

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 02/09/2021.



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



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

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

Olímpia Paschoal Martins

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Lucas Primo

COORIENTADORA: Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso

ARARAQUARA - SP

2019

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

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

Olímpia Paschoal Martins

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Lucas Primo

COORIENTADORA: Profa. Dra. Carmen Lúcia Cardoso

ARARAQUARA - SP

2019

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

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

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

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

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

CAPES: 33004030170P0
Esta ficha não pode ser modificada

Dedicatória

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

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

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

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

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Epígrafe

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

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

¹³C – Carbono 13

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CNNPA – Comissão Nacional de Normas Padrões para Alimentos

COSY - *CORrelation SpectroscopY*

DMSO – Dimetil-sulfóxido

DSMO-*d*₆ – Dimetil-sulfóxido deuterado

EtOH – Etanol

ESI – Ionização por ElectroSpray

¹⁹F – Flúor 19

FCF – Verde Rápido

FDA – *Food and Drug Administration*

¹H - Hidrogênio

HMBC - *Heteronuclear MultipleBond Coherence*

HPLC – *High Performance Liquid Cromatography*

HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

JECFA - Join FAO/WHO Expert Committtee on Food Additives

LC – Cromatografia Líquida

m/z – razão massa/carga

mL - mililitro

mm - milímetro

MeOH – Metanol

MS – *Mass Spectroscopy*

nm - nanômetro

³¹P – Fósforo 31

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SPE - *Solid Phase Extraction*

UV-Vis – Ultravioleta-Visível

µg – micrograma

SUMÁRIO

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

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

6. CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PHAM, L. H., Vater, J., Rotard, W. e Mügge, C. Identification of secondary metabolites from *Streptomyces violaceoruber* TŮ22 by means of on-flow LC-NMR and LC-DAD-MS. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, p. 710-723, 2005.

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

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

- PONTES, F.B.D.; PEREIRA, J. F. B.; NETO, A.B. **Desenvolvimento do Processo de Produção, Isolamento e Purificação de Pigmentos produzidos por *Streptomyces carpaticus***. XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica UFSCar – São Paulo 16 a 19/07, 2017.
- ROCHA, F. R. P; TEIXEIRA, L; S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, p. 807-812, 2004.
- RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Natural food pigments and colorants. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 20-26. 2016.
- SARON, C.; FELISBERT, M. I. Ação de colorantes na degradação e estabilidade de polímeros. **Química nova**, v. 29, p. 124-126, 2006.
- SHIOZER, A. L., BARATA, L. E. S. Estabilidade de Corantes e Pigmentos de Origem Vegetal, **Revista Fito**, v. 3, p. 6-24, 2007.
- SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Composto Orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2006. 530p.
- SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 9. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015. 950 p.
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 1055 p.
- SOTOMAYOR, M. D. P. T. et al. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. **Química Nova**, v. 31, p. 1755-1774, 2008.
- SPADARO, J. T.; GOLD, M. H.; RENGANATHAN, V.; **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2397-401, 1992.
- STUART, B. H., **Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications**. 1 ed Wiley-Blackwel. 2004. 244 p.
- VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, p. 2429-2436, 2009.

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

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

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

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