

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus de Araraquara**

**LETÍCIA KIYOMI ALVES OKA**

**PRODUÇÃO DO COLORANTE AZUL (INDIGOIDINA) POR CULTIVO  
SUBMERSO DE *Streptomyces lavendulae***

Araraquara – SP  
2024



**LETÍCIA KIYOMI ALVES OKA**

**PRODUÇÃO DO COLORANTE AZUL (INDIGOIDINA) POR CULTIVO  
SUBMERSO DE *Streptomyces lavendulae***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), faculdade Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Mestra em Biociências e Biotecnologia Aplicada à Farmácia

Área de Concentração: Análises clínicas

Orientador(a): Prof. Dra. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma

Araraquara – SP

2024

---

**O41p**

Oka, Letícia Kiyomi Alves.

Produção do colorante azul (indigoidina) por cultivo submerso de *Streptomyces lavendulae* / Letícia Kiyomi Alves Oka. – Araraquara, 2024.

57 f. : il.

Orientadora: Valéria de Carvalho Santos Ebinuma.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Análises clínicas.

1. Colorante microbiano. 2. Bactéria filamentosa. 3. Indigoidina. 4. Extração. 5. Têxtil. I. Ebinuma, Valéria de Carvalho Santos, orient. II. Título.

---

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

**CAPES: 33004030081P7**

**Esta ficha não pode ser modificada**

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Produção do colorante azul (indigoidina) por cultivo submerso de  
*Streptomyces lavendulae*

**AUTORA: LETÍCIA KIYOMI ALVES OKA**

**ORIENTADORA: VALÉRIA DE CARVALHO SANTOS EBINUMA**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em  
Ciências, área: Análises Clínicas pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. VALÉRIA DE CARVALHO SANTOS EBINUMA (Participação Virtual)  
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências  
Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. DENISE GROTTTO (Participação Virtual)  
Universidade de Sorocaba (UNISO)

Prof. Dr. VALKER ARAÚJO FEITOSA (Participação Virtual)  
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica / Faculdade de Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo (USP)

Araraquara, 20 de setembro de 2024

Dedico este trabalho ao meus pais (Jorge e  
Alexsandra), irmãs (Jossandra, Laisa Hidemi) e  
ao meu anjo de quatro patas, Tibi.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar finalizando mais uma etapa acadêmica. Também agradeço aos meus pais (Jorge e Alexsandra), irmãs (Jossandra e Laisa Hidemi) e minha avó (Joana) por todo apoio, suporte, conselhos, orações e principalmente em acreditar de que eu conseguiria sair da minha terrinha, Manaus, para o outro lado do Brasil em busca do aperfeiçoamento e crescimento profissional e pessoal. E obviamente que não deixaria de ser grata ao meu filho de quatro patas, Groot, que foi o meu maior companheiro durante momentos bons e difíceis em que não pude ter a presença da minha família.

Agradeço ao meu psicólogo, Rockson Pessoa, pelas orientações e como ele mesmo relata ‘trazer as luzes’ durante os dias difíceis. Além disso, agradeço ao meu psiquiatra, Dr. Rafael Araújo, por ter sido um ótimo conselheiro assim como suporte para me ajustar durante o processo de adaptação aqui em Araraquara. Agradeço também as minhas amigas de Manaus Anne, Val, Natália e Thayane que mesmo na distância deram os melhores conselhos e continuaram confiando em mim. Agradeço a Gabi, Liliz, Rafinha, Yana e Lucas que são pessoas sensacionais que apareceram em momentos aleatórios e trouxeram um diferencial nessa jornada.

Agradeço a Profa. Dra. Larissa Kirsch e Cleudiane por terem divulgado a oportunidade de prestar o mestrado sob a orientação da Profa. Dra. Valéria C. Santos Ebinuma, pois graças a elas eu pude conhecer a minha orientadora e estar em um ótimo programa, Biociências Biotecnologia Aplicada à Farmácia, e um laboratório excelente localizado no Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia.

Agradeço a orientadora Profa. Dra. Valéria C. Santos Ebinuma pela orientação, supervisão e acompanhamento durante todo o processo. Também agradeço aos colegas e amigos do grupo de pesquisa Bioppul (Bioproducts Production and Purification Lab), em especial a Nathália C., Caio, Júlio e Ariane da pós; os Ic Eduarda e Léo e a Ic júnior Bruna por toda ajuda, suporte e apoio. Além disso, agradeço imensamente aos técnicos Ivan, Flávio, Adriana e Ana por toda ajuda, ensinamento e suporte de todos os momentos em que precisei.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior – Brasil (CAPES) – código do financiamento 001 e a Fundação de Amparo À Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP/2023-00569-5)

*Follow the light, into your bright future ahead*  
*- The feeling (Shinee)*

## RESUMO

Os colorantes eram oriundos, principalmente, de plantas até o século XIX, quando William Henry Perkin descobriu acidentalmente a mauveína, o primeiro colorante químico orgânico sintetizado em laboratório. A partir de então, houve uma transição dos colorantes naturais para os sintéticos pelas indústrias. No entanto, estudos demonstram que os colorantes sintéticos podem ser prejudiciais à saúde e ao meio ambiente. Dessa maneira, uma alternativa a esses compostos são os colorantes naturais tais como os produzidos por microrganismo. Entre estes, as bactérias, do gênero *Streptomyces*, especialmente a *S. lavendulae* tem a capacidade de sintetizar o colorante azul indigoidina a partir da L-glutamina. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a produção de indigoidina por cultivo submerso de *S. lavendulae* e aplicar o extrato obtido em tecido. Inicialmente avaliou-se diferentes combinações do meio composto por aveia, glicose, L-glutamina e MgSO<sub>4</sub>. Posteriormente, por tratar-se de uma molécula produzida intracelularmente, estudou-se métodos de extração da indigoidina da biomassa microbiana, de forma a se padronizar o processo. Em seguida, novas condições de produção foram avaliadas, especificamente, concentração de inóculo e velocidade de agitação. Na melhor condição de produção obtida, realizou-se um estudo de cinética de crescimento do microrganismo e produção de indigoidina. E por fim realizou a aplicação do colorante microbiano e colorante comercial em tecido de algodão. Os resultados indicaram que o meio de cultura com a seguinte composição: 20 g/L de farinha de aveia, 1 g/L de glicose, 10 mM de L-glutamina e 1 mM de MgSO<sub>4</sub> associado com 30% v/v de inóculo e velocidade de agitação de 200 rpm proporcionou tanto o maior crescimento do microrganismo quanto a superior produção da biomolécula alvo. O estudo de cinética de crescimento e produção, mostrou que a produção máxima de indigoidina (3,75 g/L) ocorre após 96h de bioprocessamento. Como última etapa do trabalho, aplicou-se tanto o colorante produzido como o de origem comercial em tecido e observou-se que o colorante produzido apresentou baixa fixação no tecido quando comparado ao comercial. A partir do exposto, conclui-se que *S. lavendulae* tem a capacidade de produzir o colorante azul indigoidina, o qual possui amplo mercado de aplicação, como, por exemplo, matriz têxtil.

**Palavra-chave:** colorante microbiano; bactéria filamentosa; indigoidina; extração; têxtil.

## ABSTRACT

Colorants came mainly from plants until the 19th century, when William Henry Perkin accidentally discovered mauveine, the first organic chemical colorant synthesized in a laboratory. Since then, industries transitioned from natural to synthetic colorants. However, an alternative to these compounds, which is more sustainable, is the use of natural dyes such as those produced by microorganisms. Among these, bacteria of the genus *Streptomyces*, especially *S. lavendulae*, have the ability to synthesize the blue colorant indigoidine from L-glutamine. The aim of this study was to evaluate the production of indigoidine by submerged cultivation of *S. lavendulae* and to apply the obtained extract to fabric. Initially, different combinations of the medium composed of oats, glucose, L-glutamine and MgSO<sub>4</sub> were evaluated. Subsequently, since it is a molecule produced intracellularly, methods for extracting indigoidine from microbial biomass were studied in order to standardize the process. Then, new production conditions were evaluated, specifically inoculum concentration and stirring speed. Under the best production conditions obtained, a study was carried out into the kinetics of the microorganism's growth and indigoidine production. Finally, the microbial colorant and the commercial colorant were applied to cotton fabric. The results indicated that the culture medium with the following composition: 20 g/L of oat flour, 1 g/L of glucose, 10 mM of L-glutamine and 1 mM of MgSO<sub>4</sub> associated with 30% v/v of inoculum and a stirring speed of 200 rpm provided both the greatest growth of the microorganism and superior production of the target biomolecule. The growth and production kinetics study showed that the maximum indigoidine production (3.75 g/L) occurred after 96 hours of bioprocessing. As the last stage of the work, both the produced colorant and the commercial counterpart were applied to fabric, and it was observed that the produced colorants had low fixation on the fabric compared to the commercial one. From the above, it can be concluded that *S. lavendulae* has the ability to produce the blue dye indigoidine, which has a wide market for application, such as a potential use in textile materials.

**Keyword:** microbial colorant; filamentous bacteria; indigoidine; extraction; textile.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Estrutura química da indigoidina (5,5'-diamino-4,4'-dihidroxi-3,3'-diazadifenonoquinona-(2,2')) 16
- Figura 2 – Sistema de cores de Musell para os colorantes bacterianos. 20
- Figura 3 – Esquema representativo do ciclo reprodutivo da actinobactéria, exemplificando o ciclo de vida da *Streptomyces*. 21
- Figura 4 – Estrutura química da indigoidina, através da condensação de duas moléculas de L-glutamina devido ao gene BpsA presente na *Streptomyces lavendulae* (Sl-BpsA). 23
- Figura 5 – Esquema representativo dos processos realizados neste trabalho. 29
- Figura 6 – Esquema representativo da produção de indigoidina (g/L) presente nas condições: C1) 20 g/L de farinha de aveia, 4 g/L de glicose; C2) 20 g/L de farinha de aveia, 1 g/L de glicose 10 mM de L-glutamina, 1 mM de MgSO<sub>4</sub>; C3) 30 g/L de farinha de aveia, 1 g/L de glicose 5,5 mM de L-glutamina, 2,5 mM de MgSO<sub>4</sub>. 35
- Figura 7 – Comparação entre os ensaios de extrações para recuperação da indigoidina da biomassa de *S. lavendulae*: A<sub>1</sub>) água destilada, metanol e DMSO; A<sub>2</sub>) água destilada, metanol, acetato de etila, hexano e DMSO; A<sub>3</sub>) solução de lise, metanol, isopropanol, água, etanol, hexano e DMSO; A<sub>4</sub>) DMSO. Nível de significância de 0,05. Barras de erro para média ± desvio padrão das amostras. 38
- Figura 8 – Produção de indigoidina por cultivo submerso de *S. lavendulae* (média ± desvio padrão) em diferentes velocidades de agitações. Nível de significância de 0,05. Barras de erro para média ± desvio padrão das amostras. 40
- Figura 9 – Produção de indigoidina por cultivo submerso de *S. lavendulae* (média ± desvio padrão) variando as condições do pré-inóculo e inóculo: P<sub>1</sub>) 10% v/v do inóculo em 24h; P<sub>2</sub>) 15% v/v do inóculo em 24h; P<sub>3</sub>) 15% v/v do inóculo em 48h; P<sub>4</sub>) 30% v/v do inóculo em 24h; P<sub>5</sub>) 30% v/v do inóculo em 48h). Nível de significância de 0,05. Barras de erro para média ± desvio padrão das amostras. 41
- Figura 10 – Cinética de produção de indigoidina (a), consumo de glicose (b) e análise do pH (c) no cultivo submerso de *S. lavendulae*. Nível de significância de 0,05. Barras de erro para média ± desvio padrão das amostras. 42
- Figura 11 – Produção da indigoidina por cultivo submerso de *S. lavendulae* a cada 24h de bioprocesso 43
- Figura 12 – Tecido de algodão tingido por Indigoidina microbiana (IndM): a) tecido antes do processo de tingimento; b) tecido tingido após 1 hora; c) tecido tingido após 24 horas; d) cor demonstrada em colorímetro após 24 horas de tingimento. 44

- Figura 13 – Tecido de algodão tingido por Indigoidina comercial (IndC): a) tecido branco; b) tecido após 1 hora; c) tecido após 24 horas; d) cor demonstrada em colorímetro após 1 hora de tingimento; e) cor demonstrada em colorímetro após 24 horas de tingimento. 44
- Figura 14 – Cor da indigoidina diluída em DMSO: A) comercial e B) microbiana de acordo com as coordenadas obtidas na leitura do colorímetro. 46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Especificações dos solventes utilizados neste trabalho.	29
Tabela 2 – Composição dos meios de cultura baseados em aveia para a produção de indigoidina por cultivo submerso de <i>S. lavendulae</i> em agitador rotativo.	31
Tabela 3 – Extrações avaliadas para obtenção da indigoidina da biomassa intracelular de <i>S. lavendulae</i> .	32
Tabela 4 – Parâmetros CIELAB para o tecido de algodão após o processo de tingimento com Indigoidina. Sendo L, luminosidade (0 = preto, 100 = branco); a*, cor no eixo verde-vermelho (valores negativos = verde, valores positivos = vermelho); b*, cor no eixo azul-amarelo (valores negativos = azul, valores positivos = amarelo); C, chorma (intensidade da cor) e h, ângulo de tonalidade (matiz da cor).	43
Tabela 5 – Valores obtidos da indigoidina microbiana (IndM) e comercial (IndC) diluídas em DMSO antes e depois do processo de tingimento. Sendo L, luminosidade (0 = preto, 100 = branco); a*, cor no eixo verde-vermelho (valores negativos = verde, valores positivos = vermelho); b*, cor no eixo azul-amarelo (valores negativos = azul, valores positivos = amarelo); C, chorma (intensidade da cor) e h, ângulo de tonalidade (matiz da cor).	45

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	18
2.1 Colorantes, corantes e pigmento .....	18
2.2 Colorante natural .....	18
2.3 Colorante natural microbiano .....	19
2.4 A actinobactéria: <i>Streptomyces</i> .....	21
2.4.1 O colorante azul, indigoidina .....	22
2.5 Cultivo submerso .....	24
2.6 Colorantes naturais na indústria têxtil .....	26
3 OBJETIVOS .....	28
3.1 Geral .....	28
3.2 Específicos .....	28
4 METODOLOGIA .....	29
4.1 Material .....	29
4.2 Microrganismo .....	30
4.3 Reativação, manutenção e crescimento .....	30
4.4 Avaliação da produção de indigoidina por cultivo submerso de <i>S. lavendulae</i> .....	30
4.4.1 Avaliação da velocidade de agitação na produção de indigoidina .....	31
4.4.2 Avaliação do pré inóculo e inóculo .....	31
4.5 Extração da indigoidina intracelular .....	31
4.6 Cinética de crescimento .....	32
4.7 Aplicação da indigoidina em tecido .....	32
4.8 Métodos analíticos .....	33
4.9 Forma de análise de dados .....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	35
5.1 Avaliação do meio de aveia e micronutrientes para produção de indigoidina por cultivo submerso de <i>S. lavendulae</i> .....	35
5.1.1 Extração da indigoidina da biomassa de <i>S. lavendulae</i> .....	37
5.1.2 Estudos da velocidade de agitação na produção de indigoidina .....	39
5.1.3 Definição de Pré inóculo e inóculo .....	40
5.2 Cinética de crescimento do <i>S. lavendulae</i> .....	41
5.3 Aplicação da indigoidina em tecido .....	43
6 CONCLUSÃO .....	47

REFERÊNCIAS .....	48
-------------------	----

## 1 INTRODUÇÃO

Até metade do século XIX, os colorantes eram derivados de folhas, ramos, raízes, frutos, flores de várias plantas ou extraídos de animais. Contudo, devido à dificuldade de extração e ao alto custo, esses colorantes eram reservados para os mais privilegiados e utilizados principalmente na tintura de tecidos, como símbolo de poder (Cheirsilsigurdson *et al.*, 2017; Yadav *et al.*, 2023; Zarkogianni *et al.*, 2010).

Porém, em 1856 o químico William Henry Perkin sintetizou acidentalmente a mauveína, também conhecida como anilina roxa. A partir de então, os colorantes naturais começaram a ser substituídos pelos sintéticos, que oferecem uma série de vantagens, como maior estabilidade, ampla faixa de coloração, fácil aplicação e baixo custo de produção (Ksenofontov *et al.*, 2021).

Ademais, com a modernização da indústria, houve um crescimento na utilização de colorantes artificiais para as demais finalidades, incluindo sua aplicação nos setores alimentício, farmacêutico (Torres *et al.*, 2016), cosmético e, principalmente, no têxtil, uma vez que os produtos têxteis são consumidos universalmente, desempenhando funções de aquecimento, proteção, identificação conforme autoexpressão do homem através da moda (Mazotto *et al.*, 2021).

A indústria têxtil é uma das mais poluentes e drenantes de recursos do mundo, perdendo apenas para a indústria petrolífera em termos de impacto ambiental. Nessa indústria, há um uso intensivo de recursos naturais (água e energia) tal assim como a liberação de produtos químicos tóxicos que podem causar efeitos carcinogênicos, mutagênicos e genotóxico em animais e nos seres humanos (Varjani *et al.* 2021).

Estudos indicam que a produção de 1 kg de vestuário demanda entre 1,5 e 6,9 kg de produtos químicos (Pal, 2017; Ross, 2022). Além disso, no processo de tingimento, cerca de 2 a 50% de colorante é perdido, o que representa aproximadamente 200.000 toneladas de colorantes descartados nos efluentes anualmente. Esse descarte acarreta sérios impactos ambientais, especialmente em ambiente aquático, como o aumento da temperatura, variação do pH, maior turvação e alteração da sua coloração, impedindo a difusão da luz solar na água. Como consequência, ocorre diminuição do oxigênio dissolvido, afetando o crescimento dos organismos aquáticos (Madamwar *et al.*, 2019; DAVE *et al.*, 2015, Usman *et al.*, 2017; Lellis *et al.*, 2019).

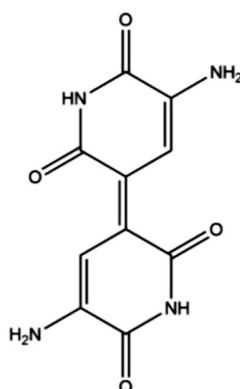
Sendo assim, tem aumentado o interesse e os estudos a respeito dos colorantes naturais, como uma via para substituir os colorantes sintéticos amplamente empregados no mercado. Dentre os colorantes naturais, destacam-se os produzidos por rota biotecnológica, empregando

microrganismos devido à sua fácil manipulação, rápida e simples reprodução, e maior estabilidade quando comparados aos produzidos e extraídos de plantas (Sengupta; Bhowal, 2023). Outrossim, há grande diversidade química entre as moléculas produzidas, tais como carotenóides, melaninas, flavonóides, quinonas, mosascinas, violáceas, ficocianinas (De Oliveira *et al.*, 2020a, Santos; Bicas, 2021).

Adicionalmente, os colorantes microbianos podem apresentar atividade biológicas, como por exemplo, antimicrobiana e antioxidante. Considerando a potencial aplicação na indústria têxtil, a confecção de vestuário com colorantes que apresentam atividade antimicrobiana pode ser destinada a profissionais da área da saúde reduzindo o risco de contaminação cruzada, ou, no caso de colorantes com atividade antioxidante como protetor UV para roupas de banho (Numan *et al.*, 2018). Logo, os colorantes microbianos, além de serem mais sustentáveis quando comparados a alguns colorantes sintéticos ou até mesmo oriundos de plantas podem oferecer benefícios funcionais.

Os colorantes microbianos podem ser produzidos por fungos assim como por bactérias, como é o caso do gênero *Streptomyces*, uma bactéria filamentosa, Gram-positiva, encontrada comumente no solo (Ai-tekreeti; Luti, 2023). Estudos têm mostrado que a espécie *S. lavendulae* é produtora do colorante azul conhecido como indigoidina (Figura 1) (5,5'-diamino-4,3'-dihidroxi-3,3'-diazadifenonoquinona-2,2') (Yumusak *et al.*, 2019).

**Figura 1** – Estrutura química da indigoidina (5,5'-diamino-4,4'-dihidroxi-3,3'-diazadifenonoquinona-2,2')



Fonte: Adaptado Brown, 2018

A indigoidina é um colorante da classe das *piridinas*, insolúvel em água e sua síntese em *S. lavendulae* ocorre a partir de duas moléculas de L-glutamina. Os estudos sobre a indigoidina concentram-se na caracterização da síntese e estrutura química do colorante. Na literatura, alguns estudos demonstram que esta biomolécula possui propriedades

antimicrobiana, antioxidante e é tolerante a estresses oxidativos de patógenos, devido a presença da dupla ligação entre carbonos conjugados com um grupo carbonila na sua estrutura (Figura 1) (Panchanawaporn *et al.*, 2022; Day *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2015; Santos; Bicas, 2021).

Pesquisas sobre a produção de indigoidina utilizando o microrganismo selvagem são escassas. Atualmente, muitos estudos sobre a indigoidina focam na manipulação genética do colorante em hospedeiros heterólogos. Um exemplo é o trabalho de Sword *et al.* (2023) que avaliaram a peptídeo sintase não ribossômico (NRPS) de *S. lavendulae* expressa na forma heteróloga em *Escherichia coli*. Outro exemplo é o estudo de Panchanawaporn e colaboradores (2022), no qual os autores investigaram a produção de indigoidina pelo fungo *Aspergillus oryzae*, geneticamente modificado para superexpressar a NRPS.

O microrganismo *S. lavendulae* é interessante para a produção do colorante azul indigoidina, uma vez que a cor azul é amplamente utilizada em diversos processos industriais, como em alimentos, cosméticos, fármacos e tecidos. O colorante azul que é comumente utilizado pelas indústrias é o índigo, e pode ser encontrado na forma natural em plantas do gênero *Indigofera* ou produzidos sinteticamente. A síntese do índigo sintético, no entanto, envolve o uso de várias substâncias tóxicas nocivas, como formaldeído, cianeto de hidrogênio e amida de sódio (Cardon, 2007; Blackburn *et al.*, 2009; Chavan, 2015; Jia *et al.*, 2023; Kabish *et al.*, 2023).

Entretanto, o índigo apresenta limitações quanto a sua fixação em tecidos de algodão, sendo necessário ser reduzido a uma forma leuco, solúvel em água, por meio de agentes redutores como o hidrossulfito de sódio (ditionito de sódio). Esse processo gera subprodutos corrosivos, como o sulfato e sulfito, que podem danificar tanto os equipamentos de tingimento quanto os de tratamento de águas residuais (Blackburn *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2023). Além disso, as águas residuais não tratadas podem apresentar problemas de toxicidade, como demonstrado no estudo de Porkodi e colaboradores (2024), que embriões de *zebrafish* expostos a soluções diluídas de índigo sintético e natural apresentaram efeitos teratogênico, causando deformidades no desenvolvimento dos peixes, além de efeitos genotóxico ao indivíduo.

Os colorantes sintéticos dominam o mercado, mas fontes alternativas a esses compostos são de grande atrativo, porém, é necessário avançar nos estudos para alcançar uma produção de alto nível, competitiva no mercado e com os seus equivalentes sintéticos. Dessa forma, faz-se necessário aprofundar os estudos quanto aos processos de produção e extração da indigoidina pelo seu microrganismo de origem, a fim de enriquecer a literatura e buscar formas alternativas ao colorante natural e sintético índigo. Em vista disso, este trabalho teve como objetivo estudar a produção de indigoidina por cultivo submerso de *S. lavendulae* e sua aplicação em tecido.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Colorantes, corantes e pigmento**

A coloração de produtos pode ser alterada mediante a incorporação de compostos aditivos, conhecidos como colorantes. Estes podem ser classificados de acordo com a sua natureza, sendo naturais ou artificiais/sintéticos, ou conforme sua solubilidade no meio em que estão presentes e ao tamanho das partículas, podendo ser classificado como corante ou pigmento (De Oliveira, 2020b). Os pigmentos são substâncias de partículas maiores, sólida e quase insolúveis, que não são afetadas física e quimicamente quando incorporados em seus solventes ou veículos, sejam eles de origem orgânica ou inorgânica. Por outro lado, os corantes são substâncias de partículas menores, solúveis no meio em que estão imersos, e podem ser coloridos ou fluorescentes (De Oliveira, 2020b; Neves, 2016; Oliveira C., 2017; Saron; Felisberti, 2006; Silva, 2013).

A coloração, portanto, tornou-se um elemento de grande relevância ao homem, tanto por sua funcionabilidade atrativa quanto pelo impacto que exerce no mercado, levando à ampla implementação dos colorantes nas indústrias (alimentícia, fármaco, têxtil). No entanto, a indústria tem adotado o uso de colorantes sintéticos, pois são estáveis, possuem uma variedade de cores, são fáceis de se aplicar e tem um baixo custo de obtenção (Ksenofontov *et al.*, 2021), embora sejam altamente tóxicos. Diante a esses desafios, a busca por alternativas mais sustentáveis e menos prejudiciais tem aumentado o interesse pelos colorantes naturais, no qual oferecem uma solução promissora para reduzir os impactos negativos aos sintéticos.

### **2.2 Colorante natural**

Os colorantes naturais são compostos que conferem cor e são derivados da natureza, sem processamento ou modificação química. Além disso, muitos colorantes naturais são reconhecidos como mais seguros para o ser humano e biodegradáveis, quando comparados a algumas classes de colorantes sintéticos, por não oferecerem risco à saúde humana e ao meio ambiente. Dessa forma, esses compostos podem ser utilizados como aditivos e intensificadores de cor em diversos segmentos industriais, incluindo fármacos e têxteis, atuando também como ingredientes funcionais de alimentos e bebidas (Nambela *et al.*, 2020; De Mejia *et al.*, 2020; Narsing *et al.*, 2017; De Oliveira, 2020b).

Os colorantes naturais são classificados de acordo com sua origem, constituição química, método de aplicação e cor. Contudo, a classificação mais comum é a partir da sua origem (plantas/vegetais; insetos; minerais e microbianos) e aos seus grupamentos químicos

(carotenoides, indigoides, quinonoides, flavonóides, taninos, betalainas). (Vankar, 2016; Nambela *et al.*, 2020).

Os colorantes de origem vegetal são extraídos de folhas, flores, frutos, sementes, cascas, troncos ou raízes de plantas. Já os de origem animal/inseto são obtidos a partir de excreções ou de corpos secos de insetos. Um exemplo comumente conhecido de colorante de inseto é o carmim, um colorante vermelho vivo extraído da cochonilha, cujo principal composto é o ácido carmínico, responsável pela coloração vermelha. Outro exemplo de colorante de origem animal é a púrpura de Tyrian, obtida a partir de conchas de moluscos marinhos (Nambela *et al.*, 2020; Yusuf *et al.*, 2017; Dapson, 2007; Moretzsohn, 2023).

Por fim, os colorantes de origem mineral ou inorgânica são obtidos a partir de sais e óxidos metálicos. Alguns exemplos incluem a cor vermelha, que pode ser obtida a partir de óxidos de ferro e chumbo; a cor verde, a partir de hidrossilicato de ferro, magnésio, alumio e potássio; a cor azul pelo azurita; e a cor branca, pelos carbonatos metálicos, como o carbonato de cálcio, de chumbo e gesso (Nambela *et al.*, 2020).

Apesar de os colorantes naturais de origem vegetal, animal e mineral oferecerem benefícios em comparação aos sintéticos, eles também apresentam algumas desvantagens, como o fato de serem sazonais e dependerem das condições climáticas, o que prolonga o tempo de crescimento (Nambela *et al.*, 2020), e eleva o custo de obtenção. Por isso, torna-se necessário a procura de colorantes que sejam economicamente viáveis e ecologicamente corretos. Nesse contexto, os estudos têm avançado sobre o uso de colorantes produzidos por microrganismos.

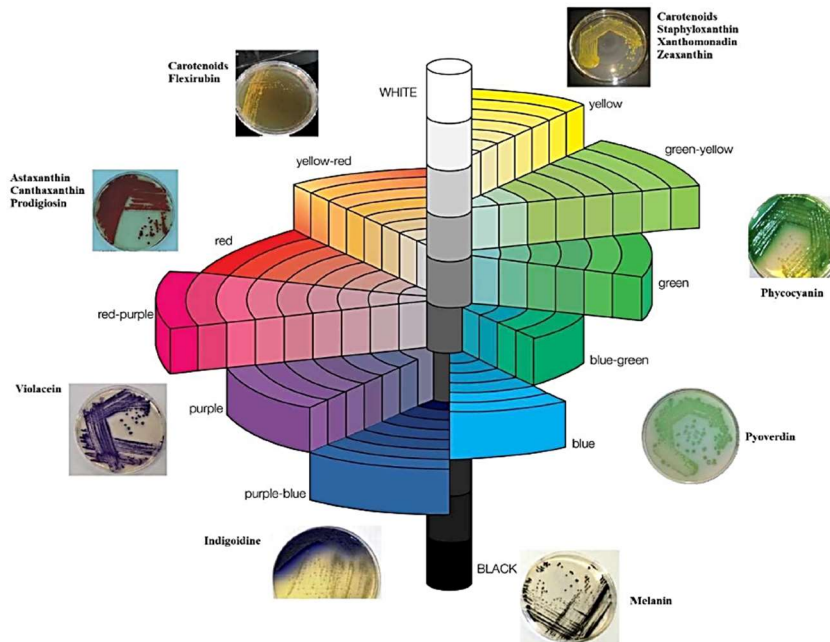
### 2.3 Colorante natural microbiano

Microrganismos, como fungos e bactérias, podem oferecer vantagens na produção em comparação a produtos similares extraídos de plantas ou animais, pois não apresentam problema de disponibilidade sazonal e, muitas vezes, são mais estáveis, solúveis e podem ser cultivados em meios de baixo custo, promovendo sustentabilidade e redução de custos (Gunasekaran; Poomiammal, 2008; Torres *et al.*, 2016, Venil *et al.*, 2020). Por isso, a crescente pesquisa sobre microrganismos capazes de biossintetizar colorantes naturais tem se tornado extremamente relevante.

Ademais, os colorantes bacterianos possuem uma diversidade de cores que varia de acordo com gênero e espécie da bactéria, como exemplificado na Figura 2, conhecido como sistema de cores de Musell. Nesse sistema, cores em tons de vermelho são produzidas por *Serratina marcescens* ou *Gordonia jacobaea*; vermelho-amarelo por *Kocuria* sp. ou *Chryseoacterium artocarpi*; amarelo por *Micrococcus*, *Hymenobacter* sp. ou *Chryseoacterium*

sp.; verde por *Pseudomonas* sp.; azul por *Corynebacterium insidiosum*, *Erwinia chrysanthemi* ou *Vogesella indigofera* e roxo por *Chromobacterium* sp. (Venil *et al.*, 2020; Devi *et al.*, 2024).

**Figura 2** – Sistema de cores de Musell para os colorantes bacterianos.



Fonte: Venil *et al.*, 2020.

Na literatura, os colorantes bacterianos podem apresentar diversas atividades biológicas. Exemplos incluem a astaxantina, que pode ter atividade anticâncer e anti-inflamatório, sendo produzida por *Paracoccus carotinifaciens* (Ambati *et al.*, 2014); a undecilprodigiosina, com atividade antimicrobiana, produzida por *Streptomyces* sp. (Stankovic *et al.*, 2012); a violaceína, com propriedades antiparasitário e antifúngico, produzida por *Janthinobacterium lividum* (Woodhams *et al.*, 2018); e a cantaxantina, com atividade antioxidante e anticâncer, produzida por *Lactobacillus pluvialis* (Ram *et al.*, 2020). Não somente, o uso desses compostos naturais pode reduzir o risco de alergias (Venil *et al.*, 2020) em comparação aos colorantes sintéticos. Dessa forma, esses compostos são de interesse para diversas áreas, não apenas por sua capacidade de conferir cor aos produtos, mas também por agregar funcionalidades à matriz em que estão inseridos.

As bactérias do gênero *Streptomyces* são amplamente citadas na literatura como produtoras de colorantes. Elas podem sintetizar moléculas de diferentes cores, como actinorrodina (vermelho-azul por *S. coelicolor*) (Bystrykh *et al.* 1996), prodigiosina (vermelho por *Streptomyces* sp. NP4) (Kramar *et al.*, 2014) e melanina (*S. glaucescens*) (El-naggar; El-ewasy, 2017). Além disso, essas bactérias possuem propriedades antibacterianas e antioxidantes, que variam conforme a espécie de *Streptomyces* empregada. A espécie *S.*

*lavendulae* produz o colorante azul indigoidina, o qual, apresenta atividade antioxidante e antimicrobiana (Panchawaporn *et al.*, 2022).

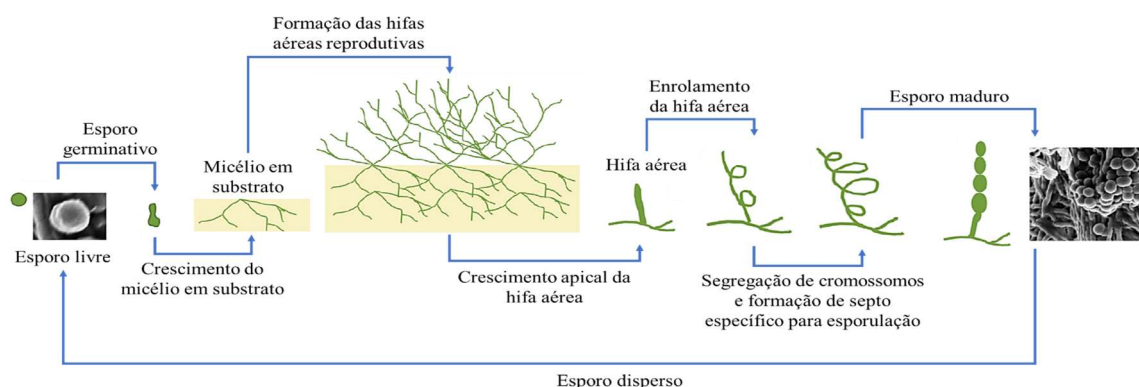
## 2.4 A actinobactéria: *Streptomyces*

As actinobactérias são bactérias filamentosas pertencentes ao grupo dos actinomicetos e apresentam diferentes características entre si no que diz respeito ao seu metabolismo, fisiologia e morfologia. Geralmente, essas bactérias possuem formas de micélio ramificado com hifa cocóide e fragmentada (Hazarika; Thakur, 2020).

As bactérias filamentosas são reconhecidas pela produção de metabólitos secundários tais como pigmentos, enzimas extracelulares e compostos terpenóides que dão o odor característico do solo (De Oliveira, 2003c; Reddy, 2011). O gênero *Streptomyces* é um dos maiores gêneros localizados na família Streptomycetaceae, pertencente ao filo Actinobacteria, sendo multicelulares, Gram positivas, filamentosas, aeróbicas, miceliais e são biologicamente ativas produzindo metabólitos secundários (Berdy, 2017).

Esses microrganismos dispõem de um ciclo de vida complexo (Figura 3), que se inicia com a germinação de esporos, originando um micélio vegetativo formado por hifas ramificadas (primárias) que penetram no substrato, metabolizando fontes orgânicas tais como polissacarídeos, proteínas, lipídeos e compostos aromáticos pela ação de enzimas extracelulares (Samac *et al.*, 2003, Pamboukian, 2003; Hazarika; Thakur, 2020). Do micélio vegetativo é originado o micélio aéreo que passará por um processo de diferenciação morfológica podendo incluir septação e formação de esporos. Durante esta fase, ativa-se o metabolismo secundário e são produzidos, principalmente, os antibióticos e colorantes (Santos, 2009; Lajtai-Szabó *et al.*, 2022; Hazarika; Thakur, 2020).

**Figura 3** – Esquema representativo do ciclo reprodutivo da actinobactéria, exemplificando o ciclo de vida da *Streptomyces*.



Fonte: Adaptado Hazarika; Thakur, 2020.

O crescimento de *Streptomyces* em escala laboratorial pode ser dividido em fases vegetativas e reprodutivas, que variam em culturas sólidas e submersas. Em culturas sólidas, há formação de hifas compartimentadas, que se iniciam com a germinação de esporos, enquanto em culturas submersas ocorre a fragmentação micelial (Lajtai-Szabó *et al.*, 2022; Oumaima; Faouzi, 2023). Em meios sólidos, o ciclo começa com a germinação do esporo e o desenvolvimento do micélio vegetativo. Posteriormente, ocorre a morte celular programada, levando à produção de antibióticos e ao crescimento do micélio aéreo (Ser *et al.*, 2017; Oumaima; Faouzi, 2023). Em alguns casos, *Streptomyces* pode liberar colorantes solúveis em água, tornando o meio colorido, ou solúveis em gordura, fazendo com que a colônia adquira a cor do colorante (Li *et al.*, 2016b; Hazarika; Thakur, 2020).

Em culturas submersas, o crescimento de *Streptomyces* se dá pela formação de hifas compartimentadas, seguida pela morte celular programada e pelo desenvolvimento de micélios produtores de metabólitos secundários (Oumaima; Faouzi, 2023). Além disso, sua morfologia pode ocorrer em três tipos diferentes: micélios livres dispersos (comportam-se como células individuais), redes miceliais abertas (frequentemente designadas em grumos ou aglomerados) e pellets (estruturas densas com centro deficiente de nutrientes) (Dissel *et al.*, 2014; Lajtai-Szabó *et al.*, 2022).

A espécie *S. lavendulae* foi primeiramente isolada do solo em 1916 (Waksman *et al.*, 1951) com a presença do micélio ramificado formando esporos aéreos. Assim como todas as *Streptomyces*, *S. lavendulae* possui alta capacidade de produzir diversos compostos bioativos com aplicabilidade industrial, farmacológica e agrícola. Em condições laboratoriais, a *S. lavendulae*, possui a capacidade de produzir quatro metabólitos secundários: antibióticos nucleosídeos (showdomicina e minimicina), a D-cicloserina (medicamento antituberculoso) e o colorante azul, indigoidina (Paint, 2018) que possui propriedades antioxidantes e antimicrobianas.

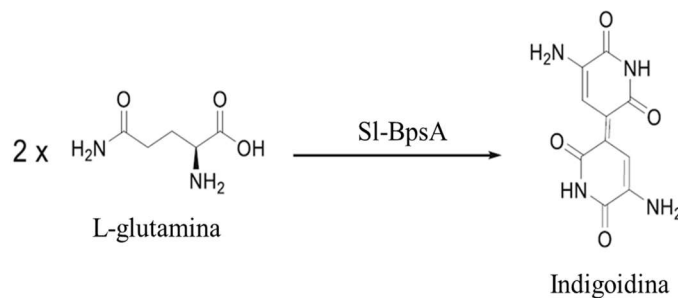
#### 2.4.1 O colorante azul, indigoidina

A indigoidina foi descrita pela primeira vez há mais de 100 anos, tendo seu primeiro isolamento em 1939. Demorou cerca de três décadas até que a estrutura do colorante fosse elucidada e classificada ao grupo das piridas. Sua produção é presente entre proteobactérias (alfa, beta, gama) e actinobactérias (Claessen, 1890; Volcani-Elazari, 1939; KUHN *et al.*, 1965; Takahashi *et al.*, 2007).

Além disso, a indigoidina pode proteger as bactérias produtoras contra o estresse oxidativo e estar envolvida na patogenicidade de agentes patogênicos de plantas endofíticas

(Reverchon *et al.*, 2002). Estudos de Ceniceros *et al.* (2017) e Panchanawaporn *et al.* (2022) relatam que a indigoidina apresenta baixa solubilidade em água, possui propriedades antimicrobianas e crioprotetora, além de atividade antirradicais e antioxidante, devido à presença de um anel com duas piridonas contendo grupos carbonila e amino na sua estrutura (Figura 4).

**Figura 4** – Estrutura química da indigoidina, através da condensação de duas moléculas de L-glutamina devido ao gene BpsA presente na *Streptomyces lavendulae* (SI-BpsA) que codifica a NRPS e ativa a 4-PPTase para realização da síntese da indigoidina.



Fonte: Adaptado de Yumusak *et al.*, 2019.

Em *S. lavendulae*, a síntese da indigoidina ocorre por um sistema não ribossômico, ou seja, não envolve diretamente os ribossomos, que normalmente são responsáveis pela síntese de proteínas. Em vez disso, a indigoidina é sintetizada por um complexo enzimático conhecido como sistema não ribossômico de síntese de peptídeos (NRPS, do inglês "*non-ribosomal peptide synthetase*").

O processo de modificação pós-traducional é essencial para a conversão da apo-forma inativa da síntese de indigoidina em sua forma holo-forma ativa. Essa ativação ocorre por meio da introdução de uma porção derivada da coenzima A no domínio de tioração (T) da enzima, com a ação de um co-facilitador e da atividade da 4'-phosphopantetheinyl transferase (PPTase). Uma vez ativa, a biossíntese da indigoidina começa com a ciclização de uma única molécula de glutamina, por meio de uma ligação amida intramolecular. O aminoácido intermediário é então desidrogenado, possivelmente por oxidação, e as duas glutaminas cíclicas modificadas se condensam para formar o colorante (Reverchon *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2013; Pang *et al.*, 2020; Panchawaporn *et al.*, 2022).

O entendimento da rota metabólica da síntese da indigoidina pode contribuir para a compreensão do metabolismo do microrganismo. A partir desse conhecimento, é possível identificar as melhores condições de cultivo, como a composição nutricional do meio, pH,

temperatura e agitação, que permitem ao microrganismo manter seu metabolismo e, assim produzir os compostos de interesse.

No entanto, os estudos relacionados à rota metabólica da indigoidina produzida por *S. lavendulae* ainda são limitados, o que torna necessário o avanço das pesquisas para compreender melhor a síntese do colorante e o comportamento do microrganismo, nas diferentes condições nutricionais e de cultivo. Por essa razão, o estudo do cultivo submerso em microrganismos torna-se importante, uma vez que é amplamente utilizado em pesquisas e indústrias para otimizar a produção do composto em questão.

## 2.5 Cultivo submerso

O cultivo submerso (CS) é amplamente utilizado para a produção de diversos compostos de interesse econômico. Nesse processo, os microrganismos são cultivados em meio líquido e convertem substratos, como fonte de carbono, nitrogênio e outros nutrientes em compostos, chamados metabólitos (primário ou secundário), que fazem parte do seu desenvolvimento bioquímico. Esses metabólitos podem apresentar bioatividade, sendo, por isso, de interesse industrial (Raimbault, 1998; Tabaraie *et al.*, 2020; Moreira, 2021).

O CS ocorre em meio composto basicamente por água e nutrientes dissolvidos, podendo ser realizado em agitador rotativo, usados em escala laboratorial para definir parâmetros, ou em biorreatores, tanto em escala laboratorial ou industrial. O CS promove homogeneidade do meio e, quando realizado em biorreator, permite o controle de parâmetros como pH, temperatura e oxigênio dissolvido (Subramaniam; Vimala, 2012; Moreira, 2021).

Durante o processo de produção de um metabólito, a escolha correta dos substratos e das condições de cultivo é fundamental, visto que o microrganismo responde às condições disponíveis. Portanto são necessários estudos para identificar os melhores parâmetros de cultivo (pH, temperatura, agitação), bem como os componentes nutricionais (fonte de carbono, nitrogênio) para otimizar a produção do composto de interesse.

O cultivo submerso em *Streptomyces* é comumente dado pelo crescimento do microrganismo em micélio dispersos ou pellets (Thakur *et al.*, 2023). Sendo assim, a formação e a morfologia dos pellets, em *Streptomyces*, dependem de parâmetros como velocidade de agitação, temperatura, pH, composição do meio e concentração de inóculo (Manteca; Yague, 2019a).

A agitação, em geral, pode reduzir o crescimento dos pellets, uma vez que altas velocidades de agitação podem desgastar os componentes das hifas da superfície do pellet ou romper o pellet enraizado, formando pellets com uma pequena morfologia filamentosa no meio

do caldo (Ribeiro *et al.*, 2021; Thankur *et al.*, 2023). Em estudos de Xia *et al.* (2014) sobre o efeito de velocidades de agitação em 150 e 220 rpm na formação da morfologia e de metabólitos secundários em *Streptomyces flocculus*, os autores verificaram que, ao aumentar a velocidade de agitação de 150 para 220 rpm, o micélio passou de pellets grandes para menores, mais biologicamente ativos, além de gerar um aumento na produção do composto em estudo, a lavendamicina, um agente modelo com propriedade anticâncer.

A temperatura também é um parâmetro importante que pode influenciar na morfologia dos microrganismos durante o cultivo, pois está relacionada com as enzimas do metabolismo microbiano (Thankur *et al.*, 2023). Em *Streptomyces* é comumente utilizado a temperatura entre 28-30 °C (Thankur *et al.*, 2023), como foi o caso do estudo de Boukaew *et al.* (2022) em *S. philanthi* e *S. mycarofaciens*. Os autores observaram que em temperaturas de 28°C ocorria o aumento do crescimento do microrganismo e a produção de metabólitos com propriedade antifúngica contra a *Botrytis cinerea*.

O pH pode afetar a produção de enzimas e a morfologia de bactérias filamentosas, pois influencia as interações eletrostáticas e hidrofóbicas da solução, que são cruciais para a formação da estrutura celular (Bourkaib *et al.*, 2021; Thankur *et al.*, 2023). Em um estudo de Yen e Li (2014a), os autores verificaram o efeito de diferentes condições de pH no crescimento e na produção de rapamicina por *S. hygrosopicus*. Eles verificaram que o pH 7,0 impedia a formação de pellets e promovia o crescimento filamentosos, aumentando a viscosidade do meio, enquanto valores de pH entre 2,0 e 4,0 favorecia a formação de pellets e filamentos curtos. No entanto, destaca-se a importância do controle do pH para otimizar não apenas a morfologia, mas também a produtividade do microrganismo, pois condições muito ácidas podem ter um efeito negativo na produção da biomassa (Thankur *et al.*, 2023).

A composição do meio de cultura é de suma importância para o crescimento dos microrganismos. No caso das actinobactérias, os diferentes componentes do meio de cultura e a adição de fontes de carbono variáveis (glucose, frutose, lactose, etc.) afetam a formação de pellets (Finger *et al.*, 2022a). Yen e Li (2014b), por exemplo, verificaram a formação de pellets na presença de glicerol e amido, em vez de fontes de carbonos tradicionais. O gênero *Streptomyces*, cujo habitat natural é o solo – local sólido, úmida e rica em nutrientes (Lajtai-Szabó *et al.*, 2022) – tem preferência por meios de cultura mais consistentes e ricos em nutrientes como a soja, aveia, amido ou glicerol (Boruta *et al.*, 2021).

Dessa forma, o cultivo submerso pode ser utilizado para produção de diversos compostos microbianos, como os colorantes naturais, que podem ser aplicados nas indústrias de alimentos, fármacos e principalmente têxtil, uma das mais poluentes e com maior consumo

de recursos no mundo. Uma alternativa mais sustentável e ecológica para indústria é o uso de colorantes naturais microbianos, como medida para reduzir problemas ambientais e toxicológicos, contribuindo para processos industriais mais verdes.

## 2.6 Colorantes naturais na indústria têxtil

A indústria global têxtil é uma das responsáveis pelo impacto ambiental. Estima-se que todos os anos, cerca de 98 milhões de toneladas de recursos não renováveis são consumidos, incluindo, por exemplo, fertilizantes para o cultivo de fibras naturais, petróleo para produção de fibras sintéticas e produtos químicos utilizados em diferentes fases da produção têxtil (Ellen Macarthur Foundation, 2017; Pizzicato *et al.*, 2023).

Os colorantes sintéticos são amplamente utilizados pela indústria têxtil pela reprodução rápida de tons e fixação; entretanto eles prejudicam ecossistemas aquáticos, diminuindo a demanda química do oxigênio (DQO) e inibindo a fotossíntese, consequentemente impedindo o crescimento das plantas (Khattab *et al.*, 2020; ADEEL *et al.*, 2024). Isso se dá, pois, as águas residuais do tingimento não contêm apenas cor, mas diversas substâncias químicas como antiespumantes, agentes oxidantes/redutores e diluentes (Pizzicato *et al.*, 2023; European Commission, 2023)

Os colorantes naturais podem ser aplicados em diferentes materiais fibroso, como fibra, fio, tecido ou peça de vestuário. No entanto, alguns colorantes naturais possuem baixa afinidade com o substrato, sendo necessário um mordente para melhorar a afinidade e as propriedades de solidez do colorantes, formando um complexo insolúvel com o colorante e o substrato (Manhita *et al.*, 2011; Nambela *et al.*, 2020).

O tingimento de tecidos com colorantes naturais pode ser feito por métodos convencionais ou não convencionais. No tingimento convencional, o colorante em uma solução é levado ao substrato por exaustão; esse método requer uma grande quantidade de energia, água e produtos químicos como dispersantes e agentes de nivelamento (Nambela *et al.*, 2020). Já o método não convencional utiliza de técnicas com ultrassom, micro-ondas e dióxido de carbono supercrítico, sendo considerado uma técnica de tingimento mais limpa, devido ao baixo custo de água e produtos químicos auxiliares (Shah; Shah, 2013; Nambella *et al.*, 2020).

Diante do exposto, ressalta-se a necessidade de buscar alternativa aos colorantes sintéticos, que, embora amplamente utilizados pelas indústrias (alimentícia, farmacêutica e têxtil), podem ser prejudiciais ao meio ambiente e à saúde. Os microrganismos, como as bactérias, apresentam-se como uma alternativa promissora devido à sua capacidade de produzir colorantes naturais de forma eficiente e sustentável. A bactéria *S. lavendulae* é capaz de

produzir o colorante azul indigoidina, que possui atividade antimicrobiana e antioxidante. No entanto, ainda há uma certa escassez de estudos sobre a produção desse composto. Assim, este trabalho busca estudar o processo de produção de indigoidina por cultivo submerso de *S. lavendulae* e sua aplicação em tecido, contribuindo para o avanço acadêmico e industrial.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Estudar a produção de indigoidina por cultivo submerso de *Streptomyces lavendulae* e a aplicação do extrato em tecido.

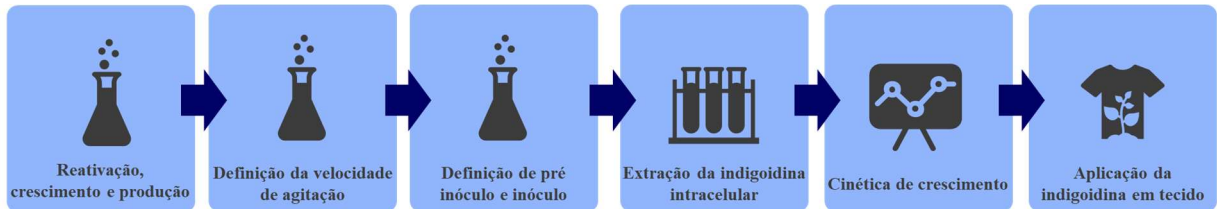
#### **3.2 Específicos**

- Avaliar a produção de indigoidina em meio de aveia por cultivo submerso de *S. lavendulae* em agitador orbital;
- Avaliar o efeito de diferentes micronutrientes no meio de cultura para a produção de indigoidina por cultivo submerso de *S. lavendulae* em agitador orbital;
- Avaliar a extração da indigoidina intracelular da biomassa de *S. lavendulae* empregando solventes orgânicos;
- Avaliar o estudo de cinética a fim de compreender o crescimento de *S. lavendulae* em relação a produção de indigoidina e o consumo de açúcar ao longo do tempo;
- Aplicar o extrato contendo a indigoidina em tecido de algodão.

## 4 METODOLOGIA

O estudo realizado neste trabalho, seguiu o esquema apresentado na Figura 5.

**Figura 5** – Esquema representativo dos processos realizados neste trabalho.



Fonte: Autor.

### 4.1 Material

O ágar, extrato de malte, extrato de levedura, glicose, carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) foi obtido por Acumedia, Kasvi, Neogen, Êxodo Científica, Synth (São Paulo, Brasil) respectivamente. A farinha de aveia foi obtida pela k-life, lote MA233 da Kinino (Mirassol, São Paulo) e a L-glutamina, sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4$ ) pela LS Chemicals, Sigma-Adrich (São Paulo, Brasil) respectivamente.

Os solventes utilizados, como acetato de etila foi obtido da Synth (São Paulo, Brasil), o dimetilsulfóxido (DMSO), hexano, metanol foram obtidos pela Êxodo (São Paulo, Brasil) e isopropanol pela Dinâmica (São Paulo). As especificações dos solventes utilizados estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1** – Especificações dos solventes utilizados neste trabalho.

Solventes	Especificações		
	Teor de pureza (%)	Densidade (g/mL)	Faixa de ebulição (°C)
Acetato de etila	99,5	0,900	77
DMSO	99,9	1,1	189
Hexano	-	0,658-0,69	-
Isopropanol	99,5	0,7840-0,47870	81 – 83
Metanol	99,8	0,791	64,7

Fonte: Autor.

A indigoidina microbiana (CAS: 2435-59-8) da Commercial Invoice (PN210887) foi obtida pela ProcureNet Limited (Tsim Sha Tsui, China) possui 99,5% de pureza. Sua aparência

é um pó azul com 99,87% de teor de acetilacetona, densidade de  $1,63\pm 0,06 \text{ cm}^3$ ; PKa de  $5,88\pm 0,40$  e o tempo de ebulição em  $285\pm 40,0 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.2 Microrganismo

A cepa de *Streptomyces lavendulae* CCT 2402 foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Adilson José da Silva do Departamento de Engenharia Química (DEQ), Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.

#### 4.3 Reativação, manutenção e crescimento

As cepas de *S. lavendulae* congeladas a  $-80^\circ\text{C}$  em 20 %v/v de glicerol foram reativadas em placa de petri contendo o meio SM (meio *Streptomyces*) durante 128h horas, sendo este o meio de reativação conforme sugerido pelo catálogo de Linhagens da Fundação André Tosello. A composição deste meio foi (g/L em água destilada): ágar (12), extrato de malte (10), extrato de levedura (4), glicose (4), carbonato de cálcio,  $\text{CaCO}_3$  (2), com pH final de 7,2.

Em seguida, realizou-se o repique para tubo de ensaio contendo 10 mL de ISP-2 ágar, durante 48 horas, constituindo a fase de inóculo (crescimento). A composição deste meio foi de acordo com Pridham *et al.* (1957) modificado pela retirada da glicose, e composto por (g/L em água destilada): extrato de levedura (4), extrato de malte (10), ágar (20), com o pH final de 7,2. A manutenção do microrganismo ocorreu em placas de petri contendo o meio de crescimento, o ISP-2. Todos os meios foram autoclavado a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos.

#### 4.4 Avaliação da produção de indigoidina por cultivo submerso de *S. lavendulae*

A avaliação da produção de indigoidina foi realizada em meio de aveia, utilizando frascos tipo Erlenmeyers de 250 mL contendo 25 mL do meio. Inicialmente, três condições foram testadas, conforme descritas na Tabela 2. Em seguida, a condição que apresentou a melhor produção foi utilizada para os estudos de influência da velocidade de agitação e para definição de pré-inóculo e inóculo, conforme descrito nos tópicos 4.4.1 e 4.4.2. Todos os meios tiveram o pH inicial ajustado para 7,2 e foram autoclavados a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos.

**Tabela 2** – Composição dos meios de cultura baseados em aveia para a produção de indigoidina por cultivo submerso de *S. lavendulae* em agitador rotativo.

Meio de cultura	Autor
Farinha de aveia (20 g/L), glicose (4 g/L)	Mendonça, 2011;
Farinha de aveia (20 g/L), glicose (1 g/L), L-glutamina (10 mM), MgSO <sub>4</sub> (1 mM)	Modificado de Panchanawaporn <i>et al.</i> , 2022;
Farinha de aveia (30 g/L), glicose (1 g/L), L-glutamina (5,5 mM), MgSO <sub>4</sub> (2,5 mM)	Modificado de Panchanawaporn <i>et al.</i> , 2022;

Fonte: Autor.

#### 4.4.1 Avaliação da velocidade de agitação na produção de indigoidina

A avaliação da velocidade de agitação foi realizada em agitador orbital, no qual testou-se três velocidades: 150, 200 e 250 rpm. O meio empregado nessa etapa e as demais condições de cultivo foram 20 g/L de farinha de aveia, 1 g/L de glicose, 10 mM de L-glutamina e 1 mM de MgSO<sub>4</sub>.

#### 4.4.2 Avaliação do pré inóculo e inóculo

As condições do estudo para a definição do pré inóculo e inóculo foram realizadas após 48 horas do crescimento da *S. lavendulae*, no qual adicionou-se 5mL de ISP-2 sem ágar para realização da raspagem e homogeneização das células no meio. Em seguida 500 µL foram coletados e lidos em OD<sub>600</sub> em espectrofotômetro (Thermo Scientific Genesys 10s UV-vis). Ao iniciar a absorbância em 0,1 Unidades de Absorbância a 600 nm (UA<sub>600nm</sub>), o pré-inóculo foi inoculado em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL do meio ISP-2 sem ágar e incubadas em agitador de bancada durante 24 e 48 horas.

A partir deste ponto, iniciaram-se estudos de avaliação do inóculo, sendo elas: 10% v/v em 24 horas; 15% e 30% v/v em 24 horas e 48 horas em frascos tipo Erlenmeyers de 250 mL contendo 25 mL do meio de aveia conforme o melhor resultado obtido a partir das condições apresentadas na tabela 1. A melhor condição de pré inóculo e inóculo (30% v/v em 48 horas) que produziu a indigoidina foi definida como padrão.

### 4.5 Extração da indigoidina intracelular

A extração da indigoidina intracelular ocorreu na biomassa obtida após a realização do primeiro cultivo deste trabalho, nomeadamente 30g/L de farinha de aveia, 1 g/L de glicose, 5,5 mM de L-glutamina e 2,5 mM de MgSO<sub>4</sub>. Para os estudos de extração, avaliou-se quatro condições de extração sólido-líquido de acordo com a Tabela 2. Em todos os ensaios, 0,5g de

biomassa foi lavada duas vezes sucessivamente empregando nos solventes citados na Tabela 3. A cada lavagem, o pellet foi agitado em vortex durante três minutos e em seguida, centrifugado a 25500 *xg* a 4°C por 15 minutos em centrífuga (Hitachi CR22N). O sobrenadante foi descartado e o pellet resultante após a última lavagem foi diluído em DMSO, agitado e centrifugado, de acordo com as condições anteriores, para obtenção da indigoidina. Este processo foi repetido cinco vezes ou até a biomassa perder a cor.

Vale ressaltar que o terceiro ensaio possui uma diferença entre os demais, pois o pellet da última lavagem ficou overnight durante 24h para que em seguida fosse diluído em DMSO, agitado e centrifugado sob as mesmas condições citadas anteriormente, para obtenção da indigoidina. O solvente que gerou o maior rendimento de extração foi selecionado como padrão.

**Tabela 3** – Extrações avaliadas para obtenção da indigoidina da biomassa intracelular de *S. lavendulae*.

	<b>Solvente</b>	<b>Autor</b>
A <sub>1</sub>	Água destilada, metanol e DMSO	Modificado de YU <i>et al.</i> , 2013
A <sub>2</sub>	Água destilada, metanol, acetato de etila e DMSO	Modificado de YU <i>et al.</i> , 2013; WEHRS <i>et al.</i> , 2019a
A <sub>3</sub>	Solução lise*, metanol, isopropanol, água destilada, etanol, hexano e DMSO	Modificado WEHRS <i>et al.</i> , 2018b
A <sub>4</sub>	DMSO	-

\*Composição da Solução lise: Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 1% e NaCl 100 mM.  
Fonte: Autor.

#### 4.6 Cinética de crescimento

O estudo da cinética de crescimento ocorreu por 168 horas sendo que a cada 24 horas, um frasco tipo Erlenmeyer foi retirado para análise. O processo de centrifugação foi o mesmo citado anteriormente e o sobrenadante foi empregado para quantificação da glicose e pH final enquanto a biomassa foi submetida a extração sólido-líquido para recuperação da indigoidina intracelular.

#### 4.7 Aplicação da indigoidina em tecido

A aplicação do extrato da indigoidina em tecido de algodão foi realizada de acordo com método de Ghiffary *et al.* (2021) com algumas modificações, no qual tecido de algodão com tamanho 4x4 cm foi lavado em detergente líquido comercial 4%v/v, enxaguados em água fria e secos em temperatura ambiente. O tecido seco foi colocado em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo 20 mL do extrato de indigoidina produzida por *S. lavendulae* e outro contendo a indigoidina comercial diluída em 1 g/L em DMSO.

Os frascos tipo Erlenmeyers foram mantidos em agitador rotativo a 30 °C, 100 rpm por 1 hora e 24 horas. Os tecidos tingidos foram lavados em água corrente até que a água de escoamento estivesse limpa e em seguida secos em estufa a 50 °C por 24 horas. O experimento foi realizado em triplicata, o colorante inicial e o residual dos frascos Erlenmeyer foi quantificado em espectrofotômetro e os tecidos tingidos em colorímetro (Konica Minolia, spectrophotometer CM-5) nos valores de cor CIELAB (L, a\*, b\*).

O espaço de cor CIELAB foi definido pela Comissão Internacional de Iluminação (CIE, do inglês *Commission on Illumination*) em 1976, no qual expressa a cor em três coordenadas: L\*, o valor de luminosidade que varia de 0 (preto) a 100 (branco); a\*, posição da cor entre o magenta (valor positivo) e verde (valores negativos) e b\*, a coordenada entre o amarelo (valor positivo) e azul (valor negativo). Além disso, para representação do cilindro CIELCh têm-se as coordenadas polares C\* (croma) e h° (ângulo de tonalidade), em vez das coordenadas cartesianas a\* b\* e o L\* que continua representando a luminosidade (CARTER *et al.*, 2018; GRIBER *et al.*, 2024).

#### 4.8 Métodos analíticos

**Determinação de Indigoidina:** A indigoidina produzida foi avaliada por espectrofotometria (Thermo Scientific Genesys 10s UV-vis) por leitura a 612 nm de acordo Wehrs *et al.* (2019). Foi realizado também uma varredura das amostras para confirmação deste comprimento de onda máximo. A concentração da indigoidina foi determinada empregando a curva de calibração (0,1 - 0,00625 g/L) (equação 1) construída com indigoidina de *Escherichia coli* modificada (99% de pureza) cedida pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Adilson José da Silva do Departamento de Engenharia Química (DEQ), Universidade Federal de São Carlos.

$$y = 10,545x - 0,0107 \quad R^2 = 0,9996 \quad (1)$$

**Determinação do pH:** A quantificação do pH foi realizado em pHmetro (Tecnal). Para a realização do ajuste de pH utilizou hidróxido de sódio (NaOH) para pH neutro a básico e ácido clorídrico (HCl) para pH ácido;

**Determinação de açúcares redutores:** A quantificação da glicose foi realizada pelo método de DNS (ácido dinitrosalicílico) de acordo com Miller (1959) com algumas modificações.

#### **4.9 Forma de análise de dados**

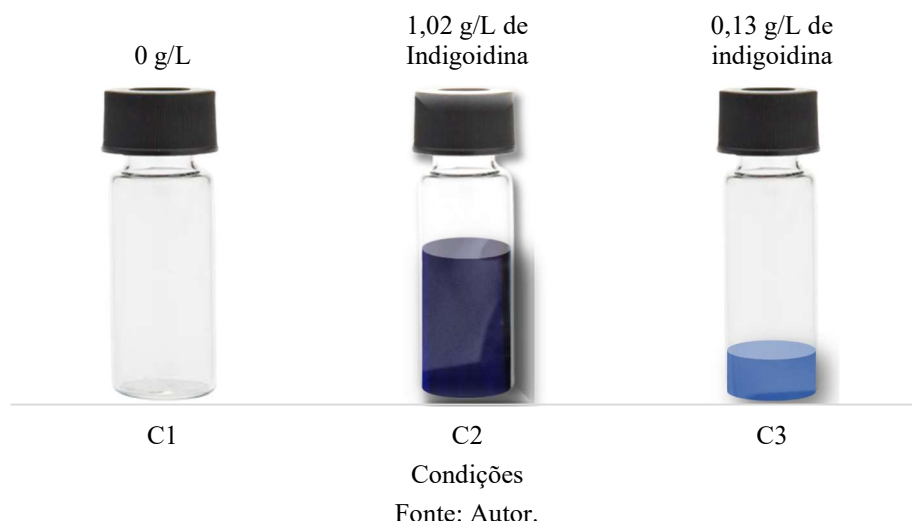
Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e testes estatísticos para verificação da normalidade foram realizados. De acordo com a distribuição dos resultados, foi aplicado o teste ANOVA. Além disso, foi feito um teste de seguimento (Tukey) para verificar diferenças entre os protocolos de tratamento. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Avaliação do meio de aveia e micronutrientes para produção de indigoidina por cultivo submerso de *S. lavendulae*

Os primeiros cultivos com *S. lavendulae* foram realizados empregando meio de cultura composto somente por farinha de aveia (20 g/L) e glicose (4 g/L). Porém, nessas condições a biomassa permaneceu sem coloração após o cultivo indicando que não houve biossíntese de indigoidina. Posteriormente, estudou-se meios de cultivos contendo não somente farinha de aveia e glicose, mas também L-glutamina (10 mM e 5,5 mM) e MgSO<sub>4</sub> (1 mM e 2,5 mM). Nessa condição, houve produção de indigoidina (figura 6) confirmando que os nutrientes L-glutamina e MgSO<sub>4</sub> são essenciais para a biossíntese de indigoidina por *S. lavendulae*. Esse resultado corrobora com a literatura que cita que a L-glutamina é o precursor direto da indigoidina, através da condensação de duas moléculas de L-glutamina e o magnésio na forma cátion divalente (Mg<sup>2+</sup>) é um íon cofator para ativação da síntese do colorante (Panchanawaporn *et al.*, 2022). Nesses ensaios, a indigoidina foi extraída da biomassa de *S. lavendulae* nas seguintes condições: água destilada, metanol e DMSO.

**Figura 6** – Esquema representativo da produção de indigoidina (g/L) por cultivo submerso de *S. lavendulae* nas seguintes condições: C<sub>1</sub>) 20 g/L de farinha de aveia, 4 g/L de glicose; C<sub>2</sub>) 20 g/L de farinha de aveia, 1 g/L de glicose 10 mM de L-glutamina, 1 mM de MgSO<sub>4</sub>; C<sub>3</sub>) 30 g/L de farinha de aveia, 1 g/L de glicose 5,5 mM de L-glutamina, 2,5 mM de MgSO<sub>4</sub>.



O meio de cultura C<sub>2</sub> (20 g/L de farinha de aveia; 1 g/L de glicose; 10 mM de L-glutamina; 1mM de MgSO<sub>4</sub>) proporcionou uma maior produção de indigoidina quando comparado ao meio de cultivo C<sub>3</sub> (farinha de aveia: 30 g/L; glicose: 1 g/L; L-glutamina: 5 mM; MgSO<sub>4</sub>: 2 mM) produzindo 1,02 g/L de indigoidina, valor 88% superior a indigoidina produzida

no meio 3 (0,13 g/L) (Figura 6). Deve-se citar que no meio de cultivo 3, empregou-se 30 g/L de farinha de aveia o que tornou o meio semissólido e não permitiu o bom desenvolvimento do cultivo no tempo avaliado.

A alta concentração de glicose pode favorecer o rápido crescimento do microrganismo e, conseqüentemente, resultar em maior produção de biomassa. Quando utilizou 4 g/L de glicose na primeira condição, observou-se um rápido crescimento. No entanto, não houve produção de indigoidina, o que corrobora com estudo de Karimian e colaboradores (2024), que sugere que altas concentrações de glicose podem inibir o metabolismo secundário devido à repressão catabólica do carbono (RCC), um mecanismo importante que regula o crescimento e a síntese de metabólitos em microrganismos (Rodrigues, 2022). Assim, em 4 g/L de glicose estudadas neste trabalho, o microrganismo pode ter redirecionado seus recursos metabólitos para o crescimento, enquanto, em concentrações mais baixas, como 1 g/L, pode diminuir essa repressão podendo desviar parte do seu metabolismo para produzir a indigoidina.

A L-glutamina desempenha um papel importante na síntese de indigoidina. No estudo de Panchanawaporn e colaboradores (2022), a produção de indigoidina foi positiva em 5 mM, e ao utilizar 10 mM houve um aumento de biomassa que se demonstrou irrelevante para *Aspergillus oryzae* modificado. No entanto, no presente estudo, a concentração de 10 mM de L-glutamina demonstrou-se adequada para síntese de indigoidina por *S. lavendulae*. Esse microrganismo consegue sintetizar rapidamente a L-glutamina devido à presença do gene BpsA, responsável por codificar a NRPS e ativar a 4'-phosphopantetheinyl transferase (PPTase) para que ocorra a síntese da indigoidina pela condensação de duas moléculas de L-glutamina (Yumusak *et al.*, 2019).

O magnésio, na forma de cátion divalente ( $Mg^{2+}$ ), foi identificado por Panchanawaporn *et al.* (2022) como suficiente para a produção de indigoidina na concentração de 2 mM. Segundo os autores, o  $Mg^{2+}$  ativa a enzima 4-PPTase, o que, por sua vez, ativa a síntese da indigoidina, convertendo-a na forma inativa para ativa, permitindo a biossíntese do metabólito. Eles postularam que o  $MgSO_4$  atua como um cofator que está envolvido na ativação da síntese do colorante. Entretanto, apesar de 2 mM ter sido ideal para o *A. oryzae*, deve-se considerar que este microrganismo modificado foi geneticamente modificado, e a resposta pode não ser a mesma para *S. lavendulae*.

A partir dos resultados obtidos e reportados, definiu-se o meio composto por: 20 g/L de farinha de aveia, 1 g/L de glicose, 10 mM de L-glutamina e 1 mM de  $MgSO_4$ , como o melhor dentre as condições estudadas, com uma produção de indigoidina de 1,02 g/L.

### 5.1.1 Extração da indigoidina da biomassa de *S. lavendulae*

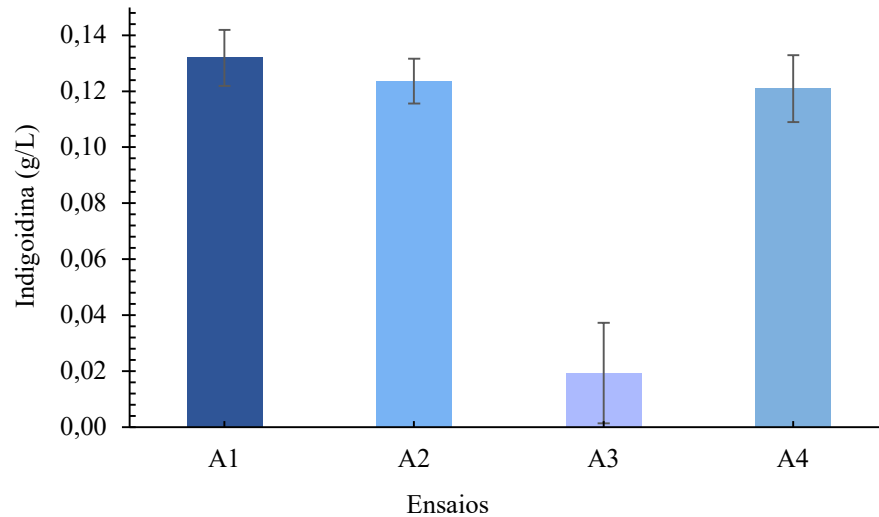
Estudos sobre a extração da indigoidina da biomassa de *S. lavendulae* são escassos na literatura. Logo, houve a necessidade de buscar um método para extração dessa biomolécula da biomassa de *S. lavendulae*. Para os ensaios de extração, empregou-se a biomassa produzida nas seguintes condições de cultivo 30 g/L de farinha de aveia, 1 g/L de glicose 5,5 mM de L-glutamina, 2,5 mM de MgSO<sub>4</sub>.

Ao fazer o levantamento bibliográfico sobre a extração da indigoidina, haviam dois autores que constantemente são citados pelos seus métodos de extração, nomeadamente Yu *et al.* (2013) e Wehrs *et al.* (2018b-2019a). Portanto, esses autores foram utilizados como as principais referências para os quatro ensaios de extração da indigoidina avaliados, conforme apresentado na Figura 7.

Entre os quatro métodos testados, o ensaio A<sub>1</sub> apresentou melhor rendimento de extração (0,132± 0,01 g/L), enquanto os ensaios A<sub>2</sub> (0,124±0,008 g/L) e A<sub>4</sub> (0,121±0,012 g/L) também demonstram boas produções, tendo uma correlação de 97,9%, ou seja, os valores de indigoidina extraído nos ensaios A<sub>2</sub> e A<sub>4</sub> são estatisticamente iguais mesmo em condições diferentes.

O ensaio A<sub>1</sub> foi definido como padrão para a realização da extração, uma vez que utiliza 2 solventes (metanol e DMSO) e tem o tempo de extração menor em comparação aos demais ensaios. O ensaio A<sub>4</sub> (DMSO) é um processo mais rápido ao comparamos com o ensaio A<sub>1</sub>, no entanto, o colorante apresentou uma coloração esverdeada, além da formação de espuma indicando outras substâncias além da indigoidina (Figura 7), por isso a utilização de solventes durante o processo de extração além de auxiliar no rompimento celular, também serve para remover impurezas e metabólitos que pode estar junto da célula (Yu *et al.*, 2013).

**Figura 7** – Comparação entre os ensaios de extrações para recuperação da indigoidina da biomassa de *S. lavendulae*: A<sub>1</sub>) água destilada, metanol e DMSO; A<sub>2</sub>) água destilada, metanol, acetato de etila, hexano e DMSO; A<sub>3</sub>) solução de lise, metanol, isopropanol, água, etanol, hexano e DMSO; A<sub>4</sub>) DMSO. Nível de significância de 0,05. Barras de erro para média  $\pm$  desvio padrão das amostras.



Fonte: Autor.

Na literatura a indigoidina não é solúvel em água e nem na maioria dos solventes orgânicos polares, mas o DMSO tem demonstrado ser um solvente adequado para a extração da indigoidina (Yu *et al.*, 2013). No entanto, é necessário realizar uma lavagem das células para remover os resíduos de meio e outros compostos que possam estar presentes na parede celular do microrganismo.

O ensaio A<sub>2</sub> não foi selecionado, pois possui um processo longo, com diversas etapas de lavagens. Além disso, durante as etapas de lavagens, mais solventes (metanol, acetato de etila, hexano) são utilizados comparados ao ensaio A<sub>1</sub>, e apesar do uso de solventes ter suas vantagens, como dito anteriormente, há a preocupação com o uso excessivo de solventes não amigáveis ao meio ambiente.

O ensaio A<sub>3</sub> promoveu a menor extração de indigoidina e o resultado apresentou um desvio padrão muito alto e próximo do valor médio ( $0,019 \pm 0,018$  g/L), mostrando a não confiabilidade dos resultados obtidos. Nessa condição, durante o processo de lavagem na

solução lise, muita biomassa foi perdida fazendo com que o rendimento final de indigoidina ficasse inferior aos demais. Além disso, nesses ensaios há o emprego de mais solventes (metanol, isopropanol, etanol, hexano) quando comparado as demais condições, além de secagem em 24 horas.

Diante do exposto, o ensaio A<sub>1</sub> (água destilada, metanol e DMSO) ficou padronizado para ser empregado ao longo de todo o trabalho.

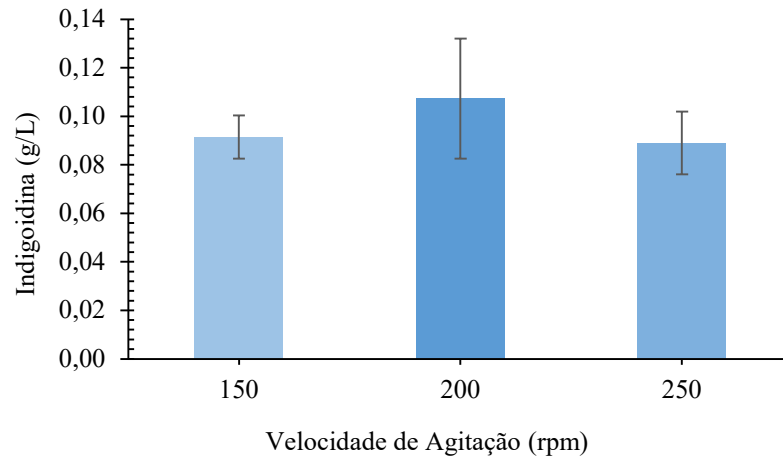
### 5.1.2 Estudos da velocidade de agitação na produção de indigoidina

O cultivo inicialmente foi realizado em 250 rpm, contudo, devido à rápida agitação, formação de espuma e pellet na parede dos frascos tipo Erlenmeyer, realizou-se teste em outras velocidades de agitação, nomeadamente 150 e 200 rpm. Assim, das três velocidades de agitações testadas, a de 200 rpm (Figura 8) gerou a maior produção (15% e 17% superior a 150 e 250 rpm, respectivamente) com  $0,107 \pm 0,025$  g/L de indigoidina, além de ter melhorado a problemática reportada anteriormente.

Os estudos sobre a produção de indigoidina em microrganismos heterólogos, como *Corynebacterium glutamicum*, *A. oryzae*, *Streptomyces lividans*, *Melittangium primigenium*, foi utilizado a velocidades de agitação de 200 e 250 rpm (Ghiffary *et al.*, 2021; Panchanawaporn *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2023b; Shehata, 2024). E no presente estudou, a produção de indigoidina por *S. lavendulae* estaria em conformidades com os parâmetros da velocidade de agitação empregadas em outros estudos.

Além disso, ao pensarmos no microrganismo em questão, é possível observar que a diferença de indigoidina produzida é mínima entre os três tipos de agitações (Figura 8) analisadas neste trabalho, corroborando com o levantamento bibliográfico de Boruta (2021) sobre parâmetros de cultivos submersos em *Streptomyces* para produção de metabólitos secundários, no qual é relatado que os valores utilizados em agitações estão entre 150 a 250 rpm.

**Figura 8** – Produção de indigoidina por cultivo submerso de *S. lavendulae* (média  $\pm$  desvio padrão) em diferentes velocidades de agitações. Nível de significância de 0,05. Barras de erro para média  $\pm$  desvio padrão das amostras.



Fonte: Autor.

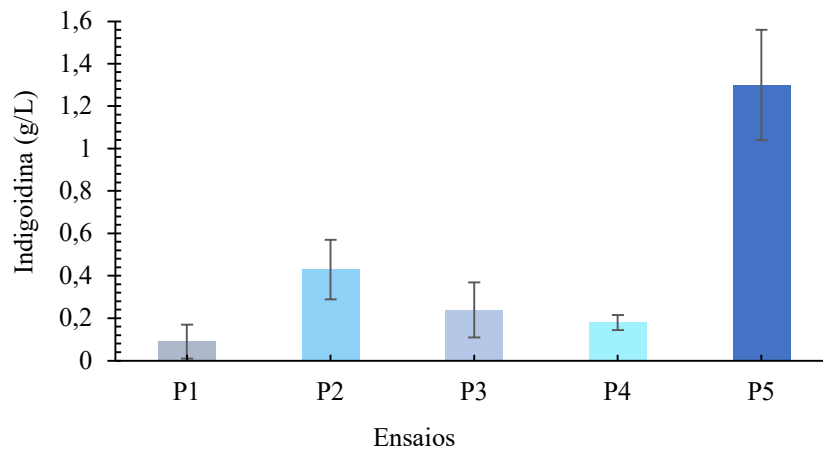
Embora haja diferenças entre os ensaios, os resultados apesar de distintos, quando analisados em seus desvios reduzidos, levam a uma interpretação de similaridade estatística, contudo a produção de indigoidina foi melhor na velocidade de agitação em 200 rpm, pois apresentou a melhor produção do colorante, mas vale ressaltar que somente a velocidade de agitação não é o único fator que deve ser considerado em relação a produção de colorante, pois outras condições como pH, temperatura e composição nutricional do meio de cultura também exercem influência no processo.

### 5.1.3 Definição de Pré inoculo e inóculo

Para os primeiros cultivos realizados, houve problemas de homogeneização do meio e diferença nos inóculos, provavelmente devido ao crescimento filamentososo do microrganismo. Assim, de forma a reduzir os erros experimentais, foi realizado um estudo para padronizar o pré-inóculo e inóculo dos cultivos.

Das cinco condições testadas, o ensaio P<sub>5</sub> (30% v/v em 48h) foi o que apresentou a melhor produção, gerando  $1,30 \pm 0,26$  g/L de indigoidina (Figura 9). Hobbs *et al.* (1989) e Pirt (1967) já destacavam a dificuldade em observar o crescimento do gênero *Streptomyces*, devido ao seu crescimento filamentososo, que pode variar entre espécies de *Streptomyces*. Em superfícies líquidas, a actinobactéria pode se diferenciar morfológicamente em micélios livremente dispersos, redes miceliais abertas ou aglomeradas e pellets (Dissel *et al.*, 2014; Manteca; Yague, 2018b; Lajtai-Szabó *et al.*, 2022).

**Figura 9** – Produção de indigoidina por cultivo submerso de *S. lavendulae* (média  $\pm$  desvio padrão) variando as condições do pré-inóculo e inóculo: P<sub>1</sub>) 10% v/v do inóculo em 24h; P<sub>2</sub>) 15% v/v do inóculo em 24h; P<sub>3</sub>) 15% v/v do inóculo em 48h; P<sub>4</sub>) 30% v/v do inóculo em 24h; P<sub>5</sub>) 30% v/v do inóculo em 48h). Nível de significância de 0,05. Barras de erro para média  $\pm$  desvio padrão das amostras.



Fonte: Autor.

As variações no erro padrão observadas em todas as condições testadas podem ser atribuídas ao crescimento na forma filamentososa. Contudo, apesar da dificuldade de homogeneização em meio líquido, é possível utilizar 30% v/v do inóculo em 48h. Por essa razão, essa condição ficou determinada como padrão para este trabalho, sendo necessário manter breves agitações a cada processo de inoculação para garantir uma mistura, mesmo que não completamente precisa. Assim, a partir desses estudos padronizou-se as seguintes condições: 30% v/v do inóculo crescido em 48h de incubação.

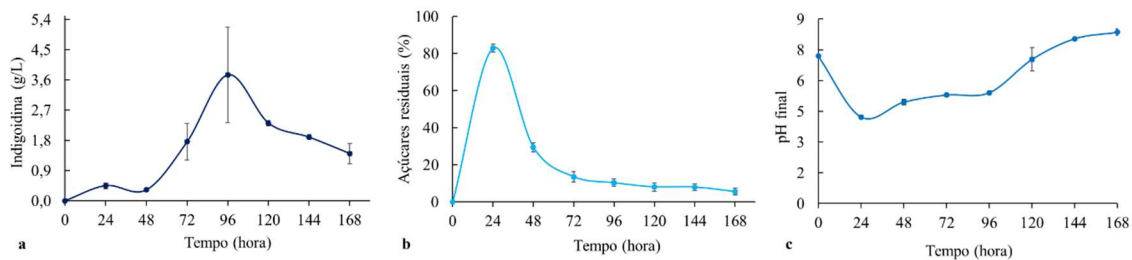
## 5.2 Cinética de crescimento do *S. lavendulae*

Após definida a condição de inóculo (30% v/v em 48h), meio de aveia (20 g/L de farinha de aveia; 1 g/L de glicose; 10 mM de L-glutamina; 1mM de MgSO<sub>4</sub>), velocidade de agitação (200 rpm) e extração da indigoidina (água destilada, metanol e DMSO), foi realizado o estudo da cinética de crescimento de *S. lavendulae* a fim de compreender o crescimento do microrganismo tal como a produção de indigoidina.

Desta maneira, através dos estudos de cinética foi possível observar que a produção máxima de indigoidina (3,45 g/L) (Figura 10a) ocorreu após 96 horas de bioprocesso, mas nas primeiras 24 horas (Figura 11) já foi possível observar uma leve coloração azul corroborando com trabalho de Finger e colaboradores (2019b), no qual em seus estudos as 20 horas já era notório a coloração azul e teve uma produção máxima de 2,5 g/L a partir das 35 horas pela bactéria *Pseudarthrobacter* sp.

Além disso, ao comparar com outros estudos sobre produção de corante azul, como a prodigiosina por *Serratia marcescens* (2,95 g/L<sup>-1</sup>) (CANG *et al.*, 2000), violaceína por *Janthinobacterium lividum* (3,5 g/L<sup>-1</sup>) (LU *et al.*, 2009) a produção de indigoidina ainda é maior que as demais moléculas, apesar de que o tempo de produção máxima seja menor ao compararmos com o presente trabalho. Entretanto, o tempo de produção de indigoidina por *S. lavendulae* ainda apresenta em vantagem ao observamos outros estudos de colorantes produzidos por *Streptomyces*, como é o caso de Kramar *et al.* (2014), no qual a produção de corante vermelho ocorre em 144h e para AI-Tekreeti; Luti (2023), a produção de amarelo foi em 160 horas.

**Figura 10** – Cinética de produção de indigoidina (a), consumo de glicose (b) e análise do pH (c) no cultivo submerso de *S. lavendulae*. Nível de significância de 0,05. Barras de erro para média ± desvio padrão das amostras.



Fonte: autor.

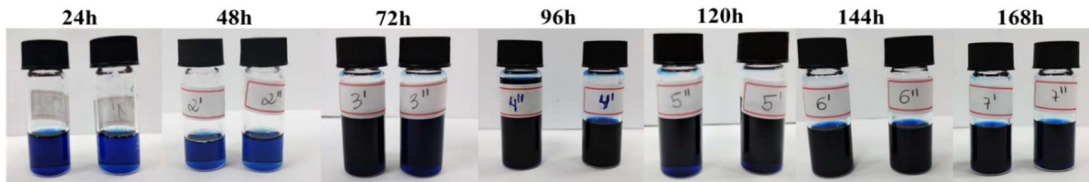
Durante as primeiras 24 horas de cultivo, o microrganismo consumiu 17% de glicose (Figura 10b) e teve um consumo acentuado até 72 horas de cultivo, no qual chegou a 86,51% de glicose consumida. Em relação a produção de indigoidina, houve uma produção acelerada entre os tempos de 48 a 96 horas, o que corrobora com o aumento do consumo de glicose, compreendendo que a medida em que o microrganismo consumia o açúcar, ocorria o aumento do crescimento e produção do corante.

No tempo de 96 horas de bioprocessamento, obteve-se a produção máxima do corante (3,75 g/L) e nesse tempo, aproximadamente 90% do açúcar foi consumido frisando que a glicose está fortemente entrelaçada ao desenvolvimento do microrganismo, pois à medida que o consumo aumenta, as fontes nutricionais diminuem causando um estresse ao microrganismo e assim aumentando desta forma a produção do corante.

Em relação ao pH (Figura 10c), nas primeiras 24 horas, no início da produção, o pH se encontrou mais ácido (4,22) enquanto ao final da produção (120 horas) o pH estava neutro (7,04), concluindo assim que a produção de indigoidina pela *S. lavendulae* ocorre preferencialmente em meios mais ácidos do que em básicos/neutros.

Os estudos de cinética de crescimento são fundamentais para compreender o padrão de crescimento do microrganismo e produção de metabolitos, sendo esse o principal objetivo da presente investigação. Com base nisso, estabeleceu-se o tempo de cultivo de 96 horas como o que proporcionava a maior produção de indigoidina.

**Figura 11** – Produção da indigoidina por cultivo submerso de *S. lavendulae* a cada 24h de bioprocesso.



Fonte: Autor.

### 5.3 Aplicação da indigoidina em tecido

O tecido de algodão foi tingido por indigoidina microbiana (IndM) e indigoidina comercial (IndC) diluídas em DMSO, durante 1 e 24 horas. Os parâmetros de cor CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) representados na Tabela 4 e as Figuras 12b e 13b, os tecidos com IndM e IndC demonstraram que não houve tingimento em 1 hora como pode ser observado através da cor (Figura 12d e 13d) obtida na análise do colorímetro. No entanto, é possível verificar por meio de observação visual que ocorreu um tingimento nas bordas do tecido pela IndC (Figura 13b), através de um leve realce de azul.

**Tabela 4** – Parâmetros CIELAB para o tecido de algodão após o processo de tingimento com Indigoidina. Sendo  $L$ , luminosidade (0 = preto, 100 = branco);  $a^*$ , cor no eixo verde-vermelho (valores negativos = verde, valores positivos = vermelho);  $b^*$ , cor no eixo azul-amarelo (valores negativos = azul, valores positivos = amarelo);  $C$ , croma (intensidade da cor) e  $h$ , ângulo de tonalidade (matiz da cor).

	Indigoidina microbiana (IndM)					Indigoidina comercial (IndC)				
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C$	$h$	$L^*$	$a^*$	$b^*$	$C$	$h^\circ$
<b>1 hora</b>	82,98	-2,36	0,92	2,545	158,55	86,085	-2,85	1,755	3,385	147,865
<b>24 horas</b>	82,495	-2,34	1,605	2,86	145,45	80,635	-11,12	-3,38	11,625	196,925

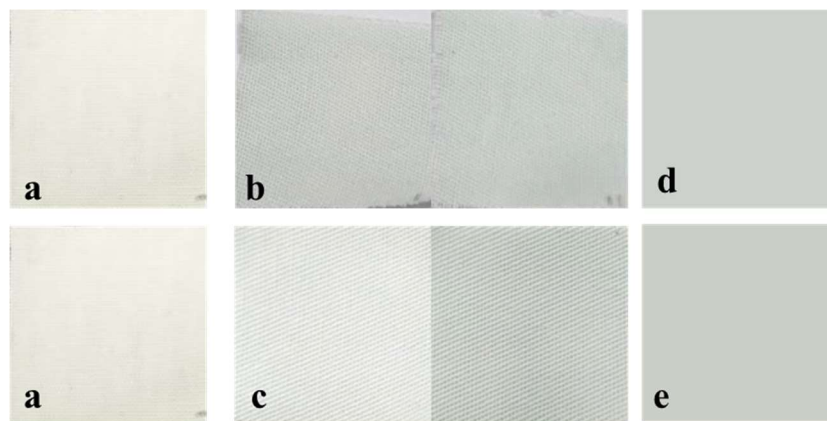
Fonte: Autor.

Ao verificar o processo de tingimento em 24 horas, foi possível verificar que o tecido foi tingido pela IndC (Figura 13c), no qual os valores obtidos em  $b^*$  indicam que a cor presente está coordenando para o azul, devido ao valor negativo em  $b^*$  (Tabela 4). Enquanto que pela

IndM o tecido não foi tingido (Figura 12c), mas a cor obtida no tecido se faz similar ao processo em 1 hora, pois os valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  estão bem próximos

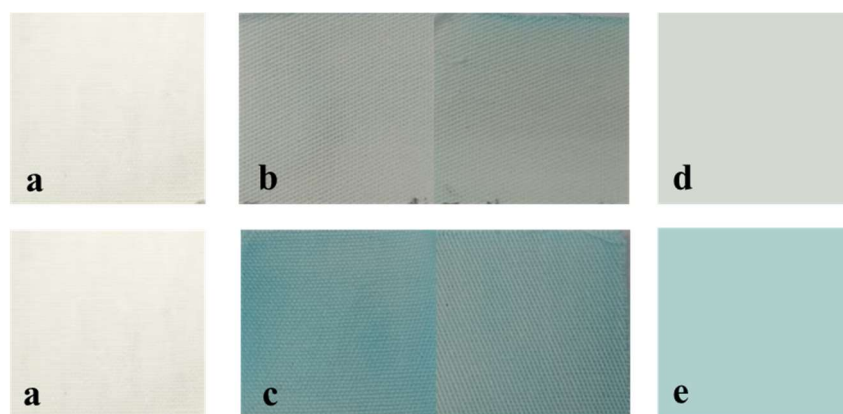
A indigoidina comercial (Commercial Invoice, PN210887) fornecida da China, não possui muitas descrições sobre este colorante pelo vendedor, no entanto comparamos os valores  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e  $C^*$  (Tabela 5) entre a comercial e a microbiana é possível verificar que elas são diferentes entre si, sendo a indigoidina comercial ser um azul mais verde, menos amarelo e mais saturada do que a indigoidina microbiana (Figura 14).

**Figura 12** – Tecido de algodão tingido por Indigoidina microbiana (IndM): a) tecido antes do processo de tingimento; b) tecido tingido após 1 hora; c) tecido tingido após 24 horas; d) cor demonstrada em colorímetro após 1 hora de tingimento; e) cor demonstrada em colorímetro após 24h de tingimento.



Fonte: Autor.

**Figura 13** – Tecido de algodão tingido por Indigoidina comercial (IndC): a) tecido branco; b) tecido 1 hora; c) tecido após 24 horas; d) cor demonstrada em colorímetro após 1 hora de tingimento; e) cor demonstrada em colorímetro após 24 horas de tingimento.



Fonte: Autor.

Ghiffary *et al.* (2021) produziram a indigoidina pela bactéria *C. Glutamicum* modificada e verificaram a aplicação do colorante em tecido de algodão em comparação com índigo

comercial e outro corante azul sintético sem aplicação de mordentes. Os pesquisadores obtiveram o tingimento no tecido nos três colorantes testados, contudo, no presente estudo só foi possível obter a coloração no tecido pela indigoidina comercial, o que confirma o uso de mordente devido a sua pouca afinidade as fibras têxteis (Pizzicato *et al.*, 2023).

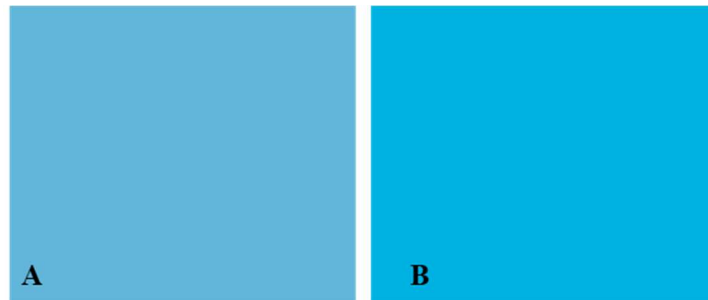
Os colorantes naturais possuem baixa afinidade com os substratos têxteis, além de apresentarem problemas, como a diminuição da solidez da cor (Kampeerappun *et al.*, 2011; Repon *et al.*, 2024). Assim, para minimizar tais problemas, utiliza-se o mordente, uma vez que são compostos que têm a capacidade de auxiliar na fixação do colorante na fibra têxtil, melhorando a reatividade (durabilidade da cor no tecido), substantividade (aumenta afinidade do colorante pelo tecido) e a propriedade de solidez (resistência da cor) nos tecidos (Haar *et al.*, 2013; Prabhu; Bhute, 2012; Repon *et al.*, 2024).

**Tabela 5** – Valores obtidos da indigoidina microbiana (IndM) e comercial (IndC) diluídas em DMSO antes e depois do processo de tingimento. Sendo L, luminosidade (0 = preto, 100 = branco); a\*, cor no eixo verde-vermelho (valores negativos = verde, valores positivos = vermelho); b\*, cor no eixo azul-amarelo (valores negativos = azul, valores positivos = amarelo); C, croma (intensidade da cor) e h, ângulo de tonalidade (matiz da cor).

		Indigoidina Microbiana (IndM)					Indigoidina Comercial (IndC)				
		L*	a*	b*	C*	h	L*	a*	b*	C*	h°
<b>1</b>	<b>inicial</b>	70,4	-15,4	-26,23	30,42	239,58	62,9	-52,37	-42,7	67,57	219,19
<b>hora</b>	<b>final</b>	70,37	-15,33	-26,25	30,4	239,72	63,28	-52,59	-42,38	67,54	218,86
<b>24</b>	<b>inicial</b>	70,87	-14,78	-24,58	28,68	238,98	63,43	-52,65	-42,28	67,53	218,76
<b>horas</b>	<b>final</b>	72,89	-13,49	-20,81	24,8	237,04	68,69	-53,47	-37	65,02	214,68

Fonte: Autor.

**Figura 14** – Cor da indigoidina diluída em DMSO: A) comercial e B) microbiana de acordo com as coordenadas obtidas na leitura do colorímetro.



Fonte: Autor.

Os colorantes (microbiano e comercial) teve o DMSO como o principal diluidor, uma vez que seu uso é eficaz em colorantes, assim como também é descrito na literatura que ele pode melhorar no controle da associação da cor e a intensidade (Chen *et al.*, 2015b -2016a; Wang *et al.*, 2014). No entanto, o DMSO presente na água residual após o processo de tingimento acaba não sendo ecologicamente correto, contudo, existe método de reciclagem do DMSO, no qual o consumo do solvente é menor, através da destilação a vácuo.

O problema deste método de reciclagem é o uso excessivo de energia, durante a mudança de fase vapor-líquido no processo de destilação a vácuo (Chen *et al.*, 2015b; Zhao *et al.*, 2024a), aumentando o gasto de energia. Mas os pesquisadores Zhao e colaboradores (2024a), relatam que o problema é utilizar o DMSO sozinho, se houver outros compostos de apoio, como foi o caso do sistema de tingimento com CO<sub>2</sub> supercrítico (SC-CO<sub>2</sub>, do inglês supercritical carbon dioxide) e etanol pelos pesquisadores, pode-se obter resultados positivos, como foi o caso dos autores, no qual melhoraram o processo de tingimento e conseguiram obter um baixo custo de energia.

Sendo assim, através dos testes realizados com a indigoidina microbiana e comercial em tecido de algodão, faz necessário estudos aprofundados quanto ao uso de mordente bem como a utilização do DMSO para diluir o colorante em tecidos, uma vez que a pesquisa visa buscar meios mais sustentáveis e amigáveis ao meio ambiente.

## 6 CONCLUSÃO

Neste estudo, a melhor produção de indigoidina por cultivo submerso de *Streptomyces lavendulae* ocorreu em meio de aveia, nas concentrações de 20 g/L de farinha de aveia, 1 g/L de glicose, 10 mM de L-glutamina e 2 mM de MgSO<sub>4</sub>. Além disso, ao padronizar a velocidade de agitação em 200 rpm e o inóculo em 30% v/v em 48h pode-se reduzir os erros e, conseqüentemente, melhorar a produção. A extração empregando lavagem em água destilada, metanol e em seguida a diluição em DMSO melhorou o processo e reduziu a quantidade de solventes utilizados. Através do estudo de cinética foi possível concluir que o melhor tempo de produção ocorreu em 96 horas. A aplicação da indigoidina comercial tingiu o tecido de algodão, enquanto que o extrato contendo a indigoidina produzida pela *S. lavendulae* necessita de novos estudos, incluindo estudos com a presença de mordente para melhor fixação do colorante em tecido. Além disso há uma preocupação quanto ao uso do DMSO no presente estudo, logo pesquisas futuras quanto a sua substituição e recuperação são de suma importância visando a melhoria e o aperfeiçoamento deste trabalho. Porém, o estudo demonstrou a produção de indigoidina por *S. lavendulae* e é um começo para novos estudos que otimizem a produção desse colorante microbiano que apresenta amplo mercado de aplicação, com destaque para a indústria têxtil.

## REFERÊNCIAS

- AI-TEKREETI, A. R. A.; LUTI, K. J. K. Utilization of an eco-friendly bioactive yellow pigment from *Streptomyces thinghirensis* AF7 for making colored antimicrobial fabrics. **Iraqi Journal of Science**, v. 64, n. 09, p 4415-4426, 2023.
- AMBATI, R. R.; PHANG, S-M.; RAVI, S.; ASWATHANARAYANA, R. G. Astaxanthin: Sources, Extraction, Stability, Biological Activities and Its Commercial Applications - A Review. **Marine Drugs**, v. 12, n. 1, p. 128-152, 2014.
- ADEEL, S.; YOUNIS, M.; MIA, R.; OZOMAY, M.; MIRNEZHAD, S.; IMRAN, M. Environmentally friendly greener approach toward sustainable application of amaltas brown pod-based natural colorant for wool yarn dyeing. **Journal of Engineered Fibers and Fabrics**, v. 19, 2024.
- BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of Antibiotics**, n. 58, v. 1, p. 01, 2005.
- BLACKBURN, R. S.; BECHTOLD, T.; JOHN, P. The development of indigo reduction methods and pre-reduced indigo products. **Coloration Technology**, v. 125, p. 193–207, 2009.
- BORUTA, T. Computation-aided studies related to the induction of specialized metabolite biosynthesis in microbial co-cultures: An introductory overview. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 21, p. 4021-4029, 2023.
- BOUKAEW, S.; YOSSAN, S.; Cheirsilp, B.; PRASERTSAN, P. Impact of environmental factors on *Streptomyces* spp. metabolites against *Botrytis cinerea*. **Journal Basic Microbiology**, v. 62, p. 611–622, 2022.
- BOURKAIB, M. C.; GAUDIN, P.; VIBERT, F.; GUIAVARC'H, Y.; DELAUNAY, S.; FRAMBOISIER, X.; HUMEAU, C.; CHEVALOT, I.; BLIN, J.-L. Aptes modified SBA15 and meso-macro silica materials for the immobilization of aminoacylases from *Streptomyces ambofaciens*. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 323, p. 11122, 2021.
- BROWN, S. A. **Engineering the indigoidine-synthesising enzyme BpsA for diverse applications in biotechnology**. 2018. Thesis (Doctor of Philosophy in Biotechnology) – Victoria University of Wellington, New Zealand, 2018.
- BYSTRYKH, L. V. *et al.* Production of actinorhodin-related" blue pigments" by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). **Journal of bacteriology**, v. 178, n. 8, p. 2238-2244, 1996.
- CANG, S.; SANADA, M.; JOHDO, O.; OHTA, S.; NAGAMATSU, Y.; YOSHIMOTO, A. High production of prodigiosin by *Serratia marcescens* grown on ethanol. **Biotechnology letters**, v. 22, p. 1761-1765, 2000.
- CARDON, D. **Natural Dyes – Sources, Tradition, Technology**. London: Archetype Publications, 2007.

CARTER, E. C.; JÁNOS, D.; SCHANDA, R.; HIRSCHLER, S.; JOST, S.; LUO, M. R.; MELGOSA, M.; OHNO, Y.; POINTER, M. R.; RICH, D. C.; VIÉNOT, F.; et al. CIE 15:2018. **Colorimetry**, 4th ed. Vienna: International Commission on Illumination, CIE, 2018.

CENICEROS, A.; KOVALCHUK, A.; PODDAR, H.; SCHERLACH, K.; MEDEMA, M.; POELARENDS, J. G.; PETRUSMA, M.; DIJKHUIZEN, L.; TAKANO, E. Chapter 2: Characterization of the *Streptomyces clavuligerus* indigoidine synthetase and its associated tautomerase. CENICEROS, A. **Bacterial natural products**. 2017. Thesis (Doctor in Microbial Physiology) – University of Groningen, Holanda, 2017.

CHAVAN, R. B. Indigo dye and reduction techniques. **Denim**, p. 37–67, 2015.

CHEIRSILPSIGURDSON, G. T.; TANG, P.; MONICA GIUSTI, M. Natural Colorants: Food Colorants from Natural Sources, **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, p. 261–280, 2017.

CHEN, L.; WANG, B.; CHEN, J.; RUAN, X.; YANG, Y. Characterization of dimethyl sulfoxide-treated wool and enhancement of reactive wool dyeing in non-aqueous medium. **Textile Research Journal**, v. 86, n. 5, p. 533-542, 2016b.

CHEN, L.; WANG, B.; RUAN, X.; CHEN, J.; YANG, Y. Hydrolysis-free and fully recyclable reactive dyeing of cotton in green, non-nucleophilic solvents for a sustainable textile industry. **Journal of Cleaner Production**, v. 107, p. 550-556, 2015a.

CLAESSEN, H. Über einen indigoblauen Farbstoff erzeugenden *Bacillus aus* Wasser. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene**, v. 7, p. 13-17, 1890.

DAPSON, R. The history, chemistry and modes of action of carmine and related dyes. **Biotech & Histochemistry**, v. 82, p. 173-187, 2007.

DAVE, S. R.; PATEL, T. L.; TIPRE, D. R. Bacterial degradation of azo dye containing waste. **Microbial Degradation of Synthetic Dyes in Wastewars**, p. 57-83, 2018.

DAY, P. A.; VILLALBA, M. S.; HERRERO, O. M.; ARANCIBIA, L. A.; ALVAREZ, H. M. Formation of indigoidine derived-pigments contributes to the adaptation of *Vogesella* sp. strain EB to cold aquatic iron-oxidizing environments. **Antonie Leeuwenhoek**, v. 110, p. 415–28, 2017.

DE MEJIA, A. G.; ZHANG, Q.; PENTA, K.; EROGLU, A.; LILA, M. A. The colors of health: chemistry, bioactivity and market demand for colorful foods and natural food sources of colorants. **Annual review of food science and technology**, v. 11, n. 1, p. 032519-051729, 2020.

DE OLIVEIRA, F. *et al.* *Talaromyces amestolkiae* cell disruption and colorant extraction using imidazolium-based ionic liquids. **Separation and Purification Technology**, p. 117759, 2020a.

DE OLIVEIRA, F. **Produção de colorantes naturais por *Talaromyces amestolkiae* para aplicação industrial**. 2020b. Tese (Doutorado em Biociências e biotecnologia Aplicadas à Farmácia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2020b.

DE OLIVEIRA, F. M. **Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem**. 2003c. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003c.

DEVI, M.; RAMAKRISHNAN, E.; DEKA, S.; PARASAR, P. D. Bacterial as a source of biopigmentos and their potential applications. **Journal of microbiological methods**, v. 219, p. 106907, 2024.

DISSEL, V. D.; CLAESSEN, D.; WEZEL, V. P. G. Chapter One - Morphogenesis of *Streptomyces* in Submerged Cultures. **Advances in Applied Microbiology**, v. 89, p. 1-45, 2014.

ELLEN MACARTHUR FOUNDATION. **A New Textiles Economy: Redesigning Fashion's Future**. 2017. Disponível em: <https://ellenmacarthurfoundation.org/a-new-textiles-economy>. Acesso em: 13 ago. 2024.

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

EUROPEAN COMMISSION. Zero Brine, D6.1 **Wastewater and Solution Provider Knowledge Models, Correlations and Interlinks**, October 2020. Disponível em: <https://ec.europa.eu/research/participants/documents/downloadPublic?documentIds=080166e5d4a61977&appId=PPGMS>. Acesso em: 13 ago. 2024.

FINGER, M.; SENTEK, F.; HARTMANN, L.; PALACIO-BARRERA, A.M.; SCHLEMBACH, I.; ROSENBAUM, M.A.; BÜCHS, J. Insights into *Streptomyces coelicolor* A3 (2) growth and pigment formation with high-throughput online monitoring. **Engineering in Life Sciences**, v. 23, p. 2100151, 2022a.

FINGER, S.; GODOY, A. F.; WITTEW, G.; ARANDA, P. C.; CALDERÓN, R.; MIRANDA, D. C. Purification and characterization of indochrome type blue pigment produced by *Pseudarthrobacter* sp. 34LCH1 isolated from Atacama Desert. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 46, n. 01, p. 101-111, 2019b.

GHIFFARY, R. N.; PRABOWO, S. P. C.; SHARMA, K.; YAN, Y.; LEE, Y. S.; KIM, U. H. High-level production of the natural blue pigment indigoidine from metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* for sustainable fabric dyes. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 9, p. 6613-662, 2021.

GRIBER, Y. A.; SAMOILOVA, T.; AL-RASHEED, A. S.; BOGUSHEVSKAYA, V.; CORDERO-JAHR, E.; DELOV, A.; GOUAICH, Y.; MANTEITH, J.; MEFOH, P.; ODETTI, J. V.; POLITI, G.; SIVOVA, T. Playing with Color: How Similar is the Geometry of Color Harmony in the CIELAB Color Space across Countries? **Arts**, v. 13, n. 53, 2024. DOI <https://doi.org/10.3390/arts1302005>.

GUNASEKARAN, S.; POORNIAMMAL, R. Optimization of fermentation conditions for red pigment production from *Penicillium* sp. under submerged cultivation. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 12, p. 1894-1898, 2008.

HAAR, S.; SCHRADER, E.; GATEWOOD, B.M. Comparison of aluminum mordants on the colorfastness of natural dyes on cotton. **Clothing Textiles Research Journal**, v. 31, p. 97–108, 2013.

HAZARIKA, S. N.; THAKUR, D. Actinobacteria. **Beneficial microbes in agro-ecology**, p. 443-476, 2020.

HOBBS, G.; FRAZER, M. C.; GARDNER, J. C. D.; CULLUM, A. G.; OLIVER, G. S. Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 272-277, 1989.

JIA, L.; LU, W.; HU, D.; FENG, M.; WANG, A.; WANG, R.; SUN, H.; WANG, P.; XIA, Q.; SANYUAN, M. A. Genetically engineered blue silkworm capable of synthesizing natural blue pigment. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 235, p. 123863, 2023.

KABISH, K. A.; ABATE, T. M.; ALEMAR, A. Z.; GIRMA, S. The importance of natural indigo dye and its revitalization and Ethiopian potential for indigo growing. **Advances in Materials Science and Engineering**, p. 13, 2023.

KAMPEERAPPUN, P.; PHATTARARITTIGUL, T.; JITTRONG, S.; KULLACHOD, D. Effect of chitosan and mordants on dyeability of cotton fabrics with *Ruellia tuberosa* Linn. **Chiang Mai Journal Science**, v. 38, p. 95–104, 2011.

KARIMIAN, S.; FARAHMANDZAD, N.; MOHAMMADIPANAH, F. Manipulation and epigenetic control of silent biosynthetic pathways in actinobacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 65, 2024.

KHATTAB, T. A.; ABDELRAHMAN, M. S.; REHAN, M. Textile dyeing industry: environmental impacts and remediation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 3803–3818, 2020.

KRAMAR, A.; ILIC-TOMIC, T.; PETKOVIC, M.; RADULOVIC, N.; JOSTIC, M.; JOCIC, D.; NIKODINOVIC-RUNIC, J. Crude bacterial extracts of two new *Streptomyces* sp. Isolates as bio-colorants for textile dyeing. **World journal of microbiology and biotechnology**, v. 30, p. 2231-2240, 2014.

KSENOFONTOV, A. A.; LUKANOV, M. M.; BICHAN, N. G.; KHODOV, I. A.; KUDRYAKOVA, N. O.; KSENOFONTOVA, K. V.; ANTINA, E.V. Non-covalent supramolecular systems with photoinduced electron transfer based on zinc bis (dipyromethenate)s and C60. **Dyes and Pigments**, v. 185, p. 108918, 2021

KUHN, R.; STARR, P. M.; KUHN, A. D.; BAUER, H.; KNACKMUSS, J. H. Indigoidine and other bacterial Pigments related to 3,3' - Bipyridyl. **Archiv fuer Mikrobiologie**, v. 51, p. 71-84, 1965.

LAJTAI-SAZABÓ, P.; HULBER-BEYER, É.; NEMESTÓTHY, N.; BÉLAFI-BAKÓ, K. The role of physical support in secondary metabolite production by *Streptomyces* species. **Biochemical Engineering Journal**, v. 185, p. 108495, 2022.

LELLIS, B. *et al.* Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 2, p. 275-290, 2019.

LI, J.; DING, X.; ZHENG, J.; LIU, D.; GUO, F.; LIU, H.; ZHANG, Y. Determination of synthetic dyes in bean and meat products by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 37, p. 2439-2445, 2014a.

LI, Q.; CHEN, X.; JIANG, Y.; JIANG, M. C. **Morphological Identification of Actinobacteria – Basics and Biotechnological Applications**. InrechOpen, 2016b. *E-book*

LU, Y.; WANG, L.; XUE, Y.; ZHANG, C.; XING, H. X.; LOU, K.; ZHANG, Z.; LI, Y.; ZHANG, G.; BI, J.; ZHIGUO, S. A production on violet pigment by newly isolated psychrotrophic bacterium from glacier in Xinjiang, China. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 2, p. 135-141, 2009.

MADAMWAR, D.; TIWAIN, O.; JAIN, K. **Mapping of research outcome on remediation of dyes, dyes Intermediates and Textile industrial waste**. First Edition. India: Sardar Patel University, 2019. Disponível em: [https://dbtindia.gov.in/sites/default/files/Compendium\\_Master-File\\_1.pdf](https://dbtindia.gov.in/sites/default/files/Compendium_Master-File_1.pdf). Acesso em: 20 jun. 2024.

MANHITA, A. *et al.* Enlightening the influence of mordant, dyeing technique and photodegradation on the colour hue of textiles dyed with madder—A chromatographic and spectrometric approach. **Microchemical Journal**, v. 98, n. 1, p. 82-90, 2011.

MANTECA, A.; YAGÜE, P. *Streptomyces* as a source of antimicrobials: Novel approaches to activate cryptic secondary metabolite pathways. **Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods**, p. 119, 2019a.

MANTECA, A.; YAGUE, P. *Streptomyces* differentiation in liquid cultures as a trigger of secondary metabolism. **Antibiotics**, v. 7, n. 2, p. 1-13, 2018b.

MAZOTTO, M. A.; SILVA, J. D. R.; BRITO, L. A. A. D. B.; ROCHA, N. U.; SOARES, A. D. S. How can microbiology help to improve sustainability in the fashion industry. **Environmental Technology & Innovation**, v. 23, p. 1 – 22, 2021.

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

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Journal of Analytic Chemistry**, n. 31, p. 426-428, 1959.

MOREIRA, B. M. D. **Otimização das condições de cultivo submerso do fungo *Lasiodiplodia* sp. para produção de extratos com atividade antimicrobiana**. 2021. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2021.

MORETZSOHN, F. **Shells: a natural and cultural history**. Texas: Reakyion Books, 2023.

NAMBELA, L.; HAULE, V. L.; MGANI, Q. A review on source, chemistry, green synthesis and application of textile colorants. **Journal of Cleaner Production**, v. 246, p. 119036, 2020.

NARSING RAO, M. P.; XIAO, M.; LI, W. J. Fungal and bacterial pigments: secondary metabolites with wide applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 6 p. 1-13, 2017.

NEVES, M. R. **Produção de colorantes e atividade biológica de Esclerotiorina**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2016.

NUMAN, M.; BASHIR, S.; MUMTAZ, R.; TAYYAB, S.; REHMAN, N. U.; KHAN, A. L.; SHINWARI, Z. K.; AL-HARRASI, A. Therapeutic applications of bacterial pigments: a review of current status and future opportunities. **3 Biotech**, v. 8, n. 4, p. 207, 2018.

OLIVEIRA, C. F. D. **Produção de pigmentos por *Monascus ruber* CCT 3802 a partir do xarope de maltose como substrato**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola de Agronomia, Universidade Federal do Amazonas, Goiânia, 2017.

OUMAIMA, B.; FAOUZI, E. *Streptomyces* at the heart of several sectors to support practical and sustainable applications: a review. **Progress in microbes and molecular biology**, v. 6, n. 1, p. 2-46, 2023.

PAINT, G. I. **Discovery of cryptic compounds from *Streptomyces lavendulae* FRI-5 using engineered microbial host**. 2018. Thesis (Doctor of Science and Biotechnology) – Graduate School of Engineering, Osaka University, Osaka, 2018.

PAL, R. **Sustainability in the textile industry**. In: Muthu, S. S. (Ed). Textile Science and Clothing Technology. Spring Nature, p. 109-138, 2017.

PAMBOUKIAN, C. R. D. **Produção do antitumoral retamicina por *Streptomyces oliendensis* em processo descontínuo, alimentado e contínuo**. 2003. Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PANCHANAWAPORN, S.; CHUTRAKUL, C.; JEENOR, S.; ANANTAYANONM J.; RATTANAPHAN, N.; LAOTENG, K. Potential of *Aspergillus oryzae* as a biosynthetic platform for indigoidine, a non-ribosomal peptide pigment with antioxidante activity. **Plos One**, v. 17, n. 6, p.1, 2022.

PANG, B.; CHEN, Y.; GAN, F.; YAN, C.; JIN, L.; GIN, J. W. Investigation of indigoidine synthetase reveals a conserved active-site base residue of non-ribosomal peptide synthetase oxidase. **Journal of the American Chemical Society**, v. 142, p. 10931-5, 2020.

PIRT, S. J. A kinetic study of the mode of growth of surface colonies of bacteria and fungi. **Journal of General Microbiology**, v. 47, p. 181-197, 1967.

PRABHU, KH.; BHUTE, AS. Plant based natural dyes and mordants: a review. **Journal of Natural Product and Plant Resources**, v. 2, p. 649–664, 2012.

PRIDHAM, T. G.; ANDERSON, C.; FOLEY, C.; LINDENFELSER, A. L.; HESSELTINE, W. C.; BENEDICT, G. R. A selection of media for maintenance and taxonomic study of streptomycetes. **Antibiotics Annual**, p. 947- 953, 1957.

PIZZICATO, B.; PACIFICO, S.; CATUELA, D.; MIJAS, G.; MOLINER, M. Advancements in sustainable natural dyes for textile application: a review. **Molecules**, v. 28, p. 5954, 2023.

PORKODI, M.; BRAHMANE, P. M.; PATHAN, A. M.; POOJARY, N.; SINGH, S.; HARSHAVARTHINI, M.; NAGPURE, S. N. Indigo dyes: Toxicity, teratogenicity, and genotoxicity studies in *zebrafish* embryos. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 896, n. 503752, 2024.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 26-27, 1998.

RAM, S. MITRA, M.; SHAH, F.; TIRKEY, S.; MISHRA, S. Bacteria as an alternate biofactory for carotenoid production: a review of its applications, opportunities and challenges. **Journal of functional foods**, v. 67, p. 103867, 2020.

REPON, R. MD.; DEV. B.; RAHMAN, A. MD.; JURKONIENÈ, S.; HAJI, A.; ALIM, A. MD.; KUMPIJAITÈ, E. Textile dyeing using natural mordants and dyes: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 22, p. 1473-1520, 2024.

REDDY, B.N. Basis for the construction of phylogenetic trees. **Web Central Biology**, n. 2, p. 12, 2011.

REVERCHON, S., ROUANET, C., EXPERT, D.; NASSER, W. Characterization of indigoidine biosynthetic genes in *Erwinia chrysanthemi* and role of this blue pigment in pathogenicity. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 654-665, 2002.

RIBEIRO, R. M.; ESPERANÇA M. N.; SOUSA, A.; NETO, A. B.; CERRI, M. O. Individual effect of shear rate and oxygen transfer on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, p. 1721–1732, 2021.

RODRIGUES, A. K. **Processos microbianos para obtenção de lovastatina e ácido hialurônico**. 2022. Tese (Doutorado em Biologia molecular) – Departamento de Biologia Celular do Instituto de ciências biológicas da Universidade de Brasília (UNB), Brasília, 2022.

ROSS, S. **Advancing life Cycle Assessment of textile products to include textile chemicals: inventory data and toxicity impact assessment**. 2019. Disponível em: <https://publications.lib.chalmers.se/records/fulltext/246361/246361.pdf>. Acesso em 16 out. 2022.

SAMAC, A. D.; WILLERT, M. A.; MCBRIDE, J. M.; KINKEL, L. L. Effects of antibiotic-producing *Streptomyces* on nodulation and leaf spot in alfalfa. **Applied Soil Ecology**, v. 22, p. 55-66, 2003.

SANTOS, M. C.; BICAS, J. L. Natural blue pigments and bikaverin. **Microbiological Research**, v. 244, 126653, 2021. DOI <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126653>.

SANTOS, V. D. C. **Extração líquido-líquido de ácido clavulânico empregando sistemas micelares mistos de duas fases aquosas**. 2009. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. DOI 10.11606/D.9.2009.tde-30032009-181850. Acesso em: 18 jun. 2022.

SARON, C.; FELISBERTI, M. I. Ação de colorantes na degradação e estabilização de polímeros. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 124-128, 2006.

SENGUPTA, S.; BHOWAL, J. Characterization of a blue-green pigment extracted from *Pseudomonas aeruginosa* and its application in textile and paper dyeing. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, p. 30343-30357, 2023.

SER LENG, H.; TAN, H. T. L.; LAW, F. W. J.; CHAN, G. K.; DUANGJAI, A.; SAOKAEW, S.; PUSPARAJAH, P.; MUTALIB, A. S. N.; KHAN, M. T.; GOH, H. B.; LEE, H. L. Focused review: cytotoxic and antioxidant potentials of mangrove-derived *Streptomyces*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2065, 2017.

SHAH, D. S.; SHAH, J. Unconventional techniques for energy conservation in textile wet Processing. **Environmental Science, Engineering, Materials Science**, 2013.

SHEHATA, N. **Heterologous Expression, Isolation, and Metabolomic Profiling of Myxobacteria to Explore Their Potential in Natural Product Biosynthesis**. 2024. Dissertação (Master of Pharmaceutical Sciences) – The University of Mississippi, Mississippi, 2024.

SILVA, W. S. **Produção de pigmentos fúngicos e seus uso no tingimento de tecidos**. 2014. Dissertação (Mestrado em Tecnologias para o Desenvolvimento Sustentável) – Universidade Federal de São João Del-Rei, Ouro Branco, 2014.

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

SUBRAMANIYAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **International Journal of Science and Nature**, Tamil Nadu, v. 3, n. 3, p. 480-486, 2012.

SWORD, T. T.; BARKER, J.; SPRADLEY, M.; CHEN, Y.; PETZOLD, J. C.; BAILEY, B. C. Expression of blue pigment synthetase a from *Streptomyces lavendulae* reveals insights on the effects of refactoring biosynthetic megasynthases for heterologous expression in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 210, p. 106317, 2023.

TABARAIE, B.; GHASEMIAN, E.; TABARAIE, T.; REZAZARANDI, M.; PARVIZI, E. Comparative evaluation of cephalosporin-c production in solid state fermentation and submerged liquid culture. **Journal of microbiology, biotechnology and food sciences**, v. 9, n. 5, p.83-94, 2020.

TAKAHASHI, H.; KUMAGI, T.; KITANI, K.; MORI, M.; MATOBA, Y.; SUGIYAMA, M.; Cloning and characterization of a *Streptomyces* single module type non-ribosomal peptide

synthetase catalyzing a blue pigment synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p.9073-9081, 2007.

THAKUR, M. T.; KUMAR, P.; RAJPUT, D.; YADAV, V.; DHAKA, N.; SHUKLA, R.; DUBEY, K. K. Genome-guided approaches and evaluation of the strategies to influence bioprocessing assisted morphological engineering of *Streptomyces* cell factories. **Bioresource Technology**, v. 376, p. 128836, 2023.

TORRES, F. A. E. ZACCARIM, B. R.; NOVAES, L. C. D. L.; JOZALA, A. F.; DOS SANTOS, C. A.; TEIXEIRA, M. F. S.; SANTOS-EBINUMA, V. C. Natural colorants from filamentous fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2511–2521, 2016.

USMAN, M. H.; ABDULKADIR, U. N.; GANI, M.; MAITURARE, M. H. Bacterial pigments and its significance. **MOJ Bioequivalence & Bioavailability**, v. 4, n. 3, p.0073, 2017.

VANKAR, P. S. **Handbook on natural dyes for industrial applications (Extraction of dyestuff from flowers, leaves, vegetables)**. NPCS. India: Niir Project Consultancy Services, 2016.

VARJANI, S.; RAKHOLIYA, P.; SHINDHAL, T.; SHAH, V. A.; NGO, H. H. Trends in dye industry effluent treatment and recovery of value-added products. **Journal of water process Engineering**, v. 39, p. 101734, 2021.

VENIL, C. K.; DUFOSSÉ, L.; DEVIL, R. P. Bacterial pigments: sustainable compounds with market potential for pharma and food industry. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, p. 1-17, 2020.

VOLCANI-ELAZARI, B. On *Pseudomonas indigofera* (Voges) Migula and its pigment. **Archive of Microbiology**, v. 10, p. 343-358, 1939.

WAKSMAN, Selman A.; HARRIS, Dale; LECHEVALIER, M. Studies on *Streptomyces lavendulae*. **Journal of Bacteriology**, v. 62, n. 2, p. 149-161, 1951.

WANG, B.; RUAN, X.; CHEN, L.; CHEN, J.; YANG, Y. Heterogeneous chemical modification of cotton cellulose with vinyl sulfone dyes in non-nucleophilic organic solvents. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 41, p. 15802-15810, 2014.

WEHRS, M.; GLADDEN, J. M.; LIU, Y.; PLATZ, L.; PRAHL, J. P.; MOON J.; PAPA, G.; SUNDSTROM, E.; GEISELMAN, G. M.; TANJORE, D.; KEASLING, J. D.; PRAY, T. R.; SIMMONS, B. A.; MUKHOPADHYAY, A. Sustainable bioproduction of the blue pigment indigoide: Expanding the range of heterologous products in *R. toruloides* to include non-ribosomal peptidest. **Green Chemistry**, v. 21. p. 3394-3406, 2019a.

WEHRS, M.; PRAHL, P. J.; MOON, J.; TANJORE, D.; KEASLING, D. J.; PRAY, T.; MUKHOPADHYAY, A. Production efficiency of the bacterial non-ribosomal peptide indigoidine relies on the respiratory metabolic state in *S. cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 193, p. 1-11, 2018b.

WOODHAMS, D. C. *et al.* Prodigiosin, violacein, and volatile organic compounds produced by widespread cutaneous bacteria of amphibians can inhibit two Batrachochytrium fungal pathogens. **Microbial Ecology**, v. 75, p. 1049-1062, 2018.

XIA, X.; LIN, S.; XIA, X.-X.; CONG., F.-S., ZHONG.; J.-J. Significance of agitation induced shear stress on mycelium morphology and lavendamycin production by engineered *Streptomyces flocculus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 4399–4407, 2014.

XU, F.; GAGE, D. ZHAN, J. Efficient production of indigoidine in *Escherichia coli*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 8, p. 1149-1155, 2015.

YADAV, S.; TIWARI, S. K.; GUPTA, C. TIWARI, K. M.; KHAN, A.; SONKAR, P. S. A brief review on natural dyes, pigments: recent advances and future perspectives. **Results in chemistry**, v. 5, p. 100733, 2023.

YEN, H. W.; LI, Y. L. The effects of viscosity and aeration rate on rapamycin production in an airlift bioreactor by using *Streptomyces hygroscopicus*. **Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, p. 1149–1153, 2014a.

YEN, H. W.; HSIAO, H. P.; CHEN, L. J. The enhancement of rapamycin production using *Streptomyces hygroscopicus* through a simple pH-shifted control. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, p. 743–747, 2014b.

YU, D.; XU, F.; VALIENTE, J.; WANG, S.; ZHAN, J. An indigoidine biosynthetic gene cluster from *Streptomyces chromofuscus* ATCC 49982 contains an unusual IndB homologue. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 40, p. 159-68, 2013.

YUMUSAK, C.; PROCHAZKOVA, J. A.; APAYDIN, D. H.; SEELAJAROEN, H.; SARICIFTCI, S. N.; WEITER, M.; KRAJCPVIC, J.; QIN, Y.; ZHANG, W.; ZHAN, J.; KOVALENKO, A. Indigoidine – Biosynthesized organic semiconductor. **Dye and Pigments**, v. 121, n. 107768, p. 1- 6, 2019.

YUSUF, L.; HAN, SHABBIR, M.; MOHAMMAD, F. Natural colorants: historical, processing and sustainable prospects. **Natural product and bioprospecting**, p. 1-23, 2017.

ZARKOGIANNI, M.; MIKROPOULOU, E.; VARELLA, E.; TSATSARONI, E. Colour and fastness of natural dyes: revival of traditional dyeing techniques. **Coloration Technology**, v. 127, n. 1, p. 18-27, 2010.

ZHAO, H.; ZHAO, Q.; TAN, L.; WANG, H. Low waste and low-energy consumption automation renovation of anhydrous dyeing system using anhydrous washing. **Sustainable chemistry and pharmacy**, v. 39, p.101548, 2024a.

ZHAO, M.; ZHANG, S-X.; XIONG, B-L.; LIU, K.; LI, F-X.; WANG, Q-F. Establishment of an efficient expression and regulation system in *Streptomyces* for economical and high-level production of the Natural Blue Pigment Indigoidine. **Agricultural and Food chemistry**: v. 72, p. 483-492, 2023b.