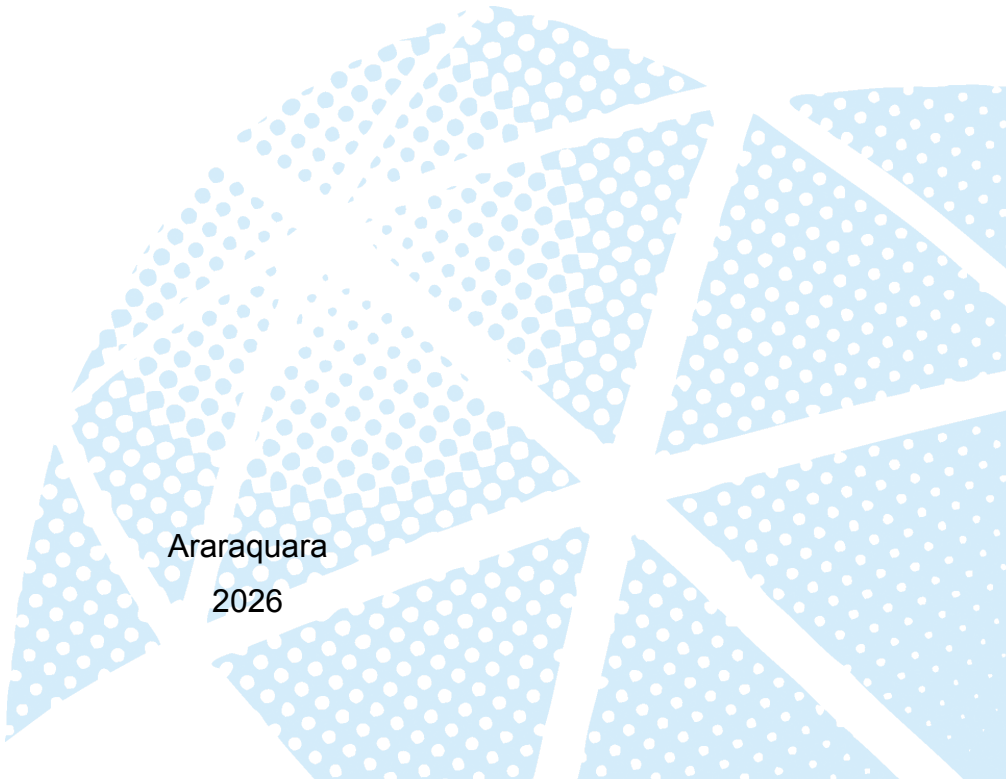


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Augusto Antonio Menzel
Gabriela de Angelo Gomes
Heitor Zaniolo Mascioli
Lorena Alicia Ferreira Prado
Pâmela Cristina de Souza
Vitória Pereira Moreira

Avaliação de meios de cultura alternativos para produção de roseoflavina por
Streptomyces davaonensis

Araraquara
2026



**Augusto Antonio Menzel
Gabriela de Angelo Gomes
Heitor Zaniolo Mascioli
Lorena Alicia Ferreira Prado
Pâmela Cristina de Souza
Vitória Pereira Moreira**

**Avaliação de meios de cultura alternativos para produção de roseoflavina por
*Streptomyces davaonensis***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Bacharel(a) em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ariela Veloso de Paula

Coorientador: Prof. Dr. Marcel Otavio Cerri

Araraquara

2026

A945 Avaliação de meios de cultura alternativos para produção de roseoflavina por *Streptomyces davaonensis* / Augusto Antonio Menzel ... [et al.]. – Araraquara, 2026.
84 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara.

Orientadora: Ariela Veloso de Paula.
Coorientador: Marcel Otavio Cerri.

1. Roseoflavina. 2. *Streptomyces davaonensis*. 3. Fermentação submersa. 4. Metabólitos. 5. Downstream. 6. Actinobacteria. I. Menzel, Augusto Antonio. II. Paula, Ariela Veloso de, orient. III. Cerri, Marcel Otavio, coorient. IV. Título.

**Augusto Antonio Menzel; Gabriela de Angelo Gomes; Heitor Zaniolo Mascioli;
Lorena Alicia Ferreira Prado; Pâmela Cristina de Souza; Vitória Pereira Moreira**

**Avaliação de meios de cultura alternativos para produção de roseoflavina por
*Streptomyces davaonensis***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentada à Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, Araraquara, para
obtenção do título de Bacharel(a) em
Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia.

Data da defesa: 24/06/2026

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcel Otávio Cerri
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Dr. Ivan Ilich Kerbauy Veloso
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Ila Maranhão de Oliveira
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

AGRADECIMENTOS

A realização do presente trabalho só foi possível graças ao apoio essencial de uma gama de pessoas e instituições. Os autores expressam seus sinceros agradecimentos aos professores orientadores Prof^a Ariela Veloso de Paula e Prof^o Marcel Otávio Cerri pela orientação dedicada ao estudo, bem como sua dedicação, disponibilidade e valiosas contribuições ao longo de todo o desenvolvimento do trabalho em pauta. Os autores estendem seus agradecimentos aos docentes do curso, que compartilharam conhecimentos e contribuíram para sua formação acadêmica, bem como aos técnicos e colaboradores dos laboratórios envolvidos, que auxiliaram de forma substancial na execução das atividades experimentais e no suporte ao longo da troca de conhecimentos. Ademais, à instituição de ensino os autores agradecem pela disponibilização de recursos essenciais e da infraestrutura fornecida, necessários para a devida concretização do estudo. Finalmente, vale ressaltar o agradecimento dos autores aos familiares, amigos e colegas, pelo apoio incondicional, incentivo, paciência e compreensão nos momentos de maior desafio, sendo fundamentais para a conclusão desta etapa e de toda a trajetória acadêmica.

RESUMO

A roseoflavina é um metabólito secundário produzido por *Streptomyces davaonensis*, caracterizado por sua atividade antimicrobiana e pelo potencial de aplicação em processos biotecnológicos e farmacêuticos. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes meios de cultura e estratégias de inoculação sobre o crescimento de *S. davaonensis* e a produção de roseoflavina, bem como propor uma estratégia de purificação do composto e de gerenciamento dos resíduos gerados durante o processo. Para isso, foram realizados cultivos submersos em frascos Erlenmeyer contendo diferentes combinações de fontes de carbono (amido de batata e fécula de mandioca) e nitrogênio (extrato de levedura e peptona), utilizando-se inóculos obtidos por suspensão de esporos e por células vegetativas. Os cultivos foram avaliados quanto à morfologia, produção de biomassa e espectrofotometria de varredura, sendo o meio AE (amido de batata e extrato de levedura) selecionado para o escalonamento em biorreator de bancada operado em batelada. Além disso, foi elaborada uma proposta teórica de purificação para trabalhos futuros, baseada em precipitação fracionada com sulfato de amônio, extração líquido-líquido com acetato de etila e análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC), complementada por um plano de gerenciamento e tratamento dos resíduos gerados. Os resultados demonstraram que o meio AE associado ao inóculo proveniente de células vegetativas proporcionou o melhor desempenho para o crescimento bacteriano. No cultivo em biorreator, a biomassa atingiu aproximadamente 9,4 g/L, seguida de estabilização compatível com a fase estacionária; entretanto, a produção de roseoflavina permaneceu reduzida nas condições avaliadas, indicando a necessidade de otimização de parâmetros operacionais, como agitação, transferência de oxigênio e tempo de cultivo. A estratégia proposta para purificação e o gerenciamento dos resíduos evidenciaram a viabilidade teórica de integrar operações de downstream e práticas sustentáveis ao processo produtivo. Em conjunto, os resultados obtidos estabelecem uma base para futuras investigações voltadas à otimização da produção de roseoflavina e ao desenvolvimento de um processo biotecnológico mais eficiente, reprodutível e ambientalmente sustentável.

Palavras-chave: roseoflavina; *Streptomyces davaonensis*; fermentação submersa; metabólito secundário; downstream.

ABSTRACT

Roseoflavin is a secondary metabolite produced by *Streptomyces davaonensis*, recognized for its antimicrobial activity and potential applications in biotechnology and the pharmaceutical industry. In this context, the present study aimed to evaluate the influence of different culture media and inoculation strategies on the growth of *S. davaonensis* and roseoflavin production, as well as to propose a purification strategy for the compound and a management plan for the waste generated throughout the process. Submerged cultivations were carried out in Erlenmeyer flasks using different combinations of carbon sources (potato starch and cassava starch) and nitrogen sources (yeast extract and peptone), with inocula prepared from either spores or vegetative cells. The cultures were evaluated regarding morphology, biomass production, and UV–Vis spectrophotometric scanning. Based on these results, the AE medium (potato starch and yeast extract) was selected for scale-up in a batch bench-scale bioreactor. Furthermore, a theoretical downstream process was proposed for future studies, including ammonium sulfate fractionation, liquid–liquid extraction with ethyl acetate, and high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis, together with a waste management and treatment strategy. The results showed that the AE medium combined with vegetative cell inoculum provided the highest bacterial growth. During bioreactor cultivation, biomass reached approximately 9,4 g/L, followed by stabilization, indicating the stationary growth phase. However, roseoflavin production remained low under the evaluated conditions, suggesting that operational parameters such as agitation, oxygen transfer, and cultivation time require further optimization. The proposed purification strategy and waste management approach demonstrated the theoretical feasibility of integrating downstream processing and sustainable practices into the production process. Overall, the findings provide a basis for future studies aimed at optimizing roseoflavin production and developing a more efficient, reproducible, and environmentally sustainable biotechnological process.

Keywords: roseoflavin; *Streptomyces davaonensis*; submerged fermentation; secondary metabolite; downstream processing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Via biossintética da roseoflavina em <i>Streptomyces davaonensis</i>	22
Figura 2 - Desenvolvimento metodológico do estudo	44
Figura 3 - Cultivo de <i>S. davaonensis</i> em biorreator Tecnal Tec-Bio-Flex em meio AE, por 77 horas	51
Figura 4 - Padrão de crescimento e tamanho das colônias de <i>S. davaonensis</i> em meios de cultura líquido AE inoculado com suspensão de esporos (A), meio AE inoculado com células vegetativas (B) e meio AP (C)	55
Figura 5 - Gráfico de colunas da média com intervalo de confiança de 95% das amostras de peso seco da biomassa de AP, FE e AE (inoculado com suspensão de esporos).	58
Figura 6 - Gráfico da espectrofotometria de varredura das amostras do cultivo em Erlenmeyer.	60
Figura 7 – Espectros de absorção UV-Visível da roseoflavina em água (curva 1)	61
Figura 8 – Crescimento da biomassa de <i>S. davaonensis</i> durante cultivo em biorreator ao longo de 77 horas	64
Figura 9 – Média das absorbâncias em 508nm das amostras retiradas do biorreator em tempos de 0h à 77h, com desvio padrão.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fontes de carbono e nitrogênio empregadas em cada tratamento experimental.	47
Tabela 2 – Composição das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas na formulação dos meios de cultivo.	48
Tabela 3 – Peso seco da biomassa da <i>Streptomyces davaonensis</i> após crescimento em diferentes meios de cultura líquidos.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AE	Amido de Batata + Extrato de Levedura
AF	8-demetil-8-amino-riboflavina (aminoflavina)
AFP	8-demetil-8-amino-riboflavina-5'-fosfato
ANOVA	Analysis of Variance (Análise de Variância)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Amido de Batata + Peptona
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido bicinconínico (Bicinchoninic Acid)
BSA	Albumina sérica bovina (Bovine Serum Albumin)
C/N	Relação Carbono/Nitrogênio
C18	Coluna cromatográfica octadecilsilano
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDW	Cell Dry Weight (Peso Seco Celular)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FE	Fécula de Mandioca + Extrato de Levedura
FMN	Flavina Mononucleotídeo
FP	Fécula de Mandioca + Peptona
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfônico
MS	Meio de esporulação Mannitol Soybean Broth Agar
NaOH	Hidróxido de sódio
ODS	Octadecilsilano
rDNA	DNA ribossômico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada (ANVISA)
RoF	Roseoflavina
RP-HPLC	Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography
rpm	Rotações por minuto
SmF	Fermentação Submersa (Submerged Fermentation)
SMM	<i>Streptomyces</i> Minimal Medium
TACO	Tabela Brasileira de Composição de Alimentos
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USDA	United States Department of Agriculture
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
YEPD	Yeast Extract Peptone Dextrose
YS	Meio de cultura Yeast Extract + Soluble Starch (Amido de Batata + Extrato de Levedura)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
g/L	Gramas por litro
kD	Constante de dissociação
mg/L	Miligramas por litro
mg/mL	Miligramas por mililitro
µg/mL	Microgramas por mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromolar
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mol/L	Mol por litro
nm	Nanômetro
U.A.	Unidade de Absorbância
v/v	Volume por volume
×g	Força centrífuga relativa (gravidades)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	<i>Streptomyces davaonensis</i>: CARACTERÍSTICAS GERAIS E MORFOLÓGICAS	19
3.2	ASPECTOS GERAIS DA ROSEOFLAVINA	20
3.2.1	BIOSSÍNTESE DA ROSEOFLAVINA	21
3.3	FONTES DE CARBONO ALTERNATIVAS	22
3.4	FONTES DE NITROGÊNIO COMPLEXAS E PURIFICADAS	24
3.5	RELAÇÃO ENTRE A FONTE DE NITROGÊNIO E FONTE DE CARBONO	25
3.6	FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM ESCALA LABORATORIAL E DE BANCADA	26
3.7	MÉTODOS DE MONITORAMENTO DO CULTIVO DE <i>Streptomyces davaonensis</i> PARA PRODUÇÃO DE ROSEOFLAVINA	27
3.8	PURIFICAÇÃO PRIMÁRIA	29
3.8.1	Centrifugação	29
3.8.2	Filtração	30
3.9	PURIFICAÇÃO SECUNDÁRIA	31
3.9.1	Teste para determinação da concentração de proteínas totais	31
3.9.2	Precipitação de proteínas utilizando sulfato de amônio	33
3.9.3	Extração líquido-líquido	36
3.9.4	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	37
3.10	GERENCIAMENTO E TRATAMENTO DE RESÍDUOS	39
3.10.1	Resíduos Sólidos e Líquidos em Processos Fermentativos	39
3.10.2	Normas de Biossegurança e Legislação Ambiental Vigente	41
4	METODOLOGIA	44
4.1	MICRORGANISMO E MANUTENÇÃO	44
4.2	PREPARO DO MEIO DE ESPORULAÇÃO	45
4.3	PREPARO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO	45
4.4	CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS	46
4.4.1	Inóculos de esporos em meios alternativos	46
4.4.2	Inóculos de células bacterianas em meio AE	48
4.5	ANÁLISES EXPERIMENTAIS	48
4.6	FERMENTAÇÃO EM ESTADO LÍQUIDO EM BIORREATOR OPERANDO EM REGIME BATELADA	49
4.6.1	Preparação do Inóculo e do Sistema de Cultivo	49

4.6.2	Cultivo de <i>Streptomyces davaonensis</i> em Biorreator	50
4.6.3	Monitoramento e Análises do Cultivo	52
4.7	GERENCIAMENTO E TRATAMENTO DE RESÍDUOS	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	ASPECTOS MORFOLÓGICOS E ANÁLISE VISUAL DO CRESCIMENTO DE <i>Streptomyces davaonensis</i>	55
5.2	DETERMINAÇÃO DO PESO SECO DA BIOMASSA DE <i>Streptomyces davaonensis</i>	57
5.3	COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ROSEOFLAVINA NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA POR ESPECTROFOTOMETRIA DE VARREDURA	59
5.4	ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Streptomyces davaonensis</i> DURANTE O CULTIVO EM BIORREATOR	63
5.5	COMPARAÇÃO DOS PERFIS ESPECTROFOTOMÉTRICOS DAS AMOSTRAS DE CULTIVO EM ERLLENMEYER E EM BIORREATOR	66
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	70
7	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

A crescente disseminação da resistência microbiana tem impulsionado a busca por novos compostos bioativos que possam contornar os mecanismos de escape bacterianos (Hemasa; Mack; Saliba, 2022). Nesse cenário, a roseoflavina surge como uma molécula de notável interesse. Produzida naturalmente pela actinobactéria *Streptomyces davaonensis*, a roseoflavina é o único antibiótico conhecido derivado da riboflavina (vitamina B₂) e atua como um antimetabólito que inibe seletivamente o crescimento de bactérias Gram-positivas, incluindo patógenos clinicamente relevantes como *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* (Hemasa; Mack; Saliba, 2022).

Seu mecanismo de ação envolve a captação por transportadores de riboflavina e a incorporação em cofatores flavínicos defeituosos, que competem com os análogos naturais e bloqueiam flavoproteínas essenciais, além de desregular riboswitches dependentes de flavina mononucleotídeo (FMN) (Pedrolli *et al.*, 2023). Para além da atividade antibacteriana, estudos recentes revelaram que a roseoflavina também pode atuar como sensibilizadora de células cancerígenas à ferroptose, ampliando seu espectro de aplicações biotecnológicas (Skafar *et al.*, 2026).

A biossíntese da roseoflavina em *S. davaonensis* ocorre por meio de uma via enzimática relativamente curta, mas extremamente específica. O processo tem início a partir do FMN (riboflavina-5'-fosfato), um cofator celular abundante, e envolve três enzimas principais: RosB, RosC e RosA. RosB converte FMN em AFP (8-demetil-8-amino-riboflavina-5'-fosfato), em seguida, RosC realiza a desfosforilação de AFP para gerar AF (8-demetil-8-amino-riboflavina), e, por fim, RosA atua como uma N,N-dimetiltransferase, transferindo grupos metila para converter AF na roseoflavina ativa (Liunardo *et al.* 2024). Embora essa via seja geneticamente bem caracterizada, a produção do composto pelo hospedeiro nativo em condições laboratoriais ainda é relativamente baixa, o que representa um gargalo para sua aplicação em larga escala e para estudos clínicos mais aprofundados (Kibling *et al.*, 2020).

Diante desse desafio, estratégias de otimização do processo produtivo tornam-se essenciais. Uma das abordagens mais tradicionais e eficazes na biotecnologia microbiana é a manipulação da composição do meio de cultura, uma vez que a disponibilidade de nutrientes influencia diretamente o metabolismo secundário dos microrganismos. Estudos demonstraram que a suplementação com precursores como riboflavina e purinas pode aumentar significativamente o rendimento de roseoflavina (Liunardo *et al.* 2024). Além disso, investigações recentes indicam que o tipo de fonte de carbono empregada, por exemplo, a substituição do amido por sacarose ou glicose em concentrações mais elevadas, pode praticamente duplicar a produção do antibiótico (Kibling *et al.*, 2020).

Diversos esforços têm sido feitos para escalonar a produção de roseoflavina, mas ainda persistem desafios significativos. O produtor natural *S. davaonensis* não é ideal para processos industriais, pois tende a aderir a superfícies e crescer em agregados, o que dificulta seu cultivo em biorreatores (Mora-Lugo *et al.*, 2019). Como alternativa, pesquisadores têm explorado hospedeiros heterólogos. Em 2019, Mora-Lugo *et al.* alcançaram uma produção de aproximadamente 14 mg/L de roseoflavina em linhagens recombinantes de *Corynebacterium glutamicum* em frascos agitados (Mora-Lugo *et al.*, 2019).

Recentemente, em 2025, houve um avanço nessa abordagem, desenvolvendo a linhagem CgRose6, que atingiu um título de $17,4 \pm 1,5$ mg/L em meio mínimo com glicose suplementado com tiamina, o maior valor reportado por um produtor não nativo até o momento (Brito *et al.*, 2025). Paralelamente, a produção por leveduras também tem sido investigada: Dymtruk *et al.* (2023) demonstraram que linhagens recombinantes de *Komagataella phaffii* cultivadas em biorreator acumularam até 130 mg/L de roseoflavina, valor cerca de uma ordem de grandeza superior ao obtido com o produtor nativo (Dymtruk *et al.*, 2023). Esses dados indicam que a produção em biorreatores e a escolha do hospedeiro são fatores críticos para a produção em escala.

Diante desse cenário, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o efeito de meios de cultura alternativos na produção de roseoflavina por *Streptomyces davaonensis* em cultivo submerso em biorreator. Especificamente, foram testadas diferentes formulações de meios, variando-se fontes de carbono e monitorou-se o crescimento bacteriano e a produção do antibiótico ao longo do tempo. Ao aliar a otimização do meio de cultura com o cultivo em biorreator, espera-se contribuir para o desenvolvimento de um processo produtivo mais eficiente, reprodutível e economicamente viável, aproximando a roseoflavina de aplicações biotecnológicas e farmacêuticas. A roseoflavina apresenta atividade antimicrobiana comprovada contra bactérias Gram-positivas, como *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, além de ser utilizada como molécula modelo no desenvolvimento de novos antibióticos direcionados a riboswitches FMN e em estudos sobre resistência bacteriana e metabolismo de flavinas (Jankowitsch *et al.*, 2011; Pedrolli *et al.*, 2015; Jiménez-Nava; Chávez-Camarillo; Cristiani-Urbina, 2026).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de roseoflavina por *Streptomyces davaonensis* empregando fontes alternativas de carbono e nitrogênio em diferentes sistemas de cultivo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na produção de roseoflavina por *S. davaonensis*
- Realizar o escalonamento do cultivo de *S. davaonensis* para biorreator de bancada, avaliando a viabilidade do processo
- Propor estratégias para a purificação da roseoflavina produzida, visando otimização do bioprocesso

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Streptomyces davaonensis*: CARACTERÍSTICAS GERAIS E MORFOLÓGICAS

O gênero *Streptomyces* compreende bactérias Gram-positivas e aeróbias amplamente reconhecidas por sua capacidade de produzir uma grande variedade de compostos bioativos, incluindo antibióticos e substâncias com atividade antifúngica (Goredema *et al.*, 2020).

Do ponto de vista biológico, *S. davaonensis* compartilha o padrão de desenvolvimento característico dos estreptomicetos, iniciado pela germinação dos esporos, seguida da formação de micélio vegetativo ramificado, do surgimento de hifas aéreas e, posteriormente, da diferenciação em cadeias de esporos. Sexton e Tocheva (2020), ao investigarem a formação de exósporos em *S. albus*, descrevem esse ciclo morfológico e mostram que as hifas vegetativas constituem estruturas alongadas e ramificadas, enquanto a esporulação ocorre a partir de hifas aéreas especializadas. Ainda que o estudo tenha utilizado técnicas avançadas de imagem, ele fornece base importante para a interpretação das estruturas visualizadas por microscopia óptica em espécies do gênero *Streptomyces*.

Ao longo do desenvolvimento, as colônias apresentam alterações morfológicas características. Inicialmente, possuem superfície relativamente lisa e, à medida que o crescimento avança, desenvolve uma trama de micélio aéreo com aspecto granular, pulverulento ou aveludado (Goredema *et al.*, 2020). A produção de pigmentos constitui outra característica marcante do gênero, sendo responsável pela coloração tanto do micélio vegetativo quanto do micélio aéreo, com tonalidades que variam do branco e creme até laranja, avermelhado e marrom (Goredema *et al.*, 2020).

Ao microscópio óptico, utilizando coloração de Gram e aumento de 1000×, as espécies de *Streptomyces* apresentam sua estrutura filamentosa característica, formada por uma rede de hifas ramificadas que constituem o micélio vegetativo (Goredema *et al.*, 2020). Já em cultivo submerso, *Streptomyces* pode crescer predominantemente na forma de pellets, constituídos por agregados compactos de hifas, embora a ocorrência de aglomerados filamentosos dependa das condições de cultivo (O'Shea, 1998). Em *S. davaonensis*, espécie produtora de roseoflavina, a formação desses pellets é influenciada por fatores como composição

do meio, intensidade de agitação e disponibilidade de oxigênio (Kibling *et al.*, 2020). Essa característica exerce influência direta sobre a transferência de oxigênio e nutrientes no cultivo, afetando a eficiência da produção de metabólitos secundários (Wang; Zhao; Ding, 2017).

A identificação molecular das espécies de *Streptomyces* é frequentemente realizada por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA, técnica amplamente utilizada para análises filogenéticas e classificação em nível de espécie (Goredema *et al.*, 2020). No caso de *S. davaonensis*, essa abordagem foi fundamental para confirmar sua classificação taxonômica e identificar os genes envolvidos na biossíntese da roseoflavina (Mack *et al.*, 2012).

3.2 ASPECTOS GERAIS DA ROSEOFLAVINA

A roseoflavina (8-dimetilamino-8-desmetil-riboflavina) é um pigmento natural de coloração rosa a vermelha, reconhecido como o único análogo natural da riboflavina (vitamina B₂) com atividade antibiótica descrito até o momento (Otani *et al.*, 1974). Estruturalmente, é um análogo da riboflavina e de seus derivados flavínicos, flavina mononucleotídeo (FMN) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD), característica que explica sua atuação como um potente antimetabólito (Jankowitsch *et al.*, 2011).

Sua fórmula molecular é C₁₈H₂₃N₅O₆, com massa molar de 405,41 g/mol e ponto de fusão entre 276 e 278 °C (Otani *et al.*, 1974). A molécula apresenta solubilidade moderada em água e elevada solubilidade em solventes orgânicos polares, como dimetilsulfóxido (DMSO), metanol e acetato de etila. Além disso, é fotossensível, sofrendo alterações em sua coloração quando exposta à luz por períodos prolongados (GLPBIO, s.d.).

A atividade antibiótica da roseoflavina é observada principalmente contra bactérias Gram-positivas, incluindo *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Sarcina lutea* (Otani *et al.*, 1974). Seu mecanismo de ação está relacionado ao antagonismo da riboflavina e ocorre por duas vias principais. Na primeira, a roseoflavina é convertida em análogos de FMN e FAD biologicamente inativos, comprometendo a atividade de flavoenzimas envolvidas em processos metabólicos essenciais. Na segunda, a molécula interfere em riboswitches dependentes de FMN ao se ligar aos seus aptâmeros com alta afinidade (K_D ≈ 100 nM), reprimindo a

expressão de genes relacionados à biossíntese e ao transporte de riboflavina. Como consequência, ocorre redução da disponibilidade intracelular de flavinas e comprometimento do crescimento microbiano (Jankowitsch *et al.*, 2011). Além da atividade antibacteriana, estudos demonstraram potencial antiparasitário da roseoflavina, evidenciado pela inibição da maturação de *Plasmodium falciparum*, protozoário causador da forma mais grave da malária humana (Jankowitsch *et al.*, 2011).

A produção natural de roseoflavina foi identificada em bactérias do solo pertencentes ao gênero *Streptomyces*, destacando-se *Streptomyces davaonensis*, *Streptomyces cinnabarinus* e *Streptomyces berlinensis* (Mack *et al.*, 2012). Como a roseoflavina é derivada estruturalmente da riboflavina, torna-se importante compreender o metabolismo dos flavinonucleotídeos celulares que atuam como precursores de sua biossíntese.

3.2.1 BIOSSÍNTESE DA ROSEOFLAVINA

A riboflavina é convertida em seus derivados biologicamente ativos por uma via metabólica conservada em procariotos e eucariotos. Inicialmente, a enzima riboflavina quinase catalisa a fosforilação da riboflavina, formando flavina mononucleotídeo (FMN). Em seguida, a FAD sintase promove a adenilação do FMN, originando flavina adenina dinucleotídeo (FAD), principal forma intracelular de flavina e cofator de diversas reações de oxirredução (Jankowitsch *et al.*, 2011).

A conversão da riboflavina em FMN e FAD é uma via altamente regulada por mecanismos de retroalimentação metabólica e por riboswitches dependentes de FMN, garantindo a homeostase celular dos flavinonucleotídeos (Joshi *et al.*, 2024). Em microrganismos produtores de roseoflavina, parte desse fluxo metabólico é direcionada para uma rota biossintética alternativa responsável pela formação desse metabólito secundário.

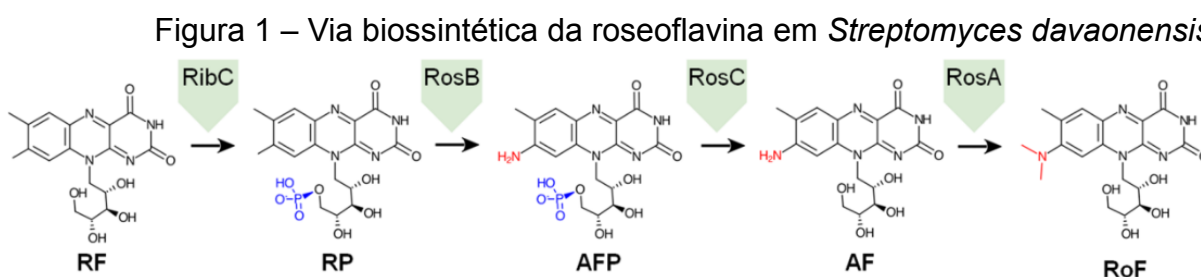
A elucidação dessa rota permitiu identificar um conjunto de genes específicos, denominado *cluster Ros*, responsável pelas etapas de conversão da riboflavina em roseoflavina (Mack *et al.*, 2012; Matern, *et al.*, 2016).

Adentrando na biossíntese, nota-se que a mesma envolve uma sequência de reações enzimáticas que promovem modificações estruturais no anel isoaloxazínico da riboflavina. Inicialmente, a riboflavina (RF) é fosforilada pela

enzima RibC (riboflavina quinase), formando riboflavina-5'-fosfato (RP). Em seguida, a flavina oxidase RosB converte RP em 8-desmetil-8-amino-riboflavina-5'-fosfato (AFP). Posteriormente, a ação da enzima RosC promove a formação de 8-desmetil-8-amino-riboflavina (AF). A etapa final é catalisada pela dimetiltransferase RosA, que utiliza S-adenosilmetionina (SAM) como doadora de grupos metila para realizar duas metilações consecutivas no grupo amino da AF, produzindo inicialmente 8-monometilamino-riboflavina (MAF) e, posteriormente, a roseoflavina (RoF), como demonstrado na Figura 1 (Matern, *et al.*, 2016; Mora-Lugo *et al.*, 2019).

Além de participar da etapa final da biossíntese, RosA é considerada uma enzima-chave para a formação do produto biologicamente ativo, uma vez que a introdução dos grupos metila confere à molécula suas propriedades antimetabólicas e antibióticas características. Estudos de mutagenese demonstraram que a interrupção dos genes *rosA*, *rosB* ou *rosC* resulta na perda ou redução significativa da produção de roseoflavina, evidenciando o papel essencial dessas enzimas na rota metabólica (Matern, *et al.*, 2016).

A Figura 1 apresenta um esquema simplificado da via biossintética da roseoflavina em *S. davaonensis*, destacando os principais intermediários metabólicos e as enzimas envolvidas em cada etapa da conversão da riboflavina em roseoflavina.



Fonte: Mora-Lugo *et al.* (2019)

3.3 FONTES DE CARBONO ALTERNATIVAS

As fontes de carbono são fundamentais em bioprocessos, pois servem como a principal base de energia e de carbono estrutural para o crescimento dos microrganismos e para a síntese de metabólitos. Para bactérias do gênero *Streptomyces*, o tipo de fonte de carbono disponível no meio de cultura está diretamente ligado ao desenvolvimento das células e à produção de metabólitos

secundários, como os antibióticos (Madigan *et al.*, 2018). Nesse sentido, fontes como glicose, sacarose, amido de milho e melaço são muito utilizadas como substratos em processos fermentativos para produzir enzimas, antibióticos e outros compostos de interesse (Sanchez; Demain, 2002).

Dentre as opções de fontes de carbono, os polissacarídeos, como o amido, se destacam por causa do baixo custo, da facilidade de encontrar e da aplicação em biotecnologia. A utilização de amido em fermentações é de extrema importância na escala industrial, porque permite trocar açúcares simples por matérias-primas mais baratas, sem que isso prejudique o crescimento do microrganismo ou a produção dos metabólitos (Zhu, 2015).

O amido é composto por duas frações principais: a amilose e a amilopectina, e possuem proporções diferentes conforme a origem. A amilose tem uma estrutura linear, enquanto a amilopectina é bastante ramificada, o que altera propriedades como a solubilidade, a gelatinização e a facilidade de ser quebrada por enzimas através do processo de hidrólise. Essas características na estrutura do amido influenciam a velocidade com que os açúcares são liberados no meio, o que acaba afetando o metabolismo microbiano (Zhu, 2015).

O amido de milho e a fécula de mandioca são fontes de carbono muito relevantes, principalmente em países com alta produção no setor de agroindústrias, como o Brasil (Soccol *et al.*, 2017). O amido de milho costuma ter uma composição e propriedades físico-químicas mais padronizadas, o que ajuda na reprodutibilidade dos cultivos no laboratório. Por outro lado, fatores como a organização dos grânulos e o processamento podem dificultar a ação das enzimas, o que às vezes resulta em uma degradação mais lenta quando comparado a outros tipos de amido (Copeland *et al.*, 2009).

Já a fécula de mandioca aparece como uma opção renovável, barata e muito disponível. Suas características estruturais geralmente facilitam a hidrólise enzimática, o que ajuda na liberação dos açúcares durante o processo. Entretanto, a composição da fécula pode variar bastante dependendo da origem da planta e de como ela foi processada, o que pode alterar suas propriedades funcionais (Zhu, 2015).

Além do tipo de fonte, a forma como esses açúcares ficam disponíveis no meio também alteram o funcionamento do metabolismo. Fontes que liberam o açúcar de forma gradual tendem a diminuir os efeitos de repressão catabólica, o que

ajuda na produção de metabólitos secundários. Já as fontes que o microrganismo consome muito rápido podem acabar direcionando o metabolismo com enfoque para o crescimento das células e não para o produto final (Madigan *et al.*, 2018).

Assim, escolher a fonte de carbono é um passo estratégico para o desenvolvimento de bioprocessos e otimização da produção. Usar fontes alternativas, como o milho e a mandioca, ajuda a reduzir custos e a direcionar o metabolismo, melhorando a eficiência das fermentações (Sánchez; Demain, 2002; Madigan *et al.*, 2018).

3.4 FONTES DE NITROGÊNIO COMPLEXAS E PURIFICADAS

O nitrogênio é um dos elementos mais importantes para os microrganismos, sendo essencial para fabricar proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes da célula. Em biotecnologia, a natureza e a disponibilidade da fonte de nitrogênio são fundamentais para regular o metabolismo, influenciando tanto a quantidade de biomassa quanto a produção dos metabólitos que se pretende obter (Madigan *et al.*, 2018).

As fontes de nitrogênio costumam ser classificadas em definidas ou complexas. As fontes definidas, como os sais de amônio, nitratos e a ureia, têm uma composição química conhecida e controlada, o que facilita na hora de repetir os experimentos e entender os fluxos metabólicos (Madigan *et al.*, 2018). Porém, essas fontes puras podem não atender todas as necessidades nutricionais de certos microrganismos, principalmente os que têm um metabolismo mais exigente. Além disso, a disponibilidade de nitrogênio regula a expressão dos genes e como a célula se adapta às condições do meio (Doroshchuk; Gelfand; Rodionov, 2005).

Por outro lado, as fontes complexas, como o extrato de levedura e a peptona, são muito usadas em fermentação por serem ricas e variadas. Elas contêm nitrogênio na forma de aminoácidos e peptídeos, além de vitaminas e minerais que funcionam como fatores de crescimento. Essa riqueza nutricional ajuda no desenvolvimento do microrganismo e pode trazer uma eficiência metabólica maior (Madigan *et al.*, 2018; Sánchez; Demain, 2002).

O extrato de levedura é uma das fontes complexas mais comuns, tendo uma alta concentração de aminoácidos livres, peptídeos e vitaminas do complexo B. Esses componentes são absorvidos facilmente pelos microrganismos, o que pode

acelerar o crescimento e aumentar a produção do produto de interesse (Madigan *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2025). Já a peptona é feita a partir da quebra parcial de proteínas animais ou vegetais, sendo composta basicamente por peptídeos e aminoácidos. Ela fornece nitrogênio de forma fácil para o microrganismo e influencia o seu perfil metabólico. Mas, como sua composição depende da matéria-prima e do processo de fabricação, isso pode acabar variando e afetando o desempenho do cultivo (Sánchez; Demain, 2002).

A escolha entre fontes purificadas ou complexas depende do objetivo do bioprocesso. Enquanto os meios definidos permitem um controle maior no laboratório, as fontes complexas são usadas quando o foco é maximizar o crescimento e a produtividade. Nesse cenário, a disponibilidade de nitrogênio tem um papel decisivo, podendo direcionar o metabolismo para crescimento ou produção de metabólitos secundários (Sánchez; Demain, 2002; Doroshchuk; Gelfand; Rodionov, 2005).

3.5 RELAÇÃO ENTRE A FONTE DE NITROGÊNIO E FONTE DE CARBONO

A relação entre as fontes de carbono e nitrogênio é um dos fatores que mais impactam o metabolismo microbiano. O balanço entre esses dois nutrientes, geralmente chamado de relação C/N, é fundamental para regular o crescimento das células e a produção das moléculas de interesse, pois afeta diretamente o caminho que o metabolismo vai seguir (Sánchez; Demain, 2002; Madigan *et al.*, 2018).

O carbono funciona como a principal fonte de energia e estrutura, enquanto o nitrogênio é indispensável para criar proteínas e o DNA celular. Por isso, o equilíbrio entre eles define se o metabolismo vai funcionar bem. Qualquer mudança na relação C/N pode alterar a forma como o microrganismo absorve nutrientes, sua taxa de crescimento e a eficiência de produção (Schmidell *et al.*, 2001).

Quando a relação C/N é baixa, com mais disponibilidade de nitrogênio do que carbono, o crescimento das células é favorecido. Já em condições de relação C/N alta, onde o nitrogênio acaba sendo o fator limitante, o metabolismo costuma ser desviado para a produção de metabólitos secundários, como os antibióticos (Doran, 2013). Isso acontece por causa de mecanismos de regulação onde a falta de nitrogênio sinaliza para a célula ativar as vias secundárias. Em bactérias

Gram-positivas, a disponibilidade de nitrogênio está ligada à forma como o microrganismo se adapta às condições nutricionais. Assim, controlar a relação C/N é uma forma de direcionar o metabolismo durante a fermentação (Doroshchuk; Gelfand; Rodionov, 2005).

Em um bioprocesso, a relação C/N é um parâmetro usado para otimizar o processo, sendo ajustada conforme o objetivo, seja para ter mais biomassa ou mais produto. Estudos mostram que mexer nessa relação impacta a produtividade e a eficiência do processo como um todo, sendo uma ferramenta importante para levar a produção da bancada para a escala industrial (Doran, 2013).

Além disso, o tipo de fonte de carbono e nitrogênio utilizada também altera a dinâmica da relação entre carbono e nitrogênio. Fontes de carbono mais lentas, como os polissacarídeos, liberam açúcares aos poucos, enquanto as fontes complexas de nitrogênio oferecem nutrientes já prontos para uso. Essa interação entre as fontes ajuda a controlar o desempenho da fermentação (Madigan *et al.*, 2018; Sánchez; Demain, 2002).

Portanto, a relação C/N é um ponto estratégico no desenvolvimento de bioprocessos. Entender como ela funciona é essencial para planejar os experimentos e conseguir os melhores resultados nas fermentações (Schmidell *et al.*, 2001).

3.6 FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM ESCALA LABORATORIAL E DE BANCADA

A fermentação submersa (submerged fermentation - SmF) é o método predominante para cultivo de *Streptomyces* em escala laboratorial e de bancada. Em estudo com *Streptomyces coelicolor*, Wentzel *et al.* (2012) estabeleceram condições operacionais otimizadas, incluindo temperatura de 30°C, pH ajustado para 7,0 com HCl e NaOH, agitação variável entre 325 e 1300 rpm, e manutenção do oxigênio dissolvido em níveis mínimos de 30 a 50% de saturação. Quanto aos meios de cultura, diferentes formulações são utilizadas para otimizar o crescimento e a produção de metabólitos. Estudos comparativos realizados por O'Shea (1998) com *Streptomyces natalensis* indicaram que meios à base de YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) promovem elevada produção de biomassa, enquanto meios para actinomicetos desenvolvidos por Sarra *et al.* (1996) também apresentam bom desempenho. A concentração de carbonato de cálcio (CaCO₃) influencia a produção,

sendo que a redução de 8 g/L para 4 g/L pode aumentar a produção de biomassa (O'Shea, 1998). Em estudos de biossíntese de roseoflavina, Jankowitsch *et al.* (2011) e Joshi *et al.* (2024) utilizaram o meio SMM (*Streptomyces Minimal Medium*) suplementado com oligoelementos.

Para estudos em escala laboratorial e de bancada, diferentes configurações experimentais são empregadas. Wentzel *et al.* (2012) descrevem o uso de frascos agitados (*shake flasks*) com volume de 50 a 150 mL em frascos de 250 mL, além de biorreatores de bancada com volumes de 200 mL a 350 mL em vasos customizados, sendo que a agitação pode ser mantida constante ou ajustada automaticamente para manter níveis adequados de oxigênio dissolvido.

A escolha do volume de cultivo é crítica, pois O'Shea (1998) demonstrou que volumes de 100 mL em frascos de 250 mL apresentam boa reprodutibilidade, enquanto volumes de 50 mL, embora apresentem desempenho superior, podem trazer problemas de reprodutibilidade. O monitoramento e controle da fermentação inclui diferentes parâmetros: Licona-Cassani *et al.* (2012) descrevem a determinação da biomassa por peso seco celular (CDW - *Cell Dry Weight*), enquanto O'Shea (1998) menciona a avaliação da produtividade específica por ensaios espectrofotométricos, como ensaios de Total Bioactive Pigments for Red Pigments (RED/TBP) para pigmentos. No trabalho de Wentzel *et al.* (2012), o oxigênio dissolvido foi monitorado continuamente por sondas no biorreator, e o sistema ajustava automaticamente a agitação e aeração para evitar limitação. O pH foi controlado por eletrodos acoplados a bombas que adicionavam ácido ou base conforme necessário, garantindo condições estáveis durante toda a fermentação.

Em sistemas mais sofisticados, pode-se utilizar agitação automática para manter níveis mínimos de oxigênio dissolvido, com incrementos manuais ou automáticos na rotação do agitador (Wentzel *et al.*, 2012).

3.7 MÉTODOS DE MONITORAMENTO DO CULTIVO DE *Streptomyces davaonensis* PARA PRODUÇÃO DE ROSEOFILAVINA

A produção de roseoflavina pode ser monitorada por diferentes técnicas, que fornecem informações complementares sobre a concentração, o crescimento microbiano e a morfologia da cultura. Entre os métodos empregados, a espectrofotometria *UV-Vis* destaca-se pela rapidez e simplicidade, sendo

amplamente utilizada para estimar a concentração de roseoflavina em sobrenadantes de cultivo. A técnica baseia-se na absorção de radiação eletromagnética em comprimentos de onda específicos, conforme a lei de Beer-Lambert, segundo a qual a absorbância é proporcional à concentração do analito, ao caminho óptico e ao coeficiente de absorção molar, desde que a amostra apresente homogeneidade e baixa interferência por espalhamento de luz (IUPAC, 2014; ASTM International, 2016). É possível então obter absorção característica da roseoflavina em aproximadamente 505 nm, decorrente da substituição estrutural presente no anel isoaloxazínico. Essa característica permite diferenciá-la da riboflavina e de outras flavinas, possibilitando sua quantificação de forma rápida (Sheraz *et al.*, 2014; Tsyrulnyk *et al.*, 2016). No entanto, a confiabilidade das análises depende da utilização de sobrenadantes previamente clarificados por centrifugação e, quando necessário, filtração, minimizando interferências causadas pela turbidez do meio. Além disso, devido à fotossensibilidade das flavinas, recomenda-se proteger as amostras da exposição à luz durante a coleta, armazenamento e análise, reduzindo a degradação do composto (Reule, 1976; Sheraz *et al.*, 2014; Tyagi *et al.*, 2010).

Além da quantificação do metabólito, o acompanhamento do crescimento de *Streptomyces* constitui um parâmetro importante para a interpretação da produção de roseoflavina. Em bactérias filamentosas, como *S. davaonensis*, a determinação da biomassa por peso seco é considerada o método mais adequado para quantificar o crescimento, uma vez que a formação de hifas, micélio ramificado e pellets limita a aplicação de métodos baseados em densidade óptica. A determinação da massa seca fornece uma medida direta da biomassa produzida e permite correlacionar o desenvolvimento da cultura com a síntese de metabólitos secundários (Fischer; Sawers, 2013; Sohoni; Bapat; Lantz, 2012). Estudos também demonstram que alterações na morfologia da biomassa influenciam diretamente a fisiologia celular e a produção de metabólitos em estreptomicetos, reforçando a importância desse parâmetro em processos fermentativos (Manteca; Yagüe, 2018).

Como técnica complementar, a microscopia óptica é utilizada para a avaliação qualitativa da morfologia da cultura, permitindo observar hifas vegetativas, micélio aéreo, cadeias de esporos, pellets e fragmentos miceliais. Embora não forneça dados quantitativos, sua aplicação auxilia na interpretação do estado fisiológico da cultura e das alterações morfológicas que ocorrem durante o cultivo, informações

que podem estar relacionadas ao crescimento celular e à produção de metabólitos secundários (Bennett *et al.*, 2018; Zacchetti; Smits; Claessen, 2018).

3.8 PURIFICAÇÃO PRIMÁRIA

A purificação primária, ou clarificação, constitui uma das etapas iniciais do processo de *downstream*. Seu objetivo é remover células, fragmentos celulares, partículas suspensas e outros sólidos remanescentes no caldo fermentativo, possibilitando a obtenção de uma fase líquida mais pura para as etapas subsequentes, possibilitando a obtenção de maior concentração do produto de interesse. A escolha das operações unitárias constituintes do processo depende das características do meio, tamanho das partículas, viscosidade do caldo e estabilidade do produto final.

3.8.1 Centrifugação

A centrifugação é uma operação unitária baseada na separação de componentes por diferença de densidade mediante a aplicação de uma força centrífuga superior à força gravitacional. Em bioprocessos, essa técnica é amplamente utilizada para separar células microbianas do caldo de fermentação, recuperar biomassa, remover detritos celulares e promover a clarificação de meios líquidos antes de etapas posteriores de purificação (Doran, 2013).

O princípio da centrifugação consiste na sedimentação das partículas em um campo centrífugo gerado pela rotação do equipamento. Quanto maior a diferença de densidade entre as partículas e o fluido, maior a eficiência da separação. Fatores como viscosidade do meio, tamanho das partículas e velocidade de rotação influenciam diretamente o desempenho do processo (Geankoplis, 2018).

Na indústria biotecnológica, os equipamentos mais empregados incluem centrífugas tubulares, de discos empilhados e decantadoras. As centrífugas de discos são particularmente importantes para a recuperação contínua de células bacterianas e leveduras devido à elevada capacidade de processamento e eficiência de separação (Stanbury; Whitaker; Hall, 2017). Já as centrífugas tubulares são utilizadas quando se deseja alta eficiência na remoção de partículas muito pequenas (Doran, 2013).

Entre as vantagens da centrifugação destacam-se a elevada velocidade de processamento, a possibilidade de operação contínua e a eficiência na separação de partículas finas. Entretanto, o método apresenta limitações, como alto consumo energético, custo elevado dos equipamentos e potencial dano celular decorrente das elevadas forças de cisalhamento. Além disso, o aquecimento gerado durante a operação pode comprometer a estabilidade de produtos biológicos sensíveis, exigindo sistemas adequados de refrigeração (Stanbury; Whitaker; Hall, 2017). Por essas características, a centrifugação é frequentemente empregada como etapa preliminar de clarificação em processos industriais.

3.8.2 Filtração

A filtração é uma operação unitária de separação sólido-líquido, que se baseia na passagem de uma suspensão através de um meio filtrante poroso, capaz de reter partículas sólidas enquanto permite a passagem do fluido. Trata-se de uma das técnicas mais tradicionais e amplamente utilizadas na recuperação de produtos provenientes de processos fermentativos (McCabe; Smith; Harriott, 2005).

Durante o processo, as partículas sólidas acumulam-se sobre o meio filtrante formando uma camada denominada torta de filtração (Doran, 2013). À medida que essa camada cresce, aumenta a resistência à passagem do fluido, reduzindo a taxa de filtração. A eficiência da operação depende de fatores como tamanho e concentração das partículas, viscosidade do meio, pressão aplicada e características do material filtrante (Geankoplis, 2018).

Nos processos biotecnológicos, a filtração pode ser empregada tanto para recuperação de biomassa quanto para obtenção de produtos extracelulares. Entre as principais modalidades destacam-se a filtração convencional, a filtração a vácuo e os processos de filtração por membranas, como microfiltração e ultrafiltração. As tecnologias de membranas ganharam grande relevância devido à elevada seletividade e à possibilidade de operar em condições brandas, preservando a atividade biológica dos produtos (Doran, 2013).

As principais vantagens da filtração incluem simplicidade operacional, baixo custo relativo e possibilidade de alta seletividade quando associada ao uso de membranas. Como desvantagens, destacam-se a redução gradual da taxa de filtração devido à formação da torta, o entupimento dos filtros e a necessidade de

substituição ou limpeza periódica dos meios filtrantes (McCabe; Smith; Harriott, 2005).

3.9 PURIFICAÇÃO SECUNDÁRIA

3.9.1 Teste para determinação da concentração de proteínas totais

A determinação da concentração de proteínas totais é uma etapa fundamental em estudos microbiológicos e biotecnológicos, pois fornece informações importantes sobre o crescimento celular, o metabolismo microbiano e a produção de biomoléculas de interesse. Em processos fermentativos envolvendo actinobactérias, como *S. davaonensis*, a quantificação de proteínas pode ser utilizada para monitorar a biomassa celular, avaliar a atividade metabólica e normalizar resultados obtidos em análises bioquímicas posteriores. Dessa forma, métodos colorimétricos para determinação de proteínas são amplamente empregados devido à sua simplicidade, sensibilidade e aplicabilidade em diferentes matrizes biológicas (Noble; Bailey, 2009).

Entre os métodos colorimétricos mais utilizados destacam-se o ensaio de Bradford e o método do ácido bicinconínico (BCA), ambos baseados em reações químicas que produzem alterações de cor proporcionais à concentração proteica presente na amostra. Esses métodos apresentam vantagens relacionadas à rapidez de execução, baixo custo operacional e possibilidade de análise de múltiplas amostras simultaneamente, características que os tornam amplamente empregados em laboratórios de pesquisa e desenvolvimento biotecnológico (Thermo Fisher Scientific, 2024).

O método de Bradford foi desenvolvido por Bradford (1976) e baseia-se na ligação do corante *Coomassie Brilliant Blue G-250* às proteínas presentes na amostra. Em solução ácida, o corante apresenta predominantemente coloração avermelhada; entretanto, ao se ligar principalmente aos resíduos de aminoácidos básicos, especialmente arginina, além de histidina, lisina e resíduos aromáticos, ocorre uma mudança estrutural que resulta na formação de um complexo de coloração azul intensa. A intensidade dessa coloração é proporcional à quantidade de proteína presente e pode ser determinada espectrofotometricamente, geralmente em comprimento de onda próximo a 595 nm (Bradford, 1976).

Uma das principais vantagens do método de Bradford é sua elevada sensibilidade, permitindo a quantificação de pequenas concentrações de proteínas em curto período de tempo. Além disso, o procedimento demanda poucos reagentes e apresenta execução relativamente simples, sendo amplamente utilizado em pesquisas envolvendo proteínas microbianas, enzimologia e biologia molecular (Noble; Bailey, 2009). Entretanto, o método apresenta algumas limitações importantes, especialmente relacionadas à variabilidade de resposta entre diferentes proteínas e à interferência causada por determinados compostos químicos presentes nas amostras, como detergentes aniônicos, particularmente o dodecil sulfato de sódio (SDS), que podem alterar significativamente os resultados obtidos (Stoscheck, 1990).

A resposta analítica do ensaio de Bradford também depende da composição de aminoácidos da proteína analisada, uma vez que proteínas ricas em resíduos básicos tendem a produzir maior intensidade de coloração em comparação com proteínas que apresentam menor quantidade desses aminoácidos. Por esse motivo, a albumina sérica bovina (BSA) é frequentemente utilizada como padrão para construção da curva analítica, embora diferenças estruturais entre a proteína padrão e as proteínas presentes na amostra possam introduzir variações na quantificação absoluta (Kruger, 2009).

Como alternativa ao método de Bradford, o ensaio baseado no ácido bicinconínico (BCA) destaca-se pela elevada robustez analítica e pela menor suscetibilidade às variações relacionadas à composição proteica. O método foi desenvolvido por Smith *et al.* (1985) e fundamenta-se na reação de biureto, na qual íons cúpricos (Cu^{2+}) são reduzidos a íons cuprosos (Cu^+) pelas ligações peptídicas das proteínas em meio alcalino. Posteriormente, os íons cuprosos formam um complexo estável com o ácido bicinconínico, originando uma coloração púrpura cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de proteínas presentes na amostra (Smith *et al.*, 1985).

O complexo formado entre o ácido bicinconínico e os íons cuprosos apresenta forte absorção na região de 562 nm, permitindo quantificações altamente reprodutíveis em ampla faixa de concentrações proteicas. Além disso, o método BCA apresenta menor dependência da composição de aminoácidos quando comparado ao ensaio de Bradford, proporcionando resultados mais consistentes para diferentes tipos de proteínas. Essa característica torna o método

particularmente útil em estudos envolvendo extratos celulares complexos, como aqueles obtidos a partir de cultivos microbianos (Smith *et al.*, 1985; Thermo Fisher Scientific, 2024).

Outra vantagem relevante do método BCA é sua compatibilidade com diversos detergentes não iônicos e agentes desnaturantes frequentemente utilizados em protocolos de extração proteica. Entretanto, o ensaio pode sofrer interferência de compostos redutores, como ditioneína (DTT), β -mercaptoetanol e ácido ascórbico, uma vez que essas substâncias também são capazes de reduzir íons cúpricos, provocando superestimação dos resultados (Thermo Fisher Scientific, 2024). Dessa forma, a escolha entre os métodos de Bradford e BCA deve considerar a composição química da amostra e os reagentes empregados durante seu preparo.

Em trabalhos relacionados à caracterização metabólica de microrganismos produtores de metabólitos secundários, como espécies do gênero *Streptomyces*, a utilização combinada de diferentes métodos de quantificação proteica pode contribuir para aumentar a confiabilidade dos resultados experimentais. A comparação entre os métodos permite avaliar possíveis interferências da matriz biológica analisada e fornece maior segurança na interpretação dos dados relacionados ao crescimento celular e à atividade metabólica. Além disso, a determinação precisa da concentração de proteínas constitui uma etapa importante para a padronização de análises bioquímicas e para a comparação entre diferentes condições de cultivo, especialmente em estudos que investigam meios alternativos para produção de compostos bioativos, como a roseoflavina (Noble; Bailey, 2009).

3.9.2 Precipitação de proteínas utilizando sulfato de amônio

A purificação de biomoléculas produzidas por processos fermentativos depende de etapas iniciais capazes de reduzir a complexidade da matriz biológica antes da aplicação de técnicas analíticas de maior resolução. Segundo Du *et al.* (2022), mesmo técnicas cromatográficas amplamente utilizadas, como a cromatografia de troca iônica, apresentam melhor desempenho quando associadas a etapas prévias de clarificação e pré-purificação, como centrifugação e precipitação proteica. Dessa forma, a remoção de proteínas constitui uma estratégia importante

para simplificar a amostra e aumentar a eficiência das etapas subsequentes de purificação.

Entre os métodos empregados para remoção proteica destacam-se a precipitação por ácidos, a precipitação com solventes orgânicos e a precipitação salina utilizando sulfato de amônio. De acordo com Akyüz *et al.* (2024), agentes como o ácido tricloroacético promovem a precipitação por meio da desnaturação proteica, provocando o desenovelamento e a agregação das cadeias polipeptídicas. Em contraste, o sulfato de amônio reduz a solubilidade das proteínas sem causar alterações significativas em sua estrutura nativa, preservando parcialmente sua atividade biológica. Essa característica torna o método particularmente interessante para aplicações em que se deseja minimizar alterações na composição da amostra.

Além da preservação estrutural das proteínas, a precipitação salina apresenta outras vantagens operacionais importantes. Segundo Du *et al.* (2022), trata-se de uma técnica de baixo custo, simples de executar, segura e realizada em condições relativamente brandas quando comparada a outros métodos de precipitação. Por essas razões, continua sendo amplamente utilizada como etapa preliminar de purificação em diferentes processos biotecnológicos.

O mecanismo responsável por esse processo é conhecido como *salting out*. Esse fenômeno está relacionado à interação entre os íons do sal, as moléculas de água e as proteínas presentes na solução. Conforme descrito por Kang *et al.* (2020), o sulfato pertence ao grupo dos íons cosmotrópicos da Série de Hofmeister, apresentando elevada capacidade de hidratação. Em concentrações elevadas, esses íons competem com as proteínas pelas moléculas de água disponíveis no meio, reduzindo a camada de hidratação que normalmente mantém as proteínas solubilizadas.

Como consequência, ocorre o aumento das interações hidrofóbicas entre moléculas proteicas vizinhas, favorecendo a formação de agregados insolúveis e, consequentemente, sua precipitação. Esse mecanismo foi descrito por Arakawa e Timasheff (1984), que demonstraram a importância da competição por água na redução da solubilidade proteica em soluções contendo altas concentrações salinas.

Entretanto, esse comportamento não ocorre da mesma forma em todas as concentrações de sal. Em concentrações mais baixas, pode ser observado o efeito conhecido como *salting in*, caracterizado por um pequeno aumento da solubilidade proteica devido à neutralização parcial das cargas presentes na

superfície das proteínas. Segundo Akyüz *et al.* (2024), esse fenômeno geralmente ocorre em concentrações inferiores a 0,15 mol/L, sendo gradualmente substituído pelo efeito de *salting out* à medida que a concentração de sulfato de amônio aumenta.

Outra característica relevante do sulfato de amônio é a possibilidade de realizar precipitação fracionada. Nesse procedimento, diferentes grupos proteicos podem ser precipitados seletivamente por meio do aumento gradual da concentração salina. Além da elevada solubilidade em água, o reagente apresenta baixo custo, ampla disponibilidade comercial e baixa toxicidade quando comparado a outros agentes precipitantes (Akyüz *et al.*, 2024). Segundo Du *et al.* (2022), essa estratégia tem sido amplamente aplicada na recuperação de proteínas de matrizes vegetais e microbianas, sendo frequentemente seguida por etapas de diálise para remoção do excesso de sal.

No contexto de bioprocessos fermentativos, a remoção de proteínas apresenta importância adicional devido à elevada complexidade dos caldos de cultivo. Microrganismos do gênero *Streptomyces* secretam diferentes enzimas extracelulares ao longo do crescimento e da diferenciação celular, contribuindo para o aumento da concentração de proteínas presentes no meio fermentativo (Van Wezel; McDowall, 2011). Além disso, componentes remanescentes do próprio meio de cultura também podem contribuir para essa complexidade.

A presença dessas macromoléculas pode interferir negativamente em etapas posteriores de purificação e análise. De acordo com Cassiano *et al.*, (2009), proteínas residuais e interferentes de matriz biológica podem elevar o ruído da linha de base em análises cromatográficas, comprometer as etapas de extração e afetar a eficiência do sistema analítico, exigindo métodos adequados de preparo de amostras.

Apesar das vantagens apresentadas, a precipitação com sulfato de amônio não promove a remoção completa de todos os compostos presentes na amostra. Metabólitos secundários, pigmentos e outras moléculas de baixa massa molecular tendem a permanecer na fase líquida após a precipitação, exigindo etapas complementares de purificação. Além disso, concentrações excessivas de sal podem favorecer a coprecipitação de moléculas de interesse, reduzindo o rendimento do processo (Du *et al.*, 2022).

Dessa forma, a precipitação com sulfato de amônio pode ser utilizada como uma etapa inicial de simplificação de caldos fermentativos complexos, contribuindo para a redução da carga proteica da amostra e facilitando as etapas subsequentes de extração e análise dos metabólitos produzidos por *Streptomyces sp.*, objetivo de interesse deste trabalho.

3.9.3 Extração líquido-líquido

A extração líquido-líquido (LLE) é uma técnica de separação consolidada, que se baseia na diferença de solubilidade de um soluto entre duas fases líquidas imiscíveis (Seader; Henley; Roper, 2020). O processo é conduzido pela transferência de massa do componente de interesse da fase de alimentação para a fase extratora, sendo a eficiência governada pelo coeficiente de partição (Poole, 2020). Embora seus fundamentos estejam bem estabelecidos, a técnica tem passado por constante evolução, com o desenvolvimento de métodos miniaturizados, como a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (Snigur *et al.*, 2023), e o uso de equipamentos inovadores, como contadores de membrana, que ampliam sua aplicabilidade (Yussof *et al.*, 2023). Esta modernização visa atender à demanda por processos mais eficientes, seletivos e sustentáveis, mantendo a LLE como uma operação essencial em diversas áreas (Lamm; Jarboe, 2020).

A versatilidade da LLE é notável, com aplicações que vão desde a indústria farmacêutica e de alimentos até a metalurgia e o tratamento de resíduos (Seader; Henley; Roper, 2020). A literatura recente destaca avanços significativos em áreas especializadas, como a purificação de enantiômeros por extração enantiosseletiva para a indústria farmacêutica (Najafi *et al.*, 2023) e a separação de íons metálicos utilizando ligantes macrocíclicos de alta seletividade (Dinira, 2023). Esses desenvolvimentos demonstram a capacidade da técnica de se adaptar e resolver problemas complexos de separação em diferentes setores, consolidando seu papel como uma ferramenta indispensável na engenharia química e química analítica modernas (Poole, 2020).

Nota-se que o campo da extração líquido-líquido é fortemente impulsionado pelos princípios da química verde, o que tem levado à pesquisa e ao emprego de solventes mais sustentáveis (Torres *et al.*, 2023). Solventes como líquidos iônicos, solventes eutéticos profundos (DES), solventes de baixa densidade

e fluidos supercríticos estão sendo amplamente estudados como alternativas aos solventes orgânicos convencionais, visando reduzir a toxicidade, a geração de resíduos e o impacto ambiental dos processos (Snigur *et al.*, 2023; Torres *et al.*, 2023). Esta tendência, aliada ao desenvolvimento de processos automatizados e em fluxo contínuo, aponta para um futuro onde a LLE será não apenas mais eficiente e seletiva, mas também intrinsecamente mais alinhada com os preceitos da sustentabilidade (Lamm; Jarboe, 2020; Yussof *et al.*, 2023).

3.9.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma técnica analítica amplamente empregada para a separação, identificação e quantificação de compostos presentes em matrizes complexas. Seu princípio de funcionamento baseia-se na distribuição diferencial dos analitos entre uma fase estacionária e uma fase móvel líquida, promovendo a separação dos compostos em função de suas propriedades físico-químicas. Devido à sua elevada sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade, a CLAE tornou-se uma das principais ferramentas analíticas utilizadas em pesquisas biotecnológicas, farmacêuticas e microbiológicas, especialmente para o monitoramento de metabólitos produzidos por microrganismos (Dong, 2019; Moldoveanu; David, 2022).

Dentre as diferentes modalidades cromatográficas, a cromatografia líquida em fase reversa (Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography – RP-HPLC) destaca-se por sua versatilidade na análise de compostos com diferentes graus de polaridade. Nesse sistema, a fase estacionária apresenta caráter apolar, enquanto a fase móvel é relativamente polar, permitindo que a separação ocorra em função das interações hidrofóbicas estabelecidas entre os analitos e a superfície da coluna cromatográfica. Segundo Dong (2019), essa configuração é a mais utilizada em análises de compostos biológicos devido à sua capacidade de promover elevada resolução cromatográfica e excelente repetibilidade dos resultados.

As colunas C18, também denominadas octadecilsilano (ODS), constituem a fase estacionária mais empregada em cromatografia líquida de fase reversa. Essas colunas possuem cadeias carbônicas de dezoito átomos ligadas à superfície da sílica, proporcionando elevada retenção de compostos moderadamente polares e

apolares. De acordo com Snyder, Kirkland e Dolan (2010), a ampla utilização das colunas C18 deve-se à sua elevada eficiência na separação de moléculas estruturalmente semelhantes, tornando-as adequadas para análises envolvendo vitaminas, flavinas e metabólitos microbianos. Dessa forma, sua utilização é particularmente apropriada para a separação de riboflavina, roseoflavina e outros compostos produzidos por *S. davaonensis*.

A composição da fase móvel exerce influência direta sobre a eficiência da separação cromatográfica. Sistemas compostos por tampões aquosos associados a solventes orgânicos são amplamente utilizados para a análise de vitaminas e metabólitos de interesse biotecnológico. O uso do tampão fosfato em meio ácido contribui para a estabilidade química dos compostos analisados e reduz possíveis interações secundárias com a fase estacionária, favorecendo a obtenção de picos cromatográficos mais simétricos e melhor resolução. A acetonitrila, por sua vez, é um dos modificadores orgânicos mais utilizados em CLAE devido à sua baixa viscosidade, elevada pureza cromatográfica e capacidade de otimizar a separação dos analitos, reduzindo o tempo de análise sem comprometer a eficiência do método (Dong, 2019; Moldoveanu; David, 2022).

A detecção dos compostos separados é realizada por espectrofotometria *UV-Vis*, técnica frequentemente associada à CLAE devido à sua simplicidade operacional e elevada sensibilidade. A absorção de radiação eletromagnética por determinadas moléculas ocorre em comprimentos de onda específicos, permitindo sua identificação e quantificação. No caso das flavinas, a presença do anel isoaloxazínico confere propriedades espectrais características que possibilitam sua detecção por absorbância. A riboflavina apresenta bandas de absorção intensa na região do ultravioleta e do visível, característica que favorece sua determinação cromatográfica (Powers, 2020).

A roseoflavina, apresenta propriedades espectrais distintas em razão da substituição de um grupo metila por um grupo dimetilamino em sua estrutura molecular. Essa modificação resulta em um deslocamento do máximo de absorção para comprimentos de onda próximos a 505 nm, permitindo sua diferenciação em relação à riboflavina e outros compostos presentes no meio de cultivo. Segundo Mora-Lugo, Stegmüller e Mack (2019), a quantificação da roseoflavina por métodos cromatográficos é fundamental para o monitoramento da produção do metabólito

durante processos fermentativos, sendo a região entre 505 e 509 nm adequada para sua detecção seletiva.

Além da análise de flavinas, o método cromatográfico também possibilita a detecção de aflatoxinas por meio da absorbância em 476 nm. A utilização de diferentes comprimentos de onda permite aumentar a seletividade analítica e minimizar interferências provenientes de outros componentes da amostra. Dessa forma, a combinação de uma coluna C18 de fase reversa, fase móvel composta por tampão fosfato acidificado e acetonitrila, associada à detecção espectrofotométrica em comprimentos de onda específicos, constitui uma estratégia eficiente para a separação e quantificação de compostos de interesse biotecnológico (Dong, 2019; Snyder; Kirkland; Dolan, 2010).

No contexto da produção de roseoflavina, a CLAE representa uma ferramenta indispensável para a avaliação da eficiência dos processos fermentativos e de purificação, permitindo determinar a concentração do metabólito produzido, monitorar sua formação ao longo do cultivo e verificar a qualidade das etapas de recuperação do produto. Assim, a técnica contribui significativamente para o desenvolvimento e otimização de processos biotecnológicos envolvendo *S. davaonensis* e a produção de compostos bioativos de interesse industrial e farmacêutico.

3.10 GERENCIAMENTO E TRATAMENTO DE RESÍDUOS

3.10.1 Resíduos Sólidos e Líquidos em Processos Fermentativos

Ao longo do processo fermentativo para produção de compostos bioativos por microrganismos, diversos resíduos são gerados em diferentes etapas do processo. Entre eles destacam-se o caldo fermentativo residual, as águas de lavagem de equipamentos, as soluções empregadas nas etapas de extração e purificação, além de efluentes contendo nutrientes remanescentes, compostos orgânicos dissolvidos, metabólitos secundários não recuperados e traços de solventes utilizados no processamento downstream. O gerenciamento adequado desses materiais residuais é fundamental para mitigar impactos ambientais e promover a sustentabilidade do processo produtivo. A natureza e o volume dos resíduos gerados variam de acordo com o tipo de substrato empregado, a cepa

microbiana utilizada e as condições operacionais adotadas. Processos conduzidos por fermentação submersa (SmF), tradicionalmente empregados para a produção de metabólitos secundários por espécies do gênero *Streptomyces*, tendem a gerar maiores volumes de efluentes líquidos, enquanto a fermentação em estado sólido (SSF) concentra a maior parte dos resíduos na fração sólida (Perwez; Al Asheh, 2025). Embora existam poucos estudos específicos sobre os resíduos provenientes da produção de roseoflavina, espera-se que sua composição seja semelhante à observada em outros processos fermentativos envolvendo espécies de *Streptomyces*, caracterizando-se pela presença de biomassa residual, nutrientes não consumidos e metabólitos secundários remanescentes.

Os resíduos sólidos provenientes da fermentação com *Streptomyces* são constituídos principalmente por biomassa microbiana excedente (micélio), componentes remanescentes do meio de cultura e metabólitos não recuperados durante as etapas de separação e purificação. Em processos industriais de produção de antibióticos por fermentação, estima-se que para cada tonelada de produto obtido sejam geradas entre oito e dez toneladas de Resíduos de Fermentação de Antibióticos (AFR), os quais podem conter quantidades significativas de resíduos de antibióticos e matéria orgânica (Alsaeedi *et al.*, 2025). Quando não recebem destinação adequada, esses materiais podem provocar sobrecarga em aterros sanitários, contaminação do solo e de recursos hídricos, além de favorecer a disseminação de genes associados à resistência antimicrobiana (De Almeida *et al.*, 2024). Em processos que utilizam substratos complexos, como resíduos agroindustriais, a fração sólida também pode incluir materiais lignocelulósicos e componentes parcialmente degradados, aumentando a complexidade do gerenciamento e do tratamento desses resíduos.

Os efluentes líquidos gerados durante processos fermentativos com *Streptomyces* constituem um dos principais desafios ambientais da indústria biotecnológica. Esses efluentes são compostos principalmente pelo sobrenadante do meio de cultivo, contendo nutrientes não consumidos, metabólitos secundários, sais minerais, biomassa residual em suspensão e produtos intermediários do metabolismo microbiano (Perwez; Al Asheh, 2025). Sua composição pode variar significativamente em função da matéria-prima empregada e das características da cepa produtora. Em processos que utilizam resíduos agroindustriais como substrato, os efluentes frequentemente apresentam concentrações elevadas de açúcares

residuais, proteínas, lipídios e compostos fenólicos. Além disso, podem apresentar alta carga orgânica, refletida em elevados valores de Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), exigindo tratamento adequado antes do descarte. Quando lançados no ambiente sem tratamento, esses efluentes podem causar eutrofização de corpos hídricos, redução da concentração de oxigênio dissolvido e efeitos tóxicos sobre organismos aquáticos, comprometendo o equilíbrio dos ecossistemas (Chen *et al.*, 2024).

3.10.2 Normas de Biossegurança e Legislação Ambiental Vigente

O tratamento adequado de resíduos, especialmente aqueles classificados como resíduos de serviços de saúde e resíduos industriais, exige rigoroso cumprimento das normas de biossegurança e da legislação ambiental vigente. A biossegurança visa proteger os profissionais envolvidos, a comunidade e o meio ambiente contra os riscos biológicos que podem advir do manejo incorreto desses resíduos (Garcia; Zanetti-Ramos, 2004). No Brasil, a Resolução RDC nº 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece os procedimentos mínimos para o gerenciamento seguro dos resíduos de serviços de saúde, contemplando desde a segregação até a disposição final, sendo considerada um marco normativo para garantir a segurança biológica (Brasil, 2004). Para resíduos químicos, como solventes orgânicos e fases móveis de HPLC, a legislação exige que sejam coletados em frascos apropriados, identificados e encaminhados para empresas especializadas em incineração ou recuperação de solventes, sendo vedado o descarte inadequado na pia ou no lixo comum.

No contexto de atividades que envolvem o cultivo de organismos geneticamente modificados (OGMs), como em processos biotecnológicos com cepas recombinantes de *Streptomyces*, é indispensável atender aos requisitos estabelecidos pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio). A liberação do cultivo e a manipulação de OGMs requerem aprovação prévia da CTNBio, que avalia os riscos à saúde humana, animal e ao meio ambiente, garantindo que as práticas estejam alinhadas com os princípios da biossegurança e com a legislação vigente (Brasil, 2005). A Resolução RDC nº 222/2018, da ANVISA, atualizou os requisitos para o gerenciamento de resíduos gerados em laboratórios,

estabelecendo critérios mais rigorosos para o tratamento e destinação final de materiais contaminados (Brasil, 2018).

Além da biossegurança, a legislação ambiental brasileira regula o gerenciamento de resíduos sólidos de forma ampla, contemplando aspectos de coleta, tratamento, reutilização e destinação final, com foco na minimização dos impactos ambientais e na promoção da sustentabilidade. A Política Nacional de Resíduos Sólidos (PNRS), instituída pela Lei nº 12.305/2010, estabelece a hierarquia de gestão de resíduos, priorizando a não geração, redução, reutilização, reciclagem, tratamento e, por último, disposição final ambientalmente adequada dos rejeitos (Brasil, 2010). Este marco legal é particularmente relevante para a produção de compostos bioativos, pois incentiva a valorização de resíduos agroindustriais como substratos para fermentação e a recuperação de solventes utilizados em etapas de purificação. A Resolução CONAMA nº 401/2008 complementa este arcabouço ao destacar critérios para o manejo ambientalmente adequado dos resíduos sólidos (Brasil, 2008).

Estudos recentes indicam que a efetiva aplicação dessas normas é essencial para garantir o desenvolvimento sustentável dos processos industriais e urbanos, reduzindo a contaminação ambiental e promovendo o uso racional dos recursos (BRASIL, 2010; BRASIL, 2020). O Decreto nº 10.936/2022 trouxe importantes atualizações à Política Nacional de Resíduos Sólidos, evidenciando a necessidade de maior rigor e transparência no controle dos resíduos, sobretudo frente aos desafios impostos pelo aumento da geração de resíduos urbanos e industriais. A legislação ambiental encontra-se em constante atualização para responder às demandas crescentes por sustentabilidade e proteção ambiental.

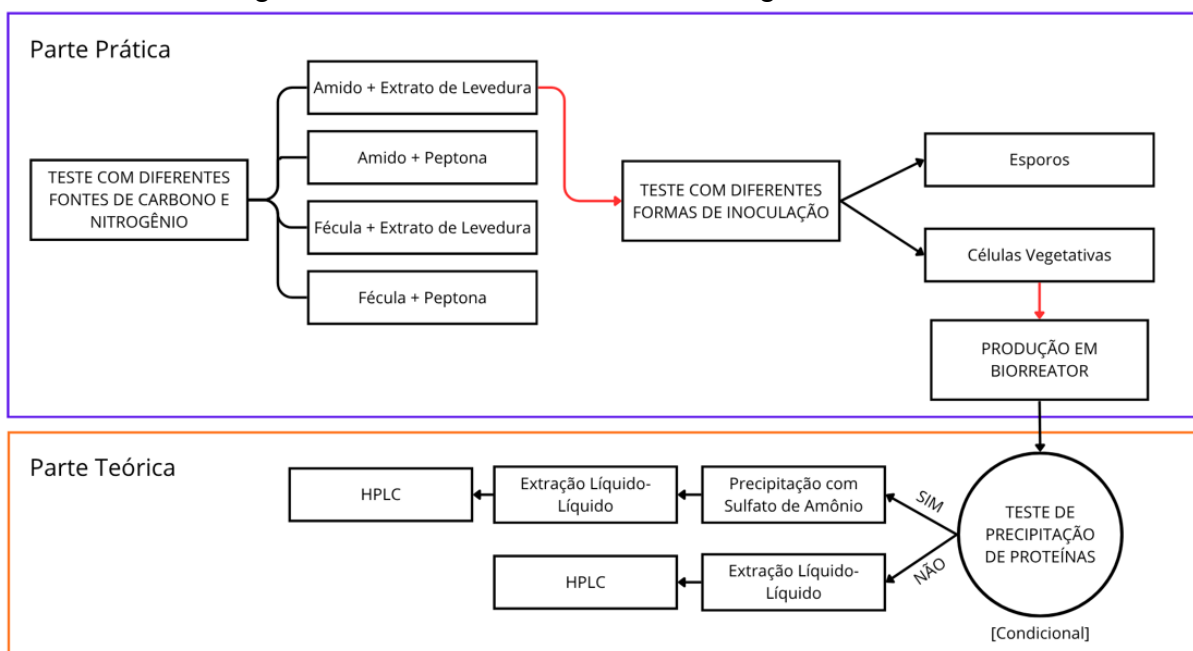
O alinhamento entre normas de biossegurança, aprovação da CTNBio e legislação ambiental torna-se imprescindível para garantir a segurança sanitária e a proteção ambiental de forma integrada, especialmente em processos fermentativos que envolvem microrganismos geneticamente modificados e a geração de resíduos potencialmente perigosos. A gestão de resíduos em processos fermentativos com *Streptomyces* deve ser conduzida dentro deste arcabouço normativo que integra as exigências da ANVISA, CTNBio, CONAMA e PNRS, garantindo a segurança dos profissionais, a proteção do meio ambiente e a conformidade legal. A adoção de práticas sustentáveis, como a fermentação em estado sólido, a valorização de resíduos agroindustriais e a reciclagem de solventes, alinha o processo produtivo

aos princípios da economia circular e da sustentabilidade, contribuindo para a redução dos impactos ambientais e para o desenvolvimento de uma biotecnologia mais responsável.

4 METODOLOGIA

A metodologia empregada neste estudo foi estruturada com base em duas diferentes abordagens, sendo uma etapa experimental e outra etapa teórica, como demonstrado na figura 2. A abordagem experimental compreendeu todas as etapas relacionadas ao cultivo do microrganismo *S. davaonensis*, incluindo ensaios em shaker com utilização de diferentes composições nos meios de cultivo analisados, diferentes formas de inoculação e posterior escalonamento do sistema para biorreator de bancada. Em um segundo momento, foi desenvolvida uma abordagem teórica voltada à proposição de estratégias para a purificação da roseoflavina, fundamentando-se em revisão da literatura disponível e análise de dados obtidos ao longo do estudo prático, mas não sendo realizada de forma experimental.

Figura 2 - Desenvolvimento metodológico do estudo.



Fonte: Autores, 2026.

4.1 MICRORGANISMO E MANUTENÇÃO

A cepa bacteriana *Streptomyces davaonensis* utilizada nesse delineamento experimental foi cedida pela professora Dr^a Danielle Biscaro Pedrolli, e pertence ao acervo de microrganismo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara. A linhagem em pauta foi mantida em meio sólido específico

para estímulo de esporulação, de forma a permitir um adequado crescimento do micélio aéreo e, por conseguinte, a formação de esporos bacterianos, a serem empregados em ensaios subsequentes.

4.2 PREPARO DO MEIO DE ESPORULAÇÃO

A indução da esporulação do microrganismo foi realizada com utilização do meio específico para esporulação denominado Meio MS (Mannitol Soybean Broth Agar), composto por manitol (20 g/L), farinha de soja (20 g/L) e ágar-ágar (20 g/L). Para seu preparo, a farinha de soja foi dissolvida em água corrente aquecida à cerca de 100°C, visando sua completa dissolução. Subsequentemente, os demais constituintes foram adicionados, com agitação constante promovendo sua homogeneização. O meio de crescimento para bactérias do gênero *Streptomyces* foi composto por: glicerol (15 g/L), extrato de levedura (1 g/L), peptona (10 g/L), tampão MOPS (21 g/L), sulfato de magnésio (1 g/L), fosfato dipotássico (K_2HPO_4) (2,5 g/L) e solução salina (1mL/L) previamente preparada contendo cloreto de manganês, sulfato de ferro e sulfato de zinco (Rodrigues *et al.*, 2015).

Os meios de esporulação e de crescimento foram autoclavados (modelo AV-75, Phoenix) à 121°C e 1 atm de sobrepressão por 20 minutos e vertidos dentro do fluxo laminar (modelo SBIIA1, FilterFlux, Brasil) em placas de Petri. Depois de observada a solidificação do meio, foi realizada sua inoculação com a cepa *S. davaonesis*, seguida de incubação em estufa (modelo Incubadora B.O.D SL - 117/250, SOLAB, Brasil) à 37°C por um período de sete dias até obtenção de esporos visíveis ou de agregados de células bem definidas, necessários para a coleta posterior.

4.3 PREPARO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS E PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

A partir da cultura obtida com o desenvolvimento do microrganismo em meio de esporulação MS, foi preparada a suspensão de esporos com auxílio de alça microbiológica esterilizada, por meio da raspagem superficial do micélio visível da placa pré-preparada. A solução aquosa de Tween 20 à 0,1% foi adicionada diretamente à placa contendo o material esporular, facilitando a raspagem de forma que a suspensão ficasse pronta para quantificação.

A suspensão foi transferida para uma Câmara de Neubauer (modelo Counting Chamber Bright Line 730, Perfecta, Brasil), preenchendo o espaço entre a lâmina e a lamínula por capilaridade. O operador responsável pelo manuseio da Câmara foi conduzido a realizar a contagem no quadrante central, subdividido em 25 quadrados médios, sendo os esporos presentes contabilizados sob microscopia óptica, adotando-se os critérios usuais de inclusão e exclusão nas linhas delimitadoras.

A fim de facilitar o armazenamento e a manipulação, essa preparação foi subdividida em três alíquotas iguais, distribuídas em criotubos estéreis. As amostras foram homogeneizadas, criopreservadas e armazenadas no freezer a -80°C (Shepherd *et al.*, 2010).

4.4 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Os cultivos de crescimento da cepa *S. davaonesis* foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 250mL contendo meio líquido YS (Yeast Extract + Soluble Starch), correspondendo ao meio de controle (tratado no estudo como AE), sendo composto por amido de batata solúvel P.A. (10 g/L) como fonte padrão de carbono e extrato de levedura (2 g/L) como fonte padrão de nitrogênio, adequados ao crescimento vegetativo e formação de biomassa em *Streptomyces*.

4.4.1 Inóculos de esporos em meios alternativos

Tomando como objetivo experimental avaliar a influência da variação de diferentes fontes de carbono e nitrogênio ao longo do cultivo no que tange o crescimento celular e a produção da molécula alvo roseoflavina, foram estabelecidas alternâncias dessas matrizes nutricionais. Por conseguinte, o experimento foi conduzido analisando-se duas fontes de carbono - amido de batata solúvel e fécula de mandioca, representando uma matriz purificada e uma matriz complexa, respectivamente - e duas fontes de nitrogênio - extrato de levedura como fonte complexa e peptona como fonte purificada. Cada combinação foi realizada em triplicata, totalizando 12 unidades experimentais.

Tabela 1 - Fontes de carbono e nitrogênio empregadas em cada tratamento experimental.

Unidades Experimentais	Tratamento	Fonte de Carbono	Fonte de Nitrogênio
3x	AE	Amido de Batata	Extrato de Levedura
3x	AP	Amido de Batata	Peptona
3x	FE	Fécula de Mandioca	Extrato de Levedura
3x	FP	Fécula de Mandioca	Peptona

Fonte: Autores, 2026.

Com finalidade de garantir a equivalência nutricional entre as fontes experimentais, foi realizada uma ancoragem de referência que permitisse padronizar as concentrações de carboidratos e nitrogênio a serem aplicadas nos meios. Para conhecimento da composição nutricional em carboidratos das fontes de carbono foram utilizados dados provenientes da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) e da base de dados FoodData Central (USDA). Já para as fontes de nitrogênio, foram utilizadas informações percentuais obtidas nos respectivos rótulos laboratoriais.

As concentrações das fontes de carbono foram ajustadas tomando-se como referência a relação entre a carga desejada de carboidratos e a fração mássica desse composto presente em cada variação de matriz carbônica, permitindo padronizar a carga metabólica efetiva fornecida aos microrganismos. Já para as fontes nitrogenadas, embora sua composição seja majoritariamente proteica, a padronização foi realizada com base no teor de nitrogênio total, correspondendo a fração metabolicamente assimilável pelo microrganismo. Para tanto, as concentrações finais empregadas nos meios de cultivo experimental se encontram na Tabela 2:

Tabela 2 - Composição das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas na formulação dos meios de cultivo.

Componente	Carboidratos (% m/m)	Nitrogênio (% m/m)	Concentração Final (g/L)
Amido de Batata	92,0	--	10,00
Fécula de Mandioca	82,0	--	10,45
Extrato de Levedura	--	8,5	2,00
Peptona	--	12,0	1,41

Fonte: Elaborados pelos autores com base na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) e nas informações dos rótulos dos produtos utilizados.

Sendo assim, cada componente foi pesado na balança semianalítica (modelo AUY220, Shimadzu, Japão) com base na concentração final explicitada na Tabela 2 e tendo em vista que as quantidades foram pesadas visando corresponder à 49 mL de meio + 1 mL da Suspensão de Esporos. Os doze frascos foram incubados em agitador orbital (modelo Incubadora Refrigerada com Agitação TE-421, TECNAL, Brasil) à 200 rpm e 37°C, ao longo de um período de cinco dias.

4.4.2 Inóculos de células bacterianas em meio AE

Após análises microscópicas, de peso seco e de espectrofotometria de varredura, foi verificado que o melhor meio de cultura para produção de roseoflavina foi o AE (amido de batata solúvel + extrato de levedura), e portanto ele foi escolhido para o teste do melhor método de inóculo. Para isso foram preparados três frascos contendo meio AE. A inoculação dos demais frascos foi realizada através transferência asséptica de um fragmento do meio sólido para crescimento, contendo colônias bacterianas já desenvolvidas para o meio líquido AE.

4.5 ANÁLISES EXPERIMENTAIS

As análises experimentais realizadas foram: medição de peso seco, microscopia óptica e espectrofotometria de varredura.

A medição do peso seco foi realizada com amostras dos frascos no dia 5, além de uma amostra do frasco com apenas meio de cultivo, a ser lida como

“branco” experimental. Foi realizada uma etapa de centrifugação (modelo UNIVERSAL 320 R, Hettich, Alemanha) à $2350 \times g$ (5.000 rpm) por 15 minutos e filtração do sobrenadante. Os falcons foram, então, encaminhados a um processo de secagem em estufa por 24 horas à 55°C, onde permaneceram até que o peso da membrana parasse de variar. A determinação do peso da biomassa foi feito subtraindo o peso encontrado no falcon com o material filtrado do peso do falcon previamente medido (Pérez-Escudero; Madirolas, 2022).

A microscopia óptica foi realizada em um microscópio óptico reto DM500 da Leica, utilizando uma gota do meio de cultivo, a fim de analisar as estruturas dos esporos, hifas das bactérias filamentosas e outros componentes presentes no meio de cultivo (Willey; Sherwood; Woolverton, 2017).

A espectrofotometria de varredura foi conduzida em um espectrofotômetro Genesys 10S UV-Vis da Thermo Scientific, na faixa de 300 nm a 700 nm, a partir de uma alíquota de 200 µL dos meios, pipetada com micropipeta de volume ajustável (200 µL), no dia 5 de cultivo (Kumar, 2022).

4.6 FERMENTAÇÃO EM ESTADO LÍQUIDO EM BIORREATOR OPERANDO EM REGIME BATELADA

4.6.1 Preparação do Inóculo e do Sistema de Cultivo

O aumento de escala do sistema produtivo de roseoflavina por meio do microrganismo *S. davaonensis* foi conduzido em biorreator comercial de bancada TEC-BIO-7,5VI (TECNAL), de volume útil máximo de 5L, operado com volume de trabalho de 4L, com dimensões internas de 0,190 metros de diâmetro e 0,217 metros de diâmetro externo, e equipado com controlador de temperatura (Pt-100), sensor de pH digital (Mettler Toledo, 405-DPAS-SCK8S/225), sistema de agitação e três bombas peristálticas (ácido, base e antiespumante) (Picão *et al.*, 2021). A escolha do meio de cultivo utilizado neste módulo foi definida com base em sua relevância previamente descrita em literatura. O meio AE foi, então, selecionado por ser, segundo Kibling *et al.* (2020), o único meio de cultivo atualmente relatado como sendo adequado para a produção de roseoflavina por *S. davaonensis*, composto majoritariamente por amido de batata solúvel e extrato de levedura. O meio foi preparado com concentrações de 10g/L de amido de batata solúvel e 2g/L de extrato

de levedura, ajustados para o volume final de 4L a ser empregado no cultivo do biorreator (Liunardo *et al.*, 2024).

A inoculação do biorreator foi realizada a partir do crescimento prévio de culturas de *S. davaonensis* em placas de Petri contendo meio específico de crescimento para bactérias do gênero *Streptomyces*, meio selecionado com base em ensaios preliminares de crescimento realizados no item 4.2 e em sua utilização já conhecida e descrita em literatura, sendo composto por glicerol (15 g/L), extrato de levedura (1 g/L), peptona (10 g/L), tampão MOPS (21 g/L), sulfato de magnésio (1 g/L), fosfato dipotássico (K_2HPO_4) (2,5 g/L) e solução de sais (1mL/L) contendo cloreto de manganês, sulfato de ferro e sulfato de zinco (Rodrigues *et al.*, 2015). Para inóculo do biorreator, foram utilizados 80 discos de micélio retirados das placas de Petri com auxílio de alça microbiológica e transferidos direta e assepticamente para o meio de cultivo líquido padrão previamente preparado e autoclavado. Essa quantidade foi estabelecida a partir da proporção prévia de 1 disco de micélio para 50mL de meio de cultivo adotada nos experimentos preliminares do item 4.4.2, de modo a manter-se a mesma razão de inoculação entre as etapas. O meio de cultivo contendo tais colônias, foi então transferido para o biorreator com utilização de funil de vidro autoclavado anteriormente.

4.6.2 Cultivo de *Streptomyces davaonensis* em Biorreator

O cultivo escalonado foi realizado em modo batelada, com agitação constante de 200 rpm e taxa de aeração equivalente à 0,5 vvm (vazão de ar de 2,0 L/min para o volume de trabalho de 4 L). Tais parâmetros operacionais adotados foram definidos com base na integração de condições experimentais previamente descritas em diferentes metodologias reportadas em literatura (Jankowitsch *et al.*, 2011; López-Agudelo; Gómez-Ríos; Ramirez-Malule, 2021). Para minimizar o acúmulo de biofilme nas paredes internas do biorreator, foi aplicado aumento temporário da agitação para cerca de 700 rpm, de modo a favorecer o desprendimento do material aderido. A temperatura foi monitorada por termômetro interno e mantida constante durante todo o cultivo em 30°C, por se tratar de uma temperatura já descrita em literatura como adequada para o crescimento da cepa e produção da molécula alvo roseoflavina (Ludwig *et al.*, 2018). A agitação do sistema como um todo foi promovida por dois impelidores (um do tipo Rushton e outro do

tipo Smith), distanciando-se um do outro em 10cm e tendo como propósito uma melhor homogeneização do meio e transferência de oxigênio adequado ao cultivo. O sistema contava com quatro chicanas diametralmente opostas com 0,015 metros de largura (Picão *et al.*, 2021).

Figura 3 - Cultivo de *S. davaonensis* em biorreator Tecnal Tec-Bio-Flex em meio AE, por 77 horas.



Fonte: Elaborado pelos autores (2026)

Um Controlador Tecnal (TEC-BIO-FLEX) foi utilizado para amparar os estudos conduzidos. Foi realizado controle de pH e de formação de espuma de modo manual, tomando-se como base leituras periódicas de sensores específicos à cada caso acoplados ao sistema, em conjunto com a análise visual do cultivo. O monitoramento remoto do sistema foi realizado via aplicativo TeamViewer, que permitiu acompanhar e controlar os parâmetros de pH e formação de espuma através do acesso direto ao software operacional do biorreator TECNAL.

Adotou-se valor de referência (setpoint) de 7,0 para a variável pH, com faixa de tolerância de $\pm 0,2$, com base em adaptação de metodologia descrita por Schneider e Mack (2021). O controle de pH foi ajustado mediante adição de soluções previamente preparadas de hidróxido de sódio (NaOH) e ácido sulfúrico (H_2SO_4), ambas em molaridade 1 mol/L e já disponíveis em laboratório, sempre que observados desvios de valores desses parâmetros fora da faixa adequada estabelecida. De modo análogo, a formação de espuma foi monitorada visualmente

ao longo do cultivo, sendo então realizada a adição do antiespumante para sistemas aquosos SQ 4436 (Silaex) nas fases inicial e final do cultivo, ou quando se mostrou necessário, visando evitar interferências de operação no cultivo. Mesmo que o controle de pH automático do software operacional fosse mantido ativo ao longo do monitoramento, as bombas de adição de base, ácido e antiespumante permaneceram desligadas até que sua ativação fosse necessária, de modo a garantir que as correções fossem realizadas somente com supervisão humana.

O cultivo foi mantido ativo por um período de 77 horas, com cronograma de amostragem adaptado à disponibilidade de acesso ao laboratório, resultando em intervalos de coleta variáveis, mas que permitissem a obtenção de dados representativos e pontos críticos do sistema em todos os dias do cultivo. Foram então realizadas amostragens de 3 em 3 horas no período matutino e vespertino (equivalente ao intervalo das 8h30 às 17h30) dos três dias de operação do biorreator.

4.6.3 Monitoramento e Análises do Cultivo

Para a execução das coletas, foram utilizadas seringas de polipropileno estéreis acopladas à tubulação de saída do biorreator. Antes da retirada do volume definitivo de cada ponto amostral, foram descartados 10 mL de caldo fermentativo em solução de hipoclorito de sódio, visando eliminar o volume morto da amostragem e garantir a representatividade cronológica da amostra. Em seguida, 10 mL de material foram transferidos para tubos tipo Falcon de 15 mL, sendo que as unidades destinadas à coleta da biomassa foram previamente pesadas em balança analítica. No total, foram realizadas 14 coletas consecutivas (P0 a P13), assegurando a obtenção de dados representativos ao longo de todo o cultivo.

O monitoramento do pH em cada intervalo também foi realizado externamente imediatamente após a coleta da amostra, utilizando-se um pHmetro de bancada (modelo mPA-210, MC Tecnopon, Brasil). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a $2350 \times g$ (5.000 rpm) por 15 minutos para a separação das fases. O sobrenadante resultante foi transferido para novos tubos Falcon e armazenado sob refrigeração para análises posteriores.

A fração sólida (pellet) remanescente foi submetida à determinação de biomassa seca, conforme metodologia descrita no item 3.5. Todos os tubos foram

devidamente identificados com o número do ponto correspondente, o tempo decorrido do cultivo e a identificação do grupo.

A análise do sobrenadante armazenado foi realizada por espectrofotometria de absorção molecular em microplacas, segundo metodologia também explicitada no item 3.5. As leituras foram realizadas em leitor de microplacas (modelo EnSpire, PerkinElmer, Estados Unidos) no comprimento de onda de 508 nm, utilizando meio de cultura estéril como branco. O uso da técnica permitiu acompanhar a evolução da absorbância associada à roseoflavina ao longo do processo fermentativo.

4.7 GERENCIAMENTO E TRATAMENTO DE RESÍDUOS

O gerenciamento dos resíduos gerados durante a produção de roseoflavina foi proposto com base nos resíduos identificados ao longo das etapas de cultivo, aumento de escala e purificação descritas no projeto. Inicialmente, os resíduos foram classificados em biológicos e químicos, considerando sua origem, composição e potencial impacto ambiental. Os resíduos biológicos compreenderam a biomassa microbiana proveniente das etapas de cultivo, os meios de cultura utilizados e os materiais descartáveis contaminados. Já os resíduos químicos compreenderam os efluentes líquidos gerados durante os procedimentos laboratoriais.

Para os resíduos biológicos, foi considerado o tratamento por autoclavagem, procedimento amplamente utilizado para a inativação de microrganismos em laboratórios de microbiologia e biotecnologia. Após a esterilização, os resíduos sólidos foram encaminhados para descarte conforme as normas institucionais, enquanto os resíduos líquidos poderiam ser destinados ao sistema de tratamento de efluentes, desde que atendidos os requisitos de segurança microbiológica. Segundo a RDC nº 222/2018 da ANVISA e a Resolução CONAMA nº 358/2005, a descontaminação prévia dos resíduos biológicos é fundamental para minimizar riscos à saúde pública e ao meio ambiente (Brasil, 2018; Brasil, 2005).

Os efluentes líquidos gerados durante o processo foram avaliados sob a perspectiva de tratamentos biológicos e físico-químicos. Em escala laboratorial, a destinação para sistemas institucionais de tratamento de efluentes é considerada a alternativa mais adequada. Entretanto, para uma eventual aplicação industrial, foram

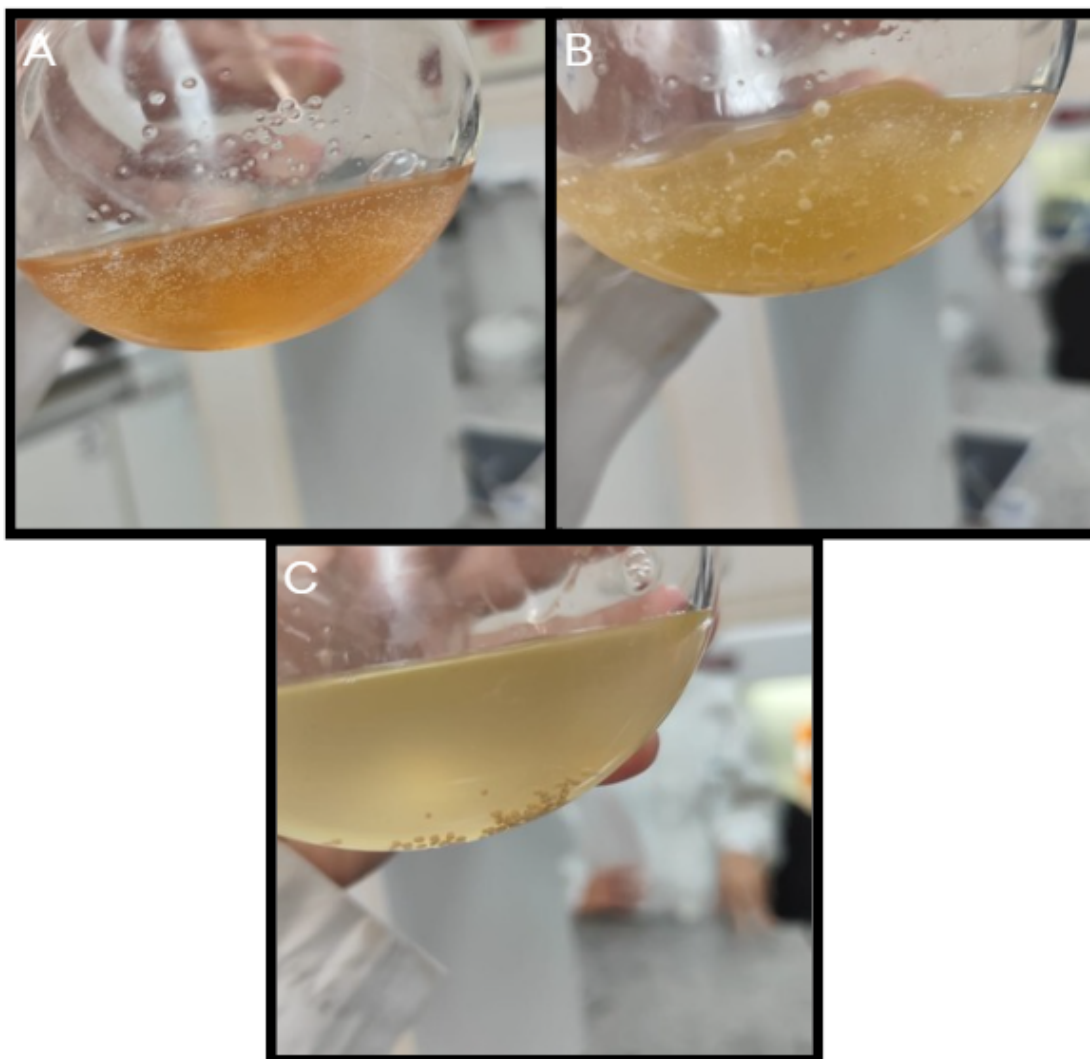
analisadas tecnologias de tratamento biológico, como sistemas de lodos ativados e reatores aeróbios, amplamente empregados na remoção de matéria orgânica e contaminantes presentes em efluentes industriais (Kanaujiya *et al.*, 2019; Narayanan; Narayan, 2019). Também foram consideradas estratégias de valorização dos resíduos orgânicos, incluindo o reaproveitamento da biomassa microbiana e de resíduos ricos em amido em processos de compostagem e em novos bioprocessos fermentativos, conforme demonstrado por estudos envolvendo espécies do gênero *Streptomyces* cultivadas em resíduos agroindustriais (Schalchli *et al.*, 2021; Astudillo *et al.*, 2024).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS E ANÁLISE VISUAL DO CRESCIMENTO DE *Streptomyces davaonensis*

A avaliação visual dos meios de cultivo líquidos permitiu observar as diferenças morfológicas dos agregados celulares formados e resultantes de cada forma de inoculação empregada, como é observado na Figura 4:

Figura 4 - Padrão de crescimento e tamanho das colônias de *S. davaonensis* em meios de cultura líquido AE inoculado com suspensão de esporos (A), meio AE inoculado com células vegetativas (B) e meio AP (C)



Fonte: Autores (2026)

Foi possível observar que os *pellets* formados nos meios de cultura inoculados com colônias das placas de Petri são menores e mais numerosos

quando comparados com os pellets formados nos meios de cultura inoculados com esporos. Kumar *et al.* (2023) encontraram o mesmo fenômeno, onde a fermentação submersa com inóculos de colônias das placas de Petri produziram *pellets* de menor tamanho. Eles argumentam que as condições de fermentação influenciam no formato dos agregados celulares, além de que em ambiente submerso, bactérias do gênero *Streptomyces* produzem alguns bioquímicos ou proteínas que controlam a formação de grânulos. A formação de agregados de menor tamanho envolve o processo de crescimento das hifas, desenvolvimento de polaridade, ramificação e formação de septos, o que resulta na transformação das hifas em *pellets* compactos. Isso indica que as colônias retiradas da placa de Petri não estavam programadas para o desenvolvimento desses pellets, ao contrário dos esporos, que por começarem o processo de crescimento desde a fase inicial, tendem a formar tais pellets.

Portanto, os ensaios foram conduzidos com suspensão de esporos, a concentração do inóculo foi padronizada por contagem em câmara de Neubauer, garantindo que todos os cultivos fossem iniciados com concentrações equivalentes de esporos. A partir da média obtida pela contagem de esporos, e considerando o volume conhecido da câmara, foi determinado o número de esporos por unidade de volume, equivalente à $7,125 \times 10^9$ esporos/mL. A partir dessa contagem, foi ajustado o volume necessário para obtenção de uma densidade final equivalente à, aproximadamente, 1×10^7 esporos/mL, a serem utilizadas como inóculo nos meios de cultivo de análise, valor empregado para padronizar a inoculação dos meios de cultivo e baseado em condições de inoculação previamente descritas em literatura para cultivo de *S. davaonensis* (Ludwig *et al.*, 2018).

Essa padronização é importante para minimizar a variabilidade experimental, uma vez que diferenças na concentração inicial do inóculo podem influenciar a cinética de crescimento, a formação da biomassa e a produção de metabólitos secundários.

Dessa forma, as diferenças morfológicas observadas entre os tratamentos podem ser atribuídas principalmente às características do tipo de inóculo empregado, e não a variações na quantidade inicial de esporos inoculados.

5.2 DETERMINAÇÃO DO PESO SECO DA BIOMASSA DE *Streptomyces davaonensis*

A determinação do peso seco da biomassa ao longo do cultivo foi empregada como parâmetro para avaliação do crescimento da *S. davaonensis* em relação às diferentes condições de cultivo adotadas no delineamento experimental, permitindo acompanhar o desenvolvimento celular e o desempenho das diferentes formulações de meios com variação nas fontes de carbono e nitrogênio. Na Tabela 3 encontram-se os pesos secos das biomassas após crescimento em diferentes meios de cultura líquido.

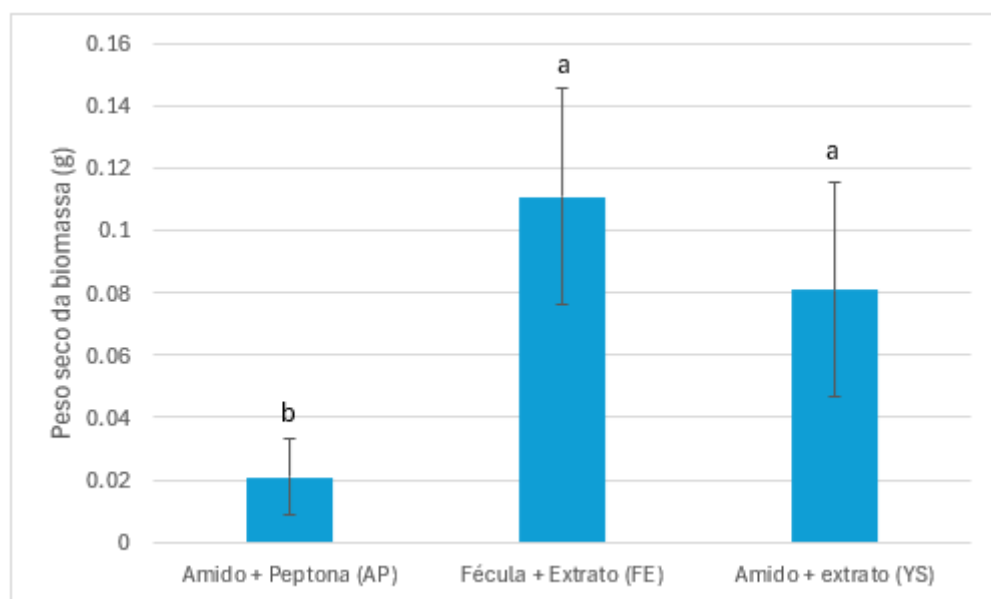
Tabela 3 - Peso seco da biomassa da *S. davaonensis* após crescimento em diferentes meios de cultura líquidos.

Amostra	Média (g)	Desvio Padrão
Amido + Extrato (AE)	0,098	0,052
Amido + Peptona (AP)	0,021	0,05
Fécula + Extrato (FE)	0,111	0,014
Fécula + Peptona (FP)	0,092	0,051
Amido + Extrato (AE com Células Vegetativas)	0,081	0,013

Fonte: Autores (2026)

Realizando uma análise estatística, notou-se que as amostras de Amido + Extrato (AE) e Fécula + Peptona (FP) não apresentaram normalidade, pelo teste de Shapiro-Wilk, apresentando p-valor menor do que 0,05 (para uma significância de 95%), e portanto elas foram retiradas da análise. Seguindo então para uma análise ANOVA, observou-se que as amostras eram homogêneas, com um p-valor maior do que 0,05 no teste de Levene, e portanto foi realizado um ensaio de ANOVA One Way. Os resultados do ensaio mostraram que há diferença significativa entre os grupos, como pode ser observado na Figura 5 abaixo:

Figura 5 - Gráfico de colunas da média com intervalo de confiança de 95% das amostras de peso seco da biomassa de AP, FE e AE (inoculado com suspensão de esporos).



Fonte: Elaborado pelos autores (2026)

Nota: Os índices a e b indicam diferença estatisticamente significativa entre as amostras

A partir da Figura 5, é possível verificar que as amostras com extrato de levedura como fonte de nitrogênio apresentaram diferença significativa em relação à amostra de peptona, com uma maior produção de biomassa. Isso pode ter acontecido pois o extrato de levedura é uma fonte complexa, e portanto, fornece nitrogênio mais biodisponível e mais variado, como na forma de aminoácidos livres, peptídeos curtos, vitaminas, entre outros compostos, que aumentam o crescimento e atividade metabólica de bactérias do gênero *Streptomyces* (Krysenko, 2023), enquanto fontes bem definidas como a peptona não possuem esses compostos. Além disso, como já comentado no item 5.1, a morfologia da bactéria influencia na sua disseminação no meio de cultura. Ścigaczewska, Boruta e Bizukojć (2024) discutem que alterações na morfologia micelial de *Streptomyces*, como o grau de ramificação, compactação e formação de pellets, afetam diretamente a eficiência metabólica e a capacidade de crescimento do microrganismo, influenciando de maneira decisiva a quantidade final de biomassa produzida.

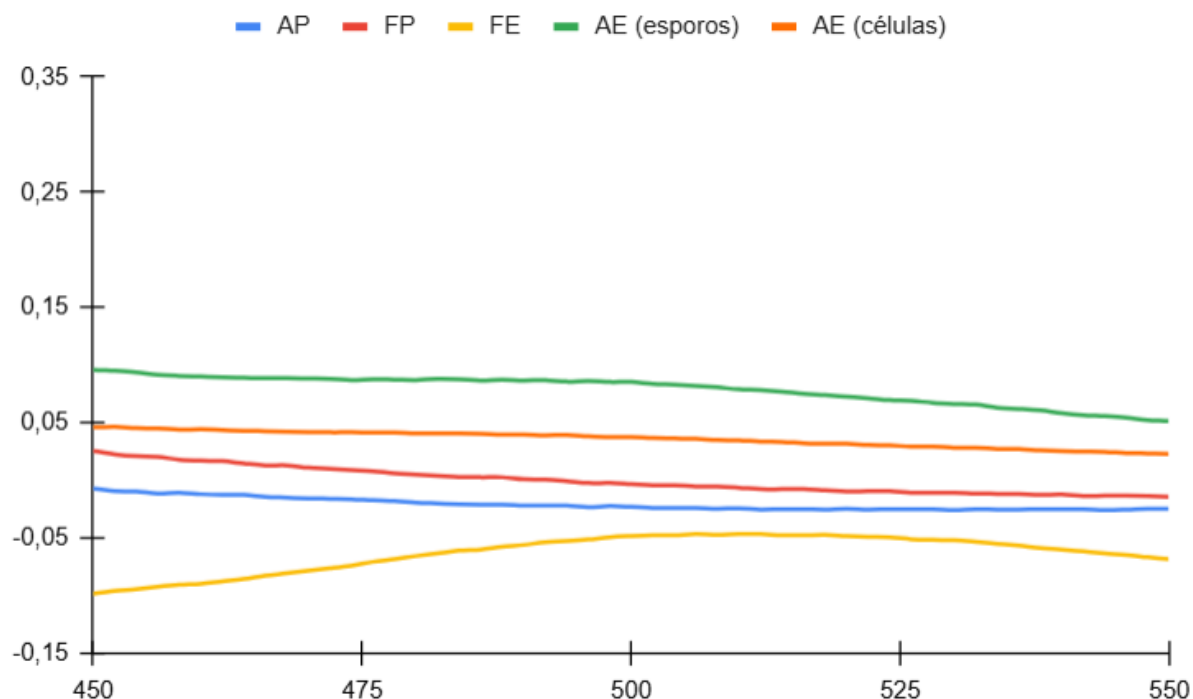
Outro fator a ser considerado na Figura 5 é a fonte de carbono, que observa-se que não houve diferença significativa entre as amostras, indicando que a variação entre fécula de mandioca e amido de batata solúvel não apresentou diferença na produção de biomassa. Isso pode ser explicado pelo fato de ambos

serem polissacarídeos estruturalmente semelhantes, compostos majoritariamente por amilose e amilopectina. *Streptomyces spp.* possuem amilases capazes de degradar eficientemente ambos os substratos, resultando em taxas de liberação de glicose e perfis metabólicos comparáveis (Al-Dhabi *et al.*, 2020). Além disso, como já discutido acima, o fator limitante do crescimento microbiano foi a fonte de nitrogênio, o que talvez possa ter influenciado nos resultados em relação às fontes de carbono.

5.3 COMPARAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ROSEOFILAVINA NOS DIFERENTES MEIOS DE CULTURA POR ESPECTROFOTOMETRIA DE VARREDURA

Os espectros de varredura obtidos para os cultivos em Erlenmeyer estão apresentados na Figura 6. De modo geral, as curvas de absorbância permaneceram muito próximas ao branco, com valores inferiores a $0,1 \pm 0,02$, indicando baixa concentração de compostos detectados no sobrenadante. Essa proximidade sugere que não houve produção significativa de roseofilavina sob as condições avaliadas. A única exceção foi a replicata AE2 (amido e extrato de levedura inoculado com esporo), que apresentou um pico isolado; contudo, esse resultado não corresponde ao perfil espectral característico da roseofilavina e deve ser interpretado como um dado discrepante (*outlier*).

Figura 6 - Gráfico da espectrofotometria de varredura das amostras do cultivo em Erlenmeyer.

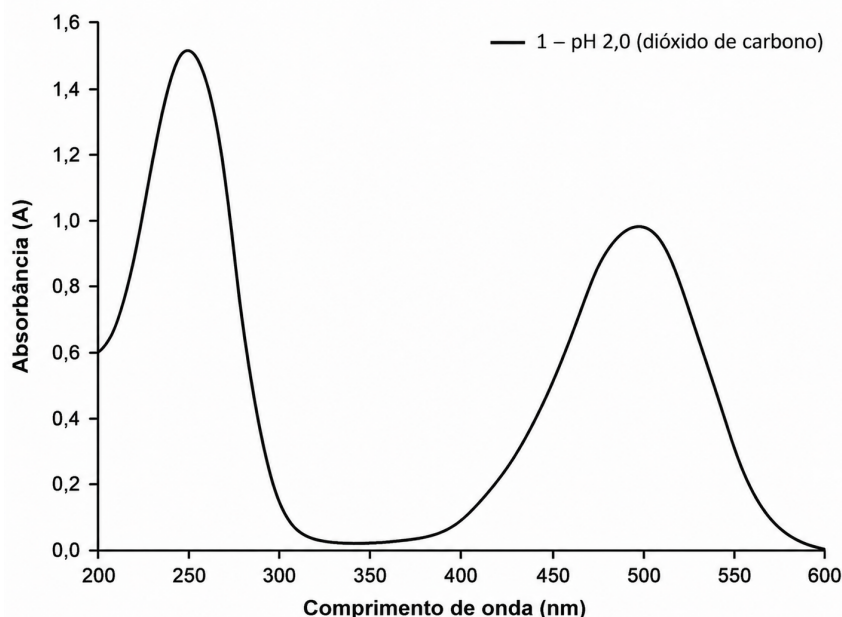


Fonte: Elaborado pelos autores (2026)

Nota: As amostras apresentadas neste gráfico inoculadas com esporos foram: azul - amido e peptona (AP), vermelho - Fécula de mandioca e peptona (FP), amarelo - Fécula de mandioca e extrato de levedura (FE), verde - Amido e extrato de levedura (AE). A amostra inoculada com células vegetativas foi: laranja - amido e extrato de levedura (AE)

Para fins comparativos, a Figura 7 apresenta o espectro de referência da roseoflavina obtido da literatura, no qual se destacam bandas em torno de 260–270 nm e 370–380 nm, além de uma absorção secundária próxima de 450-500 nm (Otani *et al.*, 1974; Kasai; Miura; Matsui, 1975). Esse perfil espectral é considerado uma assinatura da molécula e permite sua identificação inequívoca. Ao confrontar os espectros das amostras com esse padrão, verifica-se que nenhum dos cultivos apresentou traçado compatível com a presença de roseoflavina.

Figura 7 - Espectro de absorção UV-Visível da roseoflavina em água (curva 1)



Fonte: Adaptado de Kasai, Miura e Matsui (1975)

A ausência das bandas características na maioria dos cultivos reforça que as condições empregadas não foram suficientes para induzir o metabolismo secundário de *S. dawaonensis*. Essa limitação está diretamente relacionada a fatores ambientais e fisiológicos que afetam a rota biossintética da roseoflavina. A transferência de oxigênio em erlenmeyer, mesmo sob agitação de 200 rpm, é restrita pelo baixo coeficiente de transferência de oxigênio (kLa). Essa deficiência compromete a atividade de enzimas dependentes de cofatores redox, como a RosB, responsável pela oxidação da riboflavina-5'-fosfato para AFP. Sem oxigênio suficiente, há limitação na regeneração de FMN e FAD, cofatores essenciais para o funcionamento da RosB, reduzindo o fluxo metabólico para a biossíntese da roseoflavina (Mora-Lugo *et al.*, 2019). Além disso, a ausência de controle de pH em frascos agitados permite que o meio se torne mais ácido ou alcalino durante o crescimento. Variações de pH podem inibir diretamente a atividade da RosA, a N,N-dimetiltransferase responsável pela etapa final da biossíntese. Essa enzima utiliza S-adenosilmetionina (SAM) como doadora de grupos metila, e sua atividade é fortemente dependente de pH neutro a levemente alcalino. Desvios reduzem a estabilidade do SAM e comprometem a eficiência da metilação, bloqueando a formação da roseoflavina ativa (Schneider; Mack, 2021).

Outro fator relevante é a disponibilidade de nutrientes. Fontes complexas como peptona e extrato de levedura sustentam crescimento robusto, mas não induzem estresse nutricional. A biossíntese de metabólitos secundários, incluindo a roseoflavina, é ativada em condições de limitação de nitrogênio ou fósforo. Sem essa limitação, o metabolismo permanece direcionado para crescimento primário, e enzimas como a RosC, fosfatase que converte AFP em AF, não são expressas em níveis elevados (Schneider *et al.*, 2020). A morfologia celular também exerce papel decisivo. Em erlenmeyer, *S. davaonensis* tende a formar *pellets* compactos de micélio, reduzindo a difusão de oxigênio e nutrientes para o interior dos agregados e criando zonas de baixa atividade metabólica. Como consequência, há menor indução das rotas secundárias e menor expressão coordenada do *cluster* ros, responsável pela biossíntese da roseoflavina (Wang; Zhao; Ding, 2017).

Outro aspecto avaliado foi a forma de inoculação, comparando esporos e células vegetativas, conforme apresentado na Figura 6. Observou-se que os cultivos iniciados com células vegetativas apresentaram valores de absorbância levemente maiores em relação aos iniciados com esporos ($0,075 \pm 0,001$ para células vegetativas e $0,030 \pm 0,001$ para esporos). No entanto, é importante destacar que essa maior absorbância não representa necessariamente maior produção de roseoflavina, uma vez que os espectros não apresentaram bandas características do composto. Desse modo, foi verificado na literatura que a escolha entre esporos e células vegetativas pode influenciar a cinética de crescimento e a morfologia do micélio. Inóculos de células vegetativas tendem a reduzir o tempo de latência e a favorecer a formação de agregados mais homogêneos, o que pode facilitar a adaptação inicial ao meio e melhorar a transferência de massa (Hopwood, 2007; Fischer; Sawers, 2013). Por outro lado, inóculos de esporos podem resultar em maior heterogeneidade morfológica, prolongando a fase de adaptação e dificultando a indução coordenada do metabolismo secundário. Assim, embora a decisão de trabalhar com células vegetativas tenha sido sustentada por uma leve diferença de absorbância e por evidências de melhor desempenho inicial relatadas em estudos prévios, os resultados demonstram que essa escolha não se traduziu em maior produção de roseoflavina, reforçando que a limitação principal esteve nas condições de cultivo e não na forma de inoculação.

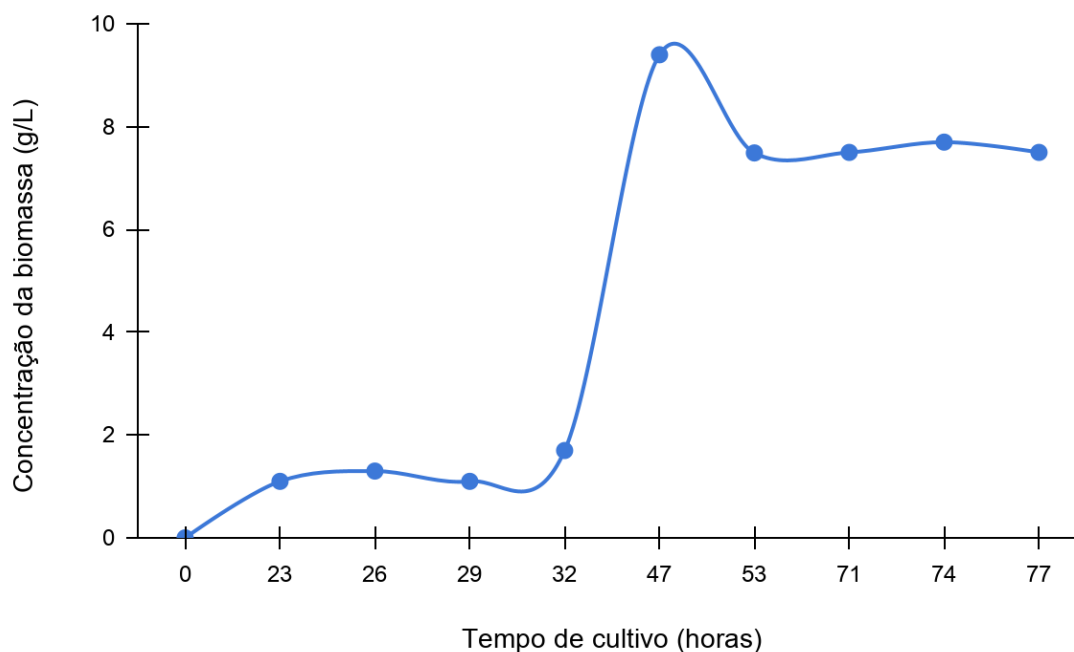
Esses fatores explicam por que, mesmo após cinco dias de cultivo, não foi observada produção significativa de roseoflavina. Para superar essas limitações,

seria necessário utilizar condições que favoreçam a ativação do metabolismo secundário, como cultivo em biorreator com aeração forçada e controle de kLa, manutenção do pH em torno de 6,8–7,2 para preservar a atividade das enzimas RosA e RosC, emprego de meios definidos com limitação de nitrogênio para induzir estresse metabólico e adição de micropartículas, como talco ou celulose, para reduzir a formação de *pellets* e melhorar a transferência de massa (Ścigaczewska *et al.*, 2024). Dessa forma, a ausência de produção observada nos cultivos em erlenmeyer não decorre de tempo insuficiente, mas da falta de indução do metabolismo secundário, que depende de condições ambientais específicas para ser ativado. Além disso, como as absorbâncias permaneceram próximas ao branco em praticamente todas as amostras, não é possível estabelecer se os meios alternativos testados foram melhores ou piores para a produção de roseoflavina, visto que o intuito deste tópico foi comparar a eficiência de diferentes formulações de meio de cultura, mas a baixa produção inviabilizou essa análise comparativa.

5.4 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Streptomyces davaonensis* DURANTE O CULTIVO EM BIORREATOR

Como explicitado na metodologia, as amostras retiradas do biorreator passaram por um processo de centrifugação, separando assim a biomassa do sobrenadante. Após o processo de secagem em estufa, a biomassa foi pesada novamente, cujo resultado está apresentado na Figura 8:

Figura 8 - Crescimento da biomassa de *S. davaonensis* durante cultivo em biorreator ao longo de 77 horas



Fonte: Elaborado pelos autores (2026)

Durante a análise dos dados, alguns pontos experimentais foram desconsiderados por apresentarem variações incompatíveis com o comportamento esperado do crescimento microbiano, como quedas abruptas na concentração de biomassa em intervalos curtos de tempo, o que não é biologicamente plausível. Tais inconsistências podem estar associadas a erros experimentais, como variações na etapa de centrifugação ou retenção de umidade residual durante a secagem, além do fato de tanto o meio de cultivo utilizado (AE) quanto a bactéria filamentosa não proporcionarem um ambiente adequado para uma amostragem qualitativa, devido à heterogeneidade do meio e do crescimento bacteriano (Willemse *et al.*, 2017). Ressalta-se ainda que a ausência de acondicionamento das amostras em dessecador após a retirada da estufa pode ter favorecido a reabsorção de umidade atmosférica antes da pesagem, influenciando a determinação da biomassa seca e aumentando a dispersão dos resultados.

A exclusão desses pontos permitiu uma melhor visualização da tendência geral de crescimento, resultando em um perfil típico de microrganismos filamentosos em cultivo submerso. Contudo, a ausência de replicatas ou duplicatas analíticas por ponto de amostragem na cinética constitui uma limitação metodológica deste ensaio. O monitoramento longitudinal denso (com alta frequência de pontos no tempo) foi

adotado para mitigar essa restrição e mapear a tendência macroscópica das fases de crescimento. Todavia, reconhece-se que a falta de repetições pontuais reduziu a precisão estatística e impediu o cálculo de desvios-padrão para cada intervalo de tempo avaliado. Como solução e recomendação para investigações futuras, preconiza-se amostragem em triplicata para cada tempo cinético, garantindo que as coletas múltiplas e frequentes não interfiram na hidrodinâmica e na transferência de oxigênio do sistema.

Observa-se que, nas primeiras horas de cultivo (0 a 32 h), a concentração da biomassa apresentou valores baixos e relativamente estáveis, variando entre aproximadamente 1 g/L e 2g/L. Embora esse comportamento possa estar associado ao período inicial de adaptação celular ao ambiente de cultivo, deve-se considerar que o meio AE utilizado apresenta amido como principal fonte de carbono. Como esse substrato necessita ser previamente hidrolisado por enzimas extracelulares antes de sua assimilação pelos microrganismos, o crescimento inicial reduzido pode refletir não apenas uma fase de adaptação fisiológica, mas também o tempo necessário para a degradação do amido e disponibilização de açúcares assimiláveis para o metabolismo celular (Madigan *et al.*, 2021). A partir de 32 horas, inicia-se um aumento mais pronunciado da biomassa, atingindo cerca de 9,4 g/L em 47 horas, o que indica a entrada na fase exponencial de crescimento, marcada pela intensificação da atividade metabólica e da proliferação celular, favorecido pela maior disponibilidade de nutrientes oriundos da degradação do substrato. Após esse ponto, observa-se uma leve redução seguida de estabilização da biomassa entre 53 e 77 horas, com valores variando em torno de 7,4 a 7,7 g/L, sugerindo a transição para a fase estacionária. Nessa fase, a taxa de crescimento tende a se equilibrar com a taxa de morte celular, possivelmente em função da limitação de nutrientes e do acúmulo de metabólitos no meio.

Esse comportamento pode ser encontrado na literatura para a *S. davaonensis* cultivada em frascos Erlenmeyer, onde Kibling *et al.* (2020) demonstraram que as bactérias entram no estado estacionário após 48h. No entanto, existem estudos que mostram que a fase estacionária é atingida após 72h (Jankowitsch *et al.*, 2011). Essas diferenciações podem ser explicadas pela variação genética entre as cepas, que pode afetar a cinética de crescimento microbiano, bem como pelas condições de cultivo, como a agitação, a oxigenação, a oferta de nutrientes, entre outros fatores. Embora os estudos disponíveis na literatura para *S.*

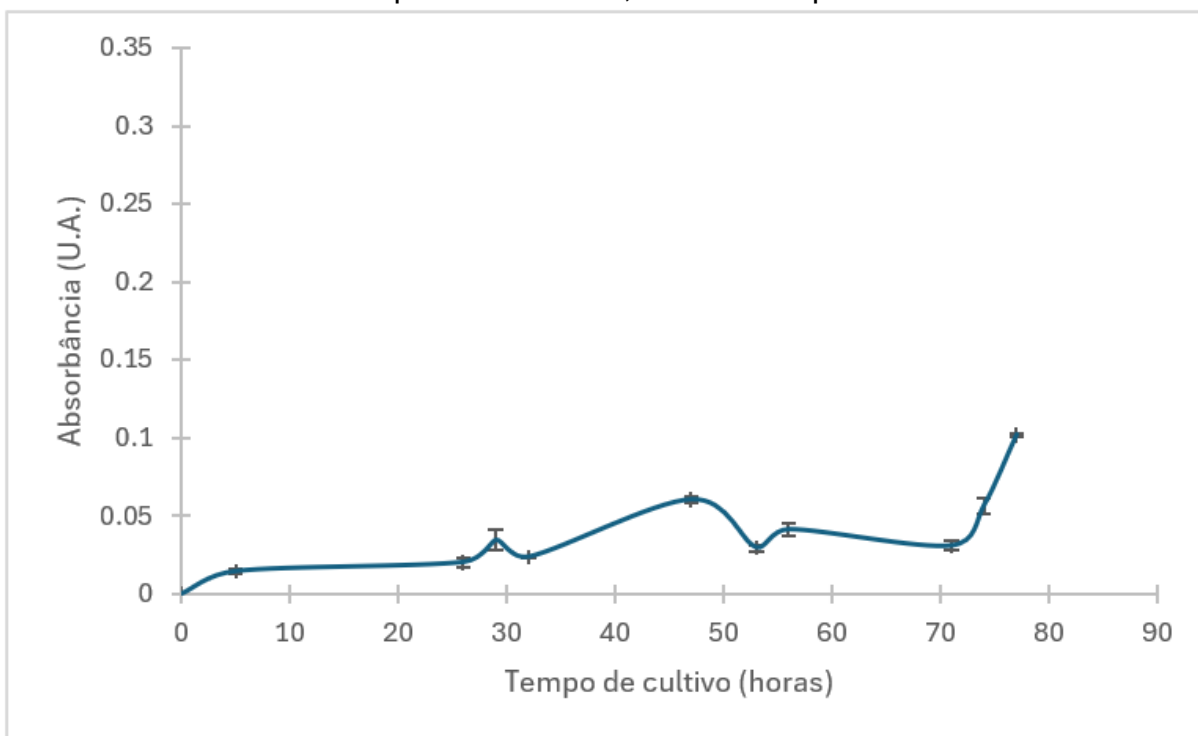
davaonensis tenham sido realizados predominantemente em frascos Erlenmeyer, os resultados obtidos neste trabalho permitem uma comparação qualitativa das tendências gerais de crescimento observadas. Entretanto, comparações quantitativas diretas devem ser realizadas com cautela, uma vez que o cultivo em biorreator apresenta condições distintas, incluindo agitação mecânica controlada, aeração contínua, monitoramento de pH e utilização de antiespumante, fatores que influenciam significativamente a transferência de massa, a disponibilidade de oxigênio e a cinética de crescimento microbiano (Nielsen; Villadsen; Lidén, 2017).

Dessa forma, os resultados obtidos sugerem que a cultura atingiu uma condição próxima à fase estacionária após aproximadamente 47 horas de cultivo. No entanto, considerando a ausência de estudos específicos sobre a cinética de crescimento de *S. davaonensis* em biorreatores e as particularidades do sistema utilizado, não é possível afirmar se o perfil observado corresponde ao comportamento típico da espécie nessa condição de cultivo ou se foi influenciado por fatores operacionais específicos do processo.

5.5 COMPARAÇÃO DOS PERFIS ESPECTROFOTOMÉTRICOS DAS AMOSTRAS DE CULTIVO EM ERLENMEYER E EM BIORREATOR

Após o processo de clarificação das amostras, foi realizada a leitura espectrofotométrica do sobrenadante. Como demonstrado na metodologia, a leitura foi feita em quintuplicata, e os resultados estão dispostos na Figura 9.

Figura 9 - Média das absorvâncias em 508nm das amostras retiradas do biorreator em tempos de 0h à 77h, com desvio padrão.



Fonte: Elaborado pelos autores (2026)

Como observado na Figura 9, as amostras coletadas até aproximadamente 71h de cultivo apresentaram valores de absorvância semelhantes, sem aumento expressivo ao longo do tempo. As pequenas oscilações observadas em alguns pontos, como 29h e 53h, podem estar relacionadas às limitações analíticas do método ou à própria heterogeneidade do cultivo. Por se tratar de *S. davaonensis*, uma bactéria filamentosa que forma pellets, a amostragem pode não representar completamente a composição do meio, mesmo sob agitação. Assim, até esse período, é provável que a produção de roseoflavina tenha sido inexistente ou inferior ao limite de detecção do método empregado.

A partir de 71h foi observado um aumento gradual da absorvância, atingindo $0,102 \pm 0,001$ em 77h. Entretanto, esse resultado não permite afirmar, isoladamente, que houve aumento da produção de roseoflavina, uma vez que outros compostos presentes no sobrenadante também podem absorver em 508 nm (Sarmiento-Tovar *et al.*, 2024). Ainda assim, esse valor foi superior ao observado no cultivo em Erlenmeyer ao final de 120h ($0,075 \pm 0,001$), indicando que o cultivo em biorreator favoreceu a formação de compostos absorventes nesse comprimento de onda.

Esses resultados são parcialmente compatíveis com o estudo de Otani, Kasai e Matsui (1980), que demonstraram que a produção máxima de roseoflavina ocorre entre 90 e 120h em biorreatores operando a 200rpm e 0,5vvm, condições semelhantes às empregadas neste trabalho. Dessa forma, é possível que o cultivo de 77h não tenha sido suficiente para atingir a produção máxima do metabólito. A confirmação dessa hipótese, entretanto, depende da realização de etapas de *downstream* e de análises químicas mais específicas, capazes de confirmar a identidade do composto responsável pelo aumento da absorbância.

Do ponto de vista metabólico, a produção de roseoflavina depende principalmente das enzimas RosB e RosA. A RosB converte o precursor flavínico em 8-amino-8-desmetil-D-riboflavina (AF), enquanto a RosA catalisa as duas etapas finais de metilação que originam a roseoflavina (Jankowitsch *et al.*, 2011). Como a atividade da RosB é dependente de oxigênio, limitações na transferência de massa podem comprometer diretamente a biossíntese do metabólito.

Neste estudo, optou-se por utilizar as mesmas condições operacionais descritas por Otani, Kasai e Matsui (1980), especialmente a agitação de 200 rpm, visando reproduzir um protocolo previamente associado à produção de roseoflavina e permitir maior comparabilidade entre os resultados. Embora Jankowitsch *et al.* (2011) tenham utilizado aproximadamente 700rpm em biorreatores de 10L e relatado produção em menor tempo, o estudo não apresenta dados quantitativos detalhados que permitam uma comparação direta.

Outrossim, velocidades de agitação mais elevadas poderiam intensificar a formação de espuma. Como o controle de espuma foi realizado manualmente, aumentos frequentes na adição de antiespumante poderiam interferir na transferência de oxigênio e no comportamento fisiológico da cultura, especialmente em bactérias filamentosas (García-Ochoa; Gómez, 2009). Dessa forma, optou-se por condições mais conservadoras para garantir a estabilidade operacional durante todo o cultivo.

Apesar disso, é possível que a agitação empregada tenha sido insuficiente para promover adequada transferência de oxigênio. Em espécies do gênero *Streptomyces*, a disponibilidade de oxigênio influencia diretamente a morfologia dos pellets, o crescimento celular e a produção de metabólitos secundários. Maiores velocidades de agitação e o uso de chicanas podem melhorar a dispersão micelial e

reduzir limitações difusionais no interior dos pellets (Zhou *et al.*, 2018), favorecendo a atividade das enzimas envolvidas na biossíntese da roseoflavina.

Os resultados obtidos também corroboram a discussão apresentada no item 5.4. Embora o crescimento tenha indicado o início da fase estacionária por volta de 48h, esperava-se que a produção de roseoflavina acompanhasse esse comportamento. Entretanto, o aumento mais evidente da absorbância ocorreu apenas ao final do cultivo. Em conjunto com os dados de peso seco, isso sugere que as condições experimentais favoreceram predominantemente o crescimento celular em detrimento da produção de metabólitos secundários. Essa hipótese é reforçada por Kibling *et al.* (2020), que relataram produção detectável de roseoflavina após 48h em cultivos conduzidos em Erlenmeyer. Por outro lado, como foi observado apenas o início de um aumento na absorbância, não se pode descartar que a produção de roseoflavina tenha ocorrido de forma mais tardia nas condições adotadas.

Assim, estudos futuros devem avaliar tempos de cultivo superiores a 77h, bem como diferentes condições de operação do biorreator, incluindo maiores velocidades de agitação, taxas de aeração e estratégias de controle de espuma. Também seria interessante investigar modificações na composição do meio, especialmente na fonte e concentração de carbono, visando favorecer a produção de metabólitos secundários em detrimento do crescimento celular.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Os dados obtidos a partir desse estudo evidenciaram que a quantificação da roseoflavina por espectrofotometria apresentou limitações quanto à caracterização do composto, uma vez que tais resultados podem ter sido influenciados pela diluição da amostra, pela baixa concentração da molécula alvo no caldo fermentativo e pela presença de proteínas ou outros compostos interferentes capazes de absorver na mesma faixa de absorção da roseoflavina. Nesse contexto, espera-se que o desenvolvimento de uma metodologia de processamento *downstream* possibilite concentração da roseoflavina e a obtenção de extratos enriquecidos com a molécula alvo, favorecendo a aplicação de técnicas analíticas de maior seletividade que permitam a identificação da roseoflavina. Ademais, o estudo e otimização dessas etapas pode contribuir para a caracterização da roseoflavina produzidas por *Streptomyces davaonensis*, e para o desenvolvimento de processos de recuperação mais eficiente desse metabólito.

Espera-se que uma avaliação de proteínas totais seja incorporada como parâmetro de controle em etapas futuras de otimização da purificação da roseoflavina, uma vez que permitirá verificar se alterações em parâmetros como condições do cultivo ao longo do escalonamento ou na composição do meio promovem aumento de teor proteico no sobrenadante, fator que pode justificar a inclusão de etapas adicionais ao processo de purificação da roseoflavina, como é o caso da precipitação fracionada com sulfato de amônio, de forma a reduzir a interferência de contaminantes nas etapas posteriores de extração líquido-líquido e análise por CLAE. Ademais, tal análise pode contribuir como uma forma de padronização confiável no estudo de meios complexos, neste contexto o meio AE, cuja composição heterogênea favorece a ocorrência de interferências nos métodos clássicos de quantificação proteica (Bonilla *et al.*, 2019). Nesse contexto, a combinação dos métodos de Bradford e do método do ácido bicinconínico (BCA) apresentam elevado potencial de análise cruzada para mitigar e identificar desvios causados por interferentes, sabendo-se que o primeiro é selecionado por sua simplicidade, rapidez e sensibilidade, mesmo que requeira cautela quando aplicado a amostras biológicas complexas (Kruger, 2009), e o segundo apresenta maior

robustez para meios complexos, mesmo que exiba susceptibilidade a interferências causadas por agentes redutores endógenos que podem estar presentes no meio AE (Kurylenko; Dmytruk; Sibirny, 2019). De tal forma, o monitoramento da carga proteica contribui para o desenvolvimento de um processo de purificação economicamente viável e reduz a utilização de reagentes desnecessários, considerando que concentrações inferiores à 0,1 mg/mL são descritas em literatura como insuficientes para justificar a necessidade do processo de precipitação fracionada. Assim sendo, torna-se possível identificar a partir de qual ponto o teor proteico passa a comprometer as etapas posteriores de purificação e de obtenção da roseoflavina com maior grau de pureza.

Nesse contexto, concentrações proteicas superiores à 0,1 mg/mL poderão justificar a aplicação da etapa de precipitação fracionada com sulfato de amônio, de mesmo modo que valores inferiores podem indicar sua dispensabilidade, de modo a reduzir custos operacionais, tempo de experimentação e consumo de reagentes, além de minimizar o risco de perda da biomolécula por coprecipitação em etapas desnecessárias ao processo (Du *et al.*, 2022). Tomando como base que o método possui como princípio o processo de *salting out*, onde elevadas concentrações de sulfato de amônio promove a precipitação de proteínas seletiva de proteínas (Arakawa; Timasheff, 1985; Kang *et al.*, 2020), tal metodologia poderá promover a remoção de proteínas de acordo com suas características físico-químicas, ao mesmo tempo em que preserva a roseoflavina na fração solúvel do sistema, em decorrência de sua baixa massa molecular ($\approx 478,5$ g/mol) quando comparada com proteínas presentes no caldo fermentativo (10.000 a >100.000 g/mol) (Akyüz *et al.*, 2024; Duong-Ly; Gabelli, 2014). Fundamentando-se ainda no fato de que a roseoflavina apresenta estabilidade em soluções aquosas próximas à neutralidade, em conjunto com sua maior susceptibilidade à fotodegradação do que à presença de sais (Tyagi *et al.*, 2010), é esperado que, se conduzida ao abrigo de luz e em baixas temperaturas, tal etapa não promova perda significativa da biomolécula, o que pode ser confirmado pelo monitoramento da absorbância do sobrenadante em 508 nm antes e após a precipitação. Ademais, a redução do teor proteico deverá favorecer as etapas subsequentes de extração líquido-líquido e análise cromatográfica, reduzindo a possibilidade de formação de emulsões ou ruído de fundo nas análises posteriores, aspecto de suma importância tendo em vista a dificuldade de diferenciação da roseoflavina de outros compostos presentes no caldo fermentativo

(Sarmiento-Tovar *et al.*, 2024). Por outro lado, sabendo-se que o processo de precipitação não remove compostos de baixa massa molecular, e que, em conjunto a isso, concentrações elevadas de sal podem ocasionar no processo de coprecipitação da molécula de interesse (Duong-Ly; Gabelli, 2014), espera-se que essa etapa, se realmente necessária, seja integrada a outras técnicas complementares de maior resolução para purificação da roseoflavina.

Já para a etapa de extração líquido-líquido com utilização de acetato de etila, é esperado que represente uma etapa eficiente para o enriquecimento da roseoflavina, levando em conta sua natureza anfifílica e sua maior afinidade relativa por solvente orgânicos de polaridade intermediária, em decorrência de sua estrutura molecular e seu comportamento de partição (Otani *et al.*, 1980; NCBI, 2026). Tendo em vista que o coeficiente de partição atua como principal parâmetro que rege a destruição da molécula-alvo entre as fases imiscíveis, é esperado que a realização de extrações sequenciais, com a adição sucessiva de acetato de etila, promova o deslocamento de forma progressiva da roseoflavina para a fase orgânica, de modo a aumentar a eficiência global da recuperação da molécula em relação à uma única etapa de extração, conforme é descrito em literatura para metabólitos microbianos (Ibarra *et al.*, 2021). Desta forma, espera-se como consequência a obtenção de uma fração enriquecida com roseoflavina e com menor concentração de interferentes hidrossolúveis provenientes do meio de cultivo, favorecendo assim as etapas posteriores de caracterização do composto por análises cromatográficas, por meio da obtenção de perfis cromatográficos compatíveis com aqueles descritos na literatura para a roseoflavina (Liunardo *et al.*, 2024; Mora-Lugo; Stegmüller; Mack, 2019).

Por fim, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) com detector *UV-Vis* passa a ser a principal ferramenta para a validação das etapas de produção e purificação da roseoflavina a partir de *Streptomyces davaonensis*, permitindo a confirmação qualitativa da identidade do composto (Kumar, 2022). Concretizada a concentração da roseoflavina na fração orgânica após a extração líquido-líquido, espera-se que a análise em coluna de fase reversa C18, fazendo-se uso de tampão fosfato 50 mmol/L (pH 3,0) contendo 12% de acetonitrila em regime isocrático, promova redução da complexidade da amostra de modo a favorecer a separação entre a roseoflavina e os outros constituintes do caldo fermentativo ainda presentes na fração enriquecida proveniente da extração (Jankowitsch *et al.*, 2011).

Tomando-se como base a hidrofobicidade da roseoflavina em decorrência da substituição do grupo metila pelo grupo dimetilamino na posição C8 do núcleo isoaloxazínico, espera-se tempos de retenção compatíveis com aqueles descritos em literatura, de forma a possibilitar sua distinção dos demais componentes (Kibling *et al.*, 2020). Assim sendo, estudos futuros podem empregar o CLAE/HPLC como método de monitoramento da produção e eficiência das etapas competentes ao *downstream*, fornecendo evidências analíticas da produção de roseoflavina e podendo reduzir etapas iniciais de desenvolvimento do processo.

7 CONCLUSÕES

A presente pesquisa permitiu avaliar a influência de diferentes meios de cultura e estratégias de inoculação sobre o crescimento de *Streptomyces davaonensis* e seu potencial de produção de roseoflavina, contribuindo para ampliar o conhecimento acerca do cultivo desse microrganismo em escala laboratorial e de bancada. Entre as condições avaliadas, o meio AE, composto por amido de batata e extrato de levedura, apresentou o melhor desempenho para o crescimento microbiano, especialmente quando associado ao uso de inóculo proveniente de células vegetativas. Os resultados evidenciaram ainda que a composição nutricional do meio exerce influência significativa sobre o metabolismo do microrganismo, enquanto a substituição da fonte de carbono por fécula de mandioca não promoveu diferenças expressivas na produção de biomassa.

O cultivo em biorreator possibilitou acompanhar a cinética de crescimento de *S. davaonensis* em escala ampliada, demonstrando que a biomassa atingiu aproximadamente 9,4 g/L e posteriormente estabilizou-se, indicando a entrada na fase estacionária. Entretanto, a produção de roseoflavina foi inferior ao esperado nas condições adotadas, sugerindo que fatores operacionais, como transferência de oxigênio, velocidade de agitação, tempo de cultivo e disponibilidade de nutrientes, podem ter favorecido o crescimento celular em detrimento da biossíntese do metabólito secundário. Dessa forma, os resultados reforçam a necessidade de otimização das condições operacionais do processo, bem como da realização de estudos envolvendo diferentes estratégias de aeração, agitação e monitoramento do oxigênio dissolvido.

Além dos resultados experimentais, o trabalho permitiu propor uma estratégia teórica de downstream para recuperação da roseoflavina, contemplando etapas de precipitação proteica com sulfato de amônio, extração líquido-líquido com acetato de etila e análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC), bem como um plano de gerenciamento e valorização dos resíduos gerados durante o processo fermentativo. Assim, o estudo contribui não apenas para o entendimento das condições de cultivo de *S. davaonensis*, mas também para o desenvolvimento de um processo integrado, contemplando as etapas upstream e downstream sob a perspectiva da eficiência produtiva, da sustentabilidade e da futura aplicação biotecnológica da roseoflavina.

REFERÊNCIAS

- AKYÜZ, E. *et al.* Advanced strategies in fractional protein precipitation: Understanding molecular weight and surface charge interactions in complex biofluids. **Process Biochemistry**, v. 138, p. 45-56, 2024.
- AL-DHABI, N. A. *et al.* Isolation and purification of starch hydrolysing amylase from *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-46 obtained from the Jazan region of Saudi Arabia with industrial applications. **Journal Of King Saud University - Science**, v. 32, n. 1, p. 1226-1232, 2020.
- ALSAEEDI, S. *et al.* Current utilization technologies and products of antibiotic fermentation residues: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 13, n. 2, p. 1-15, 2025. DOI:10.1016/j.jece.2025.116182
- ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S. N. Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: balance between hydration and salt binding. **Biochemistry**, v. 23, n. 25, p. 5912-5923, 1984. Disponível em: <https://europepmc.org/article/MED/6525340>
- ASSIA, M. *et al.* Physico-chemical Characterization of a Pink Red-like Pigments Produced by Five New Bacterial Soil Strains Identified as *Streptomyces coelicoflavus*. **American Journal Of Microbiological Research**, v. 6, n. 3, p. 67-72, 2018.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10004**: resíduos sólidos — classificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2004.
- ASTUDILLO, Á. *et al.* Recycling potato waste for the production of blue pigments by *Streptomyces lydicus* PM7 through submerged fermentation. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 11, 2024.
- BALL, G. F. M. **Vitamins in foods: analysis, bioavailability and stability**. Boca Raton: CRC Press, 2006.
- BENNETT, J. A.; KANDELL, G. V.; KIRK, S. G.; MCCORMICK, J. R. Visual and microscopic evaluation of *Streptomyces* developmental mutants. **Journal of Visualized Experiments**, n. 139, e57373, 2018. DOI: 10.3791/57373.
- BONILLA, J. O. *et al.* Intracellular Proteomic Analysis of *Streptomyces* sp. MC1 When Exposed to Cr(VI) by Gel-Based and Gel-Free Methods. **Current Microbiology**, v. 77, n. 1, p. 62-70, 2019.
- BORUTA, T. A bioprocess perspective on the production of secondary metabolites by *Streptomyces* in submerged co-cultures. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 37, p. 171, 2021. DOI: 10.1007/s11274-021-03141-z.
- BUSHELL, M. E. Growth, product formation and fermentation technology. In: **Actinomycetes in Biotechnology**. London: Academic Press, 1992. p. 185-217.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 1976.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 306, de 7 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2004.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 358, de 29 de abril de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2005.

BRASIL. Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005. Lei de Biossegurança. Estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2005.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 401, de 4 de novembro de 2008. Estabelece critérios para o manejo ambientalmente adequado dos resíduos sólidos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2008.

BRASIL. Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010. Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 222, de 28 de março de 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2018.

BRASIL. Lei nº 14.026, de 15 de julho de 2020. Atualiza o marco legal do saneamento básico e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 jul. 2020.

BRASIL. Decreto nº 10.936, de 12 de janeiro de 2022. Regulamenta a Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010, que institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 13 jan. 2022.

BRITO, L. *et al.* Production of the Antimicrobial Roseoflavin With Genetically Engineered *Corynebacterium glutamicum*. **Microbial Biotechnology**, 2025. DOI: 10.1111/1751-7915.70246. Disponível em: <https://enviromicro-journals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1751-7915.70246>.

CASSIANO, N.M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000400033>

ČIHÁK, M. *et al.* Secondary metabolites produced during the germination of *Streptomyces coelicolor*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 2495, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02495.

CHEN, Y. *et al.* Biological production and simulated moving bed purification of streptothricin F from food waste digestate. **Green Chemistry**, v. 26, n. 24, p. 11963-11975, 2024.

COPELAND, L. *et al.* Form and functionality of starch. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1527-1534, 2009. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2008.09.016.

COOK, A. M.; LUND, B. M. Total counts of bacterial spores using counting slides. **Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 97-104, 1962. DOI: 10.1099/00221287-29-1-97.

DE ALMEIDA, I. A. *et al.* Applications of actinomycete genera in the biodegradation of environmental contaminants. **Revista de Gestão Social e Ambiental**, v. 18, n. 10, p. e08798, 2024. DOI: 10.24857/rgsa.v18n10-087.

DE VERO, L. *et al.* High-glutathione producing yeasts obtained by genetic improvement strategies: a focus on adaptive evolution approaches for novel wine strains. **AIMS Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 155-170, 2017.

DMYTRUK, K. *et al.* Efficient production of bacterial antibiotics aminoriboflavin and roseoflavin in eukaryotic microorganisms, yeasts. **Microbial Cell Factories**, v. 22, p. 132, 2023. DOI: 10.1186/s12934-023-02129-8. Disponível em: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-023-02129-8>.

DUONG-LY, K. C.; GABELLI, S. B. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. In: **LABORATORY METHODS IN ENZYMOLOGY: PROTEIN PART C**. Methods in Enzymology, v. 541. Academic Press Inc., 2014. p. 85-94

DU, Miao *et al.* Progress, applications, challenges and prospects of protein purification technology. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, p. 1028691, 6 dez. 2022. DOI: 10.3389/fbioe.2022.1028691.

FAN, Y. *et al.* The Biological Functions of Yeast and Yeast Derivatives and Their Application in Swine Production: A Review. **Microorganisms**, v. 13, n. 1669, p. 1-26, 2025. DOI: 10.3390/microorganisms13071669.

FISCHER, M.; SAWERS, R. G. A universally applicable and rapid method for measuring the growth of *Streptomyces* and other filamentous microorganisms by methylene blue adsorption-desorption. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 14, p. 4499-4502, 2013. DOI: 10.1128/AEM.00778-13.

GARCÍA-OCHOA, F.; GÓMEZ, E.. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 153-176, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>

GARCIA, Leila Posenato; ZANETTI-RAMOS, Betina Giehl. Gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde: uma questão de biossegurança. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 20, n. 3, p. 740-749, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2004000300011>

GONG, Y. *et al.* Life cycle assessment of ammonium sulfate recovery from urban wastewater. **Blue-Green Systems**, 2024.

GREEN, A. A.; HUGHES, W. L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. In: **METHODS IN ENZYMOLOGY**. Elsevier, 1955. p. 67–90

HEMASA, A. L.; MACK, M.; SALIBA, K. J.. Roseoflavin, a Natural Riboflavin Analogue, Possesses In Vitro and In Vivo Antiplasmodial Activity. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 66, n. 10, 18 out. 2022

HEMBERGER, S. *et al.* RibM from *Streptomyces davawensis* is a riboflavin/roseoflavin transporter and may be useful for the optimization of riboflavin production strains. **BMC Biotechnology**, v. 11, n. 1, 2011.

HOPWOOD, D. A. ***Streptomyces in nature and medicine: the antibiotic makers***. Oxford: Oxford University Press, 2007.

HWANG, K. S. *et al.* Systems biology and biotechnology of *Streptomyces* species for the production of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 255–268, 2014. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.10.008.

IBARRA, C. *et al.* Recovery of roseoflavin from a recombinant *Streptomyces davaonensis* strain by using biphasic aqueous systems. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2021.

JANKOWITSCH, F. *et al.* A Novel N,N-8-Amino-8-demethyl-d-riboflavin Dimethyltransferase (RosA) Catalyzing the Two Terminal Steps of Roseoflavin Biosynthesis in *Streptomyces davawensis*. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 286, n. 44, p. 38275-38285, 2011.

JARDIM, W. F. Gerenciamento de resíduos químicos em laboratórios de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 671–673, 1998. DOI: 10.1590/S0100-40421998000500024.

JIMÉNEZ-NAVA, R.; CHÁVEZ-CAMARILLO, G.; CRISTIANI-URBINA, E. Biosynthesis, Regulation, and Biotechnological Production Strategies of Riboflavin (Vitamin B2) and Its Derivatives: A Review. **Pharmaceuticals**, v. 19, n. 3, p. 389, 2026. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph19030389>.

KANAUJIYA, D. *et al.* Biological treatment processes for the removal of organic micropollutants from wastewater: a review. **Current Pollution Reports**, v. 5, p. 112–128, 2019.

KANG, B. *et al.* Hofmeister Series: Insights of Ion Specificity from Amphiphilic Assembly and Interface Property. **ACS Omega**, v. 5, n. 12, p. 6229-6239, 20 mar. 2020. DOI: 10.1021/acsomega.0c00237.

KASAI, S.; MIURA, R.; MATSUI, K.. Chemical Structure and Some Properties of Roseoflavin. **Bulletin Of The Chemical Society Of Japan**, v. 48, n. 10, p. 2877-2880, 1 out. 1975

KHALIDI-IDRISSI, A. *et al.* Recent advances in the biological treatment of wastewater rich in emerging pollutants produced by pharmaceutical industrial discharges. **International Journal of Environmental Science and Technology**, 2023.

KIBLING, L. *et al.* The roseoflavin producer *Streptomyces davaonensis* has a high catalytic capacity and specific genetic adaptations with regard to the biosynthesis of riboflavin. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 8, p. 3248-3265, 2020. DOI: 10.1111/1462-2920.15066. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15066>.

KRUGER, N. J. The Bradford Method For Protein Quantitation. **Springer Protocols Handbooks**, p. 17-24, 2009.

KRYSENKO, S. Impact of Nitrogen-Containing Compounds on Secondary Metabolism in *Streptomyces spp.*—A Source of Metabolic Engineering Strategies. **Synbio**, v. 1, n. 3, p. 204-225, 2023.

KUMAR, D. *et al.* Analyte recovery in LC-MS/MS bioanalysis: an old issue revisited. **Analytica Chimica Acta**, v. 1198, p. 339512, 2022. DOI: 10.1016/j.aca.2022.339512.

KUMAR, P. *et al.* Insights into the mechanism of mycelium transformation of *Streptomyces toxytricini* into pellet. **FEMS Microbes**, v. 4, p. 1-6, 2023.

KURYLENKO, O. O.; DMYTRUK, K. V.; SIBIRNY, A. Glutathione metabolism in yeasts and construction of the advanced producers of this tripeptide. In: SIBIRNY, A. (Ed.). **Non-conventional yeasts: from basic research to application**. Cham: Springer, 2019. p. 153–196

LIU, G. *et al.* Trends in the two-component system's role in the synthesis of antibiotics by *Streptomyces*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2023. DOI: 10.1007/s00253-023-12623-z.

LIUNARDO, J. J. *et al.* Isolation, characterisation and description of the roseoflavin producer *Streptomyces berlinensis* sp. nov. **Environmental Microbiology Reports**, v. 16, n. 2, 13266, 2024. DOI: 10.1111/1758-2229.13266. Disponível em: <https://pub.uni-bielefeld.de/record/2988965>.

MACK, M. *et al.* Genome sequence of the bacterium *Streptomyces davawensis* JCM 4913 and heterologous production of the unique antibiotic roseoflavin. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 23, p. 6617-6618, 2012. DOI: 10.1128/JB.01592-12.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Brock Biology of Microorganisms**. 16. ed. New York: Pearson, 2021.

MANTECA, Á.; YAGÜE, P. *Streptomyces* differentiation in liquid cultures as a trigger of secondary metabolism. **Antibiotics**, v. 7, n. 2, p. 41, 2018. DOI: 10.3390/antibiotics7020041.

MATERN, A. *et al.* Uptake and metabolism of antibiotics roseoflavin and 8-demethyl-8-aminoriboflavin in riboflavin-auxotrophic *Listeria monocytogenes*. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 23, p. 3233–3243, 2016.

MILLIPORESIGMA. **Cell Culture Contamination Troubleshooting**. 2025. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com>. Acesso em: 30 mar. 2026.

MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. **Modern sample preparation for chromatography**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier, 2022.

MORA-LUGO, R.; STEGMÜLLER, J.; MACK, M. Metabolic engineering of roseoflavin-overproducing microorganisms. **Microbial Cell Factories**, v. 18, art. 146, 2019. DOI: 10.1186/s12934-019-1181-2.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **Ethyl acetate**. PubChem. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethyl-acetate>

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). **Riboflavin**. PubChem. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Riboflavin>

NARAYANAN, C.; NARAYAN, V. Biological wastewater treatment and bioreactor design: a review. **Sustainable Environment Research**, v. 29, p. 1–17, 2019.

NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; LIDÉN, G. **Bioreaction Engineering Principles**. 3. ed. New York: Springer, 2017.

NOBLE, J. E.; BAILEY, M. J. A. Quantitation of protein. In: **METHODS IN ENZYMOLOGY**. v. 463. Elsevier, 2009. p. 73–95.

OTANI, S.; KASAI, S.; MATSUI, K. Isolation, chemical synthesis, and properties of roseoflavin. In: WOOD, W. A.; KELLY, R. M. (ed.). **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press, 1980. v. 66, p. 235–241.

OTANI, S.; MIURA, R.; MATSUI, K. Chemical structure and some properties of roseoflavin. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 48, n. 10, p. 2877–2880, 1975.

OTANI, S. *et al.* Roseoflavin, a new antimicrobial pigment from *Streptomyces*. **Journal of Antibiotics**, v. 27, n. 1, p. 86–87, 1974.

O'SHEA, M. **Characterisation and growth optimisation of *Streptomyces natalensis***. 1998. Dissertação (Mestrado) – Dublin City University, Dublin, 1998.

PEDROLI, D. B.; MACK, M. Bacterial flavin mononucleotide riboswitches as targets for flavin analogs. In: **METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY**. Cham: Springer, 2013. p. 165–176.

PERWEZ, M.; AL ASHEH, S.. Valorization of agro-industrial waste through solid-state fermentation: Mini review. **Biotechnology Reports**, v. 45, e00873, mar. 2025. DOI:

10.1016/j.btre.2024.e00873. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215017X24000468>.

PICÃO, B. W. **Estudo da velocidade de agitação na produção de Riboflavina por *Bacillus subtilis* em biorreator mecanicamente agitado e aerado**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara, 2021.

POOLE, C. F. (ed.). **Liquid-Phase Extraction**. Amsterdam: Elsevier, 2020. (Handbooks in Separation Science).

POWERS, H. J. Riboflavin (vitamin B2) and health. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 112, n. 1, p. 7–18, 2020.

RAMOS, L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. **Journal of Chromatography A, Amsterdam**, v. 1221, p. 84-98, 2012.

REULE, A. G. Errors in spectrophotometry and calibration procedures to avoid them. **Journal of Research of the National Bureau of Standards. Section A, Physics and Chemistry**, v. 80A, n. 4, p. 609-624, 1976. DOI: 10.6028/jres.080A.060.

RODRIGUES, K. C. S. *et al.* Aumento da produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* aplicando... In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA – COBEQ, 20., 2016, Fortaleza. **Anais [...]** Fortaleza: Associação Brasileira de Engenharia Química, 2016.

SARMIENTO-TOVAR, A. A. *et al.* Exploration of the Bioactivity of Pigmented Extracts from *Streptomyces* Strains Isolated Along the Banks of the Guaviare and Arauca Rivers (Colombia). **Fermentation**, v. 10, n. 10, p. 529, 2024.

SÁNCHEZ, S.; DEMAİN, A. L. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 895-906, 2002.

SCHALCHLI, H. *et al.* Bioconversion of potato solid waste into antifungals and biopigments using *Streptomyces spp.* **PLoS ONE**, v. 16, n. 6, 2021.

SCHMIDELL, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial: Engenharia de Bioprocessos**. São Paulo: Blucher, 2001. v. 2.

SCHNEIDER, C. *et al.* The novel phosphatase RosC catalyzes the last unknown step of roseoflavin biosynthesis in *Streptomyces davaonensis*. **Molecular Microbiology**, v. 114, n. 4, p. 609-625, 21 jul. 2020

SCHNEIDER, C.; MACK, M. A second riboflavin import system is present in flavinogenic *Streptomyces davaonensis* and supports roseoflavin biosynthesis. **Molecular Microbiology**, v. 116, n. 2, p. 470–482, 2021. DOI: 10.1111/mmi.14726.

SCOPES, R. K. **Protein Purification: Principles and Practice**. 3. ed. New York: Springer, 1994.

SEADER, J. D.; HENLEY, E. J.; ROPER, D. K. **Separation process principles: chemical and biochemical operations**. 4. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2016.

SEADER, J. D.; HENLEY, E. J.; ROPER, D. K. **Separation Process Principles with Applications Using Process Simulators**. 4. ed. Hoboken: Wiley, 2020.

SEXTON, D. L.; TOCHEVA, E. I. Ultrastructure of exospore formation in *Streptomyces* revealed by cryo-electron tomography. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, art. 581135, 2020.

SHEPHERD, M. D. *et al.* Laboratory Maintenance of *Streptomyces* Species. **Current Protocols In Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 1, 2010.

SHERAZ, M. A. *et al.* Photo, thermal and chemical degradation of riboflavin. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 10, p. 1999-2012, 2014.

SHIMADZU CORPORATION. **What is the difference between absorbance and optical density (O.D.)**. Kyoto, 2021.

SHIMIZU, M.; NAZNIN, H. A.; HIENO, A. The significance of mycoparasitism by *Streptomyces* sp. MBCN152-1 for its biocontrol activity against *Alternaria brassicicola*. **Microbes and Environments**, v. 37, n. 3, 2022.

SIGURNJAK, I. *et al.* Production and performance of bio-based mineral fertilizers from agricultural waste using ammonia scrubbing technology. **Waste Management**, v. 89, p. 265–274, 2019.

SKAFAR, V. *et al.* Riboflavin metabolism shapes FSP1-driven ferroptosis resistance. **Nature Cell Biology**, v. 28, n. 4, p. 696-706, 13 mar. 2026

SKOOG, D. A., *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. 9. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2014.

SMITH, P. K. *et al.* **Measurement of protein using bicinchoninic acid.**, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.

SOCCOL, C. R. *et al.* Recent developments and innovations in solid state fermentation. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, n. 1, p. 52-71, 2017.

SOHONI, S. V.; BAPAT, P. M.; LANTZ, A. E. Robust, small-scale cultivation platform for *Streptomyces coelicolor*. **Microbial Cell Factories**, v. 11, art. 9, 2012. DOI: 10.1186/1475-2859-11-9.

ŚCIGACZEWSKA, A.; BORUTA, T.; BIZUKOJĆSA, M. Morphological-metabolic analysis in *Streptomyces rimosus* microparticle-enhanced cultivations (MPEC). **Bioprocess And Biosystems Engineering**, v. 47, n. 6, p. 891-902, 2024.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of Fermentation Technology**. 3. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2016. 826 p.

STOSCHECK, C. M. Quantitation of protein. **Methods in Enzymology**, v. 182, p. 50–68, 1990.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Cell Culture Contamination**. 2025. Disponível em: <https://www.thermofisher.com>.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Protein Assays Technical Handbook**. Rockford: Thermo Fisher Scientific, 2024.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TSYRULNYK, A. O. *et al.* Optimization of the cultivation conditions and the basic molecular tools for roseoflavin producer *Streptomyces davawensis*. **Microbiological Journal**, v. 78, n. 4, 2016.

TYAGI, A. *et al.* Photo-degradation behaviour of roseoflavin in some aqueous solutions. **Chemical Physics**, v. 369, n. 1, p. 27-36, 2010.

VAN WEZEL, G. P.; McDOWALL, K. J. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 7, p. 1311–1333, 2011.

WANG, H.; ZHAO, G.; DING, X.. Morphology engineering of *Streptomyces coelicolor* M145 by sub-inhibitory concentrations of antibiotics. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 16 out. 2017

WILLEMSE, J. *et al.* SPARTICLE, an algorithm for the analysis of filamentous microorganisms in submerged cultures. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, n. 2, p. 171-182, 2017.

WENTZEL, A. *et al.* Optimized submerged batch fermentation strategy for systems scale studies of metabolic switching in *Streptomyces coelicolor* A3(2). **BMC Systems Biology**, v. 6, p. 59, 2012.

YAGÜE, P. *et al.* Subcompartmentalization by cross-membranes during early growth of *Streptomyces hyphae*. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, 2016.

ZACCHETTI, B.; SMITS, P.; CLAESSEN, D. Dynamics of pellet fragmentation and aggregation in liquid-grown cultures of *Streptomyces lividans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, art. 943, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00943.

ZHANG, M. *et al.* Improvement of cell counting method for Neubauer counting chamber. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 34, n. 1, e23024, 2020. DOI: 10.1002/jcla.23024.

ZHANG, W. *et al.* Enhancing Protein Extraction from Streptomycin Fermentation Residue via the Optimization of Reaction Conditions in the Enzyme System. **Waste And Biomass Valorization**, v. 16, n. 12, p. 6503-6515, 2024.

ZHOU, Y. *et al.* Effects of Agitation, Aeration and Temperature on Production of a Novel Glycoprotein GP-1 by *Streptomyces kanasensis* ZX01 and Scale-Up Based on Volumetric Oxygen Transfer Coefficient. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 125, 2018.

ZHU, F. Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 456-480, 2015. DOI: 10.1016/j.carbpol.2014.10.063.

ZHU, F. Encapsulation and delivery of food ingredients using starch based systems. **Food Chemistry**, v. 229, p. 542-552, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.02.101