

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

Ana Paula Paganotto
Debora Cristina Dan Martins
Gustavo Soares
Lívia Kaori Seino Corrêa Lima
Nicole Soler Matubaro de Santi
Raquel Cristina da Silva

PRODUÇÃO DE COLORANTES A PARTIR DO CULTIVO SUBMERSO DE
Chromobacterium violaceum

Araraquara
2026

Ana Paula Paganotto
Debora Cristina Dan Martins
Gustavo Soares
Livia Kaori Seino Corrêa Lima
Nicole Soler Matubaro de Santi
Raquel Cristina da Silva

**PRODUÇÃO DE COLORANTES A PARTIR DO CULTIVO SUBMERSO DE
*Chromobacterium violaceum***

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

Orientador: Prof. Dr. Douglas Moraes
Mendel Soares

Araraquara
2026

P963 Produção de colorantes a partir do cultivo submerso de
Chromobacterium violaceum / Ana Paula Paganotto ... [et
al.]. – Araraquara, 2026.
94 f. : il.

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

Orientador: Douglas Moraes Mendel Soares.

1. Bioprocessos. 2. Biotecnologia. 3. Corantes. 4. Microbiologia.
5. Violaceína. 6. Metabólitos. 7. Bactérias gram-negativas. I.
Paganotto, Ana Paula. II. Soares, Douglas Moraes Mendel, orient.
III. Título.

Ana Paula Paganotto
Debora Cristina Dan Martins
Gustavo Soares
Livia Kaori Seino Corrêa Lima
Nicole Soler Matubaro de Santi
Raquel Cristina da Silva

PRODUÇÃO DE COLORANTES A PARTIR DO CULTIVO SUBMERSO DE
Chromobacterium violaceum

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, Departamento de
Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia.

Data da defesa: 24/06/2026

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Douglas Moraes Mendel Soares
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Flávio Pereira Picheli
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Leonardo Henrique Rotta
UNESP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

RESUMO

Chromobacterium violaceum é uma bactéria Gram-negativa capaz de sintetizar colorantes da rota biossintética da violaceína e de seus derivados, por meio do *operon vioABCDE*, de duas moléculas de triptofano. Esses metabólitos apresentam aplicações biotecnológicas relevantes, incluindo atividade antimicrobiana e uso como colorantes sustentáveis nos setores têxtil e cosmético. Neste estudo, avaliaram-se condições de cultivo submerso de uma cepa selvagem de *C. violaceum* visando à produção de colorantes associados à rota da violaceína, bem como estratégias de recuperação desses compostos. A cepa não apresentou coloração púrpura evidente em meio sólido LB; entretanto, em cultivo submerso com meio de produção “V”, formou biomassa com coloração arroxeada, indicando ativação da rota biossintética nas condições avaliadas. Após 23 horas, observou-se crescimento celular expressivo, com DO_{734} de $1,853 \pm 0,082$, e consumo total da glicose, demonstrando que o meio empregado foi compatível com o crescimento bacteriano e com a formação do colorante. A produção mostrou-se associada à maior densidade celular e ao pH próximo à neutralidade, enquanto condições mais ácidas ou menor crescimento resultaram em redução ou ausência de coloração arroxeada. Na etapa de recuperação, solventes apolares apresentaram baixa eficiência, enquanto a sonicação assistida em etanol 50% (v/v) foi a estratégia mais promissora para remoção do colorante da biomassa. Contudo, a ausência de pico definido em 575–580 nm na varredura UV-Vis indica a necessidade de purificação e confirmação cromatográfica dos colorantes produzidos. Assim, os resultados evidenciam o potencial da cepa para obtenção de colorantes de interesse biotecnológico aplicado em processos fermentativos controlados futuros.

Palavras-chave: Bioprocessos; Biotecnologia; colorantes naturais; Microbiologia aplicada; Violaceína.

ABSTRACT

Chromobacterium violaceum is a Gram-negative bacterium capable of synthesizing colorants from the violacein biosynthetic pathway and its derivatives through the *vioABCDE* operon, from two tryptophan molecules. These metabolites have relevant biotechnological applications, including antimicrobial activity and use as sustainable colorants in the textile and cosmetic sectors. In this study, submerged cultivation conditions of a wild-type *C. violaceum* strain were evaluated to produce colorants associated with the violacein pathway, as well as recovery strategies for these compounds. The strain did not show evident purple coloration on solid LB medium; however, under submerged cultivation in “V” production medium, it formed biomass with a purplish coloration, indicating activation of the biosynthetic pathway under the evaluated conditions. After 23 h of cultivation, expressive cell growth was observed, with an OD₇₃₄ of 1.853 ± 0.082 , along with complete glucose consumption, demonstrating that the medium was suitable for bacterial growth and colorant formation. Colorant production was associated with higher cell density and near-neutral pH, whereas more acidic conditions or lower growth resulted in reduced or absent purplish coloration. During the recovery step, nonpolar solvents showed low efficiency, while sonification assisted extraction with 50% ethanol (v/v) was the most promising strategy for removing the colorant from the biomass. However, the absence of a defined peak at 575–580 nm in the UV–Vis scan indicates the need for purification and chromatographic confirmation of the produced colorants. Thus, the results highlight the potential of this strain for obtaining colorants of applied biotechnological interest in future controlled fermentative processes and industrial development.

Keywords: Bioprocesses; Biotechnology; natural dyes; applied Microbiology; Violacein.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diversidade de biocolorantes, microrganismos produtores e áreas de aplicação.	18
Figura 2 – Estrutura química da violaceína	18
Figura 3 – Rota biossintética da produção de violaceína e deoxiviolaceína	19
Figura 4 – Representação da rota metabólica da violaceína e seus derivados.	22
Figura 5 – Sistema de QS com feedback positivo dos genes Cvil/R em <i>C. violaceum</i> .	24
Figura 6 – Espectro de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) da violaceína produzido por <i>C. violaceum</i> PDF23.	38
Figura 7 – Fluxograma do procedimento experimental de extração e análise de colorantes produzidos em cultivos submersos.	46
Figura 8 – Curva analítica padrão de glicose pelo método Miller	49
Figura 9 – Biomassa de <i>Chromobacterium violaceum</i> após 23 horas de incubação em 200 rpm e 30°C nas estratégias de inoculação avaliadas para produção de colorantes. A: Reativação em placa. B: Reativação em placa. C: Reativação de estoque de criopreservado. D: Reativação de novo estoque de criopreservado.	53
Figura 10 – Perfil de coloração em meio sólido LB. A: Cepa produtora de violaceína. B: Cepa selvagem de <i>C. violaceum</i> sem pigmentação púrpura visível.	54
Figura 11 – Densidade celular (DO_{734}) de <i>Chromobacterium violaceum</i> em cultivos incubados a 200 rpm e 30° C durante 23	55

horas, com valores de média e desvio-padrão de triplicatas experimentais.

Figura 12 – Densidade celular (DO_{734}) com desvio padrão de *Chromobacterium violaceum* em cultivos incubados a 200 rpm e 30° C em 23 horas de cultivo. Os valores representam média $\pm$ desvio-padrão. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). 58

Figura 13 – Densidade celular (DO_{734}) de *Chromobacterium violaceum* em cultivos incubados a 200 rpm e 30° C em 23 horas de cultivo. Os valores representam média $\pm$ desvio-padrão. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Ensaio A: Reativação em placa. Ensaio B: Reativação em placa. Ensaio C: Reativação de estoque de criopreservado. Ensaio D: Reativação de novo estoque de criopreservado. 60

Figura 14 – Observação sob microscopia óptica (aumento de 10x) de estruturas amorfas e agregados celulares indicativos da formação de biofilme por *C. violaceum* durante o cultivo de produção de colorantes. 62

Figura 15 – Cultivo em reator de tanque agitado em modo batelada com agitação de 700 rpm, aeração 0,5 vvm, 30°C e pH 7. A: 24 horas. B: Fim do cultivo. 63

Figura 16 – Microscopia óptica de amostra de 45,5 horas cultivo de *C. violaceum* em biorreator de mistura total com agitação de 700 rpm e aeração 0,5 vvm realizado a 30°C e pH 7. A: Morfologia de bacilos curtos. B: Morfologia de bacilos longos. C: Morfologia de cocos. 65

Figura 17 – Tentativa de recuperação de colorantes por ruptura celular via sonicação associada à extração com etanol absoluto. (A) Suspensão celular após sonificação; (B) sobrenadante obtido após centrifugação. 68

Figura 18 – Recuperação de colorantes por ruptura celular via sonicação associada à extração com sistema etanol-água (1:1). (A) Suspensão celular após sonificação; (B) Suspensão após centrifugação.sobrenadante obtido após centrifugação. 70

Figura 19 – A: Varredura do sobrenadante extraído após ruptura celular por sonificação, utilizando sistema etanol-água (50%) em quatro ciclos de extração com proporção biomassa e solvente (1:1). B: Espectrometria UV-Vis da violaceína 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados de pH dos cultivos de <i>C. violaceum</i> a 30° C e 200 rpm após 22 h de incubação, expresso como média $\pm$ desvio-padrão. Valores seguidos por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).	64
Tabela 2 – Valores de Log P (octanol/água) dos solventes testados e da violaceína	75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. COLORANTES MICROBIANOS E SUA APLICAÇÃO NA BIOTECNOLOGIA	17
2.2. VIOLACEÍNA E SEUS DERIVADOS: ESTRUTURA QUÍMICA, BIOSÍNTESE, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES	18
2.2.1. Estrutura química	18
2.2.2. Atividades biológicas e potencial biotecnológico	20
2.3. PRODUÇÃO NATURAL DE COLORANTES POR <i>Chromobacterium violaceum</i>	21
2.3.1. Características microbiológicas de <i>C. violaceum</i>	21
2.4. BIOSÍNTESE E REGULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE VIOLACEÍNA E DERIVADOS	21
2.4.1. Via de biossíntese da violaceína	21
2.4.2. Sistema de <i>quorum sensing</i>	22
2.4.3. Moléculas sinalizadoras	23
2.5. FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE VIOLACEÍNA E DERIVADOS EM CULTIVO SUBMERSO	24
2.5.1. Fontes de carbono	24
2.5.2. Fontes de nitrogênio	25
2.5.3. Influência do triptofano	26
2.5.4. Influência do pH e temperatura	26
2.5.5. Influência da transferência de oxigênio	27
2.6. PRODUÇÃO DE VIOLACEÍNA EM BIORREATORES	27
2.6.1. Biorreatores Tipo Tanque Agitado	27
2.6.2. Agitação, aeração e transferência de oxigênio	28
2.6.3. Estratégias de operação em batelada e batelada alimentada	28
2.7. RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE COLORANTE PRODUZIDO POR <i>C. violaceum</i>	29
2.7.1. Localização intracelular dos colorantes	29
2.7.2. Propriedades físico-químicas da violaceína	30
2.7.3. Estabilidade da violaceína	31
2.7.4. Métodos de ruptura celular e extração de colorantes	31
2.7.4.1. Métodos mecânicos	32
2.7.4.1.1. Sonicador de sonda	32
2.7.4.2. Extração por solventes orgânicos	33
2.7.4.3. Extração por surfactantes	33
2.7.4.3.1. Tween 80	34
2.7.4.3.2. Triton X-100	34
2.7.4.3.3. Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	35
2.7.5. Cromatografia para análise de colorantes	35

2.7.5.1. Cromatografia em camada delgada	35
2.7.6. Avaliação dos métodos de <i>downstream</i> para recuperação de violaceína e seus derivados	37
2.7.6.1. Colorimetria aplicada à avaliação de colorantes microbianos	37
2.7.6.2. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) aplicada à caracterização de colorantes microbianos	37
2.8. TRATAMENTO E REUTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS GERADOS NO PROCESSO	38
2.8.1. Importância do gerenciamento de resíduos em processos biotecnológicos	38
2.8.2. Tratamento de resíduos biológicos	39
2.8.3. Inativação microbiológica por autoclavagem	40
2.8.4. Resíduos químicos gerados durante a extração e purificação de violaceína	40
2.8.4.1. Recuperação e reaproveitamento de solventes orgânicos	40
2.8.4.1.1. Uso do rotaevaporador na recuperação de solventes	41
2.8.4.2. Destinação final dos resíduos químicos	41
3 OBJETIVOS	43
3.1. Objetivo geral	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1. PRODUÇÃO DE COLORANTES EM CULTIVO SUBMERSO	44
4.1.1. Reativação do microrganismo	44
4.1.2. Meio de cultura e cultivo de inóculo <i>C. violaceum</i>	44
4.1.3. Meio de cultura e cultivo de <i>C. violaceum</i> para a produção de colorantes	44
4.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE COLORANTES EM REATOR DE TANQUE AGITADO EM MODO BATELADA	45
4.2.1. Pré-Inóculo de <i>C. violaceum</i>	45
4.2.2. Preparação e Incubação de Inóculo para Cultivo em Reator	45
4.3. CULTIVO EM BIORREATOR DE TANQUE AGITADO EM MODO BATELADA	45
4.4. RECUPERAÇÃO DOS COLORANTES: AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	46
4.5. MÉTODOS ESTATÍSTICOS E ANALÍTICOS	48
4.5.2. Monitoramento do Crescimento Celular por Densidade Óptica	48
4.5.3. Análise da Produção de Violaceína e Seus Derivados	48
4.5.4. Determinação de Açúcares Redutores	49
4.5.4.1. Curva Padrão De Concentração de Açúcar	49
4.5.4.2. Determinação da Concentração de Açúcares	50
4.5.4.3. Determinação do Consumo de Glicose	50
4.5.5. Avaliação Qualitativa Das Células Produtoras De Violaceína	50
4.6. TRATAMENTO E REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUOS	50
4.6.1. Resíduos Biológicos e Inativação Microbiológica	51
4.6.1.1. Inativação por Calor Úmido (Autoclave)	51
4.6.2. Resíduos Químicos e Recuperação de Solventes	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53

5.1. Avaliação da Produção de Colorantes por <i>C. violaceum</i>	53
5.1.1. Crescimento celular e consumo de glicose	54
5.1.2. Quorum sensing e produção de colorantes	56
5.2. Efeito da Suplementação de Nitrogênio sobre a Produção de Colorantes em Meio “V”	57
5.3. Influência do Inóculo e da Ativação por QS na Produção de Colorantes	59
5.4. Avaliação preliminar do aumento de escala em biorreator	62
5.5. Recuperação dos Colorantes	65
5.5.1. Limitações da extração convencional e necessidade de ruptura celular	65
6 PERSPECTIVAS FUTURAS	72
6.1. Purificação de Colorantes Produzidos por <i>C. violaceum</i>	72
6.1.1. Uso de surfactante na extração de colorantes	72
6.1.2. Uso de Cromatografia de Camada Delgada	74
6.2. Avaliação Colorimétrica da Recuperação do Extrato Pigmentado	76
6.3. Caracterização Espectroscópica do Extrato Pigmentado por FTIR	77
7 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1 INTRODUÇÃO

Colorantes microbianos, produtos do metabolismo secundário de diversos microrganismos, têm despertado crescente interesse industrial por aliarem propriedades tintoriais a atividades biológicas funcionais. Diferentemente dos colorantes sintéticos, cuja produção e descarte frequentemente envolvem processos químicos agressivos e de difícil degradação, os biocolorantes apresentam-se como alternativas sustentáveis devido à sua biodegradabilidade, menor impacto ecológico e viabilidade de obtenção em sistemas fermentativos controlados (Choi *et al.*, 2021; Barreto *et al.*, 2023). Tais atributos viabilizam sua aplicação em setores estratégicos, como as indústrias farmacêutica, cosmética, têxtil e de biomateriais (Rajendran; Somasundaram; Dufossé, 2023; Memon; Joshi; Kamdar, 2026).

Nesse cenário, a violaceína destaca-se como um metabólito de expressivo valor biotecnológico. Trata-se de um composto bisindólico de coloração violeta intensa, biossintetizado a partir da condensação de duas moléculas de L-triptofano pela ação coordenada de enzimas codificadas pelo *operon vioABCDE*. Além do composto principal, essa rota metabólica pode originar derivados estruturalmente correlacionados com propriedades físico-químicas distintas (Wu *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2025).

A relevância da violaceína transcende o potencial estético, abrangendo um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo propriedades antimicrobianas, antioxidantes, antiproliferativas e anti-inflamatórias (Choi *et al.*, 2021; Park *et al.*, 2021). Sua eficácia contra patógenos clinicamente importantes, como cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*, consolida seu potencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e o substituição de colorantes artificiais por aditivos bioativos (Baricz *et al.*, 2018; Choi *et al.*, 2015b).

O microrganismo modelo para o estudo desse pigmento é a bactéria Gram-negativa *Chromobacterium violaceum*, amplamente distribuída em ambientes tropicais. A síntese da violaceína nessa espécie é estritamente regulada por mecanismos de *quorum sensing* (QS), nos quais a densidade populacional modula a expressão gênica via moléculas sinalizadoras (Zhou *et al.*, 2020; Venkatramanan *et al.*, 2020). No entanto, a eficiência biossintética em cultivos submersos é fortemente condicionada por parâmetros nutricionais, como a relação carbono/nitrogênio, e variáveis físico-químicas, como pH, temperatura e transferência de oxigênio (Abdella *et al.*, 2026; Gharat; Singhal, 2024).

Além dos desafios de cultivo, a natureza hidrofóbica da violaceína e sua retenção intracelular impõem obstáculos críticos às etapas de recuperação e purificação (*downstream*). A viabilidade industrial do bioprocesso depende, portanto, do desenvolvimento de técnicas eficazes de ruptura celular e do uso estratégico de solventes que maximizem o rendimento sem comprometer a estabilidade do produto (Zhang *et al.*, 2025; Scaramussa; Ishimoto; Bicas, 2025).

Frente à necessidade de otimizar a cadeia produtiva desses colorantes naturais, este trabalho objetiva avaliar o potencial de produção de violaceína e seus derivados por uma cepa selvagem de *C. violaceum* em cultivo submerso. A investigação abrange desde a otimização das condições de cultivo até a prospecção de metodologias de extração mais eficazes, visando aprimorar o rendimento global e a sustentabilidade do bioprocessos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

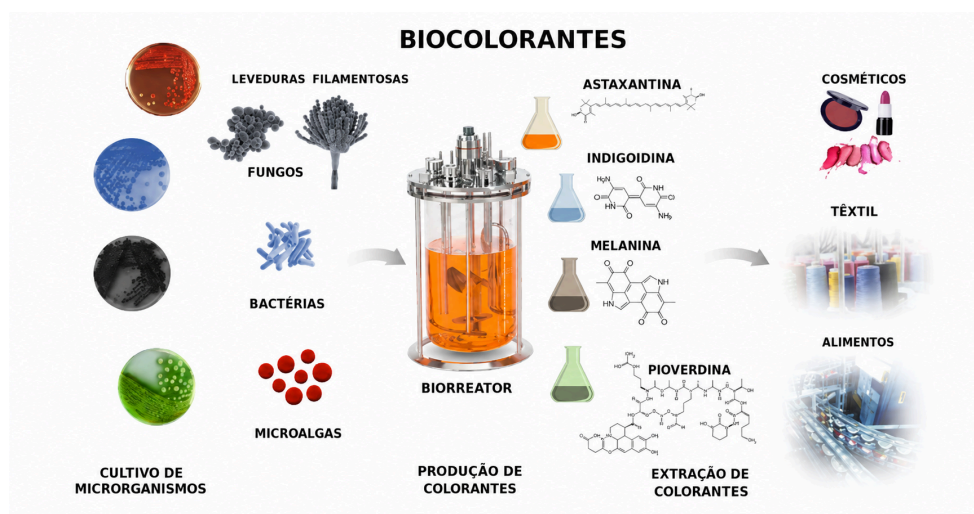
2.1. COLORANTES MICROBIANOS E SUA APLICAÇÃO NA BIOTECNOLOGIA

Os colorantes microbianos estão associados a diferentes funções, como defesa contra espécies reativas de oxigênio (EROs), comunicação celular e adaptação ao ambiente (Chatragadda; Dufossé, 2021; Orlandi *et al.*, 2021; Acharya *et al.*, 2024). Além da função biológica, esses compostos apresentam propriedades de interesse biotecnológico, incluindo atividade antioxidante, antimicrobiana e potencial terapêutico (Choi *et al.*, 2021; Barreto *et al.*, 2023). Entre os principais grupos de colorantes microbianos destacam-se carotenoides, melaninas, azafilonas e colorantes indólicos com cada grupo apresentando características químicas e aplicações específicas (Yang; Park; Lee, 2021; Barreto *et al.*, 2023).

Em razão de suas propriedades biológicas e funcionais,, os colorantes microbianos apresentam amplo potencial nos setores industriais de alimentos, cosméticos, têxtil e farmacêutico, como representado em Figura 1 (Gawale; Patil; Patil, 2026; Acharya *et al.*, 2024). Entretanto, a ampla adoção industrial dessas moléculas ainda enfrenta empecilhos, relacionados ao custo de produção, à baixa produtividade de algumas linhagens, à estabilidade química e aos processos de extração e purificação (Pathak; Vyas, 2025).

Nesse contexto, avanços em bioprocessos, engenharia genética, otimização de processos fermentativos e desenvolvimento de métodos de extração mais eficientes são fundamentais para viabilizar sua aplicação industrial (Yang; Park; Lee, 2021; Qi *et al.*, 2026). Entre esses compostos, colorantes bacterianos bioativos, como a violaceína, ganham especial relevância por associarem coloração a um amplo espectro de atividades biológicas (Park *et al.*, 2021). Isso amplia seu potencial de exploração em áreas como o desenvolvimento de agentes terapêuticos, bioativos para materiais inteligentes e aditivos naturais.

Figura 1 - Diversidade de biocolorantes, microrganismos produtores e áreas de aplicação.



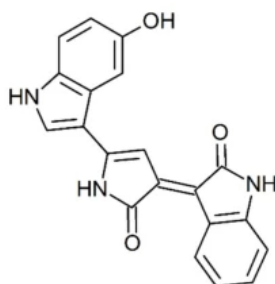
Fonte: Barreto *et al.* (2023)

2.2. VIOLACEÍNA E SEUS DERIVADOS: ESTRUTURA QUÍMICA, BIOSÍNTESE, PROPRIEDADES E APLICAÇÕES

2.2.1. Estrutura química

A violaceína é um colorante alcaloide indólico, produzido principalmente por bactérias dos gêneros *C. violaceum* e *Janthinobacterium lividum*. Sua fórmula molecular é $C_{20}H_{13}N_3O_3$, apresentando massa molar de 343,341 g/mol (Huang *et al.*, 2020). Sua estrutura química é formada por um núcleo bisindólico, no qual dois anéis indólicos encontram-se associados a uma cadeia central contendo grupos funcionais oxigenados e nitrogenados, apresentado na Figura 2. A presença de anéis aromáticos conjugados promove uma extensa deslocalização eletrônica, responsável pela absorção de luz na região do espectro visível e pela coloração violeta intensa observada no composto (Ahmad *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2021).

Figura 2 - Estrutura química da violaceína

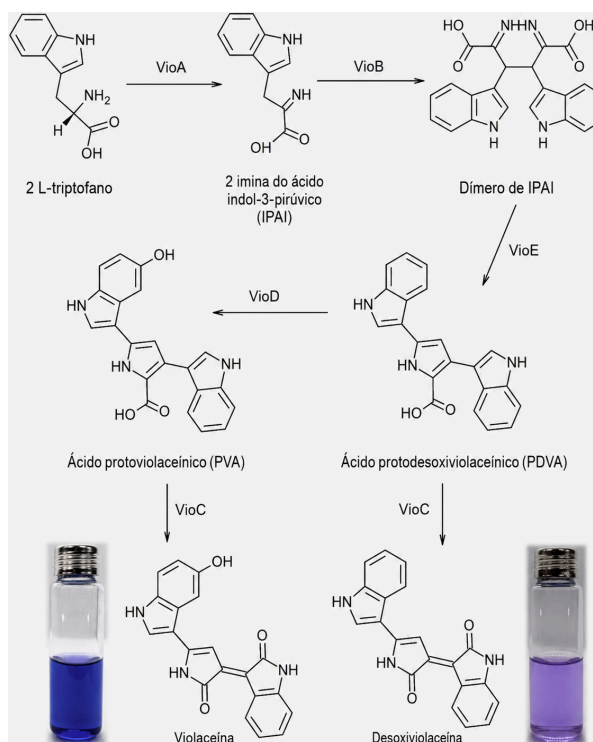


Fonte: Adaptado de Scaramussa, Ishimoto e Bicas (2025)

A molécula apresenta características de polaridade intermediária, combinando regiões hidrofóbicas e grupos funcionais polares. Os anéis aromáticos indólicos conferem caráter mais apolar à estrutura devido ao sistema de elétrons conjugados, favorecendo interações hidrofóbicas, enquanto os grupos carbonila (C=O) e nitrogênio presentes na molécula contribuem para sua capacidade de realizar interações intermoleculares (Scaramussa; Ishimoto; Bicas, 2025). Essa combinação estrutural influencia diretamente sua solubilidade e comportamento em diferentes sistemas químicos.

Conforme representado na Figura 3, a via bioquímica relacionada à biossíntese de violaceína também pode originar compostos estruturalmente semelhantes, derivados da violaceína, como a deoxiviolaceína, que apresenta uma modificação estrutural caracterizada pela ausência de um grupo oxigenado presente na molécula original (Wang *et al.*, 2012). Essa alteração resulta em diferenças nas propriedades físico-químicas, incluindo polaridade, perfil de absorção e atividade biológica. Outros derivados e intermediários da via biossintética também podem ser encontrados, apresentando variações estruturais que influenciam suas características funcionais (Scaramussa; Ishimoto; Bicas, 2025).

Figura 3 – Rota biossintética da produção de violaceína e deoxiviolaceína.



Fonte: Adaptado de Scaramussa, Ishimoto e Bicas (2025)

2.2.2. Atividades biológicas e potencial biotecnológico

A estrutura da violaceína apresenta grupos funcionais como aminas, carbonilas e ligações conjugadas, que contribuem para suas propriedades físico-químicas e sua atividade biológica (Ahmed *et al.*, 2021). A presença do sistema bisindólico aumenta a capacidade de interação da molécula com membranas celulares e macromoléculas, sendo associada a mecanismos como alteração da permeabilidade celular, indução de estresse oxidativo e modulação de vias relacionadas à morte celular (Scaramussa; Ishimoto; Bicas, 2025; Choi *et al.*, 2021; Park *et al.*, 2021).

Uma das propriedades mais estudadas da violaceína é sua atividade antimicrobiana diante bactérias, fungos e protozoários (Durán; Menck, 2001; Choi *et al.*, 2015b). Seu mecanismo de ação está relacionado principalmente à interação da molécula com membranas celulares, comprometendo a integridade da célula (Cauz *et al.*, 2019; Huanbutta *et al.*, 2025). Além disso, a violaceína pode induzir a formação de EROs, promovendo estresse oxidativo e danos celulares que contribuem para sua atividade antimicrobiana (De Carvalho *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2015a; Milosevic *et al.*, 2023).

A atividade contra bactérias têm despertado interesse devido ao aumento da resistência antimicrobiana, considerada um dos principais desafios de saúde pública global (WHO, 2024). A violaceína apresenta efeito inibitório sobre microrganismos de importância clínica, incluindo espécies resistentes a antibióticos convencionais. Estudos demonstram sua eficácia contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Staphylococcus epidermidis*, incluindo cepas formadoras de biofilme, indicando seu potencial como molécula complementar no desenvolvimento de novas estratégias antimicrobianas (Baricz *et al.*, 2018). Entretanto, sua aplicação terapêutica ainda depende de estudos adicionais relacionados à toxicidade, biodisponibilidade e estabilidade do composto (Choi *et al.*, 2021).

Na área de biotecnologia aplicada, a violaceína apresenta potencial para desenvolvimento de biomateriais funcionais, biossensores e sistemas de liberação de compostos bioativos. Sua coloração intensa, aliada às propriedades biológicas, permite sua exploração em materiais inteligentes e plataformas que associam propriedades ópticas e funcionais (Berti *et al.*, 2019; Dardari *et al.*, 2026). Adicionalmente, avanços em biologia sintética vêm sendo utilizados para modificar vias biossintéticas e aumentar a produção em escala industrial (Scaramussa; Ishimoto; Bicas, 2025).

2.3. PRODUÇÃO NATURAL DE COLORANTES POR *Chromobacterium violaceum*

2.3.1. Características microbiológicas de *C. violaceum*

C. violaceum é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família Chromobacteriaceae, amplamente distribuída em ambientes naturais, principalmente em solos e corpos d'água de regiões tropicais e subtropicais (O'Brien; Sykes, 2021). Esse microrganismo tornou-se objeto de interesse científico devido à sua capacidade de produzir diversos metabólitos secundários, entre eles a violaceína (Durán; Menck, 2001; Choi *et al.*, 2021). Do ponto de vista morfológico, *C. violaceum* apresenta células em formato de bastonete, podendo ocorrer isoladamente ou em pares, e possui flagelos que conferem mobilidade. (Kumar, 2012).

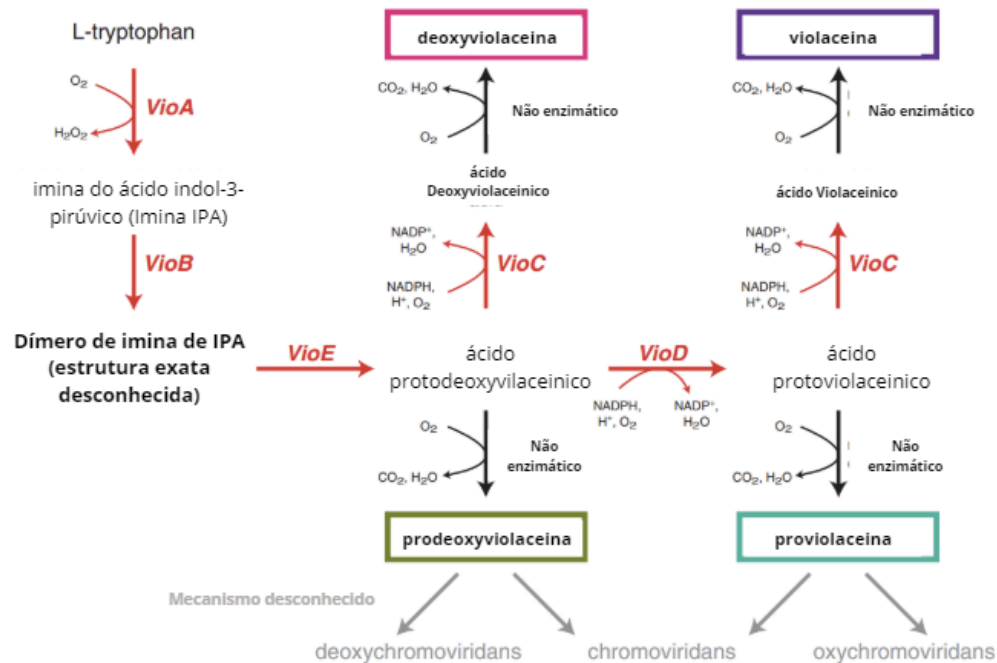
Algumas linhagens de *C. violaceum* são consideradas patógenos oportunistas, podendo causar infecções humanas raras, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. Dessa forma, estudos envolvendo sua utilização industrial devem considerar aspectos de biossegurança e seleção adequada de linhagens produtoras (Olalekan *et al.*, 2019).

2.4. BIOSÍNTESE E REGULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE VIOLACEÍNA E DERIVADOS

2.4.1. Via de biossíntese da violaceína

A biossíntese da violaceína inicia-se com a conversão de L-triptofano em ácido indol-3-pirúvico (IPA) pela enzima VioA, seguida pela ação da enzima VioB e VioE, levando à formação de um dímero de imina do IPA e do ácido protoviolaceínico (PDVA) (Xu *et al.*, 2022). A partir da formação do PDVA, existem quatro possíveis rotas metabólicas para a produção da violaceína e seus derivados: (1) conversão do PDVA pela enzima VioC seguida de oxidação espontânea para a geração da deoxiviolaceína; (2) conversão do PDVA pela enzima VioD, seguida de oxidação espontânea para a formação de proviolaceína; (3) ação sequencial das enzimas VioD e VioC, juntamente com oxidação espontânea para a produção da violaceína; (4) oxidação espontânea do PDVA, resultando na prodeoxiviolaceína (Zhang *et al.*, 2025). A Figura 4 abaixo demonstra a rota metabólica da violaceína e seus derivados, a partir da ação das diferentes enzimas.

Figura 4 – Representação da rota metabólica da violaceína e seus derivados.



Fonte: Adaptado de Lee *et al.* (2013)

2.4.2. Sistema de *quorum sensing*

O sistema de QS é de grande importância para a comunicação célula-célula em bactérias e está intrinsecamente relacionado à densidade celular, permitindo que microrganismos coordenem ações conjuntas, como a formação de biofilmes, através da liberação de moléculas de sinalização (Zhou *et al.*, 2020).

No caso da bactéria *C. violaceum*, o QS é apontado como o mecanismo regulatório para a indução da biossíntese da violaceína e de seus derivados. A produção de colorantes ocorre principalmente quando há uma alta densidade populacional e os nutrientes estão quase esgotados, sendo essa produção considerada como uma estratégia de sobrevivência bacteriana (Durán *et al.*, 2016; Durán *et al.*, 2025; Zhang *et al.*, 2025).

O sistema de QS em *C. violaceum* é regulado por moléculas autoindutoras, como a N-acil-L-homoserina lactona (AHL). Com o aumento da densidade celular no meio, a concentração de AHL no meio aumenta e, a partir do momento que atinge uma concentração limítrofe, liga-se ao gene *CviR*, que coordena a ativação dos genes do operon *vioABCDE*, levando à produção dos colorantes da rota da violaceína (Batista *et al.*, 2024).

Segundo Choi *et al.* (2015a) a *C. violaceum* produz biofilme, um fenótipo que é co-regulado pelo sistema de QS juntamente com a síntese de colorantes. Tendo em vista que os processos da produção de violaceína e formação de biofilme estão diretamente relacionados ao mesmo mecanismo dependente de densidade celular, associa-se a formação de biofilme à capacidade de síntese da violaceína e seus derivados (Mion *et al.*, 2021). O mecanismo de QS simultaneamente otimiza a criação de biofilmes protetores e produção de colorantes para a sobrevivência da população. Deste modo, tem-se que a formação de biofilme serve como um indicativo de que, possivelmente, a produção de colorantes está ocorrendo (Zhang *et al.*, 2025).

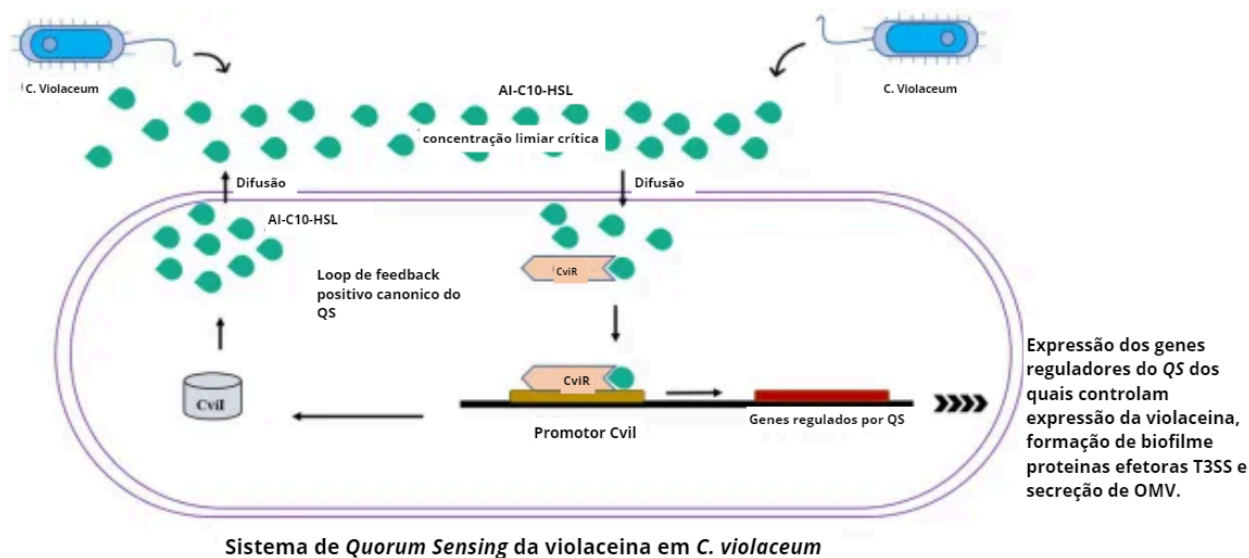
2.4.3. Moléculas sinalizadoras

As moléculas sinalizadoras do sistema de QS são importantes para o controle da expressão gênica, mediando a produção dos colorantes. Dentre estas moléculas, destacam-se a AHL, peptídeos autoindutores (AIP) e autoindutores-2 (AI-2) (Wu *et al.*, 2021).

As moléculas sinalizadoras variam de acordo com a bactéria. AHLs são produzidas principalmente por bactérias Gram-negativas, AIPs são produzidas por bactérias Gram-positivas e AI-2 são produzidas por ambos os tipos de bactérias. No caso da Gram-negativa *C. violaceum*, a produção da violaceína e seus derivados é regulada positivamente pelo sistema de QS AHL CviI/R (Batista *et al.*, 2024; Dimitrova *et al.*, 2023).

As moléculas de AHL são produzidas pela enzima AHL sintase e detectadas através de um regulador de ligação AHL, afetando a expressão da violaceína e seus derivados (Devescovi *et al.*, 2017). O sistema de QS da *C. violaceum* é mediado por meio de dois genes principais, *CviI* e *CviR*, que possuem alta afinidade à AHL. *CviI* é um gene de AHL sintase, o qual é responsável pela síntese de N-decanoil L-homoserina lactona (C10-HSL). *CviR* é um gene responsável pela síntese de uma proteína reguladora de transcrição, importante para a regulação da expressão gênica após a síntese de C10-HSL. *CviR* responde à C10-HSL com maior afinidade, e a sintase AHL *cviI* é regulada pelo *feedback* positivo por C10-HSL-*CviR* (Venkatramanan; Nalini, 2024) A figura 5 abaixo demonstra o sistema de QS com *feedback* positivo dos genes *CviI/R*.

Figura 5 - Sistema de QS com feedback positivo dos genes *CviI/R* em *C. violaceum*.



Fonte: Adaptado de Venkatramanan; Nalini (2024).

2.5. FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE VIOLACEÍNA E DERIVADOS EM CULTIVO SUBMERSO

2.5.1. Fontes de carbono

A escolha e a concentração da fonte de carbono afetam drasticamente as taxas de crescimento específico e a produtividade final do colorante (Ruiz et al., 2010; Choi et al., 2015a). Carboidratos simples como a glicose, quando presentes em altas concentrações iniciais, tendem a desviar o metabolismo da *C. violaceum* para um acúmulo excessivo de biomassa celular em detrimento da biossíntese do colorante roxo (Gharat; Singhal, 2024). Diante dessa inibição por excesso de substrato, a regulação precisa do fluxo de carbono torna-se indispensável e está intimamente ligada à manutenção adequada da relação carbono/nitrogênio (C/N) no meio, que atua como uma regulação chave para o redirecionamento metabólico rumo ao metabolismo secundário (Gharat; Singhal, 2024).

Fontes de carbono alternativas, como o glicerol, tendem a minimizar a produção de ácidos orgânicos inibitórios no cultivo aeróbio. Isso configura o glicerol como uma opção estratégica para modular a relação C/N de maneira otimizada, prolongando a viabilidade celular sem acionar mecanismos de inibição (Choi et al., 2015a).

Esse efeito supressor induzido por altas cargas de glicose é um reflexo clássico do mecanismo de repressão catabólica. Quando submetidas a concentrações elevadas

de açúcares facilmente fermentáveis, as células priorizam as vias de crescimento rápido, inibindo a transcrição de *operons* secundários através da queda do AMP cíclico (AMPC) intracelular (Görke; Stülke, 2008). No entanto, a estruturação de metabólitos secundários complexos exige não apenas esse arcabouço carbônico e energético, mas também a incorporação de heteroátomos fundamentais e cofatores enzimáticos, o que direciona a atenção para o papel crítico do nitrogênio e dos micronutrientes no processo produtivo (Ruiz *et al.*, 2010).

2.5.2. Fontes de nitrogênio

O nitrogênio atua como macronutriente indispensável para a síntese celular e do colorante. Como a violaceína possui uma estrutura rica em nitrogênio (conforme detalhado na seção 2.2.1), a natureza da fonte nitrogenada dita a eficiência do bioprocessamento (Füller *et al.*, 2016). O desbalanceamento na relação C/N, conforme discutido anteriormente, pode induzir estresse nutricional prematuro, impactando os sistemas de QS (Stauff & Bassler, 2011).

As fontes de nitrogênio são classicamente divididas em inorgânicas (como cloreto de amônio) e orgânicas (como peptona e extrato de levedura). Fontes inorgânicas são geralmente de assimilação mais lenta e exigem um elevado gasto energético da célula para a síntese de aminoácidos de novo. Em contrapartida, as fontes orgânicas complexas não apenas fornecem peptídeos e fatores de crescimento que aceleram a proliferação da *C. violaceum* e poupam rotas biossintéticas, mas também carregam uma rica carga de micronutrientes essenciais. Estes micronutrientes, que incluem íons metálicos fundamentais como magnésio, ferro, cobre e zinco, atuam como cofatores indispensáveis para a estabilidade estrutural e a atividade catalítica das enzimas envolvidas no metabolismo secundário (Durán *et al.*, 2016).

Na prática, cultivos submersos demonstram que meios ricos em nitrogênio orgânico, como os formulados com caldo nutritivo e peptona, favorecem a densidade celular e maximizam a biossíntese de pigmentos bacterianos (Venil *et al.*, 2013; Chatragadda; Dufossé, 2021). Contudo, a biossíntese deste colorante roxo vai além de um fornecimento diversificado de nutrientes: sua arquitetura molecular demanda quantidades abundantes de um aminoácido nitrogenado específico. Por isso, para que a produção seja otimizada, é indispensável analisar o papel e a disponibilidade desse precursor limitante.

2.5.3. Influência do triptofano

A biossíntese de violaceína possui uma dependência estequiométrica rigorosa com o L-triptofano, sendo a disponibilidade citosólica deste precursor o fator que dita a capacidade máxima de produção. Considerando a via metabólica detalhada na seção 2.4.1, a suplementação de L-triptofano ao meio de cultura consolida-se como a tática biotecnológica mais relatada para aumentar a produtividade. Essa adição direta permite que as enzimas biossintéticas operem em níveis próximos à saturação catalítica, poupando a *C. violaceum* do drástico e oneroso custo energético que seria exigido para a síntese endógena desse aminoácido através da via do ácido chiquímico (Choi *et al.*, 2015a; Durán *et al.*, 2016).

Além da exigência do precursor principal, a consolidação da molécula do colorante roxo depende de micronutrientes. Segundo Füller *et al.* (2016), a eficiência da catálise biossintética depende intrinsecamente de oligoelementos que são minerais e íons metálicos requeridos em concentrações mínimas, mas que atuam como cofatores essenciais e estabilizadores estruturais das enzimas envolvidas no processo.

2.5.4. Influência do pH e temperatura

Na *C. violaceum*, desvios acentuados dos parâmetros ótimos resultam na desnaturação das enzimas da via *vioA-E*, o que aborta a produção do colorante mesmo na presença abundante de precursores, fazendo do controle desses fatores físicos um pré-requisito (Durán *et al.*, 2016).

As faixas ótimas estão intimamente ligadas ao nicho ecológico da bactéria. Sendo um microrganismo mesofílico isolado de regiões tropicais, a *C. violaceum* apresenta seu crescimento otimizado e máxima síntese enzimática de violaceína em temperaturas que variam de 28 °C a 35 °C (Durán *et al.*, 2016). O cultivo fora dessa faixa, especialmente em baixas temperaturas, reprime fortemente a via biossintética do colorante e reduz drasticamente a proliferação celular, inviabilizando a transição eficiente para a fase estacionária (Choi *et al.*, 2015a; Durán *et al.*, 2016).

Quanto ao pH, o ambiente de cultivo requer neutralidade (em torno de 7,0) para manter a estabilidade da molécula alcaloide produzida. Condições ácidas inibem o crescimento celular precoce, enquanto um meio altamente alcalino induz a degradação da estrutura química da violaceína (Abdella *et al.*, 2026).

2.5.5. Influência da transferência de oxigênio

A biossíntese da violaceína pela *C. violaceum* é um evento metabólico estritamente dependente de oxigênio (Füller *et al.*, 2016). Em bioprocessos, a disponibilidade deste gás é quantificada pelo oxigênio dissolvido (OD) no meio líquido e pelo coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigênio (kLa), que expressa a eficiência da difusão gasosa para a fase líquida onde as bactérias estão suspensas. O perfil de consumo de oxigênio está intrinsecamente ligado à regulação promovida pela relação C/N do cultivo (Mendes *et al.*, 2001). Quando o balanço nutricional desencadeia a transição para o metabolismo secundário, a demanda respiratória e biossintética da célula atinge seu ápice, exigindo taxas ótimas e contínuas de transferência gasosa (Gharat; Singhal, 2024).

Como as reações de oxidação e hidroxilação da rota biossintética (seção 2.4.1) utilizam o oxigênio como cofator limitante, a eficiência do processo depende de taxas ótimas de transferência gasosa. Se a transferência de massa for deficiente, a cascata metabólica é interrompida prematuramente (Füller *et al.*, 2016).

Consequentemente, a literatura relata uma correlação direta e proporcional entre o incremento do kLa e a produtividade volumétrica deste colorante na *C. violaceum* (Mendes *et al.*, 2001; Gharat; Singhal, 2024). Todavia, um hiperoxigenamento descontrolado do sistema pode deflagrar um severo estresse oxidativo, gerando EROs que danificam o aparato estrutural celular (Garcia-Ochoa; Gomez, 2009). A mitigação desse estresse celular depende diretamente do estado nutricional da bactéria, no qual um fornecimento adequado de nitrogênio e micronutrientes suporta a síntese de enzimas antioxidantes de defesa.

2.6. PRODUÇÃO DE VIOLACEÍNA EM BIORREATORES

2.6.1. Biorreatores Tipo Tanque Agitado

Para superar as limitações de transferência de oxigênio e as restrições de controle de pH inerentes aos cultivos em frascos agitados, o escalonamento da produção com *C. violaceum* fundamenta-se no uso de Biorreatores tipo Tanque Agitado Reator de Tanque Agitado. Este equipamento opera combinando a agitação mecânica promovida por impelidores e a injeção contínua de ar estéril no fundo do vaso.

Os biorreatores de tanque agitado, são predominantes na microbiologia industrial porque fornecem flexibilidade e garantem uma mistura homogênea. Eles são

equipados com sondas que permitem a monitorização ininterrupta do pH, temperatura e oxigênio dissolvido. Isso mitiga desvios físico-químicos que levariam à inativação das enzimas biossintéticas ou à degradação precoce da violaceína (Choi *et al.*, 2015a).

Para o cultivo de *C. violaceum*, o biorreator de tanque agitado destaca-se como o sistema ideal. O controle preciso e a agitação constante evitam o surgimento de "zonas mortas" de anóxia, as quais reprimiriam a expressão do operon *vio*, além de corrigir automaticamente a acidificação natural do caldo provocada pelo consumo das fontes de carbono (Durán *et al.*, 2016). A eficácia desses biorreatores em manter o metabolismo celular ativo decorre diretamente de seus mecanismos internos — como impelidores e aspersores —, que são projetados para forçar a transferência de massa e garantir a dissolução controlada dos gases vitais, notadamente o oxigênio, em todo o meio de cultivo (Doran, 2012).

2.6.2. Agitação, aeração e transferência de oxigênio

Dentro de um biorreator, a inserção do oxigênio é gerida pelas variáveis de agitação mecânica (rpm) e aeração (vvm), que controlam o kLa (Garcia-Ochoa; Gomez, 2009). Na prática, essas variáveis operam frequentemente em cascata para manter o oxigênio dissolvido em faixas de saturação estáveis adequados à ativação máxima das oxidases, promovendo altos rendimentos, desde que a rotação não gere um cisalhamento mecânico excessivo capaz de romper as membranas bacterianas (Gharat; Singhal, 2024).

Resultados recentes de escalonamento confirmam que a otimização desses parâmetros fluidodinâmicos resolve o principal gargalo de oxigenação da biossíntese do colorante na *C. violaceum* (Gharat; Singhal, 2024). Entretanto, à medida que a agitação eficiente sustenta um crescimento populacional cada vez maior, a demanda das bactérias por substratos cresce exponencialmente, exigindo a implementação de estratégias de alimentação controlada.

2.6.3. Estratégias de operação em batelada e batelada alimentada

O cultivo em batelada simples (*batch*) caracteriza-se por ser um sistema fechado, no qual todos os substratos são fornecidos no instante inicial. Embora vantajosa pela facilidade operacional e montagem simplificada (Doran, 2012), a batelada impõe desafios significativos para o cultivo de *C. violaceum*. Essa estratégia frequentemente resulta em inibição pelo excesso inicial de substrato e no esgotamento

premature do meio, interrompendo a rota metabólica antes que o acúmulo expressivo de metabólitos secundários se concretize (Mendes *et al.*, 2001; Durán *et al.*, 2016)

Para contornar esses limites fisiológicos e maximizar a eficiência do reator, emprega-se a batelada alimentada (*fed-batch*). Esse modelo envolve a injeção programada de nutrientes ao longo do processo para manter as fontes de carbono em níveis basais e subinibitórios. Essa estratégia previne a repressão catabólica ao mesmo tempo em que eleva a densidade celular a patamares impossíveis em batelada simples (Riesenberg; Guthke, 1999; Gharat; Singhal, 2024).

No contexto específico da violaceína, o *fed-batch* revela-se indispensável também para a suplementação do precursor L-triptofano. Uma vez que concentrações iniciais massivas desse aminoácido inibem o crescimento vegetativo da *C. violaceum*, a alimentação em pulsos garante que o precursor limitante seja injetado estritamente à medida que as enzimas o consomem (Gharat; Singhal, 2024). Essa sincronia perfeita entre os fatores físicos do biorreator e o controle nutricional resulta nas maiores produtividades documentadas na literatura.

2.7. RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE COLORANTE PRODUZIDO POR *C. violaceum*

2.7.1. Localização intracelular dos colorantes

Na literatura, ainda não há consenso sobre o local predominante de acúmulo da violaceína em *C. violaceum*. De modo geral, esse colorante é descrito como um metabólito hidrofóbico intracelular (Zhang *et al.*, 2025), frequentemente associado à biomassa celular (Park *et al.*, 2021; Durán *et al.*, 2025). Essa interpretação é reforçada pelo fato de que sua recuperação normalmente envolve a clarificação das células do meio de cultivo, seguida de extração com solventes orgânicos ou da aplicação de métodos complementares de ruptura e permeabilização celular quando a extração convencional não é eficiente (Durán *et al.*, 2025; Scaramussa, Ishimoto e Bicas, 2025). No entanto, a ausência de estudos direcionados especificamente à localização subcelular da violaceína dificulta afirmar se o colorante permanece majoritariamente no citoplasma, associado à parede ou à membrana celular, ou ainda incorporado a estruturas vesiculares.

2.7.2. Propriedades físico-químicas da violaceína

A violaceína apresenta propriedades físico-químicas diretamente relacionadas às estratégias de recuperação, purificação e aplicação. Essa biomolécula conforme representada na Figura 2, é estruturalmente composta por três heterociclos, incluindo um oxindol, um 5-hidroxiindol e uma unidade derivada de pirrol, os quais contribuem para sua elevada conjugação eletrônica (Scaramussa, Ishimoto e Bicas, 2025; Nemer *et al.*, 2023; Durán *et al.*, 2021). Essa organização estrutural está associada à intensa coloração violeta característica da molécula e à sua forte absorção na região visível do espectro, com máximos de absorção entre 575–585 nm de comprimento de onda, dependendo do solvente orgânico utilizado (Berti *et al.*, 2023).

Apesar de possuir grupos funcionais polares, a violaceína apresenta baixa solubilidade em água, característica associada ao grande sistema aromático hidrofóbico presente em sua estrutura (Scaramussa; Ishimoto; Bicas, 2025). Seu coeficiente de participação octanol/água de Log P de 3,34, confirma seu caráter hidrofóbico (Durán *et al.*, 2021; Berti *et al.*, 2023; Huanbutta *et al.*, 2025). Esse valor indica maior afinidade da molécula por fases orgânicas em comparação aos meios aquosos, aspecto relevante para a seleção de solventes nas etapas de *downstream*.

De acordo com Berti *et al.* (2023), a violaceína é parcialmente solúvel em acetona, apresenta menor solubilidade em etanol e propanol, e é solúvel em acetato de etila, dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol. Assim, sua baixa solubilidade em água e sua maior afinidade por solventes orgânicos devem ser consideradas no desenvolvimento de métodos de recuperação, especialmente quando a biomolécula se encontra associada à biomassa celular ou a estruturas hidrofóbicas. Esse comportamento em diferentes meios também se relaciona com outra propriedade importante da violaceína: seu caráter tensoativo. Além da afinidade por fases orgânicas, moléculas de violaceína são capazes de formar isotermas de pressão-área na interface ar-água, evidenciando sua interação com interfaces e sistemas anfifílicos (Gupta *et al.*, 2021). Essa característica pode influenciar sua distribuição em sistemas biológicos e seu comportamento durante processos de *downstream*, reforçando a importância de compreender suas propriedades interfaciais para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de purificação.

2.7.3. Estabilidade da violaceína

Segundo Scaramussa, Ishimoto e Bicas (2025), a estabilidade da violaceína é influenciada principalmente por temperatura, exposição à luz visível, radiação ultravioleta, pH e presença de agentes oxidantes. Em relação à temperatura, o colorante apresenta maior estabilidade quando armazenado no escuro e sob baixas temperaturas. Os estudos de estabilidade de Huang *et al.* (2023), mostraram que sem a presença de luz a 20 °C a preservação do colorante pode diminuir para cerca de 70,5% após 30 dias, enquanto que a exposição à luz visível também compromete sua estabilidade, reduzindo a preservação da cor de aproximadamente 95% para 60% em uma semana e de 89% para 15,2% após um mês. A radiação UV, por sua vez, representa um dos fatores mais críticos para a degradação da violaceína, uma vez que, após 30 minutos de exposição, a preservação do colorante pode ser reduzida para apenas 3,5% (Cai *et al.*, 2024). Ainda nos estudos de Huang *et al.* (2023), a molécula apresenta estabilidade em ampla faixa de pH, geralmente entre pH 3 e 11, com preservação superior a 89,9% após 30 dias no escuro. Em condições extremamente alcalinas, como pH 13, ocorre degradação intensa, com preservação de apenas 15,4%. Outro fator a se considerar é que, os íons metálicos, como Cu^{2+} , Fe^{3+} e Cr^{6+} , e agentes oxidantes, como H_2O_2 , NaClO e KMnO_4 , podem reduzir a estabilidade da molécula (Huang *et al.*, 2023). Dessa forma, os métodos de extração de colorantes, sejam químicos, físicos ou combinados, devem ser conduzidos preferencialmente sob proteção da luz, com controle de temperatura e pH, além de evitar condições oxidantes que possam comprometer a estabilidade da violaceína (Scaramussa; Ishimoto; Bicas, 2025).

2.7.4. Métodos de ruptura celular e extração de colorantes

A recuperação de compostos intracelulares produzidos por microrganismos representa uma etapa essencial nos processos de *downstream*, uma vez que influencia diretamente o rendimento, a pureza e a estabilidade do produto final. Quando esses compostos permanecem retidos no interior da célula, torna-se necessária a aplicação de métodos de ruptura celular capazes de promover a liberação do produto de interesse para posterior extração e purificação (Zhao; Wang; Huang, 2024). Embora seja necessário liberar o conteúdo de interesse da célula, a desintegração total da parede celular dificulta os próximos passos subsequentes (Kilikian e Pessoa Júnior,

2020). De modo geral, esses métodos podem ser classificados em mecânicos e não mecânicos, sendo a escolha da técnica dependente das características do microrganismo, da localização do colorante e das propriedades físico-químicas da biomolécula alvo (Zainuddin *et al.*, 2021; D'Hondt *et al.*, 2017).

2.7.4.1. Métodos mecânicos

Os métodos mecânicos de ruptura celular promovem a desestruturação da parede celular e/ou da membrana plasmática por meio da aplicação de forças físicas. Esses métodos favorecem a liberação de biomoléculas retidas no interior da célula ou associadas a estruturas celulares. A eficiência da ruptura depende de fatores como o tipo de microrganismo, a resistência da parede celular, a concentração de biomassa, o tempo de processamento e a intensidade da força aplicada (Zhao; Wang; Huang, 2024; D'Hondt *et al.*, 2017). Neste contexto, destacam-se diferentes estratégias mecânicas nos estudos de extração de violaceína (Durán *et al.*, 2025; Scaramussa, Ishimoto e Bicas, 2025; Zhang *et al.*, 2025).

2.7.4.1.1. Sonicador de sonda

A sonicação é um método físico de ruptura celular empregado para favorecer a extração de compostos intracelulares por meio da aplicação de ondas ultrassônicas, geralmente em frequências entre 20 kHz e 10 MHz. Durante o processo, a energia elétrica é convertida em vibrações mecânicas, que se propagam no meio líquido e geram ondas de pressão. Estas ondas promovem a formação, expansão e colapso de microbolhas, fenômeno conhecido como cavitação. O colapso dessas bolhas pode gerar efeitos físicos, térmicos e químicos localizados, contribuindo para a desestruturação da parede celular, permeabilização da membrana plasmática e liberação do conteúdo intracelular. A eficiência do processo depende de parâmetros como intensidade ultrassônica, frequência, tempo de exposição, temperatura e configuração do equipamento utilizado (Zhao, Wang e Huang, 2024; D'Hondt *et al.*, 2017).

Entre as configurações utilizadas, destaca-se o sonicador de sonda. No sonicador, a sonda entra diretamente em contato com a suspensão celular, transmitindo a energia ultrassônica de forma mais intensa e localizada ao meio. Por esse motivo, a sonicação tende a apresentar maior eficiência na ruptura celular quando

comparada ao banho ultrassônico, especialmente quando se busca maior liberação de compostos intracelulares (Zhao; Wang; Huang, 2024).

2.7.4.2. Extração por solventes orgânicos

De acordo com Zainuddin *et al.* (2021), os métodos não mecânicos de ruptura ou permeabilização celular atuam principalmente por meio de alterações químicas, físicas ou biológicas na parede celular e/ou na membrana plasmática, favorecendo a liberação ou a maior acessibilidade de biomoléculas intracelulares. Entre os tratamentos mais usados para isolamento de violaceína, são incluídos os químicos, como solventes orgânicos e detergentes (Durán *et al.*, 2025; Scaramussa, Ishimoto e Bicas, 2025; Zhang *et al.*, 2025).

A extração por solventes orgânicos é amplamente empregada na recuperação de compostos intracelulares, embora apresente limitações relacionadas à possível degradação de biomoléculas sensíveis, à estabilidade do produto e aos impactos ambientais e econômicos associados à recuperação, tratamento e descarte dos solventes (Zhao; Wang; Huang, 2024). Ainda assim, esses solventes podem favorecer a extração e a permeabilização celular por interagirem com a membrana plasmática, efeito influenciado por propriedades como o coeficiente de partição octanol/água (Log P). Solventes com Log P entre 1 e 5 tendem a se acumular na bicamada lipídica, desorganizando sua estrutura e aumentando a permeabilidade celular (Isken; Bont, 1998). Esse processo também pode alterar o equilíbrio hídrico celular, promovendo desidratação parcial. Em baixas concentrações, geralmente entre 1 e 3% (v/v), alguns solventes podem induzir permeabilização seletiva, permitindo a liberação de compostos intracelulares sem lise total ou desnaturação significativa das biomoléculas (Kilikian; Pessoa Júnior, 2020). Assim, a escolha do solvente e de sua concentração é determinante para equilibrar eficiência de extração, seletividade, preservação do composto de interesse e menor liberação de componentes celulares indesejados.

2.7.4.3. Extração por surfactantes

Os surfactantes, também denominados agentes tensoativos, são moléculas anfipáticas constituídas por uma região hidrofílica e uma região hidrofóbica (Rosen; Kunjappu, 2012). Essa característica permite sua interação simultânea com fases aquosas e apolares, possibilitando a redução da tensão superficial e a formação de

estruturas organizadas, como micelas, quando presentes acima da concentração micelar crítica (Perinelli *et al.*, 2020; Aguirre-Ramírez *et al.*, 2021).

Essa propriedade torna os surfactantes ferramentas importantes em processos de extração de compostos hidrofóbicos, uma vez que as micelas podem atuar como sistemas de transporte molecular, permitindo a transferência de moléculas apolares da fase aquosa para seu interior hidrofóbico (Perinelli *et al.*, 2020). Além da capacidade de solubilização, alguns surfactantes apresentam interação com membranas biológicas devido à presença de componentes lipídicos e proteicos na estrutura celular. Essa interação pode promover alterações na organização da bicamada lipídica, aumento da permeabilidade da membrana e liberação de compostos intracelulares (Le Maire; Champeil; Møller, 2000; Alberts *et al.*, 2022).

Em *C. violaceum*, a utilização de surfactantes apresenta potencial para melhorar a recuperação da violaceína (Durán *et al.*, 2016; Choi *et al.*, 2020). A associação entre a ruptura celular e a capacidade de solubilização promovida por surfactantes pode favorecer a liberação e manutenção do colorante em solução, contribuindo para processos de extração mais eficientes. Dessa forma, surfactantes com diferentes propriedades químicas, como o dodecil sulfato de sódio (SDS), Tween 80 e Triton X-100, podem ser explorados como alternativas para promover a permeabilização celular e favorecer a solubilização do colorante liberado.

2.7.4.3.1. Tween 80

O Tween 80 (polissorbato 80) é um surfactante não iônico brando, amplamente empregado por suas propriedades emulsificantes e solubilizantes (Brovč *et al.*, 2020; Dopierala *et al.*, 2026). Sua estrutura anfifílica interage com a bicamada lipídica modulando a permeabilidade da membrana e facilitando a liberação do conteúdo intracelular sem provocar lise agressiva (Simões *et al.*, 2005; Kerwin, 2008; Rowe *et al.*, 2009). Em bioprocessos de extração, apresenta a vantagem de estabilizar compostos hidrofóbicos, prevenindo a precipitação do colorante extraído (Choi *et al.*, 2015a).

2.7.4.3.2. Triton X-100

O Triton X-100 é um surfactante não iônico que permeabiliza e lisa membranas biológicas preservando, em grande parte, a estrutura tridimensional das biomoléculas por não ser fortemente desnaturante (Berg; Tymocko; Stryer, 2015). Seu mecanismo consiste na inserção de sua porção hidrofóbica na bicamada lipídica: em baixas concentrações, aumenta seletivamente a permeabilidade; em concentrações mais

altas, forma micelas mistas que resultam na completa solubilização da membrana e lise celular (Le Maire; Champeil; Møller, 2000; Alberts *et al.*, 2022).

2.7.4.3.3. Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

O Dodecil Sulfato de Sódio é um surfactante aniônico, cuja fórmula molecular é $C_{12}H_{25}NaO_4S$. Quimicamente, o SDS é formado por uma cadeia hidrocarbonada longa hidrofóbica ligada a um grupo sulfato aniônico hidrofílico, associado ao cátion sódio (NCBI, 2026). A natureza aniônica do SDS é particularmente importante porque, ao se ligar às proteínas, confere a elas uma carga líquida negativa, independentemente de sua carga original, propriedade amplamente explorada em técnicas de eletroforese (Cao *et al.*, 2020).

Na lise celular, essas propriedades tornam o SDS um agente eficiente para a ruptura de membranas biológicas. O SDS se incorpora na bicamada fosfolipídica, substituindo parcialmente as interações entre lipídios e proteínas, aumentando a permeabilidade da membrana e levando à perda da integridade celular. Além disso, sua ação auxilia na liberação de moléculas intracelulares, como proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes celulares (Anosov *et al.*, 2019; Cao *et al.*, 2020).

2.7.5. Cromatografia para análise de colorantes

2.7.5.1. Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica simples e amplamente utilizada para a separação e análise rápida de compostos presentes em misturas, especialmente extratos orgânicos (Braga, 2006; Coskun, 2016). O método utiliza uma fase estacionária, geralmente sílica ou alumina depositada sobre uma placa, e uma fase móvel constituída por um solvente ou mistura de solventes (Aquino Neto; Nunes, 2003). A separação ocorre devido às diferenças de afinidade dos compostos pelas fases envolvidas, por meio de interações de adsorção e forças intermoleculares. Compostos com maior afinidade pela fase estacionária apresentam menor deslocamento, enquanto aqueles com menor afinidade são transportados pela fase móvel (Braga, 2006; Collins, 2006a).

A CCD possibilita análises qualitativas pela observação direta das manchas dos compostos, além de comparações semiquantitativas por meio da intensidade ou padrão de coloração observado (Coskun, 2016; Collins, 2006b). A identificação dos componentes também pode ser realizada pelo cálculo do índice de retenção (R_f),

definido pela razão entre a distância percorrida pelo composto e a distância percorrida pela frente do solvente ($R_f = d_{\text{soluto}}/d_{\text{solvente}}$). Além disso, a capacidade de separação entre diferentes substâncias pode ser avaliada pelo fator de seletividade ($\alpha = R_{fA}/R_{fB}$), que expressa a diferença de migração entre dois compostos analisados (Skoog; Holler; West, 2000; Braga, 2006).

A fase estacionária é feita de sílica de diâmetro de partícula variando de 5 a 15 μm , sendo funcionalizada quimicamente com um grupamento polar ou apolar, a depender da natureza dos analitos. Quando se trata de analitos apolares, comumente são utilizados grupos funcionais como C18, C8, C30, constituindo fases estacionárias comumente empregadas para a análise de biocolorantes (Degani, 1998; Ettre, 2000).

A fase móvel, por sua vez, pode consistir de uma mistura de solventes ou apenas um solvente puro, sendo necessário que a mesma possua alta capilaridade e baixa viscosidade (Faust, 1997). A escolha da fase móvel ideal é norteadada principalmente pela polaridade dos analitos, juntamente com a polaridade da fase estacionária (Lopes, 2006). Para CCD onde o analito é apolar, a fase móvel deve ser levemente menos apolar do que a fase estacionária, permitindo que o fenômeno de adsorção, descrito anteriormente, possa promover uma separação adequada dos componentes. Dessa forma, solventes menos polares como hexano, ciclohexano, acetato de etila, metanol e as suas combinações constituem possibilidade de fases móveis para a CCD (Faust, 1997; Lopes, 2006).

Diversos estudos demonstram a aplicação da CCD na separação e caracterização de colorantes e biocolorantes, incluindo carotenoides, flavonoides, antocianinas e clorofilas (Jeffrey, 1974; Forgacs; Cserhádi, 2002). Dessa forma, a técnica apresenta potencial para a análise preliminar da violaceína e seus derivados produzidos por *C. violaceum*, devido às características estruturais desses compostos (Zhang *et al.*, 2025). Além da caracterização, a CCD pode auxiliar na otimização de protocolos de purificação, permitindo a seleção prévia de sistemas de solventes promissores para etapas posteriores de cromatografia líquida (Nemer *et al.*, 2023).

2.7.6. Avaliação dos métodos de *downstream* para recuperação de violaceína e seus derivados

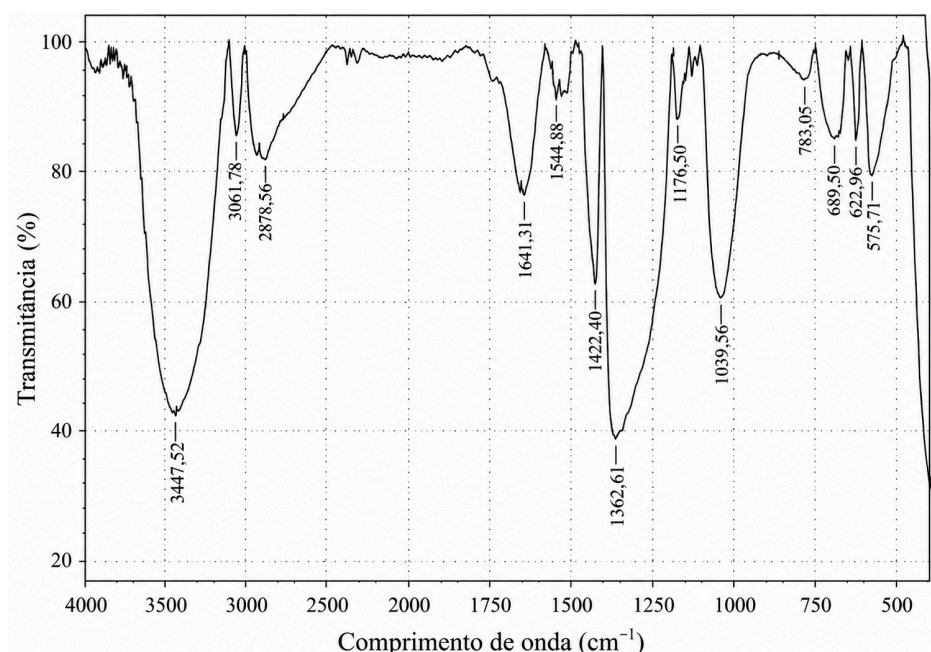
2.7.6.1. Colorimetria aplicada à avaliação de colorantes microbianos

A avaliação colorimétrica de colorantes microbianos, fundamentada no sistema Comissão Internacional de Iluminação (CIELAB), constitui uma ferramenta analítica complementar à espectrofotometria para a caracterização qualitativa e quantitativa da coloração de extratos e biomassas pigmentadas (Vázquez-Nion *et al.*, 2013). O sistema CIELAB descreve a cor por meio de três coordenadas principais: luminosidade (L), coordenada cromática a^* (transição do verde ao vermelho) e coordenada cromática b^* (transição do azul ao amarelo). A partir dessas coordenadas se derivam parâmetros como croma ($C^* = \sqrt{a^2 + b^2}$), que expressa a saturação da cor, diferença total de cor (ΔE), e ângulo de tonalidade ($h^\circ = \arctan(b^*/a^*)$), que indica a posição da cor no círculo cromático (Venil *et al.*, 2014; CIE, 2023). No estudo de Aruldass *et al.* (2015), a análise colorimétrica da violaceína revelou ângulo de tonalidade (h°) entre 280° e 290° para a faixa de pH 1 a 11, confirmando a coloração violeta característica.

2.7.6.2. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) aplicada à caracterização de colorantes microbianos

A técnica de FTIR baseia-se na absorção de radiação infravermelha por moléculas orgânicas, gerando espectros nos quais cada banda de absorção corresponde a modos vibracionais característicos de ligações químicas específicas (Al-Amin *et al.*, 2025). O espectro de infravermelho obtido para a violaceína produzida por *C. violaceum* PDF23 é apresentado na Figura 6, permitindo a visualização das bandas de absorção associadas aos grupos funcionais presentes na molécula.

Figura 6 – Espectro de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) da violaceína produzido por *C. violaceum* PDF23.



Fonte: Adaptado de Anahas *et al.* (2022)

Para a violaceína, a FTIR tem sido utilizada não apenas para confirmar a presença de grupos funcionais típicos de sua estrutura bis-indólica, mas também para monitorar a pureza do pigmento durante o processo de isolamento e purificação, permitindo distinguir diferentes frações do composto e otimizar sistemas de solventes para separação cromatográfica (Noble, 2023). Os fatores que podem influenciar a leitura da violaceína por FTIR incluem a presença de diferentes frações cromatograficamente homogêneas que são espectroscopicamente distinguíveis, bem como a produção de derivados estruturais (Al-Amin *et al.*, 2025).

2.8. TRATAMENTO E REUTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS GERADOS NO PROCESSO

2.8.1. Importância do gerenciamento de resíduos em processos biotecnológicos

O desenvolvimento de bioprocessos industriais e acadêmicos, embora fundamental para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado, está intrinsecamente associado à geração de volumes significativos de passivos ambientais. Em laboratórios de microbiologia e biotecnologia, esses passivos dividem-se primariamente em resíduos biológicos, compostos por microrganismos viáveis e meios de cultura, e resíduos químicos, que englobam os solventes e reagentes empregados

nas etapas de purificação, em função de destino de resíduo e seu gerenciamento (Majolo; Souza; Harada, 2023). O descarte inadequado desses materiais apresenta severos impactos ambientais e sanitários, podendo causar a contaminação de corpos hídricos, a disseminação de patógenos oportunistas no meio ambiente e a intoxicação ocupacional (Brasil, 2018).

Nesse cenário, o gerenciamento de resíduos transcende o mero cumprimento das obrigações legais, tornando-se um pilar estratégico fundamentado nos princípios da Química Verde e da biotecnologia sustentável (Chemat *et al.*, 2019; Rollin *et al.*, 2023). A busca por processos *downstream* mais eficientes exige que o planejamento metodológico priorize a inativação biológica total de linhagens cultivadas e a minimização ou recuperação de solventes orgânicos, mitigando os riscos à saúde pública e promovendo a sustentabilidade das atividades laboratoriais (CIBio UNESP, 2015).

2.8.2. Tratamento de resíduos biológicos

De acordo com a legislação brasileira vigente, especificamente a Resolução RDC nº 222/2018 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os resíduos gerados a partir do cultivo de bactérias são enquadrados como resíduos do Grupo A (infectantes) (Brasil, 2018). Durante a produção de violaceína em cultivo submerso, são gerados efluentes compostos pela biomassa exaurida de *C. violaceum* e pelo caldo de cultivo residual.

A disposição inadequada dessas culturas microbianas representa um risco sanitário relevante, uma vez que a *C. violaceum* é classificada como um patógeno oportunista (Abedin *et al.*, 2024). Para conter esse risco, os conceitos de biossegurança aplicados ao descarte microbiológico exigem a segregação e o acondicionamento seguro desses materiais, garantindo barreiras de contenção primárias e secundárias que evitem a dispersão do microrganismo antes que ele seja submetido a um tratamento de inativação definitivo (CIBio UNESP, 2015).

Em relação ao efluente produzido no cultivo submerso de *C. violaceum*, é importante indicar a fração de matéria orgânica ainda disponível para degradação por microrganismos aeróbios pela Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), permitindo avaliar se o efluente poderia causar consumo significativo de oxigênio no corpo hídrico receptor caso fosse descartado (Khor *et al.*, 2014).

2.8.3. Inativação microbiológica por autoclavagem

O tratamento prévio de resíduos biológicos do Grupo A é comumente realizado por esterilização em autoclave, baseada na exposição do material contaminado ao vapor de água saturado sob pressão e alta temperatura (Brasil, 2010). Esse processo promove a desnaturação de proteínas e enzimas essenciais, comprometendo funções metabólicas, membranas celulares e a viabilidade dos microrganismos (CIBio UNESP, 2015). Para bactérias Gram-negativas, como *C. violaceum*, a autoclavagem é eficiente devido à sensibilidade do envelope celular ao calor úmido, sendo recomendado o uso de 121 °C, sob aproximadamente 1 atm de pressão relativa, por pelo menos 20 minutos (CIBio UNESP, 2015). Na rotina laboratorial de produção de colorantes, esse procedimento deve ser aplicado a todos os resíduos que entraram em contato com a cepa viável, incluindo meios líquidos, biomassa celular, ponteiras, tubos, placas de Petri e vidrarias, antes do descarte ou lavagem (Brasil, 2018; CIBio UNESP, 2015).

2.8.4. Resíduos químicos gerados durante a extração e purificação de violaceína

A ruptura celular e a extração de colorantes intracelulares da biomassa de *C. violaceum* geralmente demandam o uso de solventes orgânicos, especialmente aqueles de polaridade moderada a alta para favorecer a partição do colorante (Abedin et al., 2024; Kholany et al., 2019). Após a extração, esses solventes passam a ser classificados como resíduos químicos perigosos, enquadrados no Grupo B segundo a RDC nº 222/2018 da ANVISA (Brasil, 2018). Esse aspecto é particularmente crítico para solventes como o metanol, devido à sua toxicidade, volatilidade e inflamabilidade, que representam riscos ocupacionais e ambientais caso sejam descartados inadequadamente em efluentes, comprometendo a sustentabilidade do bioprocessamento em escala industrial (Lee; Coutinho; Weingarten, 2025).

2.8.4.1. Recuperação e reaproveitamento de solventes orgânicos

Para mitigar a problemática da toxicidade e do alto volume de geração de resíduos do Grupo B, é necessário a integração dos conceitos de economia circular. A minimização de resíduos preconiza que os solventes utilizados não sejam tratados como insumos de uso único, mas sim como recursos recuperáveis dentro de um ciclo produtivo fechado (Chemat et al., 2019).

A recuperação de solventes oferece tanto benefícios ambientais ao reduzir a geração de resíduos químicos perigosos e a necessidade de destinação por métodos

convencionais, como incineração ou disposição externa, quanto a redução de custos operacionais, permitindo o reaproveitamento parcial dos solventes empregados no *downstream* e diminui a demanda por aquisição contínua desses reagentes. De acordo com Aboagye *et al.* (2022), a recuperação de solventes representa uma alternativa mais sustentável aos métodos convencionais de descarte, prevenindo cerca de 76–85% da carga ecológica e energética em comparação com a incineração. Outras estratégias modernas incluem a otimização da proporção biomassa/solvente para diminuir a demanda inicial, a substituição por solventes menos agressivos (como surfactantes em vez de solventes orgânicos) e a adoção de técnicas de separação física para condensar e purificar o extrator após o uso (Kilikian e Pessoa Júnior, 2020).

2.8.4.1.1. Uso do rotaevaporador na recuperação de solventes

Uma das tecnologias mais eficientes para a recuperação de solventes orgânicos e concentração de colorantes na etapa de *downstream* é a rotaevaporação. O evaporador rotativo funciona com base na redução da pressão interna do sistema (vácuo) acoplada a um banho de aquecimento brando e à rotação contínua do balão. A diminuição da pressão reduz proporcionalmente o ponto de ebulição do solvente, permitindo sua vaporização em temperaturas amenas, sendo os vapores condensados imediatamente por um trocador de calor e recolhidos em um balão receptor (Medeiros, 2018).

Na concentração de extratos contendo violaceína, o rotaevaporador é particularmente vantajoso porque a molécula do colorante é termolábil e pode sofrer degradação estrutural em altas temperaturas (Scaramussa; Ishimoto; Bicas, 2025). Apesar do processo de rotaevaporação de solventes orgânicos ter limitações operacionais que restringem-se ao volume de processamento laboratorial e à necessidade de constante manutenção do sistema de vácuo, os benefícios superam essas barreiras ao transformar passivos químicos tóxicos em solventes purificados prontos para reutilização (Leonard, Lygo e Procter, 2013).

2.8.4.2. Destinação final dos resíduos químicos

Mesmo com sistemas de destilação eficientes, uma fração residual dos solventes pode reter altas concentrações de impurezas, inviabilizando sua recuperação e reutilização laboratorial. Para esses resíduos não recuperáveis (pertencentes ao

Grupo B), os procedimentos de destinação final devem seguir rigorosamente os preceitos da RDC nº 222/2018 (Brasil, 2018).

A etapa preliminar consiste na segregação laboratorial primária, acondicionando os resíduos separadamente em frascos compatíveis, rotulados e classificados de acordo com suas características de periculosidade (por exemplo, a separação estrita entre misturas halogenadas e não halogenadas). Esses resíduos devem ser transportados por empresas especializadas e licenciadas, que promoverão o tratamento térmico avançado (como o coprocessamento ou a incineração) e a disposição final das cinzas em aterros industriais controlados (Brasil, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a capacidade de uma cepa selvagem de *Chromobacterium violaceum* produzir colorantes associados à via de biossíntese da violaceína sob cultivo submerso, bem como investigar estratégias iniciais de recuperação e extração desses compostos.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento celular da cepa selvagem de *C. violaceum* em meio de produção sob condições de cultivo submerso.
- Verificar a produção visual de colorantes pela biomassa bacteriana, com ênfase na formação de coloração púrpura associada à violaceína e seus derivados.
- Analisar o consumo de glicose e as alterações de pH durante o cultivo, relacionando esses parâmetros ao crescimento celular e à produção de colorantes.
- Avaliar o efeito da suplementação do meio de produção com diferentes fontes ou concentrações de nitrogênio sobre o crescimento celular e a produção de colorantes.
- Investigar métodos convencionais de extração de colorantes
- Comparar qualitativamente a eficiência dos métodos de extração a partir da coloração do sobrenadante e da biomassa residual.
- Realizar varredura espectrofotométrica UV-Vis dos extratos obtidos, visando uma análise indireta da presença de colorantes associados à violaceína.
- Identificar limitações dos métodos de extração empregados e propor ajustes para etapas futuras de purificação, quantificação e aplicação dos colorantes produzidos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. PRODUÇÃO DE COLORANTES EM CULTIVO SUBMERSO

4.1.1. Reativação do microrganismo

As células criopreservadas de *C. violaceum* foram reativadas por meio de inoculação em placas de Petri contendo meio Ágar Luria Bertani (LB), previamente esterilizado. As placas foram incubadas a 30 °C por 18 a 24 horas em estufa bacteriológica (SL-101/528), em condições adequadas para o restabelecimento do crescimento microbiano.

4.1.2. Meio de cultura e cultivo de inóculo *C. violaceum*

O meio para cultivo do inóculo foi o caldo LB. A bactéria foi inoculada a partir da reativação e cultivada a 30 °C sob agitação a 200 rpm em *overnight* em agitador orbital (modelo Incubadora 430, Ethik Technology, Brasil) (He *et al.*, 2025; Gharat; Singhal, 2024).

Posteriormente, alíquotas desse cultivo foram submetidas à criopreservação em uma solução 40% glicerol (v/v) e armazenadas a -80 °C, visando à manutenção das linhagens para experimentos futuros.

4.1.3. Meio de cultura e cultivo de *C. violaceum* para a produção de colorantes

O cultivo para produção do colorante foi conduzido em agitador orbital, utilizando frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL, inoculados a uma densidade óptica inicial (DO_{734}) de aproximadamente 0,1. Cada frasco continha 50 mL do meio de cultura “V”, composto por (g/L): $(NH_4)_2HPO_4$ (2,00), KH_2PO_4 (6,75), ácido cítrico (0,85), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,70), solução de micronutrientes (TMS) (5,00 mL/L), extrato de levedura (3,00), glicose (15,00) e $(NH_4)_2SO_4$ (3,00) (Yang, Park e Lee, 2021).

A solução de micronutrientes (TMS) foi preparada em HCl 5 M, composta por (g/L): $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (10,00), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (2,25), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (1,00), $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,50), $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ (0,23), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (2,00) e $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (0,10), conforme descrito por Yang, Park e Lee (2021). Todos os componentes do meio foram pesados em uma balança analítica (modelo AUY220, Shimadzu, Japão) e esterilizados por autoclavagem a 121 °C por 15 minutos.

O cultivo foi conduzido a 30 °C e 200 rpm por 24 horas, sendo avaliados o crescimento celular, em triplicata, e a produção de colorante de forma qualitativa. Ademais, para a avaliação da influência da fonte de nitrogênio, foram feitos cultivos

seguindo o meio de cultura com suplementação de triptona (5,00 g/L) e de ureia (5,00 g/L).

4.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE COLORANTES EM REATOR DE TANQUE AGITADO EM MODO BATELADA

A produção dos colorantes foi avaliada para o aumento da escala de frascos tipo Erlenmeyer para reator (modelo BIO-TEC-PRO-II, Tecnal, Piracicaba - SP, Brasil) tipo tanque agitado em modo batelada.

4.2.1. Pré-Inóculo de *C. violaceum*

O meio de cultura do pré-inóculo foi o caldo LB. A bactéria foi inoculada a partir de um estoque de criopreservação e foi cultivada a 30 °C sob agitação a 200 rpm em *overnight* (He *et al.*, 2025; Gharat; Singhal, 2024) em agitador orbital.

4.2.2. Preparação e Incubação de Inóculo para Cultivo em Reator

Após o crescimento *overnight* do pré-inóculo, o inóculo foi conduzido em mesa agitadora orbital, utilizando frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do meio de produção “V”, descrito por Yang, Park e Lee (2021). Os frascos com meio de produção, com apenas uma mudança de glicose (20,00 g/L) foram inoculados até densidade óptica inicial (DO_{734}) de aproximadamente 0,1. O cultivo foi conduzido a 30 °C, pH 7 e 200 rpm por 24 horas (Yang, Park e Lee, 2021).

4.3. CULTIVO EM BIORREATOR DE TANQUE AGITADO EM MODO BATELADA

O cultivo foi realizado em reator tipo tanque agitado Tecnal de 7,5 L de capacidade e um diâmetro (D_t) de 190 mm. O sistema de agitação consistiu em um eixo central equipado com dois impelidores de seis pás cada, distanciados 140 mm entre si. Utilizou-se uma configuração mista, composta por um impelidor do tipo Smith posicionado na zona superior e uma turbina do tipo Rushton na base, ambos com 70 mm de diâmetro (D_i), visando uma maior transferência de massa.

O volume útil de trabalho do reator foi de 60% (aproximadamente 4,5 L). O meio de cultura de produção foi o “Meio de cultura V” descrito na seção 4.1.3. O meio reacional foi inoculado com o cultivo preparado, correspondendo por volta de 5% do volume útil de cultivo do reator e quando o inóculo estava em fase exponencial tardia, representando um volume total de inóculo de 250 mL.

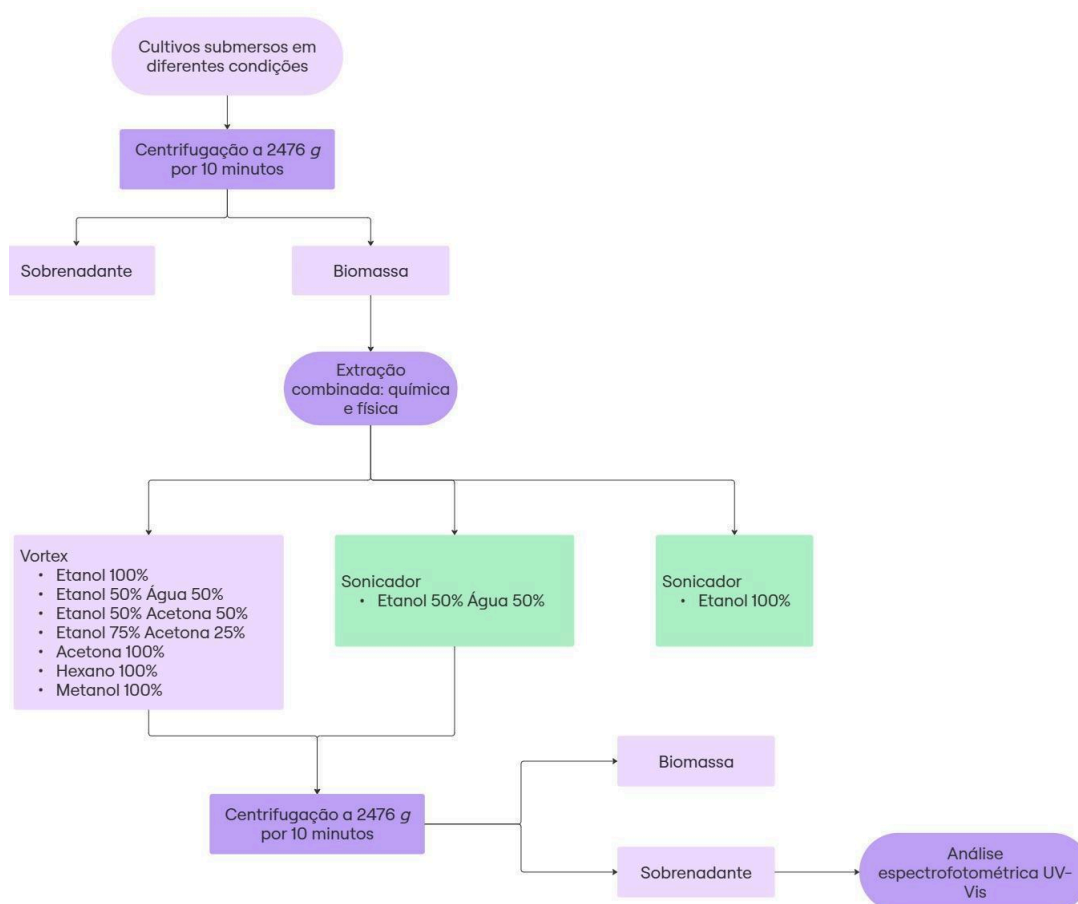
As condições de operação foram adaptadas de Yang, Park e Lee (2021). A temperatura do sistema foi mantida a 30 °C através da circulação de água em um

sistema de banho-maria acoplado à camisa do reator. O pH foi continuamente monitorado e controlado em $7,0 \pm 0,2$, com recurso à adição automática/manual de soluções de hidróxido de sódio (NaOH 5 M) e de ácido sulfúrico (H_2SO_4 5 M). O controle de ar do cultivo foi realizado com um fornecimento a uma taxa de 2 L/min (aproximadamente 0,5 vvm), associado a uma agitação mecânica constante de 700 rpm.

4.4. RECUPERAÇÃO DOS COLORANTES: AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A coleta e extração inicial da mistura de colorantes foram realizadas com base na metodologia descrita por Mendes *et al.* (2001), aplicada às bactérias avaliadas no estudo. A Figura 7 representa o fluxograma experimental dos testes de extração e ruptura de células com métodos químicos e físicos testados.

Figura 7 - Fluxograma do procedimento experimental de extração e análise de colorantes produzidos em cultivos submersos.



Fonte: Autoria própria (2026).

4.4.1. Etapa Pré-Extração

Inicialmente, coletou-se alíquotas de 1 mL do cultivo fermentado, das quais foram submetidas à centrifugação a $2.376 \times g$ (equivalente a 5.000 rpm no rotor de ângulo fixo, com raio de 8,5 cm) por 10 minutos, utilizando centrífuga refrigerada (modelo Universal 320 R, Hettich, Alemanha). Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* celular obtido foi utilizado nas etapas subsequentes de extração.

4.4.2. Utilização Dos Solventes Combinados Com Métodos Físicos Para Extração Dos Colorantes.

O *pellet* obtido, foi ressuspensionado em 5 mL de diferentes solventes orgânicos (etanol, acetona, metanol e hexano) e homogeneizado em agitador tipo vortex (modelo XH-D, Global Equipamentos, China). Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas nas mesmas condições $2.376 \times g$ por 10 minutos), visando à separação dos extratos pigmentados. Adicionalmente, foram realizados ensaios com variação na composição do solvente extrator, utilizando acetona e etanol nas proporções de 1:0, 1:1 e 1:3 (v/v). Nesses experimentos, 2 mL de cultura foram previamente centrifugados e o *pellet* ressuspensionado em 1 mL do respectivo solvente, com o objetivo de aumentar a concentração do colorante e favorecer sua extração.

Para a otimização da lise celular, foram avaliados diferentes métodos físicos de forma independente. A sonicação foi realizada utilizando sonicador (modelo Desruptor, Ultronique, Brasil), operado em potência máxima (500 W), aplicado em quatro ciclos de 2 minutos cada, com intervalos entre os ciclos para evitar o superaquecimento das amostras. Paralelamente, foi empregado banho ultrassônico (modelo Q 9.5/40A, Ultronique, Brasil), no qual as amostras foram submetidas a um tempo total de 40 minutos de tratamento.

4.4.3. Ensaios Adicionais com Solventes Orgânicos

Ensaios adicionais de extração foram conduzidos utilizando solventes orgânicos citados, com variação na proporção entre volume de cultura (2 a 5 mL) e volume de solvente (1 a 2 mL). Após a ressuspensão, as amostras foram homogeneizadas em agitador tipo vortex e submetidos à centrifugação para separação das fases.

Por fim, para as amostras extraídas em metanol 100%, foi avaliada uma etapa adicional de fragmentação mecânica. Após incubação sob refrigeração por período

overnight, as amostras foram submetidas à lise utilizando esferas de vidro de 2 mm de diâmetro, com agitação em vortex, em três ciclos de 5 minutos cada. Após esse procedimento, as amostras foram novamente centrifugadas para obtenção dos extratos.

4.5. MÉTODOS ESTATÍSTICOS E ANALÍTICOS

4.5.1. Análise Estatística

Todas as análises realizadas foram conduzidas em triplicata retiradas as estatística descritiva básica, média e desvio padrão. Para comparação entre condições experimentais avaliadas foram aplicados testes ANOVA e pós-teste de Tukey. Os resultados foram plotados em gráficos adequados, limitando-se gráficos de barra, e gráficos de séries temporais, sendo empregos para comparação entre condições experimentais testadas e para análise temporal dos experimentos respectivamente, acompanhado pelas barras de desvio padrão dos dados.

4.5.2. Monitoramento do Crescimento Celular por Densidade Óptica

A concentração celular foi monitorada por meio da densidade óptica a 734 nm (OD_{734}), conforme recomendado na literatura para bactérias produtoras de colorantes, com o objetivo de minimizar interferências espectrais decorrentes da presença de violaceína (Kothari; Sharma; Padia, 2017). Em microrganismos pigmentados, a utilização de comprimentos de onda convencionais, como 600 nm, pode resultar em superestimação da biomassa devido à absorção do metabólito secundário, sendo, portanto, preferível a adoção de comprimentos de onda alternativos. Dessa forma, a leitura de absorbância foi realizada em um leitor de placas de 96 poços (EnSpire 2300, PerkinElmer, Waltham, MA, EUA).

4.5.3. Análise da Produção de Violaceína e Seus Derivados

A fim de validar a presença de violaceína produzida pelas células, na etapa de otimização do meio de cultivo, realizou-se uma varredura espectral na faixa de 300 a 700 nm em espectrofotômetro UV-Vis, com a finalidade de identificar os picos característicos de violaceína, deoxiviolaceína e deoxicromoviridina. A violaceína, principal colorante produzido por *C. violaceum*, apresenta máximo de absorção na região de 575 a 585 nm, conforme descrito na literatura (Yang *et al.*, 2021; Kothari;

Sharma; Padia, 2017), sendo esse parâmetro utilizado como referência para sua identificação.

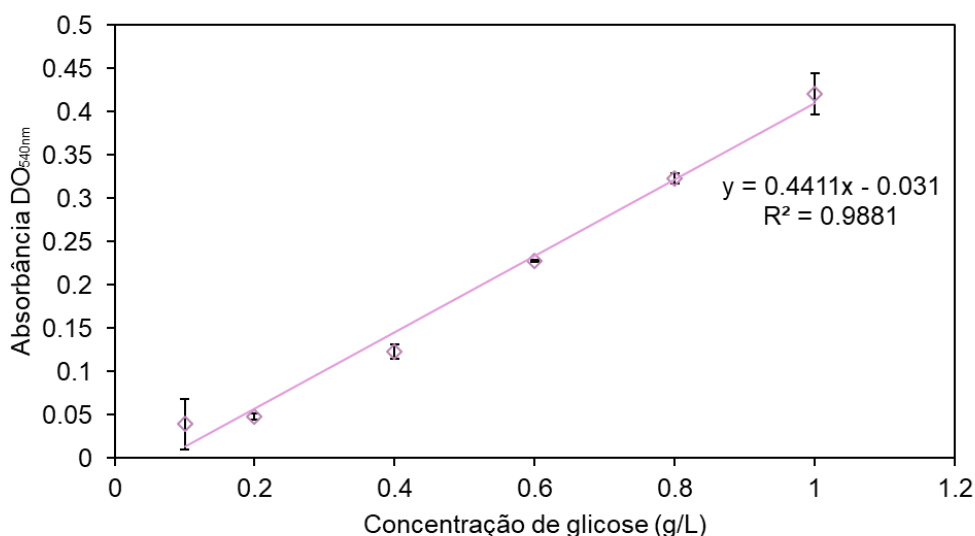
4.5.4. Determinação de Açúcares Redutores

O consumo de substrato da glicose da composição do meio de cultura foi analisado a partir da determinação de açúcares redutores nos cultivos através da metodologia colorimétrica adaptada de Miller (1959).

4.5.4.1. Curva Padrão De Concentração de Açúcar

Para a construção da curva analítica para determinação de açúcar pelo método adaptado de Miller, foi necessário preparar padrões de concentração de glicose a partir de uma solução de estoque de 1 g/L. A leitura das soluções preparadas, foi realizada a adição 100 μ L do reagente ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) e 100 μ L das soluções feitas e aquecimento deles por 5 minutos em banho seco a 100°C. Em seguida, os microtubos foram resfriados em banho de gelo e foram acrescentados 1,0 mL de água destilada em cada microtubo. As soluções de açúcar, após a reação, foram analisadas no espectrofotômetro visível (V-M5, Bel Engineering, Monza, Itália) em 540 nm. Por fim, foi traçado a curva de calibração e foi calculado o R^2 , utilizando os dados de absorbância média obtidos e a concentração em gramas de glicose por litro de amostra no eixo x, pelo software *Excel*® pelo Método dos Mínimos Quadrados (MMQ). A curva analítica obtida é apresentada na Figura 8.

Figura 8 - Curva analítica do padrão de glicose pelo método Miller.



Fonte: Autoria própria (2026).

4.5.4.2. Determinação da Concentração de Açúcares

As amostras do cultivo em reator foram clarificadas por centrifugação, para análise do sobrenadante, a $9.503 \times g$ por 5 minutos. O sobrenadante foi tratado em banho-maria seco por 5 minutos e resfriado em gelo. Posteriormente, essas amostras foram reagidas com DNS para quantificação de formação de ácido 3-amino-5-nitrossalicílico (ANS) no espectrofotômetro de absorvância em 540 nm (Miller, 1959). A partir das unidades de absorvância obtidas, foi calculada a concentração de açúcares pela Equação 1 abaixo.

$$x = \frac{(y + 0,0310)}{0,4411} \quad (1)$$

Onde:

x: concentração de glicose (g/L);

y: absorvância.

4.5.4.3. Determinação do Consumo de Glicose

O consumo de açúcar percentual foi calculado pela Equação 2 abaixo.

$$Consumo (\%) = 100 - \frac{100 \times [G_{final}]}{[G_{inicial}]} \quad (2)$$

Onde:

G_{final} : Glicose final (g/L);

$G_{inicial}$: Glicose inicial (g/L).

4.5.5. Avaliação Qualitativa Das Células Produtoras De Violaceína

A violaceína foi analisada de forma qualitativa por meio de visualização da cor do meio cultivo e biomassa a partir da centrifugação do cultivo em $9.503 \times g$ por 5 minutos, utilizando centrífuga refrigerada.

4.6. TRATAMENTO E REAPROVEITAMENTO DE RESÍDUOS

O gerenciamento de resíduos foi conduzido em conformidade com as normas gerais de biossegurança laboratorial e com as diretrizes de segurança química, visando à mitigação de riscos ao meio ambiente e à saúde pública. Nesse contexto, priorizou-se a completa inativação biológica da cepa selvagem de *C. violaceum*, bem como a recuperação e o manejo adequado de solventes orgânicos empregados na extração do

colorante, com vistas à promoção da sustentabilidade e das boas práticas nas atividades laboratoriais (CIBio UNESP, 2015).

4.6.1. Resíduos Biológicos e Inativação Microbiológica

Os resíduos biológicos gerados, constituídos por culturas em meio líquido e biomassa celular de *C. violaceum*, foram classificados como resíduos do Grupo A (infectantes), especificamente enquadrados no subgrupo A1 (resíduos contendo culturas e estoques de microrganismos), em virtude do potencial patogênico oportunista da cepa. O manejo, segregação e acondicionamento desses materiais foram realizados em conformidade com as diretrizes estabelecidas para o descarte seguro de resíduos microbiológicos de laboratório, assegurando barreiras de contenção adequadas antes do tratamento definitivo.

4.6.1.1. Inativação por Calor Úmido (Autoclave)

Todo resíduo sólido e líquido que entrou em contato direto com a cepa viável de *C. violaceum*, incluindo o meio líquido de cultivo, tubos e placas de Petri, foi submetido à esterilização por vapor saturado sob pressão. O protocolo adotado consistiu na exposição a 121 °C por, no mínimo, 20 minutos, conforme estabelecido pelos padrões metodológicos de descontaminação por calor úmido (CIBio UNESP, 2015).

Essa etapa foi realizada previamente ao descarte final ou à lavagem de materiais reutilizáveis, com o objetivo de promover a desnaturação global de proteínas estruturais e enzimáticas, induzindo a lise celular e garantindo a perda irreversível de viabilidade do microrganismo selvagem.

Após o tratamento térmico, antes do descarte final na rede coletora, o pH do material líquido foi monitorado e ajustado para a faixa de neutralidade, conforme as recomendações técnicas vigentes para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde (BRASIL, 2018).

4.6.2. Resíduos Químicos e Recuperação de Solventes

Os solventes orgânicos residuais foram coletados separadamente em balão de fundo redondo, e submetidos ao rotaevaporador sob pressão reduzida, utilizando as temperaturas compatíveis com os pontos de ebulição de cada solvente, de forma a minimizar perdas e evitar degradação. Durante a rotaevaporação, o solvente

vaporizado será condensado por meio de um sistema de refrigeração com água gelada, e coletado em frascos receptores adequados.

A rotaevaporação permite que os solventes orgânicos sejam reutilizados em etapas menos críticas de processos laboratoriais, reduzindo o consumo de reagentes e custos experimentais.

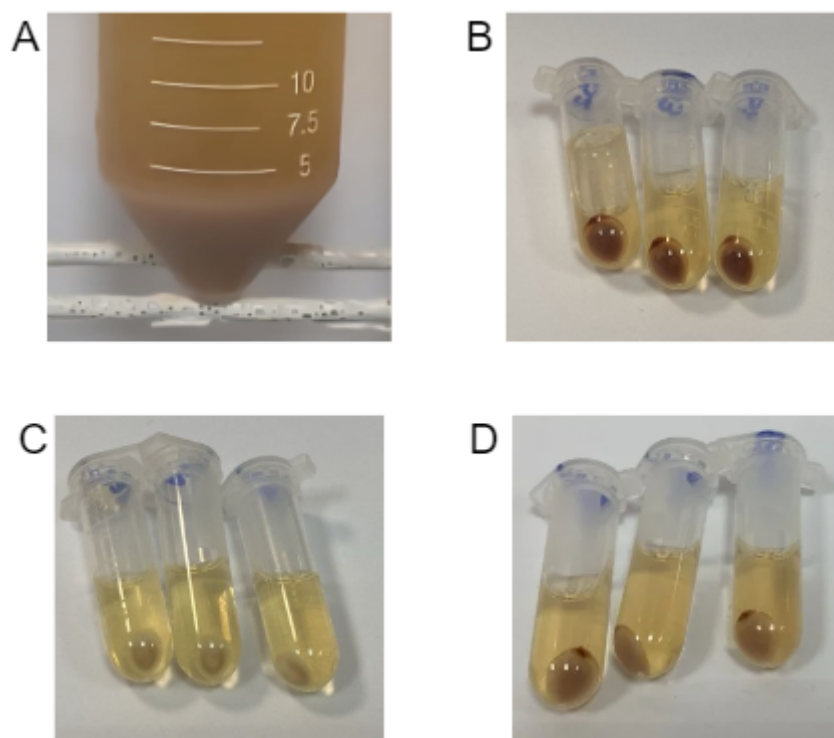
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da Produção de Colorantes por *C. violaceum*

Durante o cultivo para produção de colorantes foi avaliado o crescimento celular, o consumo de glicose e a produção do metabólito secundário de interesse apresentados na próxima seção. Ao final do cultivo, observou-se que a operação e meio de cultura foram adequados para a produção de colorante pela presença de coloração púrpura na biomassa, representada pela Figura 9 (A, B e D).

Figura 9 - Biomassa de *Chromobacterium violaceum* após 23 horas de incubação em 200 rpm e 30°C nas estratégias de inoculação avaliadas para produção de colorantes.

A: Reativação em placa. B: Reativação em placa. C: Reativação de estoque de criopreservado. D: Reativação de novo estoque de criopreservado.



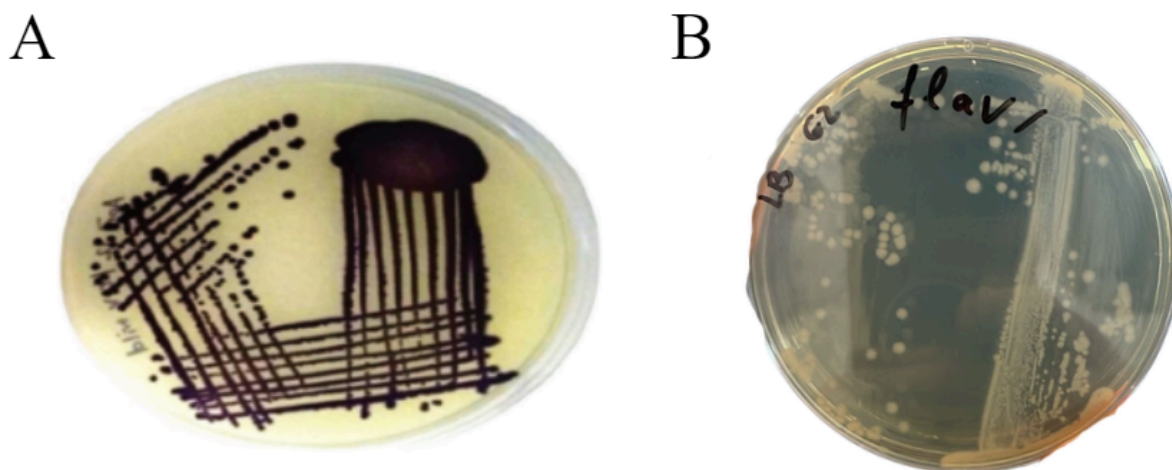
Fonte: Autoria Própria (2026).

Destaca-se que o meio de produção utilizado foi adaptado de Yang, Park e Lee (2021), sendo derivado de um meio mineral basal suplementado com fonte de carbono, representada pela glicose, além de componentes orgânicos e inorgânicos, como extrato de levedura e sulfato de amônio. Dessa forma, trata-se de um meio com composição direcionada à produção de colorantes, contendo fonte complexa de nitrogênio, sais minerais e oligoelementos. Esse perfil é compatível com condições

descritas na literatura para a produção de violaceína, as quais frequentemente envolvem fontes complexas de nitrogênio, presença de micronutrientes, pH inicial próximo à neutralidade, temperatura 30-37°C e agitação de 150-200 rpm (Kanelli *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2025; Yama, Shrivastava e Singh, 2026; Abdella *et al.*, 2026).

Vale ressaltar que existem cepas não produtoras de violaceína, bem como variantes que apresentam pigmentação com baixa produção (Ahmad *et al.*, 2012). No presente trabalho, a cepa selvagem utilizada não apresentou coloração púrpura em cultivo em ágar lisogênico LB, o que inicialmente gerou dúvidas quanto à sua capacidade de produzir violaceína. Conforme apresentado na Figura 10, a parte A representa uma cepa produtora, enquanto a parte B corresponde à cepa selvagem avaliada neste estudo, a qual não apresentou ativação visível da produção de colorante em meio sólido. No entanto, como demonstrado na Figura 9, a biomassa obtida nos cultivos líquidos apresentou coloração característica, indicando que, nas condições empregadas no cultivo líquido de produção, houve ativação da rota biossintética, com produção de colorante rosado.

Figura 10 - Perfil de coloração em meio sólido LB. A: Cepa produtora de violaceína. B: Cepa selvagem de *C. violaceum* sem pigmentação púrpura visível.

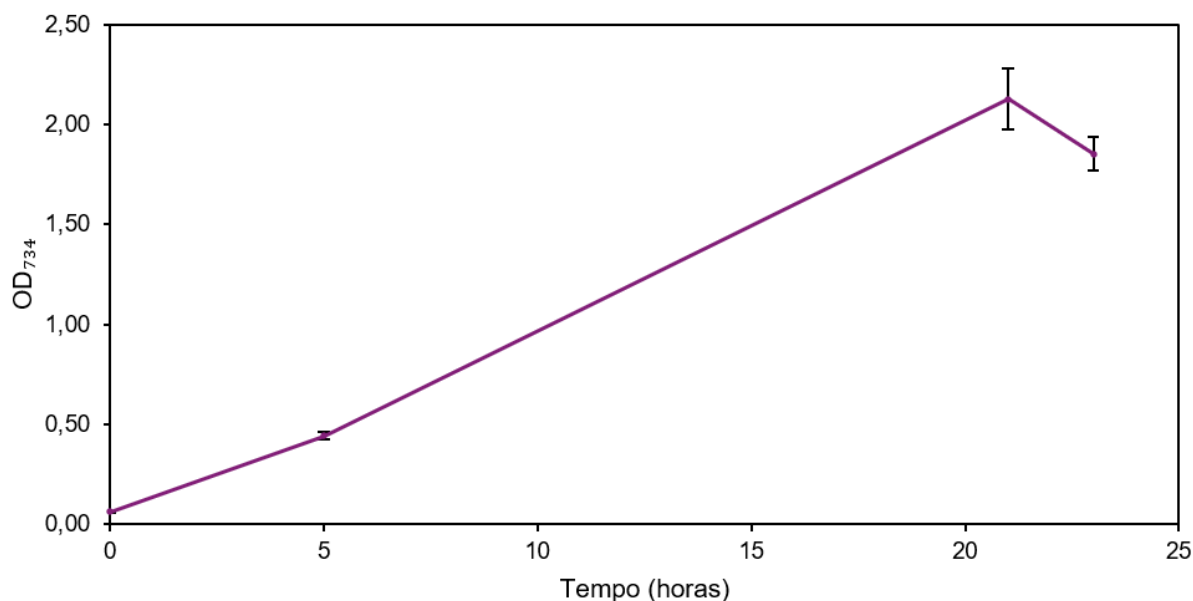


Fonte: A: Adaptada de Mohammed *et al.* (2024), B: Autoria Própria (2026).

5.1.1. Crescimento celular e consumo de glicose

Durante o cultivo em meio “V”, observou-se crescimento da cepa selvagem de *C. violaceum* ao longo do período avaliado, com o consumo de glicose ao final do cultivo. O crescimento celular da *C. violaceum* foi representado na Figura 11.

Figura 11 - Densidade celular (DO_{734}) de *Chromobacterium violaceum* em cultivos incubados a 200 rpm e 30° C durante 23 horas, com valores de média e desvio-padrão de triplicatas experimentais.



Fonte: Autoria Própria (2026).

Conforme apresentado na Figura 11, observa-se aumento da densidade óptica ao longo do cultivo, indicando manutenção do crescimento da biomassa nas condições avaliadas. Ao final de 23 h, foi obtida DO_{734} de $1,853 \pm 0,082$, evidenciando crescimento expressivo em relação à inoculação inicial. No entanto, a tendência de estabilização dos valores de DO_{734} ao final do cultivo sugere possível desaceleração do crescimento celular, podendo indicar a fase estacionária. Enquanto o consumo de glicose em 23 horas de cultivo foi de 100% mostrando que a concentração inicial de 15 g/L de glicose foi o suficiente para a manutenção celular. Assim, a associação entre aumento de biomassa, consumo de substrato e aparecimento de coloração permite sustentar que o meio de cultura “V” foi compatível com o crescimento da cepa e com a coloração púrpura na biomassa observado na Figura 9.

Vale salientar que a DO_{734} inicial foi padronizada em 0,1 para todos os ensaios, garantindo condições de inóculo equivalentes entre eles para demais comparações.

5.1.2. *Quorum sensing* e produção de colorantes

Para que ocorra a síntese dos colorantes, é necessário que o mecanismo de QS seja ativado. O QS está intrinsecamente relacionado à densidade celular, sendo necessário que uma determinada concentração celular limite seja atingida para ativação deste mecanismo e, conseqüentemente, ocorra a síntese da violaceína e seus derivados.

Tendo em vista a importância da densidade celular para que as moléculas sinalizadores do QS sejam produzidas, o monitoramento da DO é de grande importância. Como discutido na seção anterior, é possível perceber que a DO atingida ao longo dos dias de cultivo indicou crescimento expressivo, sendo possível observar a coloração arroxeada na biomassa, principalmente dos cultivos A e B representados na Figura 9. Desta forma, a DO atingida corrobora com o fato de a concentração celular limítrofe ter sido atingida para ativação do QS e indução da síntese dos colorantes.

Apesar da DO ser um parâmetro de extrema importância para acompanhamento da produção dos colorantes de interesse, demais fatores como o pH e a reativação da bactéria também devem ser monitorados e padronizados. A Tabela 1 apresenta os valores de pH analisados ao longo dos cultivos A, B, C e D.

Tabela 1 - Resultados de pH dos cultivos de *Chromobacterium violaceum* a 30° C e 200 rpm após 22 h de incubação, expresso como média $\pm$ desvio-padrão. Valores seguidos por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). A: Reativação em placa. B: Reativação em placa. C: Reativação de estoque de criopreservado. D: Reativação de novo estoque de criopreservado.

Ensaio	pH
A e B	6,34 $\pm$ 0,02 ^a
C	4,62 $\pm$ 0,02 ^b
D	6,11 $\pm$ 0,02 ^c

Fonte: Autoria Própria (2026).

Estudos demonstram que a *C. violaceum* apresenta melhor desempenho metabólico de síntese dos colorantes em faixas de pH próximas da neutralidade, normalmente entre 6,0 a 7,5, enquanto condições muito ácidas ou alcalinas reduzem significativamente o crescimento celular e síntese do colorante (Scaramussa et al., 2025). Nesse contexto, observa-se na Tabela 1 nota-se que os ensaios A e B, que apresentaram coloração mais forte, apresentam pH mais próximos dessa faixa ideal

para produção de colorantes. Já o ensaio C, que não apresenta quase nenhuma coloração, apresenta pH ácido, assim como o ensaio D que, embora mais próximo da faixa ideal de pH para produção dos colorantes, apresenta pouca coloração da biomassa.

Segundo Cheng *et al.* (2022), meios mais ácidos reduzem a síntese de violaceína devido aos efeitos adversos sobre a atividade metabólica, estabilidade enzimática e sistema de QS envolvidos na biossíntese dos colorantes. Em pH ácido, ocorrem alterações conformacionais de proteínas e enzimas essenciais à rota biossintética da violaceína e seus derivados, além de levar à menor estabilidade das moléculas sinalizadoras AHL, e ao estresse metabólico da *C. violaceum*, fazendo com que a rota bioquímica modifique-se para mecanismos de sobrevivência (Cheng *et al.*, 2022; Lozano *et al.*, 2020). Tendo isto em vista, o pH mais ácido pode explicar os resultados obtidos para os ensaios C e D, que apresentaram pH mais ácido e ausência de biomassa corada.

Adicionalmente, o pH ácido pode interferir tanto na produção do colorante quanto na estabilidade da própria violaceína. Em relação à biossíntese, condições ácidas podem afetar a disponibilidade e o transporte de nutrientes essenciais, como o triptofano, precursor direto da violaceína. Alterações na permeabilidade da membrana celular e nos sistemas de transporte podem comprometer a assimilação desse aminoácido, reduzindo a formação do colorante (Gohil *et al.*, 2022). Além disso, o pH também pode influenciar a estabilidade físico-química da violaceína. Embora essa molécula apresente relativa estabilidade em determinadas faixas de pH, meios muito ácidos podem favorecer degradação gradual, alterações estruturais e redução da intensidade de coloração (Ahmad *et al.*, 2012).

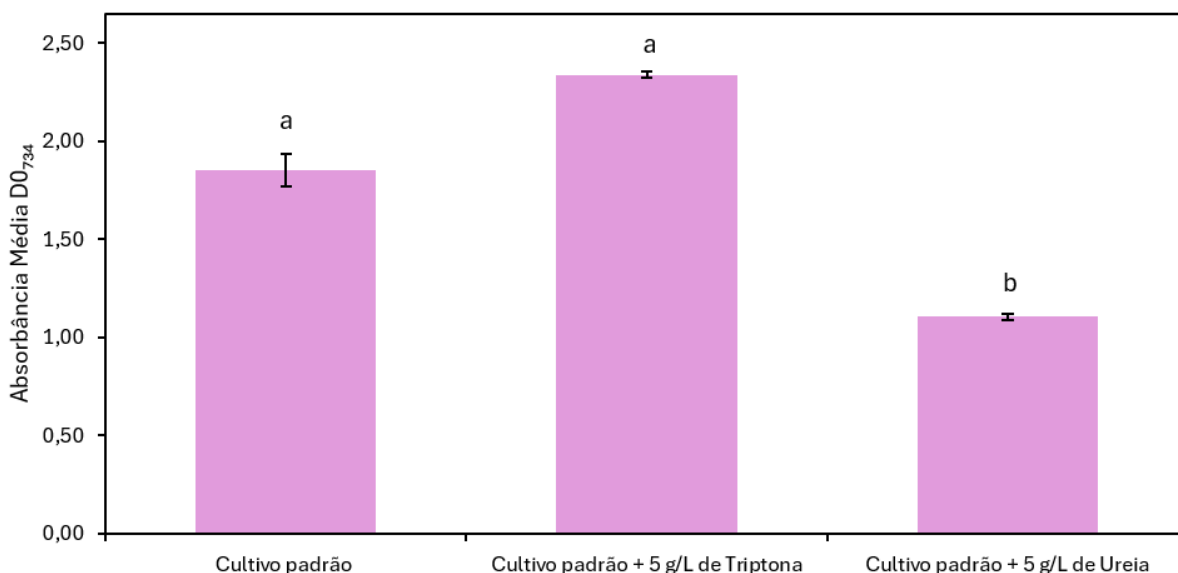
5.2. Efeito da Suplementação de Nitrogênio sobre a Produção de Colorantes em Meio “V”

Foram avaliadas suplementações com diferentes fontes de nitrogênio, com o objetivo de investigar a influência da relação C/N sobre a biossíntese de colorantes. Segundo Gharat e Singhal (2024), a disponibilidade de nitrogênio, especialmente na forma de aminoácidos, pode influenciar o direcionamento metabólico de *C. violaceum*, favorecendo ou limitando a produção do colorante. Dessa forma, foram realizados

ensaios de suplementação do meio “V” com triptona e ureia, visando avaliar seus efeitos sobre o crescimento celular e a produção de colorante.

O crescimento celular obteve diferenças significativas estatisticamente entre os cultivo padrão e as suplementações ($p < 0,05$), como visto na Figura 12. O cultivo com suplementação de triptona obteve uma DO_{734} de $2,340 \pm 0,013$ que foi 1,26 vezes maior do que o cultivo com meio padrão, enquanto a menor DO_{734} foi de $1,105 \pm 0,015$ pelo cultivo suplementado de ureia, que foi 0,59 vezes menor do que o cultivo padrão.

Figura 12 - Densidade celular (DO_{734}) com desvio padrão de *Chromobacterium violaceum* em cultivos incubados a 200 rpm e 30° C em 23 horas de cultivo. Os valores representam média $\pm$ desvio-padrão. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).



Fonte: Autoria Própria (2026).

A partir desses resultados é possível inferir que dependendo da fonte de nitrogênio a biomassa é favorecida. A suplementação com 5 g/L de triptona resultou na maior densidade celular, porém sem diferença significativa estatisticamente, sugerindo que fontes complexas de nitrogênio, compostas por peptídeos e aminoácidos, podem favorecer o crescimento de *C. violaceum* (Fachinelli, 2006; Gharat; Singhal, 2024; Barroso, 2022). Além disso, esse ensaio suplementado não apresentou diferença expressiva na coloração da biomassa em relação ao cultivo controle no meio “V”,

indicando que, nas condições avaliadas, a suplementação de triptona foi indiferente para a intensificação de coloração durante a extração do corante da biomassa.

Em contrapartida, a suplementação com 5 g/L de ureia reduziu significativamente a densidade óptica em relação ao cultivo padrão, não resultou na produção de violaceína e ainda apresentou 7,185 g/L de glicose residual após 23 h, diferentemente dos demais cultivos, nos quais houve consumo total da glicose. Esse resultado sugere menor assimilação da fonte de carbono e possível limitação metabólica associada ao uso da ureia como fonte de nitrogênio. Embora a ureia possa ser transportada para o interior da célula e hidrolisada pela urease, formando amônia assimilável no metabolismo celular (Sigurdarson; Svane; Karring, 2018), por algumas cepas adaptativas dessa bactéria apresentam essa capacidade (Sharma *et al.*, 2021), esse processo também pode elevar o pH do meio, inviabilizando as células (Pant; Sharma, 2016; Parajuli *et al.*, 2016). Assim, a alcalinização dada a formação de amônia, impactou na pigmentação púrpura característica, sendo esse fato, já descrito por outros pesquisadores (Castro *et al.*, 2015). Outra justificativa é a baixa DO, impedindo expressão suficiente de AHL até atingir seu valor crítico, e por consequência, não houve a ativação de QS capaz de induzir a rota biossintética dos corantes (Dimitrova; Damyanova; Paunova-Krasteva, 2023; Batista *et al.*, 2024). No entanto, essa hipótese não pôde ser confirmada experimentalmente, uma vez que o pH final dos cultivos não foi quantificado, por falta de tempo hábil e não inclusão da análise no planejamento inicial.

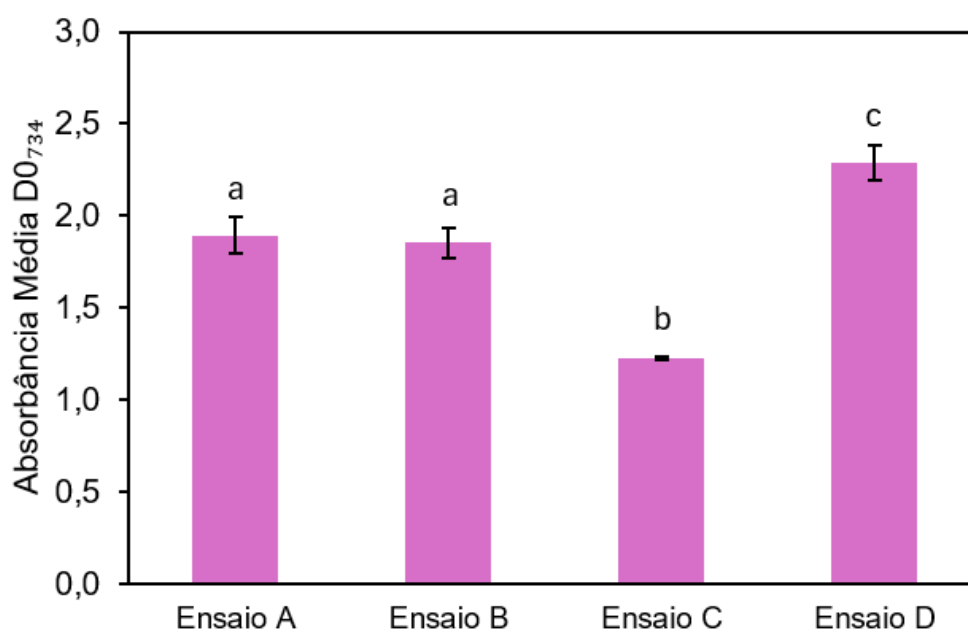
Em estudos de Gharat e Singhal (2024), as menores produções de corante foram em uma razão C/N de 10 e as maiores produções foram entre 0,5 e 1. A partir da razão C/N dos ensaios testados é possível observar que o meio de cultura padrão apesar de ter sido considerado inicialmente como um meio que favorece a produção de corante, sua razão C/N é de aproximadamente 6,2, e que possivelmente este meio de cultura ainda possa ser otimizado com uma maior contribuição de nitrogênio, visando a produtividade do corante.

5.3. Influência do Inóculo e da Ativação por QS na Produção de Corantes

Estudos realizados pelo presente trabalho mostraram a influência da concentração celular sobre a ativação da rota biossintética do corante. No ensaio C, representado na Figura 9(C), a biomassa obtida ao final do cultivo não apresentou

coloração arroxeada. Esse cultivo também apresentou a menor densidade óptica entre os ensaios avaliados, como demonstrado na Figura 13, com DO_{734} de $1,225 \pm 0,007$, sendo estatisticamente diferente dos demais cultivos ($p < 0,05$). Esse resultado sugere que o inóculo utilizado nesse ensaio pode ter apresentado menor atividade metabólica ou menor proporção de células viáveis, o que teria comprometido o crescimento celular e, consequentemente, a ativação do sistema de QS necessário para a indução da rota biossintética da violaceína. A ausência de pigmentação também pode estar relacionada ao redirecionamento da rota metabólica do cultivo, uma vez que, conforme apresentado anteriormente na Tabela 1, esse ensaio apresentou pH final mais ácido, de $4,62 \pm 0,02$. Essa acidificação pode estar associada à produção de ácidos orgânicos, conforme descrito por Choi *et al.* (2015a), indicando que, nas condições desse cultivo, outras rotas metabólicas podem ter sido favorecidas em detrimento da produção de violaceína.

Figura 13 - Densidade celular (DO_{734}) de *Chromobacterium violaceum* em cultivos incubados a 200 rpm e 30° C em 23 horas de cultivo. Os valores representam média $\pm$ desvio-padrão. Médias seguidas por letras diferentes diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Ensaio A: Reativação em placa. Ensaio B: Reativação em placa. Ensaio C: Reativação de estoque de criopreservado. Ensaio D: Reativação de novo estoque de criopreservado.



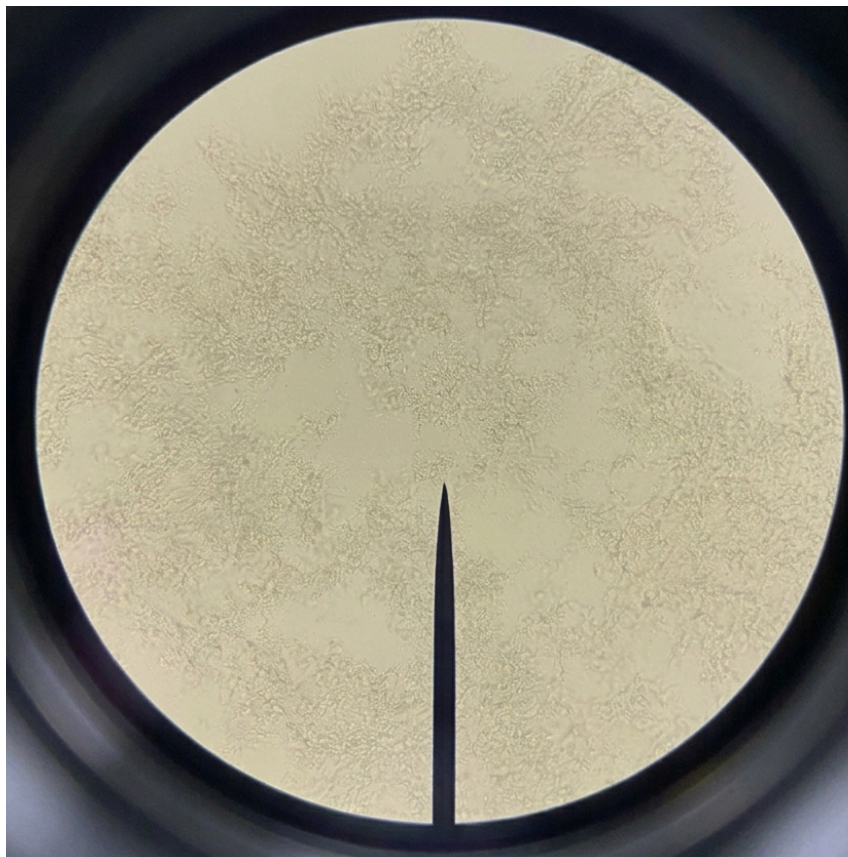
Fonte: Autoria Própria (2026).

Ademais, vale ressaltar que, embora os ensaios A e B tenham apresentado valores superiores de DO e pH final mais próximo à neutralidade, apenas o ensaio B apresentou coloração púrpura mais intensa, conforme mostrado na Figura 9(B). Esse resultado pode estar relacionado à maior carga celular utilizada durante a inoculação do inóculo da bactéria nesse ensaio em comparação aos demais. A partir disso, formulou-se a hipótese de que a maior densidade celular inicial poderia ter favorecido o acúmulo mais rápido de moléculas sinalizadoras do QS, permitindo que o nível crítico necessário para ativação da rota biossintética da violaceína fosse atingido mais rapidamente. Esse efeito poderia ter prolongado ou intensificado a produção do colorante, especialmente durante a transição para a fase estacionária, como discutido em estudos de Kanekar e Devasya (2022) e Gharat e Singhal (2024).

Com exceção, o ensaio D apresentou a DO_{734} mais alta comparada com os demais ensaios, porém possivelmente a rota metabólica foi desviada e obteve uma coloração menos intensa do que os outros ensaios apresentados da Figura 9(D), apresentando um pH com uma diferença estatisticamente significativa de $6,11 \pm 0,02$ apresentada na Tabela 1. Vale ressaltar que esse cultivo foi pré-inoculado a partir de uma solução estoque.

Ademais, segundo Alves *et al.* (2021) demonstram que fatores relacionados ao estresse oxidativo, formação de biofilme e regulação global do metabolismo influenciam a expressão dos genes associados à produção do colorante. Foi feita uma análise sob microscopia, representada na Figura 14, que revela a presença de aglomerados celulares irregulares no meio do cultivo, em vez de células isoladas, indicando a possibilidade de haver biofilme. Apesar da confirmação da formação de biofilme demandar a utilização de técnicas como microscopia eletrônica, Choi *et al.* (2015a) a bactéria selvagem produz biofilme, um fenótipo que é co-regulado pelo sistema de QS juntamente com a síntese de colorantes. Essa correlação fisiológica possivelmente indica que o meio de cultura e as condições estabelecidas foram capazes de induzir com sucesso a ativação do QS durante a fase estacionária. Consequentemente, observou-se a biossíntese de metabólitos secundários de interesse, evidenciada pela coloração mais escurecida da biomassa recuperada, conforme ilustrado na Figura 9.

Figura 14 - Observação sob microscopia óptica (aumento de 10x) de estruturas amorfas e agregados celulares indicativos da formação de biofilme por *C. violaceum* durante o cultivo de produção de colorantes.



Fonte: Autoria própria (2026).

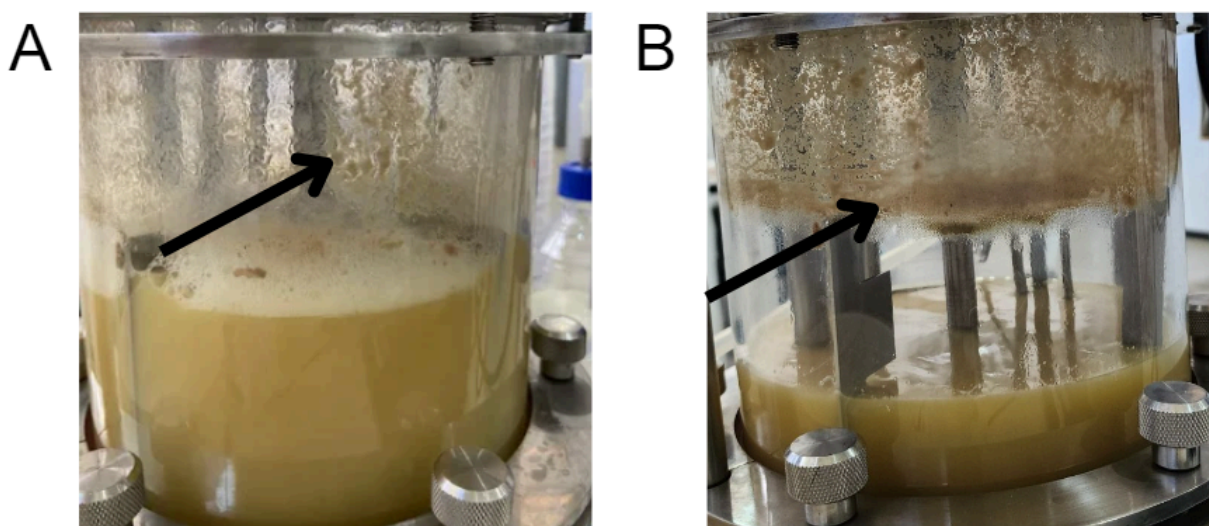
5.4. Avaliação preliminar do aumento de escala em biorreator

A produção de colorantes em reator tipo tanque agitado foi uma tentativa de aumento de escala com maior controle das condições operacionais. Embora estudos de otimização em reator para produção de colorantes por *C. violaceum* sejam escassos, foram tomadas estratégias no reator para otimizar a transferência e a absorção de oxigênio pela bactéria, visto que conforme discutido anteriormente sobre a bactéria, são necessárias condições aeróbias para a produção de colorantes (Packard, 2023; Hoshino, 2011; Durán *et al.*, 2016).

No presente estudo, optou-se inicialmente por um cultivo em batelada, utilizando condições adaptadas de Yang, Park e Lee (2021). A mudança para o *STR* alterou principalmente as condições de mistura e transferência de oxigênio. Assim, adotou-se aeração de 0,5 vvm e agitação de 700 rpm, com dois impelidores distintos, Rushton e Smith, buscando favorecer a homogeneização do meio e a transferência de oxigênio. A

configuração utilizada apresentou relação de diâmetro do impelidor e do tanque (D_i/D_t) de 0,37, próxima às proporções recomendadas para sistemas agitados, e a combinação dos impelidores foi escolhida visando melhorar o tempo de mistura em altas rotações, conforme descrito na literatura (Schmidell, 2021; Costa Júnior e Correa, 2019). Contudo, como apresentado na Figura 15, o cultivo não apresentou coloração arroxeada no meio, apenas na biomassa aderida no vidro.

Figura 15 - Cultivo em reator de tanque agitado em modo batelada com agitação de 700 rpm, aeração 0,5 vvm, 30°C e pH 7. A: 24 horas. B: Finalização do cultivo de 45,5 horas.



Fonte: Autoria própria (2026).

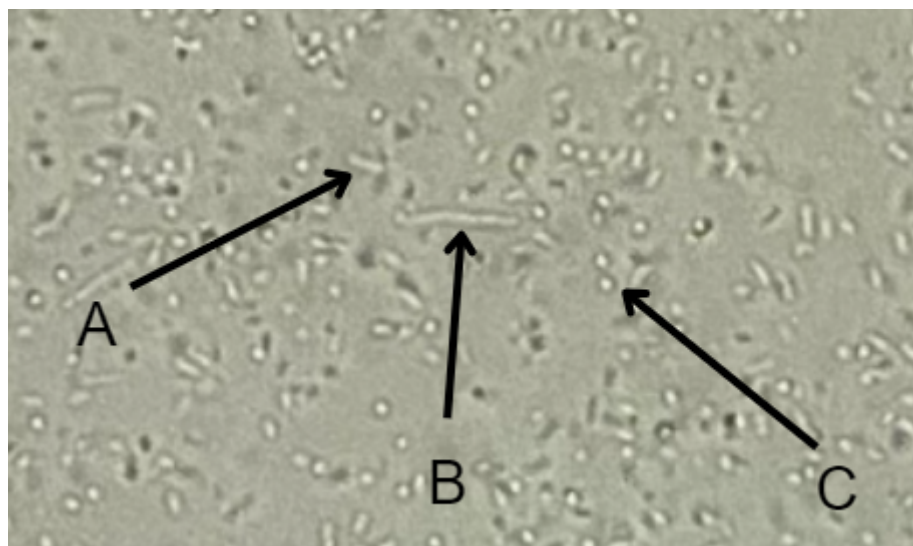
O cultivo em biorreator não apresentou produção evidente de colorante. Esse resultado deve ser interpretado considerando dois fatores principais. O primeiro está relacionado ao histórico observado no ensaio D, no qual a baixa viabilidade do inóculo comprometeu a ativação do fenótipo pigmentado. O segundo fator está associado às mudanças impostas pelo cultivo em biorreator, como maior volume de trabalho, alterações na transferência de oxigênio, agitação, aeração, cisalhamento e distribuição celular, as quais podem modificar a dinâmica de crescimento, a sinalização celular e o acúmulo de moléculas relacionadas ao QS.

Conforme descrito por Cardoso (2025), cultivos submetidos a elevadas velocidades de agitação apresentaram coloração amarelada, enquanto condições mais estáveis favoreceram a coloração arroxeada associada à produção de violaceína,

comportamento semelhante ao observado no presente estudo. Segundo a autora, esse efeito pode estar relacionado à desagregação bacteriana causada pela intensa mistura do meio, uma vez que a proximidade celular é importante para o acúmulo de moléculas sinalizadoras e ativação do QS. Há de se explicitar que, o aumento do cisalhamento mecânico e da oxigenação decorrentes de condições hidrodinâmicas mais intensas pode interferir negativamente na produção de metabólitos secundários, contribuindo para a ausência de pigmentação observada no cultivo em reator (Cheng *et al.*, 2022).

Além disso, foi observada possível contaminação no cultivo em biorreator, evidenciada por microscopia óptica, conforme apresentado na Figura 16. Foi revelado a presença de três morfologias celulares distintas, incluindo bacilos curtos, bacilos longos e cocos, indicando que o cultivo foi contaminado. Embora a morfologia bacilar possa estar associada à *C. violaceum* (Durán *et al.*, 2016), a confirmação da identidade dos microrganismos exige a realização de análises complementares. Para isso, recomenda-se o plaqueamento de alíquotas do cultivo em meio sólido adequado, como LB ágar ou ágar nutriente, preferencialmente após diluições seriadas, seguido de incubação a 30 °C por 24 a 48 horas. Após o crescimento, devem ser avaliadas as características macroscópicas das colônias, como coloração, formato, borda, elevação e textura, permitindo verificar a presença de diferentes tipos coloniais. Colônias isoladas podem então ser repicadas para obtenção de culturas puras e submetidas à coloração de Gram, a fim de diferenciar bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e confirmar a morfologia celular ao microscópio óptico. Dessa forma, os dados de consumo de glicose e biomassa não foram utilizados para discussão quantitativa do desempenho do processo, uma vez que não seria possível atribuir os resultados metabólicos exclusivamente à cepa de interesse. Assim, a discussão foi restrita aos aspectos qualitativos do cultivo, como ausência de pigmentação, observações visuais e confirmação microscópica. As possíveis falhas de assepsia, associadas às intervenções frequentes no reator, podem ter contribuído para alterações na composição microbiana do cultivo e interferido negativamente na produção de violaceína.

Figura 16. Microscopia óptica de amostra de 45,5 horas cultivo de *C. violaceum* em biorreator de mistura total com agitação de 700 rpm e aeração 0,5 vvm realizado a 30°C e pH 7. A: Morfologia compatível com bacilos curtos; B: morfologia compatível com bacilos longos; C: morfologia compatível com cocos.



Fonte: Autoria própria (2026).

Dessa forma, o ensaio em biorreator deve ser apresentado como uma etapa preliminar de escalonamento, que evidenciou a necessidade de maior controle sobre a qualidade do inóculo, assepsia, carga celular inicial e condições operacionais para que a produção de colorantes seja reproduzida em maior escala.

5.5. Recuperação dos Colorantes

5.5.1. Limitações da extração convencional e necessidade de ruptura celular

A ausência de estudos voltados especificamente à localização subcelular da violaceína dificulta afirmar se o colorante permanece majoritariamente no citoplasma, associado à biomassa. Essa indefinição interfere diretamente no planejamento das estratégias de recuperação, uma vez que diferentes localizações celulares exigem métodos distintos de extração e ruptura celular (Durán *et al.*, 2025). Por esse motivo, foram avaliados métodos químicos e físicos para recuperação dos colorantes produzidos por *C. violaceum*. Os testes iniciais foram realizados apenas com as repetições do ensaio A, apresentados anteriormente na Figura 9, com o objetivo de avaliar preliminarmente a produção de colorantes e a eficiência de diferentes

estratégias de extração. Entretanto, devido à limitação de tempo, agravada pela greve estudantil, não foi possível aplicar todos os métodos aos demais ensaios.

Inicialmente, foi avaliada a extração com etanol absoluto, conforme metodologia proposta por Mendes *et al.* (2001). O resultado foi insatisfatório, pois após homogeneização mecânica em agitador tipo vórtex e centrifugação o sobrenadante permaneceu sem coloração, enquanto a biomassa celular se manteve corada. Esse comportamento indicou que o etanol absoluto, nas condições avaliadas, não foi suficiente para solubilizar ou remover o colorante associado à biomassa. Em seguida, foram testados solventes orgânicos com diferentes polaridades: metanol, acetona e hexano. O hexano não promoveu a solubilização do *pellet*, sugerindo baixa eficiência na extração dos compostos pigmentados. Através de inspeção visual, visualizou-se que a acetona resultou em um sobrenadante opaco e praticamente incolor, enquanto o metanol apresentou leve coloração no sobrenadante, indicando recuperação parcial dos colorantes intracelulares. Esse resultado está de acordo com Periz *et al.* (2020), que relatam o metanol como um dos solventes frequentemente utilizados na extração de violaceína e derivados. No entanto, a permanência de biomassa pigmentada após a extração demonstrou que parte significativa dos colorantes permaneceu retida no *pellet*, indicando que um único ciclo de extração não foi suficiente.

A partir desses resultados, foram levantadas hipóteses para explicar a dificuldade de extração da violaceína. A primeira hipótese considera a possível presença de material extracelular aderido à biomassa bacteriana, dificultando o contato direto entre o solvente e o colorante (Choi *et al.*, 2015a; Di Martino, 2018). Assim, a ausência de uma etapa prévia de lavagem da biomassa pode ter favorecido a permanência de resíduos extracelulares aderidos às células, atuando como barreira física e química à difusão dos solventes até a violaceína intracelular ou associada a estruturas membranosas. Aponta-se também fatores relacionados à remoção de componentes da matriz extracelular, podendo exigir tratamentos físicos e químicos adicionais, o que explicaria a baixa eficiência da simples exposição da biomassa aos solventes.

A segunda hipótese está relacionada à interação entre os solventes orgânicos e as estruturas celulares. Com base nos valores de Log P apresentados na Tabela 2, solventes mais apolares, como o hexano, poderiam ser inicialmente considerados promissores para interagir com estruturas lipídicas, especialmente devido ao caráter

hidrofóbico da violaceína, cujo Log P é 3,34. No entanto, os resultados demonstraram que essa afinidade teórica não foi suficiente para promover a extração eficiente do colorante.

O resultado da extração com hexano pode estar relacionado à alta apolaridade e baixa miscibilidade do hexano em água. Como a biomassa apresentava umidade residual, o contato efetivo entre o solvente e o material celular pode ter sido limitado, favorecendo apenas alterações superficiais, como desidratação e compactação do pellet. Dessa forma, o hexano não teria promovido ruptura ou permeabilização celular suficiente para liberar o colorante, mantendo a violaceína retida na biomassa. Assim, embora solventes orgânicos possam alterar a organização da membrana e promover permeabilização seletiva em determinadas condições, esse efeito não implica necessariamente lise celular completa ou liberação eficiente de compostos fortemente associados à biomassa (Isken; Bont, 1998; Kilikian e Pessoa Júnior, 2020).

Tabela 2 - Valores de Log P (octanol/água) dos solventes testados e da violaceína

Composto	Log P (octanol:água)	Referência
Metanol	-0,74	Haynes (2024)
Etanol	-0,31	
Acetona	-0,24	
Hexano	4,00	Scaramussa, Ishimoto e Bicas (2025)
Violaceína	3,34	

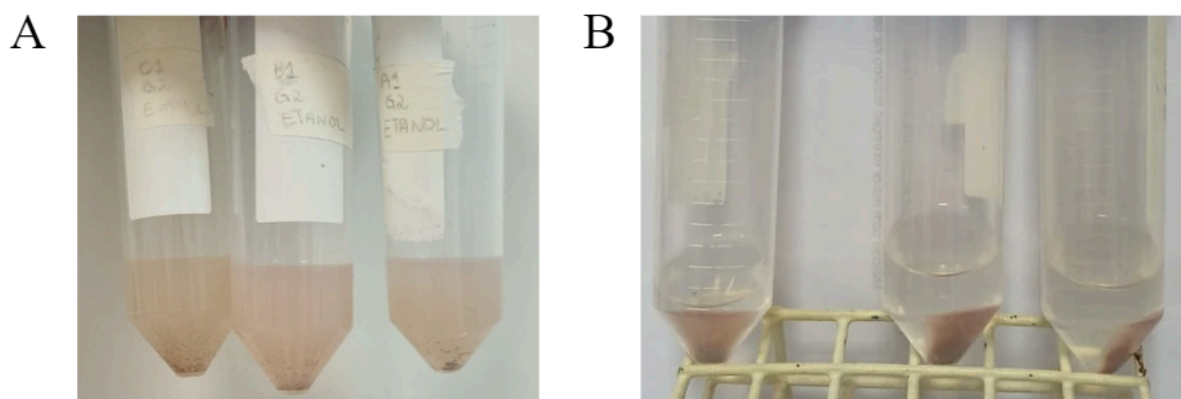
Fonte: Autoria própria (2026).

A terceira hipótese considera as propriedades físico-químicas dos próprios colorantes. Embora sejam frequentemente descritos como moléculas hidrofóbicas, a violaceína e seus derivados apresenta grupos funcionais polares, como carbonila, hidroxila e amina, além de anéis aromáticos conjugados, presentes em unidades como hidroxiindol, oxoindol e pirrolidona (Ahmad *et al.*, 2012). Esses grupos favorecem interações com solventes polares, como metanol e acetona, por ligações de hidrogênio, enquanto a região aromática contribui para sua afinidade por ambientes hidrofóbicos.

Dessa forma, a violaceína apresenta comportamento anfifílico, podendo interagir tanto com fases orgânicas quanto com estruturas lipídicas e interfaces (Gupta *et al.*, 2021). Essa característica ajuda a explicar o fato de o metanol ter apresentado indícios de extração, possivelmente por interagir com grupos polares do colorante ou com frações mais acessíveis. Entretanto, a permanência de biomassa intensamente colorida indicou que essa interação foi apenas parcial, não sendo suficiente para remover o colorante associado a componentes celulares, membranosos ou extracelulares.

Considerando as características anfifílicas da violaceína e sua afinidade por solventes de polaridade moderada, avaliou-se o uso de etanol associado à sonicação como estratégia alternativa de extração. Inicialmente, a sonicação foi realizada com etanol absoluto, em quatro ciclos, seguindo metodologia adaptada de Mendes *et al.* (2001). Após o procedimento, observou-se a presença de uma suspensão com tonalidade rosada, conforme apresentado na Figura 17(A); entretanto, ainda foram visualizados pellets celulares contendo colorante, indicando que parte da biomassa não foi completamente rompida ou que a violaceína permaneceu associada aos fragmentos celulares. Após a centrifugação, o sobrenadante não apresentava coloração, como observado na Figura 17(B), sugerindo que a ruptura celular não foi suficiente para promover a solubilização completa da violaceína no etanol absoluto. Esse resultado indica que, mesmo após sonicação, a interação entre a violaceína e os componentes da biomassa foi mais intensa do que sua afinidade pelo etanol absoluto.

Figura 17 - Tentativa de recuperação de colorantes por ruptura celular via sonicação associada à extração com etanol absoluto. A: Suspensão celular após sonificação; B: sobrenadante obtido após centrifugação.

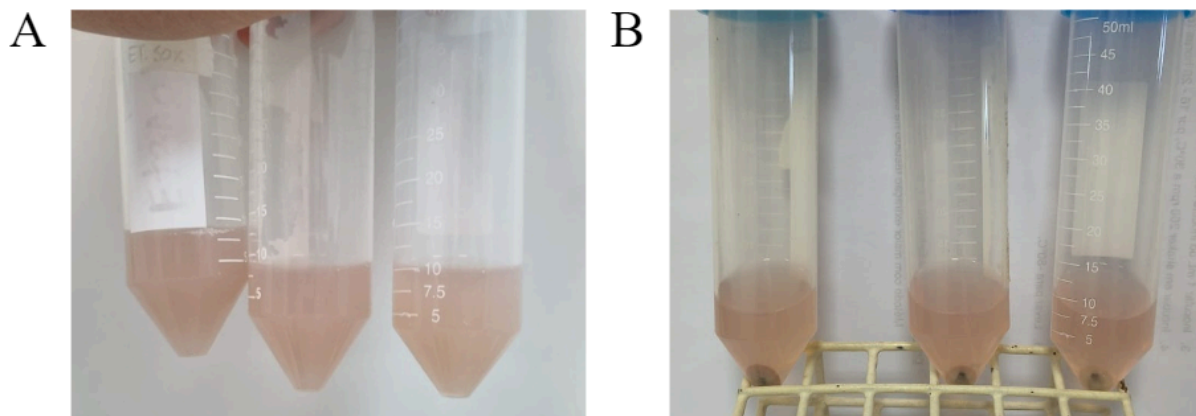


Fonte: Autoria própria (2026).

Essa baixa eficiência pode estar relacionada aos efeitos dos solventes absolutos sobre a estrutura celular, justamente pelo fato de que, altas concentrações de etanol podem favorecer a desidratação celular, precipitação de proteínas, além do aumento da rigidez da biomassa, dificultando assim, a penetração do solvente conjuntamente a liberação de compostos intracelulares (Kilikian e Pessoa Júnior, 2020). Além disso, o corante pode não estar simplesmente livre no meio ou disponível para partição direta no solvente, mas protegida ou estabilizada por estruturas lipídicas. Segundo Choi *et al.*, (2020), como a *C. violaceum* possui na sua organização celular uma membrana externa, e possibilidade de formação de vesículas de membrana externa, estudos demonstram que a violaceína pode ser transportada por essas vesículas, que apresentaram maior quantidade de violaceína do que de proteínas, sugerindo sua atuação como reservatórios do colorante. Concomitantemente, no mesmo estudo quando presente no interior dessas vesículas, 79,5% da violaceína permaneceu na fase aquosa, representando aumento de 1740 vezes na solubilidade aparente do composto. Esses dados reforçam que a baixa recuperação pode estar associada à combinação entre barreiras extracelulares, retenção em membranas e proteção vesicular.

Com base nessas hipóteses, foi realizada uma nova extração por sonicação utilizando etanol-água (1:1). Após o ensaio, observou-se coloração lilás/rosada mais homogênea na suspensão, sem a presença evidente de *pellets* pigmentados em suspensão, diferentemente do observado no ensaio com etanol absoluto, apresentado na Figura 17(A). Após centrifugação, o sobrenadante manteve a coloração rosada, enquanto grande parte do *pellet* apresentou coloração esbranquiçada, com pequenas regiões escurecidas representadas na Figura 18.

Figura 18 - Recuperação de colorantes por ruptura celular via sonicação associada à extração com sistema etanol-água (1:1). A: Suspensão celular após sonificação; B: Suspensão após centrifugação.



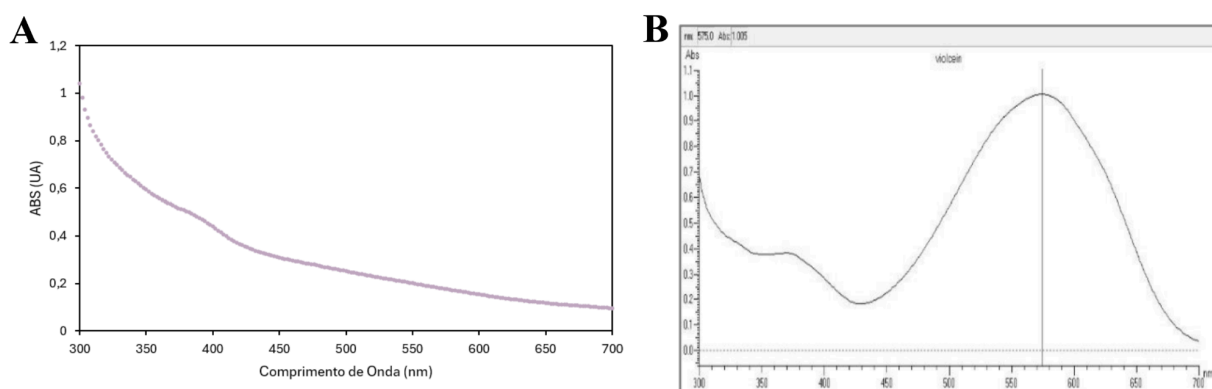
Fonte: Autoria própria (2026).

Esse resultado sugere que o sistema etanol-água promoveu maior remoção do colorante da biomassa bacteriana. A presença de água pode ter favorecido a hidratação da biomassa, o intumescimento celular e a difusão do solvente, enquanto o etanol contribuiu para a desorganização das estruturas lipídicas. Como solvente anfipático, o etanol pode se intercalar entre fosfolipídios da membrana, aumentar o espaçamento intermolecular, alterar a fluidez da bicamada e favorecer o aumento da permeabilidade celular (Isken; Bont, 1998; Gurtovenko; Anwar, 2007). Também há de se dissertar sobre a formação de ligações de hidrogênio entre o grupo hidroxila do etanol e os grupos fosfato e colina dos fosfolipídios, podendo assim modificar a organização molecular da membrana (Patra *et al.*, 2006). Em bactérias Gram-negativas, como *C. violaceum*, a camada de peptidoglicano mais fina pode tornar as células mais suscetíveis a processos de permeabilização quando expostas a sistemas solvente-água (Blössey *et al.*, 1998).

Após a extração com etanol-água, foi realizada varredura espectrofotométrica do sobrenadante entre 300 e 700 nm, com o objetivo de verificar a presença de pico próximo a 575–580 nm, faixa característica de absorção da violaceína (Yang *et al.*, 2021; Kothari, Sharma e Padia, 2017). A varredura foi utilizada como metodologia indireta, uma vez que técnicas cromatográficas seriam necessárias para confirmar e quantificar com precisão os colorantes associados na produção de violaceína. O resultado apresentado na Figura 19 não evidenciou um pico bem definido na região esperada para a violaceína. Apesar da coloração rosada observada no extrato, o perfil

espectral sugere que outros compostos liberados durante a ruptura celular podem ter contribuído para a absorção, principalmente entre 300 e 450 nm. A utilização da potência máxima do sonicador provavelmente promoveu desintegração celular intensa, liberando não apenas o colorante, mas também componentes celulares de não interesse. Como consequência, embora a sonicação tenha favorecido a transferência de compostos coloridos para o sobrenadante, também pode ter aumentado a complexidade do extrato bruto, dificultando etapas posteriores de clarificação, separação e purificação (Kilikian e Pessoa Júnior, 2020)

Figura 19 - A: Varredura do sobrenadante extraído após ruptura celular por sonificação, utilizando sistema etanol-água (50%) em quatro ciclos de extração com proporção biomassa e solvente (1:1). B: Espectrometria UV-Vis da violaceína concentrada com pico de absorbância em 575 nm recuperada a partir da produção em cultivo por *C. violaceum*.



Fonte: A: Autoria Própria (2026). B: Abedin *et al.* (2024)

Resultados de Abedin *et al.* (2024) demonstraram a obtenção de um pico característico em 575 nm após extração assistida por sonicação seguida de etapas adicionais de concentração e filtração. No presente estudo, utilizou-se uma potência mais elevada do que dos estudos de Abedin *et al.* (2024), fato que, associado à ausência de etapas de purificação e concentração do extrato, pode ter contribuído para a ausência do pico esperado.

Portanto, outros métodos de extração ainda devem ser avaliados, principalmente aqueles que utilizem menor quantidade de solventes orgânicos tóxicos, pois esses

compostos podem limitar a aplicação futura do colorante (Lee, Coutinho e Weingarten, 2025). Embora o método com etanol-água associado à sonicação tenha apresentado o melhor potencial de recuperação neste estudo, este ainda precisa ser otimizado. Entre os ajustes necessários, destacam-se a lavagem prévia da biomassa, para remoção de resíduos do meio de cultivo, compostos extracelulares e possíveis componentes associados ao biofilme; a avaliação da proporção biomassa/solvente; e a redução da potência do sonificador, buscando aumentar a recuperação do colorante sem liberar excesso de compostos celulares indesejados; concentração do colorante. Dessa forma, considerando que a cepa selvagem utilizada apresentou capacidade de produzir cor, os resultados indicam que a principal limitação está na etapa de extração e recuperação do colorante rosado. Logo, análises complementares, especialmente cromatográficas, avaliação da cor por colorímetro e caracterização do extrato, são necessárias para confirmar a presença de violaceína e identificar possíveis colorantes derivados. Além disso, deve-se considerar a otimização de métodos que preservem a estabilidade da biomolécula e sejam mais sustentáveis, ao mesmo tempo em que possibilitem maior purificação do extrato, visando futuras aplicações da violaceína e os demais colorantes derivados.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

6.1. Purificação de Colorantes Produzidos por *C. violaceum*

6.1.1. Uso de surfactante na extração de colorantes

Espera-se que a aplicação de surfactantes no processo de extração da violaceína produzida por *C. violaceum* contribua para o aumento da recuperação do colorante por meio da combinação de dois mecanismos principais: a alteração da integridade celular e a solubilização de compostos hidrofóbicos liberados após o rompimento ou permeabilização da célula. Considerando que a violaceína apresenta baixa solubilidade em água devido ao seu caráter hidrofóbico, a utilização de surfactantes com diferentes propriedades químicas pode favorecer sua manutenção em solução e aumentar a eficiência do processo extrativo.

Para o SDS, cogita-se maior contribuição na etapa de lise celular, favorecendo a liberação da violaceína intracelular devido à sua ação sobre componentes da membrana bacteriana. Para mais, sua capacidade de formação de micelas pode contribuir para a manutenção do colorante solubilizado após sua liberação,

aumentando sua disponibilidade para as etapas posteriores de extração (Le Maire; Champeil; Møller, 2000). Esse comportamento é particularmente relevante para *C. violaceum*, considerando a estrutura do envelope celular de bactérias Gram-negativas e a necessidade de superar barreiras celulares para recuperação de metabólitos intracelulares (Silhavy *et al.*, 2010). Estudos anteriores realizados por Siqueira *et al.* (2021) demonstraram a aplicação do SDS no processo de lise de células de *C. violaceum* ATCC 12472, utilizando tratamento com SDS 10% seguido de extração com n-butanol e análise espectrofotométrica da violaceína em 540 nm. Os resultados descritos na literatura indicam que essa abordagem permitirá a liberação do colorante intracelular, demonstrando o potencial do SDS como agente químico para extração de metabólitos hidrofóbicos bacterianos .

Em relação ao Tween 80, acredita-se que sua principal contribuição esteja associada à etapa de solubilização e estabilização da violaceína após sua liberação celular. Por apresentar caráter não iônico, esse surfactante pode atuar como agente auxiliar na recuperação de compostos hidrofóbicos, favorecendo a permanência do colorante em solução e reduzindo limitações relacionadas à baixa solubilidade em meio aquoso (Kerwin, 2008; Dopierala *et al.*, 2026). Assim, cogita-se que o Tween 80 seja capaz de apresentar maior relevância como componente complementar do processo extrativo, podendo ser associado a estratégias de rompimento celular para otimizar a recuperação do colorante.

Kholany *et al.* (2019) desenvolveram um processo de downstream em duas etapas para extração de violaceína a partir de células de *Yarrowia lipolytica*, uma primeira etapa de extração sólido-líquido utilizando soluções aquosas de surfactantes, seguida de uma segunda etapa de purificação por meio de sistemas aquosos bifásicos (SAB) compostos por Tween 20 e líquidos iônicos à base de colina, alcançando seletividade e remoção de 80% das proteínas contaminantes presentes no extrato. Os autores ainda relatam que a extração consecutiva com soluções de surfactantes mostrou-se mais eficiente do que o uso isolado de etanol (controle), evidenciando o potencial da abordagem combinada, principalmente, para lidar com a presença de detritos celulares e interferentes, os quais, tiveram grande impacto na varredura realizada sobre o sobrenadante obtido no presente estudo.

Já sobre o Triton X-100, foi apresentado por Chen *et al.* (2017), que a extração de colorantes intracelulares produzidos por espécies fúngicas do gênero *Monascus*

utilizando soluções aquosas contendo Triton X-100, permitiram a transferência praticamente completa do corante intracelular para o meio extracelular. O estudo demonstrou que o Triton X-100 atuou simultaneamente promovendo a permeabilização das membranas celulares e fornecendo micelas capazes de incorporar os corantes liberados, aumentando sua estabilidade e permanência em solução. Ademais, verificou-se que o aumento da concentração de Triton X-100 elevou significativamente a eficiência de extração até que fosse atingido um limite de saturação do sistema micelar. Dessa forma, a aplicação de Triton X-100, poderia ser utilizado futuramente como alternativa mais viável para extração, mediante o fato da dificuldade da extração, evidenciada no projeto realizado, ser ocasionada também pela pouca produção dos corantes pela cepa selvagem.

Diante disso, a avaliação do uso de surfactantes na extração da violaceína mostra-se uma abordagem interessante para investigar alternativas capazes de aumentar a eficiência de recuperação do corante em comparação aos métodos previamente utilizados. A associação de diferentes estratégias de extração, combinando agentes de permeabilização celular e sistemas de solubilização, pode representar uma alternativa para otimizar a liberação e estabilização da violaceína em solução. Dessa forma, a comparação entre o uso de surfactantes isolados ou associados a técnicas já empregadas, como a extração com etanol 50% e sonificação, permitiria avaliar o potencial dessas abordagens para um processo mais eficiente na recuperação do corante.

Complementarmente, a utilização de surfactantes como agentes extrativos não limita as etapas posteriores de purificação, uma vez que estratégias de separação entre o corante e o tensoativo podem ser empregadas. Conforme demonstrado por Kholany *et al.* (2019), após a extração da violaceína utilizando Tween 20, a retroextração com solvente orgânico, acetato de etila, permite isolar a violaceína do tensoativo. Após a evaporação do solvente orgânico, o corante obtido pode ser ressuspensionado em solvente adequado, permitindo o preparo da amostra para etapas posteriores de análise, como a CCD.

6.1.2. Uso de Cromatografia de Camada Delgada

Acredita-se que a metodologia de extração empregando solventes orgânicos possibilite a recuperação eficiente da violaceína e seus derivados a partir da biomassa microbiana. Devido à natureza hidrofóbica e intracelular destes metabólitos, ruptura

mecânica seguida de extração com solventes orgânicos vêm sendo amplamente empregadas devido à sua eficiência na extração e solubilização, resultando em extratos enriquecidos com a violaceína e seus derivados para posterior etapa de purificação (Nemer *et al*, 2023; Durán *et al*, 2025).

Após a etapa de extração descrita anteriormente, prevê-se a utilização de CCD em placas de sílica gel como técnica analítica e semi-preparativa para a separação dos metabólitos presentes no extrato bruto. A sílica gel constitui uma fase estacionária altamente polar capaz de interagir diferencialmente com os compostos a partir de suas polaridades relativas, sendo capaz, portanto, de separar metabólitos secundários com estruturas químicas similares (Durán *et al*, 2025). Devido à esta característica, durante a migração da fase móvel, os compostos menos polares tendem a apresentar maiores valores de fator de retenção (R_f), enquanto compostos mais polares interagem mais fortemente com a sílica gel, exibindo menor migração (Kowalska e Sherma, 2022).

A sílica gel apresenta diversas vantagens que fazem seu uso ser adequado para a separação da violaceína e seus derivados. A primeira delas é sua alta seletividade para Bis-indol, que é o caso da violaceína e seus derivados (Nemer *et al*, 2025). A violaceína e seu derivado deoxiviolaceína apresentam estrutura química muito similar, mas polaridades levemente diferentes devido a presença de um grupo hidroxila (Huanbutta *et al*, 2025). Devido à esta propriedade, a sílica gel pode ser capaz de separar de maneira eficiente a violaceína da deoxiviolaceína. Além desta vantagem, a sílica gel é inerte, altamente estável e resistente à mudanças químicas, não degradando a violaceína e solventes orgânicos, nem reagindo com estes compostos (Amara *et al.*, 2024).

Acredita-se que a utilização de sistemas efluentes com solventes orgânicos em diferentes proporções, como etanol e acetato de etila, auxilie na otimização e resolução cromatográfica, promovendo uma separação eficiente entre a violaceína e seus derivados. Seguindo a metodologia proposta por Hayward *et al.* (2021), após a corrida dos colorantes pela placa de sílica gel, as bandas correspondentes aos diferentes colorantes serão raspadas e analisadas individualmente, de forma a obter frações enriquecidas dos diferentes colorantes. Os colorantes serão ressuspensos em etanol e subsequentemente centrifugados, a fim de separar as partículas residuais de sílica do sobrenadantes contendo os colorantes eluídos. Posteriormente, os sobrenadantes obtidos serão submetidos à uma varredura espectrofotométrica UV-Vis, permitindo a

identificação preliminar dos compostos isolados com base em seus espectros de absorção (Durán *et al*, 2025).

Espera-se que a abordagem descrita acima de extração por solventes orgânicas seguida de separação por CCD em sílica gel contribua para a obtenção de frações enriquecidas em violaceína com maior grau de pureza, reduzindo a presença de metabólitos secundários e impurezas celulares.

6.2. Avaliação Colorimétrica da Recuperação do Extrato Pigmentado

Estima-se que a avaliação colorimétrica permita comparar a recuperação visual da coloração entre as diferentes frações obtidas durante o processo de extração, incluindo o extrato pigmentado, o branco do extrato, a biomassa pigmentada e a biomassa branca/controle. Para o extrato pigmentado, prevê-se observar maior intensidade cromática em relação ao branco do extrato, indicando que parte da coloração associada à biomassa foi transferida para o solvente extrator. Da mesma forma, estima-se que a biomassa pigmentada apresentará diferença de cor evidente em relação à biomassa branca/controle, reforçando que a coloração observada está associada à produção de colorantes por *C. violaceum*.

Para suposição os parâmetros do sistema CIELAB, como luminosidade (L^*), coordenadas cromáticas (a^*) e (b^*), croma (C^*), diferença total de cor (ΔE) e ângulo de tonalidade (h°), permitam diferenciar as amostras pigmentadas dos seus respectivos controles. Em especial, acredita-se que o extrato pigmentado e a biomassa pigmentada apresentem maior croma e valores de ângulo de tonalidade compatíveis com a região violeta. Aruldass *et al.* (2015) observaram que o pigmento violeta produzido por *C. violaceum* UTM5 apresentou valores de h° próximos de 288° no início do armazenamento, indicando uma tonalidade característica da região violeta. Assim, prevê-se que extratos com maior recuperação visual do colorante apresentem valores de h° próximos a essa faixa, enquanto os brancos e controles não pigmentados deverão apresentar baixo croma e ausência de tonalidade definida. Dessa forma, embora a análise colorimétrica não confirme quimicamente a presença de violaceína, acredita-se que ela permita comparar objetivamente a recuperação da cor entre as diferentes frações do *downstream*.

6.3. Caracterização Espectroscópica do Extrato Pigmentado por FTIR

Para a caracterização espectroscópica do extrato pigmentado por FTIR, espera-se que os espectros apresentem bandas associadas aos principais grupos funcionais presentes na biomassa bacteriana, nos componentes residuais do meio de cultivo e nos compostos extraídos. Caso a extração seja eficiente, o extrato deverá apresentar perfil espectral distinto do branco, do sobrenadante e do pellet residual, com possível intensificação de bandas relacionadas a compostos aromáticos e nitrogenados, como ligações N–H, O–H, C=O, C=C e C–N, confirmando indiretamente existem compostos químicos no extrato com estruturas parecidas com violaceína (Anahas *et al.*, 2022). Aruldass *et al.* (2015) identificaram, para a violaceína purificada, bandas em 3421 cm^{-1} associadas a N–H, 3237 cm^{-1} atribuída a O–H, 1689 e 1669 cm^{-1} relacionadas a carbonila amídica, 1621 cm^{-1} associada a C=C e 1279 cm^{-1} atribuída a C–N. Para a desoxiviolaceína, os autores observaram perfil semelhante, porém sem a banda referente ao grupo O–H, evidenciando diferenças estruturais entre os compostos. Assim, no presente estudo, cogita-se que o uso do FTIR apresente resultados qualitativos e comparativos para verificar se o extrato apresenta sinais compatíveis com compostos indólicos associados à violaceína e seus derivados. Entretanto, devido à possível presença de detritos celulares, proteínas, lipídios e outros metabólitos, essa análise não será considerada confirmatória de identidade molecular, mas sim complementar à avaliação do processo de extração.

7 CONCLUSÃO

Em suma, a cepa selvagem de *C. violaceum* apresentou potencial para a produção de colorantes de interesse biotecnológico em cultivo submerso, especialmente em meio “V”, no qual houve formação de biomassa com tonalidade arroxeada, crescimento celular expressivo após 23 horas, com DO_{734} de $1,853 \pm 0,082$, e consumo total da glicose inicial. A produção visual dos colorantes mostrou-se associada a maior densidade celular e pH próximo à neutralidade, enquanto o cultivo mais ácido, com $pH 4,62 \pm 0,02$, apresentou menor crescimento e ausência evidente da produção de colorante. A suplementação com triptona a 5 g/L favoreceu o crescimento celular, atingindo DO_{734} de $2,340 \pm 0,013$, mas não intensificou expressivamente a produção visual do colorante, mostrando que o meio “V” pode ser otimizado, visando diminuir a relação C/N. No aumento de escala, o cultivo em biorreator de tanque agitado, conduzido a 30 °C, pH 7,0, 700 rpm e 0,5 vvm, não apresentou produção evidente de colorante, indicando a necessidade de otimização do inóculo, assepsia, transferência de oxigênio e condições operacionais. A recuperação dos colorantes mostrou-se uma etapa crítica, uma vez que os solventes orgânicos avaliados apresentaram eficiência limitada, enquanto a sonicação assistida em etanol 50% (v/v) foi a estratégia mais promissora para remoção do colorante da biomassa. Contudo, a ausência de pico definido em 575–580 nm na varredura UV-Vis evidencia a necessidade de purificação, concentração e confirmação cromatográfica dos compostos produzidos, demonstrando que etapas futuras de otimização do cultivo, extração e caracterização são essenciais para o desenvolvimento de um processo fermentativo mais controlado, eficiente e sustentável para obtenção de violaceína e seus derivados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELLA, F. I. A. *et al.* Optimized bioproduction and stability of violacein from *Chromobacterium violaceum* with preclinical gastroprotective activity. *Bioresource Technology Reports*, v. 34, p. 102741, 2026. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2026.102741>.
- ABEDIN, S. M. M. *et al.* Isolation and characterization of *Chromobacterium violaceum* and antibacterial activities of its metabolite violacein. **Dhaka University Journal Of Biological Sciences**, [s.l.], v. 33, n. 1, p. 109-119, 2024. DOI: : <https://doi.org/10.3329/dujbs.v33i1.72487>.
- ABOAGYE, E. A. *et al.* Systematic design of solvent recovery pathways: integrating economics and environmental metrics. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 10, n. 33, p. 10879-10887, 2022. DOI: 10.1021/acssuschemeng.2c02497.
- ACHARYA, K. *et al.* Pigments from pathogenic bacteria: a comprehensive update on recent advances. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 40, n. 9, 20 jul. 2024. DOI: 10.1007/s11274-024-04076-x.
- AGUIRRE-RAMÍREZ, M. *et al.* Surfactants: physicochemical interactions with biological macromolecules. **Biotechnology Letters**, v. 43, n. 3, p. 523–535, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03054-1>.
- AHMAD, W. A. *et al.* Production and Characterization of Violacein by Locally Isolated *Chromobacterium violaceum* Grown in Agricultural Wastes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 5, p. 1220–1234, 2012. DOI: 10.1007/s12010-012-9553-7
- AHMED, A. *et al.* Recent Advances in Synthetic, Industrial and Biological Applications of Violacein and Its Heterologous Production. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 11, p. 1465–1480, 2021. DOI: 10.4014/jmb.2107.07045
- AL-AMIN *et al.* Fourier transform infrared spectroscopic technique for analysis of inorganic materials: A review. **Nanoscale Advances**, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1039/d5na00522a>.
- ALBERTS, Bruce *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2022. cap. 10.
- ALVES, J. A. *et al.* The MarR family regulator OsbR controls oxidative stress response, anaerobic nitrate respiration, and biofilm formation in *Chromobacterium violaceum*. **Bmc Microbiology**, [s.l.], v. 21, n. 1, p. 1-23, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-021-02369-x>.
- AMORIM, L. F. A.; GOMES, A. P.; GOUVEIA, I. C. Design and Preparation of a Biobased Colorimetric pH Indicator from Cellulose and Pigments of Bacterial Origin, for Potential Application as Smart Food Packaging. **Polymers**, v. 14, n. 18, p. 3869, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym14183869>.

ANAHAS, A. M. P. *et al.* Applications of Natural Violet Pigments from Halophilic *Chromobacterium violaceum* PDF23 for Textile Dyeing with Antimicrobial and Antioxidant Potentials. **Journal of Nanomaterials**, v. 2022, p. e3885396, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/3885396>.

ANOSOV, A. A. *et al.* The effects of SDS at subsolubilizing concentrations on the planar lipid bilayer permeability: Two kinds of current fluctuations. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 218, p. 10–15, 2019. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2018.11.005.

AQUINO NETO, F. R.; NUNES, D. S. S. Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: Interciência, 2003, 187 p.

ARULDASS, C. A. *et al.* Violet pigment production from liquid pineapple waste by *Chromobacterium violaceum* UTM5 and evaluation of its bioactivity. **RSC Advances**, v. 5, n. 64, p. 51524–51536, 2015. DOI: 10.1039/C5RA05765E.

BARICZ, A. *et al.* Investigating the potential use of an Antarctic variant of *Janthinobacterium lividum* for tackling antimicrobial resistance in a One Health approach. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33691-6>.

BARRETO, J. *et al.* Microbial Pigments: Major Groups and Industrial Applications. **Microorganisms**, v. 11, n. 12, p. 2920–2920, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11122920>.

BARROSO, K. C. M.. Caracterização do sistema de secreção do tipo II de *Chromobacterium violaceum*. 2022. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

BATISTA, B. B. *et al.* A quorum-sensing regulatory cascade for siderophore-mediated iron homeostasis in *Chromobacterium violaceum*. **mSystems**, v. 9, n. 4, p. e01397-23, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1128/msystems.01397-23>.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Bioquímica. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

BELTER, P. A.; CUSSLER, E. L.; HU, W.-S. **Bioseparations: Downstream Processing for Biotechnology**. New York: Wiley-Interscience, 1988.

BERTI, I. R. *et al.* Assessment of in vitro cytotoxicity of imidazole ionic liquids and inclusion in targeted drug carriers containing violacein. **Rsc Advances**, [s.l.], v. 10, n. 49, p. 29336–29346, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1039/D0RA05101B>.

BERTI, I. R. *et al.* Development of biocarrier for violacein controlled release in the treatment of cancer. **Reactive and Functional Polymers**, v. 136, p. 122–130, mar. 2019. DOI: 10.1016/j.reactfunctpolym.2019.01.001.

BERTI, I. R. *et al.* Potential biocide roles of violacein. **Frontiers In Nanotechnology**, [s.l.], v. 5, p. 1186386, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fnano.2023.1186386>.

BLÖSSEY, R. *et al.* Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 5, p. 689–696, 1998. DOI: 10.1023/A:1008825500934.

BRAGA, G. L. Cromatografia em papel. In: COLLINS, C. H. *et al.* Fundamentos de cromatografia. Campinas: UNICAMP, 2006. Cap. 2, p. 47–66.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução - RDC nº222, de 28 de março de 2018**. Regulamenta as Boas Práticas de Gerenciamento dos Resíduos de Serviços de Saúde e dá outras providências. Brasília, DF: Diário Oficial da União, ed. 61, seção 1, p. 76, 29 mar. 2018. Disponível em: <http://www.in.gov.br/consulta>. Acesso em: 14 jun. 2026.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. **Autoclavação como forma eficaz de inativação de micro-organismos em bolsas de sangue soropositivo**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2010. 106 p. (Série F. Comunicação e Educação em Saúde). ISBN 978-85-334-1766-3. Disponível na Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde. Disponível em: https://bvsmis.saude.gov.br/bvsmis/publicacoes/autoclavacao_inativacao_microorganismos.pdf. Acesso em: 14 jun. 2026.

BROVČ, E. V. *et al.* Rational design to biologics development: The polysorbates point of view. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 581, p. 119285, 2020. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2020.119285.

CAI, G. *et al.* The novel application of violacein produced by a marine *Duganella* strain as a promising agent for controlling *Heterosigma akashiwo* bloom: algicidal mechanism, fermentation optimization and agent formulation. **Journal Of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 466, p. 133548, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.133548>.

CAO, C. *et al.* Genome-wide identification for genes involved in sodium dodecyl sulfate toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, 2020. DOI: 10.1186/s12866-020-1721-2.

CARDOSO, Jackelyne Panta. Dinâmica de QS e produção de violaceína em cocultivos de *Chromobacterium subtsugae* e *Bacillus sp.* 2025. 97 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Biodiversidade) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2025. Disponível em: https://ri.ufs.br/bitstream/riufs/23396/2/JACKELYNE_PANTA_CARDOSO.pdf. Acesso em: 12 maio 2026.

CASTRO, D. *et al.* Proteomic analysis of *Chromobacterium violaceum* and its adaptability to stress. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, 2015. DOI: 10.1186/s12866-015-0606-2.

CAUZ, A. C. G. *et al.* Violacein Targets the Cytoplasmic Membrane of Bacteria. **ACS Infectious Diseases**, v. 5, n. 4, p. 539–549, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00245>.

CHATRAGADDA, R.; DUFOSSÉ, L. Ecological and biotechnological aspects of pigmented microbes: A way forward in development of food and pharmaceutical grade pigments. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 974, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030637>.

CHEMAT *et al.* Review of Alternative Solvents for Green Extraction of Food and Natural Products: Panorama, Principles, Applications and Prospects. **Molecules**, v. 24, n. 16, p. 3007. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24163007>.

CHEN, G. *et al.* Saturation effect and transmembrane conversion of Monascus pigment in nonionic surfactant aqueous solution. **AMB Express**, v. 7, n. 24, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0327-z>.

CHENG, K. *et al.* Improvement in Violacein Production by Utilizing Formic Acid to Induce QS in *Chromobacterium violaceum*. **Antioxidants**, [s.l.], v. 11, n. 5, p. 849, 26 abr. 2022. MDPI AG. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/antiox11050849>.

CHOI, S. Y. *et al.* Biotechnological Activities and Applications of Bacterial Pigments Violacein and Prodigiosin. **Journal of Biological Engineering**, v. 15, n. 1, 2021. DOI: 10.1186/s13036-021-00262-9.

CHOI, S. Y. *et al.* *Chromobacterium violaceum* delivers violacein, a hydrophobic antibiotic, to other microbes in membrane vesicles. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 705–713, 2020. DOI: 10.1111/1462-2920.14888.

CHOI, S. Y. *et al.* High-level production of violacein by the newly isolated *Duganella violaceinigra* str. NI28 and its impact on *Staphylococcus aureus*. Scientific Reports, v. 5, n. 1, 22 out. 2015b. DOI: 10.1038/srep15598.

CHOI, S. Y. *et al.* Violacein: properties and production of a versatile bacterial pigment. Biomed Research International, [s.l.], v. 2015, p. 1-8, 2015a. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/465056>.

COLLINS, C. H. Cem anos das palavras cromatografia e cromatograma. Química Nova, v. 29, n. 4, p. 889–890, 2006a.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: COLLINS, C. H. *et al.* Fundamentos de cromatografia. Campinas: UNICAMP, 2006b. Cap. 1, p. 18–45.

COMISSÃO INTERNA DE BIOSSEGURANÇA (CIBio) UNESP. **Orientações para manuseio, processamento e descarte de organismos geneticamente modificados (OGMs)**. Instituto de Biociências de Botucatu, 2015. Disponível em: <https://www1.ibb.unesp.br/Home/Instituicao/Comissoes733/ComissaoInternadeBiosseguranca-CIBio/manual-de-biosseguranca-2015.pdf>.

COSKUN, O. Separation techniques: Chromatography. **Northern Clinics of Istanbul**, v. 3, n. 2, p. 156–160, 2016. DOI: 10.14744/nci.2016.32757.

D'HONDT, E. *et al.* Cell disruption technologies. In: GONZALEZ-FERNANDEZ, C.; MUÑOZ, R. (ed.). Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts. **Woodhead Publishing**, p. 133-154, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00006-6>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081010235000066>. Acesso em: 12 jun. 2026.

DE CARVALHO, D. D. *et al.* Cytotoxic activity of violacein in human colon cancer cells. Toxicology in Vitro, v. 20, n. 8, p. 1514–1521, dez. 2006. DOI: 10.1016/j.tiv.2006.06.007.

DEGANI, A. L. G. *et al.* Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 21–25, 1998.

DEVESCOVI, G. *et al.* Negative Regulation of Violacein Biosynthesis in *Chromobacterium violaceum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00349>.

DI MARTINO, P. Extracellular polymeric substances, a key element in understanding biofilm phenotype. **AIMS Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 274–288, 2018. DOI: [10.3934/microbiol.2018.2.274](https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.2.274).

DIMITROVA, P. D.; DAMYANOVA, T.; PAUNOVA-KRASTEVA, T. *Chromobacterium violaceum*: A Model for Evaluating the Anti-QS Activities of Plant Substances. **Scientia Pharmaceutica**, v. 91, n. 3, p. 33, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/scipharm91030033>.

DOPIERAŁA, K. *et al.* Tuning lipid monolayer behavior with soluble surfactants: A pathway to enhanced ultradeformable drug carriers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 225, p. 115122, 2026. DOI: [10.1016/j.ejpb.2026.115122](https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2026.115122).

DORAN, P. M. Bioprocess engineering principles. 2. ed. Amsterdam.: Academic Press, Cop, 2013.

DURÁN, N. *et al.* Advances in *Chromobacterium violaceum* and properties of violacein-Its main secondary metabolite: a review. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 34, n. 5, p. 1030-1045, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.06.003>.

DURÁN, N. *et al.* New Advancements in Production, Purification, and Current Biological Activities of Violacein. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [s.l.], v. 36, n. 10, n.p., 2025. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20250096>.

DURÁN, N. *et al.* Patents on Violacein: A Compound with Great Diversity of Biological Activities and Industrial Potential. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 102–111,. 2021. DOI: [10.2174/2213476X07666201221111655](https://doi.org/10.2174/2213476X07666201221111655).

DURÁN, N. *et al.* Violacein: properties and biological activities. **Biotechnology Advances**, v. 40, p. 107–121, 2007. DOI: [10.1042/BA20070115](https://doi.org/10.1042/BA20070115).

DURÁN, N.; MENCK, C. F. M. *Chromobacterium violaceum*: A Review of Pharmacological and Industrial Perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 201–222, 2001. DOI: [10.1080/20014091096747](https://doi.org/10.1080/20014091096747)..

ETTRE, L. S. Chromatography: the separation technique of the 20th century. *Chromatographia*, v. 51, n. 1/2, p.7–17, 2000.

FACHINELLI, Natália Pezzi. Clonagem e expressão de provável serino protease extracelular de *Chromobacterium violaceum* em *Escherichia coli*. 2006. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

FAUST, B. Modern chemical techniques: an essential reference for students and teachers. **Royal Society of Chemistry**, 1997. Cap. 5, p.116–159.

FORGACS, E.; CSERHATI, T. Thin-Layer Chromatography Of Natural Pigments: New Advances. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 25, n. 10-11, p. 1521–1541, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1081/JLC-120005702>.

FÜLLER, J. J. *et al.* Biosynthesis of violacein, structure and function of L-tryptophan oxidase VioA from *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 38, p. 20068–20084, 2016. DOI: [10.1074/jbc.M116.741454](https://doi.org/10.1074/jbc.M116.741454).

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 2, p. 153–176, 2009. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2008.10.001](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.001).

GAWALE, D. R.; PATIL, M. R.; PATIL, R. H. Bacterial pigments: Diversity of pigment-producing microorganisms, biotechnological production and their applications in food. **Food Wellness**, p. 100055, 2026. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodw.2026.100055>.

GHARAT, K.; SINGHAL, R. S. A strategic media engineering and fed-batch approach enhances violacein production by *Chromobacterium violaceum* MTCC2656. **Systems Microbiology and Biomanufacturing**, v. 4, n. 3, p. 1106–1120, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s43393-023-00230-y>.

GOHIL, N. *et al.* Enhanced production of violacein by *Chromobacterium violaceum* using agro-industrial waste soybean meal. **Journal Of Applied Microbiology**, [s.l.], v. 132, n. 2, p. 1121-1133, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jam.15277>.

GÖRKE, B.; STÜLKE, J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 613-624, 2008.

GUPTA, R. *et al.* Discerning perturbed assembly of lipids in a model membrane in presence of violacein. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Biomembranes**, [s.l.], v. 1863, n. 9, p. 183647, 2021. DOI: [10.1016/j.bbamem.2021.183647](https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2021.183647).

GURTOVENKO, A. A.; ANWAR, J. Modulation of the structure and properties of cell membranes: molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 35, p. 10453-10460, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp073113e>.

GWON, Da-Ae *et al.* Biosensor-Assisted Adaptive Laboratory Evolution for Violacein Production. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 22, n. 12, p. 6594, 19 jun. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22126594>.

HARRISON, R. G. *et al.* Bioseparations science and engineering. New York, Ny: Oxford University Press, 2015.

HAYNES, W. M. (ed.). CRC handbook of chemistry and physics. 105. ed. Boca Raton: CRC Press, 2024.

HAYWARD, John; MADER, Lavleen; TRANT, John. Giving preparative thin layer chromatography some tender loving care. ChemRxiv, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.26434/chemrxiv-2021-6ddp9>. Acesso em: 21 jul. 2026.

HE, R. *et al.* One-step biological upcycling of chitin wastes into violacein by engineered *Chromobacterium violaceum*. **ACS Synthetic Biology**, v. 14, n. 12, p. 4733–4743, 2025. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acssynbio.5c00472>.

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

HUANBUTTA, K. *et al.* Violacein: a natural antibacterial agent empowered by film-forming sprays for topical applications. **Bmc Complementary Medicine And Therapies**, [s.l.], v. 26, n. 1, p. 1–12, 2025. DOI: 10.1186/s12906-025-05191-4.

HUANG, C. *et al.* Study on extraction and characterization of new antibiotics violacein from engineered *Escherichia coli* VioABCDE-SD. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 70, n. 5, p. 1582–1596, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/bab.2454>.

HUANG, T. *et al.* Tryptophan-Derived Microbial Alkaloids. **Comprehensive Natural Products III**, v. 2, p. 393–445, 2020. DOI: 10.1016/b978-0-12-409547-2.14734-1

JEFFREY, S. W. Profiles of photosynthetic pigments in the ocean using thin-layer chromatography. **Marine Biology**, v. 26, n. 2, p. 101–110, 1974. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00388879>.

KANEKAR, S.; DEVASYA, R. P. Growth-phase specific regulation of cvil/R based QS associated virulence factors in *Chromobacterium violaceum* by linalool, a monoterpenoid. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 38, n. 2, p. 23, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-021-03208-x>.

KANELLI, M.; MANDALA, S.; KALIAFAS, A.; STEFANOPOULOS, I.; STAMATIS, H. Microbial production of violacein and process optimization for dyeing polyamide fabrics with acquired antimicrobial properties. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 1495, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01495.

KERWIN, B. A. Polysorbates 20 and 80 Used in the Formulation of Protein Biotherapeutics: Structure and Degradation Pathways. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 97, n. 8, p. 2924–2935, 2008. DOI: 10.1002/jps.21190.

KHOLANY, M. *et al.* Extraction and purification of violacein from *Yarrowia lipolytica* cells using aqueous solutions of surfactants. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 95, n. 4, p. 1126–1134, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.6297>.

KILIKIAN, Beatriz Vahan; PESSOA JÚNIOR, Adalberto (coord.). *Purificação de produtos biotecnológicos: operações e processos com aplicação industrial*. 2. ed. rev. e ampl. São Paulo: Blucher, 2020.

KHOR, B. H. *et al.* *Chromobacterium violaceum* for rapid measurement of biochemical oxygen demand. **Jurnal Teknologi**, v. 69, n. 1, p. 9–15, 2014. Disponível em: <https://www.jurnalteknologi.utm.my>. Acesso em: 29 jun. 2026.

KOTHARI, V.; SHARMA, S.; PADIA, D. Recent research advances on *Chromobacterium violaceum*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 8, p. 744-752, ago. 2017. DOI: 10.1016/j.apjtm.2017.07.022.

KOWALSKA, Teresa; SAJEWICZ, Mieczysław. Thin-Layer Chromatography (TLC) in the Screening of Botanicals: Its Versatile Potential and Selected Applications. *Molecules*, v. 27, n. 19, p. 6607, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27196607>. Acesso em: 21 jul. 2026.

KUMAR, L. *et al.* Molecular Mechanisms and Applications of N-Acyl Homoserine Lactone-Mediated QS in Bacteria. **Molecules**, [s.l.], v. 27, n. 21, p. 7584, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules27217584>.

KUMAR, M. R. *Chromobacterium violaceum*: A rare bacterium isolated from a wound over the scalp. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 2, n. 1, p. 70–72, 2012. DOI: 10.4103/2229-516X.96814

LE MAIRE, M.; CHAMPEIL, P.; MØLLER, J. V. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1508, n. 1, p. 86–111, 2000. DOI: 10.1016/s0304-4157(00)00010-1.

LEE, M. E. *et al.* Expression-level optimization of a multi-enzyme pathway in the absence of a high-throughput assay. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 22, p. 10668–10678, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt809>.

LEE, S. Y.; COUTINHO, J. A.P.; WEINGARTEN, M. Sustainable recovery of microbial-derived natural pigments using deep eutectic solvents: advances, potential, and challenges. **Separation And Purification Technology**, [s.l.], v. 361, p. 131413, jul. 2025.

LEONARD, J.; LYGO, B.; PROCTER, G. Advanced practical organic chemistry. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2013.

LOPES, J. L. C. Cromatografia em camada delgada. In: COLLINS, C. H. *et al.* Fundamentos de cromatografia. Campinas: UNICAMP, 2006. Cap. 3, p. 67–86.

MAJOLO, C.; DE SOUZA, M. G.; HARADA, P. K. Manual de gerenciamento dos resíduos de laboratório da Embrapa Amazônia Ocidental. **Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental**, 2023. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1157596/1/Doc160.pdf>. acesso em: 14, jun. 2026.

MEDEIROS, T. D. M. Estudo da recuperação e purificação do limoneno-1,2-diol obtido por biotransformação fúngica do limoneno. 2018. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018. DOI: 10.47749/T/UNICAMP.2018.1101177.

MEMON, N.; JOSHI, P.; KAMDAR, J. H. Bacterial pigments for a circular bioeconomy through bioprocess innovation and industrial application. **Discover Applied Sciences**, 9 2026. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42452-026-08795-8>.

MENDES, A. S. *et al.* Factorial design and response surface optimization of crude violacein for *Chromobacterium violaceum* production. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 23, p. 1963–1969, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1013734315525>.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.

MILOSEVIC, E. *et al.* Antitumor activity of natural pigment violacein against osteosarcoma and rhabdomyosarcoma cell lines. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 149, n. 13, p. 10975–10987, 2023. DOI: [10.1007/s00432-023-04930-9](https://doi.org/10.1007/s00432-023-04930-9).

MION, S.; CARRIOT, N.; LOPEZ, J.; PLENER, L.; ORTALO-MAGNÉ, A.; CHABRIÈRE, E.; CULIOLI, G.; DAUDÉ, D. Disrupting QS alters social interactions in *Chromobacterium violaceum*. **Biofilms and Microbiomes**, v. 7, n. 1, p. 40, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00211-w>.

MOHAMMED, S. P. *et al.* Unlocking the antibiofilm and anti-virulence potential of *Pithecellobium dulce* against *Chromobacterium violaceum* CV12472. **World Academy Of Sciences Journal**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 1-7, 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.3892/wasj.2024.302>.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). PubChem Compound Summary for CID 3423265, Sodium Lauryl Sulfate. Bethesda: National Library of Medicine, 2026. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sodium-Lauryl-Sulfate>. Acesso em: 18 jun. 2026.

NEMER, G.; LOUKA, N.; RABILLER BLANDIN, P.; MAROUN, R. G.; VOROBIEV, E.; ROSSIGNOL, T.; NICAUD, J.-M.; GUÉNIN, E.; KOUBAA, M. Purification of natural pigments violacein and deoxyviolacein produced by fermentation using *Yarrowia lipolytica*. **Molecules**, v. 28, n. 11, p. 4292, 2023. DOI: [10.3390/molecules28114292](https://doi.org/10.3390/molecules28114292).

NOBLE, J. A. Further studies on the isolation, characterization and structure of violacein: Purple pigment of *Chromobacterium violaceum*. **American University Research Archive**, 2023. DOI: <https://doi.org/10.57912/23864070>.

O'BRIEN, C. R.; SYKES, J. E. Miscellaneous Bacterial Infections. Elsevier eBooks, p. 948–959, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-50934-3.00077-X>.

OLALEKAN, A. *et al.* Case Report on Pleural Empyema Thoracis and Urinary Tract Infection Caused by *Chromobacterium violaceum* from Lagos, Nigeria. **Case Reports in Medicine**, v. 2019, p. 1–5, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/5321484>.

ORLANDI, V. T. *et al.* Bacterial pigments: A colorful palette reservoir for biotechnological applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 3, p. 981–1001, 2 maio 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/bab.2170>

PACKARD, C. The Effects of Anaerobic Growth on Quorum Sensing, Cobalt Inhibition, and Biofilm Formation in *Chromobacterium violaceum*. Disponível em: <https://digital.library.txst.edu/items/7473662f-ec71-4b6f-bc1b-1d81ce409f29>. Acesso em: 7 maio. 2026.

PANT, N.; SHARMA, M. Urinary tract infection caused by *Chromobacterium violaceum*. **International Journal of General Medicine**, v. 8, p. 293, set. 2015. DOI: 10.2147/IJGM.S89886

PARAJULI, N. P. et al. Bacteremia caused by a rare pathogen – *Chromobacterium violaceum*: a case report from Nepal. **International Journal of General Medicine**, v. 9, p. 441–446, 5 dez. 2016. DOI: 10.2147/IJGM.S125183.

PARK, H. et al. Microbial synthesis of violacein pigment and its potential applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 41, n. 6, p. 879–901, 17 mar. 2021. DOI: 10.1080/07388551.2021.1892579.

PATHAK, L.; VYAS, P. The Science of Biocolour: An Overview. 2025. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/396049766_The_Science_of_Biocolour_An_Overview. Acesso em: 14 jun. 2026.

PATRA, M. et al. Under the influence of alcohol: the effect of ethanol and methanol on lipid bilayers. *Biophysical Journal*, v. 90, n. 4, p. 1121–1135, 2006. DOI: 10.1529/biophysj.105.062364.

PERINELLI, D. R. et al. Surfactant Self-Assembling and Critical Micelle Concentration: One Approach Fits All? *Langmuir*, v. 36, n. 21, p. 5745–5753, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00420>.

PERİZ, Ç. D. et al. Antibacterial and Anticancer Activities of Violacein Extracted Through Ultrasound-Assisted Extraction Method Ultrason Destekli Ekstraksiyon Yöntemi ile Elde Edilen Violasinin Antibakteriyel ve Antikanser Aktiviteleri. **Akademik Gıda**, v. 18, n. 3, p. 241–246, 2020. DOI: 10.24323/akademik-gida.

PIRKHARATI, Z.; PIRSA, S.; MOHEBINIA, R. Microorganism-based techniques for extracting food pigments: Insights and applications. *Food and Humanity*, v. 5, p. 100820, 20 set. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2025.100820>.

QI, C. et al. Advances in the microbial sustainable production of pigment indigoidine. **Dyes and Pigments**, v. 245, p. 113262, 2026. DOI: 10.1016/j.dyepig.2025.113262.

RAJENDRAN, P.; SOMASUNDARAM, Pr.; DUFOSSÉ, L. Microbial pigments: eco-friendly extraction techniques and some industrial applications. **Journal Of Molecular Structure**, [s.l.], v. 1290, p. 135958, out. 2023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.135958>.

RIESENBERG, D.; GUTHKE, R. High-cell-density cultivation of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 4, p. 422–430, 1999. DOI: 10.1007/s002530051412.

ROLLIN, S. et al. Development of sustainable downstream processing for nutritional oil production. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, 2023. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1227889.

ROSEN, M. J.; KUNJAPPU, J. T. Surfactants and interfacial phenomena. Hoboken, N.J.: Wiley, 2012. DOI:10.1002/9781118228920

ROWE, R. C. *et al.* Handbook of pharmaceutical excipients. 6. ed. London ; Chicago: Apha/Pharmaceutical Press, 2009.

RUIZ, B. *et al.* Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 146-167, 2010. DOI: 10.3109/10408410903489576.

SCARAMUSSA, S. A. DE L.; ISHIMOTO, C. K.; BICAS, J. L. Production, downstream, stability, bioactivities, and applications studies of violacein and related compounds. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 7, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-025-04434-3>.

SCHMIDELL, Willibaldo. Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2021. v. 2.

SHARMA, S. K. *et al.* Characterization and low-cost preservation of *Chromobacterium violaceum* strain TRFM-24 isolated from Tripura state, India. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 19, n. 1, 2021. DOI: 10.1186/s43141-021-00241-z.

SIGURDARSON, J. J.; SVANE, S.; KARRING, H. The molecular processes of urea hydrolysis in relation to ammonia emissions from agriculture. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 17, n. 2, p. 241–258, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11157-018-9466-1>

SILHAVY, T. J.; KAHNE, D.; WALKER, S. The bacterial cell envelope. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, v. 2, n. 5, 14 abr. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414>

SIQUEIRA, F. DOS S. *et al.* Molecular docking, quorum quenching effect, antibiofilm activity and safety profile of silver-complexed sulfonamide on *Pseudomonas aeruginosa*. **Biofouling**, v. 37, n. 5, p. 555–571, 28 maio 2021.

SKOOG, D. A.; F JAMES HOLLER; WEST, D. M. Fundamentos de química analítica. Barcelona: Reverté, 2000.

SIMÕES, S. I. *et al.* Permeabilisation and solubilisation of soybean phosphatidylcholine bilayer vesicles, as membrane models, by polysorbate, Tween 80. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 26, n. 3-4, p. 307–317, nov. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.07.002>

VÁZQUEZ-NION, D. *et al.* Reliability of color measurements for monitoring pigment content in a biofilm-forming cyanobacterium. International Biodeterioration & Biodegradation, v. 84, p. 220–226, out. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.05.037>

VENIL, C. K. *et al.* Isolation and characterization of flexirubin type pigment from *Chryseobacterium* sp. UTM-3T. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 3, n. 4, p. 103–107, out. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.02.006>

VENIL, C. K.; ZAKARIA, Z. A.; AHMAD, W. A. Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, v. 48, n. 7, p. 1065–1079, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.06.006>

VENKATRAMANAN, M.; NALINI, E. Regulation of virulence in *Chromobacterium violaceum* and strategies to combat it. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, 24 jan. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1303595>

WANG, H. *et al.* Biosynthesis and characterization of violacein, deoxyviolacein and oxyviolacein in heterologous host, and their antimicrobial activities. *Biochemical Engineering Journal*, v. 67, p. 148–155, ago. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.06.005>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Antimicrobial resistance. Geneva: WHO, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 14 jun. 2026.

WU, X. *et al.* Comparative genomics reveals insights into induction of violacein biosynthesis and adaptive evolution in *Janthinobacterium*. *Microbiology Spectrum*, v. 9, n. 3, p. 1–23, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01414-21>

XU, X.; CHU, X.; DU, B. *et al.* Functional characterization of a novel violacein biosynthesis operon from *Janthinobacterium* sp. B9-8. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 106, p. 2903–2916, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11929-8>

YAMA, T., SHRIVASTAVA, K., SINGH, S. S. Molecular identification and optimized production of violacein by *Chromobacterium vaccinii* Strain NFML 5214 isolated from Arunachal Pradesh, India. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, [s.l.], n.v., n.n. 5, n.p., 2026. <https://dx.doi.org/10.7324/JABB.2026.272361>.

YANG, D.; PARK, S. Y.; LEE, S. Y. Production of Rainbow Colorants by Metabolically Engineered *Escherichia coli*. *Advanced Science*, v. 8, n. 13, p. 2100743, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/advs.202100743>

YANG, Z. *et al.* Enhancement and analysis of Anthracene degradation by Tween 80 in LMS-HOBt. *Scientific reports*, v. 11, n. 1, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90609-5>

ZAINUDDIN, M. F. *et al.* Current Pretreatment/Cell Disruption and Extraction Methods Used to Improve Intracellular Lipid Recovery from Oleaginous Yeasts. *Microorganisms*, [s.l.], v. 9, n. 2, p. 251, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020251>

ZHANG, Qining; YANG, Jiahui; MOU, Lu; JIANG, Yujia; BARRIUSO, Jorge; GUO, Feng; XIN, Fengxue; JIANG, Min. A comprehensive review on violacein production by microbial fermentation. *Biodesign Research*, [s.l.], v. 7, n. 3, p. 100043, 2025. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bidere.2025.100043>.

ZHAO, F.; WANG, Z.; HUANG, H. Physical Cell Disruption Technologies for Intracellular Compound Extraction from Microorganisms. *Processes*, [s.l.], v. 12, n. 10, p. 2059, 24 set. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr12102059>

ZHOU, L.; ZHANG, Y.; GE, Y.; ZHU, X.; PAN, J. Regulatory mechanisms and promising applications of QS-inhibiting agents in control of bacterial biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 589640, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.589640>.