos anos mais de 90% dos corantes utilizados são sintéticos (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009). O índigo que dá cor ao jeans e foi sintetizado por Baeyer na Alemanha é um dos corantes mais amplamente utilizado desde sua descoberta no ano de 1880 até os dias atuais (PERKIN, 1896; MUNCHEN et al., 2015). A Figura 2 ilustra a estrutura química de alguns corantes sintéticos.

Figura 2 - Estruturas químicas de corantes sintéticos.

Fonte: autores.

Desde então as pesquisas de corantes artificiais foram aumentando com o passar dos anos, assim como sua produção, fazendo com que o uso de corantes naturais tivesse uma grande queda (HOLME, 2006; MOHAMMD et al., 2013).

O Comitê Científico Internacional da JECFA (*Join Expert Comminittee on Food Additives*) é uma Instituição não governamental que traz informações sobre alguns corantes sintéticos. (PINTEA, 2007). Na Tabela 1 estão listados alguns corantes sintéticos que são utilizados no Brasil e na União Europeia.

Tabela 1 - Corantes Sintéticos Utilizados no Brasil e na União Europeia, de acordo com cada órgão institucional específico

Classificação	Corante	ANVISA	U.E
Triarilmetano	verde rápido (FCF)	sim	não
Trifenilmetano	verde S	não	sim
Azo	tartrazina	sim	sim
Quinophthalon	amarelo de quinolina	não	sim
Xanteno	eritrosina	sim	sim
Índigo	indigotina	sim	sim

Fonte: Adaptado de Mendonça, 2011.

Há uma preocupação científica e regulatória crescente e constante com a segurança de alguns aditivos em produtos disponibilizados ao consumidor, com isso são comuns os pedidos de reformulação da composição e da rotulagem dos produtos processados conforme podemos verificar consultando órgãos regulamentadores como ANVISA. Os corantes citados na Tabela 1 por exemplo ainda continuam liberados pela ANVISA conforme a RDC N° 239, DE 26 DE JULHO DE 2018 (ANVISA, 2016; ANVISA 2018).

Com o aumento da produção e uso dos corantes sintéticos, começaram a ter relatos de problemas ambientais como a baixa biodegradabilidade e problemas de saúde, como alergias, efeitos tóxicos como mutagenicidade e potencial carcinogênico (CARVALHO et al., 2014).

Assim, há um grande interesse mundial no desenvolvimento de processos para a produção de corantes de origem natural, devido aos sérios problemas de segurança de muitos corantes artificiais, o que vem de encontro com as vias biotecnológicas para sua obtenção.

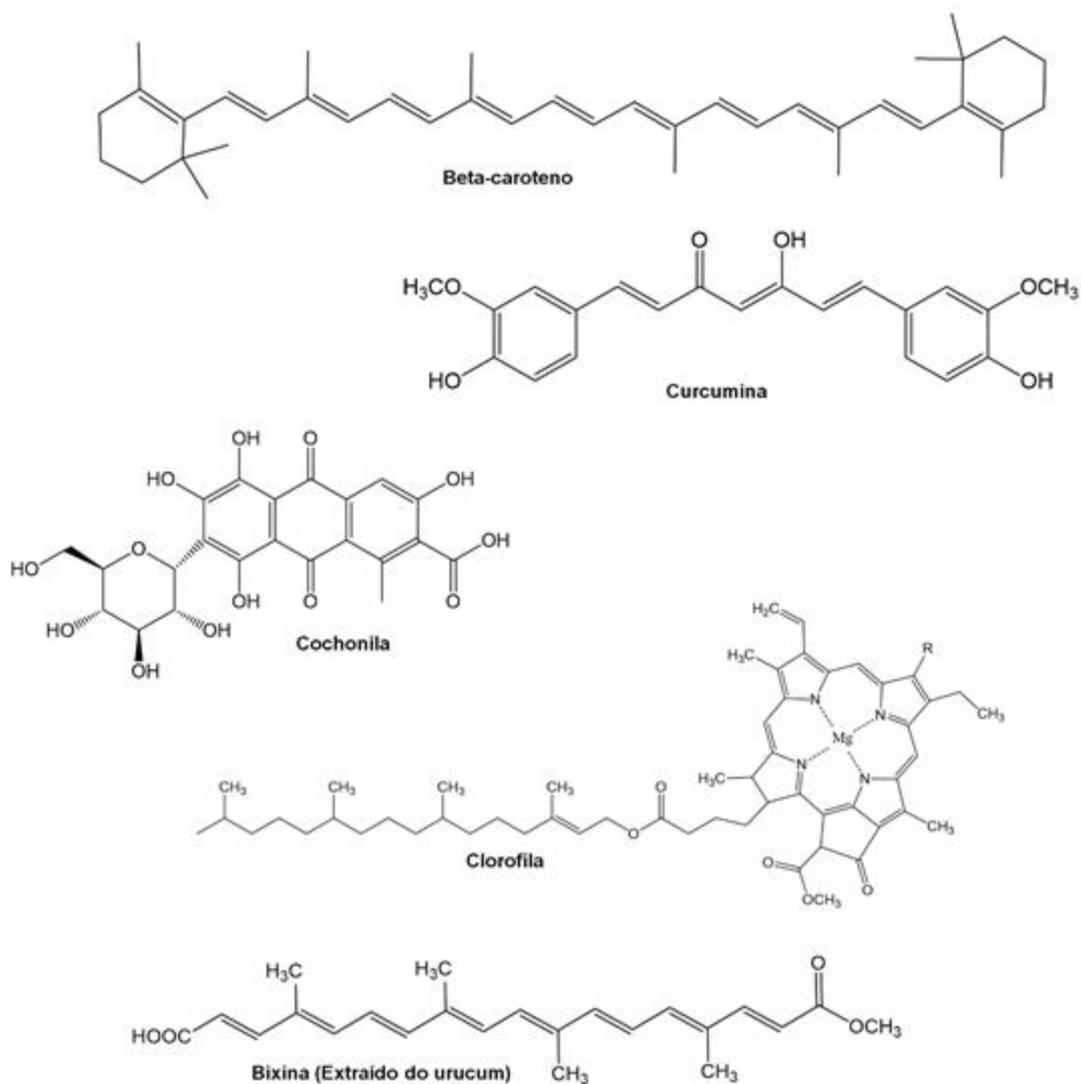
3.3.CORANTES NATURAIS

Corantes naturais no art.10, § 1º do Decreto 55.871 de 26/03/65, considera-se “Corante Natural” o pigmento ou corante inócuo extraído de substância vegetal ou animal. Os corantes

naturais podem ser obtidos de três fontes principais, dentre elas temos as plantas (folhas, flores e frutos), animais (insetos) e micro-organismos (fungos e bactérias) (MENDONÇA, 2011).

Pesquisas mostram que a indústria de corantes naturais tem apresentado um crescimento de 5-10% em relação aos 3-5% dos obtidos por via sintética (CRUZ FILHO; TEIXEIRA, 2013). Dentre os corantes naturais utilizados nas indústrias de alimentos, podemos citar o urucum, o vermelho carmim de cochonilha, a curcumina, as betalaínas as antocianinas (CONSTANT et al., 2002). Na Figura 3 podemos observar a estrutura química de alguns corantes naturais.

Figura 3 - Estruturas Químicas de corantes naturais.



Fonte: autores.

Podemos encontrar facilmente na natureza alguns corantes que são extraídos de planta e animais e estes se dividem em 5 classes principais, sendo elas: tetrapirrol, flavonoides, antraquinona, tetraterpeno ou caroteno e betaína. Alguns corantes naturais relacionados a cada classe estão listados na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2 - Principais corantes naturais extraídos de plantas e animais.

Classe	Corante	Cor	Fontes de obtenção
Tetrapirrol	Clorofila	Verde	Folhas
Flavonóides	Luteolina	Amarelo	Frutas folhas e vegetais
	Cianidina	Vermelho	Frutas, cereja, morango, açaí
Antraquinona	Ácido Camínco	Vermelho	Inseto: Cochonilha
Tetraterpeno ou caroteno	β -caroteno	Amarelo	Cenoura
	Astaxantina	Vermelho	Microalgas, salmão, camarão
Betaína	Betanina	Vermelho	Beterraba

Fonte: Adaptado de Mendonça, 2011.

3.4. CORANTES PRODUZIDOS POR MICRORGANISMOS

Os corantes naturais podem ser obtidos por três fontes principais, dentre elas as plantas os quais podem ser extraídos de folhas, flores ou frutos, de animais onde podemos citar os insetos e de microrganismos que compreendem os fungos e as bactérias (MENDONÇA, 2011).

Uma alternativa para a diminuição de aplicação de corantes sintéticos é o uso de microrganismos na produção de corantes que apresenta entre suas vantagens a utilização de substrato de baixo custo ou até mesmo resíduos industriais (VALDUGA et al., 2009).

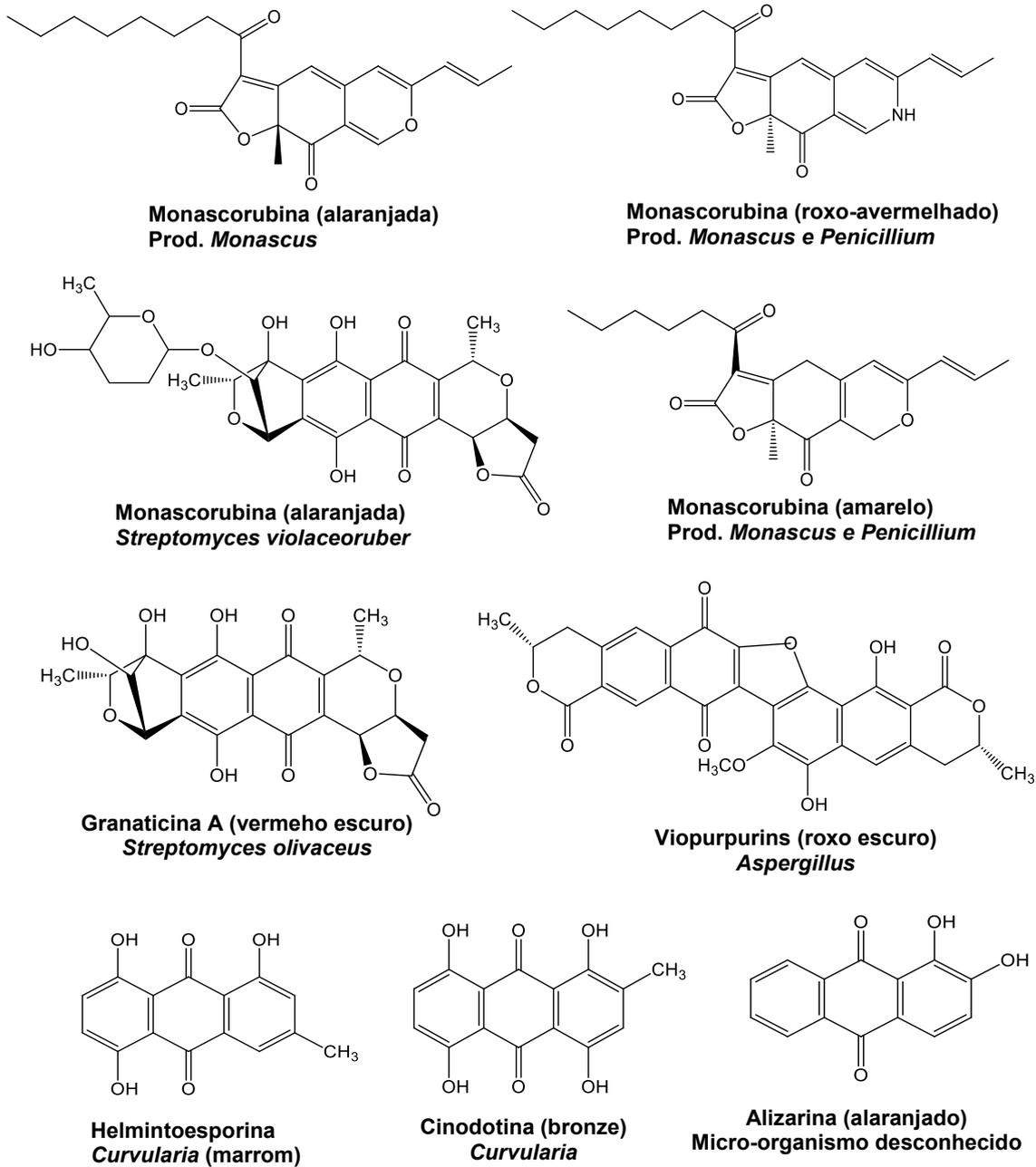
Corantes produzidos por microrganismos já vem sendo comercializados, dentre os quais podemos citar o β -caroteno da classe dos carotenoides, a riboflavina da classe das flavinas e os corantes produzidos pelo fungo do gênero *Monascus* que produz os corantes ankaflavina e monascina de coloração amarela, a monascorubrina e rubropunctatina de coloração alaranjada e a ruropunctamina de coloração roxa avermelhado (MAPARI et al., 2009).

Podemos encontrar duas grandes classes principais de corantes obtidos por microrganismos, os policetídeos e carotenoides. Os corantes policetídeos podem formar compostos policarbonílicos, sendo por sua vez responsáveis pela geração de compostos aromáticos, típicos de metabólitos secundários de micro-organismos (MAPARI et al., 2009).

Dentre os policetídeos podemos citar as antraquinonas, as hidroxiantraquinonas, as nafitoquinonas e as azaphilones (MAPARI et al., 2010).

Os carotenóides são um grande grupo de pigmentos presentes na natureza, com mais de 600 estruturas caracterizadas, eles podem ser encontrados em organismos fotossintetizantes e não fotossintetizantes, plantas superiores, algas, fungos, bactérias e em alguns animais. A presença desses corantes determina cores do amarelo ao vermelho em frutas, flores, fungos e vegetais e são inseridos no mercado em suplementos nutricionais e no setor alimentício. Esse grupo apresenta quarenta átomos de carbono e tem uma estrutura química de tetraterpenoide. Sua grande variedade de estruturas moleculares se dá pelo fato de poder sofrer diversas reações como por exemplo: alongamento de cadeia, isomerização, migração de duplas ligações, hidrogenação, desidrogenação, ciclização, entre outros. Os carotenoides podem ser divididos em duas classes: carotenos e xantofilas. Dentre os carotenoides mais comuns encontrados em alimentos podemos citar: α -carotenos, β -carotenos, a β -criptoxantina, o licopeno, a zeaxantina e a luteína. Na Figura 4 podemos observar a estrutura de alguns corantes naturais produzidos por microrganismo.

Figura 4- Estruturas químicas de alguns corantes naturais produzidos por microrganismos.



Fonte: Adaptado de Mendonça, 2011.

3.5. CORANTE PRODUZIDO POR *STREPTOMYCES*

Sabendo-se que os microrganismos são excelentes produtores de várias moléculas e muitas das quais são difíceis de serem produzidas sinteticamente, tem-se pensado na procura de locais onde os microrganismos ainda são pouco explorados, como por exemplo o ambiente marinho (CARVALHO; FERNANDES, 2010). Estes microrganismos, apresentam vantagens frente aos microrganismos terrestres, pois ocupam locais de temperaturas e pHs extremos, podendo desenvolver capacidades metabólicas a fornecer grande potencial para produzir compostos diferenciados, o que os torna altamente vantajosos (CARVALHO; FERNANDES, 2010).

Segundo Brakhage e colaboradores, 2011, microrganismos do gênero *Streptomyces* são responsáveis pela produção de grande parte dos mais de 23.000 metabólitos bioativos conhecidos, sendo que estes possuem diversas propriedades, dentre elas ação antifúngica, antiviral, antibacteriana, imunossupressora e citotóxica (MENDONÇA, 2011).

As actinobactérias são responsáveis por produzir 45% de todo metabólito secundário bioativo e deste 80% são produzidos por *Streptomyces* que equivale a mais de 6.000 compostos produzidos (MENDONÇA, 2011).

Podemos verificar diversos benefícios desses metabólitos podendo ser aplicados em fármacos, fragrâncias e aromatizantes, corantes ou pigmentos e agroquímicos (MENDONÇA, 2011).

O microrganismo *Streptomyces carpaticus* também é uma importante fonte de metabólitos secundários, incluindo a valinomicina e pigmentos/corantes de coloração escura em determinados meios de cultivo (PONTES et al., 2017). Além de crescer em diversos ambientes, com forma semelhante à forma dos fungos filamentosos, apresenta uma diferenciação morfológica que proporciona a formação de uma camada de hifas que podem diferenciar-se em uma cadeia de esporos. O estudo destes pigmentos/corantes torna-se importante, pois cada vez mais pesquisas são realizadas para obter novas fontes de corantes e pigmentos naturais. Essas pesquisas são motivadas pelo fato de alguns destes compostos, além de apresentarem a função de fornecerem cor a diversos alimentos e serem substitutos aos compostos de via sintética, podem apresentar inúmeros benefícios à saúde humana (RODRIGUEZ-AMAYA, 2016). A capacidade de produzir metabólitos secundários bioativos, com diversas funções, dentre elas antifúngicas, antivirais, antitumoral, anti-hipertensivos, imunossupressores e principalmente na produção de antibióticos, pode-se dizer que é a

propriedade mais interessante do gênero *Streptomyces* (OHNISHI et al., 2008). Na Tabela 3 podemos verificar alguns corantes e metabólitos produzidos por *Streptomyces*.

Tabela 3: Tipos de *Streptomyces*, colorações e outros metabólitos produzidos.

Tipo de <i>Streptomyces</i>	Coloração produzida	Metabólitos produzidos
<i>Caeruleautus</i>	Azul	**
<i>Carpaticus</i>	Verde	Vanilomicina
<i>Coleicolor</i>	Azul - pH básico	**
<i>Coleicolor</i>	Vermelho - pH ácido	**
<i>Griséus</i>	*	Streptomicina
<i>Hygroscopicus</i>	*	Geldamicina
<i>Hygroscopicus</i>	*	Nigericina
<i>Labendulae</i>	*	Streptotricina
<i>Lasaliensis</i>	*	Lasalocida
<i>Rishiriense</i>	*	Balmoralmicina
<i>Violaceolatus</i>	Roxa	**
<i>Violaceoruber</i>	Vermelho	Atividade antibiótica

* Coloração não identificada. ** Metabólitos não identificados.

Fonte: autores

3.6. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Os métodos espectroscópicos são ferramentas modernas utilizadas para identificação de estruturas moleculares. Na química orgânica, os métodos espectroscópicos servem principalmente para a elucidação e confirmação de estruturas moleculares, mas também para o acompanhamento de reações e controle de pureza. Dentre os métodos mais importantes para a química orgânica temos a ressonância magnética nuclear (RMN - ^1H e ^{13}C), a espectrometria de massas, as espectroscopias no infravermelho e no UV-Visível (PAVIA et al., 2015).

A seletividade e sensibilidade destes métodos são dependentes da concentração da amostra assim como da estrutura química e intensidade ou frequência de energia utilizada (GIL, 2007).

A radiação eletromagnética é uma forma de energia propagada em ondas, e pode ser dividida em regiões de comprimento de onda distinto. Também pode ser considerada como um fluxo de partículas denominadas fótons e cada um destes fótons contém determinada energia cuja magnitude é proporcional à frequência e inversamente proporcional ao comprimento de onda. O comprimento de onda é, normalmente, especificado em nanômetros, nm (10^{-9} m) (ANVISA, 2010). Na Tabela 4 podemos observar o intervalo de frequência da energia eletromagnética relacionada com a região de absorção.

Tabela 4 - Faixas de comprimento de onda de interesse para a espectrofotometria.

Região	Faixa de Comprimento de onda
Ultravioleta (UV)	190 – 380 nm
Visível (VIS)	380 – 780 nm
Infravermelho próximo (NIR)	780 – 2500 nm
Infravermelho médio (MIR)	4 – 25 mm
Infravermelho distante	25 – 300 mm

Fonte: ANVISA (2010).

3.6.1. ESPECTROMETRIA DE ABSORÇÃO NO UV-VIS

Medidas de absorção da radiação ultravioleta e visível têm ampla aplicação na determinação quantitativa de uma grande variedade de espécies inorgânicas e orgânicas. A espectrometria de absorção molecular está baseada na medida da transmitância T ou absorbância A de soluções contidas em células transparentes tendo um caminho óptico de b cm (ROCHA; TEIXEIRA, 2004).

A Espectrofotometria na região UV-VIS do espectro eletromagnético tem uma grande robustez, um custo relativamente baixo se comparado a outras técnicas e muitas aplicações, por isso é uma das técnicas analíticas mais empregada. Podem ser verificados diversos procedimentos envolvendo essa técnica, dentre eles: medidas diretas de espécies que absorvem radiação, medidas após derivação química e acoplamento a diversas técnicas ou processos, como cromatografia, eletroforese e análises em fluxo. Pode-se também utilizar a técnica como ferramenta para determinação de parâmetros, tais como constantes de equilíbrio e de velocidade de reações (ROCHA; TEIXEIRA, 2004).

A técnica vem sendo largamente utilizada para determinação de íons de metais de transição, compostos orgânicos e macromoléculas biológicas (ABADI et al., 2012). Pode-se observar na Tabela 5 alguns intervalos de comprimentos de onda com suas respectivas cores absorvidas e observadas.

Tabela 5 - Relação entre as cores absorvidas e suas cores observadas com os respectivos comprimentos de onda.

Intervalo de comprimento de onda (nm)	Cor absorvida	Cor complementar (observada)
380-435	Violeta	Amarelo-verde
435-480	Azul	Amarelo
480-490	Azul esverdeado	Laranja
490-500	Verde azulado	Vermelho
500-560	Verde	Roxo-vermelho
560-595	Amarelo-verde	Roxo
650-780	Vermelho	Azul esverdeado

Fonte: Skoog, 2015.

A técnica envolve medidas diretas de espécies que absorvem radiação no UV-visível assim como medidas após derivação química (ROCHA; TEIXEIRA, 2004).

Quando as moléculas absorvem energia ocorre a transição para um estado de maior energia ou excitado, esta passagem não é de natureza contínua, realizando-se, geralmente, em etapas que são chamadas de transições eletrônicas. Na região do ultravioleta e visível ocorrem transições eletrônicas em porções da molécula chamadas de cromóforos (ANVISA, 2010).

A espectrofotometria é fundamentada na Lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético (ROCHA; TEIXEIRA, 2004):

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I}$$

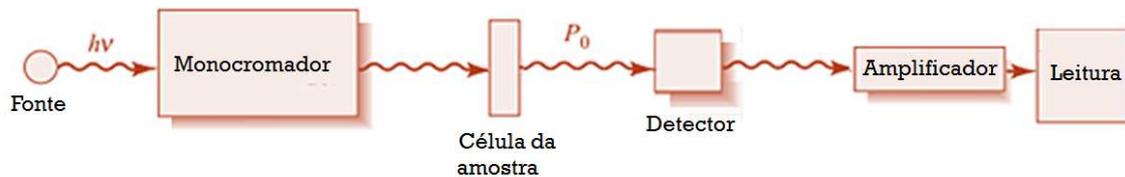
Onde:

I_0 = intensidade da radiação incidente

I = intensidade da radiação transmitida.

A instrumentação utilizada no ultravioleta (UV) e visível (Vis) são os espectrofotômetros (Figura 5), compostos essencialmente, de fonte de radiação; seletor de comprimento de onda; celas de absorção (cubetas), para inserção de soluções de amostras no feixe de luz monocromática; detector de radiação e uma unidade de leitura e processamento de sinal (ANVISA, 2010).

Figura 5 - Esquema de um espectrofotômetro



Fonte: Adaptado de Skoog, 2009.

A relação direta entre a concentração da substância e a quantidade de luz absorvida (Lei de Beer), é o princípio da análise espectrofotométrica quantitativa.

$$\text{Equação de Beer: } A = \epsilon b c$$

Onde:

A = absorbância

ϵ = absortividade molar ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

c = concentração (mol L^{-1})

b = caminho óptico (cm)

Sabendo que a transmitância (T) é o quociente entre a intensidade da radiação transmitida pela solução (I) e a intensidade da radiação incidente (I_0):

$$T = I / I_0$$

$$\log_{10} (I_0/I) = A = \epsilon.b.c$$

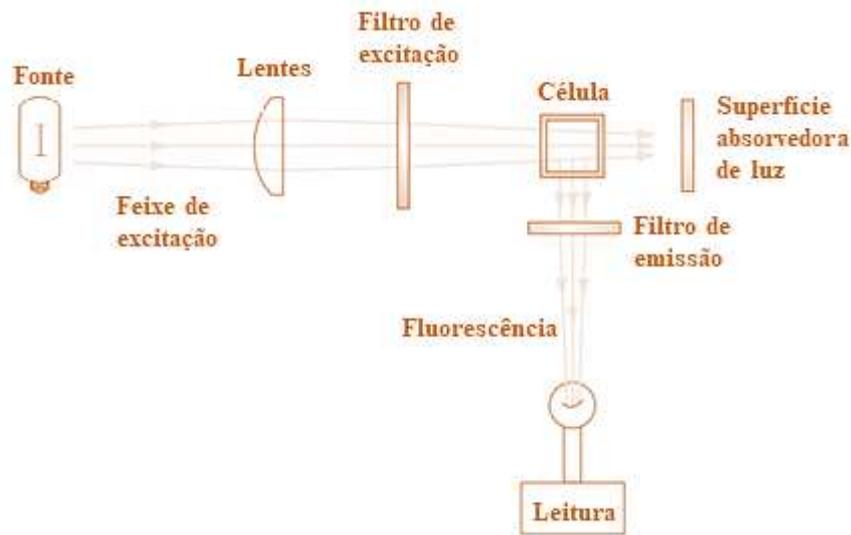
3.6.2. ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA

A luminescência é a emissão de luz de qualquer substância e ocorre a partir de estados eletronicamente excitados. É formalmente dividido em duas categorias, fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado (LAKOWICZ, 1999).

A espectrofluorimetria compreende a medida da fluorescência emitida quando estas substâncias (fluorescentes) são expostas à radiação ultravioleta, visível ou outras também de natureza eletromagnética. Essas radiações provocam a excitação dos elétrons da molécula para níveis energéticos mais elevados, por um curto espaço de tempo (10^{-8} a 10^{-4} segundos), e por isso os elétrons retornam ao estado fundamental através de um processo não radioativo, chamado desativação por colisão, juntamente com um processo radioativo chamado luminescência (fluorescência ou fosforescência), ou seja, ao retornarem ao estado menos energético ocorre a emissão de luz. O fundamento da espectrofluorescência consiste, pois, em excitar a substância com radiação no comprimento de onda de máxima absorção e medir comparativamente a intensidade da luz fluorescente emitida frente a um padrão (ANVISA, 2010).

Conforme pode ser observado na Figura 6, para medidas de fluorescência são necessários dois seletores de comprimento de onda para selecionar os valores de excitação e emissão. A radiação da fonte é selecionada e incidida na amostra, enquanto a radiação emitida é medida, normalmente em ângulo reto para evitar o espalhamento (SKOOG et al. 2006).

Figura 6 - Esquema geral de um espectrofluorímetro.



Fonte: Adaptado de Skoog, 2009.

A escolha do solvente ideal para utilizar no preparo de soluções fluorescentes exige planejamento, pois as características químicas e o pH são parâmetros que podem influenciar na intensidade e distribuição espectral da fluorescência. A experimentação em diferentes solventes é extremamente importante para determinar a propriedade fluorescente de uma substância, já que muitas substâncias que apresentam fluorescência em solventes orgânicos são praticamente não fluorescentes quando dissolvidas em água devido efeitos de solubilidade e/ou supressão de estados excitados (ANVISA, 2010).

Entre as vantagens da fluorimetria com relação à absorção no UV-VIS, pode-se destacar a sensibilidade (em média 100 vezes maior) e também a seletividade. Como desvantagem existe a limitação de aplicação da técnica já que existem moléculas que não apresentam fluorescência (ANVISA, 2010).

Técnicas analíticas baseadas na detecção de fluorescência são muito populares devido à alta sensibilidade e seletividade, assim como pelas vantagens do espaço e resolução temporal, e a possibilidade de sensoriamento remoto usando fibras ópticas. Quando um analito é fluorescente, a detecção fluorimétrica direta é possível por meio de um espectrofluorímetro operando em comprimentos de onda de excitação e absorção adequados (VALEUR; BERBERAN-SANTOS, 2012).

A espectroscopia de luminescência é uma ferramenta analítica bastante sensível e com ampla aplicação quando se trata da necessidade de baixos limites de detecção. Por isso são

facilmente encontrados na literatura trabalhos mostrando análises ao nível de traços, devido à alta sensibilidade quando comparada a outras metodologias, tais como a espectrofotometria UV-VIS. Isso ocorre por que nas medidas de absorvância o sinal está associado à atenuação da intensidade de um feixe de radiação por uma espécie absorvente, tornando difícil a detecção quando a quantidade de espécie na amostra é pequena, e isto não acontece na luminescência (SOTOMAYOR et al., 2008).

Aliado a todas essas vantagens, a técnica também possui instrumental simples e com baixo custo de manutenção e análise, quando comparado a outros métodos analíticos, por isso têm sido largamente utilizadas na análise de muitos compostos de interesse farmacêutico, biológico, ambiental e industrial (SOTOMAYOR et al., 2008).

3.6.3. A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Dentre as ferramentas analíticas de grande aplicabilidade podemos citar a cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High performance liquid Chromatography* - HPLC), que veio para melhorar a separação de misturas complexas de compostos polares e apolares, sendo bastante utilizada no estudo do perfil fitoquímico e na quantificação de substâncias ativas e/ ou marcadores químicos (CASS; CASSIANO, 2015).

A espectrometria de massas MS (do inglês *Mass Spectrometry*) também é uma técnica que se destaca devido a velocidade de aquisição de dados, análise em uma ampla faixa de concentração, sua capacidade quantitativa e qualitativa de análise, além de ter a capacidade de interfaceamento com outras técnicas. Quando se opta por análises de MS, espera-se fazer a medida da massa de íons que são oriundos de analitos em fase gasosa e que são determinados com uma relação de massa-carga (m/z) conseguindo assim fazer a identificação de compostos, aliado aos experimentos de MS/MS (HAGE; TWEED, 1997; JINNO, 1997; HOUSTON; BANKS, 1997). Através dessa técnica também é possível fazer a determinação da massa molecular do composto, determinação da composição elementar e da composição isotópica dos elementos fornecendo informações estruturais quando realizados experimentos de fragmentação (MS/MS) (HODGSON et al., 2005; MOADDEL et al., 2002; KAMIMORE; KONISHI, 2001). Com o desenvolvimento das técnicas de LC-MS tornou-se possível obter informações a respeito das amostras com seletividade e com uma maior rapidez nas análises. Fazer a análise de compostos com retenção cromatográfica idêntica ou similar, além de obter

uma sensibilidade elevada desta técnica, permitindo a detecção de compostos com concentrações baixas, na ordem de pico/fentogramas (MOADDEL et al., 2002; KAMIMORE; KONISHI, 2001). Com o desenvolvimento de interfaces de fonte de ionização à pressão atmosférica, o acoplamento LC-MS ampliou a aplicabilidade dessa técnica nas diversas áreas da química, bioquímica, farmacêutica, alimentícia, petroquímica, dentre outras, fazendo com que essa ferramenta analítica se tornasse insubstituível na determinação e quantificação de diversas moléculas.

3.6.4. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR - RMN

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica espectroscópica fundamental na determinação e caracterização estrutural de moléculas orgânicas. De maneira geral, através da RMN pode-se inferir o tamanho e composição da cadeia carbônica bem como os substituintes presentes em uma molécula, permitindo a proposição da estrutura molecular. O preparo das amostras para análises por RMN em solução requer a sua solubilização em solventes orgânicos deuterados tais como: clorofórmio, metanol, dimetilsulfóxido, acetona, benzeno e/ou piridina. A técnica permite obter espectros uni e bi-dimensionais, tais como: ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F , HSQC, HMBC, COSY entre outros. As informações obtidas pelas diferentes técnicas de RMN são de grande utilidade para a elucidação estrutural de compostos orgânicos.

3.6.5. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO – IR

A Espectroscopia no Infravermelho é especialmente útil para se detectar a presença de alguns “grupos funcionais” na molécula, pois cada grupo apresenta uma absorção forte em uma determinada banda, como é o caso da carbonila C=O, que apresenta uma absorção forte em torno de 1700 cm^{-1} , seja de aldeído, cetona, éster, lactona, ácido carboxílico, etc. (CONSTANTINO, 2008).

A região espectral do infravermelho compreende radiação com números de onda no intervalo de 12.800 a 10 cm^{-1} e comprimentos de onda de $0,78$ a $1.000\text{ }\mu\text{m}$. Do ponto de vista da aplicação como da instrumentação, o espectro de infravermelho é dividido em radiação no infravermelho próximo, médio e distante. Na Tabela 6 podemos observar as diferentes regiões

espectrais do infravermelho e seus respectivos intervalos de comprimento de onda (SKOOG, et al. 2015).

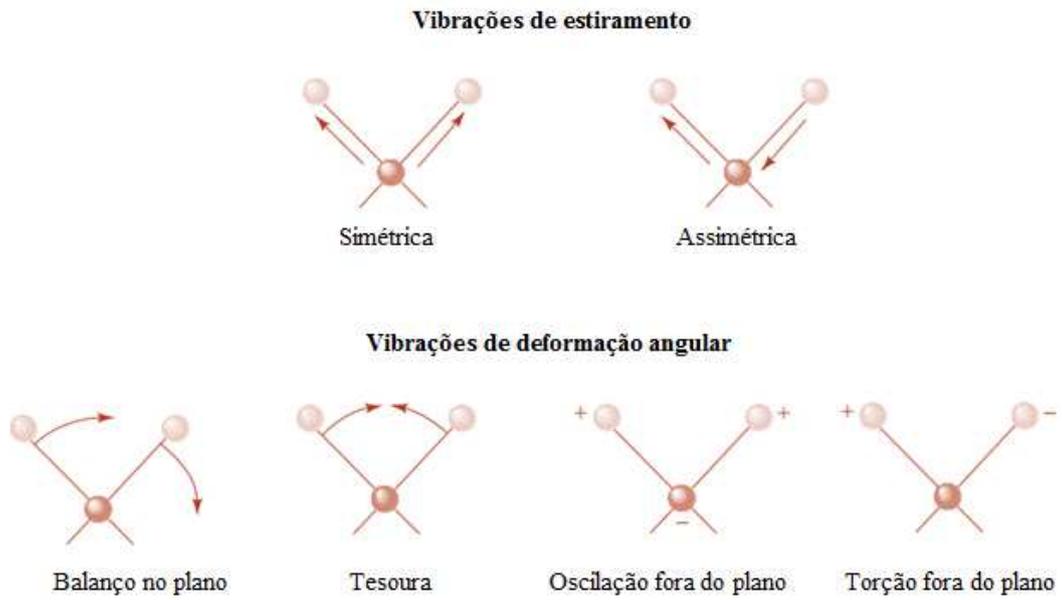
Tabela 6 - Regiões Espectrais do Infravermelho.

Região	Intervalo de comprimento de onda (λ) μm
Próximo	0,78 a 2,5
Médio	2,5 a 50
Distante	0 a 1.000
Mais usada	2,5 a 15

Fonte: Constantino, 2008

Para absorver radiação infravermelha, uma molécula precisa sofrer uma variação no momento de dipolo como consequência do movimento vibracional ou rotacional. As posições relativas dos átomos em uma molécula não estão fixadas exatamente, elas variam continuamente devido a inúmeros tipos de vibrações e rotações em torno das ligações moleculares. As vibrações podem ser classificadas como estiramentos ou deformações angulares. Uma vibração de estiramento envolve uma variação contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos. As vibrações de deformação angular são caracterizadas pela variação do ângulo entre duas ligações e são de quatro tipos: tesoura, balanço, sacudida e torção (SKOOG, et al. 2015). Na Figura 7 podemos observar os tipos de vibrações moleculares.

Figura 7 - Tipos de vibrações moleculares consideradas na espectroscopia de infravermelho.



Fonte: Adaptado de Skoog, 2009.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. REAGENTES E MATERIAIS

- Todos os solventes utilizados foram de alta pureza com grau analítico P.A e HPLC: dimetilsulfóxido (J.T.Baker); acetonitrila (J.T.Baker), acetona (J.T.Baker), n- hexano (J.T.Baker), acetato de etila (J.T.Baker), etanol (Merck), metanol (Merck), e dimetilsulfóxido deuterado (Sigma Aldrich).
- Microtubo Shigemi (5 mm, d.i), para experimentos de RMN.
- Sílica gel 60 (0,063-0,200mm) (Merck).
- Cartucho de Extração SPE – DSC-18 (Supelco).
- Cubetas espectrofotométrica de quartzo com comprimento óptico de 1,0 cm.
- Cromatoplaça de alumínio recobertas com sílica gel 60 GF 254 (CCD) (Merck).
- Coluna Express C8 2.7 μm (10 cm x 3.0 mm) (Ascentis).
- Coluna Luna 5 $\mu\text{C}18$ (250x4.6mm) (Phenomenex).
- Gel de Dextrana, Sephadex LH-20 (Sigma).
- Água deionizada (Sistema Millipore Milli-Q).
- Ácido 3-5-dinitrosalicílico (DNS) (Merck).
- Tartarato de sódio e potássio (Merck).
- Solução 2M de NaOH (J.T.Baker).
- Solução de HCl (J.T.Baker).

4.2. EQUIPAMENTOS

- Espectrofotômetro UV-Vis - GE Ultrospec 7000.
- Espectrofluorímetro Fluorolog - SPEX DM-302.
- pH metro - Marte MB-10.
- Centrífuga - Eppendorf 5804R
- Câmara escura – CN 15 LC 254 nm.
- Coletor de frações - BioRad 2110
- Espectrômetro de Infravermelho - Shimadzu IR Prestige – 21.
- Concentrador a vácuo – Eppendorf Concentrator Plus/Vacufuge Plus.
- Centrífuga para microtubos - Eppendorf Minispin

- Vórtex - Visatom 772.
- Liofilizador - Labconco Lyph Lock 4.5.
- Espectrômetro RMN - Bruker DPX300 e DRX500.
- HPLC - Shimadzu Nexera XR.
- Espectrômetro de massas – Bruker Ion Trap (ESI) - Amazon Speed.

4.3. MÉTODOS OU PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.3.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NO UV-VIS

As medidas espectroscópicas foram realizadas utilizando cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e espectrofotômetro UV-VIS (modelo Utrospec 7000). Os dados espectrais foram registrados na faixa de 300-600 nm, com resolução de 1 nm e processados utilizando o programa Origin Pro8.

O preparo de cada solução foi feito adicionando-se 50 µL do corante bruto em 1950 µL de diferentes solventes (MeOH, EtOH e DMSO), em cubeta de quartzo, para obtenção de diluição da amostra de 40 vezes. Foi feita uma varredura de 300 a 600 nm para aquisição dos espectros de absorção do composto em cada ambiente químico de estudo.

Para o estudo de variação de pH do corante verde foram preparadas amostras em diversos pHs adicionando HCl 10% (v/v) para amostras ácidas, soluções de concentrações variadas de KOH para amostras básicas e água Milli-Q para amostras próximas da neutralidade. As amostras com pHs de 4,0, 6,0, 9,0, 8,0, 10,0 e 13,0, foram analisadas no espectrofotômetro UV-Vis por varredura de 300 a 600 nm para aquisição dos espectros de absorção.

4.3.2. ESPECTROSCOPIA DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA

As medidas de fluorescência foram realizada no Espectrofluorímetro Fluorolog - SPEX DM-302. O preparo de cada solução foi feito adicionando-se 50 µL do corante bruto em 1950 µL de cada um dos solventes, em cubeta de quartzo de 1,0 cm sem face polida, específica para espectrofluorimetria. Obteve-se uma diluição da amostra de 40 vezes e os espectros de emissão foram coletados na região de 300 a 400 nm, com excitação fixa em 270 e 440 nm.

4.3.3. LIOFILIZAÇÃO

O processo de liofilização da amostra foi feito no Liofilizador Labconco (Lymph Lock 4.5). Um volume de 25 mL do corante (bruto) foi dividido em 5 alíquotas de 5 mL em tubo do tipo Falcon, as amostras foram inicialmente congeladas em freezer a -21°C por 20 minutos, depois foram colocadas em freezer -80°C por 30 minutos. Esse procedimento foi realizado para que o congelamento da amostra acontecesse de forma gradativa com o intuito de preservar a mesma, visto que não se tem informações sobre sua estabilidade. Foram necessárias 30 horas para que o processo de liofilização se completasse.

4.3.4. ANÁLISE DE RMN

As análises de RMN foram realizadas no Departamento de Química da FFCLRP-USP-Ribeirão Preto/SP, no espectrômetro BRUKER (R) - Modelo DRX500 - *Ultra Shield* (R) com magneto de 11,74 T e sonda multinuclear de detecção inversa (^1H : 500,13 MHz e ^{13}C : 125,77 MHz), utilizando tubos de 5,0 mm de diâmetro, com sistema de "lock" de deutério e bobina geradora de gradiente de campo em z (campo máximo de $53,5 \text{ Gauss.cm}^{-1}$).

Para o preparo das amostras utilizou-se aproximadamente 10 mg do corante liofilizado e 5 mg do corante purificado dissolvidos em $\text{MeOH-}d_4$ em um microtubo (5 mm, d.i.; Sigma-Aldrich.) para experimentos de RMN de ^1H .

4.3.5. ANÁLISE DE INFRAVERMELHO

Na metodologia utilizada na análise por espectroscopia na região do infravermelho, os espectros foram realizados em espectrofotômetro Perkin-Elmer FT-IR *Spectrum Two instrument*, de responsabilidade do Prof. Dr. Luíz Alberto Beraldo de Moraes no Departamento de Química – FFCLRP-USP, Ribeirão Preto/SP. Preparou-se a amostra utilizando fase sólida, a qual foi triturada e misturada com KBr anidro em um almofariz com pistilo que, após a prensagem formou uma pastilha translúcida. Para a análise, cerca de 7 a 30 varreduras foram realizadas na faixa de $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$.

4.3.6. CROMATOGRAFIA EM COLUNA

Para cromatografia líquida em coluna (80 cm x 250 mm) empregou-se como fase estacionária Sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm- Merck). O fracionamento foi realizado em um gradiente crescente de polaridade, utilizando como fase móvel hexano e acetato de etila. As frações foram coletadas e observadas em câmara escura no comprimento de onda de 254 nm em cubeta de quartzo de 1,0 cm.

Para cromatografia líquida em coluna (60 cm x 400 mm) empregou-se como fase estacionária gel de dextrana (Sephadex LH-20), e como fase móvel metanol 100%. As frações foram coletadas e analisadas em comprimento de onda de 450 nm em leitora de microplaca marca Labtec (LT4000MS).

4.3.7. EXTRAÇÃO DO CORANTE

A extração do corante verde foi realizada pelo método de extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction – SPE*) com fase estacionária C18 (*Chromabond*). O cartucho de extração foi inicialmente ativado com 3 mL de metanol, em seguida foi acondicionado com 3 mL de água e só então foi aplicado 1,0 mL de amostra de corante verde bruto. Foi possível observar inicialmente a retenção da coloração, em seguida o cartucho foi lavado 3 vezes com 200 µL de água para retirada de impurezas e o material foi extraído com 200 µL de metanol.

Foi realizada também a extração do tipo líquido-líquido utilizando, hexano e acetato de etila como solventes extratores.

4.3.8. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – HPLC

Os testes foram iniciados utilizando o cromatógrafo Shimadzu-Prominance com duas bombas Shimadzu LC 20 AD, sendo que uma delas foi acoplada a uma válvula seletora de solvente SHIMADZU FCV-20AL para gradiente de baixa pressão. Um detector de arranjo de diodo com comprimento de onda variável Shimadzu SPD-M 20A, e auto injetor Shimadzu SIL-20A compõem o sistema. O equipamento também está acoplado a uma interface Shimadzu CBM – 20A, e os cromatogramas foram registrados através do *software LC solution*. A separação foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa C18 (Luna Phenomenex; 250 x 4,6 mm x 5 µm) e fase móvel água (A) e acetonitrila (B) em modo gradiente de eluição de 10 a

90 % de (B) em 40 minutos, com vazão de 0,4 mL/min e volume de injeção 10 µL do corante purificado. O comprimento de onda empregado foi de 450 nm.

As análises LC-MS foram realizadas no cromatógrafo Shimadzu Nexera XR composto por duas bombas LC-20ADXR, um injetor automático SIL 20A, um degaseificador DGU-20A, um forno CTO-20A, interligados através de uma controladora CBM-20A. Esse sistema foi acoplado a um Espectrômetro de Massas Amazon Speed Ion Trap Bruker equipado com uma fonte de ionização do tipo Electro-Spray (ESI). Os espectros foram registrados através do software Hystar e TrapControl. A separação foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa C18 conforme descrição e condições descritas nas utilizadas acima. Os parâmetros ESI consistiram em: voltagem do capilar 4500 volts; end plate offset 500 volts; pressão do gás de nebulização (N₂) 45 psi; vazão do gás de secagem (N₂) 9,0 L/min; temperatura da fonte de ionização 300 °C. As análises foram realizadas em modos *full scan*, e de ionização positiva na faixa de 100 a 1500 *m/z*. Todos os dados foram coletados e analisados no programa Bruker Daltonics Data Analysis.

4.3.9. ANÁLISE DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As análises foram realizadas por infusão direta (3 µL/min) do corante purificado no Espectrômetro de Massas *Amazon Speed Ion Trap* Bruker equipado com uma fonte de ionização do tipo *Electro-Spray* (ESI). Os parâmetros ESI consistiram em: voltagem do capilar 4500 volts; end plate offset 500 volts; pressão do gás de nebulização (N₂) 10 psi; vazão do gás de secagem (N₂) 4,0 L/min; temperatura da fonte de ionização 240 °C. As análises foram realizadas em modos *full scan* e de ionização positiva na faixa de 100 a 1000 *m/z*. Todos os dados foram coletados e analisados no programa Bruker Daltonics Data Analysis.

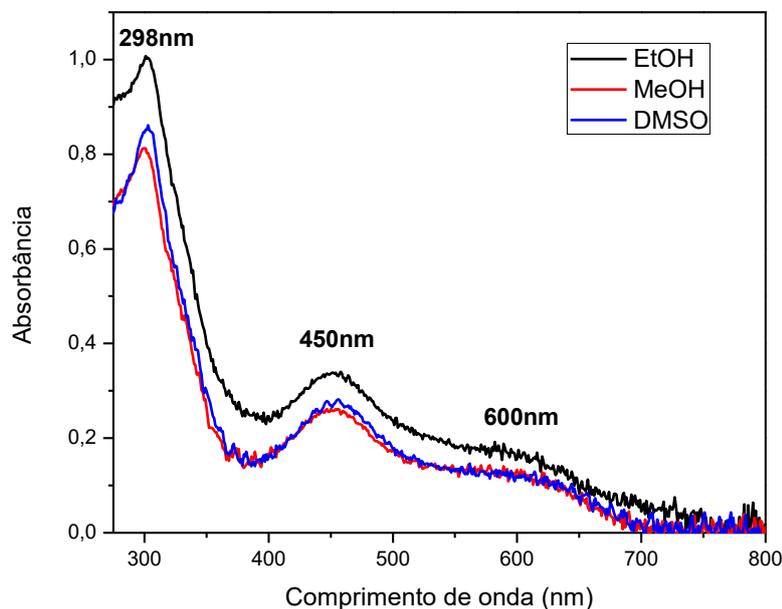
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERÍSTICAS DO CORANTE VERDE DE *STREPTOMYCES CARPATICUS*

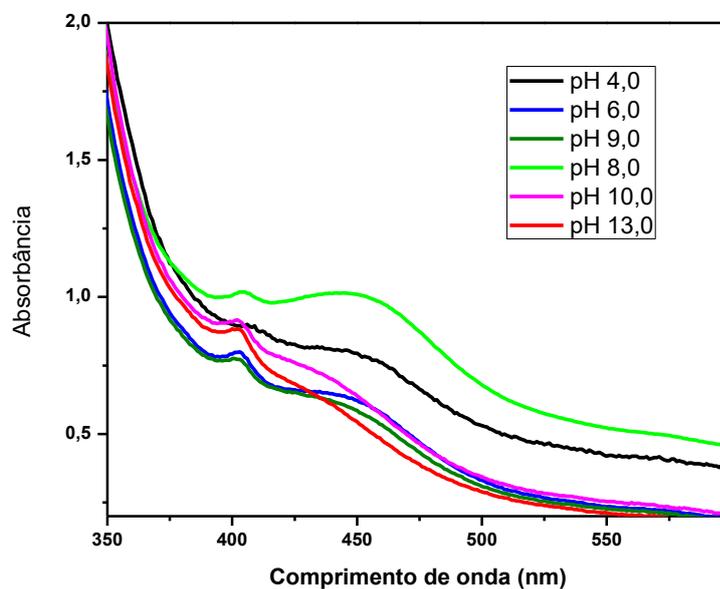
Foram conduzidos os estudos utilizando-se a técnica de espectroscopia eletrônica UV-visível com três solventes para a preparação da amostra de Corante Verde, o dimetilsulfóxido (DMSO), o metanol (MeOH) e o etanol (EtOH). A Figura 8 apresenta o espectro eletrônico UV-vis do corante em diferentes solventes orgânicos.

Foi possível observar uma banda de transição eletrônica na região do visível de 400 – 500 nm, com absorvância máxima em 450nm (λ máximo). Também observamos outra banda, porém de menor intensidade, na região de 550 – 650 nm com absorvância maior em 600 nm. Pode-se ter, por meio desta análise, a evidência da ocorrência de duas transições intramoleculares diferentes, ocorrendo em partes diferentes da molécula. As transições referentes a região do visível podem ser atribuídas a transferência de elétrons entre os orbitais $\pi \rightarrow \pi^*$ (AMRALLAH et al., 2007). A banda de absorvância que aparece na região do ultravioleta, de maior intensidade, um pouco acima de 300 nm, pode ser atribuído a transição eletrônica de um orbital não ligante para um π^* ($n \rightarrow \pi^*$), características de moléculas com compostos carbonílicos (CONSTANTINO, 2008).

Fazendo uma análise do espectro eletrônico em relação a interação com solvente, observa-se que o corante apresentou um perfil semelhante em todos os sistemas (Figura 8).

Figura 8 - Espectro eletrônico no UV-vis do corante em diferentes solventes orgânicos.

Foram realizados ensaios exploratórios para verificar a influência do pH nos estudos espectroscópicos, sendo que a preparação das amostras foram feitas utilizando diversas concentrações de ácido e base, de forma a se utilizar o mesmo volume com o intuito de manter a mesma diluição. Na Figura 9 podemos observar o espectro de absorção para amostras com variação de pH na faixa de 4,0 a 13,0 na região de 350 a 600 nm. Podemos observar que o espectro do corante apresentou um perfil semelhante nos diversos valores de pH analisados, comparando-se ao pH inicial de aproximadamente 8,0, o que é uma característica positiva e indicativa de estabilidade dentro dessa faixa, podendo aplicá-lo em diversas áreas, e processamentos visando utilização em produtos cosméticos, medicamentos e alimentos. Quando o corante é colocado em pH 4 percebe-se uma alteração no seu perfil de absorção, o que limita o uso de corante em materiais e processos que utilizem de pH 4 ou menor.

Figura 9 - Espectro de absorção em diferentes valores de pH.

Nas Figuras 10 e 11 podemos observar os espectros de fluorescência do corante verde com excitação em 270 e 440 nm em metanol, etanol e dimetil sulfóxido. As análises com excitação fixa em 270 nm (Figura 10), demonstraram uma emissão acentuada para o solvente DMSO diante dos demais solventes utilizados no estudo. Para as análises realizadas com excitação fixa em 440 nm (Figura 11), demonstraram um perfil de emissão de fluorescência diferenciado para o meio etanólico, com deslocamento do máximo de absorção para região do ultra-violeta. As análises de emissão demonstram que o corante possui bom perfil de emissão no UV-visível, sendo um interessante indicativo de utilização desta propriedade em aplicações futuras do composto em estudo.

Figura 10 - Espectro de emissão de fluorescência normalizado com excitação fixa em 270 nm em diferentes solventes orgânicos. Fendas de resolução espectral de 10 nm e 15 nm para excitação e emissão respectivamente.

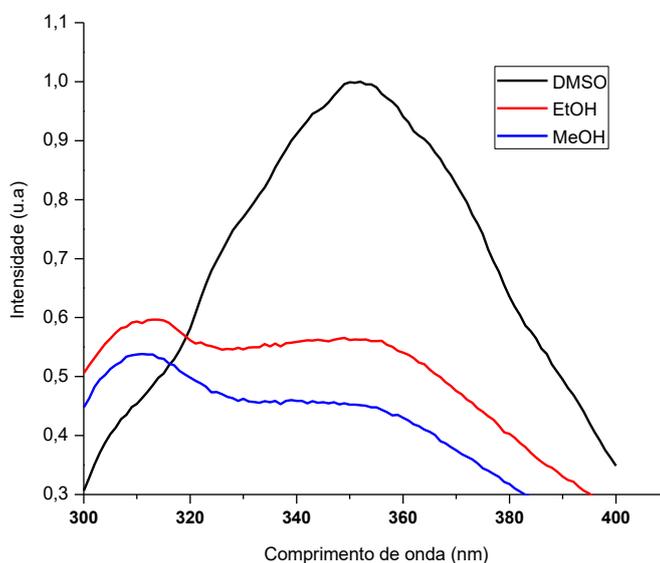
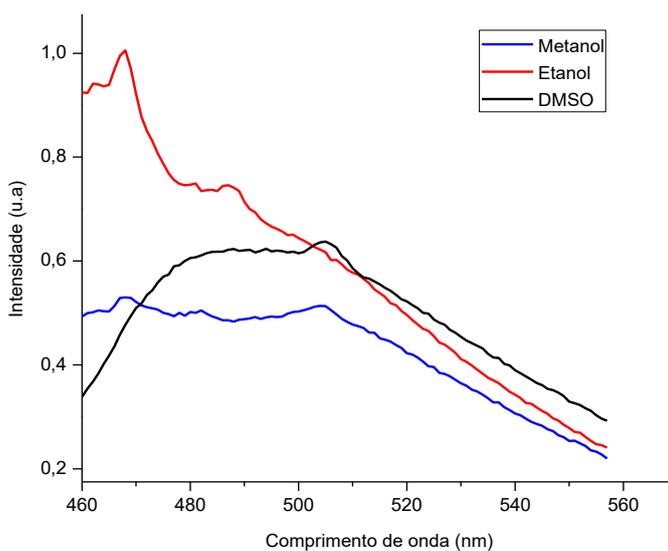


Figura 11 – Espectro de fluorescência normalizado com excitação fixa em 440 nm em diferentes solventes orgânicos. Fendas de resolução espectral de 10 nm e 15 nm para excitação e emissão respectivamente.



5.2. ANÁLISE DE INFRAVERMELHO

Foram realizadas análises de infravermelho uma vez que essa técnica auxilia na elucidação estrutural do corante biotecnológico identificando os principais grupos funcionais presentes na estrutura química do corante verde. As Figuras 12 e 13 apresentam os espectros do corante bruto (líquido e liofilizado) e purificado.

Figura 12 - Espectro de infravermelho obtido do corante líquido e liofilizado.

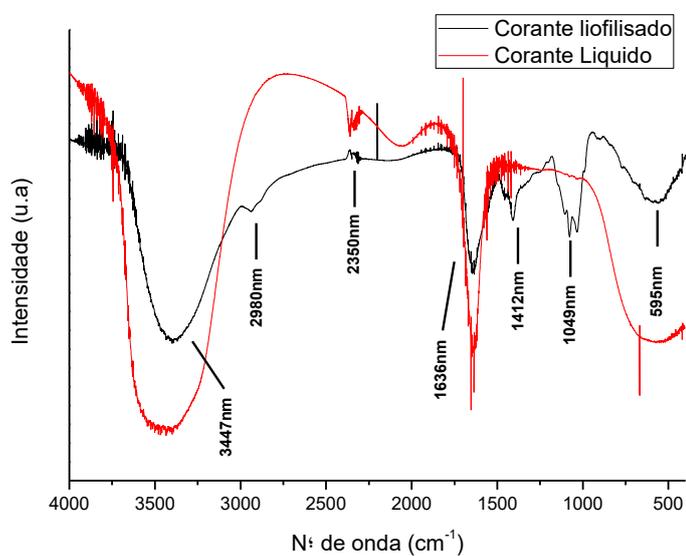
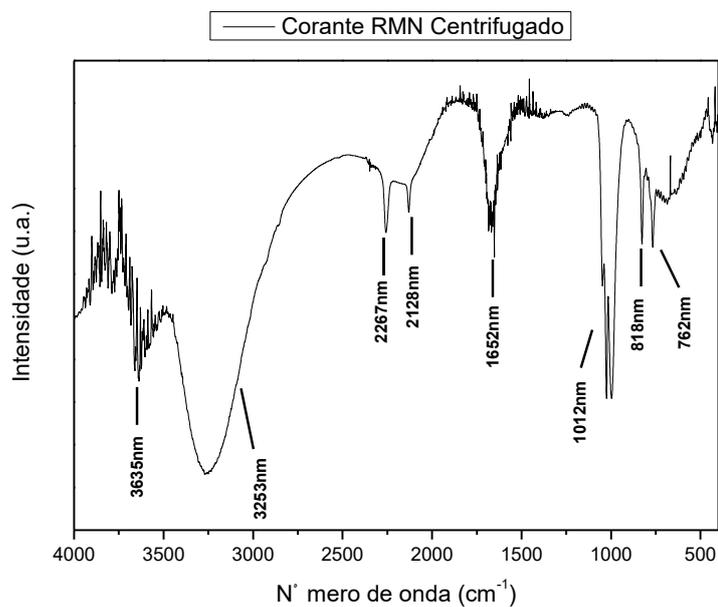


Figura 13 - Espectro de infravermelho obtido do corante purificado.



Comparando-se os dois espectros de infravermelho na Figura 12, é possível perceber uma mudança significativa no espectro da amostra liofilizada, com a diminuição do alargamento da banda em 3397 cm^{-1} , característica de estiramento O-H ou N-H. Pode-se atribuir essa mudança a diminuição da quantidade de água na amostra. Compostos com grande quantidade de água pode interagir entre si por meio de ligações de hidrogênio e influenciar no alargamento.

Ainda na Figura 12 notam-se bandas de estiramento característico da hidroxila na região de $\sim 3500\text{ cm}^{-1}$ que pode ser proveniente de um álcool, ácido carboxílico ou fenol. A banda de estiramento em 1637 cm^{-1} é atribuída a dupla ligação de alcenos que geralmente são observadas na região de $1780 - 1610\text{ cm}^{-1}$. Ainda com relação a banda em 1652 cm^{-1} , se encontra na região de 1700 cm^{-1} a 1600 cm^{-1} que é característica do estiramento do grupo carbonílico (C=O) que pode indicar a presença de ácido carboxílico, uma vez que possui banda de estiramento O-H. Em se tratando de um composto colorido, este grupo pode estar conjugado com duplas ligações. Pode-se observar o mesmo perfil acima citado no espectro do corante purificado (Figura 13). Além disso pode-se observar o estiramento em $\sim 1400\text{ cm}^{-1}$ que pode ser atribuído a metil cetona, acetal e a $\text{CH}_3 - \text{C}=\text{C}$. As bandas referentes a região de $2800 - 3000\text{ cm}^{-1}$ são atribuídos aos estiramentos C-H que podem ser referentes a $-\text{CH}_3$, $\text{CH}_3 - \text{CH}_2$ que ocorrem em ligação de hidrogênio e carbono, e são ligações simples (CONSTANTINO, 2008).

Com os resultados de espectroscopia vibracional na região do infravermelho, é possível ter evidências da presença de grupos funcionais da molécula orgânica em questão. Porém não é conclusiva. Para se ter uma melhor elucidção da molécula é necessário o uso de outras técnicas complementares, como por exemplo, a ressonância magnética nuclear que é uma ferramenta importantíssima para a elucidção estrutural, para nos dar informação de como os átomos estão ligados entre si.

5.3. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A análise do espectro de RMN H^1 (Figuras 14,15, 16 e 17) apresentam deslocamentos em 3,75 ppm o que evidencia a presença de glicose, assim como a Figura 18 apresenta sinais característicos de α -glicose (a) e β -glicose (b) (BUBB, 2003). A presença desses sinais interferiu diretamente na identificação de sinais referentes ao corante verde. Uma etapa de purificação foi definida na tentativa de se retirar a glicose e outros possíveis interferentes do meio.

Figura 14 - Espectro de RMN de análise de ^1H do corante verde liofilizado, dissolvido em $\text{MeOH-}d_4$, frequência 5MHz.

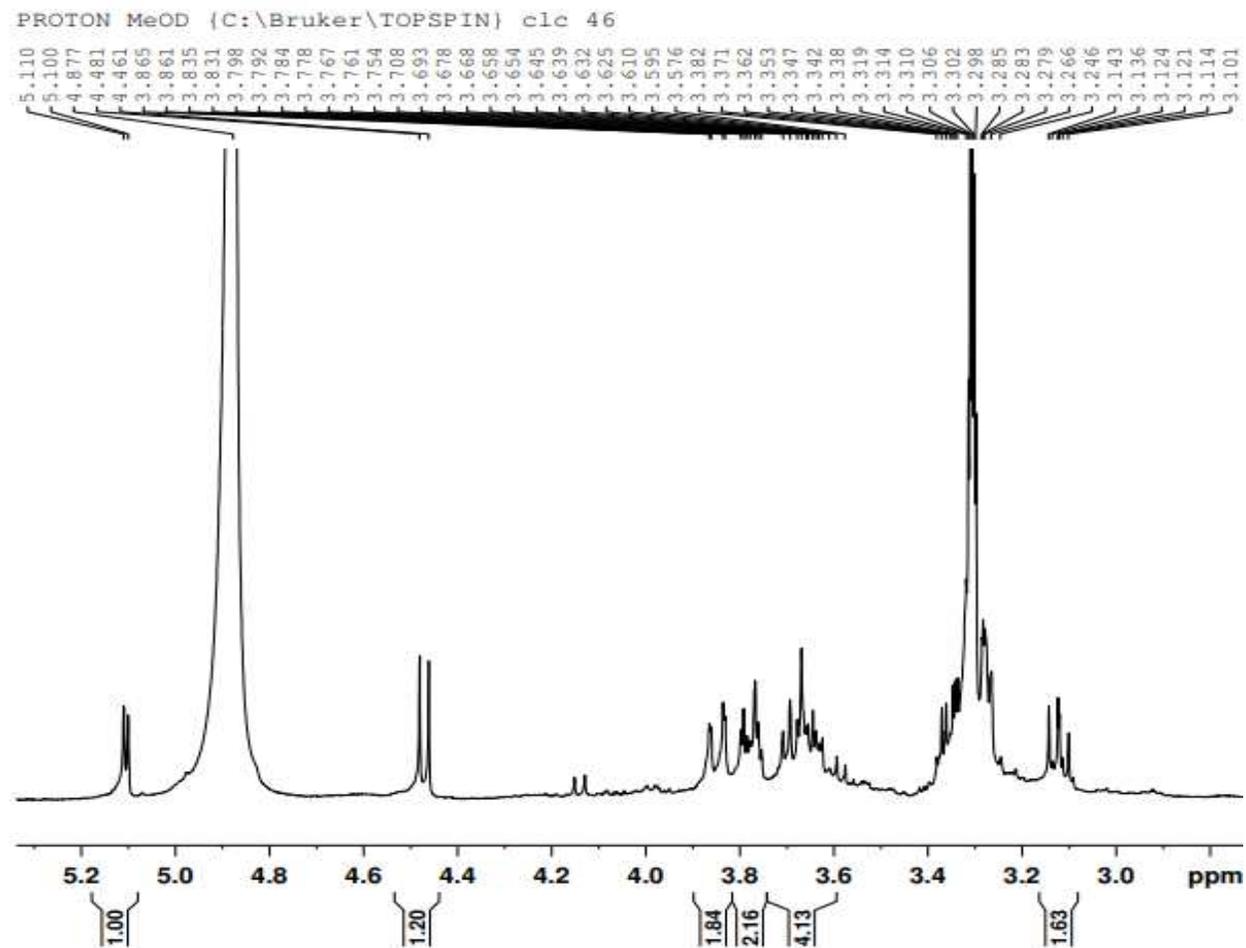


Figura 15 - Espectro de RMN de análise de ^1H do corante verde liofilizado, dissolvido em $\text{MeOH-}d_4$, frequência 5MHz.

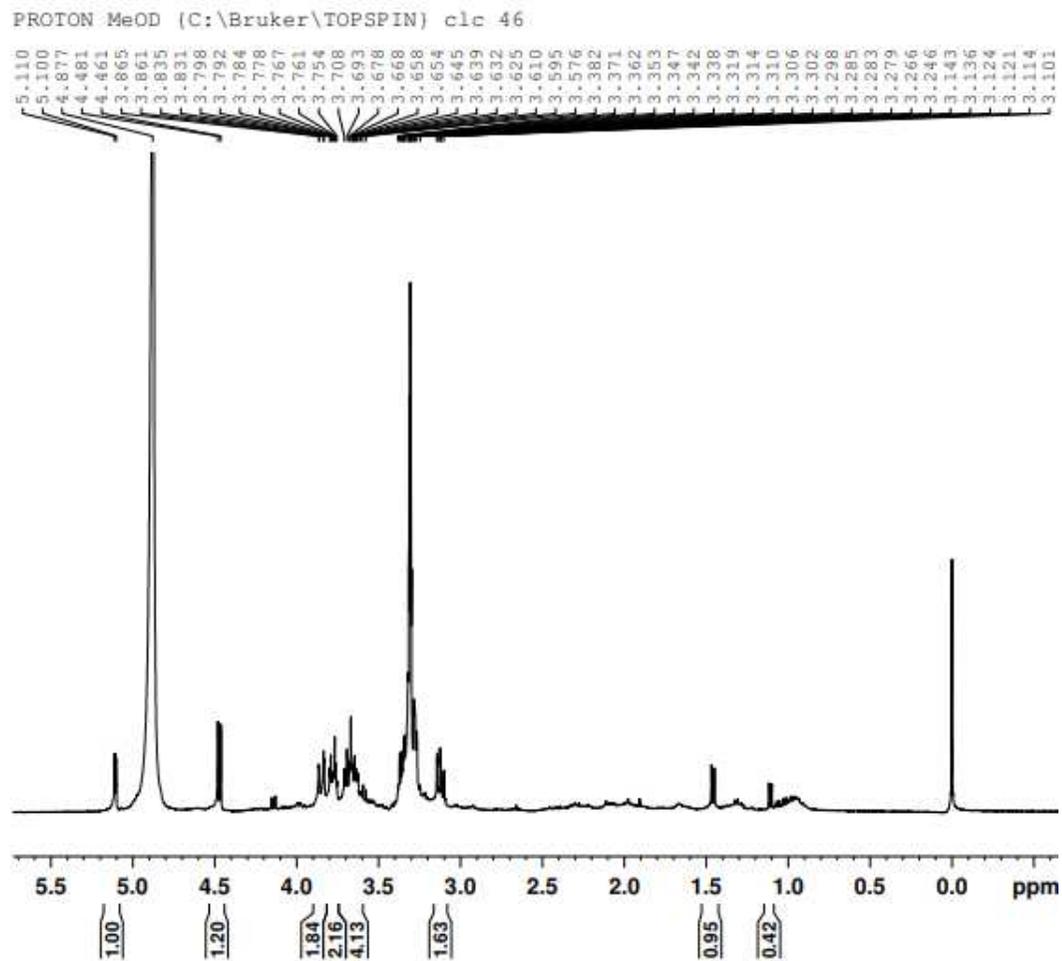


Figura 16 - Espectro de RMN de análise de ^{13}C do corante verde liofilizado, dissolvido em $\text{MeOH-}d_4$, frequência 5MHz.

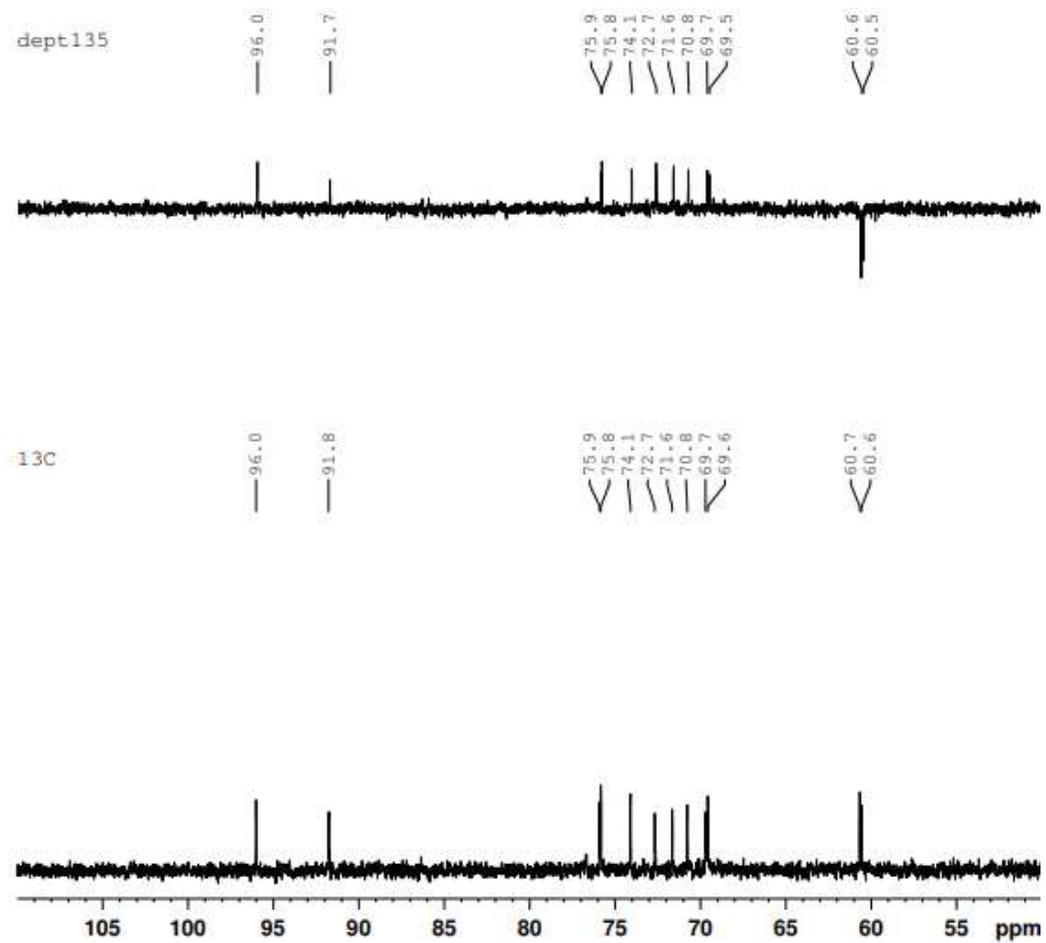


Figura 17 - Espectro de RMN de análise de ^{13}C do corante verde liofilizado, dissolvido em $\text{MeOH-}d_4$, frequência 5MHz.

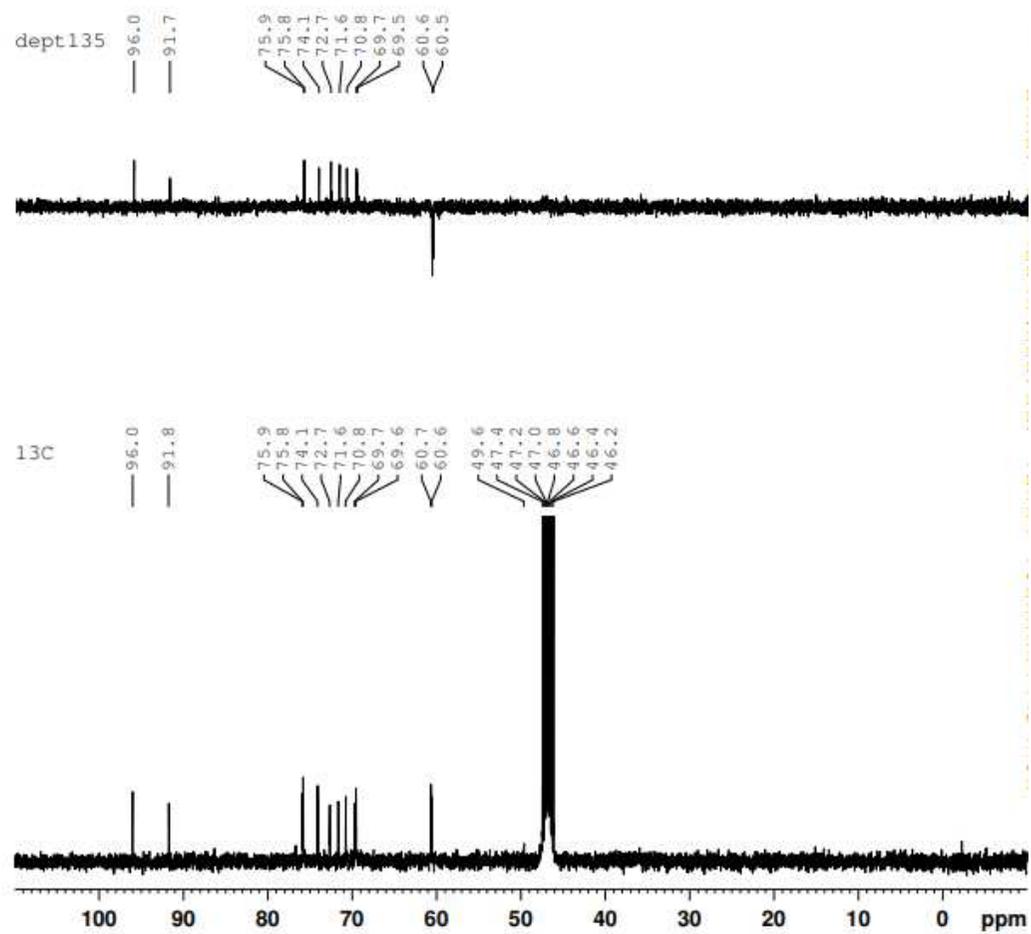
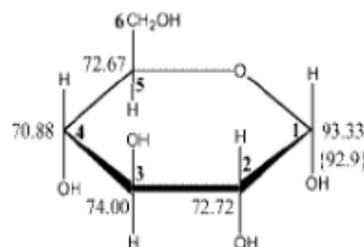


Figura 18 - Sinais de RMN da α -glicose (a) e β -glicose (b).

a)		
α -glicose		
	^1H	^{13}C
1	5,11	92,07
2	3,35	71,41
3	3,77	71,67
4	3,24-3,38	78,71
5	3,28	70,36
6	3,80-3,88; 3,65-3,72	60,22

b)		
β -glicose		
	^1H	^{13}C
1	4,48	96,01
2		74,07
3		74,63
4	3,24-3,38	78,58
5		75,05
6	3,75-3,80	60,35



Após a purificação do corante em cartucho de SPE e aplicação em coluna cromatográfica de sephadex LH-20, foram feitas novas análises de RMN ^1H (Figura 19, 20, 21) onde foi possível observar a ausência de glicose. Além disso é possível observar alguns sinais de anel aromático na região entre 6 e 8 ppm. Em 5,0 ppm há a evidência de hidrogênio vinílico e em 3,1 ppm hidrogênios próximos de oxigênio como por exemplo uma metoxila. Os sinais de solvente aparecem muito mais intensos do que o composto de interesse, com isso não houve resolução suficiente para fazer uma análise mais aprofundada.

Figura 19 - Espectro de RMN de análise de ^1H do corante verde purificado, dissolvido em $\text{MeOH-}d_4$, frequência 5MHz (faixa: 5 – 9 ppm).

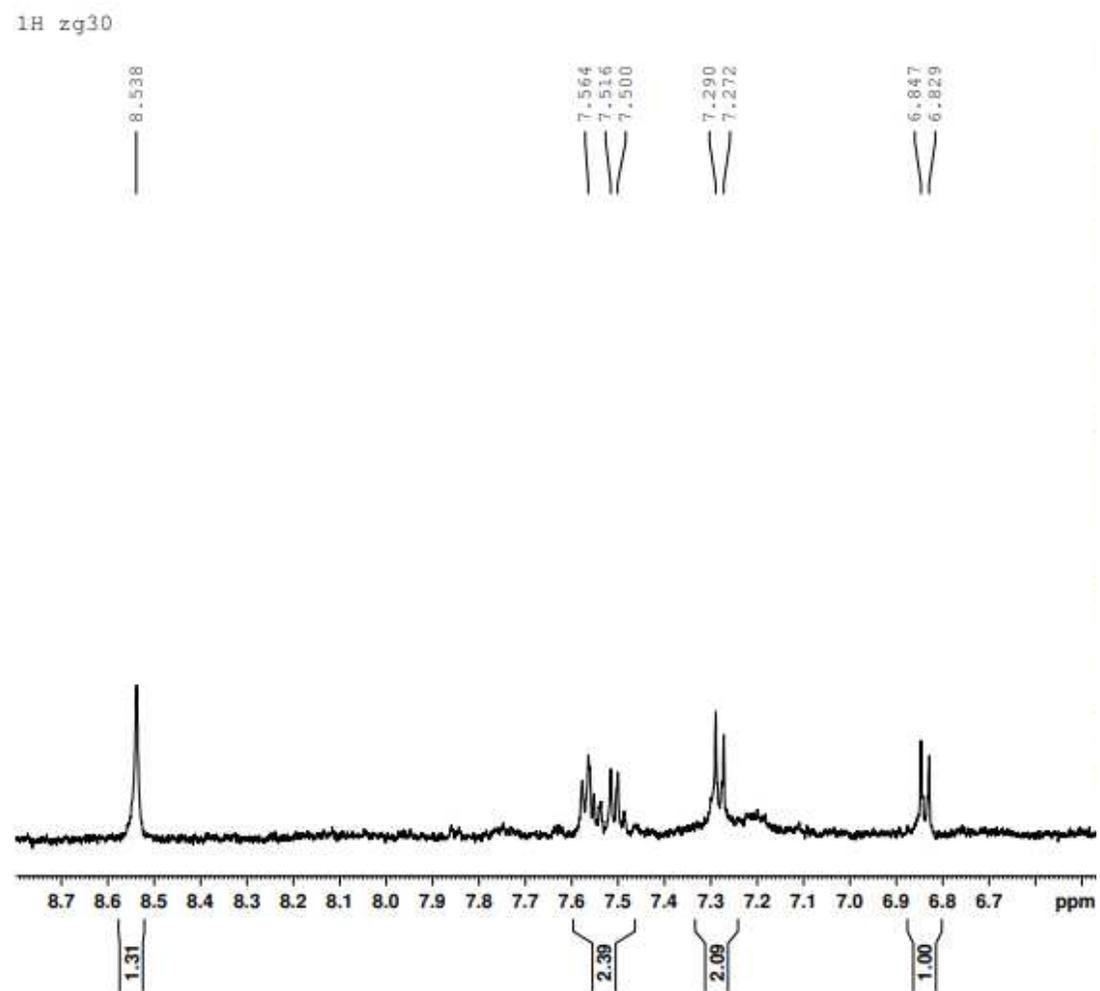


Figura 20 - Espectro de RMN de análise de ^1H do corante verde purificado, dissolvido em $\text{MeOH-}d_4$, frequência 5MHz (faixa: 2 - 6 ppm).

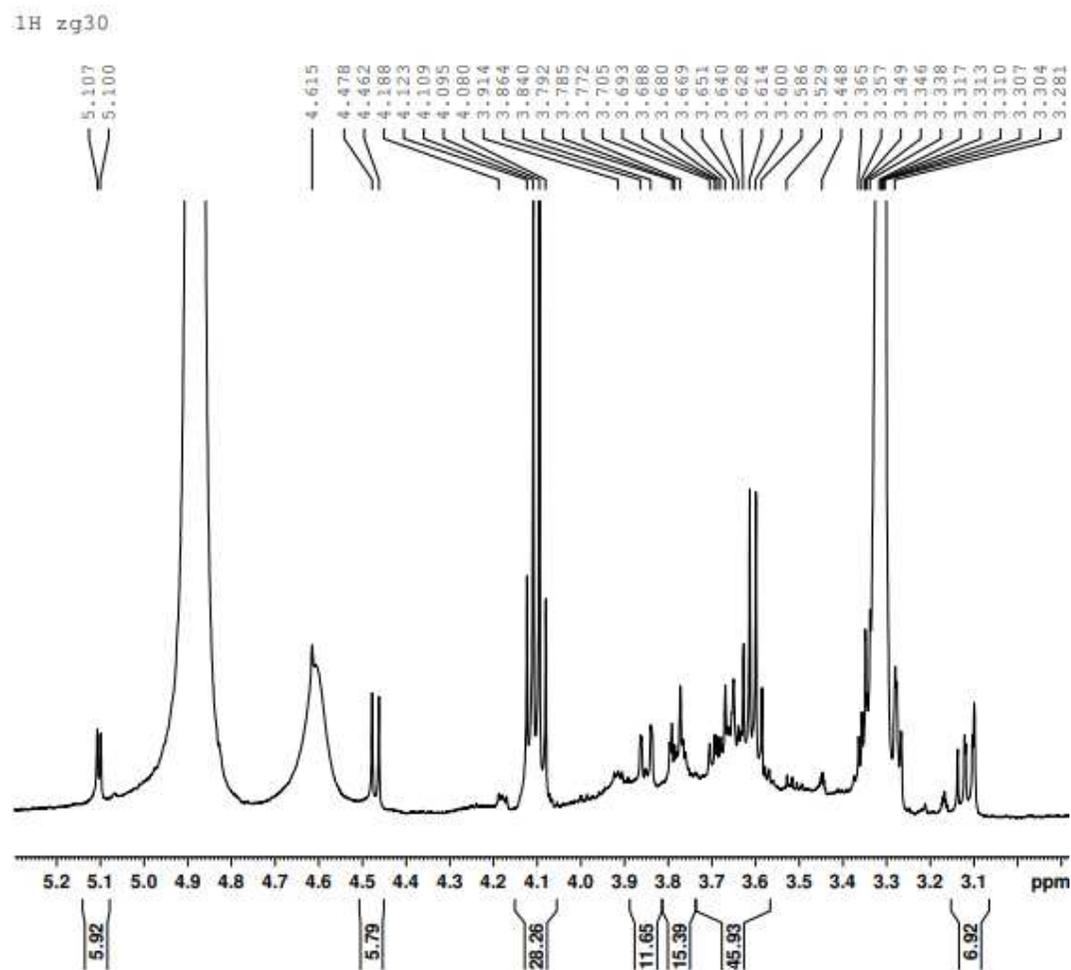
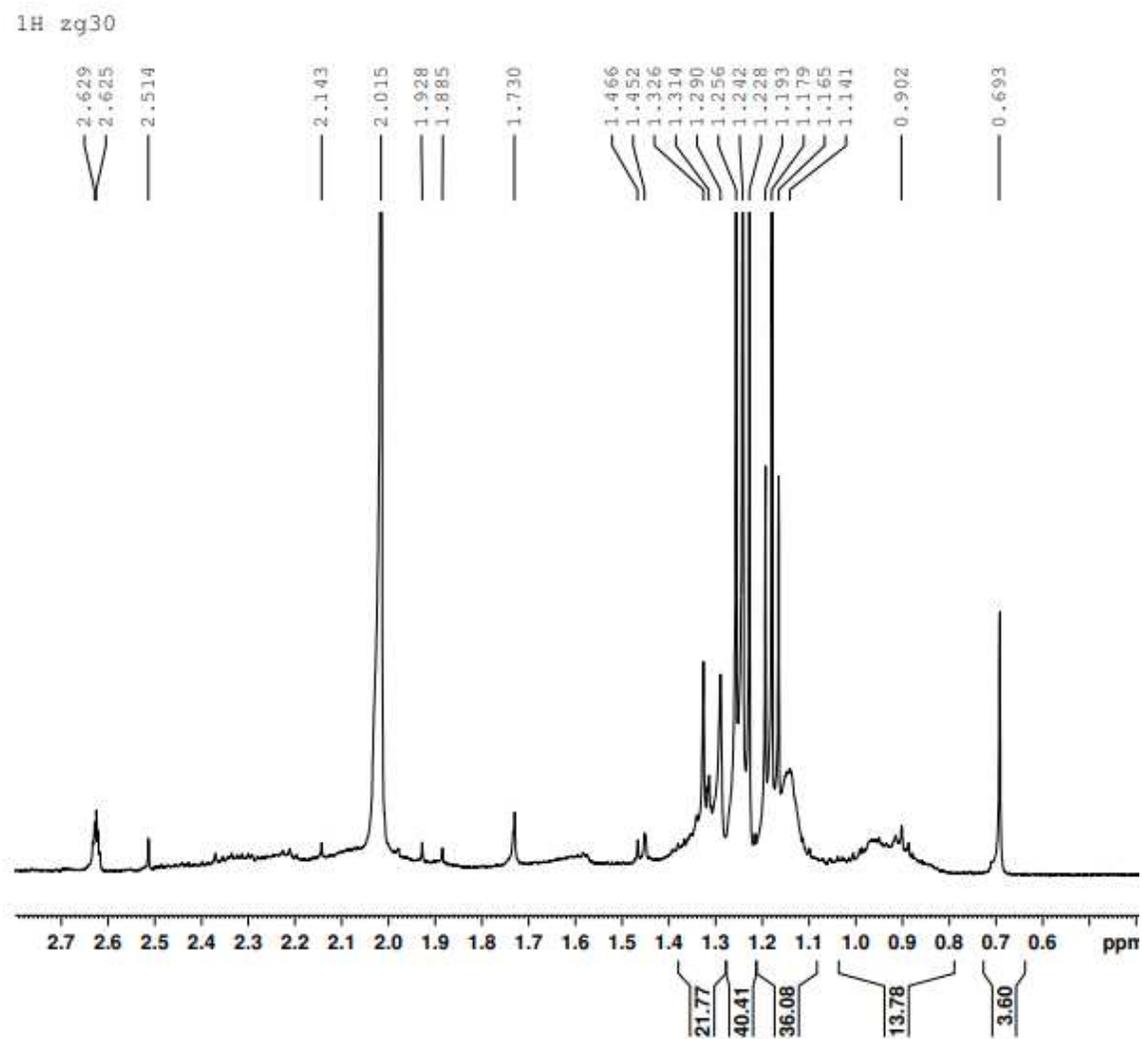


Figura 21 - Espectro de RMN de análise de ^1H do corante verde purificado, dissolvido em $\text{MeOH-}d_4$, frequência 5MHz (faixa: 0 – 3 ppm).

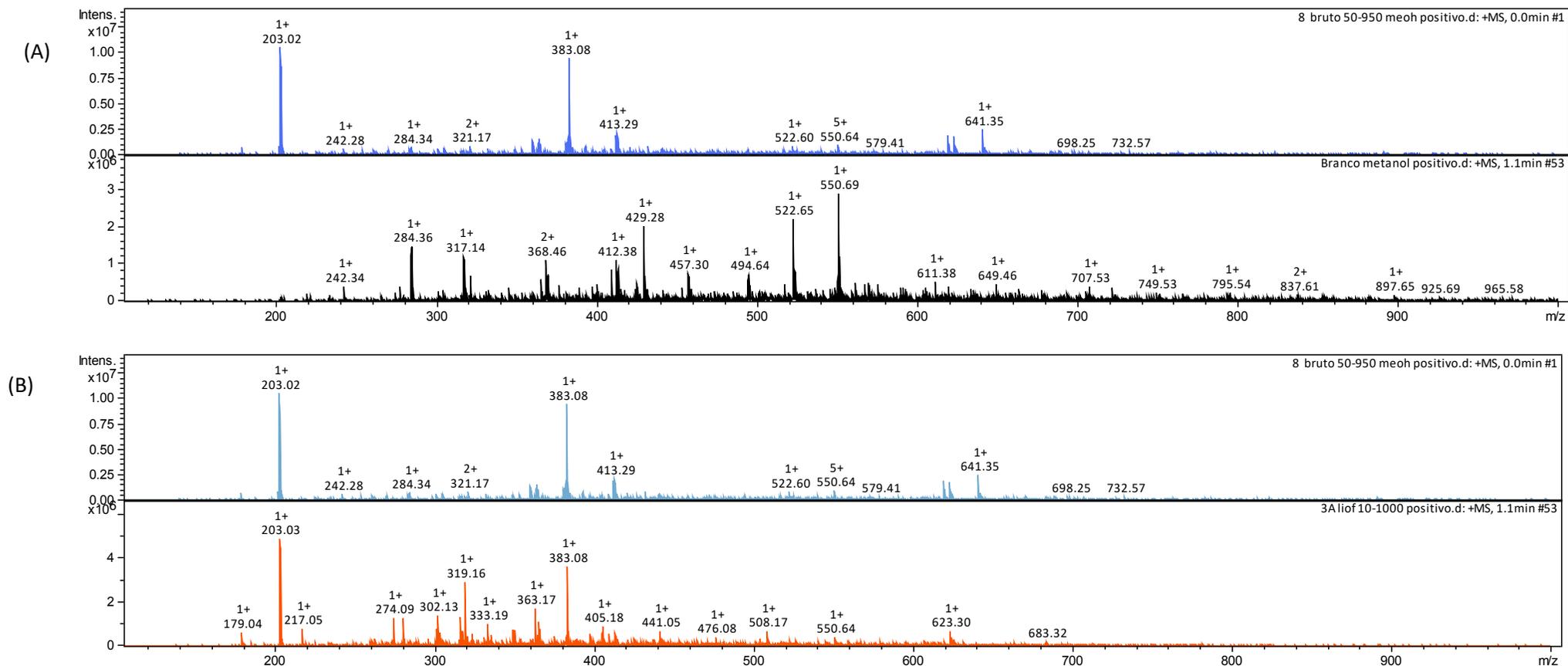


5.4. ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Foi feita análise por MS por meio de infusão direta do corante bruto no espectrômetro de massas, utilizando uma bomba/seringa com uma vazão de (10 $\mu\text{L}/\text{min}$). Na Figura 22A pode-se observar o espectro do corante bruto na sua forma líquida e na Figura 22B o corante liofilizado, ambos espectros com seus respectivos brancos.

O espectro de massas (ESI+) da Figura 22A apresenta como sinais principais os íons de m/z 203 e 383 no modo positivo que não são observados no branco (metanol), sendo possivelmente atribuído a um aduto de glicose $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (glicose sodiada) e ao seu dímero, também na forma sodiada. Na Figura 22B, após a amostra ter sido liofilizada ainda é possível observar os sinais de m/z 203 e 383, referentes a glicose e seu dímero.

Figura 22 – Comparação dos espectros de massas (ESI+) do corante bruto e metanol /branco (A) e corante bruto e liofilizado (B).



5.5. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA – SPE

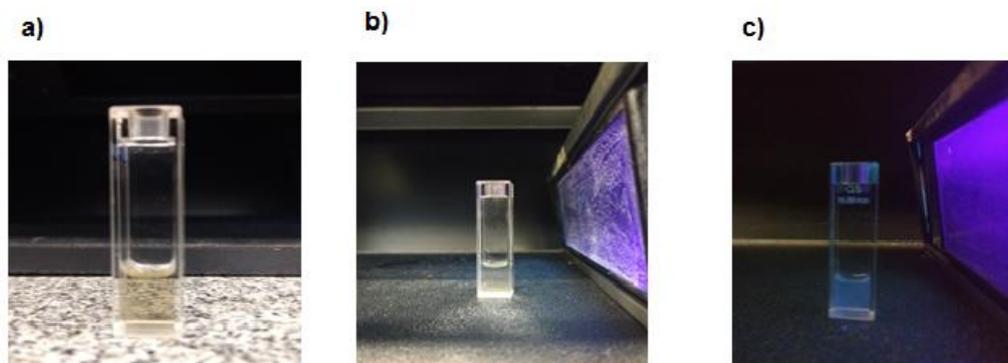
Inicialmente foi realizada a extração do corante utilizando a metodologia de extração líquido-líquido tendo como solventes extratores hexano e acetato de etila, porém não foi possível a extração, pois o corante continuou na fase aquosa. Esses resultados indicam que o corante tem característica polar ou tem grupos polares em sua estrutura devido ao fato da sua maior solubilidade em solventes orgânicos polares.

Uma outra alternativa foi realizar a extração do corante verde através do procedimento de extração em fase sólida (*solid phase extraction* – SPE) na qual se utilizou a fase estacionária C18. Com essa extração em cartucho SPE foi obtido o corante em fase metanólica que foi utilizado em experimentos posteriores.

5.6. FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA

O corante bruto foi submetido a um processo de purificação utilizando uma coluna empacotada com Sílica gel, tendo como fase móvel hexano:acetato de etila (7:3). Entretanto não foi possível verificar a eluição do corante na coluna, devido à perda de coloração. As frações coletadas foram aplicadas em placas de TLC (*Thin Layer Chromatography*) também não sendo possível a visualização da separação. Com isso, uma outra estratégia foi analisar as frações em uma câmara escura com luz UV (254 nm). Na Figura 23a podemos observar a 8ª fração que apresenta uma coloração bege fora da câmara escura e quando colocada na mesma adquiriu uma coloração mais clara (Figura 23c), já a partir da 16ª fração houve uma alteração na coloração da fração de bege (Figura 23a) para azul luminescente quando colocada na câmara escura (Figura 23c).

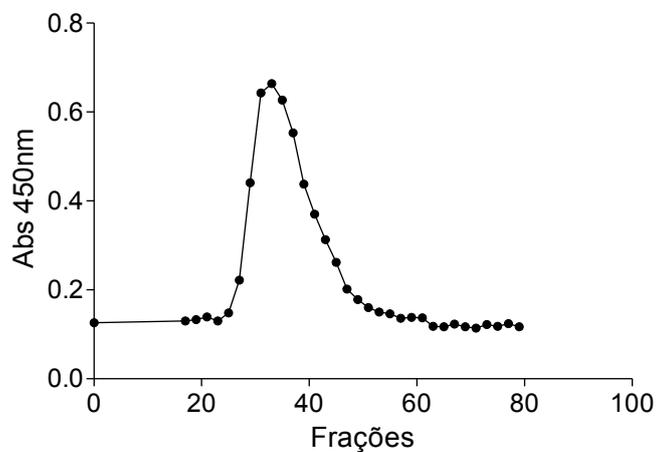
Figura 23 – Frações da coluna de Silica gel observadas em: (a) fora da câmara escura, (b) Hexano/Acetato de etila, (c) fração com o composto de interesse.



Foram separadas algumas frações que foram recolhidas após passar na coluna de Sílica gel, as frações foram selecionadas de acordo com a tonalidade que foi vista na câmara escura. Através desse teste foi possível verificar que as amostras já não continham mais glicose, tendo sido selecionadas 33 frações para verificação.

Devido à dificuldade de visualização da purificação em coluna de Sílica Gel, a amostra foi aplicada em uma coluna com Sephadex. Nessa purificação foi possível visualizar as frações do corante por meio da absorção em 450 nm (Figura 24). As frações (de 25 a 45) com maior absorbância no comprimento de onda de interesse foram reunidas. Com base nas frações obtidas nas duas purificações optou-se por utilizar apenas a fração obtida na purificação da coluna em Sephadex devido a maior facilidade na visualização de separação durante a eluição. Sendo assim, após reunir todas as frações o solvente foi evaporado e essa amostra foi utilizada nos experimentos posteriores.

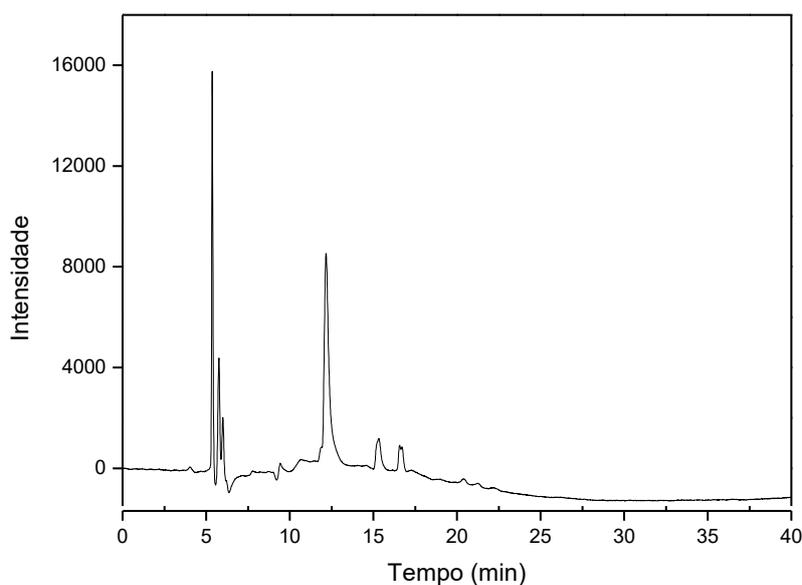
Figura 24 – Cromatograma obtido do corante bruto extraído com cartucho SPE e aplicada em coluna de resina Sephadex com monitoramento em 450 nm.



5.7. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Após a purificação o corante foi submetido a uma análise por LC-UV utilizando uma coluna C18 e monitoramento em 450 nm, resultando no cromatograma da Figura 25. Pode-se observar três picos no cromatograma com tempos de retenção de 12, 15 e 17 minutos.

Figura 25 – Cromatograma LC-UV do corante purificado em C18 com monitoramento em 450 nm.



A mesma corrida foi realizada, porém com o espectrômetro de massas como detector, resultando no cromatograma da Figura 26. Nessa análise também foi possível observar um pico em aproximadamente 10 minutos o qual apresenta íon de m/z 672,3, evidenciando que o corante verde possui massa molecular por volta de 600 g/mol.

Apesar de em 5 minutos tem sido obtido um bico com maior intensidade, ele é referente a glicose, conforme espectro mostrado na Figura 27. Mesmo após purificação ainda foi possível verificar a presença de glicose, mostrando que o processo purificação não foi totalmente eficiente, porém após as etapas de purificação realizadas até o momento contribuíram para a diminuição da glicose possibilitando a visualização de outros compostos, tanto nas análises de LC-MS quanto nas análises de Infra vermelho e Ressonância Magnética Nuclear.

Figura 26 - Cromatograma LC-MS do corante purificado em C18.

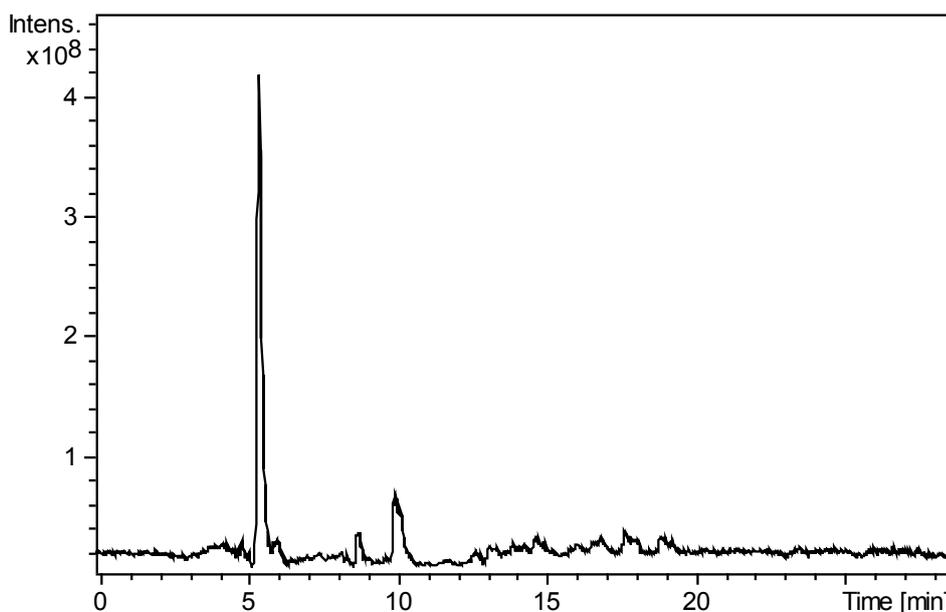


Figura 27 – Espectro de massas referente ao pico de tempo de retenção de 10 minutos da análise LC-MS.

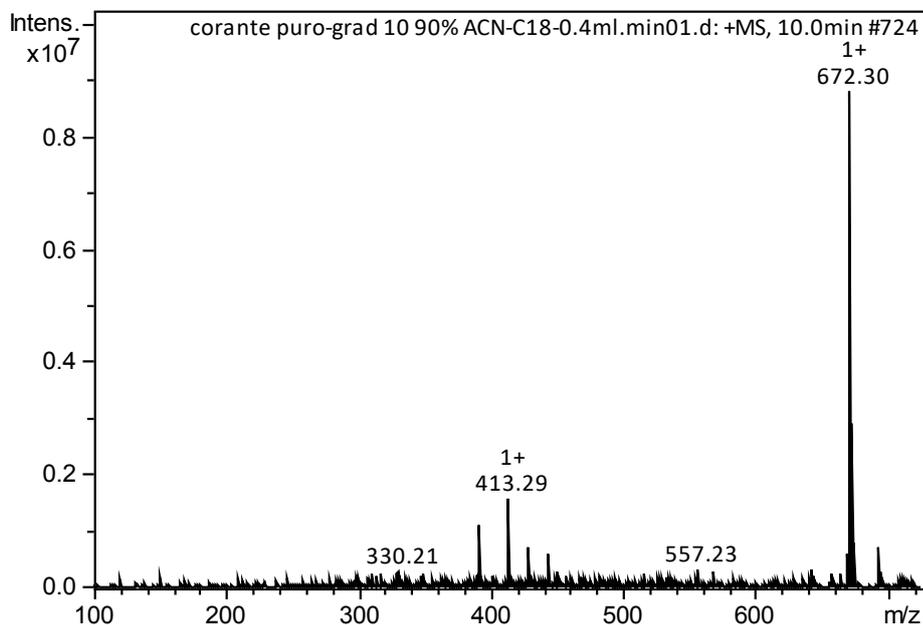
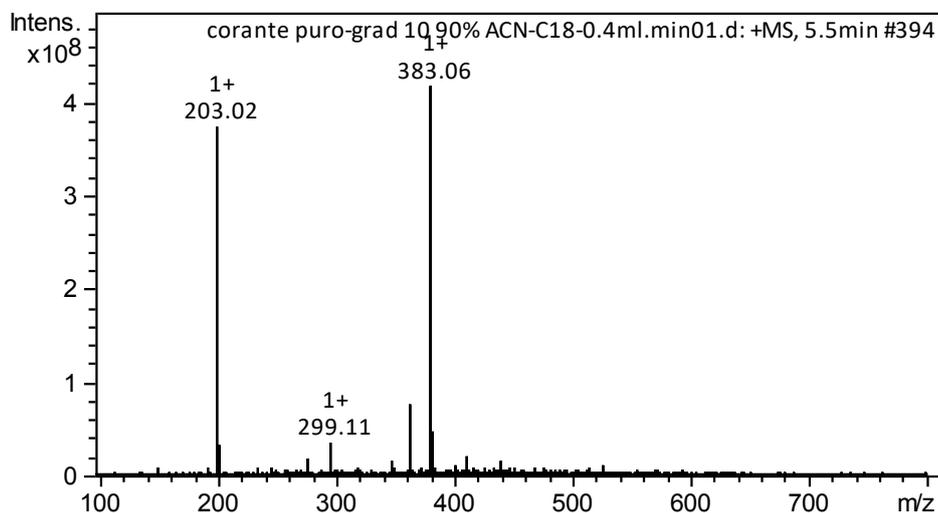


Figura 28- Espectro de massas referente ao pico de tempo de retenção de 5 minutos da análise LC-MS.



A partir desses resultados, foi realizada uma busca no banco de dados “*Dictionary of Natural Products*”, por compostos de massa molecular na faixa de 665 a 675 g/mol tendo como fonte biológica *Streptomyces*. Nessa busca foram encontrados alguns compostos como Bingchamide B, o qual é conhecido como um peptídeo cíclico de *Streptomyces*

bingchenggensis, *Pepsidins A* e *Bu*, que são compostos relacionados com inibição de *Streptomyces*, os quais não apresentam absorção de 450 nm. Também foram encontradas as *Actinorhodin* β e δ , que são pigmentos azuis que absorvem na região de 600 a 700 nm. Com isso não foram encontrados compostos produzidos por *Streptomyces* que apresentem coloração verde e que estejam na faixa de massa de 660 a 675 g/mol, o que nos leva a conclusão de que o corante verde é provavelmente um composto inédito que ainda não se encontra descrito na literatura. Com isso, os resultados apresentados nesse trabalho contribuíram para os estudos iniciais sobre a estrutura deste corante, porém, com os dados obtidos até o momento não foi possível propor a sua estrutura química. Esses estudos podem ser continuados em trabalhos posteriores afim de se elucidar a estrutura do corante.

6. CONCLUSÕES

Nesse trabalho de pesquisa foi possível realizar várias etapas propostas para a determinação da fórmula molecular do corante verde.

A amostra foi liofilizada para que fosse possível prepará-la para as análises de RMN e Infravermelho. Pode-se perceber que a amostra é altamente higroscópica, pois absorveu água, mesmo tendo sido fechada de modo adequado. Após a liofilização do corante foi possível solubizar o mesmo parcialmente nos solventes selecionados para o preparo das amostras (MeOH, EtOH, DMSO), isso pode ter sido devido a danos na estrutura da molécula, visto que o processo de liofilização faz uso de condições extremas como abaixamento de temperatura e alto vácuo.

Com a realização dos espectros de absorção e emissão de fluorescência no UV-Vis, foi possível perceber um padrão equivalente de espectros da amostra com picos em 270 nm e 454 nm.

Após a análise de RMN foi possível verificar a presença de glicose como contaminante o que dificultou a visualização de picos de interesse no espectro e direcionou as atividades do projeto para a investigação de métodos para purificação do corante verde.

Através das análises de infravermelho da amostra bruta e da amostra liofilizada foi possível verificar a diminuição significativa do alargamento da banda que se encontra na região 3397 cm^{-1} característica de estiramento O-H equivalente a molécula de água, mas a análise não foi conclusiva com relação aos grupos existentes, pois não foi possível realizar outras análises para comparação.

A tentativa de purificação da amostra, foi feita com aplicação da mesma em coluna de sílica gel e sephadex e em seguida foi colocada no *speed vac*, rotaevaporada, tendo em vista a preparação da mesma para análises de infravermelho e ressonância magnética nuclear.

A amostra foi aplicada em espectrômetro de massas por inserção direta e apresentou um espectro com muitas impurezas, o que tornou os resultados inconclusivos. Foi possível verificar a necessidade da purificação da amostra para otimização do método através de análises futuras.

Quando o corante verde foi aplicado no equipamento de HPLC, utilizando a coluna C18 não foi possível fazer uma separação eficiente da amostra, pois a mesma apresentou problemas com o solvente e com a coluna. Em trabalhos futuros a amostra será aplicada em diferentes colunas com a utilização de outros solventes e diferentes proporções na tentativa de otimizar o processo de separação.

Os estudos deixaram evidente que existe uma mistura na qual mais de um produto pode se apresentar como promissor para diversas aplicações, pois pode ser um composto inédito, com isso deve-se pensar na possibilidade da obtenção de uma quantidade maior da amostra para se iniciar com processo de extração seguido da concentração da mesma, podendo então realizar os processos de purificação conforme descritos nesse trabalho. Com isso espera-se obter uma maior eficiência na remoção dos possíveis ativos para aplicação e análise dessa amostra mais concentrada em equipamentos analíticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADI, M. D. M.; ASHRAF, N.; CHAMSAZ, M.; SHEMIRANI, F. An overview of liquid phase microextraction approaches combined with UV-Vis spectrophotometry. **Talanta**, v. 99, p. 1-12, 2012.

ABEROUMAND, A. A review article on edibel pigments properties and sources as natural biocolorants in doodstuff and food industry. **Word Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 6, p. 71-78, 2011.

ALVES, L. D. S.; ROLIM, L. A.; FONTES, D. A. F.; ROLIM-NETO, P. J.; SOARES, M. F. L. R.; SOBRINHO, J. L. S. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do efavirenz por espectrofotometria no UV-Vis. **Química Nova**, v. 33, p. 1967-1972, 2010.

AMRALLAH, A. H.; ABDALLA, N. A.; EL-HATY, E. Y. Spectrophotometric studies on some arylazo barbituric acids and arylazo pyrimidine in organic solvents and in buffer solutions. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 54, p.1629-1637, 2007.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, Brasília, v. 1, 5. ed., 2010.

ANVISA, Resolução – CNNPA nº 44, de 1977, Publicada DOU – Seção I, 01/02/78 e 24/04/78. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>.

ANVISA, Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 239, julho de 2018 , Publicada DOU nº 144, de 27 de julho de 2018.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Esclarecimentos sobre a declaração de alegações de conteúdo para aditivos alimentares na rotulagem de alimentos e bebidas**. Brasília, 2016. 9 p. (Informe Técnico nº 70, de 19 de janeiro de 2016).

BAFANA, A.; DEVI, S.; CHAKRABARTI, T. Azo dyes: past, present and the future. **Environmental Reviews**, v. 19, p. 350-370, 2011.

BARBOZA, F. M.; VECCHIA, D. D.; PEREIRA, A. V.; STULZER, H. K.; SILVA, M. A. S. Desenvolvimento e validação de um método analítico simples e rápido por espectroscopia UV para quantificação de aciclovir em matrizes hidrofílicas de liberação prolongada. **Química Nova**, v. 33, p. 747-749, 2010.

BRAKHAGE, A. A.; SCHROECKH, V. Fungal secondary metabolites – Strategies to activate silent gene clusters. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, p. 15-22, 2011.

BERMOND, J. **Apostila Intuitiva de pigmentos naturais**: Arte da Terra. 2016. Disponível em: <https://mac.arq.br/wp-content/uploads/2016/03/Apostila-Pigmentos-Naturais.pdf>

BUBB, W. A. NMR Spectroscopy in the Study of Carbohydrates: Characterizing the Structural Complexity. **Concepts In Magnetic Resonance**, v. 19, p.1-19, 2003.

CARVALHO, C. C. C. R.; FERNANDES, P. Production of metabolites as bacterial responses to the marine environment, **Marine Drugs**, v. 8, p. 705-727, 2010.

CARVALHO, J. C., et al. **Biotransformation Of Waste Biomass Into High Value Biochemicals**, 2014. 504 p.

CASS, Q. B.; CASSIANO, N. **Cromatografia líquida Novas tendências e aplicações**. 1. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 392 p.

CONSTANT, P. B. L., STRINGHETA, P. C., SANDI, D. Corantes Alimentícios, **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, p. 203-220, 2002.

CONSTANTINO, M. G., **Química Orgânica Curso Básico Universitário - Volume 3**. 1 ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2008. 592 p.

CRUZ FILHO, R. F; TEIXEIRA, M. F. S. **Avaliação do potencial biotecnológico de pigmentos produzidos por bactérias do gênero serratia isoladas de substratos amazônicos**. Duque de Caxias: Espaço científico livre projetos. 1 ed. 2013. 46 p.

DOWNHAM, A.; Collins, P. Colouring our foods in the last and next millennium. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 35, p. 5-22, 2000.

FABRI, E. G, TERAMOTO, J. R. S. Urucum: fonte de corantes naturais. **Revista da Associação Brasileira de Horticultura**, v. 33, p. 140-140, 2015.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Dossiê corante: Azo corantes, estrutura e implicações tecnológicas em alimentos. **Food Ingredients Brasil**, n.9, p. 54-55, agosto/setembro, 2009. Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/106.pdf>.

GIL, E. S. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. 2 ed. São Paulo: **Pharmabooks**, 2007. 485 p.

GALO, A. L.; COLOMBO, M. F. Espectrofotometria de longo caminho óptico em espectrofotômetro de duplo-feixe convencional: uma alternativa simples para investigações de amostras com densidade óptica muito baixa. **Química Nova**, v. 32, p. 488-492, 2009.

GANODERMAIERI, G., CENNAMO, G., SANNIA, G. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p. 17-24, 2005.

GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B.; Corantes têxteis, **Química Nova**, v. 23, p. 71-78, 2000.

HAGE, D. S.; TWEED, S. A. Recent advances in chromatographic and electrophoretic methods for the study of drug-protein interactions. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 699, p. 499-525, 1997.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3. ed. New York: Springer, 2006. 954 p.

HODGSON, R.J.; BROOK, M.A. e BRENNAN, J.D., Capillary scale monolithic immunoaffinity columns for immunoextraction with in-line laser-induced fluorescence detection. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 4404-4412, 2005.

HOLME, I. Sir William Henry Perkin: a review of his life, work and legacy. **Coloration Technology**, v. 122, p. 235-251, 2006.

HOUSTON, G.; BANKS, M. The chemical biological interface: Developments in automated and miniaturised screening technology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, p. 734-740, 1997.

IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, Lyon, v. 100, 1. ed., 2012.

JINNO, K. **Chromatographic Separations Based on Molecular Recognition**. 1 ed. New York: Wiley, 1997. 420 p.

KAMIMORI, H.; KONISHI, M. Evaluation and Application of Liquid Chromatographic Columns Coated with “Intelligent” Ligands.(III) Immobilized Enzyme Phospholipid Column. **Analytical sciences**, v. 17, p. 1085-1089, 2001.

KARP, Gerald. **Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos**. 3 ed. Barueri: Manole, 2005. 832 p.

LEAL, C. S. M. **Solubilidade de corantes azo**. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Química Industrial) - Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal 2011.

MAPARI, S. A. S.; HANSEN, M. E.; MEYER, A. S E THRANE, U. Computerized Screening for Novel Producers of *Monascus* – like Food Pigments in *Penicillium* Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 9981-9989, 2008.

MAPARI, S. A. S.; MEYER, A. S., THRANE, U. E FISVAD, J. C. Identification of potentially safe promising fungal cell factories for the production of polyketide natural food colorants using chemotaxonomic rationale. **Microbial Cell Factories**, v. 8, p. 24-39, 2009.

MENDA, M. **Corantes e pigmentos**. Química Viva – CRQ. 2011. Disponível em: <http://crq4.org.br/quimicaviva_corantespigmentos.htm>. Acesso em: 16 jun. 2019.

MENDES, C. R.; DILARRI, G.; PELEGRINI, R. T. Aplicação da biomassa *Saccharomyces cerevisiae* como agente adsorvente do corante Direct Orange 2GL e os possíveis mecanismos de interações adsorbato/adsorvente. **Revista Matéria**, v. 20, p. 898-908, 2015.

MENDONÇA, J. N. **Identificação e isolamento de corantes naturais produzidos por actinobactérias**. 2011. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

MARTÍNEZ SUÁREZ, J. F. **Comportamiento electroquímico de colorantes antraquinónicos, azul de metileno, y compuestos afines en solución de solventes noacuoso**. 2017. 324 f. Tese (Doutorado em Ciências Exatas) - Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, 2017.

MOADDEL, R.; LU, L.; BAYNHAM, M. e WAINER, I.W. Immobilized receptor and transporter based liquid chromatographic phases for online pharmacological and biochemical

studies: a mini review. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 768, p. 41-53, 2002.

MOHAMMAD, S.; SHAHID-UL-ISLAM; MOHAMMAD, F. Recent advancements in natural dye applications: a review, **Journal of Cleaner Production**, v. 53, p. 310-331, 2013.

MUNCHEN, S.; ADAIME, M. B.; PERAZOLLI, L. A.; AMANTÉA, B. E.; ZAGHETE, A. Jeans: A relação entre os aspectos científicos, tecnológicos e sociais para o ensino de química. **Química Nova na Escola**, v. 37, p. 172-179, 2015.

NIGAM, P.; BANAT, I. M.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 435-442, 1996.

NIGAM, P.; MARCHANT, R.; Selection of a substratum for composing biofilm system of a textile-effluent decolourizing bacteria, **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 993-996, 1995.

OHNISH, Y.; ISHIKAWA, J., HARA, H.; SUZUKI, H.; IKENOYA, M.; IKEDA, H.; YAMASHITA, A.; HATTORI, M.; HORINOUC, S.; Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. **Journal of bacteriology**, v. 190, p. 4050-4060, 2008.

PAVIA, D.L. et al. **Introdução à Espectroscopia**, 5 ed. Cengage Learning, 2015. 733 p.

PERKIN, W. H. The origin of the coal-tar colour industry, and the contributions of Hofmann and his Pupils. **Journal of the Chemical Society, Transactions**, v. 69, p. 596-637, 1896.

PHAM, L. H., Vater, J., Rotard, W. e Mügge, C. Identification of secondary metabolites from *Streptomyces violaceoruber* TÚ22 by means of on-flow LC-NMR and LC-DAD-MS. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, p. 710-723, 2005.

PINAZO BELTRÁN, K. F. P. **Determinación de la eficacia de biomasa de *Cladophora* sp. en la biosorción de azul de metileno**. 2015. 91f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biologia) – Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, Arequipa, 2015.

PINTEA, A. M. **Food colorants: chemical and functional properties**. 1 ed. CRC press. 2007. 648 p.

PONTES, F.B.D.; PEREIRA, J. F. B.; NETO, A.B. **Desenvolvimento do Processo de Produção, Isolamento e Purificação de Pigmentos produzidos por Streptomyces carpaticus**. XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica UFSCar – São Paulo 16 a 19/07, 2017.

ROCHA, F. R. P; TEIXEIRA, L; S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, p. 807-812, 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Natural food pigments and colorants. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 20-26. 2016.

SARON, C.; FELISBERT, M. I. Ação de colorantes na degradação e estabilidade de polímeros. **Química nova**, v. 29, p. 124-126, 2006.

SHIOZER, A. L., BARATA, L. E. S. Estabilidade de Corantes e Pigmentos de Origem Vegetal, **Revista Fito**, v. 3, p. 6-24, 2007.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Composto Orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006. 530p.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 9. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015. 950 p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 1055 p.

SOTOMAYOR, M. D. P. T. et al. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química Nova**, v. 31, p. 1755-1774, 2008.

SPADARO, J. T.; GOLD, M. H.; RENGANATHAN, V.; **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2397-401, 1992.

STUART, B. H., **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. 1 ed Wiley-Blackwel. 2004. 244 p.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, p. 2429-2436, 2009.

VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS, M. N. **Molecular fluorescence: principles and applications**. John Wiley & Sons, 2012. 592 p.

VANDEVIVERE, P.V.; BIANCHI, R.; VERSTRAETE, W. Review: Treatment and reuse of wastewater from the, **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 72, p. 289-302, 1999.

ZANONI, M. V. B; YAMANAKA, H. **Corantes: caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento**. 1. ed. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016. 344 p.

ZHU, H.; GUO, J.; YAO, Q.; YANG, S.; DENG, M. E LI, T. *Streptomyces caeruleatus* sp. Nov., with dark blue diffusible pigment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 61, p. 507-5011, 2011.