

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE – CCTS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PLANEJAMENTO E USO DOS
RECURSOS RENOVÁVEIS

Juliana Cristina Ramos de Oliveira

Avaliação da produção de pigmentos por microrganismos isolados de painéis
fotovoltaicos: otimização do processo, influência da radiação UV e potenciais
propriedades biotecnológicas

Sorocaba

2026

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA PARA A SUSTENTABILIDADE – CCTS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PLANEJAMENTO E USO DOS
RECURSOS RENOVÁVEIS

Juliana Cristina Ramos de Oliveira

Avaliação da produção de pigmentos por microrganismos isolados de painéis
fotovoltaicos: otimização do processo, influência da radiação UV e potenciais
propriedades biotecnológicas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Planejamento e Uso de Recursos Renováveis para obtenção do título de Doutora em Planejamento e Uso de Recursos Renováveis da Universidade Federal de São Carlos. Área de concentração: Produtos Sustentáveis.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Iolanda Cristina Silveira Duarte

Coorientação: Prof^ª. Dr^ª. Tayane de Cássia Dias Mendes-Silva

Financiamento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Sorocaba

2026

Oliveira, Juliana Cristina Ramos de

Avaliação da produção de pigmentos por microrganismos isolados de painéis fotovoltaicos: otimização do processo, influência da radiação UV e potenciais propriedades biotecnológicas / Juliana Cristina Ramos de Oliveira -- 2026.
147f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba
Orientador (a): Iolanda Cristina Silveira Duarte
Banca Examinadora: Rosileide Fontanele da Silva
Andrade, Silvia Pierre Irazusta, Clovis Wesley Oliveira de Souza, Cleoni dos Santos Carvalho
Bibliografia

1. Atividade biológica. 2. Circularidade. 3. Substrato alternativo. I. Oliveira, Juliana Cristina Ramos de. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano -
CRB/8 6979

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do(a) candidato(a) Juliana Cristina Ramos de Oliveira, realizada em 03/03/2026.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a). Rosileide Fontanele da Silva Andrade (UNICAP)

Prof(a). Dr(a). Silvia Pierre Irazusta (FATEC)

Prof(a). Dr(a). Clovis Wesley Oliveira de Souza (UFSCar)

Prof(a). Dr(a). Cleoni dos Santos Carvalho (UFSCar)

Prof(a). Dr(a). Iolanda Cristina Silveira Duarte (UFSCar)

AGRADECIMENTO

A todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho, deixo meus sinceros agradecimentos, em especial:

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos a mim concedida, permitindo assim, a realização desta pesquisa.

Ao programa de pós-graduação em Planejamento e Uso de Recursos Renováveis (PPGPUR), junto à Universidade Estadual de São Carlos (UFSCar).

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Iolanda Cristina Silveira Duarte, por todo o auxílio, suporte, paciência e, sobretudo, por acreditar em meu potencial ao longo desta trajetória.

À minha coorientadora, Prof.^a Dr.^a Tayane de Cássia Mendes Silva, pela disponibilidade e pelo apoio sempre que necessitei.

Às equipes de laboratórios parceiros que colaboraram para o desenvolvimento desta pesquisa, dentre eles, o Instituto de Química da Universidade de São Paulo, o Laboratório de Avaliação da Bioatividade e Toxicologia de Nanomateriais da Universidade de Sorocaba, o Laboratório de Produção e Purificação de Bioprodutos da Universidade Estadual de São Paulo e a empresa Chemyunion.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA), por toda contribuição, companheirismo e companhia sempre que necessário, me ajudando a concluir essa jornada.

Aos meus pais, por me ensinarem o valor do estudo e do conhecimento.

À minha família, Rodrigo, Leonardo e Joaquim por compreenderem e apoiarem, com paciência e respeito, o caminho por mim escolhido.

À Deus, por ter me concedido a oportunidade dessa conquista.

“Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre.”

Albert Einstein

RESUMO

Pigmentos microbianos representam alternativas sustentáveis aos corantes sintéticos. O emprego de resíduos agroindustriais como substratos surge como estratégia promissora para reduzir custos e ampliar a viabilidade da biossíntese desses metabólitos. Microrganismos adaptados a ambientes extremos frequentemente sintetizam pigmentos como mecanismo de proteção, o que os torna alvos relevantes para exploração biotecnológica. Neste contexto, foram investigadas as condições de cultivo que favorecem a produção de pigmentos pelas cepas *Rhodotorula mucilaginosa* PSR 34, *Arthrobacter koreensis* PSR 37 e *Kocuria sp.* PSR 51, previamente isoladas de painéis fotovoltaicos da cidade de Sorocaba/SP, ambiente artificial extremo, de origem antropogênica. Meios de cultura sintéticos, melaço de soja como substrato alternativo, tempo e temperatura de incubação foram avaliados. Adicionalmente, foi determinada a influência da radiação UV-A, UV-B e UV-C na produção de pigmentos. O melaço de soja não demonstrou ser um substrato com atributos superiores ao uso de meios sintéticos. A determinação das condições ideais evidenciou diferenças no perfil de produção de pigmentos entre as cepas analisadas. PSR 37 apresentou maior produção a 15 °C, com 72 horas de incubação, atingindo concentração média de 958,66 µg/L. Para PSR 34, a condição mais favorável foi 15 °C associada a 168 horas de incubação, resultando em 1,66 mg/L de pigmento. Em contraste, PSR 51 apresentou maior produção a 30 °C após 72 horas, com concentração média de 610 µg/L. A radiação UV, nas doses avaliadas, não promoveu aumento da produção de pigmentos. As análises espectrais e cromatográficas do pigmento de PSR 34 indicaram a presença de β-caroteno e toruleno. Esses pigmentos demonstraram atividade antimicrobiana superior à 90% frente às cepas testadas, na concentração de 7,5 mg/L. De forma semelhante, os pigmentos extraídos de PSR 37 e PSR 51 também demonstraram elevada atividade antimicrobiana nas concentrações de 4,5 e 7,5 mg/L, respectivamente. Todos os extratos pigmentares apresentaram fator fotoprotetivo superior a 30 FPS. A atividade antioxidante dos pigmentos se mostrou dependente do tempo de exposição, apresentando capacidade de sequestro do radical DPPH após 60 minutos de 56,07% para PSR 34, 76,9% para PSR 37 e 89,67% para PSR 51. Além disso, os extratos pigmentares exibiram baixa citotoxicidade em células 3T3 e HaCaT, mantendo viabilidade celular superior a 50%. Esses resultados evidenciam o promissor potencial biotecnológico desses pigmentos, reforçando sua relevância para futuras aplicações em diferentes setores industriais.

Palavras-chave: atividade biológica; circularidade; estresse celular; substrato alternativo.

ABSTRACT

Microbial pigments represent sustainable alternatives to synthetic dyes. The use of agro-industrial waste as substrates emerges as a promising strategy to reduce costs and increase the viability of the biosynthesis of these metabolites. Microorganisms adapted to extreme environments frequently synthesize pigments as a protective mechanism, making them relevant targets for biotechnological exploration. In this context, the cultivation conditions that favor pigment production by the strains *Rhodotorula mucilaginosa* PSR 34, *Arthrobacter koreensis* PSR 37, and *Kocuria sp.* PSR 51, previously isolated from photovoltaic panels in the city of Sorocaba/SP, an extreme artificial environment of anthropogenic origin, were investigated. Synthetic culture media, soybean molasses as an alternative substrate, incubation time, and temperature were evaluated. Additionally, the influence of UV-A, UV-B, and UV-C radiation on pigment production was determined. Soybean molasses did not prove to be a substrate with superior attributes compared to the use of synthetic media. Determining the ideal conditions revealed differences in the pigment production profile among the analyzed strains. PSR 37 showed the highest production at 15 °C, with 72 hours of incubation, reaching an average concentration of 958.66 µg/L. For PSR 34, the most favorable condition was 15 °C associated with 168 hours of incubation, resulting in 1.66 mg/L of pigment. In contrast, PSR 51 showed the highest production at 30 °C after 72 hours, with an average concentration of 610 µg/L. UV radiation, at the evaluated doses, did not promote an increase in pigment production. Spectral and chromatographic analyses of the PSR 34 pigment indicated the presence of β-carotene and torulene. These pigments demonstrated antimicrobial activity greater than 90% against the tested strains, at a concentration of 7.5 mg/L. Similarly, pigments extracted from PSR 37 and PSR 51 also demonstrated high antimicrobial activity at concentrations of 4.5 and 7.5 mg/L, respectively. All pigment extracts showed a photoprotective factor greater than 30 SPF. The antioxidant activity of the pigments was dependent on exposure time, showing DPPH radical scavenging capacity after 60 minutes of 56.07% for PSR 34, 76.9% for PSR 37, and 89.67% for PSR 51. Furthermore, the pigment extracts exhibited low cytotoxicity in 3T3 and HaCaT cells, maintaining cell viability greater than 50%. These results highlight the promising biotechnological potential of these pigments, reinforcing their relevance for future applications in different industrial sectors.

Keywords: biological activity; circularity; cell stress; alternative substrate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Estrutura química dos carotenoides. (A) carotenos – α -caroteno, β -caroteno, licopeno, fitoeno, δ -caroteno, respectivamente; (B) carotenoides oxigenados (xantofilas) - luteína, astaxantina, criptoxantina, zeaxantina e cataxantina, respectivamente.....	19
Figura 2.2 – Estrutura química da piocianina.....	21
Figura 2.3 – Estrutura química dos principais pigmentos produzidos por <i>Monascus</i> . Pigmentos vermelhos: (a) Rubropunctamina e (b) Monascorubramina; Pigmentos laranja: (c) Rubropunctina e (d) Monascorubrina; Pigmentos amarelos: (e) Ankaflavina e (f) Monascina.....	22
Figura 2.4 – Estrutura química da prodigiosina.....	23
Figura 2.5 – Parte da estrutura química dos tipos mais comuns de melaninas; eumelanina (A) e feomelanina (B).....	24
Figura 3.1 – Monitoramento do crescimento microbiano, consumo de açúcar nos meios <i>Yeast Peptone Dextrose</i> e Kitamoto (A) e produção de carotenoides (B) durante 168 h de cultivo.....	68
Figura 3.2 – Biomassa seca e produção de carotenoide de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> PSR 34 cultivada em meio <i>Yeast Peptone Dextrose</i> . Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (teste de Tukey, $p > 0,05$).....	70
Figura 3.3 – Interação entre os meios de cultura <i>Yeast Peptone Dextrose</i> e melaço de soja e as temperaturas de cultivo na produção de biomassa (g/L) (A) e de carotenoides totais (mg/L) (B).....	71
Figura 3.4 – Curvas de contorno representando os efeitos do tipo de meio de cultivo (<i>Yeast Peptone Dextrose</i> e melaço de soja) e da temperatura sobre a produção de carotenoides (A), biomassa (B) e consumo de açúcares (C).....	73
Figura 3.5 – Espectro de absorção UV-vis de pigmento de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> PSR 34.....	75
Figura 3.6 – Perfis de eluição por cromatografia líquida de alta eficiência dos carotenoides extraídos de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> PSR 34.....	76
Figura 3.7 – Espectro de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier do pigmento extraído de <i>R. mucilaginosa</i> PSR 34.....	77
Figura 3.8 – Concentração de carotenoides (mg/L) de <i>R. mucilaginosa</i> PSR 34: selvagem e exposta à radiação UV-C e à radiação Ambiental. Médias com letras diferentes são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p > 0,05$).....	79

Figura 3.9 – Atividade antioxidante do pigmento de <i>R. mucilaginosa</i> PSR 34 ao longo do tempo 0, 30 e 60 minutos.....	82
Figura 3.10 – Viabilidade celular de linhagens 3T3 e HaCaT tratadas com pigmento microbiano, determinada pelo ensaio de redução do tetrazólio (MTT).....	83
Figura 4.1 – Monitoramento do crescimento microbiano e consumo de açúcar nos meios <i>Brain Heart Infusion</i> e Caldo Nutriente ao longo de 168 h de cultivo (A), produção específica de carotenoides em <i>Brain Heart Infusion</i> e Caldo Nutriente (B) e produção de carotenoides totais em <i>Brain Heart Infusion</i> e Caldo Nutriente (C) da cepa de <i>A. koreensis</i> PSR 37.....	112
Figura 4.2 – Monitoramento do crescimento microbiano e consumo de açúcar nos meios <i>Brain Heart Infusion</i> e Caldo Nutriente (A), produção específica de carotenoides em <i>Brain Heart Infusion</i> e Caldo Nutriente (B) e produção de carotenoides totais em <i>Brain Heart Infusion</i> e Caldo Nutriente (C) da cepa de <i>Kocuria sp.</i> PSR 51.....	114
Figura 4.3 – Biomassa seca e produção de carotenoides totais por <i>Arthrobacter koreensis</i> PSR 37 em meio <i>Brain Heart Infusion</i> . Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (teste de Tukey com 95% de confiança).....	116
Figura 4.4 – Biomassa seca e produção de carotenoides totais por <i>Kocuria sp.</i> PSR 51 em meio <i>Brain Heart Infusion</i> . Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (teste de Tukey com 95% de confiança).....	117
Figura 4.5 – Interação entre os meios de cultura <i>Brain Heart Infusion</i> e melão de soja e as temperaturas utilizadas para o cultivo na produção de biomassa (g/L) e carotenoides totais (µg/L): Gráfico de interação para biomassa como variável resposta (A) e gráfico de interação para carotenoides totais como variável resposta (B) para <i>A. koreensis</i> PSR 37.....	118
Figura 4.6 – Interação entre os meios de cultura <i>Brain Heart Infusion</i> e melão de soja e as temperaturas utilizadas para o cultivo na produção de biomassa (g/L) e carotenoides totais (µg/L): Gráfico de interação para biomassa como variável resposta (A) e gráfico de interação para carotenoides totais como variável resposta (B) para <i>Kocuria sp.</i> PSR 51.....	119
Figura 4.7 – Gráfico de Contorno apresentando a relação entre as variáveis meio de cultivo, sintético <i>Brain Heart Infusion</i> (1) e melão de soja (2), e temperatura no cultivo de <i>A. koreensis</i> PSR 37. (A) produção de carotenoides totais; (B) produção de carotenoides específicos; (C) produção de biomassa e (D) consumo de açúcares.....	122

Figura 4.8 - Gráfico de Contorno apresentando a relação entre as variáveis meio sintético <i>Brain Heart Infusion</i> (1) e melaço de soja (2), e temperatura no cultivo de <i>Kocuria sp.</i> PSR 51. (A) produção de carotenoides específicos; (B) produção de carotenoides totais; (C) produção de biomassa e (D) consumo de açúcares.....	123
Figura 4.9 – Espectro UV-Vis dos pigmentos produzidos por <i>Arthrobacter koreensis</i> PSR 37 (A) e <i>Kocuria sp.</i> PSR 51 (B).....	126
Figura 4.10 – Espectro de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier do pigmento extraído de <i>Arthrobacter koreensis</i> PSR 37.....	128
Figura 4.11 – Espectro de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier do pigmento extraído de <i>Kocuria sp.</i> PSR 51.....	130
Figura 4.12 – Atividade antioxidante do pigmento de <i>A. koreensis</i> PSR 37 (A) e <i>Kocuria sp.</i> PSR 51 (B). Tempos 0, 30 e 60 min.....	136
Figura 4.13 – Percentual de viabilidade celular a partir do ensaio de redução do tetrazólio (MTT) em células 3T3 e HaCaT dos pigmentos produzidos por <i>Arthrobacter koreensis</i> (PSR 37) e <i>Kocuria sp.</i> PSR 51.....	137

LISTA DE TABELAS

TABELA 2.1 – Pigmentos microbianos produzidos por diferentes grupos de microrganismos e suas aplicações.....	17
TABELA 2.2 – Tipos de resíduos utilizados como meio de cultivo na produção de pigmentos microbianos.....	25
TABELA 2.3 – Exemplos de diferentes métodos de extração de pigmentos microbianos.....	33
TABELA 3.1 – Relação do efeito eritemogênico (EE) <i>versus</i> intensidade da radiação (I) para cada comprimento de onda.....	65
TABELA 3.2 – Biomassa (g/L) e carotenoides (mg/L) produzidos por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> PSR 34 após 168 h de cultivo.....	67
TABELA 3.3 – Comparação das bandas de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier no extrato de pigmentos de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> PSR 34 com padrão de β -caroteno.....	78
TABELA 3.4 – Atividade antimicrobiana (% de inibição) do extrato de pigmento de <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> PSR 34 determinada pelo método de microdiluição em placa.....	80
TABELA 4.1 – Relação entre o efeito eritemogênico (EE) e a intensidade (I) da radiação para cada comprimento de onda.....	109
TABELA 4.2 – Produção de biomassa, carotenoides específicos e carotenoides totais por <i>Arthrobacter koreensis</i> PSR 37 e <i>Kocuria sp.</i> PSR 51 em meios de cultura sintéticos.....	112
TABELA 4.3 – Características espectrais de padrões de carotenoides solubilizados em metanol: água deionizada (80:20, v/v).....	127
TABELA 4.4 – Produção de carotenoides e biomassa de <i>Arthrobacter koreensis</i> PSR 37 e <i>Kocuria sp.</i> PSR 51 sem exposição à radiação, exposição à radiação UV-C e à radiação ambiental (UV-A e UV-B).....	131
TABELA 4.5 – Atividade antimicrobiana dos extratos contendo pigmentos de <i>Arthrobacter koreensis</i> PSR 37 e <i>Kocuria sp.</i> PSR 51 avaliado com teste de microdiluição em placa.....	143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS – *Aqueous biphasic system*
ANOVA – *Analysis of variance*
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC – *American Type Culture Collection*
ATR – *Attenuated total reflectance*
BHI – *Brain Heart Infusion*
CE – *Cavitation-based extraction*
CIM – Concentração inibitória mínima
CN – Caldo nutriente
CO₂ – Dióxido de carbono
VOC – *Volatile organic compounds*
DMSO – Dimetilsulfóxido
DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DNS – Ácido dinitrosalicílico
EE – Efeito eritemogênico
FCF – For Coloring Food
FPS – Fator de Proteção Solar
FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*
HCl – Ácido clorídrico
HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*
HPPD – Hidroxifenilpiruvato dioxigenase
IL – *Ionic liquids*
IQ-USP – Instituto de Química da Universidade de São Paulo
KH₂PO₄ – Fosfato monobásico de potássio
KOH – Hidróxido de potássio
LPB – Laboratório de processos biológicos
LMA – Laboratório de Microbiologia Aplicada
LSF – Fermentação em estado líquido
MB – Mueller Hinton
MgSO₄ – Sulfato de magnésio
MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NaCl – Cloreto de sódio

NaNO₃ – Nitrato de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

OD – *Optical Density*

PEF – *Pulsed Electric Fields*

RDC – Resoluções da Diretoria Colegiada

SS – Simulador solar

SSF – Fermentação em estado sólido

TBAOH – Hidróxido de tetrabutylamônio

TSA – *Tryptic Soy Agar*

UFSCar – Universidade Federal de São Carlos

USP – Universidade de São Paulo

UV – Ultravioleta

YPD – *Yeast Extract Peptone Dextrose*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	09
1.1 OBJETIVOS.....	12
2 CAPÍTULO 1.....	13
2.1 INTRODUÇÃO.....	15
2.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE PIGMENTOS.....	16
2.3 APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS UTILIZADOS NA SÍNTESE DE PIGMENTOS MICROBIANOS.....	24
2.4 ESTRATÉGIAS DE EXTRAÇÃO PARA PIGMENTOS MICROBIANOS.....	32
2.5 VIABILIDADE ECONÔMICA, APLICAÇÕES E POTENCIAL DE MERCADO DOS PIGMENTOS MICROBIANOS.....	39
2.6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	41
REFERÊNCIAS.....	43
3 CAPÍTULO 2.....	55
3.1 INTRODUÇÃO.....	57
3.2 MÉTODOS.....	58
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
3.4 CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS.....	86
4 CAPÍTULO 3.....	98
4.1 INTRODUÇÃO.....	100
4.2 MÉTODOS.....	102
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	111
4.4 CONCLUSÕES.....	138
REFERÊNCIAS.....	140
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	144
5.1 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	144
REFERÊNCIAS.....	146

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com a substituição dos corantes sintéticos por corantes naturais é crescente devido aos seus efeitos toxicológicos. Corantes sintéticos podem apresentar efeitos negativos tanto à saúde humana quanto ao meio ambiente, são compostos não biodegradáveis e potencialmente cancerígenos. Devido à sua toxicidade, diversos países proibiram o consumo de vários corantes, como Azul FCF (For Coloring Food), Azul nº1 e nº 2 (Di Salvo et al., 2023). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece, através da Instrução Normativa N° 211, de 1° de março 2023, o limite máximo permitido de 50 mg/L ou mg/Kg desses corantes.

Os pigmentos naturais não possuem aplicação somente para o fornecimento de cor, mas também oferecem potenciais em diversas áreas como alimentícia, farmacêutica e cosmética (Di Salvo et al., 2023). Esses metabólitos possuem propriedades antioxidantes, antimicrobianas (Ibrahim et al., 2024), fotoprotetivas (Mendes-Silva et al., 2021) e anticancerígenas (Yu et al., 2022).

Existem duas fontes principais de pigmentos naturais, as plantas e os microrganismos (Di Salvo et al., 2023). As plantas têm sido estudadas há muito tempo por sua capacidade de sintetizar pigmentos carotenoides. Entretanto, os carotenoides microbianos apresentam vantagens devido às condições de cultivo, tais como obtenção de maior quantidade de biomassa em curtos períodos de tempo, ausência de restrições sazonais, cultivo rápido e fácil, ampla variedade de cores, não toxicidade, processo de extração mais fácil e produto final biodegradável com múltiplas aplicações, além de possibilidade de manipulação genética e seleção de linhagens (Ram et al., 2020; Rather et al., 2023).

Diferentes metabólitos secundários são produzidos por inúmeras espécies microbianas que representam diferentes classes de pigmentos, como carotenoides, bacterioclorofilas, fenazinas, quinomas, melaninas, favinas, monascinas, violaceína, prodigiosina e índigo (Rather et al., 2023). Em especial, os carotenoides são um grupo de pigmentos lipossolúveis com uma composição heterogênea, pertencentes à subfamília isoprenoide que podem ser produzidos por vários microrganismos, incluindo microalgas, cianobactérias, fungos, bactérias e arqueias (Di Salvo et al., 2023).

Caracterizados por uma gama de colorações que vai do vermelho ao amarelo, passando por um espectro de tons alaranjados (Ram et al., 2020), os carotenoides são classificados em dois grupos principais: carotenos, compostos exclusivamente de átomos de carbono e hidrogênio, (por exemplo, fitoeno, licopeno e β -caroteno) e carotenoides oxigenados, também

conhecidos como xantofilas, que possuem grupos funcionais de oxigênio como grupos hidroxila, epóxi e carboxila em suas moléculas, e inclui carotenóis (por exemplo, zeaxantina), carotenais (por exemplo, β -apo-8'-carotenal), carotenonas (por exemplo, cantaxantina) e ácidos carotenoides (por exemplo, ácido 4,4'-diaponeurosporenóico) (López et al., 2023; Mariutti; Mercadante, 2018).

Até o momento, o banco de dados de carotenoides fornece informações sobre 1.204 carotenoides naturais em 722 organismos de origem, sendo 324 carotenoides microbianos (<http://carotenoiddb.jp/index.html>). Isso demonstra uma alta diversidade estrutural desses pigmentos na natureza, sendo os microrganismos responsáveis por 27% dessa produção.

Para a saúde humana, os carotenoides funcionam como um potente antioxidante e evitam os efeitos prejudiciais do estresse oxidativo, que é o principal contribuinte para a patogênese de doenças crônicas. Estão sendo associados à prevenção do câncer, exercendo um amplo papel na proteção e na melhoria dos mecanismos de defesa e na inibição da proliferação celular, além de apresentarem capacidade de absorver luz azul, prejudicial à saúde ocular, protegendo assim a retina de danos fotográficos, entre outros benefícios (Ram et al., 2020).

Nos microrganismos, o acúmulo de carotenoides mediado pelo estresse pode ser utilizado como uma estratégia bem-sucedida para sintetizar carotenoides de interesse. Muitos organismos tendem a acumular carotenoides sob estresses por meio da regulação positiva da via dessa molécula como uma resposta à degradação evasiva (Ram et al., 2020). Sendo assim, microrganismos produzem pigmentos para se protegerem de condições adversas (Choksi; Vora; Shrivastava, 2020). Ambientes de radiação solar extrema, por exemplo, são ideais para isolar microrganismos que produzem carotenoides com funções fotoprotetoras e propriedades únicas, como alta fotoestabilidade e capacidade de absorção de luz, e maior resistência à radiação UV (Akulava et al., 2024; Paredes Contreras et al., 2025). Painéis fotovoltaicos podem apresentar uma configuração adequada de um modelo de ambiente que possui condições extremas de vida a esses microrganismos, os quais são capazes de sobreviver em ambientes inóspitos. Por meio da predição de genes realizado no trabalho de Moura et al. (2021), demonstrou-se que microrganismos de painel fotovoltaico apresentam genes de resistência à radiação e dessecação e de produção de pigmentos.

Apesar dos diversos benefícios relacionados à utilização de pigmentos microbianos, os processos de produção e extração ainda constituem desafios a serem superados. Dessa forma, a utilização de resíduos agroindustriais vem sendo avaliada como substrato na produção de metabólitos microbianos de interesse científico e biotecnológico como alternativa de baixo custo, onde a multiplicidade de resíduos resulta em um conteúdo heterogêneo de nutriente (Di

Salvo et al., 2023). A disponibilidade de nutrientes nessas matérias-primas oferece ambientes apropriados para o crescimento de microrganismos, sendo um meio rico para aumento da biomassa microbiana e produção de enzimas, o que faz com que, diversos resíduos agrícolas sejam utilizados em processos biotecnológicos, como a produção de compostos de valor agregado (Venil; Devi; Ahmad, 2020).

O aproveitamento de resíduos agroindustriais como substratos para produção de carotenoides, incluindo cascas de batata e cebola, casca de feijão mungo, vagens de ervilha (Sharma; Ghoshal, 2020), melaço de cana-de-açúcar e efluentes da mandioca (Machado et al., 2022) e resíduos de alcachofra (Terrones Rodríguez et al., 2023), configura uma estratégia promissora para valorização e destinação sustentável desses resíduos.

É neste contexto que, visando amenizar os problemas ambientais causados pelo uso de pigmentos sintéticos, destinação adequada aos resíduos produzidos no setor agroindustrial e o potencial uso biotecnológico de microrganismos advindos de ambientes extremos, este estudo parte das seguintes hipóteses:

Hipótese 1: o melaço de soja apresenta potencial como substrato alternativo para a produção de pigmentos microbianos;

Hipótese 2: a exposição à radiação ultravioleta promove o aumento da produção de pigmentos em microrganismos isolados de ambientes extremos; e

Hipótese 3: os pigmentos produzidos apresentam propriedades biotecnológicas relevantes, como atividades antimicrobiana, antioxidante, fotoprotetiva e citotóxica, evidenciando seu potencial de aplicação em diferentes setores industriais.

A seleção das espécies investigadas neste estudo, bem como a escolha do resíduo agroindustrial melaço de soja é motivada pela escassez de produção científica acerca da síntese de pigmentos por esses microrganismos em conjunto com este substrato, ainda que já tenham sido investigadas suas potenciais produções. A busca por artigos de pesquisa publicados nas bases de dados Web of Science, Scopus e Science Direct a partir de junho de 2022 não evidenciou trabalhos de pesquisa similares publicados utilizando o melaço de soja como substrato na produção de pigmentos pelas cepas de *Rhodotorula mucilaginosa*, *Arthobacter koreensis* e *Kocuria sp.* utilizadas neste estudo, bem como a pesquisa de cepas advindas do isolamento de painéis fotovoltaicos. Esses resultados evidenciam o ineditismo e o potencial de inovação desta proposta.

Sendo assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar a produção de pigmentos por microrganismos isolados e identificados de painéis fotovoltaicos. A radiação ultravioleta foi utilizada como estressante celular para avaliar o possível aumento da produção de carotenoide

e o melaço de soja foi utilizado como substrato alternativo para o cultivo dos microrganismos. Além disso, possíveis propriedades biotecnológicas como atividade antimicrobiana, fotoprotetiva, antioxidante e também citotóxica foram avaliadas.

Este trabalho está dividido em três capítulos, sendo o primeiro o Capítulo 1 “Produção de Pigmentos Microbianos: Avanços, Desafios e Perspectivas no Uso de Resíduos Agroindustriais e Métodos de Extração”, Capítulo 2 “Produção de Pigmentos Carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* PSR 34 em Substrato Agroindustrial: Influência da Radiação UV e Potencial Biotecnológico” e o Capítulo 3 “Determinação das condições de cultivo para produção de pigmentos por *Arthrobacter koreensis* PSR 37 e *Kocuria sp.* PSR 51 em melaço de soja como substrato: influência da radiação ultravioleta e potencial biotecnológico”.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de pigmentos por microrganismos isolados de painéis fotovoltaicos, determinando as condições ideais de cultivo, o efeito da radiação ultravioleta como agente estressante e o potencial biotecnológico dos pigmentos produzidos.

1.1.2 Objetivos específicos

- 1) Caracterizar o crescimento microbiano e a produção de pigmentos das cepas *Rhodotorula mucilaginosa* PSR 34, *Arthrobacter koreensis* PSR 37 e *Kocuria sp.* PSR 51 em meios sintéticos.
- 2) Determinar as condições ideais de cultivo, incluindo temperatura e tempo de incubação, para otimizar a produção de pigmentos pelas três cepas microbianas.
- 3) Avaliar o melaço de soja como substrato alternativo para a produção de pigmentos pelas três cepas microbianas, comparando seu desempenho aos meios sintéticos.
- 4) Determinar o efeito da radiação UV-A, UV-B e UV-C na produção de pigmentos, avaliando seu papel como agente indutor de estresse celular.
- 5) Identificar parcial ou totalmente os pigmentos produzidos utilizando técnicas espectroscópicas e cromatográficas (UV-Vis, FTIR e HPLC).
- 6) Avaliar as propriedades biotecnológicas dos pigmentos obtidos, incluindo atividade antimicrobiana, antioxidante, fotoprotetiva e citotoxicidade *in vitro*.

2 CAPÍTULO 1

Produção de Pigmentos Microbianos: Avanços, Desafios e Perspectivas no Uso de Resíduos Agroindustriais e Métodos de Extração

Resumo

Os pigmentos microbianos vêm ganhando destaque como alternativas sustentáveis aos corantes sintéticos, frequentemente associados a impactos ambientais e potenciais riscos à saúde. Diversos microrganismos, incluindo bactérias, fungos e leveduras, são capazes de produzir pigmentos de interesse industrial. Apesar de seu potencial, a produção em larga escala ainda enfrenta desafios relacionados aos custos de cultivo e, principalmente, às etapas de extração que, tradicionalmente, dependem do uso de solventes orgânicos e podem apresentar baixo rendimento e limitada sustentabilidade. Nesse contexto, a utilização de resíduos agroindustriais como fontes alternativas de nutrientes para o crescimento microbiano e a biossíntese de pigmentos surge como uma estratégia promissora de valorização sustentável, contribuindo para redução dos custos de produção, mitigação de impactos ambientais e fortalecimento da bioeconomia circular. Entretanto, a recuperação de pigmentos microbianos ainda representa um obstáculo tecnológico, uma vez que muitos desses compostos são intracelulares ou estão associados a estruturas celulares, o que torna a extração e a purificação desafiadoras e afeta a viabilidade industrial. Para superar essas limitações, avanços recentes têm se concentrado na melhoria das técnicas de extração visando aumentar o rendimento, a pureza e a sustentabilidade. Esta revisão aborda os principais pigmentos microbianos e seus produtores, destacando o potencial dos resíduos agroindustriais na produção sustentável. Além disso, sintetiza os avanços recentes em estratégias de extração enfatizando abordagens que combinam eficiência, menor impacto ambiental e viabilidade econômica. Dessa forma integrada, a discussão evidencia que a combinação entre substratos de baixo custo e tecnologias de extração mais sustentáveis representam um caminho promissor para ampliar a produção e atender à crescente demanda por corantes naturais nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica.

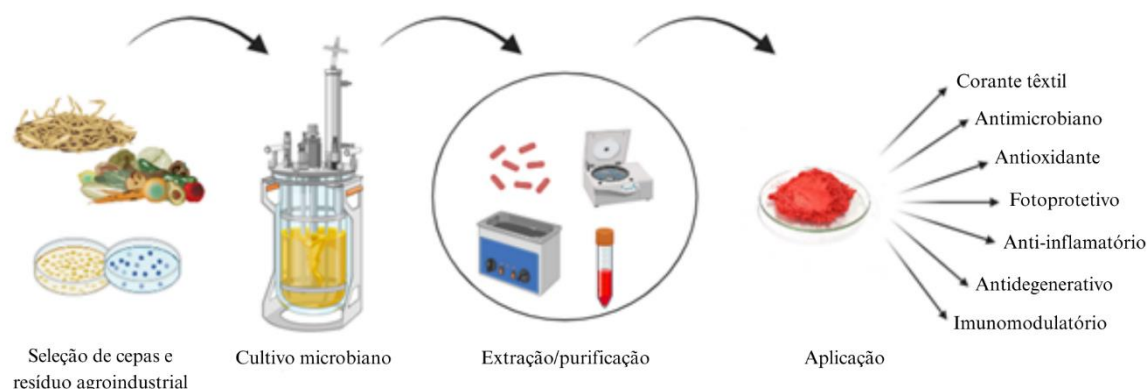
Palavras-chave: bioeconomia circular; extração sustentável; pigmentos microbianos; resíduos agroindustriais; solventes verdes.

Abstract

Microbial pigments are gaining prominence as sustainable alternatives to synthetic dyes, which are often associated with environmental impacts and potential health risks. Several microorganisms, including bacteria, fungi, and yeasts, are capable of producing pigments of industrial interest. Despite their potential, large-scale production still faces challenges related to cultivation costs and, especially, extraction steps that traditionally depend on the use of organic solvents and can present low yields and limited sustainability. In this context, the use of agro-industrial waste as alternative sources of nutrients for microbial growth and pigment biosynthesis emerges as a promising strategy for sustainable valorization, contributing to reduced production costs, mitigation of environmental impacts, and strengthening the circular bioeconomy. However, the recovery of microbial pigments still represents a technological obstacle, since many of these compounds are intracellular or associated with cellular structures, which makes extraction and purification challenging and affects industrial viability. To overcome these limitations, recent advances have focused on improving extraction techniques to increase yield, purity, and sustainability. This review addresses the main microbial pigments and their producers, highlighting the potential of agro-industrial waste in sustainable production. Furthermore, it synthesizes recent advances in extraction strategies, emphasizing approaches that combine efficiency, lower environmental impact, and economic viability. In this integrated way, the discussion shows that the combination of low-cost substrates and more sustainable extraction technologies represents a promising path to expand production and meet the growing demand for natural colorants in the food, cosmetic, and pharmaceutical industries.

Keywords: agro-industrial waste; circular bioeconomy; green solvents; microbial pigments; sustainable extraction.

Resumo Gráfico



2.1 INTRODUÇÃO

Diversas moléculas são produzidas por microrganismos, muitas delas de importância industrial como enzimas, ácidos orgânicos, biocombustíveis, biossurfactantes, antimicrobianos, pigmentos, etc (Gupta et al., 2026; Brahma; Dutta, 2022; Ibrahim et al., 2024; Mendes-Silva et al., 2020; Yu et al., 2022). Pigmentos sintéticos são amplamente utilizados nas indústrias devido aos seus baixos custos de produção e rendimento, no entanto podem ter efeitos nocivos ao meio ambiente. Neste contexto, os pigmentos microbianos emergem como moléculas multifuncionais com propriedades promissoras. A substituição de pigmentos sintéticos derivados do petróleo por pigmentos microbianos representa uma alternativa ao uso desses materiais (Grewal et al., 2022; Pailliè-Jiménez; Stincone; Brandelli, 2020). A produção de pigmentos a partir de fontes microbianas é mais vantajosa em relação aos pigmentos à base de plantas, sendo estes altamente influenciados pelas condições climáticas (Di Salvo et al., 2023; Tuli et al., 2015). Os pigmentos microbianos são obtidos a partir de condições de crescimento controladas, regulando-se a fisiologia e a nutrição desses microrganismos.

Desde os primeiros esforços no final do século XIX até os avanços tecnológicos contemporâneos, uma gama diversificada de microrganismos tem sido alvo de investigações intensivas quanto à sua capacidade de sintetizar pigmentos de interesse. Neste contexto, microrganismos como *Monascus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Serratia sp.* e *Streptomyces sp.* emergem como protagonistas no campo da produção de pigmentos microbianos, desencadeando descobertas que percorrem tanto a compreensão fundamental dos processos metabólicos quanto a otimização dos métodos de cultivo e extração.

Entretanto, o alto custo de produção pode representar um empecilho na substituição de corantes sintéticos pelos corantes de origem microbiana. Dessa forma, soluções que buscam

diminuir estes custos vêm de encontro com a viabilidade de produção. A utilização de resíduos agroindustriais para produção de moléculas com interesse econômico representa uma alternativa viável para mitigar essa questão, promovendo a redução da carga poluente e a recuperação de compostos de valor agregado nestes substratos (Zakaria; Boopathy; Dib, 2020).

Outro desafio na solidificação da produção de pigmentos por microrganismos são os métodos de extração utilizados. Nesse processo a jusante de extração, a lise celular é o primeiro passo para extração de metabólitos intracelulares (Sena et al., 2012). Vários métodos químicos atuam com base na permeabilidade de um agente em relação à parede celular e permitem que produtos periplasmáticos permeiem através da parede (Liu et al., 2016). Entretanto, a extração dos pigmentos microbianos e uso desse material em larga escala pode ser um desafio dentro do processo de obtenção dessas moléculas, apresentando desvantagens como o uso de solventes orgânicos sintéticos e o baixo rendimento de extração. Em decorrência da origem dos pigmentos (fúngica ou bacteriana), bem como das diferenças na composição das paredes celulares e da sua localização (intracelular ou extracelular), esses fatores influenciam diretamente a escolha da metodologia de extração (Mussagy et al., 2019a; Saini; Keum, 2018). Alternativas sustentáveis, baseadas em métodos ecológicos e menos poluentes vêm sendo utilizadas para extrair pigmentos, reduzindo ou até eliminando a necessidade de substâncias químicas nocivas (Rajendran; Somasundaram; Dufossé, 2023).

O presente trabalho tem como objetivo integrar e discutir informações referentes a dois fatores essenciais para a viabilidade da produção de pigmentos de origem microbiana, a utilização de resíduos agroindustriais como substrato e os métodos de extração empregados. Esse artigo enfatiza a relevância da redução dos impactos ambientais associados ao processo produtivo, destacando o potencial de torná-lo mais sustentável e economicamente viável por meio do uso de fontes alternativas de cultivo.

2.2 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE PIGMENTOS

Microrganismos diversos são capazes de produzir uma ampla variedade de pigmentos microbianos, incluindo carotenoides como β -caroteno, astaxantina, zeaxantina e cataxantina, assim como outros compostos, como piocianina, pigmentos de *Monascus*, prodigiosina e melanina, entre outros (Tabela 2.1) (Rajendran; Somasundaram; Dufossé, 2023).

TABELA 2.1. Pigmentos microbianos produzidos por diferentes grupos de microrganismos e suas aplicações

(Continua)

Grupo de microrganismo	Microrganismo produtor	Pigmento	Principais aplicações / propriedades	Referências
Bactérias	<i>Kocuria</i>	Carotenoides	Corantes naturais para indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica	Mendes-Silva et al. 2021; Rajendran et al. 2023
	<i>Arthrobacter</i>	Carotenoides	Compostos bioativos com potencial industrial	Noby et al. 2023
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piocianina	Sensores, agricultura, compostos anticancerígenos, indústria alimentícia	Meyer 2000; Hall et al. 2016; Zhao et al. 2014; Shen et al. 2014; Yu et al. 2017; Jabłońska et al. 2022
	<i>Serratia marcescens</i>	Prodigiosina	Atividade antitumoral, antimicrobiana, antiparasitária, inseticida e imunomoduladora	Paul et al. 2022a; Islan et al. 2022
	<i>Bacillus, Klebsiella, Pseudomonas, Streptomyces</i>	Melanina	Atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena e fotoprotetora	El-Naggar and Saber 2022; Michael et al. 2023
Fungos	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	Carotenoides	Produção de pigmentos naturais para aplicações industriais	Ochoa-Viñals et al. 2024
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Carotenoides	Produção de carotenoides de interesse industrial	Ochoa-Viñals et al. 2024

(conclusão)

Grupo de microrganismo	Microrganismo produtor	Pigmento	Principais aplicações / propriedades	Referências
Fungos	<i>Blakeslea trispora</i>	Carotenoides	Produção industrial de carotenoides	Di Salvo et al. 2023
	<i>Monascus</i> spp.	Pigmentos de <i>Monascus</i> (vermelho, laranja e amarelo)	Corantes alimentícios e compostos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas	Feng et al. 2012; Vendruscolo et al. 2016; Gong et al. 2023
	<i>Cryptococcus</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cryomyces</i>	Melanina	Aplicações biomédicas e ambientais	El-Naggar and Saber 2022
Algas	<i>Haematococcus</i>	Astaxantina (carotenoide)	Indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica	Sun et al. 2023
	<i>Dunaliella</i>	β -caroteno (carotenoide)	Produção comercial de carotenoides	Sun et al. 2023

Fonte: elaborado pelo autor.

Os carotenoides constituem um dos grupos de compostos biologicamente ativos mais estudados (Saubenova et al., 2024). A crescente demanda por corantes naturais nas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas tem impulsionado o mercado de carotenoides, que deve alcançar US\$ 5.221,30 até 2030 (Grand View Research).

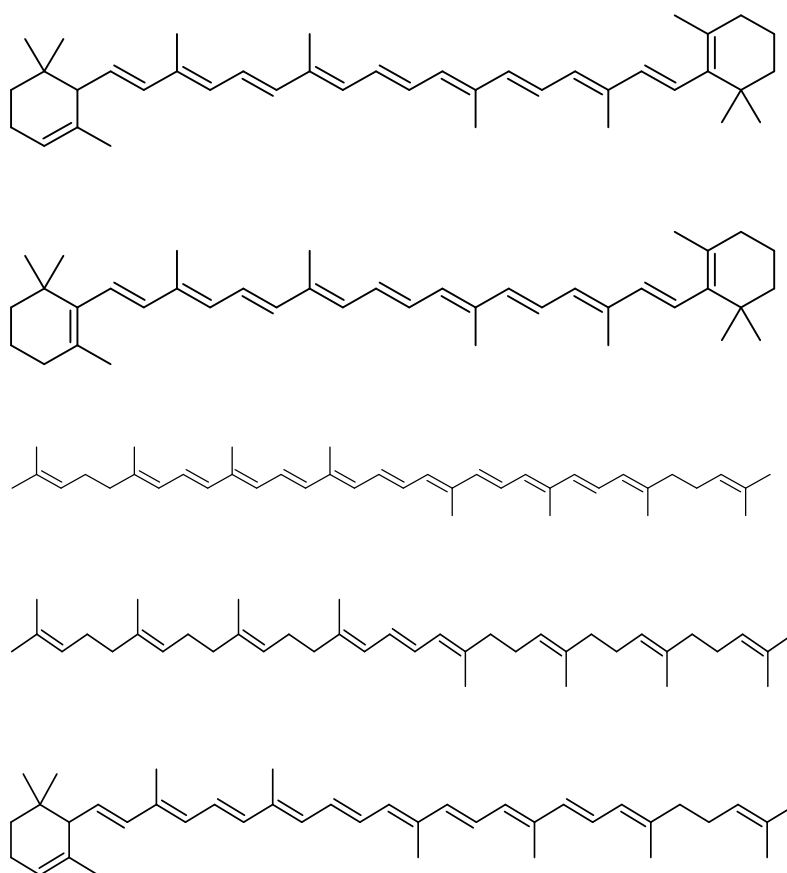
Apresentam coloração que varia do amarelo ao vermelho e são pigmentos lipossolúveis. Classificam-se, com base na estrutura de suas cadeias, em duas classes, os carotenos, e seus derivados oxigenados, as xantofilas (Figura 2.1). Cada molécula consiste em oito unidades isoprenoides unidas de forma opostas no centro da molécula. Sua composição pode ser derivada da estrutura do $C_{40}H_{56}$ por meio de hidrogenação, desidrogenação, ciclização, oxidação ou qualquer combinação desses processos (Di Salvo et al., 2023; Pfander, 1992).

Dentre os microrganismos produtores de carotenoides, estão gêneros bacterianos, como *Kocuria* (Mendes-Silva et al., 2021) e *Arthrobacter* (Noby; Khattab; Soliman, 2023), leveduras, como *Rhodotorula mucilaginosa* e *Rhodotorula glutinis* (Ochoa-Viñals et al., 2024).

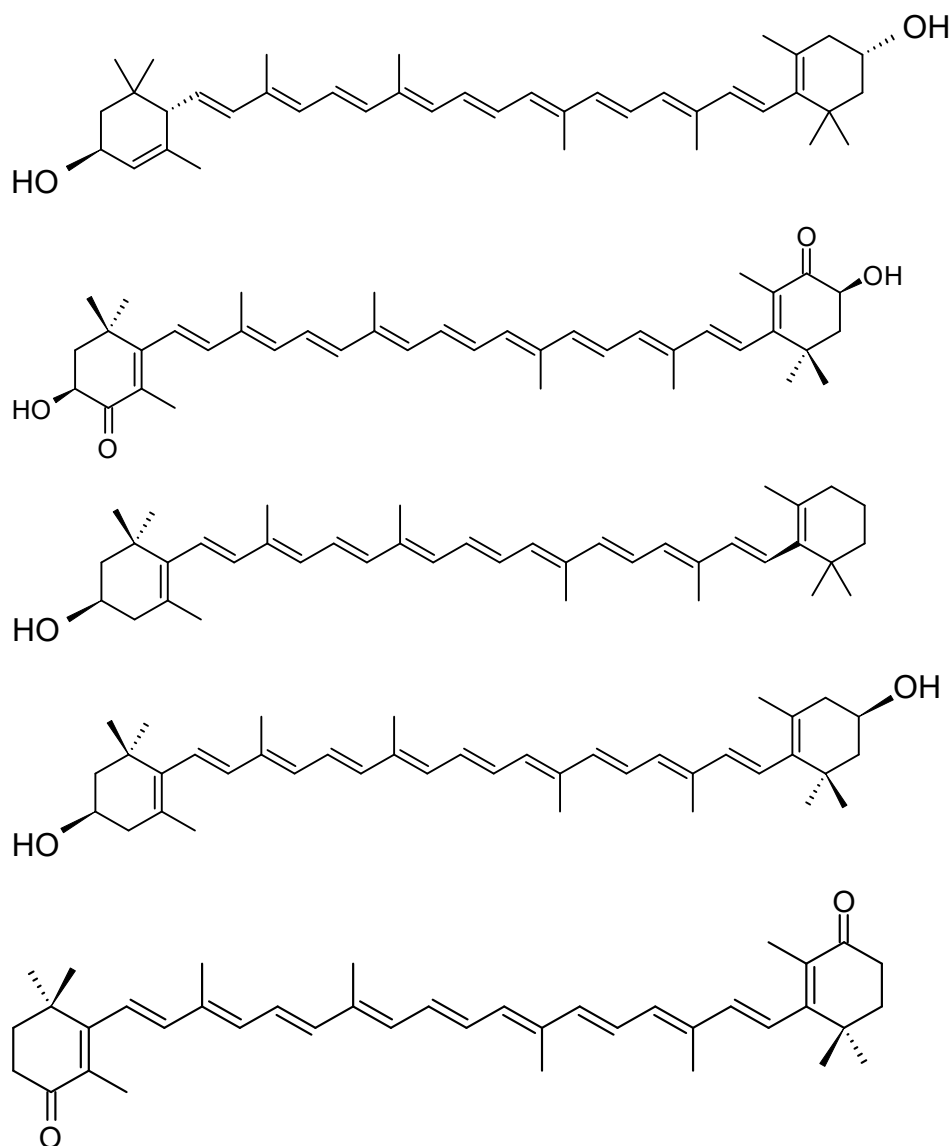
Fungos filamentosos, como *Blakeslea trispora* (Di Salvo et al., 2023) e microalgas como *Haematococcus* e *Dunaliella* (Sun et al., 2023) também fazem parte dos microrganismos produtores de carotenoides.

Figura 2.1 – Estrutura química dos carotenoides. (A) carotenos – α -caroteno, β -caroteno, licopeno, fitoeno, δ -caroteno, respectivamente; (B) carotenoides oxigenados (xantofilas) - luteína, astaxantina, criptoxantina, zeaxantina e cataxantina, respectivamente.

(A)



(B)

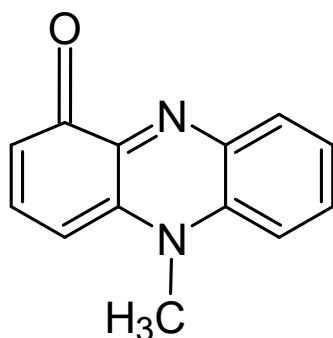


Fonte: Valduga et al., 2009.

A piocianina, reconhecida em *Pseudomonas aeruginosa* como fator de virulência (Hall et al., 2016; Meyer, 2000), é um pigmento microbiano extracelular azul-esverdeado produzido por cerca de 90 a 95% das cepas (Figura 2.2). Apresenta vantagens para aplicações biotecnológicas, sendo natural e biodegradável, e sua produção pode ser otimizada a partir de substratos de baixo custo, com procedimentos de extração mais rápidos e simples em comparação com outros processos de síntese química (Abdelaziz et al., 2023).

Devido às suas distintas propriedades, a piocianina apresenta grande potencial para aplicações em diversas áreas tecnológicas, incluindo sensores, agricultura, agentes anticancerígenos, indústria alimentícia, sendo considerado um reagente de alto valor comercial (Jabłońska et al., 2022; Shen et al., 2014; Yu et al., 2017; Zhao et al., 2014).

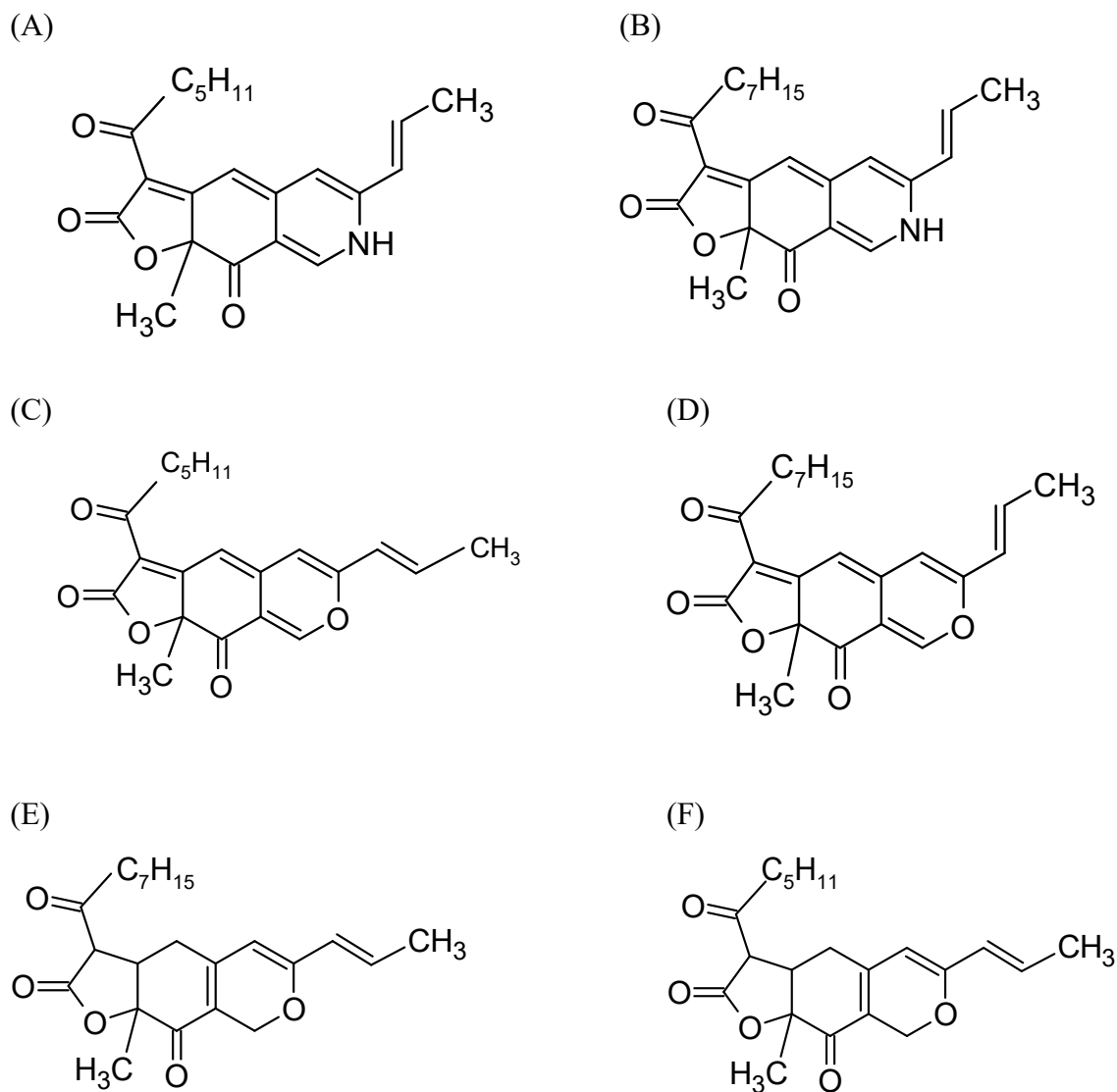
Figura 2.2 – Estrutura química da piocianina.



Fonte: Jabłońska et al., 2023.

Cepas de *Monascus* são reconhecidas por produzir pigmentos de coloração vermelha (rubropunctamina e monacorubramina), laranja (rubropunctatina e monascorubrina) e amarela (ankaflavina e monascina) (Vendruscolo et al., 2016) (Figura 2.3), cuja tonalidade é diretamente influenciada pelas condições de cultivo. Esses pigmentos são amplamente utilizados na indústrias alimentícias global, com destaque para China e o Japão (Feng; Shao; Chen, 2012). *Monascus* é um fungo filamentoso, homotático, pertencente à classe *Ascomycetes* e à família *Monascaceae*. É aeróbio, mesófilo e apresenta metabolismo respiratório-fermentativo (Egea et al., 2023). Os pigmentos produzidos por este fungo têm atraído atenção devido aos seus potenciais benefícios à saúde humana, incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas. Estudos indicam que esses pigmentos podem exercer efeitos protetores em diversos tecidos, como fígado, próstata, mama, neurônios, sangue e pele, evidenciando seu grande potencial para aplicações na indústria alimentícia, farmacêuticas e biotecnológica (Gong et al., 2023).

Figura 2.3 – Estrutura química dos principais pigmentos produzidos por *Monascus*. Pigmentos vermelhos: (a) Rubropunctamina e (b) Monascorubramina; Pigmentos laranja: (c) Rubropunctina e (d) Monascorubrina; Pigmentos amarelos: (e) Ankaflavina e (f) Monascina.



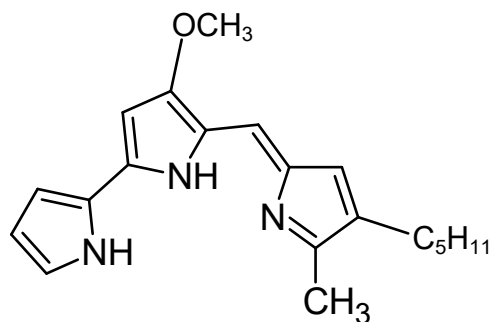
Fonte: Egea et al., 2023.

O pigmento prodigiosina, composto por uma estrutura tripirrol com a fórmula química $C_{20}H_{25}N_3O$ (Figura 2.4), pertence ao grupo de moléculas bioativas coloridas produzidas por fermentação microbiana. Trata-se de um metabólito secundário vermelho que se acumula em membranas celulares e grânulos intracelulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

A prodigiosina e seus derivados apresentam ampla atividade biológica, incluindo propriedades pró-apoptóticas, antitumorais, antimicrobianas, antiparasitárias, inseticidas e

imunomoduladoras (Islan et al., 2022; Paul et al., 2022a). A principal cepa produtora é a *Serratia marcescens*, cuja a utilização industrial é limitada devido a associação desta bactéria a algumas patologias em mamíferos (Islan et al., 2022).

Figura 2.4 – Estrutura química da prodigiosina.

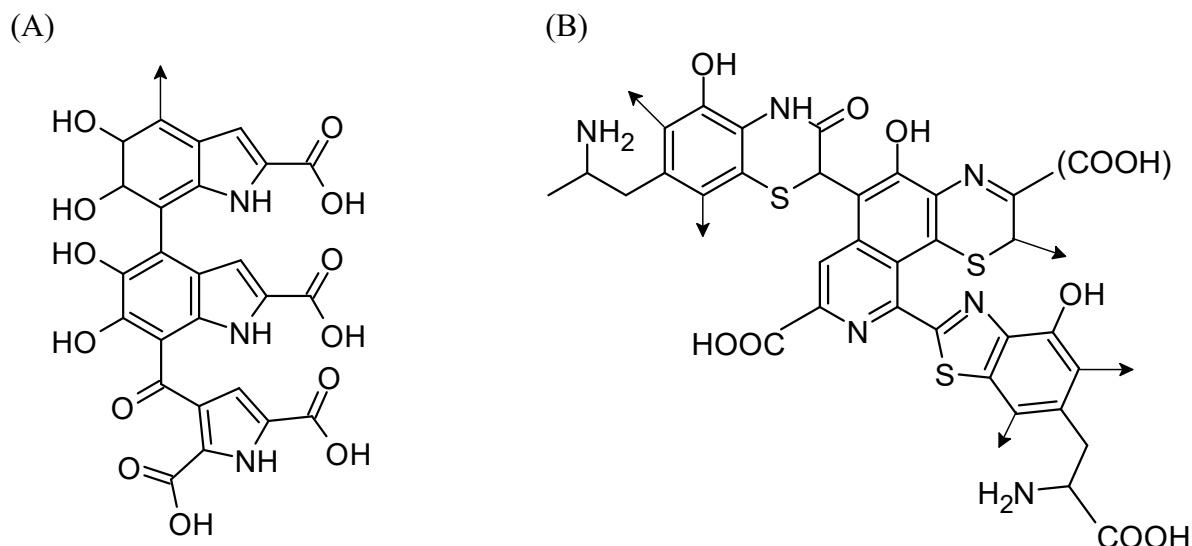


Fonte: Nguyen; Wang; Nguyen, 2022.

O pigmento melanina, gerado pela polimerização oxidativa de moléculas fenólicas ou indólicas, é natural e pode ser produzido por diversas espécies de gêneros bacterianos como *Bacillus*, *Klebsiela*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, bem como por gêneros fúngicos como *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Cryomyces*, entre outros (El-Naggar; Saber, 2022). Dependendo das vias de polimerização, monômeros precursores e enzimas, é classificada em eumelanina, piomelanina, feomelanina, entre outras (Figura 2.5) (Choi, 2021).

Apresenta amplo potencial de aplicação em biotecnologia, meio ambiente e medicina, demonstrando notável atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de propriedades anti-inflamatórias, antioxidante, anticancerígena, neuroprotetivas, fotoprotetivas (Michael et al., 2023).

Figura 2.5 – Parte da estrutura química dos tipos mais comuns de melaninas; eumelanina (A) e feomelanina (B).



Fonte: El-Naggar; Saber, 2022.

2.3 APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS UTILIZADOS NA SÍNTESE DE PIGMENTOS MICROBIANOS

A síntese de pigmentos microbianos a partir de resíduos agroindustriais tem ganhado destaque por aliar reaproveitamento de subprodutos a um processo sustentável. Esses pigmentos, produzidos por diferentes microrganismos, apresentam diversas atividades biotecnológicas e vêm sendo cada vez mais explorados, seja na utilização direta desses metabólitos, na prospecção de novas espécies produtoras ou na otimização das condições de cultivo. Além disso, o uso de resíduos como substrato fortalece a viabilidade de produção em escala industrial, representando uma alternativa promissora aos pigmentos sintéticos e contribuindo para uma cadeia produtiva ambientalmente limpa.

O aproveitamento de resíduos agroindustriais como substratos para a produção de pigmentos microbianos tem emergido como uma estratégia sustentável, contribuindo para a redução de impactos ambientais associados ao descarte inadequado desses materiais. A Tabela 2.2 apresenta os diversos resíduos já empregados na produção de pigmentos por diversos microrganismos.

TABELA 2.2 – Tipos de resíduos utilizados como meio de cultivo na produção de pigmentos microbianos

(Continua)

Tipo de resíduo	Microrganismo produtor	Pigmento obtido	Referência
Farelo de arroz	<i>Monascus purpureus</i>	Pigmento de <i>Monascus</i>	Chen et al., 2025
Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	<i>Monascus ruber</i>	Pigmento de <i>Monascus</i>	De Arruda et al., 2025
Cascas de abóbora, mamão e laranja	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Carotenoides	Yadav; Vashisht; Rai, 2024
Farelo de trigo em pó, farelo de arroz e pó de casca de laranja	<i>Serratia marcescens</i> / <i>Serratia nematodiphilia</i>	Prodigiosina	Maurya et al., 2024
Lodo de laticínios	<i>Monascus purpureus</i>	Pigmento de <i>Monascus</i>	Moradi; Mortazavi, 2024
Bagaço de uva	<i>R. glutinis</i>	Carotenoides	Uğurlu; Günan Yücel; Aksu, 2023
Partes não comestíveis de frutas e vegetais	<i>R. toruloides</i>	Carotenoides	Sinha et al., 2023
Salmoura	<i>Dunaliella salina</i>	Carotenoides	Bas et al., 2023
Soro de leite	<i>Arthrobacter agilis</i>	Carotenoides	Noby; Khattab; Soliman, 2023
Cascas de banana e batata, pão velho, iogurte, carne processada, ovos e resíduos alimentares mistos	<i>P. aeruginosa</i>	Piocianina	Pantelic et al., 2023
Palha de arroz	<i>Serratia marcescens</i>	Prodigiosina	Miglani et al., 2023
Penas e óleo de amendoim	<i>Serratia marcescens</i>	Prodigiosina	Asitok et al., 2023
Extratos de casca de cenoura	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Melanina	Müjdeci, 2022
Óleo residual de processado de peixe	<i>Erythrobacter citreus</i>	Carotenoides	Niero et al., 2021

(Conclusão)

Tipo de resíduo	Microrganismo produtor	Pigmento obtido	Referência
Melaço e soro de queijo	<i>P. aeruginosa</i>	Piocianina	Kahraman; Karaderi, 2021
Resíduos quitinosos marinhos	<i>Serratia marcescens</i>	Prodigiosina	Nguyen et al., 2021
Soro de leite, melaço e cascas de melão e melancia	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Melanina	Müjdeci, 2021
Melaço	<i>Pseudomonas koreensis</i>	Melanina	Eskandari; Etemadifar, 2021
Soro de leite	<i>Monascus purpureus</i>	Pigmento de <i>Monascus</i>	Mehri; Perendeci; Goksungur, 2021
Hidrolisado de palha de arroz e farelo de milho	<i>Monascus</i>	Pigmento de <i>Monascus</i>	Liu et al., 2020
Bagaço de malte	<i>P. aeruginosa</i>	Piocianina	Oliveira et al., 2019
Hidrolisado de grãos de cevada	<i>Monascus</i>	Pigmento de <i>Monascus</i>	Silbir; Goksungur, 2019
Bagaço de cana	<i>Monascus</i>	Pigmento de <i>Monascus</i>	Terán Hilaes et al., 2018; Silveira et al., 2013

Fonte: elaborado pelo autor.

2.3.1 Produção de carotenoides

Os carotenoides são produzidos principalmente por fungos filamentosos, leveduras além de algumas espécies de bactérias e algas. Entre as fontes microbianas de carotenoides, o cultivo de leveduras do gênero *Rhodotorula* tem sido amplamente investigado (Gedela et al., 2023; Mussagy et al., 2019a, 2021; Sharma; Ghoshal, 2020). Essas leveduras, pertencem à família *Sporidiobolaceae* e a ordem *Sporidiales*, formam um grupo heterogêneo de fungos que apresentam colônias visíveis de coloração amarelada a avermelhada entre 24 e 48 h, sob temperaturas de 25 a 37 °C. Dentre as espécies do gênero, *Rhodotorula glutinis* se destaca pelo potencial biotecnológico e pelo crescente interesse industrial (Garcia-Cortes et al., 2021).

Entre os fatores nutricionais que influenciam a produção de carotenoides, estão a sacarose e a glicose, as fontes de carbono mais comumente utilizadas. Em relação ao pH de cultivo, a biossíntese de carotenoides provoca alterações naturais nesse parâmetro em

decorrência do metabolismo e do crescimento das leveduras (Valduga et al., 2009). Vale ressaltar que as condições ótimas para a produção de carotenoides nem sempre coincidem com aquelas que favorecem o crescimento celular.

A produção de carotenoides por diversas espécies de *Rhodotorula* também pode ser realizada em cultivos que empregam substratos de baixo custo, estratégia que visa reduzir os custos do processo e tornar a obtenção desses pigmentos mais viável economicamente. Estudos utilizando bagaço de sisal, melaço de cana de açúcar, resíduos de glicerina, água residual de mandioca, demonstraram a viabilidade do uso de resíduos provenientes de diferentes setores industriais para a biossíntese de carotenoides (Cheng; Yang, 2016; Da Silva et al., 2020a, 2020b; Lakshmidevi et al., 2021; Ribeiro et al., 2019).

Em cultivos de *R. glutinis*, bagaço de uva foi usado como substrato e resultou em um rendimento 5988,6 mg/L de β -caroteno, enquanto o meio preparado a partir de casca de laranja hidrolisada alcançou 370,0 mg/L do mesmo pigmento (Uğurlu; Günan Yücel; Aksu, 2023). De forma semelhante, *R. toruloides* cultivada em hidrolisado obtido de partes descartadas e não comestíveis de vegetais e frutas foi capaz de sintetizar β -caroteno, toruleno e torularodina, atingindo um rendimento de 62 mg/L de carotenoides (Sinha et al., 2023).

A utilização de resíduos como estratégia de cultivo de microalgas representa uma alternativa promissora da biossíntese de carotenoides nesse grupo de microrganismos. Resíduos de salmoura ricos em cloreto de sódio, provenientes de usinas de dessalinização, têm sido explorados no cultivo da microalga *Dunaliella salina*, reconhecida por sua tolerância a elevadas concentrações salinas e pela capacidade de acumular β -caroteno (Bas et al., 2023). De modo semelhante, resíduos de cascas de abóbora, mamão e laranja empregados como substratos no cultivo de *Chlorella sorokiniana* resultaram em uma produtividade de 9,18 mg/L de carotenoides (Yadav; Vashisht; Rai, 2024).

Bactérias fototróficas de ambiente marinho também são capazes de sintetizar carotenoides, os quais atuam como pigmentos acessórios no processo fotossintéticos e como agentes de proteção da maquinaria fotossintética contra o excesso de luz que pode induzir fotodanos (Mapelli-Brahm et al., 2023). *Erythrobacter citreus*, uma bactéria isolada de águas profundas, foi cultivada em meio a base de óleo residual do processamento de pescado, substrato de baixo custo, alcançando rendimento aproximado de 1,3 mg/L de carotenoides (Niero et al., 2021). Semelhantemente, meio suplementado com soro de leite foi utilizado para fermentação da bactéria psicotrófica *Arthrobacter agilis*, resultando na síntese do carotenoide raro (C₅₀), a bacterioruberina, e de seus derivados, com rendimento máximo de 5,13 mg/L (Noby; Khattab; Soliman, 2023).

2.3.2 Produção de piocianina

Pesquisas vêm sendo conduzidas com o objetivo de otimizar a produção de piocianina, seja por meio da modificação das condições de incubação, seja pela adição de substâncias que favoreçam o crescimento celular e a síntese do pigmento. Entre os fatores extrínsecos limitantes que regulam a produção de piocianina destacam-se variações de pH, temperatura, aeração e disponibilidade de nutrientes no meio de cultura (Elbargisy, 2021). Neste contexto, tem-se buscado o desenvolvimento de meios de crescimento mais adequados para *P. aeruginosa*, incluindo, por exemplo, a adição de glutamina a meios de enriquecimento convencionais, atuando como fonte primária de nitrogênio para a síntese do anel fenazina. Essa característica é considerada essencial para a persistência de microrganismos no solo, uma vez que a piocianina é predominantemente produzida por linhagens edáficas de *P. aeruginosa*. O caldo King A, é amplamente usado como meio referência para a detecção e produção de piocianina e servindo de base para formulações em estudos subsequentes (Gonçalves; Vasconcelos, 2021). Além disso, o potencial de nanomateriais como moduladores da produção de piocianina e outros metabólitos secundários de *P. aeruginosa* tem sido investigado com o intuito de otimizar essa produção (Jabłońska et al., 2022).

Entretanto, a busca por um substrato de baixo custo na produção de piocianina está em consonância com as pesquisas recentes voltadas à produção de diversos pigmentos, com o objetivo de reduzir os custos de produção. Ao analisar o custo da piocianina, observou-se uma redução significativa quando se utilizou do meio à base de farelo de algodão suplementado com peptona, em comparação com o meio sintético de controle (caldo nutriente suplementado com glicerol) e com piocianina quimicamente sintetizada disponível comercialmente (El-Fouly et al., 2015).

Os resultados de pesquisas comprovam a viabilidade do uso desses substratos para a produção de piocianina. O bagaço de malte, por exemplo, contribuiu para um aumento de aproximadamente 70% na concentração de piocianina em relação ao controle, com rendimento variando entre 21 a 58 µg/mL (Oliveira et al., 2019). Diversos resíduos alimentares como cascas de banana e batata, lavagem de batata, pão velho, iogurte, carne processada, ovos e resíduos alimentares mistos foram testados como única fonte de nutrientes em culturas submersas de *P. aeruginosa*. Entre eles, cascas de banana e batata mostraram-se menos favoráveis, tanto para o crescimento quanto para a biossíntese de pigmentos. No entanto, a suplementação com NaCl aumentou a produção de pigmentos entre 1,3 e 7,9 vezes, quando pão velho e cascas de batata e lavagem foram usados como substratos, atingiram rendimento de 5,2 mg/L de piocianina

(Pantelic et al., 2023). Além disso, melaço e soro de queijo residual empregados como meio de cultivo resultaram em rendimento de 3 mg/L de piocianina (Kahraman; Karaderi, 2021).

2.3.3 Produção de pigmentos de *Monascus*

A fermentação em estado sólido (SSF) e a fermentação em estado líquido (LSF) são os dois processos principais empregados na produção de pigmentos de *Monascus*. Com o objetivo de avançar nessa área, diversos estudos têm buscado otimizar as condições de cultivo. A variação de fontes de carbono e nitrogênio, bem como pH e temperatura de cultivo, pode favorecer ou restringir a síntese desses metabólitos (Feng; Shao; Chen, 2012). Além disso, a proporção de pigmentos intracelular e extracelular também depende das condições de cultivo do fungo, podendo ser manipulada para promover a conversão de pigmentos intracelulares em extracelulares (Egea et al., 2023). A produção dos pigmentos vermelho e amarelo por *Monascus* pode variar em função de diferenças nutricionais e condições físicas. Fatores como temperatura de cultivo, pH do meio, concentrações de glicose, incidência de luz interferem diretamente na biossíntese desses pigmentos (Mukherjee; Singh, 2011).

Historicamente, o uso de resíduos agroindustriais para a produção de pigmentos de *Monascus* tem sido investigado com o objetivo de reduzir os custos, e ao mesmo tempo, alcançar elevados índices de produção. O bagaço de cana, por exemplo, quando usado como fonte de carbono, mostrou-se um resíduo de interesse para o cultivo de *Monascus*, proporcionando alta estabilidade na produção de pigmento vermelho (Silveira et al., 2013; Terán Hílares et al., 2018). O primeiro estudo a investigar o uso de hidrolisado de grãos de cevada como fonte de carbono para a produção de pigmentos de *M. purpureus* em fermentação submersa foi realizado em 2019 e demonstrou eficiência no processo (Silbir; Goksungur, 2019). Substratos lignocelulósicos, como hidrolisado de palha de arroz, e resíduos amiláceos, como farelo de milho, demonstraram ser alternativas viáveis, de baixo custo e biotecnologicamente eficientes para produção de pigmentos vermelhos por fermentação submersa de *Monascus* (Liu et al., 2020).

Atualmente, são escassos os estudos que investigam o uso de farelo de arroz como substrato para produzir pigmentos de *Monascus*. Entretanto, Chen et al. (2025) avaliaram o cultivo de *M. purpureus* em farelo de arroz suplementado com diferentes fontes de carbono e submetido a distintas condições de hidrólise enzimática de celulase. Os autores determinaram condições ótimas com a suplementação de manitol, resultando em um valor máximo de cor de 3538 U/g.

De forma semelhante, o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar foi explorado como um meio de cultivo de baixo custo para produção de pigmentos por uma cepa de *M. ruber*, alcançando rendimento máximo de 13,1 UA, 11,87 UA e 11,32 UA para pigmentos amarelo, laranja e vermelho, respectivamente (De Arruda et al., 2025). Uma cepa de *M. purpureus* foi estudada quando a utilização de soro de leite como substrato para produção de pigmentos, obtendo a produção máxima de pigmento vermelho de 38,4 UA (Mehri; Perendeci; Goksungur, 2021).

Indústrias de laticínios, importantes geradoras de águas residuais, produzem lodos com elevados teores de compostos orgânicos, incluindo carboidratos e proteínas, que podem ser exploradas como fontes de carbono e nitrogênio para microrganismos, reduzindo, assim, os custos da produção. Nesse contexto, lodo de laticínios foi utilizado como substrato na produção de pigmentos por *Monascus purpureus*, com rendimento de 4,85 g de cor seca (Moradi; Mortazavi, 2024).

2.3.4 Produção de prodigiosina

Embora inicialmente descoberta em *Serratia marcescens*, nas últimas décadas a prodigiosina também foi identificada em outros microrganismos, como *Pseudoalteromonas rubra*, *Vibrio* sp., *Janthinobacterium*, *P. putida*, *Hahella chejuensis*, *Streptomyces coelicolor*, bem como diferentes espécies do gênero *Serratia* (Han et al, 2021). Além de meios básicos de cultivo, a suplementação do meio com compostos específicos, como tirosina, prolina, óleo de palma, tem se mostrado eficaz para otimizar a produção de prodigiosina por cepas de *Serratia* (Abdul Manas et al., 2020; Faraag; El-Batal; El-Hendawy, 2017; Wei; Yu; Chen, 2005).

A aplicação comercial da prodigiosina é limitada pelo elevado custo de produção, que é parcialmente determinado pelo preço dos meios de cultivo. Para reduzir esses custos, diversos resíduos e subprodutos agroindustriais tem sido propostos como alternativas viáveis, incluindo resíduos agrícolas, subprodutos da industrial alimentícia, resíduos de processamento de pescado, resíduos da indústria química e outros materiais de baixo valor (Han et al., 2021).

Resíduos de farelo de trigo em pó, farelo de arroz e pó de casca de laranja foram avaliados como meios de fermentação para a produção de prodigiosina por cepas de *Serratia marcescens* *bhu prodig* e *Serratia nematodiphilia*, bem como sua otimização por meio da suplementação de aminoácidos, incluindo metionina, cisteína, cistina, triptofano e tirosina. Os resultados indicaram o farelo de trigo em pó como substrato altamente eficiente para a produção de pigmentos, especialmente com a cepa *S. nematodiphilia*, que alcançou uma produção de 387

mg/L de prodigiosina. Entre os suplementos testados, a tirosina mostrou-se a mais eficaz para aumentar o rendimento do pigmento (Maurya et al., 2024).

A síntese de prodigiosina por *S. marcescens* também foi investigada em fermentação submersa utilizando palha de arroz como uma fonte econômica de carbono. O meio de cultivo foi ainda enriquecido com torta de amendoim desoleificada, resultando em um aumento de 1,9 vezes na produção de prodigiosina (Miglani et al., 2023). Resíduos quitinosos marinhos também foram empregados como substrato para produção de prodigiosina por *S. marcescens* atingindo 6,2 g/L em biorreator de 15 L, com aumento significativo de rendimento observado mediante a adição combinada de 0,02% de K₂SO₄ e 0,05% de K₂HPO₄ ao meio de cultivo (Nguyen et al., 2021). Outros resíduos também foram avaliados para produção de prodigiosina por *S. marcescens*, incluindo resíduos de penas e óleo de amendoim usado em fritura, alcançando um rendimento de 9,66 g/L de pigmento (Asitok et al., 2023).

2.3.5 Produção de melanina

A busca por redução de custos na produção em escala industrial de melanina microbiana, é fundamental para garantir competitividade em relação à melanina sintética. O uso da tirosina como substrato garante uma massa celular adequada e aumenta a atividade de enzimas de conversão, como tirosinase, lacase e 4-HPPD. Entretanto, a tirosina tem um valor mais alto do que os resíduos a base de açúcar (Choi, 2021). Todavia, o estudo de diferentes resíduos agroindustriais como substratos vem sendo realizado a fim de minimizar estes custos.

Diversos microrganismos produtores de melanina possuem características que podem ser úteis na utilização de alguns tipos de resíduos. Os estreptomicetos, por exemplo, podem degradar biomassas lignocelulosicas devido aos seus reservatórios multienzimáticos que incluem diferentes celulasas (endo-, exo- e betagalactosidases), lignina peroxidases e/ou lacases (Kordjazi et al., 2024). O gênero *Streptomyces* é uma fonte significativa de pigmentos naturais (Díez; Torres; Gaudêncio, 2025).

Entre os resíduos agroindustriais empregados na produção de melanina, os extratos de casca de cenoura, ricos em fibras alimentares como celulose, hemicelulose, lignina e pectina, foram avaliados como meio de fermentação para *Aureobasidium pullulans*, microrganismo conhecido como produtor de melanina. Neste estudo foi obtida produtividade de 2,23 e 1,83 g/L de melanina intracelular e extracelular, respectivamente (Müjdeci, 2022). Em um outro trabalho realizado com o mesmo resíduo, os valores obtidos foram de 0,19 g/L de melanina intracelular e 3,52 g/L de melanina extracelular, indicando influência significativa das

condições de cultivo sobre o perfil de produção. Além disso, outros resíduos, como soro de leite, melaço e cascas de melão e melancia, também foram avaliadas quanto ao seu potencial como substrato na produção de melanina com a cepa de *Aureobasidium pullulans*. Dentre esses, soro de leite e melaço apresentaram rendimentos inferiores a 0,03 g/L de melanina total, enquanto as cascas de melão e melancia resultaram em rendimentos de 0,29 e 0,78 g/L, respectivamente (Müjdeci, 2021).

Resíduos de melaço também foram avaliados como substratos na produção de melanina por *Pseudomonas koreensis*, resultando em rendimento máximo de 5,5 g/L de pigmento (Eskandari; Etemadifar, 2021). De forma semelhante, melaço de cana-de-açúcar, vinhaça e licor de maceração de milho foram investigados na produção de melanina com cepa de *Aspergillus nidulans*. O meio de cultivo de 0,81% (v/v) de vinhaça e 1,62% (p/v) de glicose apresentou rendimento total de 1 g/L de melanina. Entretanto, o aumento das concentrações de melaço (2,45%) e vinhaça (2,40%) causaram redução na produção desse pigmento (Campanhol et al., 2023).

2.4 ESTRATÉGIAS DE EXTRAÇÃO PARA PIGMENTOS MICROBIANOS

Uma vez produzidos, os pigmentos microbianos devem ser recuperados de forma eficiente da biomassa, tornando as técnicas de extração e recuperação uma etapa crítica no processo geral. A extração de pigmentos microbianos e sua aplicação em larga escala representam desafios significativos nos processos de produção, podendo apresentar desvantagens relacionadas ao uso de solventes tóxicos e ao baixo rendimento de extração. A escolha da metodologia mais adequada depende de diversos fatores, como a origem do pigmento (fungos ou bactérias) e sua localização celular, que pode ser intracelular ou extracelular (Gómez-Marín and Sánchez 2010; Saini and Keum 2018; Mussagy et al. 2019b). Dessa forma, diferentes estratégias de extração têm sido desenvolvidas para melhorar a eficiência do processo e reduzir impactos ambientais (Tabela 2.3).

TABELA 2.3 – Exemplos de diferentes métodos de extração de pigmentos microbianos

Método de extração	Microrganismos	Pigmento	Rendimento	Objetivo do estudo / Aplicação	Referência
Metanol	<i>Paracoccus marcusii</i> RSPO1	Carotenoides	7,24 µg/L	Propriedades antidiabéticas, antimicrobianas e antioxidantes	Naik; Gupte, 2023
Etanol e sonicação	<i>Serratia</i>	Prodigiosina	72 mg/L	Anticancerígeno	Tunca Koyun et al., 2022
Metanol	<i>Arthrobacter</i>	Carotenoide (decaprenoxantina)	60 mg/L	Atividade antiproliferativa de pigmentos bacterianos contra células cancerosas Neuro-2a, Saos-2 e MCF-7	Tapia et al., 2021
Metanol, Vórtex e Ultrassom	<i>Kocuria arsenatis</i>	Carotenoide (sarcinaxantina)	112,480 µg/L	Antioxidante e fotoprotetivo	Mendes-Silva et al., 2021
Campo elétrico pulsado e Fluido supercrítico	<i>Rhodotorula glutinis</i>	Carotenoide	13,54 µg/g	Avaliar a extração de carotenoide por campo elétrico pulsado	Matínez et al., 2020
Enzimático	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>	Carotenoide (astaxantina)	3,6 mg/L	Otimização da produção de pigmento e avaliação de estratégias de extração	Harith el al., 2020
Fluido supercrítico					
Alta pressão	<i>Talaromyces sp</i>	Azafilona	Não consta	Estratégias de extração	Lebeau et al., 2020
Solvente verde	<i>R. glutinis</i>	Carotenoide	β-caroteno: 187,8 µg/mL	Estratégias de extração	Mussagy et al., 2019a
			Torularodina: 122,6 µg/mL		
			Toruleno; 22,9 µg/mL		
Extração aquosa	<i>Epicoccum nigrum</i>	Flavanóides	0,127 mg/mL	Otimização da produção de pigmento	Kaur et al., 2019

Fonte: elaborada pelo autor.

A extração de metabólitos intracelulares constitui uma etapa fundamental dos processos downstream, na qual a lise celular representa a fase inicial (Sena et al. 2012). Diversos métodos químicos baseiam-se na capacidade de certos agentes permearem a parede celular, permitindo que os produtos periplasmáticos atravessem essa barreira (Liu et al. 2016).

Historicamente, os primeiros métodos de extração de pigmentos microbianos foram baseados em técnicas originalmente desenvolvidas para pigmentos vegetais. Em 1942, métodos empregados para a separação e identificação de carotenoides em plantas foram adaptados para carotenoides bacterianos utilizando metanol como agente extrator (Sobin and Stahly 1942). Posteriormente, outros pigmentos microbianos passaram a ser extraídos utilizando diferentes solventes e condições experimentais. Por exemplo, o pigmento extracelular indigoidina foi isolado por agitação e centrifugação (Kuhn et al. 1965), enquanto a piocianina de *Pseudomonas aeruginosa* foi extraída com clorofórmio em meio ácido (Chang and Blackwood 1969). Hyoichiro et al. (1971) também relataram a extração de pigmentos de *Brevibacterium* utilizando éter de petróleo e acetona (Hyoichiro et al. 1971). Desde então, a busca por metodologias mais eficazes e sustentáveis tem se intensificado. Inicialmente, os métodos de extração baseavam-se principalmente no uso de solventes orgânicos convencionais. Entretanto, com o avanço das tecnologias de processamento e o aumento das preocupações ambientais, novas abordagens têm sido desenvolvidas para melhorar a eficiência de extração e reduzir o impacto ambiental dos processos.

O uso convencional de solventes orgânicos voláteis (VOCs) tóxicos, como hexano, éter de petróleo e dimetilsulfóxido (DMSO), tem sido amplamente empregado na extração de carotenoides microbianos. No entanto, solventes alternativos não tóxicos e ecologicamente corretos, como líquidos iônicos (IL), vêm sendo introduzidos para atender à crescente demanda por tecnologias mais limpas e biocompatíveis (Mussagy et al., 2024).

2.4.1 Técnicas de extração convencionais

Os métodos convencionais de extração de pigmentos microbianos geralmente envolvem o uso de solventes químicos associados a processos de maceração celular, sonicação, centrifugação e aplicação de temperatura para pré-tratamento e lise celular. No entanto, esses métodos frequentemente apresentam elevado consumo de solventes e baixos rendimentos de extração (Rajendran et al. 2023).

O dimetilsulfóxido (DMSO) continua sendo considerado um dos solventes mais eficazes para extração de pigmentos microbianos. Esse solvente polar aprótico apresenta alta

afinidade por carotenoides, permitindo dissolver uma ampla variedade de analitos sem promover reações químicas ou degradação durante o processo de extração (Papapostolou et al. 2023). Em estudos com biomassa de *Nannochloropsis*, por exemplo, foram observadas taxas de recuperação próximas a 100% para carotenoides utilizando DMSO (Cecchin et al. 2022).

A eficiência da extração também depende da polaridade do pigmento e da afinidade com o solvente utilizado. Solventes não polares, como hexano, petróleo e tetrahidrofurano, são geralmente mais eficazes para a extração de carotenoides apolares, enquanto solventes mais polares, como etanol, acetona e acetato de etila, apresentam melhor desempenho na recuperação de carotenoides polares (Saini and Keum 2017). Contudo, para pigmentos intracelulares, a escolha do solvente por si só não é suficiente para garantir altos rendimentos de extração. Nesses casos, a ruptura eficiente da parede celular torna-se uma etapa fundamental para a liberação dos compostos de interesse.

2.4.2 Métodos de ruptura e pré-tratamento celular

Como muitos pigmentos microbianos são intracelulares, a recuperação eficiente desses compostos requer etapas adicionais de processamento a jusante. Os procedimentos geralmente incluem separação da biomassa celular do sobrenadante, lise celular e posterior extração dos pigmentos liberados (Saini and Keum 2018; Zhang et al. 2020).

Métodos físicos, químicos ou biológicos podem ser utilizados para promover a ruptura celular. Estratégias como cozimento celular, moagem criogênica ou o uso de agentes químicos (ácidos, bases, surfactantes ou solventes orgânicos) são frequentemente aplicadas para romper células mais resistentes. Em células Gram-negativas, a ruptura celular pode ser alcançada por ultrassonicação ou ciclos de congelamento e descongelamento. Já células Gram-positivas possuem paredes celulares mais espessas e estruturadas, apresentando maior resistência à lise. As células de leveduras, por sua vez, são ainda mais robustas e exigem condições mais intensas para ruptura eficiente (Mussagy et al. 2019b).

Os pré-tratamentos celulares podem aumentar significativamente a eficiência de extração. A homogeneização em alta pressão, por exemplo, permitiu a extração quase completa de carotenoides de biomassa algal, alcançando eficiências de 98% e 100% quando metanol e acetona foram utilizados como solventes, respectivamente (Cecchin et al. 2022).

Outras técnicas, como sonicação e tratamento por micro-ondas, também têm sido utilizadas para melhorar o rendimento de extração. No entanto, a relação entre o volume de

solvente e a quantidade de material influencia diretamente a eficiência do processo, podendo afetar a dispersão da energia acústica e a intensidade do ultrassom (Dzah and Dzigbor 2023).

Métodos mecânicos de ruptura celular, como fresamento com esferas e ultrassonicação, têm sido explorados como alternativas mais sustentáveis e menos poluentes. Apesar de apresentarem elevada eficiência e potencial de escalonamento industrial, essas técnicas podem apresentar baixa seletividade, o que pode comprometer a recuperação específica dos pigmentos (Nemer et al. 2021).

2.4.3 Extração assistida por enzimas

A extração assistida por enzimas representa uma abordagem mais suave para lise celular em comparação com métodos mecânicos ou químicos (Liu et al. 2016). Esse método tem sido amplamente aplicado na extração de pigmentos em leveduras, nas quais a complexa estrutura da parede celular exige a ação sinérgica de múltiplas enzimas (Vukasinovic-Milic et al. 2007).

Enzimas como proteases e β -glucanases são frequentemente utilizadas para degradar a parede celular de leveduras, aumentando a extratibilidade do pigmento (Salazar and Asenjo 2007). A utilização de β -1,3-glucanase derivada de *Trichoderma harzianum*, por exemplo, permitiu a extração completa de astaxantina de células de *Xanthophyllomyces dendrorhous*, superando os resultados obtidos com métodos convencionais baseados em DMSO e acetona (Harith et al. 2020). Apesar de sua eficiência, o elevado custo das enzimas ainda limita sua aplicação em escala industrial.

2.4.4 Tecnologias Sustentáveis para Extração de Pigmentos Microbianos

Embora os métodos convencionais de ruptura celular apresentem boa eficiência, muitos deles ainda dependem do uso intensivo de solventes orgânicos ou condições operacionais severas. Dessa forma, nos últimos anos, diversas tecnologias alternativas têm sido investigadas com o objetivo de tornar os processos de extração mais sustentáveis e ambientalmente compatíveis.

Entre essas estratégias destacam-se a extração com líquidos iônicos, fluidos supercríticos, alta pressão, campos elétricos pulsados e sistemas aquosos bifásicos.

Líquidos iônicos apresentam diversas vantagens, incluindo baixa inflamabilidade, elevada capacidade de dissolução e possibilidade de ajuste estrutural por meio da combinação de diferentes ânions e cátions (Rajendran et al. 2023). Na recuperação de carotenoides

intracelulares, esses solventes atuam como agentes de lise altamente eficientes, especialmente em leveduras com paredes celulares mais resistentes (Mussagy et al. 2019b). Estudos demonstraram que diferentes líquidos iônicos possibilitam a recuperação de carotenoides como β -caroteno, torularrodina e toruleno a partir de *Rhodotorula glutinis* (Mussagy et al. 2019a).

A extração por fluidos supercríticos também tem se destacado como uma técnica promissora. Nessa abordagem, substâncias são submetidas a condições de temperatura e pressão superiores ao seu ponto crítico, adquirindo propriedades intermediárias entre líquidos e gases, o que aumenta sua capacidade de solubilizar compostos orgânicos (Rajendran et al. 2023). Essa técnica tem sido aplicada com sucesso na extração de astaxantina de *Haematococcus pluvialis*, demonstrando potencial para aplicações industriais (Vardanega et al. 2022).

Outra abordagem promissora é a extração assistida por alta pressão, na qual o caldo de cultura é submetido à homogeneização sob pressão elevada, promovendo a ruptura celular e a liberação de metabólitos intracelulares (Dias et al. 2022). Técnicas baseadas em campos elétricos pulsados (PEF) também têm sido utilizadas para promover eletroporação da membrana celular, facilitando a liberação de carotenoides (Rajendran et al. 2023).

A combinação de diferentes tecnologias pode aumentar significativamente o rendimento de extração. Estudos comparativos demonstraram que líquidos iônicos, HCl e microfluidização de alta pressão apresentam elevada eficiência na ruptura celular, permitindo recuperar mais de 80% de astaxantina (Liu et al. 2018).

2.4.5 Métodos Específicos de Extração de Pigmentos Microbiano

Embora as tecnologias de extração descritas anteriormente possam ser aplicadas a diferentes pigmentos microbianos, as propriedades físico-químicas específicas de cada composto frequentemente exigem adaptações nos métodos utilizados. Assim, diferentes estratégias têm sido desenvolvidas para a extração eficiente de pigmentos específicos, como carotenoides, piocianina, prodigiosina e melanina.

2.4.5.1 Carotenoides

Como a maioria dos carotenoides microbianos é intracelular e hidrofóbica, sua extração geralmente envolve solventes orgânicos e etapas adicionais de ruptura celular (Saini and Keum

2018). A presença simultânea de carotenoides com diferentes polaridades pode tornar o processo de extração mais complexo (Saini and Keum 2017).

A saponificação é frequentemente utilizada como etapa prévia à análise cromatográfica para remover carotenoides esterificados, embora condições inadequadas possam resultar na degradação dos pigmentos (Papapostolou et al. 2023).

2.4.5.2 Piocianina

A extração de piocianina baseia-se principalmente em extração líquido-líquido utilizando solventes orgânicos como clorofórmio, diclorometano ou acetato de etila (Honselmann Genannt Humme et al. 2025). A variação do pH da solução influencia diretamente a solubilidade do pigmento, permitindo sua transferência entre fases aquosa e orgânica (Abdelaziz et al. 2023).

2.4.5.3 Pigmentos de *Monascus*

Os pigmentos produzidos por *Monascus* são geralmente extraídos com solventes orgânicos, especialmente etanol, cuja eficiência e menor toxicidade o tornam uma alternativa amplamente utilizada (Ghosh et al. 2024). Variáveis operacionais como tempo de extração, concentração do solvente e razão sólido-líquido influenciam significativamente o rendimento do processo (Kumar Shetty et al. 2021).

2.4.5.4 Prodigiosina

A prodigiosina é um pigmento altamente hidrofóbico cuja extração envolve geralmente solventes orgânicos como clorofórmio, acetona ou metanol (Liu et al. 2021). Sistemas aquosos bifásicos têm sido investigados como alternativa eficiente e de baixo custo para sua recuperação (Jaffer et al. 2021).

2.4.5.5 Melanina

A extração de melanina pode envolver precipitação ácida, extração alcalina ou técnicas assistidas por ultrassom e micro-ondas (El-Bialy et al. 2019; Lu et al. 2014). Devido à sua baixa solubilidade na maioria dos solventes orgânicos, diferentes abordagens têm sido investigadas

para melhorar a eficiência do processo (Ghadge et al. 2022). Solventes alternativos, como hidróxido de tetrabutilamônio, têm demonstrado maior eficiência e sustentabilidade em comparação com métodos convencionais (Ghadge et al. 2022a).

2.5 VIABILIDADE ECONÔMICA, APLICAÇÕES E POTENCIAL DE MERCADO DOS PIGMENTOS MICROBIANOS

A valorização de resíduos tem se destacado como uma estratégica alternativa, oferecendo o benefício duplo de reduzir o acúmulo de descartes e viabilizar a produção sustentável de produtos de valor agregado. Quando não aproveitados, esses resíduos contribuem para o aumento da carga global de descartes, estimada em 3,4 bilhões de toneladas métricas até 2050 (Kaza et al., 2018). Avanços recentes evidenciam o potencial desses resíduos como substratos para a geração de uma ampla gama de bioprodutos, incluindo enzimas, produtos químicos de plataforma e moléculas bioativas. De forma análoga, a utilização desses resíduos como fontes de nutrientes para o cultivo microbiano e produção de pigmentos configura uma estratégia que integra benefícios ambientais a um modelo economicamente sustentável em consonância com os princípios da bioeconomia circular (Grewal et al., 2022).

Aliada a isso, a viabilidade econômica da produção de pigmentos microbianos tem se destacado quando em comparação ao crescimento do mercado global de corantes naturais e da necessidade de alternativas sustentáveis aos pigmentos sintéticos. Os pigmentos de origem microbiana estão emergindo rapidamente e o crescimento de mercado é impulsionado principalmente pela crescente demanda do consumidor por produtos naturais e com rótulos limpos, especialmente nos setores de alimentos e bebidas e cosméticos. O mercado global de pigmentos biológicos, incluindo pigmentos advindos de microrganismos, foi avaliado em cerca de USD 3,5 bilhões em 2025, com previsão de alcançar aproximadamente USD 6,2 bilhões até 2034, com uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) em torno de 6,3%, impulsionado pela crescente demanda por produtos naturais e sustentáveis (24 CHEMICAL RESEARCH, 2026). Especificamente, o segmento de pigmentos obtidos por fermentação microbiana apresenta crescimento ainda mais acelerado, com estimativas indicando aumento de USD 1,11 bilhão em 2025 para USD 2,26 bilhões até 2032, correspondendo a uma CAGR de 10,7% (360iResearch, 2026).

Do ponto de vista de mercado, os pigmentos microbianos não se limitam a conferir coloração, apresentando também propriedades biológicas relevantes para as indústrias cosmética, alimentícia e farmacêutica (Lopes and Ligabue-Braun 2021). Entre eles, os

carotenoides desempenham múltiplas funções na saúde humana, sendo seu principal efeito a atividade antioxidante (Sharma et al. 2024).

Além disso, esses pigmentos exibem várias propriedades terapêuticas, como atividades antiinflamatórias, imunomoduladoras, anticancerígenas e antiobesidade, bem como efeitos cardiovasculares e neurodegenerativas (Sundararajan and Ramasamy 2024).

Diversas pesquisas apontam os pigmentos microbianos abordados nesta revisão como agentes potenciais em diferentes áreas, incluindo aquicultura, agricultura, biossensores e medicina. A piocianina apresenta atividades antioxidantes, antimicrobianos, anticancerígenos, antidegenerativos, entre outras (Abdelaziz et al. 2023). Os pigmentos de *Monascus*, tradicionalmente usados como corantes naturais seguros em países asiáticos devido à sua coloração e propriedades antibacterianas, vêm sendo estudados quanto aos seus efeitos hepatoprotetores, antioxidantes e anticancerígenos (Gong et al. 2023). A prodigiosina destaca-se por um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo antibacteriana, antifúngica, algicida, anti-Chagas, antiamebiana, antimalárica, anticâncer, antiparasitária, antiviral e/ou imunossupressora (Islan et al. 2022; Mnif et al. 2022).

A melanina possui propriedades como biomaterial para dispositivos eletrônicos orgânicos, além de efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, fotoprotetor. Na indústria de materiais de embalagem, filmes finos desenvolvidos a partir de carvacrol e melanina fúngica têm sido comercializados com sucesso, oferecendo uma alternativa sustentável aos filmes plásticos para embalagens verdes e alimentícias (Suthar et al. 2023). Essa amplitude de propriedades dos pigmentos funcionais evidencia o potencial de aplicação dos pigmentos microbianos e seu valor econômico significativo.

Além disso, fatores como rendimento do processo, eficiência de extração e escalabilidade industrial influenciam diretamente a competitividade econômica dos pigmentos microbianos. Tecnologias avançadas de fermentação e otimização de processos vêm sendo desenvolvidas para aumentar a produtividade e reduzir custos, tornando esses pigmentos cada vez mais viáveis frente aos sintéticos.

Do ponto de vista regulatório, a crescente restrição ao uso de corantes sintéticos tem desempenhado um papel central na expansão do mercado de pigmentos naturais e microbianos. O uso de pigmentos microbianos já é permitido em diferentes regiões do mundo, desde que atendam aos critérios de segurança estabelecidos. Na União Europeia, os corantes alimentares são regulamentados pelo Regulamento (CE) nº 1333/2008, sendo autorizados apenas após avaliação da *European Food Safety Authority* (EFSA). Nesse contexto, diversos pigmentos de origem microbiana já são aprovados, incluindo o β -caroteno e licopeno produzidos pelo fungo

Blakeslea trispora e β -caroteno de *Dunaliella salina* (Rodriguez-Amaya et al., 2023). Esses compostos podem ser utilizados em diferentes categorias de alimentos, desde que respeitados os limites e especificações técnicas estabelecidos pela legislação europeia.

Nos Estados Unidos, a utilização de corantes é regulada pela *Food and Drug Administration* (FDA) sendo obrigatória a aprovação prévia para uso em alimentos, medicamentos e cosméticos e o consumo e a comercialização de alguns pigmentos derivados de microrganismos já se encontram aprovados, como o *Arpink Red*, produzido por *Penicillium oxalicum* e a astaxantina produzida por *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Barreto et al., 2023).

No Brasil, o uso de aditivos alimentares segue um sistema de listas positivas, no qual apenas substâncias previamente avaliadas e autorizadas podem ser utilizadas, conforme estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária por meio da RDC nº 778/2023, que estabelece as diretrizes gerais para aditivos alimentares, e pela lista de substâncias autorizadas constantes na IN nº 211/2023, com as atualizações vigentes da IN nº 369/2025. Isso implica que novos pigmentos microbianos só podem ser incorporados após rigorosa avaliação de segurança, frequentemente baseada em referências internacionais como o *Codex Alimentarius*, a *European Food Safety Authority* (EFSA) e a *Food and Drug Administration* (FDA) (ANVISA 2025).

Entretanto, apesar da existência de pigmentos microbianos já aprovados, muitos compostos ainda estão em fase de avaliação regulatória, especialmente aqueles derivados de fungos e bactérias não tradicionalmente utilizados na alimentação. Na União Europeia, novos pigmentos podem ser enquadrados como novos alimentos, exigindo avaliação adicional antes da aprovação comercial (Karunathana et al., 2025). Assim, embora as regulamentações representem uma barreira inicial à introdução de novos pigmentos, elas também impulsionam o desenvolvimento de compostos seguros e de alta qualidade, alinhados à crescente demanda por produtos “rótulo limpo”.

2.6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A produção de pigmentos microbianos representa um campo biotecnológico em rápida expansão, impulsionado pelo interesse em soluções sustentáveis e economicamente viáveis. Apesar do seu elevado potencial industrial, a extração continua sendo um desafio, frequentemente dependente de solventes orgânicos tóxicos, o que limita a sustentabilidade e a segurança dos produtos. O desenvolvimento de métodos de extração limpos e eficientes é,

portanto, crucial para preservar a integridade química e funcionalidade dos pigmentos, viabilizando sua aplicação em alimentos, cosméticos e farmacêuticos.

A utilização de resíduos agroindustriais como substratos oferece uma abordagem estratégica convertendo subprodutos abundantes e de baixo valor em pigmentos de alto valor agregado. Essa estratégia contribui para a redução de custos, substituição de corantes artificiais e promoção de práticas de produção mais limpas, alinhando-se aos princípios da bioeconomia circular.

Para a consolidação industrial, é necessário superar desafios técnicos, incluindo métodos de extração menos poluentes, estabilidade dos pigmentos, a remoção de metabólitos indesejáveis e a garantia da inocuidade dos produtos finais. Essas estratégias combinam benefícios econômicos, ambientais e sociais, abrindo perspectivas para a inovação e aplicação industrial de pigmentos microbianos.

REFERÊNCIAS

- ABDELAZIZ, Ahmed A. *et al.* Pseudomonas aeruginosa's greenish-blue pigment pyocyanin: its production and biological activities. **Microbial Cell Factories**, v. 22, n. 1, p. 110, 8 jun. 2023.
- ABDUL MANAS, Nor Hasmaliana *et al.* Effects of oil substrate supplementation on production of prodigiosin by Serratia nematodiphila for dye-sensitized solar cell. **Journal of Biotechnology**, v. 317, p. 16–26, jun. 2020.
- AKULAVA, Volha *et al.* Screening for pigment production and characterization of pigment profile and photostability in cold-adapted Antarctic bacteria using FT-Raman spectroscopy. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 450, p. 115461, maio 2024.
- ASHENAFI, Eyosias L. *et al.* Spectral properties and stability of selected carotenoid and chlorophyll compounds in different solvent systems. **Food Chemistry Advances**, v. 2, p. 100178, out. 2023.
- ASITOK, Atim *et al.* Stochastic modeling and meta-heuristic multivariate optimization of bioprocess conditions for co-valorization of feather and waste frying oil toward prodigiosin production. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 53, n. 6, p. 690–703, 3 jul. 2023.
- BANERJEE, Somak; SARKAR, Anwesha; RAO, K. V. Bhaskara. Extraction and characterization of carotenoid pigments with antioxidant and antibacterial potential from marine yeast Rhodotorula sp. KSB1. **International Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 137–156, 15 maio 2024.
- BAS, Tomas Gabriel *et al.* Economic–Financial Assessment of Seawater Desalination Plants in Northern Chile to Reduce Hydric Scarcity and a Proposal for the Environmental and Sustainable Use of Brine Waste by Cultivating the Microalga Dunaliella salina to Produce β -Carotene. **Processes**, v. 11, n. 6, p. 1668, 30 maio 2023.
- BRAHMA, Daiji; DUTTA, Debjani. Antioxidant property of beta-cryptoxanthin produced by Kocuria marina DAGII. **Materials Today: Proceedings**, v. 57, p. 1833–1837, 2022.
- CAMPANHOL, Beatriz Silva *et al.* Improvement of DOPA-Melanin Production by Aspergillus nidulans Using Eco-Friendly and Inexpensive Substrates. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 7, p. 714, 29 jun. 2023.
- CECCHIN, Michela *et al.* Astaxanthin and eicosapentaenoic acid production by S4, a new mutant strain of Nannochloropsis gaditana. **Microbial Cell Factories**, v. 21, n. 1, p. 117, dez. 2022.
- CHANG, P. C.; BLACKWOOD, A. C. Simultaneous production of three phenazine pigments by Pseudomonas aeruginosa Mac 436. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 439–444, 1 maio 1969.
- CHENG, Yu-Ting; YANG, Chu-Fang. Using strain Rhodotorula mucilaginosa to produce carotenoids using food wastes. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 61, p. 270–275, abr. 2016.

CHOI, Kwon-Young. Bioprocess of Microbial Melanin Production and Isolation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 765110, 16 nov. 2021.

CHOKSI, Janki; VORA, Jaykant; SHRIVASTAVA, Neeta. Bioactive Pigments from Isolated Bacteria and Its Antibacterial, Antioxidant and Sun Protective Application Useful for Cosmetic Products. **Indian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 379–382, set. 2020.

CHUYEN, Hoang V. *et al.* Microwave-assisted extraction and ultrasound-assisted extraction for recovering carotenoids from Gac peel and their effects on antioxidant capacity of the extracts. **Food Science & Nutrition**, v. 6, n. 1, p. 189–196, jan. 2018.

DA SILVA, Josevan *et al.* Effect of supplementation, temperature and pH on carotenoids and lipids production by *Rhodotorula mucilaginosa* on sisal bagasse hydrolyzate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 30, p. 101847, nov. 2020a.

DA SILVA, Sabrina Roberta Santana *et al.* Reutilization of residual glycerin for the produce β -carotene by *Rhodotorula minuta*. **Biotechnology Letters**, v. 42, n. 3, p. 437–443, mar. 2020b.

DADACHOVA, Ekaterina *et al.* Ionizing Radiation Changes the Electronic Properties of Melanin and Enhances the Growth of Melanized Fungi. **PLoS ONE**, v. 2, n. 5, p. e457, 23 maio 2007.

DE ARRUDA, Gabriel Leda *et al.* Biopigments production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using cells of *Monascus ruber* immobilized in polyurethane foam. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 8, p. 289, ago. 2025.

DI SALVO, Eleonora *et al.* Natural Pigments Production and Their Application in Food, Health and Other Industries. **Nutrients**, v. 15, n. 8, p. 1923, 16 abr. 2023.

DIAS, Carla *et al.* Direct lipid and carotenoid extraction from *Rhodospiridium toruloides* broth culture after high pressure homogenization cell disruption: Strategies, methodologies, and yields. **Biochemical Engineering Journal**, v. 189, p. 108712, dez. 2022.

DÍEZ, Blanca Hey; TORRES, Cristiana A. V.; GAUDÊNCIO, Susana P. Actinomycete-Derived Pigments: A Path Toward Sustainable Industrial Colorants. **Marine Drugs**, v. 23, n. 1, p. 39, 13 jan. 2025.

DONG, Caihong; YAO, Yijian. Isolation, characterization of melanin derived from *Ophiocordyceps sinensis*, an entomogenous fungus endemic to the Tibetan Plateau. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 4, p. 474–479, abr. 2012.

DZAH, Courage Sedem; DZIGBOR, Aaron. Ultrasound assisted extraction: A relook at solvent to material ratio, its effects on process efficiency and how it can be exploited for different uses. v. 46, n. 7, p. e14339, 2023.

EGEA, Mariana Buranelo *et al.* The potential, strategies, and challenges of *Monascus* pigment for food application. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 7, p. 1141644, 23 mar. 2023.

ELBARGISY, Rehab Mohammed. Optimization of nutritional and environmental conditions for pyocyanin production by urine isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 993–1000, jan. 2021.

EL-BIALY, Heba A. *et al.* Microbial melanin physiology under stress conditions and gamma radiation protection studies. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 162, p. 178–186, set. 2019.

EL-FOULY, M. Z. *et al.* Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 8, n. 1, p. 36–48, jan. 2015.

EL-NAGGAR, Noura El-Ahmady; SABER, WesamEldin I. A. Natural Melanin: Current Trends, and Future Approaches, with Especial Reference to Microbial Source. **Polymers**, v. 14, n. 7, p. 1339, 25 mar. 2022.

ESKANDARI, S.; ETEMADIFAR, Z. Melanin biopolymers from newly isolated *Pseudomonas koreensis* strain UIS 19 with potential for cosmetics application, and optimization on molasses waste medium. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 3, p. 1331–1343, set. 2021.

FARAAG, Ahmed Hassan Ibrahim; EL-BATAL, Ahmed I.; EL-HENDAWY, Hoda H. Characterization of prodigiosin produced by *Serratia marcescens* strain isolated from irrigation water in Egypt. v. 15, n. 5, p. 55–68, 2017.

FENG, Yanli; SHAO, Yanchun; CHEN, Fusheng. Monascus pigments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 6, p. 1421–1440, dez. 2012.

GARCIA-CORTES, Alejandra *et al.* Pigment Production Improvement in *Rhodotorula mucilaginosa* AJB01 Using Design of Experiments. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 387, 14 fev. 2021.

GEDELA, Ravi *et al.* High yield production of lipid and carotenoids in a newly isolated *Rhodotorula mucilaginosa* by adapting process optimization approach. **Biofuels**, v. 14, n. 5, p. 509–520, 28 maio 2023.

GHADGE, Vishal *et al.* Facile Alternative Sustainable Process for the Selective Extraction of Microbial Melanin. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 10, n. 8, p. 2681–2688, 28 fev. 2022.

GHOSH, Sandip; CHAKRABORTY, Abhinaba; DAM, Bomba. Improved yield of UV and heat-stable *Monascus* yellow pigment by statistical optimization of solid-state fermentation conditions and extraction process. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 98, p. 103859, dez. 2024.

GÓMEZ-MARÍN, Ana M.; SÁNCHEZ, Carlos I. Thermal and mass spectroscopic characterization of a sulphur-containing bacterial melanin from *Bacillus subtilis*. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 356, n. 31–32, p. 1576–1580, jul. 2010.

GONÇALVES, Thiago; VASCONCELOS, Ulrich. Colour Me Blue: The History and the Biotechnological Potential of Pyocyanin. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 927, 10 fev. 2021.

GONG, Pengfei *et al.* Recent advances in monascus pigments produced by *Monascus purpureus*: Biosynthesis, fermentation, function, and application. **LWT**, v. 185, p. 115162, ago. 2023.

GREWAL, Jasneet *et al.* Colorful Treasure From Agro-Industrial Wastes: A Sustainable Chassis for Microbial Pigment Production. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 832918, 31 jan. 2022.

GUPTA, Mahiti *et al.* Natural pigments: recent advances and challenges in production and application. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, p. 1–20, 5 fev. 2026.

HALL, Susan *et al.* Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. **Toxins**, v. 8, n. 8, p. 236, 9 ago. 2016.

HAN, Rui *et al.* High-level production of microbial prodigiosin: A review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 506–523, jun. 2021.

HARITH, Zuharlida Tuan *et al.* Optimised Production and Extraction of Astaxanthin from the Yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 430, 19 mar. 2020.

HONSELMANN GENANNT HUMME, Joanna *et al.* The Comparison of Typical Organic Solvents and Ionic Liquid for More Environmentally and User-Friendly Pyocyanin Extraction. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 64, n. 1, p. 781–787, 8 jan. 2025.

HU, W. L. *et al.* Isolation and Characterization of Extracellular Melanin Produced by *Chroogomphus rutilus* D447. v. 10, n. 2, p. 68–77, 2015.

HYOICHIRO, Sakurai *et al.* Studies on Microbial Utilization of Petroleum. I. Separation and Characterization of Carotenoids Produced by a Species of *Brevibacterium* in Hydrocarbon Media. v. 44, n. 2, 1971.

IBRAHIM, Ghada S. *et al.* Bio-production and characterization of carotenoid yellow pigment from *Kocuria* sp. GMA and exploring its sustainable antioxidant, antimicrobial and antibiofilm properties. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 67, n. 8, p. 57–68, 1 ago. 2024.

ISLAN, German A. *et al.* Prodigiosin: a promising biomolecule with many potential biomedical applications. **Bioengineered**, v. 13, n. 6, p. 14227–14258, jun. 2022.

JABŁOŃSKA, Joanna *et al.* The influence of nanomaterials on pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Nanoscience**, v. 12, n. 6, p. 1929–1940, jun. 2022.

JABŁOŃSKA, Joanna *et al.* The two faces of pyocyanin - why and how to steer its production? **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 103, abr. 2023.

JAFFER, Zahraa Mohammed; HAMEED, Khalid W.; IMRAN, Sahar Ghazi. Extraction of prodigiosin using aqueous two phase system. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 1076, n. 1, p. 012026, 1 fev. 2021.

KAHRAMAN, Hüseyin; KARADERI, Cennet. Pyocyanine Production, Twitching Motility and Hydrophobicity of Different Wastes on *Pseudomonas aeruginosa*. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 30, n. 2, p. 1641–1645, 5 fev. 2021.

KORDJAZI, Talayeh *et al.* Streptomyces as Microbial Cell Factories for the Biotechnological Production of Melanin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 5, p. 3013, 5 mar. 2024.

KUHN, R. *et al.* Indigoidine and Other Bacterial Pigments Related to 3,3'-Bipyridyl. v. 51, p. 71–84, 1965.

KUMAR SHETTY, Anala Vinay *et al.* Production and extraction of red pigment by solid-state fermentation of broken rice using *Monascus sanguineus* NFCCI 2453. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 33, p. 101964, maio 2021.

LAKSHMIDEVI, Rajendran *et al.* Valorisation of molasses by oleaginous yeasts for single cell oil (SCO) and carotenoids production. **Environmental Technology & Innovation**, v. 21, p. 101281, fev. 2021.

LEBEAU, Juliana *et al.* Alternative Extraction and Characterization of Nitrogen-Containing Azaphilone Red Pigments and Ergosterol Derivatives from the Marine-Derived Fungal *Talaromyces* sp. 30570 Strain with Industrial Relevance. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, p. 1920, 3 dez. 2020.

LIU, Dan *et al.* Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds — A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 36, p. 181–192, ago. 2016.

LIU, Jun *et al.* Cost-effective pigment production by *Monascus purpureus* using rice straw hydrolysate as substrate in submerged fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 129, n. 2, p. 229–236, fev. 2020.

LIU, Weijie *et al.* An in situ extractive fermentation strategy for enhancing prodigiosin production from *Serratia marcescens* BWL1001 and its application to inhibiting the growth of *Microcystis aeruginosa*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 166, p. 107836, fev. 2021.

LIU, Zhi-Wei *et al.* The efficiency and comparison of novel techniques for cell wall disruption in astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis*. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 53, n. 9, p. 2212–2219, set. 2018.

LOPES, Fernanda Cortez; LIGABUE-BRAUN, Rodrigo. Agro-Industrial Residues: Eco-Friendly and Inexpensive Substrates for Microbial Pigments Production. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 589414, 18 mar. 2021.

LÓPEZ, Gerson-Dirceu *et al.* Bacterial Carotenoids: Extraction, Characterization, and Applications. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1239–1262, 18 ago. 2023.

LU, Ying *et al.* Isolation, Purification, and Anti-Aging Activity of Melanin from *Lachnum singermanum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 2, p. 762–771, set. 2014.

- MACHADO, Whallans Raphael Couto *et al.* Optimization of agro-industrial coproducts (molasses and cassava wastewater) for the simultaneous production of lipids and carotenoids by *Rhodotorula mucilaginosa*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 42, p. 102342, jul. 2022.
- MAPELLI-BRAHM, Paula *et al.* Microalgae, Seaweeds and Aquatic Bacteria, Archaea, and Yeasts: Sources of Carotenoids with Potential Antioxidant and Anti-Inflammatory Health-Promoting Actions in the Sustainability Era. **Marine Drugs**, v. 21, n. 6, p. 340, 1 jun. 2023.
- MARIUTTI, Lilian R. B.; MERCADANTE, Adriana Z. Carotenoid esters analysis and occurrence: What do we know so far? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 648, p. 36–43, jun. 2018.
- MARTÍNEZ, J. M. *et al.* Evaluation of pulsed electric fields technology for the improvement of subsequent carotenoid extraction from dried *Rhodotorula glutinis* yeast. **Food Chemistry**, v. 323, p. 126824, set. 2020.
- MATHEW, Dayana; BHAT, Sarita G. Statistical design for biogenesis of melanin nanoparticles from producer strain *Pseudomonas stutzeri* BTCZ 109 through Taguchi DOE. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 42, p. 102366, jul. 2022.
- MAURYA, Anisha *et al.* Effect of Amino Acid Supplementation on Prodigiosin and its Derivatives Production Using Agro-Waste as Potential Substrate. **Indian Journal of Microbiology**, 31 jul. 2024.
- MEHRI, Dilara; PERENDECI, N. Altinay; GOKSUNGUR, Yekta. Utilization of Whey for Red Pigment Production by *Monascus purpureus* in Submerged Fermentation. **Fermentation**, v. 7, n. 2, p. 75, 10 maio 2021.
- MENDES-SILVA, Tayane De Cássia Dias *et al.* Biotechnological Potential of Carotenoids Produced by Extremophilic Microorganisms and Application Prospects for the Cosmetics Industry. **Advances in Microbiology**, v. 10, n. 08, p. 397–410, 2020.
- MENDES-SILVA, Tayane De Cássia Dias *et al.* Production of carotenoid sarcinaxanthin by *Kocuria palustris* isolated from Northeastern Brazil Caatinga soil and their antioxidant and photoprotective activities. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 44–53, set. 2021.
- METWALLY, Rasha A. *et al.* Optimization and multiple in vitro activity potentials of carotenoids from marine *Kocuria* sp. RAM1. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 18203, 28 out. 2022.
- MEYER, Jean-Marie. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. **Archives of Microbiology**, v. 174, n. 3, p. 135–142, 30 ago. 2000.
- MICHAEL, Helan Soundra Rani *et al.* Melanin biopolymers from microbial world with future perspectives—a review. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 9, p. 306, 14 ago. 2023.
- MIGLANI, Kanika *et al.* Sustainable production of prodigiosin from rice straw derived xylose by using isolated *Serratia marcescens* (CMS 2): statistical optimization, characterization, encapsulation & cost analysis. **Sustainable Food Technology**, v. 1, n. 6, p. 837–849, 2023.

MNIF, Sami *et al.* Prodigiosin from *Serratia*: Synthesis and potential applications. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 12, n. 6, p. 233–242, jun. 2022.

MOLINO, Antonio *et al.* Extraction of astaxanthin from microalga *Haematococcus pluvialis* in red phase by using generally recognized as safe solvents and accelerated extraction. **Journal of Biotechnology**, v. 283, p. 51–61, out. 2018.

MORADI, Samira; MORTAZAVI, Seyed Ali. Evaluation of *Monascus purpureus* fermentation in dairy sludge-based medium for enhanced production of vibrant red pigment with minimal citrinin content. **PLOS ONE**, v. 19, n. 12, p. e0315006, 9 dez. 2024.

MÜJDECI, GAMZE NUR. Natural Melanin Synthesized by *Aureobasidium pullulans* Using Food Wastes and its Characterization: Characterization of natural melanin produces by *Aureobasidium pullulans*. **Applied Food Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 307–318, 2 out. 2021.

MÜJDECI, Gamze Nur. Experimental modeling and optimization of melanin production by *Aureobasidium pullulans* NBRC 100716 in carrot peel extract. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 41, n. 6, p. e13919, nov. 2022.

MUKHERJEE, Gunjan; SINGH, Sanjay Kumar. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 188–192, jan. 2011.

MUSSAGY, Cassamo U. *et al.* Protic Ionic Liquids as Cell-Disrupting Agents for the Recovery of Intracellular Carotenoids from Yeast *Rhodotorula glutinis* CCT-2186. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, n. 19, p. 16765–16776, 7 out. 2019a.

MUSSAGY, Cassamo U. *et al.* Selective recovery and purification of carotenoids and fatty acids from *Rhodotorula glutinis* using mixtures of biosolvents. **Separation and Purification Technology**, v. 266, p. 118548, jul. 2021.

MUSSAGY, Cassamo U. *et al.* Recovery of β -carotene and astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* biomass using aqueous solutions of cholinium-based ionic liquids. **Separation and Purification Technology**, v. 290, p. 120852, jun. 2022a.

MUSSAGY, Cassamo U. *et al.* Production of natural astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* and its potential application in textile dyeing. **Biochemical Engineering Journal**, v. 187, p. 108658, nov. 2022b.

MUSSAGY, Cassamo U. *et al.* Tailor-made solvents for microbial carotenoids recovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 1, p. 234, dez. 2024.

MUSSAGY, Cassamo Ussemane *et al.* Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 3, p. 1095–1114, fev. 2019b.

NEMER, Georgio *et al.* Mechanical Cell Disruption Technologies for the Extraction of Dyes and Pigments from Microorganisms: A Review. **Fermentation**, v. 7, n. 1, p. 36, 9 mar. 2021.

NGUYEN, Thi Hanh; WANG, San-Lang; NGUYEN, Van Bon. Recent Advances in Eco-Friendly and Scaling-Up Bioproduction of Prodigiosin and Its Potential Applications in Agriculture. **Agronomy**, v. 12, n. 12, p. 3099, 7 dez. 2022.

NGUYEN, Thi-Hanh *et al.* Bioprocessing of Marine Chitinous Wastes for the Production of Bioactive Prodigiosin. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3138, 24 maio 2021.

NIERO, Henrique *et al.* Carotenoids produced by the deep-sea bacterium *Erythrobacter citreus* LAMA 915: detection and proposal of their biosynthetic pathway. **Folia Microbiologica**, v. 66, n. 3, p. 441–456, jun. 2021.

NOBY, Nehad; KHATTAB, Sherine N.; SOLIMAN, Nadia A. Sustainable production of bacterioruberin carotenoid and its derivatives from *Arthrobacter agilis* NP20 on whey-based medium: optimization and product characterization. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 10, n. 1, p. 46, 24 jul. 2023.

NUMAN, Muhammad *et al.* Chemical profile and in-vitro pharmacological activities of yellow pigment extracted from *Arthrobacter gandavensis*. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 74–82, dez. 2018.

OCHOA-VIÑALS, Nayra *et al.* Current Advances in Carotenoid Production by *Rhodotorula* sp. **Fermentation**, v. 10, n. 4, p. 190, 30 mar. 2024.

OLIVEIRA, Bianca Teixeira Morais *et al.* Craft beer waste as substrate for pyocyanin synthesis. v. 14, n. 1, p. 21–25, 2019.

PAILLIÈ-JIMÉNEZ, Maria Elisa; STINCONE, Paolo; BRANDELLI, Adriano. Natural Pigments of Microbial Origin. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, p. 590439, 30 set. 2020.

PANTELIC, Lena *et al.* Upcycling of food waste streams to valuable biopigments pyocyanin and 1-hydroxyphenazine. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 171, p. 110322, dez. 2023.

PAPAPOSTOLOU, Harris *et al.* Natural Carotenoids: Recent Advances on Separation from Microbial Biomass and Methods of Analysis. **Antioxidants**, v. 12, n. 5, p. 1030, 29 abr. 2023.

PAREDES CONTRERAS, Beatriz Vivian *et al.* Enhanced UV-B photoprotection activity of carotenoids from the novel *Arthrobacter* sp. strain LAPM80 isolated from King George Island, Antarctica. **Heliyon**, v. 11, n. 1, p. e41400, jan. 2025.

PAUL, Tania *et al.* A comprehensive review on recent trends in production, purification, and applications of prodigiosin. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, n. 4, p. 1409–1431, abr. 2022a.

PAUL, Tania *et al.* Downstream Process Development for Extraction of Prodigiosin: Statistical Optimization, Kinetics, and Biochemical Characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, n. 11, p. 5403–5418, nov. 2022b.

PFANDER, Hanspeter. [1] Carotenoids: An overview. *In: Methods in Enzymology*. [S.l.]: Elsevier, 1992. v. 213 p. 3–13.

PFEIFFER, Thomas; MORLEY, Annabel. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 1, 21 out. 2014.

RAJENDRAN, Poorniammal; SOMASUNDARAM, Prabhu; DUFOSSÉ, Laurent. Microbial pigments: Eco-friendly extraction techniques and some industrial applications. **Journal of Molecular Structure**, v. 1290, p. 135958, out. 2023.

RAM, Shruti *et al.* Bacteria as an alternate biofactory for carotenoid production: A review of its applications, opportunities and challenges. **Journal of Functional Foods**, v. 67, p. 103867, abr. 2020.

RATHER, Luqman Jameel *et al.* Research progress, challenges, and perspectives in microbial pigment production for industrial applications - A review. **Dyes and Pigments**, v. 210, p. 110989, fev. 2023.

RIBEIRO, José Evangelista Santos *et al.* Rhodotorula glutinis cultivation on cassava wastewater for carotenoids and fatty acids generation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101419, nov. 2019.

RIBEIRO, Renata M. M. G. P. *et al.* Synergistic Effects of Stirring and Aeration Rate on Carotenoid Production in Yeast *Rhodotorula toruloides* CCT 7815 Envisioning Their Application as Soap Additives. **Fermentation**, v. 9, n. 9, p. 828, 11 set. 2023.

RUDRAPPA, Muthuraj *et al.* Bioproduction, purification and physicochemical characterization of melanin from *Streptomyces* sp. strain MR28. **Microbiological Research**, v. 263, p. 127130, out. 2022.

SAINI, Ramesh Kumar; KEUM, Young-Soo. Progress in Microbial Carotenoids Production. **Indian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 129–130, mar. 2017.

SAINI, Ramesh Kumar; KEUM, Young-Soo. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. **Food Chemistry**, v. 240, p. 90–103, fev. 2018.

SALAZAR, Oriana; ASENJO, Juan A. Enzymatic lysis of microbial cells. v. 29, n. 7, p. 985–994, 2007.

SANTOS, André Luiz Da Conceição; FERREIRA, Anna Clara Accioly; FIGUEIREDO, José Ricardo De. Potential use of bacterial pigments as anticancer drugs and female reproductive toxicity: a review. **Ciência Animal Brasileira**, v. 23, p. e-72911, 2022.

SAUBENOVA, Margarita *et al.* Production of Carotenoids by Microorganisms. **Fermentation**, v. 10, n. 10, p. 502, 30 set. 2024.

SENA, Amanda Reges De *et al.* Application of Doehlert experimental design in the optimization of experimental variables for the *Pseudozyma* sp. (CCMB 306) and *Pseudozyma* sp. (CCMB 300) cell lysis. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 4, p. 761–767, 2 nov. 2012.

SHARMA, Chikanshi; KAMLE, Madhu; KUMAR, Pradeep. Microbial-Derived Carotenoids and Their Health Benefits. **Microbiology Research**, v. 15, n. 3, p. 1670–1689, 27 ago. 2024.

SHARMA, Rajan; GHOSHAL, Gargi. Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) using agro-industrial waste in bioreactor: A statistical approach. **Biotechnology Reports**, v. 25, p. e00407, mar. 2020.

SHARMA, Rajan; GHOSHAL, Gargi. Characterization and cytotoxic activity of pigment extracted from *Rhodotorula mucilaginosa* to assess its potential as bio-functional additive in confectionary products. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 7, p. 2688–2698, jul. 2021.

SHEN, Hai-Bo *et al.* Enhanced bioelectricity generation by improving pyocyanin production and membrane permeability through sophorolipid addition in *Pseudomonas aeruginosa*-inoculated microbial fuel cells. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 490–494, set. 2014.

SILBIR, Selim; GOKSUNGUR, Yekta. Natural Red Pigment Production by *Monascus Purpureus* in Submerged Fermentation Systems Using a Food Industry Waste: Brewer's Spent Grain. **Foods**, v. 8, n. 5, p. 161, 11 maio 2019.

SILVEIRA, Silvana Terra *et al.* Stability Modeling of Red Pigments Produced by *Monascus purpureus* in Submerged Cultivations with Sugarcane Bagasse. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 4, p. 1007–1014, abr. 2013.

SINHA, Sweta *et al.* Anti-microbial, anti-oxidant, and anti-breast cancer properties unraveled in yeast carotenoids produced via cost-effective fermentation technique utilizing waste hydrolysate. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1088477, 18 jan. 2023.

SOBIN, Ben; STAHLY, Grant L. The Isolation and Absorption Spectrum Maxima of Bacterial Carotenoid Pigments. **Journal of Bacteriology**, v. 44, n. 3, p. 265–276, set. 1942.

SUN, Han *et al.* Microalgae-Derived Pigments for the Food Industry. **Marine Drugs**, v. 21, n. 2, p. 82, 25 jan. 2023.

SUNDARARAJAN, Priya; RAMASAMY, Shanmuga Priya. Current perspectives on industrial application of microbial carotenoid as an alternative to synthetic pigments. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 37, p. 101353, fev. 2024.

SUTHAR, Malika; DUFOSSÉ, Laurent; SINGH, Sanjay K. The Enigmatic World of Fungal Melanin: A Comprehensive Review. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 9, p. 891, 31 ago. 2023.

TERÁN HILARES, Ruly *et al.* Sugarcane bagasse hydrolysate as a potential feedstock for red pigment production by *Monascus ruber*. **Food Chemistry**, v. 245, p. 786–791, abr. 2018.

TERRONES RODRÍGUEZ, Nicole Alejandra *et al.* Optimization of Total Carotenoid Production by *Rhodotorula mucilaginosa* from Artichoke Agroindustrial Waste Using Response Surface Methodology. **Environmental Research, Engineering and Management**, v. 79, n. 2, p. 111–121, 18 jul. 2023.

TRONINA, Tomasz *et al.* Prenylated Flavonoids with Selective Toxicity against Human Cancers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 8, p. 7408, 18 abr. 2023.

TULI, Hardeep S. *et al.* Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 4669–4678, ago. 2015.

UĞURLU, Şenay; GÜNAN YÜCEL, Hande; AKSU, Zümriye. Valorization of food wastes with a sequential two-step process for microbial β -carotene production: A zero waste approach. **Journal of Environmental Management**, v. 340, p. 118003, ago. 2023.

VALDUGA, Eunice *et al.* Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, 2009.

VARDANEGA, Renata; CEREZAL-MEZQUITA, Pedro; VEGGI, Priscilla Carvalho. Supercritical fluid extraction of astaxanthin-rich extracts from *Haematococcus pluvialis*: Economic assessment. **Bioresource Technology**, v. 361, p. 127706, out. 2022.

VENDRUSCOLO, Franciello *et al.* Monascus: a Reality on the Production and Application of Microbial Pigments. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 2, p. 211–223, jan. 2016.

VENIL, Chidambaram Kulandaisamy; DEVI, Ponnuswamy Renuka; AHMAD, Wan Azlina. Agro-Industrial Waste as Substrates for the Production of Bacterial Pigment. *In*: ZAKARIA, Zainul Akmar; BOOPATHY, Ramaraj; DIB, Julian Rafael (Orgs.). **Valorisation of Agro-industrial Residues – Volume I: Biological Approaches**. Applied Environmental Science and Engineering for a Sustainable Future. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 149–162.

VUKASINOVIC-MILIC, Tatjana; RAKIN, Marica; SILER-MARINKOVIC, Slavica. Utilization of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) for the production of yeast extract: Effects of different enzymatic treatments on solid, protein and carbohydrate recovery. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 72, n. 5, p. 451–457, 2007.

WANG, Xin *et al.* Two-Step Optimization for Improving Prodigiosin Production Using a Fermentation Medium for *Serratia marcescens* and an Extraction Process. **Fermentation**, v. 10, n. 2, p. 85, 30 jan. 2024.

WEI, Yu-Hong; YU, Wan-Ju; CHEN, Wei-Chuan. Enhanced undecylprodigiosin production from *Serratia marcescens* SS-1 by medium formulation and amino-acid supplementation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 4, p. 466–471, out. 2005.

YADAV, Kushi; VASHISHT, Manasvi; RAI, Monika Prakash. Employing microalgae cultivation on fruits and vegetable peel waste to produce biofuel, lutein, and biochar concurrently with an “Agro to Agro” algae biorefinery approach. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 32, n. 3, p. 1415–1429, 28 dez. 2024.

YU, Dengbin *et al.* New applications of genetically modified *Pseudomonas aeruginosa* for toxicity detection in water. **Chemosphere**, v. 184, p. 106–111, out. 2017.

YU, Xue *et al.* Purification, Identification, and Properties of a Novel Carotenoid Produced by *Arthrobacter* sp. QL17 Isolated from Mount Qomolangma. **Antioxidants**, v. 11, n. 8, p. 1493, 29 jul. 2022.

ZAKARIA, Zainul Akmar; BOOPATHY, Ramaraj; DIB, Julian Rafael (ORGS.). **Valorisation of Agro-industrial Residues – Volume I: Biological Approaches**. Cham: Springer International Publishing, 2020.

ZHANG, Congqiang; CHEN, Xixian; TOO, Heng-Phon. Microbial astaxanthin biosynthesis: recent achievements, challenges, and commercialization outlook. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 13, p. 5725–5737, jul. 2020.

ZHAO, J. *et al.* Anticancer effects of pyocyanin on HepG2 human hepatoma cells. **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 541–548, jun. 2014.

ZHOU, Jianjun *et al.* Pulsed electric fields (PEF), pressurized liquid extraction (PLE) and combined PEF + PLE process evaluation: Effects on Spirulina microstructure, biomolecules recovery and Triple TOF-LC-MS-MS polyphenol composition. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 77, p. 102989, maio 2022.

ZOU, Yu Mu; XIE, Chunyan; FAN, Gongjan. Optimization of ultrasound-assisted extraction of melanin from Auricularia auricula fruit bodies. v. 11, n. 4, p. 611–615, 2010.

3 CAPÍTULO 2

Produção de Pigmentos Carotenoides por *Rhodotorula mucilaginosa* PSR 34 em Substrato Agroindustrial: Influência da Radiação UV e Potencial Biotecnológico

Resumo

Pigmentos microbianos emergem como alternativa promissora aos sintéticos apresentando, além de menor impacto ambiental, propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenas e fotoprotetivas. A utilização de resíduos agroindustriais como substratos de cultivo contribui para valorização de subprodutos e para a bioeconomia circular. Neste contexto, microrganismos isolados de ambientes extremos exibem potencial elevado para a produção de biomoléculas de interesse. A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* PSR 34, isolada de painéis fotovoltaicos, foi avaliada quanto à produção de carotenoides utilizando melaço de soja como substrato alternativo. Foram comparados meios sintéticos e investigados parâmetros de cultivo, incluindo temperatura e tempo de incubação. O meio YPD, a 15 °C e 168 h, resultou na maior produtividade, alcançando 1,66 mg/L de carotenoides. A exposição à radiação UV-A, UV-B e UV-C, visando a indução do aumento da produção de carotenoides por estresse celular, não promoveu aumento na produção, com concentrações médias de $1,26 \pm 0,12$ mg/L para cepa exposta à radiação UV-C (600 J/m² durante de 3 min e 15 s) e $1,34 \pm 0,12$ mg/L sob radiação ambiental (400 kJ/m² por 120 minutos). As análises espectrais e cromatográficas indicaram a presença majoritária de β -caroteno e toruleno. Os pigmentos exibiram elevada atividade antimicrobiana (> 90%) na concentração de 7,5 mg/L frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Os extratos metanólicos apresentaram capacidade fotoprotetora com FPS $33,04 \pm 0,25$ e atividade antioxidante crescente, com sequestro de DPPH variando de 47,39% (30 min) a 56,07% (60 min). Ensaios de citotoxicidade indicaram viabilidade celular superior a 50% em linhagens 3T3 e HaCaT na presença de 1,4 mg/L de pigmento. Esses resultados evidenciam o potencial biotecnológico desses pigmentos, destacando sua aplicabilidade em diferentes setores industriais e farmacêuticos.

Palavras-Chave: atividade biotecnológica; circularidade; estresse celular; melaço de soja.

Abstract

Microbial pigments are emerging as a promising alternative to synthetic pigments, offering not only a lower environmental impact but also antimicrobial, antioxidant, anticancer, and photoprotective properties. The use of agro-industrial waste as cultivation substrates contributes to the valorization of by-products and to the circular bioeconomy. In this context, microorganisms isolated from extreme environments exhibit high potential for the production of biomolecules of interest. The yeast *Rhodotorula mucilaginosa* PSR 34, isolated from photovoltaic panels, was evaluated for carotenoid production using soybean molasses as an alternative substrate. Synthetic media were compared, and cultivation parameters, including temperature and incubation time, were investigated. The YPD medium, at 15 °C and 168 h, resulted in the highest productivity, reaching 1.66 mg/L of carotenoids. Exposure to UV-A, UV-B, and UV-C radiation, aimed at inducing increased carotenoid production through cellular stress, did not promote increased production, with average concentrations of 1.26 ± 0.12 mg/L for the strain exposed to UV-C radiation (600 J/m² for 3 min and 15 s) and 1.34 ± 0.12 mg/L under ambient radiation (400 kJ/m² for 120 minutes). Spectral and chromatographic analyses indicated the predominant presence of β -carotene and torulene. The pigments exhibited high antimicrobial activity (> 90%) at a concentration of 7.5 mg/L against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans*. Methanolic extracts showed photoprotective capacity with SPF 33.04 ± 0.25 and increasing antioxidant activity, with DPPH scavenging ranging from 47.39% (30 min) to 56.07% (60 min). Cytotoxicity assays indicated cell viability greater than 50% in 3T3 and HaCaT cell lines in the presence of 1.4 mg/L of pigment. These results highlight the biotechnological potential of these pigments, emphasizing their applicability in different industrial and pharmaceutical sectors.

Keywords: biotechnological activity; circularity; cellular stress; soybean molasses.

3.1 INTRODUÇÃO

O interesse pela produção de pigmentos microbianos tem crescido ao longo dos anos devido ao grande interesse pelo uso desses metabólitos em substituição ao uso de pigmentos sintéticos (GUPTA et al., 2026; PAPAPOSTOLOU et al., 2023). Em especial, os carotenoides são um grupo de compostos amplamente utilizados nas indústrias química, farmacêutica e alimentícia (OCHOA-VIÑALS et al., 2024). O mercado de carotenoides vem se expandindo e, com base nas expectativas de especialistas, o mercado global deve atingir US\$ 2,7 bilhões até 2027, a uma taxa de crescimento anual composta de 5,7% para o período de 2022-2027 (BCC Research, 2022). Aplicações biotecnológicas dos carotenoides microbianos tem sido demonstradas por diversos autores como antioxidantes (BANERJEE; SARKAR; RAO, 2024; SERETI et al., 2024b), antitumorais (ZOHARI; SEPAHY; AMINI, 2020), antimicrobianos (BANERJEE; SARKAR; RAO, 2024; NAISI et al., 2023) e protetores solares (PATKI et al., 2021). O gênero *Rhodotorula*, uma das cepas mais estudadas é produtora de pigmentos como β -caroteno, γ -caroteno, licopeno, toruleno e torularodina (OCHOA-VIÑALS et al., 2024).

A produção biotecnológica de carotenoides apresenta potencial para maior viabilidade econômica a partir da redução de custos proporcionada pelo aproveitamento de resíduos ou subprodutos de outros processos biotecnológicos como substrato para microrganismos produtores (RAPOPORT et al., 2021). Esses produtos de alto valor agregado podem ser produzidos a partir de materiais mais acessíveis que, se não utilizados, resultariam em danos ambientais (LOPES; LIGABUE-BRAUN, 2021).

Pesquisas demonstraram o uso de diversas matérias-primas agrícolas e subprodutos industriais para o cultivo de *Rhodotorula sp.*. No entanto, pouca informação está disponível sobre a exploração de melaço de soja na produção de carotenoides por esta levedura.

O melaço de soja é um subproduto gerado na obtenção de proteína concentrada de soja via extração hidroalcóolica, sendo a fração líquida resultante deste processo (RODRIGUES et al., 2020). No Brasil, estima-se que a produção de grãos de soja na safra 2023/2024 está em torno de 297,54 milhões de toneladas (CONAB, 2024). Para cada tonelada de soja processada, obtém-se cerca de 720 kg de farelo, o qual é utilizado para a obtenção de concentrados proteicos, gerando cerca de 190 kg de melaço de soja (SIQUEIRA et al., 2008).

O melaço de soja apresenta elevada concentração de carboidratos solúveis, caracterizando-se como um líquido viscoso, de coloração acastanhada, rico em estaquiase, rafinose e sacarose, além de conter traços de açúcares monoméricos como

glicose, frutose, xilose e galactose (SANCHETI; THOMPSON; JU, 2023). Essas características conferem a esse resíduo potencial para aproveitamento como matéria-prima de baixo custo na produção de biomassa de microrganismos, uma vez que tais nutrientes podem ser assimilados e utilizados nos processos metabólicos dos microrganismos.

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo avaliar a produção de pigmentos por uma cepa de *Rhodotorula mucilaginosa* (PSR 34), isolada de painéis fotovoltaicos, utilizando o melaço de soja como substrato. A radiação ultravioleta foi empregada como estressante celular, visando avaliar seu efeito sobre a produção de carotenoide, uma vez que, em microrganismos, esses compostos desempenham papel fundamental na proteção celular, frente aos efeitos deletérios das formas reativas de oxigênio e da radiação (RAPOPORT et al., 2021). Ademais, com o intuito de explorar potenciais aplicações dos carotenoides produzidos por essa cepa foram avaliadas, atividades biológicas, incluindo a atividade antimicrobiana, foto protetiva, antioxidante e citotóxica. A hipótese testada é que o estresse por radiação UV induz a superexpressão de pigmentos antioxidantes pela cepa *R. mucilaginosa* PSR 34, e que tais compostos exibem atividades biológicas que justificam seu aproveitamento biotecnológico.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Microrganismo

A cepa de *Rhodotorula mucilaginosa* PSR 34 foi isolada previamente de painéis fotovoltaicos da cidade de Sorocaba (-23°28'55", -47°22'19.9") em junho de 2020 e identificada molecularmente por Moura (2021). As condições meteorológicas registradas pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), para o período da coleta foram de temperatura próxima de 19 °C, umidade relativa de 72 %, radiação solar de 311,5 W/m², precipitação de 0,05 mm e temperatura do painel de 43 °C. O painel amostrado estava instalado há dois anos antes da retirada da amostra e sem limpeza prévia (MOURA et al., 2021).

A cepa foi armazenada no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), de 2 a 5 °C em ágar Sabouraud-Dextrose e com subcultivos regulares para manutenção da viabilidade.

3.2.2 Melaço de soja

O melaço de soja utilizado foi cedido pela empresa CJ Selecta de Araguari, Minas Gerais e mantido refrigerado de 2 a 8 °C até sua utilização. Uma diluição em água na proporção 1:5 foi realizada para seu uso como meio de cultivo. A quantificação de monossacarídeos encontrados no melaço foi realizada anteriormente por Amaral (2024): Amostras de melaço diluído foram analisadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) utilizando uma coluna Aminex HPX-87P para quantificar a concentração de sacarose, glicose, xilose, galactose, arabinose, manose e frutose. As análises foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu com detector de índice de refração RI-101 (volume de injeção de 200 µL), conforme descrito por Lazaro et al. (2012), no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos (USP) (AMARAL, 2024).

A análise por HPLC evidenciou que o melaço de soja como um resíduo agroindustrial com significativo teor de carboidratos, é particularmente rico em sacarose (94,33 g/L). Outros açúcares foram identificados incluindo glicose (6,04 g/L), xilose (14,10 g/L), galactose (2,13 g/L) e frutose (5,47 g/L) (AMARAL, AZEVEDO M., 2024). Esses dados confirmam as especificações da ficha técnica emitida pela empresa Selecta, geradora do resíduo (Selecta, 2023).

3.2.3 Produção de pigmentos

3.2.3.1 Preparo do inóculo e condições de cultivo

R. mucilaginosa PSR 34 foi previamente cultivada em placa de Petri contendo ágar Sabouraud-Dextrose a 22,5 °C por 48 horas. Para preparar o inóculo, uma alça calibrada (10 µL) do cultivo foi transferido para 100 mL de meio *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YPD) e incubado por mais 48 horas a 30 °C sob agitação de 150 rpm. A biomassa foi separada por centrifugação (7830 rpm) e o precipitado foi ressuscitado em solução salina estéril (0,85% de NaCl). A concentração do inóculo foi padronizada ajustando a absorbância para 1 a 600 nm em espectrofotômetro UV (MARCELINO et al., 2019). Os ensaios para produção de pigmentos foram inoculados com 10% de suspensão celular (YANG et al., 2024), em erlenmeyer de 500 mL com 100 mL de meio.

3.2.3.2 Determinação das condições de cultivo favoráveis para a produção de pigmentos

A produção de pigmentos pela levedura foi avaliada em dois meios de cultura sintéticos, YPD e meio Kitamoto. Este último apresentou formulação constituída de fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4) (2 g/L), extrato de levedura (10 g/L), nitrato de sódio (NaNO_3) (20 g/L), MgSO_4 (sulfato de magnésio) (2 g/L) e glicose (4 g/L) (KITAMOTO et al., 1990).

Os cultivos foram realizados por um período de sete dias, a 30 °C e agitação de 150 rpm com o objetivo de selecionar as condições mais favoráveis à produção de pigmentos, considerando o tipo de meio e o tempo de cultivo como variáveis independentes, e a concentração de pigmentos (mg/L) como variável resposta.

Após a definição das condições ótimas relacionadas ao meio de cultura sintético e tempo de cultivo, o estudo prosseguiu com a avaliação do um resíduo agroindustrial para a produção de pigmentos. Nessa etapa, a determinação das condições favoráveis de cultivo envolveu a análise das variáveis temperatura (15, 30 e 45 °C) e tipo meio de cultivo (meio de cultura sintético e resíduo agroindustrial). As respostas avaliadas incluíram a produção de pigmentos (mg/L), biomassa seca (mg/L) e consumo de açúcar (%) a fim de se definir a condição mais favorável para a produção de carotenoides.

3.2.3.3 Determinação da biomassa seca e consumo de açúcar

A determinação da biomassa seca (g/L) foi realizada a partir da centrifugação de 5 mL da cultura a 7820 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. O precipitado celular foi submetido a duas lavagens sucessivas com água destilada, seguida de centrifugação nas mesmas condições. Em seguida, o precipitado foi então seco a 60 °C por 24 horas em estufa. Após a secagem, a biomassa foi quantificada e expressa em g/L.

A concentração de açúcares residuais foi determinada pelo método de 3,5-dinitrossalicílico (DNS), conforme descrito por Miller (1959) (MILLER, 1959).

3.2.3.4 Extração e quantificação do pigmento

A extração do pigmento foi realizada de acordo com Garcia-Cortes et al (2021), com modificações. Para isso, 5 mL do cultivo foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente e a biomassa precipitada foi lavada com água destilada. Ressalta-se que

a biomassa seca correspondente à amostra de 5 mL já havia sido previamente quantificada conforme item 3.2.3.3.

O precipitado foi então suspenso com 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e os tubos foram incubados em banho-maria a 55 °C por 1 hora, com homogeneização em vórtex a cada 10 minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi coletado em tubo resfriado e protegido da luz com papel alumínio. O extrato obtido foi armazenado de 2 a 8 °C.

O precipitado foi lavado com 1 mL de acetona resfriada a 5 °C e agitado em vórtex por 15 minutos. Em seguida, realizou-se nova centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante resultante foi combinado com 1 mL de DMSO. Posteriormente, foram adicionados 1,5 mL de solução saturada de NaCl e 1 mL de hexano ao tubo resfriado e a mistura foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto.

A fração de hexano contendo os pigmentos, obtida após centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos, foi transferida para um tubo limpo e protegido da luz com papel alumínio. Os tubos foram armazenados entre 2 a 8 °C até a quantificação dos pigmentos por espectrofotometria UV-visível, utilizando o hexano como branco. A concentração de carotenoides foi determinada conforme a Equação (1): (GARCIA-CORTES et al., 2021).

$$Carotenoides\ totais\ (\mu g/g) = \frac{DO \times Volume\ (mL) \times 10^4 \mu g/mL}{CE \times Biomassa\ (g)}$$

(1)

Onde:

DO = Densidade ótica a 485 nm;

Volume = volume do reagente de extração em mL;

CE = Coeficiente de extinção do hexano = 2592;

Biomassa = Massa seca da amostra em g.

3.2.4 Caracterização do pigmento extraído

3.2.4.1 Espectrofotometria UV-visível

Para confirmar a presença de carotenoide, o pigmento extraído foi analisado por espectrofotômetro UV-visível, com uma varredura dos picos máximos de absorbância entre 200 e 600 nm (SHARMA; GHOSHAL, 2021).

3.2.4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Os carotenoides foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Shimadzu - LC 20AD), em uma coluna C18 Shimadzu® Shim-pack (4,6 × 250 mm), utilizando como fase móvel um gradiente de metanol/acetonitrilo/diclorometano (60:10:30, v/v/v) com vazão de 1,0 mL/min e a temperatura da coluna foi ajustada em 30 °C. Os carotenoides correspondentes foram determinados usando detector UV-Vis em $\lambda_{\text{máx}}$ 450 nm. A identificação de β -caroteno e torularodina, frações amarela e vermelha, respectivamente, foi realizada por comparação com padrões anteriores de tempo de retenção (com alto nível de pureza) sob as mesmas condições experimentais (MUSSAGY et al., 2021).

3.2.4.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia FTIR foi empregada para caracterizar os grupos funcionais do pigmento extraído. O extrato foi então analisado em equipamento Agilent modelo Cary 630, na faixa entre 600 e 4000 cm^{-1} . Para medir a intensidade do pico da amostra, foi utilizado o modo ATR (*Attenuated Total Reflectance*) com 64 scans. Uma gota de amostra foi utilizada para medição da intensidade do pico. Os dados obtidos foram interpretados com base nas bandas características de grupos funcionais presentes em carotenoides, conforme descrito por Mulik, Kumbhar e Bhadekar (2017) e Sharma e Ghoshal (2021).

3.2.5 Efeito da radiação ultravioleta na produção de carotenoide

A cepa selvagem de *R. mucilaginosa* PSR 34 foi submetida à radiação UV-A e UV-B em um simulador de radiação solar e radiação UV-C, no Laboratório de Astrobiologia (Astrolab) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

Inicialmente, a cepa foi cultivada em caldo YPD (pH 6,5) sob agitação de 150 rpm a 25 °C. Após crescimento, as células foram padronizadas a uma absorbância de 1,0 a 600 nm com solução de NaCl 0,85% (p/v). Para a irradiação UV, foram preparadas diluições seriadas da cultura, variando de 10^{-1} até 10^{-5} , e alíquotas de 10 µL de cada diluição foram plaqueadas em ágar Sabouraud-Dextrose.

Para experimentos de exposição UV-C, a irradiação foi conduzida em capela de fluxo laminar utilizando uma lâmpada Philips TUV-20W (254 nm). A irradiância foi calibrada com um radiômetro Vilber Lourmat RMX-3W equipado com fotocélula UV-C (CX-254, Vilber Lourmat), resultando em um fluxo UV-C aproximado de 0,1208 W, considerando a geometria da câmara e a distância entre a lâmpada e a amostra. As doses de UV-C aplicadas variaram de 0 a 600 J/m².

Para simular as condições de exposição em painéis fotovoltaicos, foram realizados testes de irradiação UV. Suspensões microbianas em solução salina 0,85 % com densidade óptica (DO₆₀₀) de aproximadamente 1, foram submetidas às doses de irradiação de 0, 100, 200, 300 e 400 kJ/m² ao longo de 120 minutos.

A composição da radiação foi composta de 85,7% de UV-A, 11% de UV-B e 3,3% de luz visível em temperatura ambiente. A irradiação nas placas de Petri (com suspensões diluídas até 10^{-5}) foi de 51,47 W/m² de UV-A e 35,55 W/m² para UV-B, medidas por um radiômetro Vilber Lourmat equipado com fotocélulas específicas UV-A (CX-365) e UV-B (CX-312). Após a irradiação, as placas foram incubadas a $25 \pm 0,5$ °C.

A partir de cada placa irradiada, uma única colônia sobrevivente à maior dose de radiação foi isolada e novamente cultivada em caldo YPD, utilizando as condições de cultivo otimizadas para a produção e extração de carotenoides.

3.2.6 Atividade antimicrobiana e Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada segundo Quintero *et al.* (2018), com modificações. Após a remoção do hexano do extrato de carotenoides por rotoevaporação o resíduo foi ressuspensionado em 3 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se uma concentração final de 50 mg/L de pigmento extraído.

A atividade antimicrobiana do pigmento foi avaliada frente às seguintes cepas padrão: *Staphylococcus aureus* (ATCC 26923 – isolado clínico), *Escherichia coli* (ATCC 25922 -

isolado clínico), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442 – isolado de garrafa de água em biotério) e *Candida albicans* (ATCC 10231 – isolado clínico) (<https://www.atcc.org>).

As bactérias foram previamente cultivadas em ágar TSA e incubadas por 24 horas a 35 °C, e a *Candida albicans* foi cultivada em meio ágar Sabouraud. Posteriormente, as cepas foram inoculadas em caldo Mueller Hinton (MH) e incubadas por 48 horas a 30 °C e agitação de 150 rpm. As suspensões bacterianas foram padronizadas por turbidimetria, utilizando espectrofotômetro UV visível a 600 nm, ajustando a absorbância para 0,5.

A atividade antimicrobiana foi avaliada em placas de 96 poços, contendo inicialmente 100 µL de caldo LB e 20 µL de inóculo microbiano por poço. Volumes de 10 µL, 20 µL, 25 µL e 40 µL do pigmento foram adicionados aos poços, os quais tiveram o volume final ajustados para 200 µL com caldo MH, resultando em concentrações finais de 2,5 mg/L, 5 mg/L, 7,5 mg/L e 10 mg/L, respectivamente.

As microplacas foram incubadas a 37 °C por 18 horas. A absorbância foi determinada em leitor de microplaca BioTek Synergy, no comprimento de onda de 600 nm. Para cada amostra, o branco experimental consistiu em caldo MH contendo os respectivos volumes de pigmentos. O controle positivo incluiu 40 µL de DMSO.

O percentual de crescimento microbiano foi calculado conforme Equação 2, e os extratos com inibição superior a 50 % (Equação 3) foram considerados ativos. Os experimentos foram realizados em sextuplicata, conforme descrito por QUINTERO et al., 2018.

$$\% \text{ Crescimento} = \frac{DO_{\text{Tratamento}} - DO_{\text{Branco}}}{DO_{\text{Controle positivo}}} \times 100$$

(2)

$$\% \text{ Inibição} = 100 - \% \text{ Crescimento}$$

(3)

3.2.7 Atividade fotoprotetora *in vitro*

O fator de proteção solar (FPS) foi determinado por espectrofotometria UV-visível (modelo HASH DR 5000), conforme método de Mansur et al. (1986). Soluções metanólicas do pigmento extraído na concentração de 15 mg/L foram preparadas em triplicata utilizando metanol como branco. As leituras de absorbância foram realizadas na faixa de 290 e 320 nm em intervalos de 5 nm. O FPS foi calculado utilizando a Equação 4, considerando os fatores de ponderação eritematosa e a intensidade da radiação solar, sendo os valores necessários apresentados na Tabela 3.1.

$$FPS = FC \times \sum EE \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad (4)$$

Onde:

FC = fator de correção (10);

EE (λ) = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda (λ);

I (λ) = intensidade de luz solar no comprimento de onda;

Abs (λ) = leitura espectrofotométrica da absorbância da formulação em solução no comprimento de onda (λ)

TABELA 3.1 – Relação do efeito eritemogênico (EE) *versus* intensidade da radiação (I) para cada comprimento de onda

Comprimento de onda (nm)	EE x I
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180

Fonte: Mansur *et al.* (1986)

3.2.8 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do carotenoide foi avaliada pelo método de sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), conforme descrito por Blois (1958), com adaptações.

O ensaio foi conduzido utilizando uma solução de DPPH a 0,4 mM em metanol. A partir da concentração inicial de 7,5 mg/L do pigmento extraído, foram preparadas diluições seriadas, com redução da concentração pela metade a cada etapa, totalizando 12 concentrações testadas. As amostras foram incubadas por 0, 30 e 60 minutos, e a absorbância foi medida a 517 nm em espectrofotômetro UV-Vis, utilizando metanol como branco.

A atividade antioxidante (%) foi calculada com base na redução da absorbância do DPPH, de acordo com a Equação (5):

$$Atividade\ antioxidante\ (\%) = \frac{A_{DPPH} - A_{Amostra}}{A_{DPPH}} \times 100$$

(5)

Onde:

A_{DPPH} = absorbância (UA) a 517 nm da solução inicial de DPPH.

$A_{Amostra}$ = absorbância medida após a adição dos extratos metanólicos contendo o pigmento.

3.2.9 Atividade citotóxica

A avaliação da citotoxicidade por atividade mitocondrial, baseada na redução do sal de tetrazolium (MTT), foi realizada com o objetivo de avaliar o efeito do extrato de carotenoides na viabilidade celular das linhagens 3T3 (Swiss Albino) e HaCaT. As células foram semeadas na densidade de 1×10^5 células/mL e incubadas por 24 horas a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, para permitir a aderência e estabilização da cultura.

Após esse período, as células foram expostas por 24 horas ao pigmento extraído de *R. mucilaginosa* nas concentrações de 1,0, 1,2 e 1,4 mg/L. Ao final da exposição, os poços foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) estéril, seguido da adição de solução de MTT na concentração de 0,5 mg/mL. As placas foram incubadas por aproximadamente 3 horas nas mesmas condições.

Em seguida, a solução de MTT foi descartada e adicionou-se DMSO. A absorbância foi medida a 540 nm em leitor de microplacas. Todos os testes foram realizados em sextuplicatas para cada concentração testada. A viabilidade celular relativa foi calculada considerando-se como 100% de viabilidade a média dos valores de absorbância obtidos no controle negativo.

3.2.10 Análise estatística

Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), considerando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$), com intervalo de confiança de 95%, utilizando o software Minitab 19. As diferenças entre as médias foram avaliadas por meio do teste de comparação múltiplas de Tukey.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Determinação das condições favoráveis de cultivo à produção de pigmentos

3.3.1.1 Definição do meio e tempo de cultivo

A avaliação dos meios de cultura sintéticos para a determinação das condições favoráveis de cultivo à produção de pigmentos, bem como a determinação do tempo de incubação, indicou que o meio YPD promoveu a maior produção de pigmentos em comparação ao meio Kitamoto, após 168 h de cultivo (Tabela 3.2).

TABELA 3.2 – Biomassa (g/L) e carotenoides (mg/L) produzidos por *Rhodotorula mucilaginosa* PSR 34 após 168 h de cultivo.

Meio de cultura	Biomassa (g/L)	Produção de carotenoides (mg/L)
YPD	8,56	0,62
Kitamoto	5,2	0,47

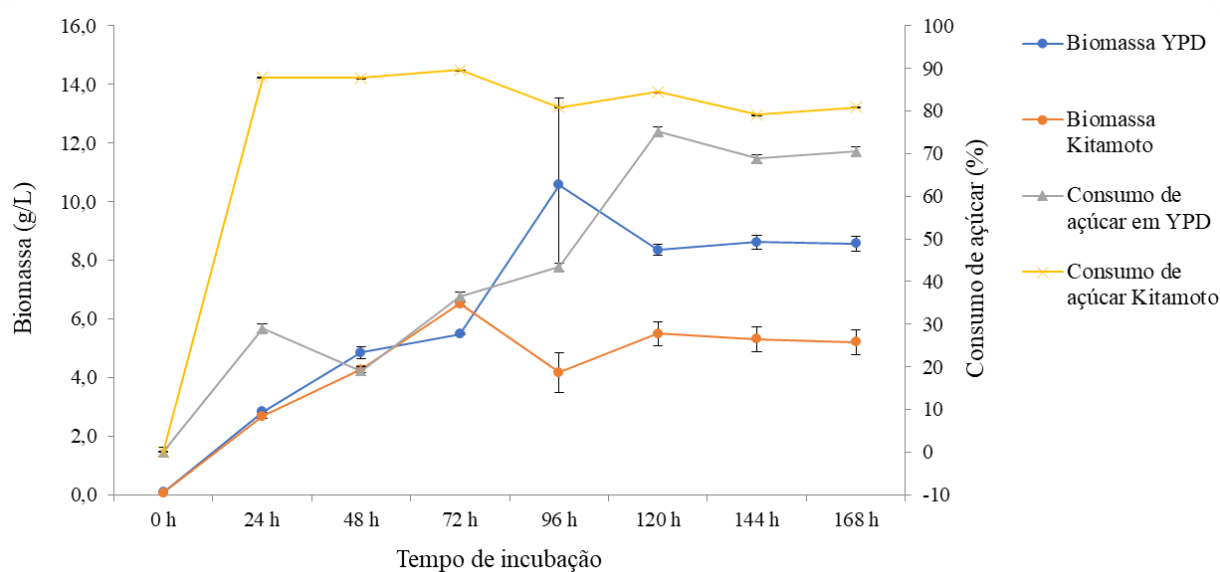
Fonte: elaborado pelo autor.

Nesse período, o cultivo em meio YPD resultou em maior produção de biomassa de 8,56 g/L, associada a um consumo de açúcares de 70 %. Em contraste, o meio Kitamoto, apresentou produção de biomassa de 5,2 g/L, com consumo de açúcares de 80% (Figura 3.1A).

A produção de carotenoides também foi superior no meio YPD, alcançando 0,62 mg/L, enquanto no meio Kitamoto foi de 0,47 mg/L (Figura 3.1B).

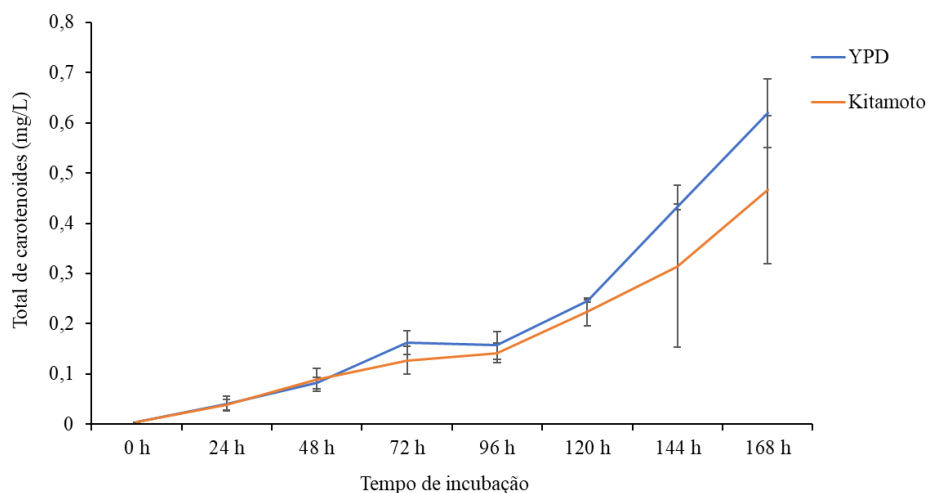
Figura 3.1 – Monitoramento do crescimento microbiano, consumo de açúcar nos meios *Yeast Peptone Dextrose* e Kitamoto (A) e produção de carotenoides (B) durante 168 h de cultivo.

(A)



Fonte: elaborado pelo autor.

(B)



Fonte: elaborado pelo autor.

O rendimento de biomassa e o conteúdo de carotenoides dependem fortemente da composição do meio de cultura (ALLAHKARAMI et al., 2021). O meio YPD contém extrato de levedura e a peptona, que fornecem carbono, nitrogênio e vitaminas, além de 20 g/L de glicose. No entanto, o meio Kitamoto apresenta apenas 4 g/L de glicose e utiliza nitrato de sódio como fonte de nitrogênio.

Elevadas concentrações de glicose no meio podem reduzir a eficiência da biossíntese de carotenoides pela *Rhodotorula* devido à incidência do efeito *Crabtree* em leveduras (ALLAHKARAMI et al., 2021; LIU; WU, 2007). Leveduras Crabtree-positivas realizam fermentação mesmo na presença de oxigênio, enquanto poderiam, em princípio, depender da via respiratória (Pfeiffer; Morley, 2014). Nesse contexto, seria esperado que a produção de carotenoides fosse maior no meio Kitamoto, o que diverge dos resultados obtidos.

No entanto, o gênero *Rhodotorula* é considerado Crabtree-negativo (ALLAHKARAMI et al., 2021). Além disso, estudos indicam que o aumento da concentração de glicose, aliado ao uso de extrato de levedura, pode favorecer a produção de carotenoides (GEDELA et al., 2023), corroborando os resultados obtidos com cultivo em meio YPD.

A análise de monitoramento do cultivo microbiano no meio YPD indicou que o crescimento máximo foi atingido em 96 horas, não havendo incremento significativo na biomassa celular com o prolongamento do período de cultivo.

Diferentemente do crescimento celular, a produção máxima de carotenoides ocorreu em 168 h, sendo observadas, conforme teste de Tukey (Figura 3.2).

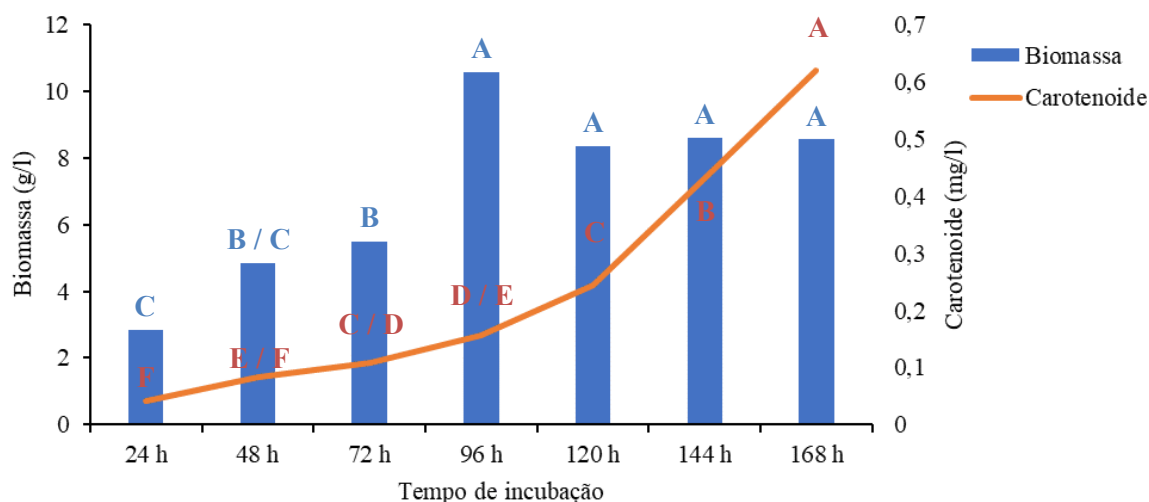
O fato de o pico do crescimento microbiano ocorrer em 96 horas, enquanto a produção de carotenoide atinge máximo, em 168 horas sugere que a biossíntese de carotenoides pode ser favorecida por condições de estresse relacionadas a baixas concentrações de nutrientes. Essa condição, que geralmente limita o crescimento celular, pode favorecer a síntese de pigmento.

A glicose e pH mostraram-se fatores significativos, afetando tanto a cinética de crescimento quanto a via biossíntese de carotenoides. É importante ressaltar que as condições ótimas para cada parâmetro divergem: o crescimento celular requer concentrações relativamente altas de glicose, e pH neutro ou ligeiramente alcalino, enquanto a biossíntese de carotenoide é maximizada em concentrações inferiores de glicose e um pH discretamente mais ácido (LIU; WU, 2007).

Um estudo com *R. toruloides* demonstrou que o pico de rendimento de biomassa atingido em 168 horas, precedeu o máximo da produção de carotenoide, registrada em 240 horas. A redução da biomassa após seu valor máximo, concomitantemente ao aumento do conteúdo de carotenoides, sugere que levedura entrou na fase de declínio do crescimento.

Apesar da diminuição da biomassa, a disponibilidade de acetil CoA permitiu a continuidade da síntese de carotenoides (YANG et al., 2024).

Figura 3.2 – Biomassa seca e produção de carotenoide de *Rhodotorula mucilaginosa* PSR 34 cultivada em meio *Yeast Peptone Dextrose*. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (teste de Tukey, $p > 0,05$).



Fonte: elaborado pelo autor.

2.3.2.2 Melaço de soja como substrato para produção de carotenoides

O estudo do melaço de soja como substrato para o crescimento de *Rhodotorula mucilaginosa* PSR 34, em diferentes temperaturas (15, 30 e 45 °C), indicou maior acúmulo de biomassa a 15 °C. No entanto, a produção de carotenoide foi superior no meio de cultura YPD em todas as temperaturas analisadas (Figura 3.3). A análise de variância demonstrou que os fatores meio e temperatura apresentaram efeito significativo sobre a variável resposta ($p < 0,05$), assim como a interação entre eles. O modelo foi significativo ($p = 0,001$) e o efeito de blocos não foi significativo ($p > 0,05$), indicando baixa influência de variações experimentais externas.

Essa limitação do melaço para a produção de pigmentos também foi reportada na literatura para *Phaffia rhodozyma* (KANWUGU et al., 2020). Para superar essa desvantagem, estratégias como suplementação do melaço com extrato de levedura podem ser consideradas, uma vez que estudos com *Rhodotorula mucilaginosa* demonstraram ganhos significativos na

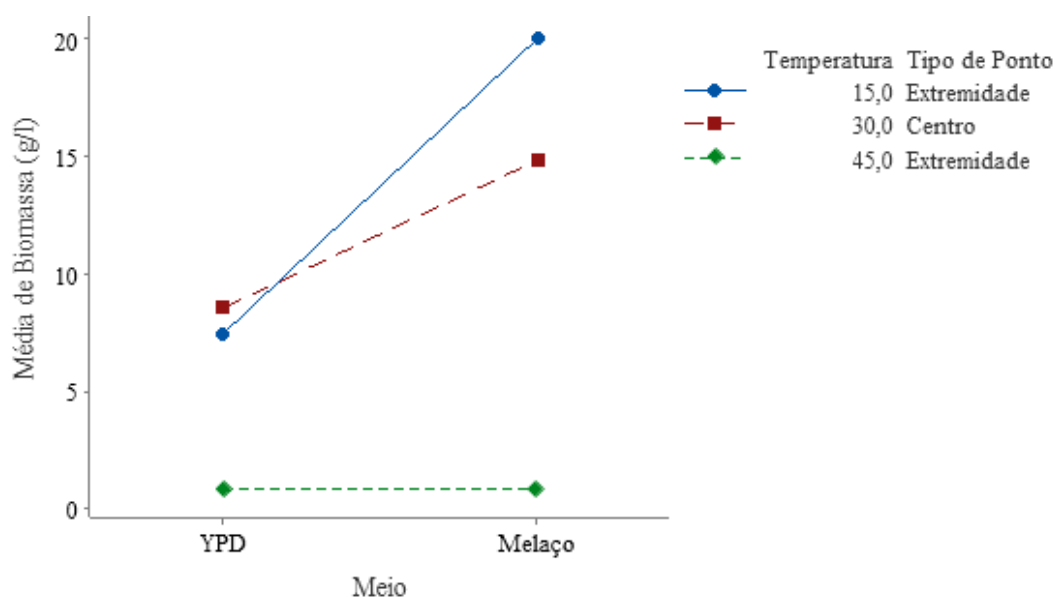
produção de carotenoides quando comparados o uso de melaço de cana-de-açúcar bruto e suplementado (BHOSALE; GADRE, 2001).

Dentre os carboidratos que podem ser encontrados no melaço de soja está a rafinose (DA SILVA et al., 2012; ROMÃO et al., 2012; SANCHETI; THOMPSON; JU, 2023), que pode limitar o uso do melaço de soja como meios de produção de microrganismos, visto que a maioria dos microrganismos industriais não podem utilizar esses açúcares, a menos que sejam pré-hidrolisados em monômero, o que aumenta os custos de produção (KANWUGU et al., 2020; YANG et al., 2018). No entanto, a quantificação da rafinose não foi detectada nas amostras utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho pela ausência de padrão. Testes bioquímicos com estirpes de *Rhodotorula mucilaginosa* demonstraram que a levedura pode ser assimiladora de rafinose (ALLAHKARAMI et al., 2021). O melaço de soja, caracterizado por uma elevada concentração de sacarose (um dissacarídeo fermentável facilmente convertido e utilizado por várias leveduras), lipídeos e proteínas, configura-se como uma fonte alternativa e acessível para a produção de microrganismos (KANWUGU et al., 2020).

Adicionalmente, a hidrólise de polissacarídeos constituintes do melaço pode favorecer sua assimilação pela levedura, embora essa etapa adicional possa implicar aumento os custos do processo produtivo (KANWUGU et al., 2020).

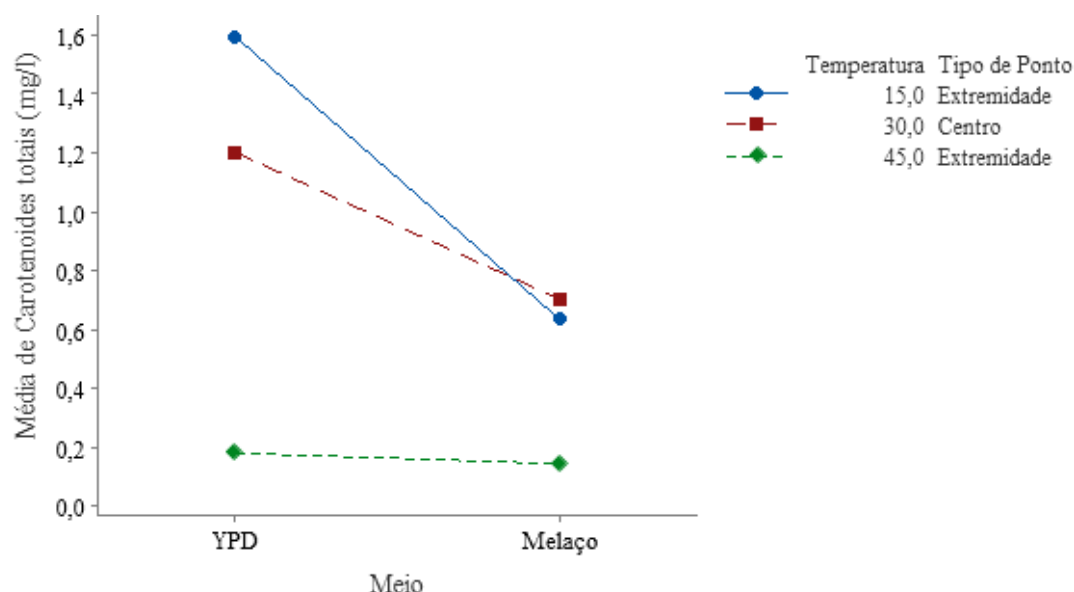
Figura 3.3 – Interação entre os meios de cultura *Yeast Peptone Dextrose* e melaço de soja e as temperaturas de cultivo na produção de biomassa (g/L) (A) e de carotenoides totais (mg/L) (B).

(A)



Fonte: elaborado pelo autor.

(B)



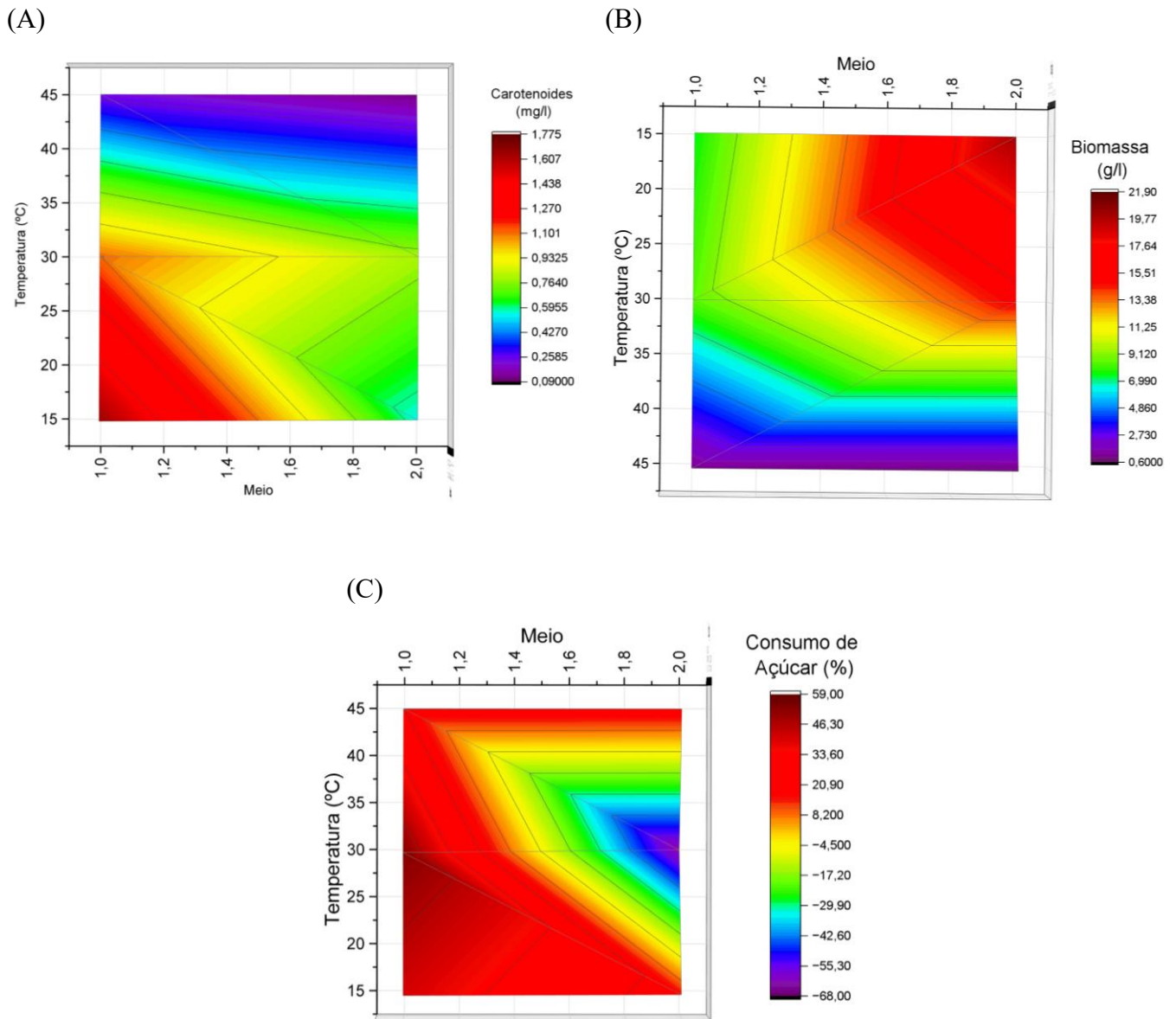
Fonte: elaborado pelo autor.

Com base nos resultados obtidos, o otimizador de resposta do Minitab 19 foi usado para determinar as condições ideais para a maximização da produção de carotenoides. As condições ótimas identificadas corresponderam ao uso do meio YPD e à temperatura de 15 °C, resultando em uma produção média de carotenoide de 1,66 mg/L, com uma *desirability* composta de 0,89.

Com objetivo de avaliar o efeito das variáveis independentes sobre a produção de carotenoides, biomassa e consumo de açúcares, foram elaboradas representações gráficas na forma de curvas de contorno. Análise dessas curvas revelou que a faixa ótima para a produção de carotenoides encontra-se entre os intervalos de 15 a 20 °C empregando meio sintético YPD (Figura 3.4A).

Contudo, a maior produção de biomassa foi observada no cultivo em melaço de soja, dentro da mesma faixa de temperatura (Figura 3.4B), enquanto o maior consumo de açúcares foi constatado no meio sintético, entre 20 a 30 °C (Figura 3.4C). A avaliação conjunta desses gráficos permitiu concluir que o pico de produção de carotenoides ocorreu em uma região próxima à menor temperatura investigada, associada ao uso de meio sintético, corroborando os resultados obtidos.

Figura 3.4 – Curvas de contorno representando os efeitos do tipo de meio de cultivo (*Yeast Peptone Dextrose* e melaço de soja) e da temperatura sobre a produção de carotenoides (A), biomassa (B) e consumo de açúcares (C).



Fonte: elaborado pelo autor.

A produção de carotenoides por *R. mucilaginosa* utilizando bagaço de sisal como substrato indicou que menores rendimentos de biomassa podem ser vantajosos quando o objetivo é a produção de carotenoides. Cultivos com elevada biomassa apresentaram produção volumétrica de carotenoides consideravelmente baixa, enquanto aqueles com menor biomassa apresentaram maior produção volumétrica de carotenoides (DA SILVA et al., 2020).

A temperatura também é um fator determinante na produção de carotenoides, afetando diretamente a via da carotenogênese. Alterações na temperatura modulam a atividade das enzimas envolvidas na síntese de carotenoides, podendo inclusive, alterar a concentração relativa de cada composto (DA SILVA et al., 2020; VALDUGA et al., 2009). Evidências indicam que temperaturas relativamente mais baixas favorecem o acúmulo de carotenoides (YANG et al., 2024).

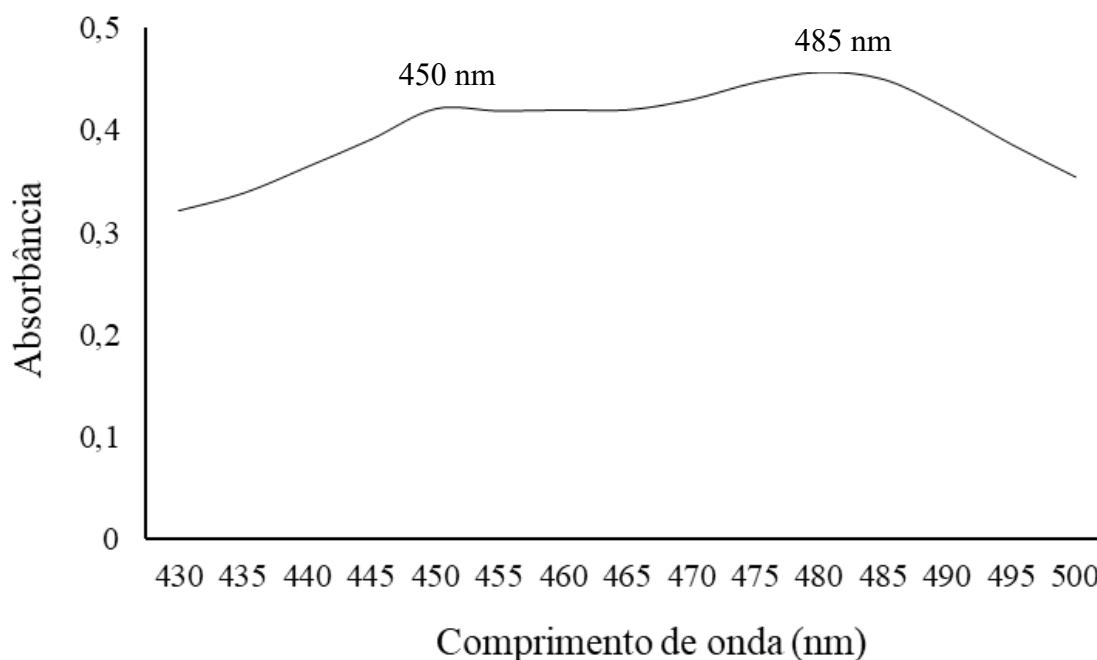
Tipicamente, as faixas de temperatura ideais para a carotenogênese (20 e 30 °C) diferem daquelas ótimas para o crescimento celular, sendo a síntese de pigmentos reduzida em cultivos acima de 30 °C (OCHOA-VIÑALS et al., 2024) o que está em concordância com os achados deste trabalho.

3.3.3 Caracterização do pigmento extraído

3.3.3.1 Espectrofotometria UV-visível

A análise espectrofotometria revelou picos de absorção característicos de carotenoides em 450 e 485 nm (Figura 3.5). Picos de absorção em 450 nm, atribuídos a β -caroteno, bem como em 484 nm, para tolureno e 490 nm para torularodina foram encontrados por Sharma e Ghoshal (2021). De forma semelhante, Moline et al. (2012) observaram valores máximos de absorção na faixa de 480-490 nm. A detecção do pico em 450 nm no presente estudo reforça a possível presença de β -caroteno.

Figura 3.5 – Espectro de absorção UV-Vis de pigmento de *Rhodotorula mucilaginosa* PSR 34.



Fonte: elaborado pelo autor.

A espectroscopia de absorção constitui uma ferramenta valiosa para a caracterização de pigmentos, uma vez que esses compostos absorvem luz predominantemente nas regiões do ultravioleta (UV) e visível do espectro, enquanto o restante da radiação é transmitido ou refletido. A absorção da luz por esses compostos é determinada pela presença de cromóforos, formados por duplas ligações conjugadas presentes na estrutura química. Cada carotenoide apresenta um padrão de absorção específico de absorção eletrônica (Valduga et al, 2009).

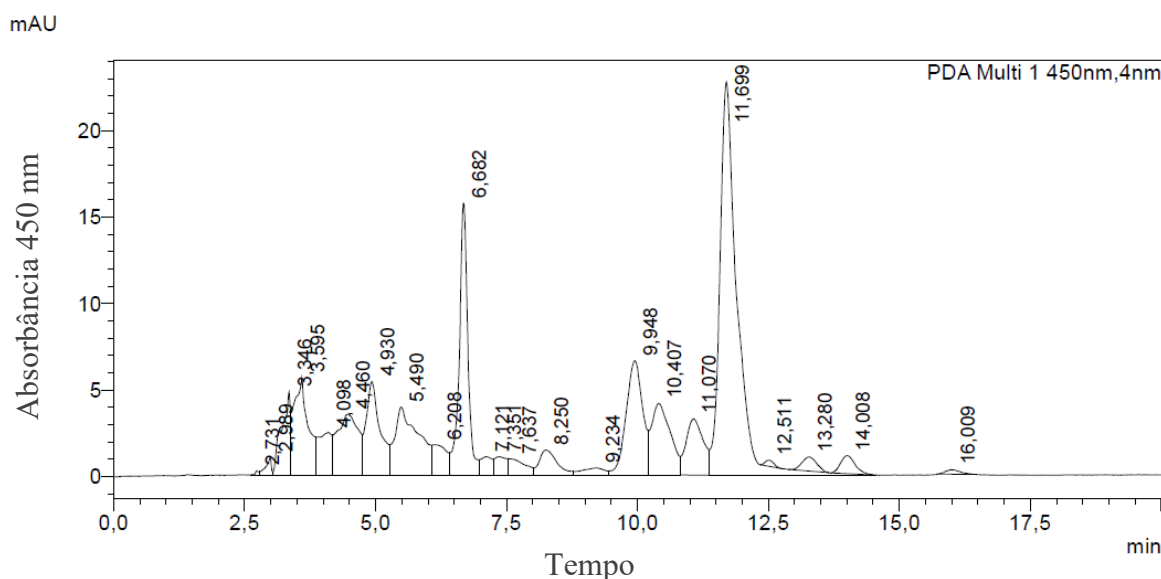
Os espectros obtidos neste trabalho apresentam picos de absorção em 450 e 485 nm, sugerindo a possível predominância de β -caroteno e tolureno entre os carotenoides produzidos.

3.3.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para identificação dos pigmentos

As análises por HPLC permitiram identificar a presença de dois tipos de pigmentos nos extratos. A identificação dos carotenoides foi realizada por meio da comparação dos tempos de retenção e dos perfis de absorbância das amostras com aqueles obtidos para os padrões correspondentes.

Os resultados indicaram a presença de um pico principal com tempo de retenção de 11,699 minutos, correspondente ao tempo de retenção do padrão de β -caroteno. Além disso, outros picos, com tempos de retenção de 9,948 e 10,407 minutos, coincidem com o tempo de retenção do toruleno degradado (Figura 3.6).

Figura 3.6 – Perfis de eluição por cromatografia líquida de alta eficiência dos carotenoides extraídos de *Rhodotorula mucilaginosa* PSR 34



Fonte: elaborado pelo autor.

A ordem de eluição de pigmentos em análises por HPLC é determinada principalmente por sua polaridade, sendo a torularodina o composto mais polar, seguido por toruleno e, por último, pelo β -caroteno, o menos polar (MOLINÉ; LIBKIND; VAN BROOCK, 2012). Tempos de retenção para torularodina (13,4 min), tolureno (18,4 min) e β -caroteno (20,6 min) foram previamente reportados por GHILARDI et al. (2020) o que está de acordo com a sequência de picos observada no presente estudo.

Adicionalmente, a detecção de um pico com tempo de retenção de 6,68 min sugere sua possível correspondência à torularodina. Perfis cromatográficos semelhantes, apresentando a sequência de eluição torularodina, toruleno, γ -caroteno e β -caroteno, também foram observados por SERETI et al. (2024).

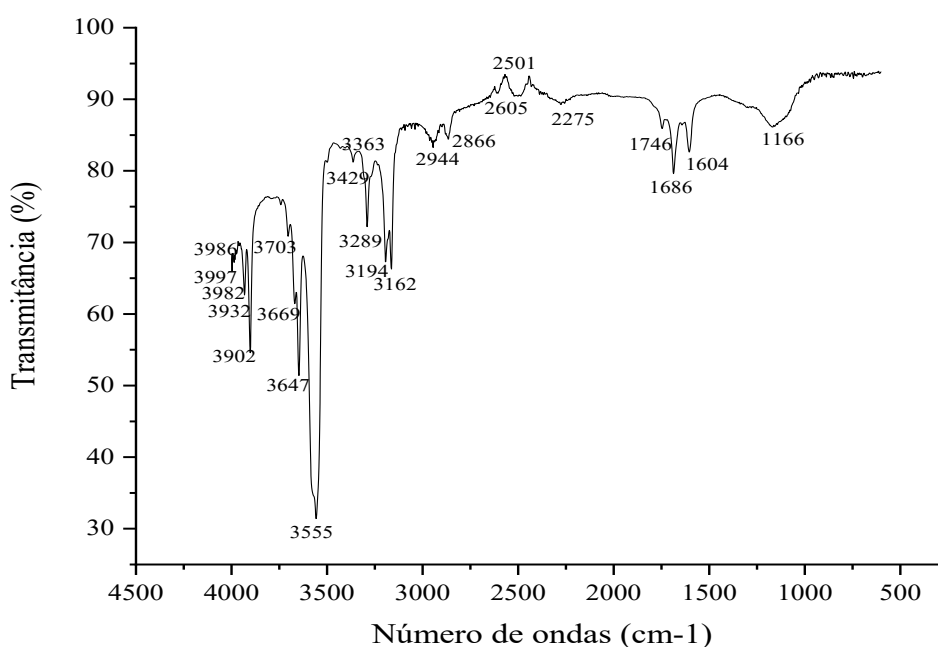
3.3.3.3 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia FTIR, baseada na excitação vibracional de ligações moleculares por meio da absorção da luz infravermelha, permite a identificação de grupos funcionais partir de

suas bandas de absorção características (SHARMA; GHOSHAL, 2021). A análise do extrato dos pigmentos obtidos da *Rhodotorula mucilaginosa* PSR 34 revelou a presença de picos principais encontrados nos números de onda 3429, 3363, 2944, 2866, 1746, 1686, 1166 cm^{-1} (Figura 3.7).

A comparação desses resultados com o espectro FTIR padrão de β -caroteno, reportado por Sharma e Ghoshal (2021) (Tabela 3.3), demonstrou a ocorrência de bandas em números de onda semelhantes, reforçando a possível presença desse carotenoide no extrato analisado.

Figura 3.7 – Espectro de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier do pigmento extraído de *R. mucilaginosa* PSR 34.



Fonte: elaborado pelo autor.

TABELA 3.3 – Comparação das bandas de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier no extrato de pigmentos de *Rhodotorula mucilaginosa* PSR 34 com padrão de β -caroteno.

Extrato do pigmento de PSR 34 (cm ⁻¹)	Padrão de β -caroteno (*) (cm ⁻¹)	Grupo funcional
2944	2972,4	-CH ₃ , -CH ₂
2866	2874,9	-CH ₃ , -CH
1746	1717,4	-C=O
1686	1717,4	-C=O
1166	1174,6	C-O

(*) Valores obtidos por Sharma e Ghoshal (2021). Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com Sebastian et al. (2023), os picos de FTIR observados podem ser atribuídos a: O-H ligado por hidrogênio em 3429 cm⁻¹; estiramento metílico C-H em 2866 cm⁻¹; e grupos alquenila C=C e arila C=C substituído em 1686 cm⁻¹. As bandas em 3363 cm⁻¹ indicaram a presença do grupo carboxílico no carotenoide purificado (SEBASTIAN et al., 2023; SUNDARAMAHALINGAM; SIVASHANMUGAM, 2023).

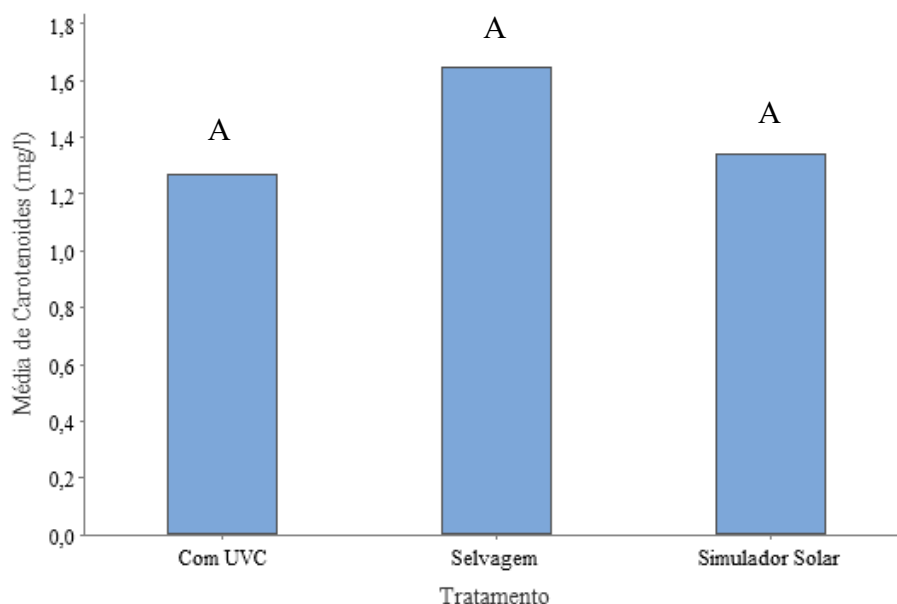
A similaridade dos picos obtidos com espectros de FTIR da torularodina retratados na literatura sugere a possível presença desse carotenoide no extrato analisado.

3.3.4 Produção de carotenoide em resposta ao estresse celular por radiação ultravioleta

A *R. mucilaginosa* PSR 34 apresentou resistência à radiação UV-C, com crescimento até a dose de 600 J/m² durante 3 min e 15 s. Além disso, a cepa resistiu à radiação UV-A e UV-B ambiental (400 kJ/m² por 120 minutos), recebida por meio do simulador solar (SS).

A análise da produção de pigmentos após o estresse celular indicou que tanto a radiação UV-C e a radiação ambiental não promoveram aumento significativo na concentração de carotenoides. A média da concentração volumétrica de carotenoides obtida foi de 1,64 ± 0,21 mg/L para a cepa selvagem, 1,26 ± 0,12 mg/L para cepa exposta à radiação UV-C (600 J/m² durante de 3 min e 15 s) e 1,34 ± 0,12 mg/L para a cepa exposta a radiação ambiental (400 kJ/m² por 120 minutos) (Figura 3.8).

Figura 3.8 – Concentração de carotenoides (mg/L) de *R. mucilaginosa* PSR 34: selvagem e exposta à radiação UV-C e à radiação ambiental. Médias com letras diferentes são significativamente diferentes (teste de Tukey, $p > 0,05$).



Fonte: elaborado pelo autor.

Geralmente, a produção de biomassa e metabólitos em leveduras é influenciada por condições de estresse, como concentração de oxigênio dissolvido, pressão osmótica, temperatura, pH, radiação, luz e presença de metabólito secundários, como o etanol. Especificamente em relação à radiação ultravioleta, as células ativam mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo, produzindo moléculas fotoprotetoras como carotenoides e micosporinas (GARCIA-CORTES et al., 2021).

Diferentemente dos resultados obtidos neste estudo, trabalhos anteriores demonstraram que a radiação pode estimular positivamente a produção de carotenoide em *R. mucilaginosa*. Garcia Cortes et al. (2021) observaram um aumento significativo na produção de carotenoides (350 $\mu\text{g/g}$) após 2 min de exposição UV-C (256 nm), sugerindo um efeito positivo. Resultados semelhantes foram relatados para *R. glutinis* após exposição à radiação UV-C por 15 a 30 min (YOLMEH; KHOMEIRI, 2017) e para *R. toruloides* onde a exposição a 15 W/m^2 por 8 min possivelmente induziu mutagênese, levando ao aumento da produção de toruleno e torularodina (YANG et al., 2024).

No presente estudo, a *R. mucilaginosa* foi exposta a irradiâncias de 51,47 W/m^2 de UV-A e 35,55 W/m^2 de UV-B por 120 min. A ausência de um aumento significativo na produção

de carotenoides pode ser atribuída ao fato de que essas irradiâncias não foram suficientes para induzir mutagenicidade capaz de estimular a carotenogênese.

3.3.5 Atividade antimicrobiana e Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos pigmentos produzidos por *R. mucilaginosa* PSR 34

A análise da atividade antimicrobiana do pigmento extraído de *R. mucilaginosa* PSR 34 revelou inibição superior a 90% para os microrganismos testados: bactéria Gram-positiva *S. aureus*, bactérias Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* e levedura *C. albicans*. Os ensaios foram conduzidos utilizando a maior concentração do extrato de pigmentos, 10 mg/L.

A capacidade inibitória foi observada a partir da menor concentração testada de 2,5 mg/L e aumentou com a elevação da concentração, atingindo índice de inibição superior a 90 % com concentração de 7,5 mg/L (Tabela 3.4).

TABELA 3.4 – Atividade antimicrobiana (% de inibição) do extrato de pigmento de *Rhodotorula mucilaginosa* PSR 34 determinada pelo o método de microdiluição em placa.

Extrato de pigmentos	Cepa alvo	% Inibição Concentração (mg/L)			
		2,5	5	7,5	10
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 26923)	59,57	77,94	94,67	100
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	42,71	88,08	100	100
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	50,76	73,59	97,28	100
	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	58,36	72,28	95,89	99,16

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os carotenoides naturais são reconhecidos por sua atividade antimicrobiana contra diversos patógenos (VARGAS-SINISTERRA; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, 2021). A crescente resistência microbiana impulsiona a busca por novos agentes antimicrobianos. Em ensaios realizados pelo teste de microdiluição em microplaca, concentrações de 17 µL/mL e 4,1 µL/mL

inibiram o crescimento de *Salmonella typhimurium* e *S. aureus*, respectivamente (NAISI et al., 2023).

Atividade antimicrobiana de pigmentos de *Rhodotorula* também já foi observada contra *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* e *E.coli*, em análises conduzidas por meio da técnica de difusão em poços de ágar (BANERJEE; SARKAR; RAO, 2024). Teste com pigmento de *R. paludigenum* demonstraram eficácia contra cepas patogênicas, com CIM de 36 mg/L para *S. enteritidis*, 90 mg/L para *P. aeruginosa*, 180 mg/L para de *S. aureus*.

Assim, os resultados do presente estudo confirmam a atividade antimicrobiana do pigmento produzido contra as cepas testadas.

3.3.6 Atividade fotoprotetora *in vitro* dos pigmentos de *R. mucilaginosa* PSR 34

O Fator de Proteção solar (FPS) do extrato de carotenoide da levedura *R. mucilaginosa* PSR 34 foi de $33,04 \pm 0,25$. No contexto regulatório brasileiro, esse resultado é relevante, pois de acordo com a Resolução Brasileira RDC nº 629, de 10 de março de 2022 (BRASIL, 2022), que estabelece um FPS mínimo de 6,0 para protetores solares, valores entre 30 e 50 são considerados de alta proteção. Portanto, o FPS do extrato estudado se enquadra nessa categoria.

Para comparação, pigmentos carotenoides alaranjados de *Brevibacterium sp.* apresentaram FPS de 5,3 (PATKI et al., 2021), enquanto um extrato bruto pigmentos de *Kocuria sp.* atingiu FPS de 9,36 (MENDES-SILVA et al., 2021), evidenciando o potencial desses pigmentos como agentes fotoprotetores. No entanto, os pigmentos de *R. mucilaginosa* PSR 34 demonstraram capacidade fotoprotetiva superior aos exemplos citados.

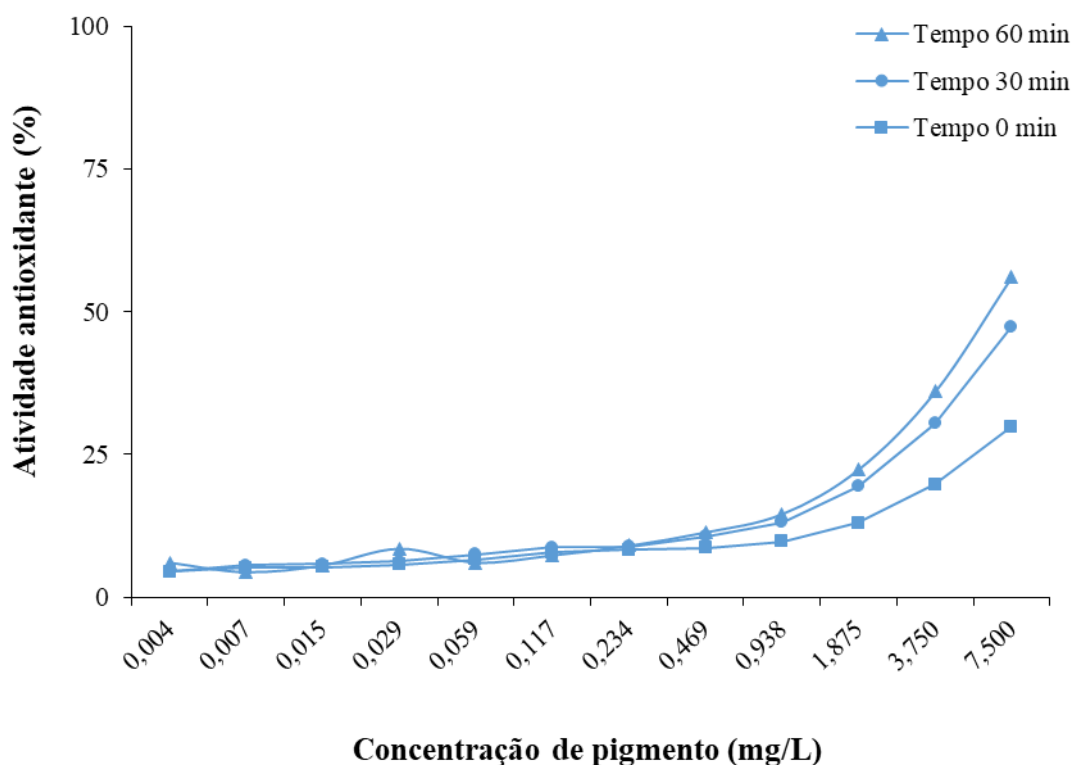
3.3.7 Atividade antioxidante

O composto DPPH apresenta coloração roxa, tornando-se amarelada ao reagir com um agente oxidante, devido à diminuição do radical DPPH, e essa mudança de cor indica a atividade sequestradora de radicais (Banerjee; Sarkar; Rao, 2024). Visualmente, a coloração do pigmento pode interferir na avaliação, uma vez que apresenta tonalidade semelhante à do DPPH após reação com antioxidantes. Na maior concentração testada (7,5 mg/L) foi observado alteração visual da cor do DPPH, indicando atividade antioxidante, enquanto nas demais concentrações, a atividade antioxidante não foi evidenciada.

A relação entre a quantidade de amostra (mg) e o DPPH (em mg) foi utilizada para calcular a atividade antioxidante, permitindo também traçar o perfil antioxidante do pigmento.

(Figura 3.9). A atividade sequestradora de radicais DPPH atingiu 47,39 % em 30 minutos e 56,07 % em 60 minutos, demonstrando que a atividade antioxidante do pigmento é dependente do tempo de exposição ao DPPH.

Figura 3.9 – Atividade antioxidante do pigmento de *Rhodotorula mucilaginosa* PSR 34 ao longo do tempo 0, 30 e 60 minutos



Fonte: Elaborado pelo autor.

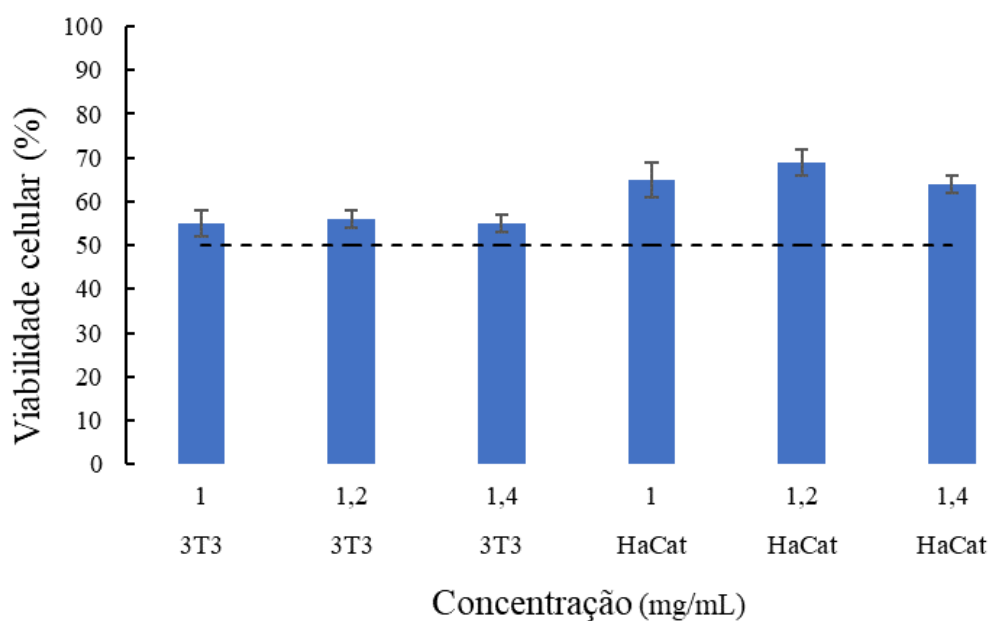
Pigmentos microbianos têm sido amplamente relatados por suas atividades antioxidantes. Banerjee, Sarkar e Rao (2025) demonstraram a capacidade de pigmentos carotenoides extraídos de quatro isolados marinhos do gênero *Rhodotorula*, em sequestrar radicais DPPH, atingindo a atividade máxima de 72% em 20 minutos. Em outro estudo, extratos carotenoides em concentrações de 93,2 e 46,6 mg/L apresentaram percentuais elevados de inibição de 60 e 100%, respectivamente, enquanto concentrações menores de 5,85 mg/L, resultaram em apenas 18% de inibição (Ribeiro et al., 2023). Estes resultados indicam que os achados obtidos no presente estudo poderiam ser potencialmente aumentados mediante o uso de concentrações maiores de pigmento.

Entretanto, estudos com pigmentos extraídos de *Phaffia rhodozyma* mostraram que, mesmo em concentrações relativamente baixas, foi possível observar altos percentuais de inibição do DPPH (2022). A concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ exibiu 100% de inibição, enquanto concentrações menores de até 6,2 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram menos de 20% de inibição, evidenciando que o efeito antioxidante do extrato diminuiu significativamente com a redução da concentração de pigmento (Mussagy et al., 2022b).

3.3.8 Atividade de citotoxicidade

O ensaio de redução do tetrazólio (MTT) foi aplicado para avaliar a citotoxicidade do pigmento de *R. mucilaginosa* sobre a viabilidade de linhagens celulares não tumorais 3T3 e HaCaT. As concentrações testadas (1,0, 1,2 e 1,4 mg/L) apresentaram percentuais de viabilidade celular superiores a 50%, indicando que o composto avaliado não apresenta citotoxicidade significativa nas condições testadas, mantendo atividade metabólica mitocondrial em mais da metade da população celular (Figura 3.10).

Figura 3.10 – Viabilidade celular de linhagens 3T3 e HaCaT tratadas com pigmento microbiano, determinada pelo ensaio de redução do tetrazólio (MTT).



Fonte: elaborado pelo autor.

Embora não tenham sido utilizadas linhagens tumorais neste estudo, os resultados obtidos fornecem informações relevantes sobre o perfil de segurança celular e permitem inferências preliminares acerca do potencial antitumoral do pigmento extraído. Em estudo anterior, o ensaio MTT aplicado para avaliar a citotoxicidade do pigmento do gênero *Rhodotorula* revelou redução da viabilidade celular de forma dose-dependente, com valor de IC₅₀ de 46,5 µL/mL (Naisi et. al. 2023).

Extratos de astaxantina biossintetizados por *P. rhodozyma* demonstraram ausência significativa de citotoxicidade nas concentrações de 0,5 a 5 µg/mL, enquanto concentrações de 10 e 15 µg/mL resultaram em alta taxa de morte celular (Mussagy et al., 2022b).

Em relação à atividade anticancerígena, estudo realizado com uma linhagem tumoral MCF-7 apresentou inibição de 21,21% após 72 horas de incubação com 40 µg do pigmento extraído, sugerindo que concentrações maiores podem induzir atividade moderada contra células tumorais (Sharma; Ghoshal, 2021).

A capacidade de um composto de induzir morte celular preferencialmente em células tumorais, preservando células normais, constitui um parâmetro crítico no desenvolvimento de agentes anticâncer. Compostos com maior seletividade citotóxica são considerados mais promissores para aplicações farmacológicas, pois podem exercer ação antitumoral eficaz com menor danos às células saudáveis (Tronina et al., 2023). Nesse contexto, a baixa toxicidade observada em células não tumorais, como 3T3 e HaCaT, pode ser interpretada como um indicativo indireto preliminar de potencial seletividade, hipótese que deverá ser confirmada em estudos futuros utilizando modelos celulares tumorais.

3.4 CONCLUSÕES

A *Rhodotorula mucilaginosa* PSR 34, isolada de painel fotovoltaico, apresentou melhor produção de carotenoides utilizando meio de cultura sintético YPD, tempo de cultivo de 168 h e temperatura de incubação de 15 °C. Tentativas de aumentar a produção por mutagênese com exposição à radiação UV não apresentaram incremento significativo.

O melaço de soja não se mostrou um substrato adequado para a produção de carotenoides, uma vez que a síntese de pigmentos foi significativamente maior em meio de cultura sintético. No entanto, futuras pesquisas poderiam avaliar a utilização do melaço após hidrólise, visando melhorar sua performance como substrato.

A análise dos pigmentos indicou a presença de β -caroteno e toruleno. O extrato apresentou forte atividade antimicrobiana e elevado potencial fotoprotetor, com FPS acima dos limites estabelecidos pela legislação brasileira. A atividade antioxidante do pigmento foi baixa na concentração testada, mas aumentou de forma dependente do tempo de exposição. Além disso, os extratos pigmentares demonstram baixa citotoxicidade, sugerindo um perfil de segurança compatível com estudos posteriores em linhagens tumorais.

De modo geral, os resultados deste estudo evidenciaram o promissor potencial biotecnológico do pigmento produzido pela cepa *Rhodotorula mucilaginosa* PSR 34, destacando suas aplicações em bioprodutos com propriedades antimicrobianas, fotoprotetoras e antioxidantes.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução nº 629, de 10 de março de 2022. Dispõe sobre protetores solares e produtos multifuncionais em cosméticos e internaliza a Resolução GMC MERCOSUL nº 08/2011. Disponível em <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-629-de-10-de-marco-de-2022-386099957> (acessado em 29 de Novembro de 2024).
- ABDELAZIZ, Ahmed A. *et al.* Pseudomonas aeruginosa's greenish-blue pigment pyocyanin: its production and biological activities. **Microbial Cell Factories**, v. 22, n. 1, p. 110, 8 jun. 2023.
- ABDUL MANAS, Nor Hasmaliana *et al.* Effects of oil substrate supplementation on production of prodigiosin by Serratia nematodiphila for dye-sensitized solar cell. **Journal of Biotechnology**, v. 317, p. 16–26, jun. 2020.
- AKULAVA, Volha *et al.* Screening for pigment production and characterization of pigment profile and photostability in cold-adapted Antarctic bacteria using FT-Raman spectroscopy. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 450, p. 115461, maio 2024.
- ASHENAFI, Eyosias L. *et al.* Spectral properties and stability of selected carotenoid and chlorophyll compounds in different solvent systems. **Food Chemistry Advances**, v. 2, p. 100178, out. 2023.
- ASITOK, Atim *et al.* Stochastic modeling and meta-heuristic multivariate optimization of bioprocess conditions for co-valorization of feather and waste frying oil toward prodigiosin production. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 53, n. 6, p. 690–703, 3 jul. 2023.
- BANERJEE, Somak; SARKAR, Anwesha; RAO, K. V. Bhaskara. Extraction and characterization of carotenoid pigments with antioxidant and antibacterial potential from marine yeast Rhodotorula sp. KSB1. **International Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 137–156, 15 maio 2024.
- BAS, Tomas Gabriel *et al.* Economic–Financial Assessment of Seawater Desalination Plants in Northern Chile to Reduce Hydric Scarcity and a Proposal for the Environmental and Sustainable Use of Brine Waste by Cultivating the Microalga Dunaliella salina to Produce β -Carotene. **Processes**, v. 11, n. 6, p. 1668, 30 maio 2023.
- BRAHMA, Daiji; DUTTA, Debjani. Antioxidant property of beta-cryptoxanthin produced by Kocuria marina DAGII. **Materials Today: Proceedings**, v. 57, p. 1833–1837, 2022.
- CAMPANHOL, Beatriz Silva *et al.* Improvement of DOPA-Melanin Production by Aspergillus nidulans Using Eco-Friendly and Inexpensive Substrates. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 7, p. 714, 29 jun. 2023.
- CECCHIN, Michela *et al.* Astaxanthin and eicosapentaenoic acid production by S4, a new mutant strain of Nannochloropsis gaditana. **Microbial Cell Factories**, v. 21, n. 1, p. 117, dez. 2022.
- CHANG, P. C.; BLACKWOOD, A. C. Simultaneous production of three phenazine pigments by Pseudomonas aeruginosa Mac 436. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 439–444, 1 maio 1969.

CHENG, Yu-Ting; YANG, Chu-Fang. Using strain *Rhodotorula mucilaginosa* to produce carotenoids using food wastes. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 61, p. 270–275, abr. 2016.

CHOI, Kwon-Young. Bioprocess of Microbial Melanin Production and Isolation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 765110, 16 nov. 2021.

CHOKSI, Janki; VORA, Jaykant; SHRIVASTAVA, Neeta. Bioactive Pigments from Isolated Bacteria and Its Antibacterial, Antioxidant and Sun Protective Application Useful for Cosmetic Products. **Indian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 379–382, set. 2020.

CHUYEN, Hoang V. *et al.* Microwave-assisted extraction and ultrasound-assisted extraction for recovering carotenoids from Gac peel and their effects on antioxidant capacity of the extracts. **Food Science & Nutrition**, v. 6, n. 1, p. 189–196, jan. 2018.

DA SILVA, Josevan *et al.* Effect of supplementation, temperature and pH on carotenoids and lipids production by *Rhodotorula mucilaginosa* on sisal bagasse hydrolyzate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 30, p. 101847, nov. 2020a.

DA SILVA, Sabrina Roberta Santana *et al.* Reutilization of residual glycerin for the produce β -carotene by *Rhodotorula minuta*. **Biotechnology Letters**, v. 42, n. 3, p. 437–443, mar. 2020b.

DADACHOVA, Ekaterina *et al.* Ionizing Radiation Changes the Electronic Properties of Melanin and Enhances the Growth of Melanized Fungi. **PLoS ONE**, v. 2, n. 5, p. e457, 23 maio 2007.

DE ARRUDA, Gabriel Leda *et al.* Biopigments production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using cells of *Monascus ruber* immobilized in polyurethane foam. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 8, p. 289, ago. 2025.

DI SALVO, Eleonora *et al.* Natural Pigments Production and Their Application in Food, Health and Other Industries. **Nutrients**, v. 15, n. 8, p. 1923, 16 abr. 2023.

DIAS, Carla *et al.* Direct lipid and carotenoid extraction from *Rhodospiridium toruloides* broth culture after high pressure homogenization cell disruption: Strategies, methodologies, and yields. **Biochemical Engineering Journal**, v. 189, p. 108712, dez. 2022.

DÍEZ, Blanca Hey; TORRES, Cristiana A. V.; GAUDÊNCIO, Susana P. Actinomycete-Derived Pigments: A Path Toward Sustainable Industrial Colorants. **Marine Drugs**, v. 23, n. 1, p. 39, 13 jan. 2025.

DONG, Caihong; YAO, Yijian. Isolation, characterization of melanin derived from *Ophiocordyceps sinensis*, an entomogenous fungus endemic to the Tibetan Plateau. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 4, p. 474–479, abr. 2012.

DZAH, Courage Sedem; DZIGBOR, Aaron. Ultrasound assisted extraction: A relook at solvent to material ratio, its effects on process efficiency and how it can be exploited for different uses. v. 46, n. 7, p. e14339, 2023.

EGEA, Mariana Buranelo *et al.* The potential, strategies, and challenges of *Monascus* pigment for food application. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 7, p. 1141644, 23 mar. 2023.

ELBARGISY, Rehab Mohammed. Optimization of nutritional and environmental conditions for pyocyanin production by urine isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, n. 1, p. 993–1000, jan. 2021.

EL-BIALY, Heba A. *et al.* Microbial melanin physiology under stress conditions and gamma radiation protection studies. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 162, p. 178–186, set. 2019.

EL-FOULY, M. Z. *et al.* Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 8, n. 1, p. 36–48, jan. 2015.

EL-NAGGAR, Noura El-Ahmady; SABER, WesamEldin I. A. Natural Melanin: Current Trends, and Future Approaches, with Especial Reference to Microbial Source. **Polymers**, v. 14, n. 7, p. 1339, 25 mar. 2022.

ESKANDARI, S.; ETEMADIFAR, Z. Melanin biopolymers from newly isolated *Pseudomonas koreensis* strain UIS 19 with potential for cosmetics application, and optimization on molasses waste medium. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 3, p. 1331–1343, set. 2021.

FARAAG, Ahmed Hassan Ibrahim; EL-BATAL, Ahmed I.; EL-HENDAWY, Hoda H. Characterization of prodigiosin produced by *Serratia marcescens* strain isolated from irrigation water in Egypt. v. 15, n. 5, p. 55–68, 2017.

FENG, Yanli; SHAO, Yanchun; CHEN, Fusheng. *Monascus* pigments. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 6, p. 1421–1440, dez. 2012.

GARCIA-CORTES, Alejandra *et al.* Pigment Production Improvement in *Rhodotorula mucilaginosa* AJB01 Using Design of Experiments. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 387, 14 fev. 2021.

GEDELA, Ravi *et al.* High yield production of lipid and carotenoids in a newly isolated *Rhodotorula mucilaginosa* by adapting process optimization approach. **Biofuels**, v. 14, n. 5, p. 509–520, 28 maio 2023.

GHADGE, Vishal *et al.* Facile Alternative Sustainable Process for the Selective Extraction of Microbial Melanin. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 10, n. 8, p. 2681–2688, 28 fev. 2022.

GHOSH, Sandip; CHAKRABORTY, Abhinaba; DAM, Bomba. Improved yield of UV and heat-stable *Monascus* yellow pigment by statistical optimization of solid-state fermentation conditions and extraction process. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 98, p. 103859, dez. 2024.

GÓMEZ-MARÍN, Ana M.; SÁNCHEZ, Carlos I. Thermal and mass spectroscopic characterization of a sulphur-containing bacterial melanin from *Bacillus subtilis*. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 356, n. 31–32, p. 1576–1580, jul. 2010.

GONÇALVES, Thiago; VASCONCELOS, Ulrich. Colour Me Blue: The History and the Biotechnological Potential of Pyocyanin. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 927, 10 fev. 2021.

GONG, Pengfei *et al.* Recent advances in monascus pigments produced by *Monascus purpureus*: Biosynthesis, fermentation, function, and application. **LWT**, v. 185, p. 115162, ago. 2023.

GREWAL, Jasneet *et al.* Colorful Treasure From Agro-Industrial Wastes: A Sustainable Chassis for Microbial Pigment Production. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 832918, 31 jan. 2022.

GUPTA, Mahiti *et al.* Natural pigments: recent advances and challenges in production and application. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, p. 1–20, 5 fev. 2026.

HALL, Susan *et al.* Cellular Effects of Pyocyanin, a Secreted Virulence Factor of *Pseudomonas aeruginosa*. **Toxins**, v. 8, n. 8, p. 236, 9 ago. 2016.

HAN, Rui *et al.* High-level production of microbial prodigiosin: A review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 6, p. 506–523, jun. 2021.

HARITH, Zuharlida Tuan *et al.* Optimised Production and Extraction of Astaxanthin from the Yeast *Xanthophyllomyces dendrorhous*. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 430, 19 mar. 2020.

HONSELMANN GENANNT HUMME, Joanna *et al.* The Comparison of Typical Organic Solvents and Ionic Liquid for More Environmentally and User-Friendly Pyocyanin Extraction. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 64, n. 1, p. 781–787, 8 jan. 2025.

HU, W. L. *et al.* Isolation and Characterization of Extracellular Melanin Produced by *Chroogomphus rutilus* D447. v. 10, n. 2, p. 68–77, 2015.

HYOICHIRO, Sakurai *et al.* Studies on Microbial Utilization of Petroleum. I. Separation and Characterization of Carotenoids Produced by a Species of *Brevibacterium* in Hydrocarbon Media. v. 44, n. 2, 1971.

IBRAHIM, Ghada S. *et al.* Bio-production and characterization of carotenoid yellow pigment from *Kocuria* sp. GMA and exploring its sustainable antioxidant, antimicrobial and antibiofilm properties. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 67, n. 8, p. 57–68, 1 ago. 2024.

ISLAN, German A. *et al.* Prodigiosin: a promising biomolecule with many potential biomedical applications. **Bioengineered**, v. 13, n. 6, p. 14227–14258, jun. 2022.

JABŁOŃSKA, Joanna *et al.* The influence of nanomaterials on pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Nanoscience**, v. 12, n. 6, p. 1929–1940, jun. 2022.

JABŁOŃSKA, Joanna *et al.* The two faces of pyocyanin - why and how to steer its production? **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 103, abr. 2023.

JAFFER, Zahraa Mohammed; HAMEED, Khalid W.; IMRAN, Sahar Ghazi. Extraction of prodigiosin using aqueous two phase system. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 1076, n. 1, p. 012026, 1 fev. 2021.

KAHRAMAN, Hüseyin; KARADERI, Cennet. Pyocyanine Production, Twitching Motility and Hydrophobicity of Different Wastes on *Pseudomonas aeruginosa*. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 30, n. 2, p. 1641–1645, 5 fev. 2021.

KORDJAZI, Talayeh *et al.* Streptomyces as Microbial Cell Factories for the Biotechnological Production of Melanin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 5, p. 3013, 5 mar. 2024.

KUHN, R. *et al.* Indigoidine and Other Bacterial Pigments Related to 3,3'-Bipyridyl. v. 51, p. 71–84, 1965.

KUMAR SHETTY, Anala Vinay *et al.* Production and extraction of red pigment by solid-state fermentation of broken rice using *Monascus sanguineus* NFCCI 2453. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 33, p. 101964, maio 2021.

LAKSHMIDEVI, Rajendran *et al.* Valorisation of molasses by oleaginous yeasts for single cell oil (SCO) and carotenoids production. **Environmental Technology & Innovation**, v. 21, p. 101281, fev. 2021.

LEBEAU, Juliana *et al.* Alternative Extraction and Characterization of Nitrogen-Containing Azaphilone Red Pigments and Ergosterol Derivatives from the Marine-Derived Fungal *Talaromyces* sp. 30570 Strain with Industrial Relevance. **Microorganisms**, v. 8, n. 12, p. 1920, 3 dez. 2020.

LIU, Dan *et al.* Yeast cell disruption strategies for recovery of intracellular bio-active compounds — A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 36, p. 181–192, ago. 2016.

LIU, Jun *et al.* Cost-effective pigment production by *Monascus purpureus* using rice straw hydrolysate as substrate in submerged fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 129, n. 2, p. 229–236, fev. 2020.

LIU, Weijie *et al.* An in situ extractive fermentation strategy for enhancing prodigiosin production from *Serratia marcescens* BWL1001 and its application to inhibiting the growth of *Microcystis aeruginosa*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 166, p. 107836, fev. 2021.

LIU, Zhi-Wei *et al.* The efficiency and comparison of novel techniques for cell wall disruption in astaxanthin extraction from *Haematococcus pluvialis*. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 53, n. 9, p. 2212–2219, set. 2018.

LOPES, Fernanda Cortez; LIGABUE-BRAUN, Rodrigo. Agro-Industrial Residues: Eco-Friendly and Inexpensive Substrates for Microbial Pigments Production. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 589414, 18 mar. 2021.

LÓPEZ, Gerson-Dirceu *et al.* Bacterial Carotenoids: Extraction, Characterization, and Applications. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1239–1262, 18 ago. 2023.

LU, Ying *et al.* Isolation, Purification, and Anti-Aging Activity of Melanin from *Lachnum singermanum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 2, p. 762–771, set. 2014.

- MACHADO, Whallans Raphael Couto *et al.* Optimization of agro-industrial coproducts (molasses and cassava wastewater) for the simultaneous production of lipids and carotenoids by *Rhodotorula mucilaginosa*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 42, p. 102342, jul. 2022.
- MAPELLI-BRAHM, Paula *et al.* Microalgae, Seaweeds and Aquatic Bacteria, Archaea, and Yeasts: Sources of Carotenoids with Potential Antioxidant and Anti-Inflammatory Health-Promoting Actions in the Sustainability Era. **Marine Drugs**, v. 21, n. 6, p. 340, 1 jun. 2023.
- MARIUTTI, Lilian R. B.; MERCADANTE, Adriana Z. Carotenoid esters analysis and occurrence: What do we know so far? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 648, p. 36–43, jun. 2018.
- MARTÍNEZ, J. M. *et al.* Evaluation of pulsed electric fields technology for the improvement of subsequent carotenoid extraction from dried *Rhodotorula glutinis* yeast. **Food Chemistry**, v. 323, p. 126824, set. 2020.
- MATHEW, Dayana; BHAT, Sarita G. Statistical design for biogenesis of melanin nanoparticles from producer strain *Pseudomonas stutzeri* BTCZ 109 through Taguchi DOE. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 42, p. 102366, jul. 2022.
- MAURYA, Anisha *et al.* Effect of Amino Acid Supplementation on Prodigiosin and its Derivatives Production Using Agro-Waste as Potential Substrate. **Indian Journal of Microbiology**, 31 jul. 2024.
- MEHRI, Dilara; PERENDECI, N. Altinay; GOKSUNGUR, Yekta. Utilization of Whey for Red Pigment Production by *Monascus purpureus* in Submerged Fermentation. **Fermentation**, v. 7, n. 2, p. 75, 10 maio 2021.
- MENDES-SILVA, Tayane De Cássia Dias *et al.* Biotechnological Potential of Carotenoids Produced by Extremophilic Microorganisms and Application Prospects for the Cosmetics Industry. **Advances in Microbiology**, v. 10, n. 08, p. 397–410, 2020.
- MENDES-SILVA, Tayane De Cássia Dias *et al.* Production of carotenoid sarcinaxanthin by *Kocuria palustris* isolated from Northeastern Brazil Caatinga soil and their antioxidant and photoprotective activities. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 44–53, set. 2021.
- METWALLY, Rasha A. *et al.* Optimization and multiple in vitro activity potentials of carotenoids from marine *Kocuria* sp. RAM1. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 18203, 28 out. 2022.
- MEYER, Jean-Marie. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. **Archives of Microbiology**, v. 174, n. 3, p. 135–142, 30 ago. 2000.
- MICHAEL, Helan Soundra Rani *et al.* Melanin biopolymers from microbial world with future perspectives—a review. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 9, p. 306, 14 ago. 2023.
- MIGLANI, Kanika *et al.* Sustainable production of prodigiosin from rice straw derived xylose by using isolated *Serratia marcescens* (CMS 2): statistical optimization, characterization, encapsulation & cost analysis. **Sustainable Food Technology**, v. 1, n. 6, p. 837–849, 2023.

MNIF, Sami *et al.* Prodigiosin from *Serratia*: Synthesis and potential applications. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 12, n. 6, p. 233–242, jun. 2022.

MOLINO, Antonio *et al.* Extraction of astaxanthin from microalga *Haematococcus pluvialis* in red phase by using generally recognized as safe solvents and accelerated extraction. **Journal of Biotechnology**, v. 283, p. 51–61, out. 2018.

MORADI, Samira; MORTAZAVI, Seyed Ali. Evaluation of *Monascus purpureus* fermentation in dairy sludge-based medium for enhanced production of vibrant red pigment with minimal citrinin content. **PLOS ONE**, v. 19, n. 12, p. e0315006, 9 dez. 2024.

MÜJDECI, GAMZE NUR. Natural Melanin Synthesized by *Aureobasidium pullulans* Using Food Wastes and its Characterization: Characterization of natural melanin produces by *Aureobasidium pullulans*. **Applied Food Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 307–318, 2 out. 2021.

MÜJDECI, Gamze Nur. Experimental modeling and optimization of melanin production by *Aureobasidium pullulans* NBRC 100716 in carrot peel extract. **Environmental Progress & Sustainable Energy**, v. 41, n. 6, p. e13919, nov. 2022.

MUKHERJEE, Gunjan; SINGH, Sanjay Kumar. Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 188–192, jan. 2011.

MUSSAGY, Cassamo U. *et al.* Protic Ionic Liquids as Cell-Disrupting Agents for the Recovery of Intracellular Carotenoids from Yeast *Rhodotorula glutinis* CCT-2186. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, n. 19, p. 16765–16776, 7 out. 2019a.

MUSSAGY, Cassamo U. *et al.* Selective recovery and purification of carotenoids and fatty acids from *Rhodotorula glutinis* using mixtures of biosolvents. **Separation and Purification Technology**, v. 266, p. 118548, jul. 2021.

MUSSAGY, Cassamo U. *et al.* Recovery of β -carotene and astaxanthin from *Phaffia rhodozyma* biomass using aqueous solutions of cholinium-based ionic liquids. **Separation and Purification Technology**, v. 290, p. 120852, jun. 2022a.

MUSSAGY, Cassamo U. *et al.* Production of natural astaxanthin by *Phaffia rhodozyma* and its potential application in textile dyeing. **Biochemical Engineering Journal**, v. 187, p. 108658, nov. 2022b.

MUSSAGY, Cassamo U. *et al.* Tailor-made solvents for microbial carotenoids recovery. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 1, p. 234, dez. 2024.

MUSSAGY, Cassamo Ussemane *et al.* Production and extraction of carotenoids produced by microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 3, p. 1095–1114, fev. 2019b.

NEMER, Georgio *et al.* Mechanical Cell Disruption Technologies for the Extraction of Dyes and Pigments from Microorganisms: A Review. **Fermentation**, v. 7, n. 1, p. 36, 9 mar. 2021.

NGUYEN, Thi Hanh; WANG, San-Lang; NGUYEN, Van Bon. Recent Advances in Eco-Friendly and Scaling-Up Bioproduction of Prodigiosin and Its Potential Applications in Agriculture. **Agronomy**, v. 12, n. 12, p. 3099, 7 dez. 2022.

NGUYEN, Thi-Hanh *et al.* Bioprocessing of Marine Chitinous Wastes for the Production of Bioactive Prodigiosin. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3138, 24 maio 2021.

NIERO, Henrique *et al.* Carotenoids produced by the deep-sea bacterium *Erythrobacter citreus* LAMA 915: detection and proposal of their biosynthetic pathway. **Folia Microbiologica**, v. 66, n. 3, p. 441–456, jun. 2021.

NOBY, Nehad; KHATTAB, Sherine N.; SOLIMAN, Nadia A. Sustainable production of bacterioruberin carotenoid and its derivatives from *Arthrobacter agilis* NP20 on whey-based medium: optimization and product characterization. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 10, n. 1, p. 46, 24 jul. 2023.

NUMAN, Muhammad *et al.* Chemical profile and in-vitro pharmacological activities of yellow pigment extracted from *Arthrobacter gandavensis*. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 74–82, dez. 2018.

OCHOA-VIÑALS, Nayra *et al.* Current Advances in Carotenoid Production by *Rhodotorula* sp. **Fermentation**, v. 10, n. 4, p. 190, 30 mar. 2024.

OLIVEIRA, Bianca Teixeira Morais *et al.* Craft beer waste as substrate for pyocyanin synthesis. v. 14, n. 1, p. 21–25, 2019.

PAILLIÈ-JIMÉNEZ, Maria Elisa; STINCONE, Paolo; BRANDELLI, Adriano. Natural Pigments of Microbial Origin. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, p. 590439, 30 set. 2020.

PANTELIC, Lena *et al.* Upcycling of food waste streams to valuable biopigments pyocyanin and 1-hydroxyphenazine. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 171, p. 110322, dez. 2023.

PAPAPOSTOLOU, Harris *et al.* Natural Carotenoids: Recent Advances on Separation from Microbial Biomass and Methods of Analysis. **Antioxidants**, v. 12, n. 5, p. 1030, 29 abr. 2023.

PAREDES CONTRERAS, Beatriz Vivian *et al.* Enhanced UV-B photoprotection activity of carotenoids from the novel *Arthrobacter* sp. strain LAPM80 isolated from King George Island, Antarctica. **Heliyon**, v. 11, n. 1, p. e41400, jan. 2025.

PAUL, Tania *et al.* A comprehensive review on recent trends in production, purification, and applications of prodigiosin. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 12, n. 4, p. 1409–1431, abr. 2022a.

PAUL, Tania *et al.* Downstream Process Development for Extraction of Prodigiosin: Statistical Optimization, Kinetics, and Biochemical Characterization. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, n. 11, p. 5403–5418, nov. 2022b.

PFANDER, Hanspeter. [1] Carotenoids: An overview. *In: Methods in Enzymology*. [S.l.]: Elsevier, 1992. v. 213 p. 3–13.

PFEIFFER, Thomas; MORLEY, Annabel. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 1, 21 out. 2014.

RAJENDRAN, Poorniammal; SOMASUNDARAM, Prabhu; DUFOSSÉ, Laurent. Microbial pigments: Eco-friendly extraction techniques and some industrial applications. **Journal of Molecular Structure**, v. 1290, p. 135958, out. 2023.

RAM, Shruti *et al.* Bacteria as an alternate biofactory for carotenoid production: A review of its applications, opportunities and challenges. **Journal of Functional Foods**, v. 67, p. 103867, abr. 2020.

RATHER, Luqman Jameel *et al.* Research progress, challenges, and perspectives in microbial pigment production for industrial applications - A review. **Dyes and Pigments**, v. 210, p. 110989, fev. 2023.

RIBEIRO, José Evangelista Santos *et al.* Rhodotorula glutinis cultivation on cassava wastewater for carotenoids and fatty acids generation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101419, nov. 2019.

RIBEIRO, Renata M. M. G. P. *et al.* Synergistic Effects of Stirring and Aeration Rate on Carotenoid Production in Yeast *Rhodotorula toruloides* CCT 7815 Envisioning Their Application as Soap Additives. **Fermentation**, v. 9, n. 9, p. 828, 11 set. 2023.

RUDRAPPA, Muthuraj *et al.* Bioproduction, purification and physicochemical characterization of melanin from *Streptomyces* sp. strain MR28. **Microbiological Research**, v. 263, p. 127130, out. 2022.

SAINI, Ramesh Kumar; KEUM, Young-Soo. Progress in Microbial Carotenoids Production. **Indian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 129–130, mar. 2017.

SAINI, Ramesh Kumar; KEUM, Young-Soo. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. **Food Chemistry**, v. 240, p. 90–103, fev. 2018.

SALAZAR, Oriana; ASENJO, Juan A. Enzymatic lysis of microbial cells. v. 29, n. 7, p. 985–994, 2007.

SANTOS, André Luiz Da Conceição; FERREIRA, Anna Clara Accioly; FIGUEIREDO, José Ricardo De. Potential use of bacterial pigments as anticancer drugs and female reproductive toxicity: a review. **Ciência Animal Brasileira**, v. 23, p. e-72911, 2022.

SAUBENOVA, Margarita *et al.* Production of Carotenoids by Microorganisms. **Fermentation**, v. 10, n. 10, p. 502, 30 set. 2024.

SENA, Amanda Reges De *et al.* Application of Doehlert experimental design in the optimization of experimental variables for the *Pseudozyma* sp. (CCMB 306) and *Pseudozyma* sp. (CCMB 300) cell lysis. **Food Science and Technology**, v. 32, n. 4, p. 761–767, 2 nov. 2012.

SHARMA, Chikanshi; KAMLE, Madhu; KUMAR, Pradeep. Microbial-Derived Carotenoids and Their Health Benefits. **Microbiology Research**, v. 15, n. 3, p. 1670–1689, 27 ago. 2024.

SHARMA, Rajan; GHOSHAL, Gargi. Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) using agro-industrial waste in bioreactor: A statistical approach. **Biotechnology Reports**, v. 25, p. e00407, mar. 2020.

SHARMA, Rajan; GHOSHAL, Gargi. Characterization and cytotoxic activity of pigment extracted from *Rhodotorula mucilaginosa* to assess its potential as bio-functional additive in confectionary products. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 7, p. 2688–2698, jul. 2021.

SHEN, Hai-Bo *et al.* Enhanced bioelectricity generation by improving pyocyanin production and membrane permeability through sophorolipid addition in *Pseudomonas aeruginosa*-inoculated microbial fuel cells. **Bioresource Technology**, v. 167, p. 490–494, set. 2014.

SILBIR, Selim; GOKSUNGUR, Yekta. Natural Red Pigment Production by *Monascus Purpureus* in Submerged Fermentation Systems Using a Food Industry Waste: Brewer's Spent Grain. **Foods**, v. 8, n. 5, p. 161, 11 maio 2019.

SILVEIRA, Silvana Terra *et al.* Stability Modeling of Red Pigments Produced by *Monascus purpureus* in Submerged Cultivations with Sugarcane Bagasse. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 4, p. 1007–1014, abr. 2013.

SINHA, Sweta *et al.* Anti-microbial, anti-oxidant, and anti-breast cancer properties unraveled in yeast carotenoids produced via cost-effective fermentation technique utilizing waste hydrolysate. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 1088477, 18 jan. 2023.

SOBIN, Ben; STAHLY, Grant L. The Isolation and Absorption Spectrum Maxima of Bacterial Carotenoid Pigments. **Journal of Bacteriology**, v. 44, n. 3, p. 265–276, set. 1942.

SUN, Han *et al.* Microalgae-Derived Pigments for the Food Industry. **Marine Drugs**, v. 21, n. 2, p. 82, 25 jan. 2023.

SUNDARARAJAN, Priya; RAMASAMY, Shanmuga Priya. Current perspectives on industrial application of microbial carotenoid as an alternative to synthetic pigments. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 37, p. 101353, fev. 2024.

SUTHAR, Malika; DUFOSSÉ, Laurent; SINGH, Sanjay K. The Enigmatic World of Fungal Melanin: A Comprehensive Review. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 9, p. 891, 31 ago. 2023.

TERÁN HILARES, Ruly *et al.* Sugarcane bagasse hydrolysate as a potential feedstock for red pigment production by *Monascus ruber*. **Food Chemistry**, v. 245, p. 786–791, abr. 2018.

TERRONES RODRÍGUEZ, Nicole Alejandra *et al.* Optimization of Total Carotenoid Production by *Rhodotorula mucilaginosa* from Artichoke Agroindustrial Waste Using Response Surface Methodology. **Environmental Research, Engineering and Management**, v. 79, n. 2, p. 111–121, 18 jul. 2023.

TRONINA, Tomasz *et al.* Prenylated Flavonoids with Selective Toxicity against Human Cancers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 8, p. 7408, 18 abr. 2023.

TULI, Hardeep S. *et al.* Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 4669–4678, ago. 2015.

UĞURLU, Şenay; GÜNAN YÜCEL, Hande; AKSU, Zümriye. Valorization of food wastes with a sequential two-step process for microbial β -carotene production: A zero waste approach. **Journal of Environmental Management**, v. 340, p. 118003, ago. 2023.

VALDUGA, Eunice *et al.* Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, 2009.

VARDANEGA, Renata; CEREZAL-MEZQUITA, Pedro; VEGGI, Priscilla Carvalho. Supercritical fluid extraction of astaxanthin-rich extracts from *Haematococcus pluvialis*: Economic assessment. **Bioresource Technology**, v. 361, p. 127706, out. 2022.

VENDRUSCOLO, Franciello *et al.* Monascus: a Reality on the Production and Application of Microbial Pigments. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, n. 2, p. 211–223, jan. 2016.

VENIL, Chidambaram Kulandaisamy; DEVI, Ponnuswamy Renuka; AHMAD, Wan Azlina. Agro-Industrial Waste as Substrates for the Production of Bacterial Pigment. *In*: ZAKARIA, Zainul Akmar; BOOPATHY, Ramaraj; DIB, Julian Rafael (Orgs.). **Valorisation of Agro-industrial Residues – Volume I: Biological Approaches**. Applied Environmental Science and Engineering for a Sustainable Future. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 149–162.

VUKASINOVIC-MILIC, Tatjana; RAKIN, Marica; SILER-MARINKOVIC, Slavica. Utilization of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) for the production of yeast extract: Effects of different enzymatic treatments on solid, protein and carbohydrate recovery. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 72, n. 5, p. 451–457, 2007.

WANG, Xin *et al.* Two-Step Optimization for Improving Prodigiosin Production Using a Fermentation Medium for *Serratia marcescens* and an Extraction Process. **Fermentation**, v. 10, n. 2, p. 85, 30 jan. 2024.

WEI, Yu-Hong; YU, Wan-Ju; CHEN, Wei-Chuan. Enhanced undecylprodigiosin production from *Serratia marcescens* SS-1 by medium formulation and amino-acid supplementation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 4, p. 466–471, out. 2005.

YADAV, Kushi; VASHISHT, Manasvi; RAI, Monika Prakash. Employing microalgae cultivation on fruits and vegetable peel waste to produce biofuel, lutein, and biochar concurrently with an “Agro to Agro” algae biorefinery approach. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 32, n. 3, p. 1415–1429, 28 dez. 2024.

YU, Dengbin *et al.* New applications of genetically modified *Pseudomonas aeruginosa* for toxicity detection in water. **Chemosphere**, v. 184, p. 106–111, out. 2017.

YU, Xue *et al.* Purification, Identification, and Properties of a Novel Carotenoid Produced by *Arthrobacter* sp. QL17 Isolated from Mount Qomolangma. **Antioxidants**, v. 11, n. 8, p. 1493, 29 jul. 2022.

ZAKARIA, Zainul Akmar; BOOPATHY, Ramaraj; DIB, Julian Rafael (ORGS.). **Valorisation of Agro-industrial Residues – Volume I: Biological Approaches**. Cham: Springer International Publishing, 2020.

ZHANG, Congqiang; CHEN, Xixian; TOO, Heng-Phon. Microbial astaxanthin biosynthesis: recent achievements, challenges, and commercialization outlook. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 13, p. 5725–5737, jul. 2020.

ZHAO, J. *et al.* Anticancer effects of pyocyanin on HepG2 human hepatoma cells. **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 541–548, jun. 2014.

ZHOU, Jianjun *et al.* Pulsed electric fields (PEF), pressurized liquid extraction (PLE) and combined PEF + PLE process evaluation: Effects on Spirulina microstructure, biomolecules recovery and Triple TOF-LC-MS-MS polyphenol composition. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 77, p. 102989, maio 2022.

ZOU, Yu Mu; XIE, Chunyan; FAN, Gongjan. Optimization of ultrasound-assisted extraction of melanin from Auricularia auricula fruit bodies. v. 11, n. 4, p. 611–615, 2010.

4 CAPÍTULO 3

Determinação das condições de cultivo para produção de pigmentos por *Arthrobacter koreensis* PSR 37 e *Kocuria sp.* PSR 51 em melaço de soja como substrato: influência da radiação ultravioleta e potencial biotecnológico

Resumo

Pigmentos microbianos despontam como alternativas sustentáveis aos corantes sintéticos, especialmente quando produzidos a partir de substratos de baixo custo. Microrganismos de ambientes extremos, particularmente expostos a altas doses de radiação, tendem a apresentar elevada capacidade de biossíntese desses pigmentos. Duas cepas bacterianas isoladas de painéis fotovoltaicos, *Arthrobacter koreensis* PSR 37 e *Kocuria sp.* PSR 51, foram avaliadas quanto à produção de carotenoides em meio sintético e em melaço de soja, e submetidas a ensaios de estresse por radiação ultravioleta (UV-A, UV-B e UV-C), para potencial estímulo da biossíntese. Temperatura e tempo de cultivo também foram avaliados. As condições ótimas diferiram entre as cepas: PSR 37 apresentou maior produção de carotenoides a 15 °C (958,66 µg/L), enquanto PSR 51 atingiu máxima síntese a 30 °C (610 µg/L); ambos após 72 h. O melaço de soja não se mostrou eficiente nas condições testadas, e a radiação UV, nas doses utilizadas. Os extratos pigmentares apresentaram forte atividade antimicrobiana, com inibição superior a 90% frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*, com concentrações de 4,5 mg/L (PSR 37) e 6,0 mg/L (PSR 51). A atividade fotoprotetora foi elevada, com FPS de $32,70 \pm 0,46$ e $31,86 \pm 0,27$, respectivamente, e a atividade antioxidante dependente do tempo, atingiu até 76,9% (PSR 37) e 89,7% (PSR 51) de sequestro de DPPH após 60 min (12 mg/L). Ensaios de citotoxicidade mostraram viabilidade celular superior a 50% em linhagens 3T3 e HaCaT, indicando baixa toxicidade. Em síntese, os resultados demonstram o relevante potencial biotecnológico desses carotenoides bacterianos para aplicações industriais e farmacêuticas.

Palavras-Chave: atividades biológicas; circularidade; estresse celular; substrato alternativo.

Abstract

Microbial pigments are emerging as sustainable alternatives to synthetic dyes, especially when produced from low-cost substrates. Microorganisms from extreme environments, particularly those exposed to high doses of radiation, tend to exhibit a high capacity for biosynthesizing these pigments. Two bacterial strains isolated from photovoltaic panels, *Arthrobacter koreensis* PSR 37 and *Kocuria sp.* PSR 51, were evaluated for carotenoid production in synthetic media and in soybean molasses, and subjected to ultraviolet radiation stress assays (UV-A, UV-B, and UV-C) to potentially stimulate biosynthesis. Temperature and cultivation time were also evaluated. Optimal conditions differed between the strains: PSR 37 showed the highest carotenoid production at 15 °C (958.66 µg/L), while PSR 51 reached maximum synthesis at 30 °C (610 µg/L); both after 72 h. Soybean molasses did not prove effective under the tested conditions, nor did UV radiation at the doses used. The pigment extracts showed strong antimicrobial activity, with inhibition greater than 90% against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*, at concentrations of 4.5 mg/L (PSR 37) and 6.0 mg/L (PSR 51). Photoprotective activity was high, with SPF of 32.70 ± 0.46 and 31.86 ± 0.27 , respectively, and time-dependent antioxidant activity reached up to 76.9% (PSR 37) and 89.7% (PSR 51) DPPH scavenging after 60 min (12 mg/L). Cytotoxicity assays showed cell viability greater than 50% in 3T3 and HaCaT cell lines, indicating low toxicity. In summary, the results demonstrate the significant biotechnological potential of these bacterial carotenoids for industrial and pharmaceutical applications.

Keywords: biological activities; circularity; cell stress; alternative substrate.

4.1 INTRODUÇÃO

O uso de pigmentos sintéticos pode levar à geração de resíduos tóxicos, com potencial para poluir o meio ambiente e gerar preocupações relacionadas à saúde dos organismos. Apesar disso, os pigmentos sintéticos apresentam ampla aplicação em vários setores, como os de cosméticos, tintas e plásticos, pois apresentam melhor relação custo-benefício na produção em larga escala (PAREDES CONTRERAS et al., 2025).

Alternativas como o uso de corantes extraídos de plantas tendem a ser mais onerosas, além disso, esses pigmentos são rapidamente desnaturados na presença de variações de pH, como também podem não garantir reprodutibilidade entre lotes (AGARWAL et al., 2023). Ademais, sua obtenção pode resultar na geração de biomassa vegetal como subproduto, configurando material residual ou desperdício proveniente de outros processos produtivos (AKULAVA et al., 2024).

O mercado global de carotenoides encontra-se em expansão e, de acordo com projeções de especialistas, deverá atingir US\$ 2,7 bilhões até 2027, com uma taxa de crescimento anual composta de 5,7% no período de 2022-2027 (BCC Research, 2022). A astaxantina, em particular, movimentou US \$ 192,5 milhões em 2020, com previsão de crescimento para cerca de US \$ 228,4 milhões até 2027.

A produção de carotenoides é predominantemente realizada por síntese química, representando a 80–90% da produção global, principalmente devido ao menor custo estimado entre US\$ 250–2000/kg, quando comparado aos carotenoides derivados de plantas, cujos custos variam entre US\$ 350–7500/kg. No entanto, a biomassa de algas contendo carotenoides é comercializada a preços significativamente inferiores, em torno de US \$ 40–50/kg (AGARWAL et al., 2023).

Neste contexto, a produção de pigmentos por microrganismos pode ser vantajosa e competitiva em escala industrial. Os microrganismos exibem velocidade de crescimento relativamente maior que as plantas, sendo, portanto, amplamente considerados biofontes alternativas para produção de pigmentos (ALLAHKARAMI et al., 2021). Entretanto, devido à limitada disponibilidade comercial, os pigmentos de origem microbiana ainda não são amplamente utilizados pelas indústrias.

O elevado custo do meio nutricional para cultivar os microrganismos representa um dos principais obstáculos que dificultam a produção em larga escala desses pigmentos. Como alternativa, tem-se investigado o uso de substratos de baixo custo para o cultivo microbiano. As biomassas oriundas do processamento de produtos agrícolas e alimentícios são ricas em

carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais, contudo, a maior parte desses resíduos não é aproveitada de maneira eficiente, o que pode resultar em riscos de poluição ambiental (NOBY; KHATTAB; SOLIMAN, 2023).

O melaço de soja, um subproduto gerado na obtenção de proteína concentrada de soja via extração hidroalcóolica (RODRIGUES et al., 2020), tem sido investigado como substrato alternativo para o cultivo microbiano (DA SILVA et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2008; YANG et al., 2018). Entretanto, a literatura científica ainda carece de informações acerca da exploração de melaço de soja na produção de pigmentos microbianos.

No Brasil, estima-se que a produção de grãos de soja na safra 2023/2024 seja de aproximadamente 297,54 milhões de toneladas (CONAB, 2024). Para cada tonelada de soja processada, obtém-se cerca de 720 kg de farelo, utilizado para a obtenção de concentrados proteicos, o que resulta na geração aproximada de 190 kg de melaço de soja (SIQUEIRA et al., 2008).

Carotenoides produzidos por microrganismos apresentam promissor potencial biotecnológico, não apenas para o seu uso como corantes nas indústrias têxtil, cosmética, alimentícia, mas também em função de seus efeitos protetivo frente à radiação ultravioleta (UV), ação antioxidante, biossurfactante, anticancerígena e antimicrobiana (IBRAHIM et al., 2024; MENDES-SILVA et al., 2021; YU et al., 2022).

A produção de pigmentos microbianos está frequentemente associada a ambientes física e quimicamente extremos (BRAHMA; DUTTA, 2022). Desta forma, microrganismos capazes de crescer em condições adversas, como superfícies expostas a irradiação solar, podem apresentar elevado potencial biotecnológico, em razão de suas propriedades de resistência à radiação e à dessecação.

Diversos estudos têm isolado e identificado microrganismos de ambientes com condições extremas de sobrevivência como fontes valiosas de novos genes, os quais podem ser explorados para obtenção de novos bioprodutos, incluindo pigmentos, enzimas e outros metabólitos bioativos (BRAHMA; DUTTA, 2022; MENDES-SILVA et al., 2021; TIMKINA et al., 2022). Em relação aos carotenoides, seu principal papel está associado à proteção celular contra os efeitos deletérios de espécies reativas de oxigênio e da radiação (RAPOPORT et al., 2021).

Um exemplo de ambiente fisicamente extremo é o painel fotovoltaico, cuja superfície abriga uma comunidade microbiana altamente diversa, submetida a condições críticas de sobrevivência, como exposição diária a intensa radiação ambiental, altas temperaturas e baixa umidade (MOURA et al., 2021).

O gênero *Kocuria*, por exemplo, é composto por bactérias em formato de cocos, Gram-positivos, aeróbios, não formadores de endósporos, catalase-positivas, coagulase-negativas, não hemolíticas e produtores de pigmentos, além de apresentarem elevada capacidade de sobreviver em condições extremas. Em termos de uso biotecnológico, essas bactérias têm uma gama diversificada de produtos e processos metabólicos passíveis de exploração (TIMKINA et al., 2022).

Outro gênero de interesse biotecnológico é *Arthrobacter*, inicialmente descrito por Conn e Dimmich (1947), que compreende bactérias Gram-positivas, aeróbias, com um ciclo morfológico bastonete-coco dependente da fase de crescimento, exibindo formato de bastonete em culturas jovens e cocos em culturas mais antigas, e reconhecidas como produtoras de pigmentos (SUTTHIWONG et al., 2014).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar a produção de pigmentos por *Arthrobacter koreensis* PSR 37 e *Kocuria sp.* PSR 51, duas cepas bacterianas isoladas de painéis fotovoltaicos, empregando o melaço de soja como substrato. A radiação ultravioleta foi utilizada como fator de estresse celular, com o intuito de avaliar um possível incremento na produção de carotenoide. Além disso, foram avaliadas a atividade antimicrobiana, anti-UV, antioxidante e citotóxica, a fim de desvendar potenciais aplicações dos pigmentos produzidos por essas cepas recém isoladas.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Cepas Bacterianas

As cepas de *Arthrobacter koreensis* PSR 37 e *Kocuria sp.* PSR 51 foram previamente isoladas de painéis fotovoltaicos localizados na cidade de Sorocaba (-23°28'55" S, -47°22'19.9" W) durante o período de inverno, sendo sua identificação molecular realizada por Moura (2021).

De acordo com dados meteorológicos registrados pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), no mês de junho de 2020 – ano de coleta das amostras – observou-se temperatura média aproximada de 19 °C e umidade relativa do ar de 72 %. O nível de radiação solar atingiu 311,5 W/m², a precipitação pluviométrica foi de 0,05 mm e a temperatura do painel alcançou 43 °C. O painel amostrado havia sido instalado dois anos antes da coleta e não havia sido submetido a qualquer procedimento de limpeza (MOURA et al., 2021).

As bactérias foram armazenadas no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), sob refrigeração (2 a 5 °C), em meio ágar triptona de soja (TSA), sendo periodicamente reativadas por meio de subcultivos realizados em intervalos regulares.

4.2.2 Condições de cultivo e preparo do inóculo

As bactérias *Arthrobacter koreensis* PSR 37 e *Kocuria sp.* PSR 51 foram inicialmente cultivadas em meio TSA e incubadas a 30 °C durante 48 horas. Após esse período, uma alça calibrada de 10 µL foi usada para transferir o crescimento microbiano para 100 mL de meio *Brain Heart Infusion* (BHI), seguido de incubação por 48 h a 30 °C sob agitação de 150 rpm.

Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 7830 rpm para obtenção da biomassa microbiana, que foi ressuspensa em solução salina estéril (0,85% de NaCl) para padronização do inóculo. A densidade ótica da suspensão foi determinada em espectrofotômetro UV visível e ajustada para 1 a 600 nm (MARCELINO et al., 2019).

Os ensaios subsequentes de produção de pigmentos foram iniciados mediante a inoculação de 5% dessa suspensão padronizada (NOBY; KHATTAB; SOLIMAN, 2023), em frascos erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura.

4.2.3 Melaço de soja

O melaço de soja utilizado, cedido pela empresa CJ Selecta, localizada em Araguari, Minas Gerais foi mantido sob refrigeração (2 a 8 °C) até sua utilização. Para uso como meio de cultivo, foi realizada uma diluição em água na proporção 1:5.

A quantificação de monossacarídeos presentes no melaço foi realizada anteriormente por Amaral (2024), onde amostras de melaço diluído em água (1:5) foram analisadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) utilizando uma coluna Aminex HPX-87P, a fim de determinar a concentração de sacarose, glicose, xilose, galactose, arabinose, manose e frutose. Foram realizadas as leituras em um cromatógrafo Shimadzu equipado com detector de índice de refração RI-101 (volume de injeção de 200 µL), conforme descrito por Lazaro et al. (2012), no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da Escola de Engenharia de São Carlos (USP) (AMARAL, AZEVEDO M., 2024).

Dessa forma, o melaço de soja apresentou uma composição de 94,33 g/L de sacarose, 6,04 g/L de glicose, 14,10 g/L de xilose, 2,13 g/L de galactose e 5,47 g/L de frutose.

(AMARAL, AZEVEDO M., 2024). Esses dados confirmam as especificações da ficha técnica emitida pela empresa Selecta (Selecta, 2023).

4.2.4 Determinação das condições favoráveis de cultivo para a produção de pigmentos

As cepas de *Arthrobacter koreensis* PSR 37 e *Kocuria sp.* PSR 51 foram inicialmente cultivadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) e caldo nutriente (CN), por um período de 7 dias, a 30 °C e 150 rpm. O objetivo dessa etapa foi selecionar as condições mais favoráveis para produção de pigmentos, como variáveis, o tipo de meio sintético e tempo de cultivo e, como resposta, a concentração de carotenoides totais (µg/L).

Uma vez definidas as melhores condições para produção de pigmentos, procedeu-se à avaliação do potencial do melaço de soja como substrato. A etapa subsequente incluiu, como variáveis, temperatura (15, 30 e 45 °C) e o meio de cultivo (meio sintético e resíduo agroindustrial). Adicionalmente, foram verificadas a produção de biomassa seca (g/L) e o percentual de consumo de açúcar (%).

4.2.5 Procedimentos analíticos

4.2.5.1 Determinação da biomassa seca e consumo de açúcar

Para quantificação da biomassa seca (g/L), alíquotas de 5 mL de cada cultura foram centrifugadas a 7820 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. O precipitado celular resultante foi lavado com água destilada e centrifugado novamente nas mesmas condições. Esse procedimento de lavagem e centrifugação foi repetido por duas vezes para remoção de resíduos da cultura.

O precipitado celular foi então transferido para placas de Petri previamente pesadas e seco a 60 °C por 24 horas. Após a completa secagem, a massa das células secas foi determinada e os valores expressos em g/L (SHARMA e GHOSHAL, 2020).

A determinação da concentração de açúcares residuais no meio de cultura foi realizada pelo método de 3,5-dinitrossalicílico (DNS), descrito por Miller (1959) (MILLER, 1959).

4.2.5.2 Extração e quantificação do pigmento

O pigmento foi extraído da biomassa de acordo com Rezaeeyan et al. (2017), com algumas modificações. Inicialmente, um volume de 5 mL da cultura foi centrifugado a 7830 rpm por 10 minutos, em temperatura ambiente, e a biomassa precipitada foi lavada com água destilada para remoção de resíduos. Antes da extração, a biomassa seca presente em 5 mL da amostra foi determinada.

O precipitado celular foi ressuspenso em 5 mL de metanol e homogeneizado em vórtex por 1 minuto. Os tubos contendo a suspensão foram colocados em banho-maria a 60 °C por 15 minutos. Em seguida, a mistura de células e metanol foi submetida à ultrassonicação em banho ultrassônico USC-1600A, 40 kHz, à temperatura ambiente, por 10 minutos.

Após a sonicação, o material foi novamente centrifugado a 7830 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante colorido, contendo o pigmento dissolvido, foi filtrado através de papel de filtro Whatman nº 1 (REZAEYAN et al., 2017).

A concentração total de carotenoides foi determinada espectrofotometricamente e calculada de acordo com as Equações 1, 2 e 3 (MENDES-SILVA et al., 2021):

$$\mu g = \frac{A \times y (mL) \times 10^6}{A_{1cm}^{1\%} \times 100}$$

(1)

Onde: A = Absorbância máxima; y = volume do solvente usado na extração; $A_{1cm}^{1\%}$ = coeficiente de absorção = 2500.

$$Carotenoides\ específicos\ (\mu g/g) = \frac{\mu g}{peso\ da\ amostra\ (g)}$$

(2)

$$Carotenoides\ totais\ (\mu g/L) = Peso\ da\ biomassa\ seca \times Carotenoides\ específicos\ (\mu g/g)$$

(3)

4.2.6 Caracterização do pigmento extraído

4.2.6.1 Espectrofotometria UV-visível

O pigmento extraído foi analisado em espectrofotômetro UV-visível, realizando-se uma varredura dos picos máximos de absorbância entre 200 e 600 nm, a fim de confirmar a presença de carotenoides, segundo SIDIN; RETNANINGRUM (2022).

4.2.6.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia FTIR foi empregada para caracterização estrutural do pigmento extraído, com ênfase na identificação dos grupos funcionais presentes. Para essa análise, as cepas foram cultivadas nas condições otimizadas, e o extrato de pigmentos resultante desses cultivos foi diretamente analisado em FTIR.

Uma aliquota de 50 μL da amostra foi aplicada no equipamento para medição da intensidade dos picos de absorção. As análises foram feitas em um espectrômetro Agilent modelo Cary 630, na faixa entre 600 e 4000 cm^{-1} , no modo ATR (*Attenuated Total Reflectance*) com aquisição de 64 scans (MULIK; KUMBHAR; BHADEKAR, 2017).

4.2.6.3 Análise da produção de carotenoide após estresse celular por radiação ultravioleta

As cepas selvagens de *Arthrobacter koreensis* PSR 37 e *Kocuria sp.* PSR 51 foram cultivadas em caldo BHI, sob agitação de 150 rpm a 30 °C por 24 horas. Após o cultivo, a suspensão celular foi submetida à radiação UV-C em capela de fluxo laminar, enquanto a exposição à radiação UV-A e UV-B foi realizada em um simulador de radiação solar.

Para padronização dos inóculos, a suspensão celular foi ajustada a uma absorbância de 1,0 em a 600 nm com solução de NaCl a 0,85% (p/v). Diluições seriadas decimais foram realizadas até 10^{-5} , e alíquotas de 10 μL de cada diluição foram transferidas para placas de Petri contendo TSA para posterior irradiação com diferentes doses de UV.

Para experimentos de exposição UV-C, utilizou-se uma lâmpada Philips TUV-20W (254 nm). A irradiância foi calibrada usando um radiômetro Vilber Lourmat RMX-3W e fotocélula UV-C (CX-254, Vilber Lourmat), resultando em um fluxo UV-C aproximado de 0,1208 W, considerando a geometria da câmara e a distância da lâmpada. As doses de UV-C variaram de 0 a 600 J/m^2 .

Os testes de irradiação UV-A e UV-B foram conduzidos com o objetivo de simular condições ambientais semelhantes às encontradas em painéis fotovoltaicos. As suspensões microbianas foram expostas a doses progressivas de irradiação (0, 100, 200, 300 e 400 kJ/m²) por um período total de 120 minutos. A composição espectral da radiação constituída foi de 85,7% de UV-A, 11% de UV-B e 3,3% de luz visível, sendo todos os ensaios realizados à temperatura ambiente.

Durante as exposições, as placas de Petri foram submetidas a uma irradiância de 51,47 W/m² de UV-A e 35,55 W/m² de UV-B, conforme medido por um radiômetro Vilber Lourmat equipado com fotocélulas específicas para UV-A (CX-365) e UV-B (CX-312). Após a irradiação, as placas contendo as suspensões diluídas até 10⁻⁵ foram então incubadas a 30 ± 0,5 °C.

Uma única colônia que apresentou crescimento na placa de Petri submetida à maior dose de radiação, no período experimental, foi selecionada e transferida para um novo meio de cultura BHI visando ao cultivo, à produção e à extração de carotenoides. As condições de cultivo adotadas nesta fase foram definidas a partir dos resultados obtidos na etapa anterior de avaliação das variáveis do processo.

4.2.7 Atividade antimicrobiana e Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A atividade antimicrobiana foi analisada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), segundo Quintero *et al.* (2018), com modificações. Após a remoção do metanol do extrato pigmentar por rotaevaporação, o resíduo foi ressuspenso em 5 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se uma concentração de 18 mg/L de pigmentos de *Arthrobacter koreensis* PSR 37 e 30 mg/L de pigmentos *Kocuria sp.* PSR 51.

A atividade antimicrobiana de ambos os pigmentos foi avaliada frente a quatro microrganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 26923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Candida albicans* (ATCC 10231). As bactérias foram cultivadas em meio TSA e incubadas por 24 horas a 35 °C, enquanto a levedura foi cultivada em meio *Sabouraud* e incubada por 24 horas a 22,5 °C.

Posteriormente, as cepas foram inoculadas em caldo Mueller Hinton (MH) e incubadas por 48 horas a 30 °C, sob agitação de 150 rpm. As suspensões microbianas foram padronizadas utilizando o método indireto de medida do crescimento por turbidimetria, em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 600 nm, ajustando a absorbância para 0,5.

A avaliação da CIM foi realizada em microplacas de 96 poços. Inicialmente, cada poço recebeu 100 µL de meio MH e 20 µL de inóculo padronizado. Em seguida, foram adicionados volumes crescentes de pigmento (20 µL, 30 µL, 40 µL e 50 µL). Os poços foram então completados com meio de cultivo MH até o volume final de 200 µL, resultando em concentrações de 1,8 mg/L, 2,7 mg/L, 3,6 mg/L e 4,5 mg/L para os pigmentos provenientes de *Arthrobacter koreensis* PSR 37. Para os pigmentos *Kocuria sp.* PSR 51, foram utilizadas concentrações de 3 mg/L, 4,5 mg/L, 6 mg/L e 7,5 mg/L.

As microplacas foram submetidas à incubação a 37°C por um período de 18 horas. A leitura da absorbância foi realizada em um leitor de microplaca BioTek Synergy, a um comprimento de onda de 600 nm.

Para cada concentração de pigmento, foi estabelecido um controle em branco, composto por meio MH e os respectivos volumes de pigmento e o controle positivo incluiu o DMSO. Os percentuais de crescimento e inibição foram calculados utilizando as Equações 4 e 5, respectivamente. Os extratos foram considerados ativos quando apresentaram inibição de crescimento superior a 50% (Equação 5). Todos os experimentos foram realizados em sextuplicata, conforme descrito por QUINTERO et al. (2018).

$$\% \text{ Crescimento} = \frac{DO_{\text{Tratamento}} - DO_{\text{Branco}}}{DO_{\text{Controle positivo}}} \times 100$$

(4)

$$\% \text{ Inibição} = 100 - \% \text{ Crescimento}$$

(5)

4.2.8 Atividade fotoprotetora *in vitro*

O fator de proteção solar (FPS) do pigmento extraído foi determinado por meio de leituras espectrofotométricas das soluções diluídas, utilizando espectrofotômetro UV-visível modelo HASH DR 5000, conforme o método de Mansur et al. (1986). Soluções metanólicas dos pigmentos extraídos foram preparadas em triplicata, nas concentrações de 22,5 mg/L para pigmentos de *Arthrobacter koreensis* PSR 37 e 30 mg/L para pigmentos de *Kocuria sp.* PSR 51.

A absorvância das soluções foi determinada nos comprimentos de onda entre 290 e 320 nm com intervalos de 5 nm. Os valores de absorvância obtidos foram utilizados para o cálculo do FPS, aplicando-se a Equação 6. Os demais parâmetros necessários para o cálculo encontram-se descritos na Tabela 4.1.

$$FPS = FC \times \sum EE \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad (6)$$

Onde: FC = fator de correção (10); EE (λ) = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda (λ); I (λ) = intensidade de luz solar no comprimento de onda; Abs (λ) = leitura espectrofotométrica da absorvância da formulação em solução no comprimento de onda (λ)

TABELA 4.1 – Relação entre o efeito eritemogênico (EE) e a intensidade da radiação (I) para cada comprimento de onda

Comprimento de onda (nm)	EE x I
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180

Fonte: Mansur et al. (1986)

4.2.9 Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante do pigmento extraído foi avaliada por meio da metodologia descrita por Blois (1958), com adaptações. Para essa finalidade, empregou-se o ensaio modificado de sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), visando à determinação da atividade antioxidante do pigmento extraído.

O ensaio foi conduzido utilizando uma solução de DPPH a 0,4 mM preparada em metanol. A partir de uma solução estoque do pigmento na concentração de 7,5 mg/L, foram realizadas diluições seriadas sucessivas, com redução da concentração pela metade em cada etapa, totalizando 12 concentrações avaliadas. As amostras foram incubadas por períodos de 0, 30 e 60 minutos, e, ao final de cada intervalo, a absorbância foi determinada a 517 nm em espectrofotômetro UV-Vis.

A atividade antioxidante foi expressa em porcentagem e calculada com base na redução da absorbância do radical DPPH, conforme descrito na Equação (7).

$$Atividade\ antioxidante\ (\%) = \frac{A_{DPPH} - A_{Amostra}}{A_{DPPH}} \times 100$$

(7)

Onde: A_{DPPH} = absorbância (UA) a 517 nm da solução inicial de DPPH; $A_{Amostra}$ = absorbância medida após a adição dos extratos metanólicos contendo o pigmento.

4.2.10 Atividade citotóxica

A citotoxicidade do extrato de carotenoides foi investigada por meio do ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT), o qual avalia a atividade mitocondrial, com o objetivo de verificar seus efeitos sobre a viabilidade das linhagens celulares 3T3 (*Swiss Albino*) e HaCaT. Para o ensaio, foi preparada uma suspensão celular na densidade de 1×10^5 células/mL, a qual foi incubada por 24 horas a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, permitindo a aderência celular e a estabilização da cultura.

Após esse período, as células foram tratadas por 24 horas com os pigmentos extraídos nas concentrações de 1,0, 1,2 e 1,4 mg/L. Concluída a etapa de exposição, os poços foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) estéril e, em seguida, foi adicionada solução de MTT na concentração de 0,5 mg/mL, permanecendo as placas em incubação por aproximadamente 3 horas. Posteriormente, a solução de MTT foi removida, adicionou-se DMSO para solubilização do formazan, e a absorbância foi determinada a 540 nm em leitor de microplacas.

Todos os ensaios foram realizados em sextuplicata para cada concentração avaliada. Os resultados foram expressos como viabilidade celular relativa, considerando-se como 100% de viabilidade a média dos valores de absorbância obtidos para o controle negativo.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Determinação das condições de cultivo favoráveis para a produção de pigmentos

4.3.1.1 Definição do meio e tempo de cultivo

Na comparação entre os meios sintéticos BHI e CN (Tabela 4.2), o meio BHI apresentou maior concentração de biomassa para ambos os microrganismos. Em meio BHI *A. koreensis* PSR 37, apresentou uma biomassa máxima de 3,7 g/L após 96 horas de cultivo, com consumo de açúcar de 95,73 %. Já para *Kocuria sp.* PSR 51, a biomassa atingiu 4,87 g/L em 120 horas de cultivo, e consumo de açúcar de 98,59%.

No entanto, no meio CN, a produção de biomassa atingiu valores inferiores, com pico de 0,89 g/L em 144 horas de cultivo, sem consumo de açúcar detectável para *A. koreensis* PSR 37 (Figura 4.1A) e em 48 horas com produção de 1,05 g/L e consumo de açúcar de 45,33 % para *Kocuria sp.* PSR 51 (Figura 4.2A). Para *Kocuria sp.* PSR51, o maior acúmulo de biomassa no meio foi observado após 48 horas de cultivo, alcançando 1,05 g/L, e consumo de açúcar de 45,33%.

A produção específica de carotenoides, expressa como a razão entre a quantidade de pigmentos (μg) e a biomassa (g), foi superior no meio CN, para ambos os microrganismos. Para *A. koreensis* PSR 37, a maior produção específica foi de 1040 $\mu\text{g/g}$ após 168 horas de cultivo (Figura 4.1B). De forma semelhante, *Kocuria sp.* PSR 51 apresentou maior produção específica de carotenoides no meio CN, com 195,89 $\mu\text{g/g}$ em 24 horas de cultivo, enquanto no meio BHI o pico foi de 131,20 $\mu\text{g/g}$ em 48 horas (Figura 4.2B).

Contudo, ao considerar a concentração de carotenoides totais, expressa como a razão entre a quantidade de pigmentos (μg) e o volume de cultivo (L), o meio BHI demonstrou um desempenho superior para ambas as cepas. Para *A. koreensis* PSR 37 observou-se pico de 958,66 $\mu\text{g/L}$ após 144 horas de cultivo em BHI, enquanto no meio CN a concentração foi de 381,33 $\mu\text{g/L}$ em 168 horas de cultivo. Para *Kocuria sp.* PSR 51, a maior concentração de carotenoides totais em BHI foi de 610 $\mu\text{g/L}$ em 96 horas de cultivo, ao passo que, no meio CN, o pico foi de 191 $\mu\text{g/L}$ em 24 horas de cultivo (Figuras 4.1C e 4.2C).

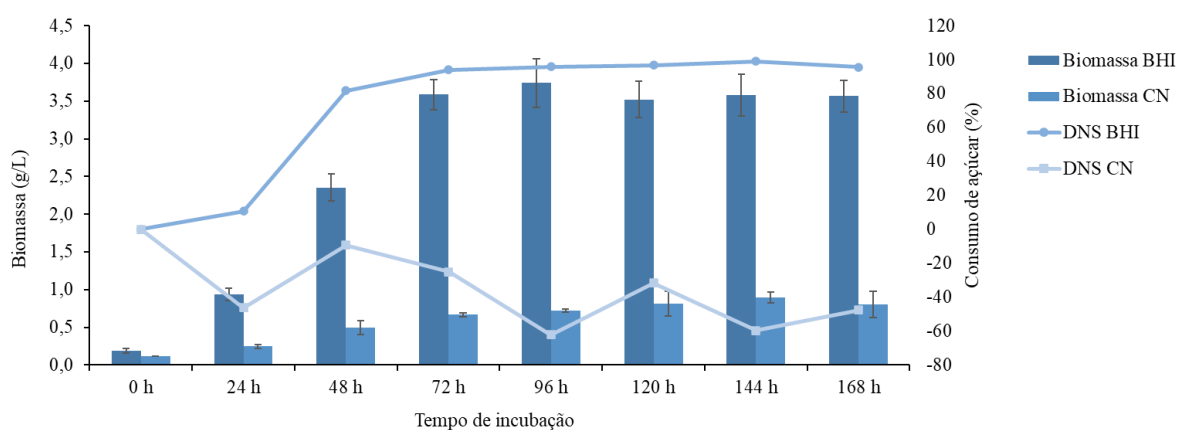
TABELA 4.2 – Produção de biomassa, carotenoides específicos e carotenoides totais por *Arthrobacter koreensis* PSR 37 e *Kocuria sp.* PSR 51 em meios de cultura sintéticos.

Microrganismo	Meio de cultura	Biomassa (g/L)	Carotenoides específicos (µg/g)	Carotenoides totais (µg/L)
<i>A. koreensis</i>	BHI	3,7	282,24	958,66
PSR 37	CN	0,89	1040	381,33
<i>Kocuria sp.</i> PSR	BHI	4,87	131,2	610
51	CN	1,05	195,89	191

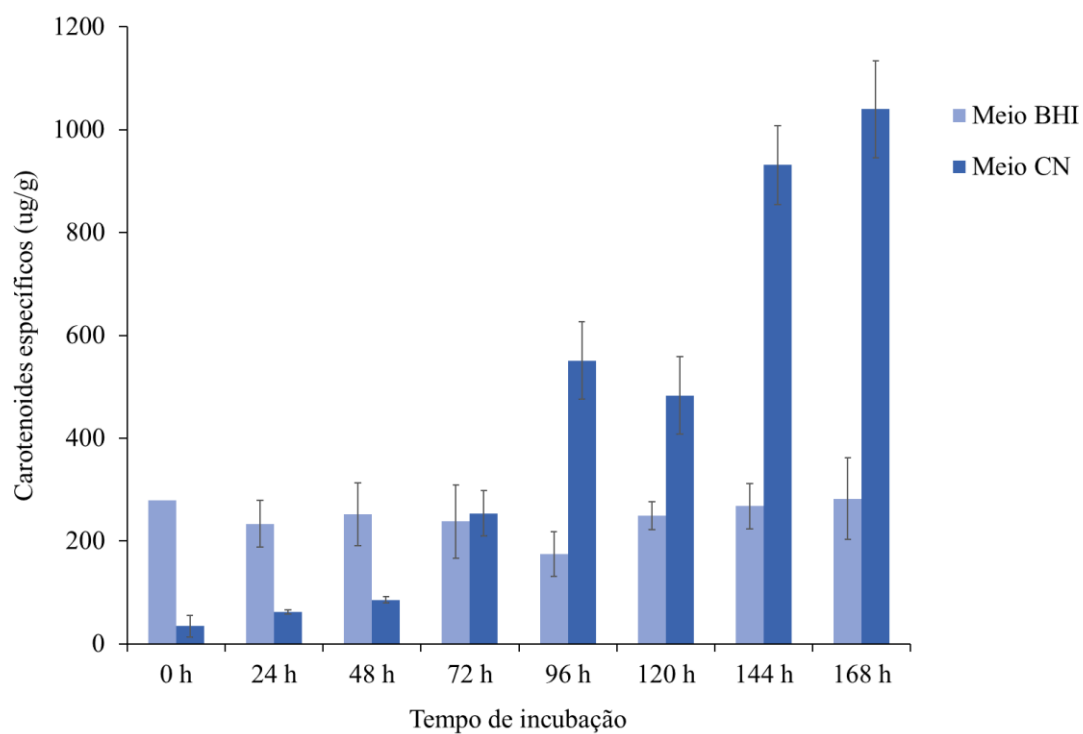
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 4.1 – Monitoramento do crescimento microbiano e consumo de açúcar nos meios *Brain Heart Infusion* e Caldo Nutriente ao longo de 168 h de cultivo (A), produção específica de carotenoides em *Brain Heart Infusion* e Caldo Nutriente (B) e produção de carotenoides totais em *Brain Heart Infusion* e Caldo Nutriente (C) da cepa de *A. koreensis* PSR 37.

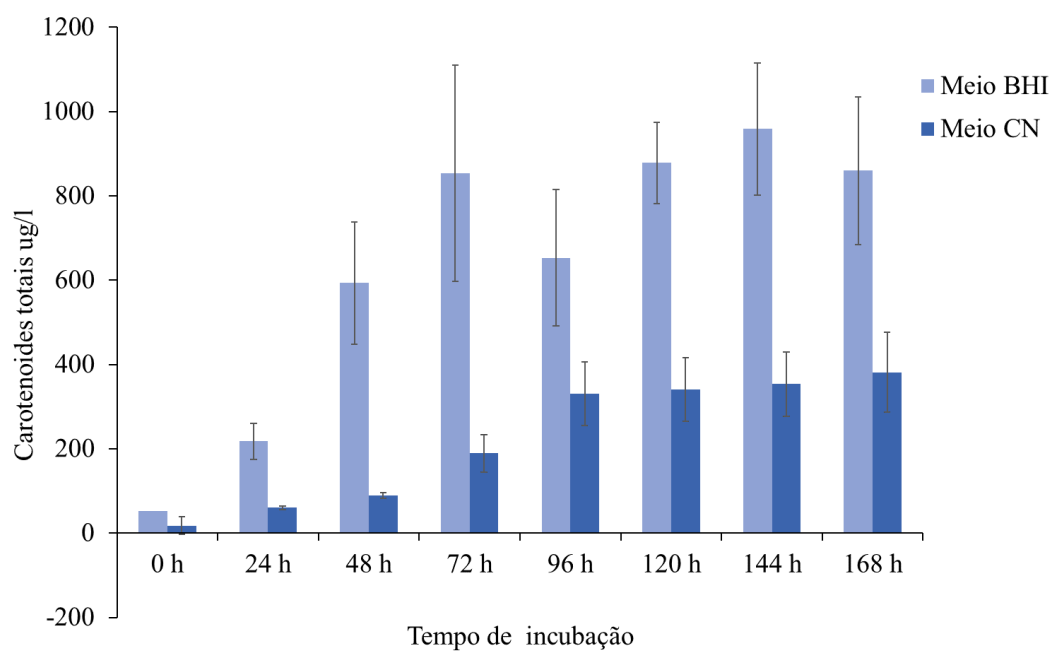
(A)



(B)



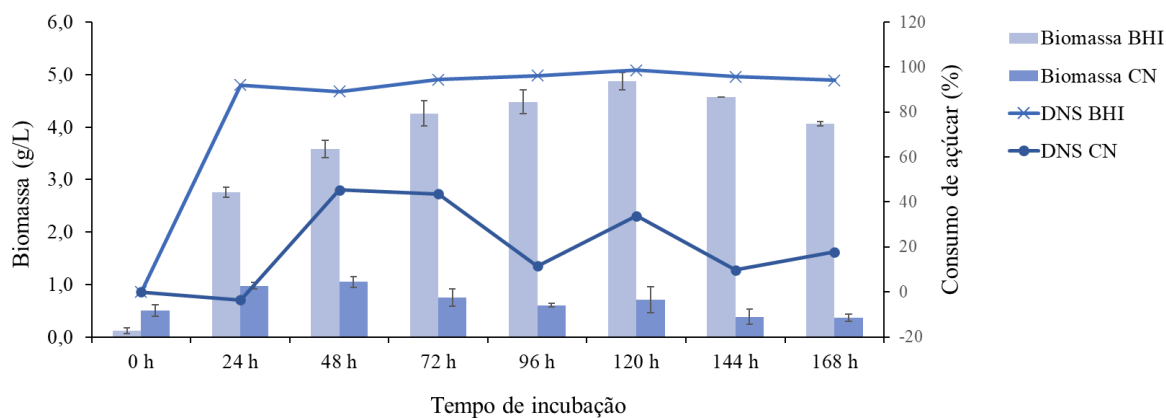
(C)



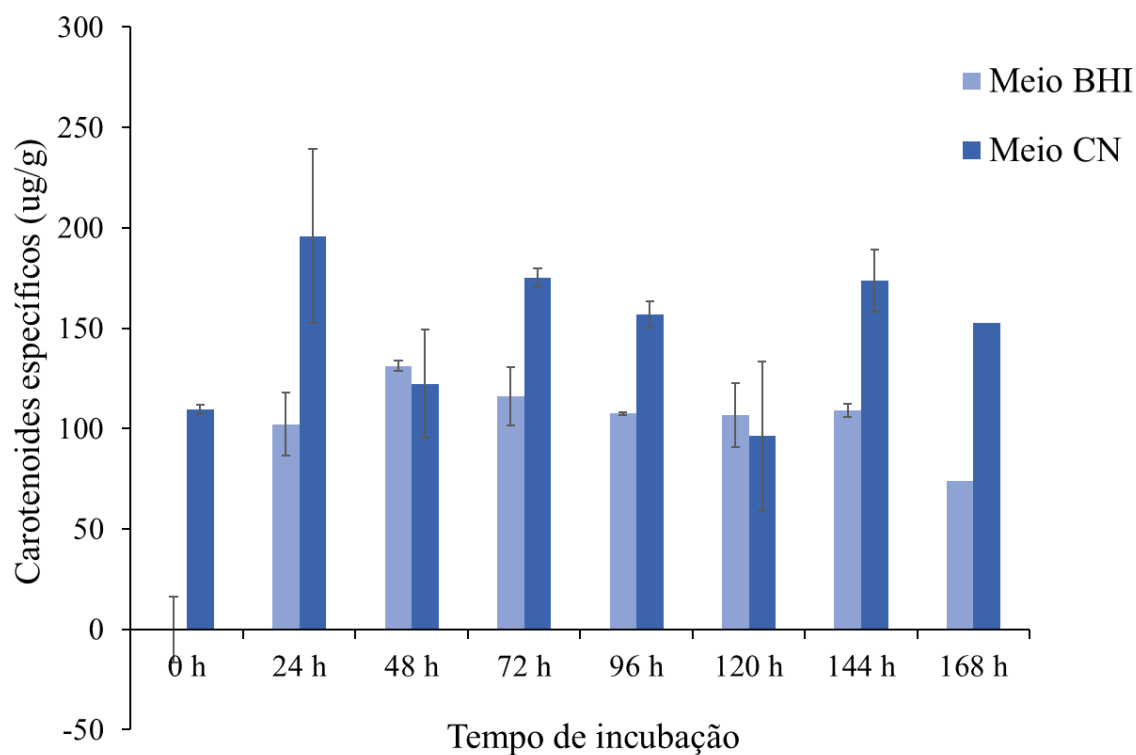
Fonte: elaborado pelo autor.

Figura 4.2 – Monitoramento do crescimento microbiano e consumo de açúcar nos meios *Brain Heart Infusion* e Caldo Nutriente (A), produção específica de carotenoides em *Brain Heart Infusion* e Caldo Nutriente (B) e produção de carotenoides totais em *Brain Heart Infusion* e Caldo Nutriente (C) da cepa de *Kocuria sp.* PSR 51.

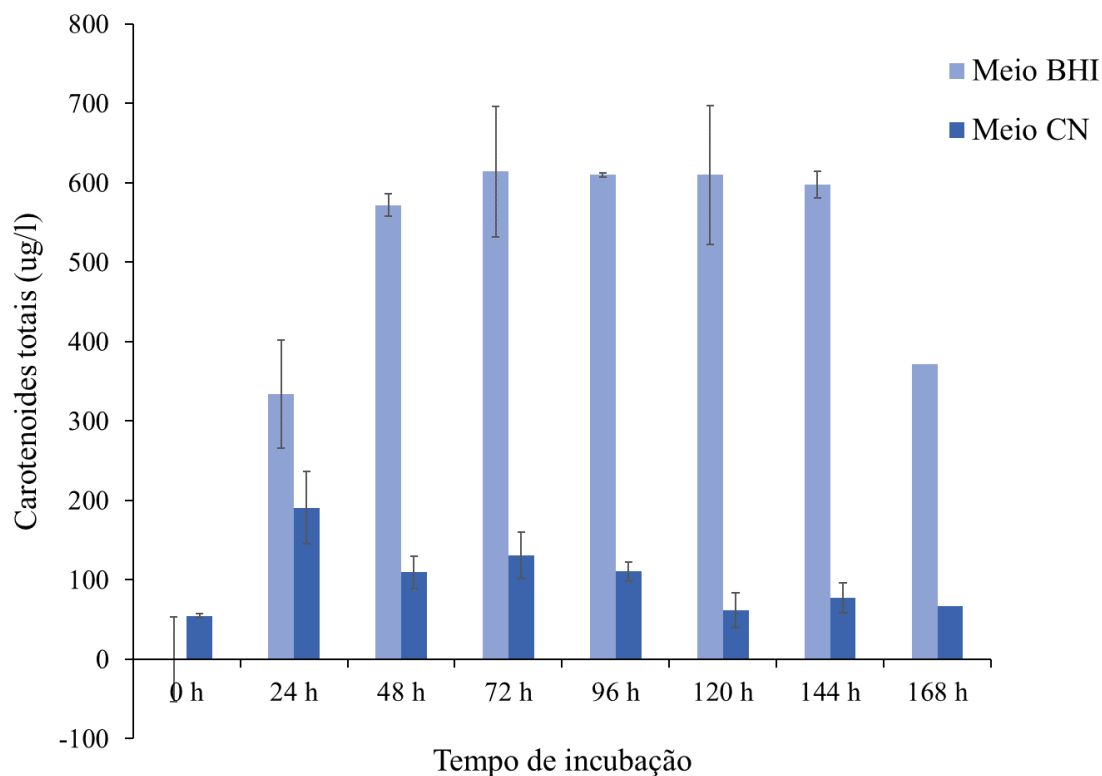
(A)



(B)



(C)



Fonte: elaborado pelo autor.

Considerando que o caldo nutriente (CN) é um meio de cultura indefinido e que não possui em sua formulação, a adição de açúcares como glicose ou maltose, sua composição pode representar uma limitação para o cultivo de microrganismos que utilizam eficientemente a glicose em seu metabolismo. O meio BHI, por sua vez, contém 2 g/L de glicose, embora essa concentração ainda seja relativamente pequena quando comparada às condições consideradas ótimas para a produção de pigmento em outros estudos.

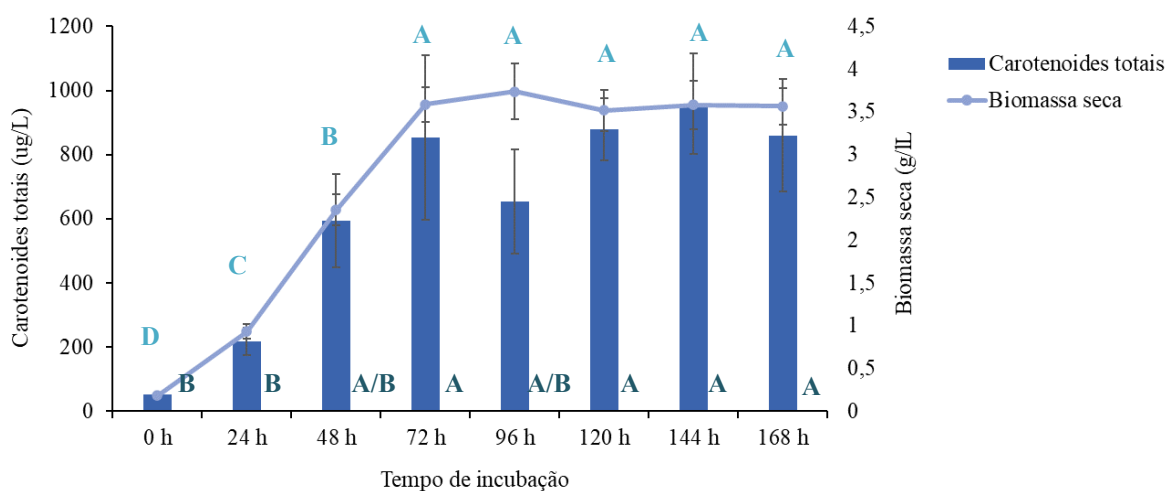
Uma pesquisa que investigou a produção de carotenoides e biomassa por *A. gandavensis* MTCC 25325, comparando o cultivo em CN e em meios suplementados com glicose, sacarose e glicerol, demonstrou que os meios suplementados com glicose apresentaram um aumento 1,7 vezes na produção em relação ao controle (CN) (RAM et al., 2020).

Da mesma forma, meios de cultivo compostos de extrato de levedura (10 g/L), peptona bacteriológica (5 g/L), NaCl (4 g/L) e glicose (7,5 g/L) ou maltose (10 g/L) proporcionaram elevado rendimento de β -criptoxantina (β -CRX) em *Kocuria marina* DAGII. Neste contexto, a presença de glicose no meio exerceu influência direta tanto no crescimento microbiano quanto sobre a produção de β -CRX (MITRA et al., 2016).

Adicionalmente, a otimização do processo de produção volumétrica de carotenoides totais realizada por Ubeda (2008) identificou, como condições ótimas para a produção por *Kocuria rhizophila*, o uso de 50 g/L de sacarose, 2,5 g/L de NH_4Cl , 2,6 g/L de extrato de levedura.

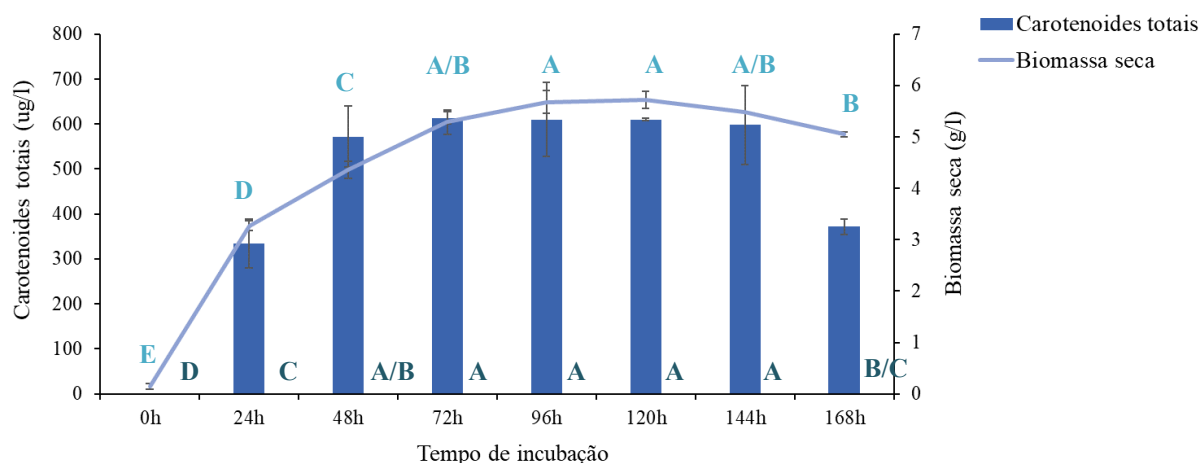
As variáveis resposta biomassa seca (g/L) e produção de carotenoides totais ($\mu\text{g/L}$) convergiram para a definição do tempo de incubação de 72 horas como o mais promissor. A análise temporal das amostras apresentou um pico de crescimento de biomassa após 96 h de cultivo, enquanto a produção máxima de carotenoides totais foi observada em 72 h. Entretanto, a partir de 72 horas de incubação, não foram verificadas diferenças significativas no crescimento de biomassa, conforme teste de Tukey (Figuras 4.3 e 4.4).

Figura 4.3 – Biomassa seca e produção de carotenoides totais por *Arthrobacter koreensis* PSR 37 em meio *Brain Heart Infusion*. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (teste de Tukey com 95% de confiança).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.4 – Biomassa seca e produção de carotenoides totais por *Kocuria sp.* PSR 51 em meio *Brain Heart Infusion*. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (teste de Tukey com 95% de confiança).



Fonte: elaborado pelo autor.

Um estudo realizado com *A. gandavensis* MTCC 25325 demonstrou que o acúmulo de zeaxantina e a produção de biomassa aumentaram progressivamente com o tempo de incubação, atingindo valores máximos após 72 h de cultivo. Esse comportamento está em consonância com os resultados obtidos no presente trabalho, no qual a produção de carotenoides totais atingiu pico máximo em 72 horas. Dessa forma, os dados reforçam a escolha de 72 horas como o tempo de incubação adequado, conciliando elevada produção de pigmentos e eficiência do processo produtivo (RAM et al., 2020).

4.3.1.2 Melaço de soja como substrato para produção de pigmentos

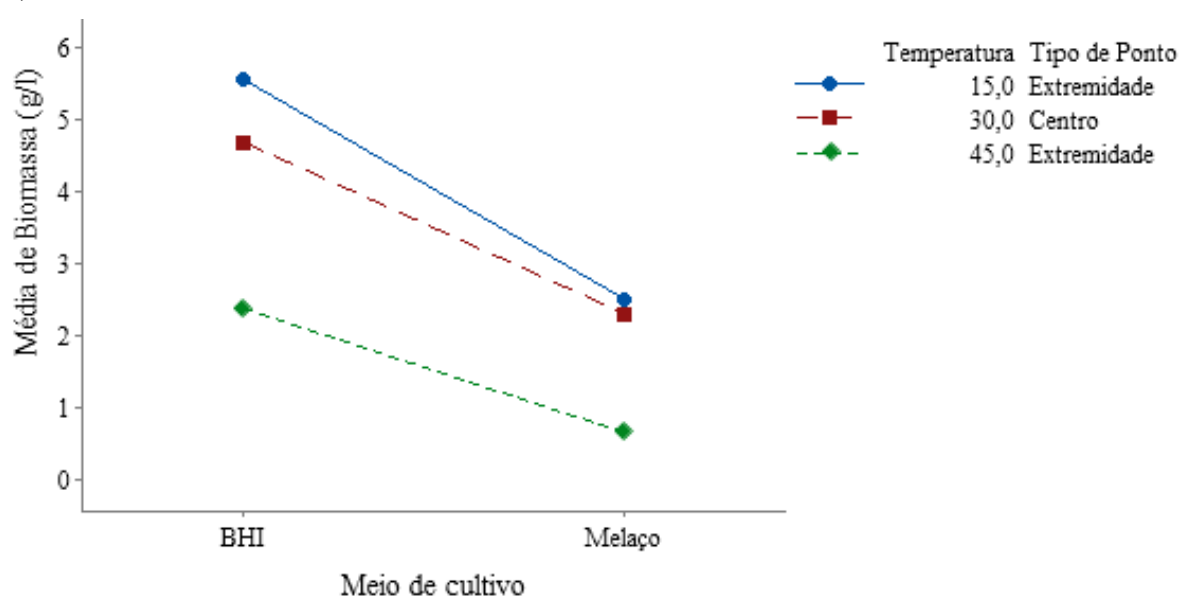
A produção de pigmentos por *Arthrobacter koreensis* PSR 37 com o uso do melaço de soja como substrato resultou em concentração média de carotenoides totais de $758,66 \pm 101,30$ µg/L, a 45 °C, $725,33 \pm 237,86$ µg/L a 30 °C e $181,33 \pm 19,73$ µg/L a 15 °C.

Já o cultivo em meio sintético BHI apresentou a maior concentração média de carotenoides totais quando conduzido a 15 °C, alcançando $2254,66 \pm 271,47$ µg/L. Nas temperaturas de 30 e 45 °C, as produções médias em BHI foram de $226,66 \pm 66,01$ e $193,33 \pm 92,72$ µg/L, respectivamente.

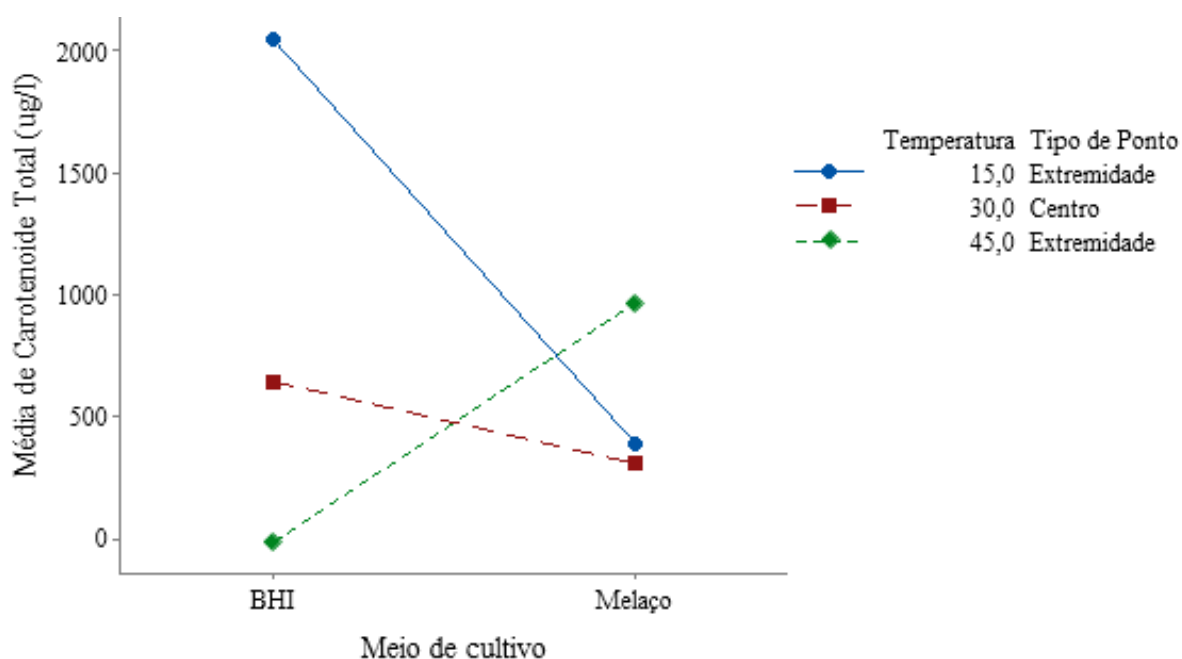
Em relação à produção de biomassa e ao consumo de açúcar, o meio sintético BHI apresentou melhores resultados, com concentração média de biomassa de $5,74 \pm 0,06$ g/L em cultivos à 15 °C e consumo de açúcar acima de 90% (Figura 4.5).

Figura 4.5 – Interação entre os meios de cultura *Brain Heart Infusion* e melaço de soja e as temperaturas utilizadas para o cultivo na produção de biomassa (g/L) e carotenoides totais (µg/L). Gráfico de interação para biomassa como variável resposta (A) e gráfico de interação para carotenoides totais como variável resposta (B) para *A. koreensis* PSR 37.

(A)



(B)

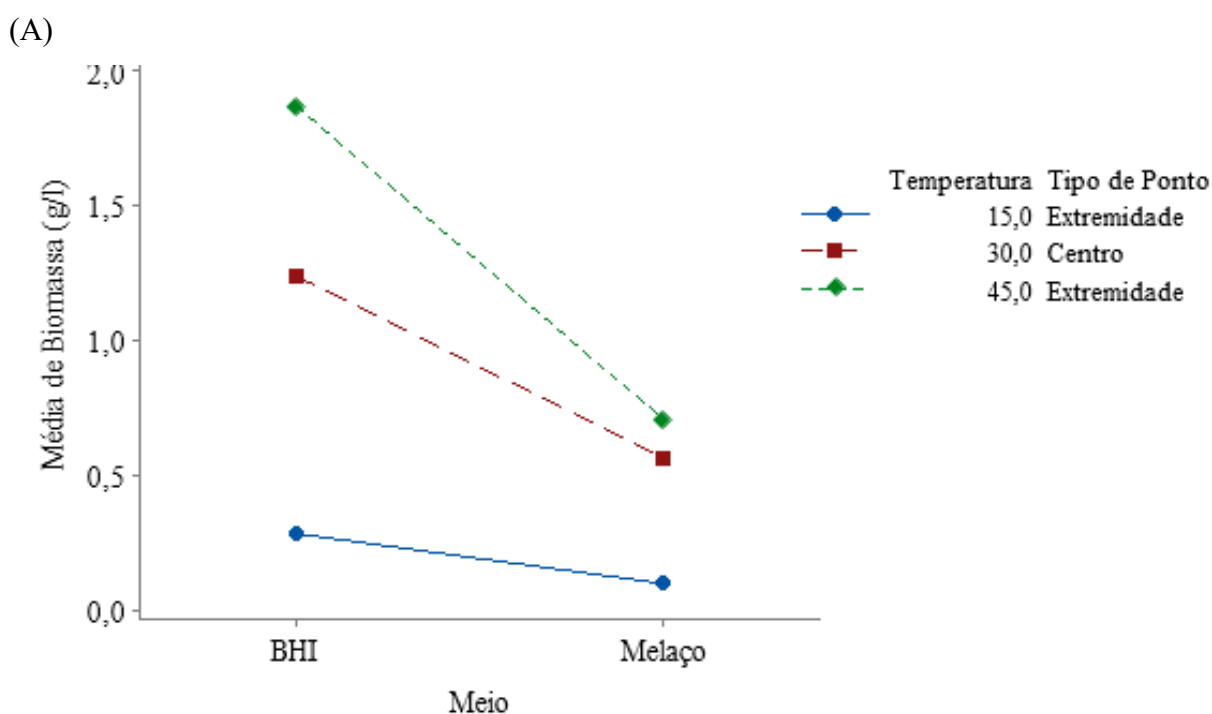


Fonte: Elaborado pelo autor.

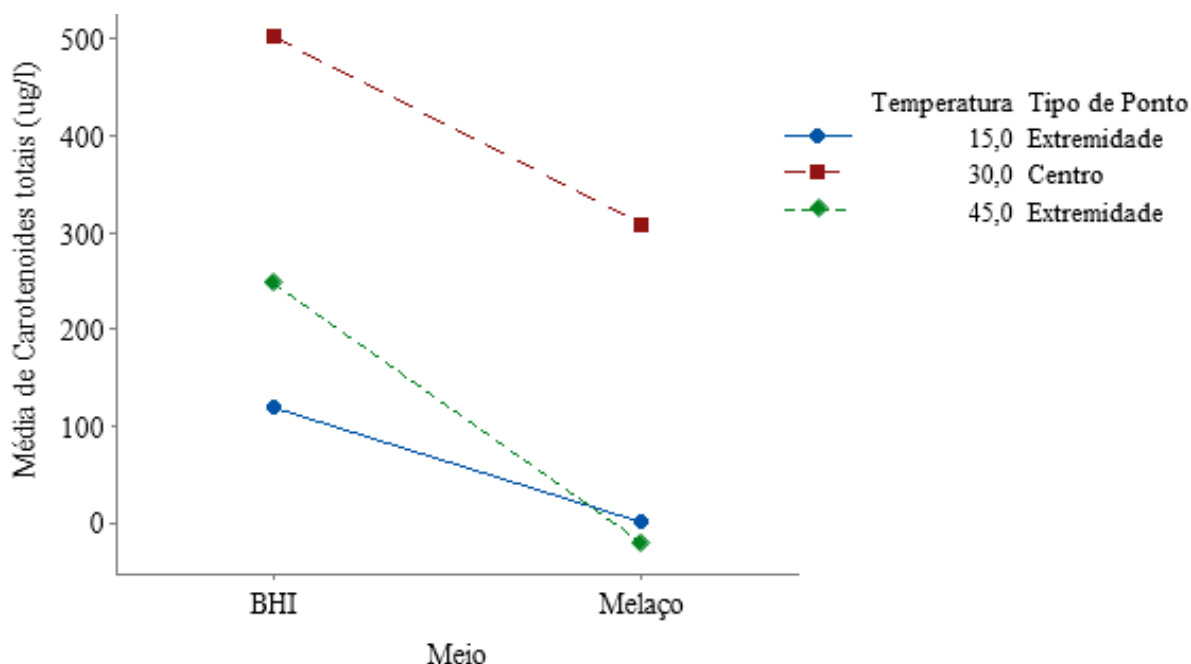
Para produção de pigmentos por *Kocuria sp.* PSR 51, avaliada nas temperaturas de 15, 30 e 45 °C, observou-se maior produção de biomassa em 45 °C com média de 0,7 g/L, enquanto a maior produção de carotenoides totais ocorreu a 30 °C com média de 189,33 µg/L.

Entretanto, ao comparar as respostas obtidas entre o uso do melaço e o meio BHI, verificaram-se resultados mais expressivos para o cultivo em meio sintético (Figura 4.6). Cultivos em meio BHI a 30 °C apresentaram médias de produção de 621,33 µg/L, enquanto o cultivo em melaço de soja, na mesma temperatura, apresentou médias de produção de 189,33 µg/L. Esses dados evidenciam que tanto a escolha do meio quanto a temperatura de incubação influenciam significativamente a produção de pigmentos, reforçando a importância da pesquisa de condições de cultivo favoráveis para cada microrganismo.

Figura 4.6 – Interação entre os meios de cultura *Brain Heart Infusion* e melaço de soja e as temperaturas utilizadas para o cultivo na produção de biomassa (g/L) e carotenoides totais (µg/L): Gráfico de interação para biomassa como variável resposta (A) e gráfico de interação para carotenoides totais como variável resposta (B) para *Kocuria sp.* PSR 51.



(B)



Fonte: Elaborado pelo autor.

A produção de carotenoides totais utilizando melaço de soja não apresentou resultados promissores, mesmo considerando a elevada concentração de açúcares em sua composição. Estudos com *Phaffia rhodozyma* também demonstraram produção de pigmento astaxantina inferior à obtida em meio padrão com glicose, corroborando os resultados obtidos neste estudo (KANWUGU et al., 2020).

Entretanto, não quantificados por ausência de padrão, entre os carboidratos presentes no melaço de soja, inclui-se a rafinose e estaquiose (CORREA DA SILVA et al., 2024; SANCHETI; THOMPSON; JU, 2023). Esses oligossacarídeos podem limitar o uso do melaço de soja como meios de produção de microrganismos, visto que a maioria dos microrganismos industriais não conseguem utilizar esses açúcares (KANWUGU et al., 2020; YANG et al., 2018). Uma alternativa para otimizar o uso do melaço seria a implementação de um processo de hidrólise, visando converter os carboidratos complexos em monômeros assimiláveis pelo microrganismo. Entretanto, essa etapa adicional aumentaria significativamente os custos de produção (KANWUGU et al., 2020).

Todavia, a alta presença de sacarose no melaço de soja, que é um dissacarídeo fermentável facilmente convertido, pode torná-lo uma fonte alternativa barata para a produção de microrganismos (KANWUGU et al., 2020). Estudos demonstraram que a adição de glicose, na concentração de 0,93 mg/g, aumentou significativamente a produção de zeaxantina em espécies do gênero *Arthrobacter*. Esse aumento da produtividade foi atribuído à capacidade do

organismo de metabolizar a glicose e utilizá-la como precursor na biossíntese de carotenoides (RAM et al., 2020).

Meio suplementado com glicose e sacarose apresentou maior produção de zeaxantina e biomassa em um estudo realizado com *Arthrobacter gandavensis* MTCC 25325, sendo esse aumento de 1,7 vezes (RAM et al., 2020). Em um estudo com *Kocuria rhizophila*, uma concentração de 2024,4 µg/L de carotenoides totais foi obtida após 48 horas de fermentação em meio de cultivo contendo 75 g/L de sacarose (TORSANI UBEDA, 2008).

Entretanto, é importante notar que altos níveis de glicose podem inibir a produção de pigmentos (RAM et al., 2020). Por exemplo, uma produção de 2024,4 µg/L de carotenoides totais por *Kocuria rhizophila* foi obtida em meio de cultivo contendo 75 g/L de sacarose (TORSANI UBEDA, 2008). Da mesma forma, β-criptoxantina extraída de *Kocuria marina* atingiu picos de produção em meios contendo 7,5 g/L de glicose e 10 g/L de maltose (MITRA et al., 2016). Esses dados reforçam que a concentração ideal de açúcar é uma variável crítica na biossíntese de carotenoides.

No presente trabalho, as análises foram realizadas em meio constituído unicamente de melaço de soja, contendo 6,04 g/L de glicose e 94,33 g/L de sacarose. Estudo com *Arthrobacter globiform*, utilizando meio enriquecido com 40 g/L de melaço de cana e 50 g/L de licor de maceração, apresentaram produção ótima de carotenoides de 1,19 mg/g, onde a concentração de sacarose era de 22,8 g/L (ZHAI et al., 2014).

Assim, as elevadas concentrações de açúcares presentes no melaço de soja *in natura* podem ser consideradas excessivas para a produção de pigmentos carotenoides por *A. koreensis* PSR 37 e *Kocuria sp.* PSR 51. No entanto, o melaço de soja mantém potencial como suplemento ou componente de enriquecimento de meios de cultura, o que merece ser investigado em futuras otimizações.

O ponto otimizado para máxima produção de carotenoides totais foi calculado utilizando o software Minitab 19. Para *Arthrobacter koreensis* PSR 37, os valores ótimos foram identificados como cultivo em meio BHI a 15 °C, resultando em uma produção de 2045,89 µg/L de carotenoides totais, com *desirability* composta de 0,79. Para *Kocuria sp.* PSR 51, valores ótimos corresponderam ao cultivo em meio BHI a com produção de 502,2 µg/L e 396,2 µg/g de carotenoides totais e específicos, respectivamente, com *desirability* composta de 0,68.

Representações gráficas em curva de contorno foram elaboradas para visualizar o efeito das variáveis independentes (temperatura e meio de cultivo) sobre a produção de carotenoides específicos e totais, biomassa e consumo de açúcares (Figura 4.7).

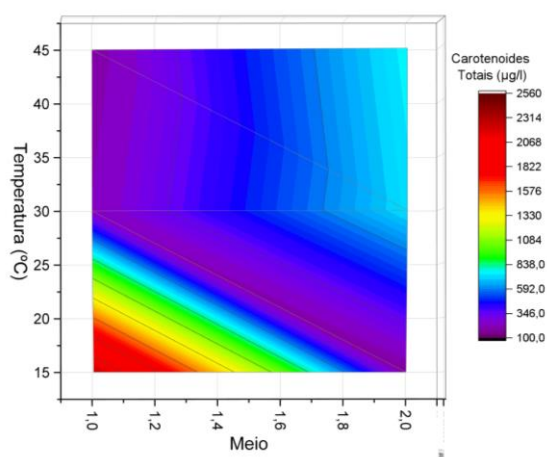
Nota-se que a faixa ótima para a produção de carotenoides totais por *A. koreensis* PSR 37 encontra-se em torno de 15 °C em meio BHI (Figura 4.7A). Entretanto, a produção de carotenoides específicos apresenta pico em torno de 45 °C, com melaço de soja sendo o meio mais promissor para essa finalidade (Figura 4.7B). Em relação à produção de biomassa (Figura 4.7C), temperaturas inferiores à 35 °C, especialmente a 15 °C, demonstraram-se mais favoráveis em meio BHI. O consumo de açúcar (Figura 4.7D) ocorreu ao longo de toda a faixa de temperatura analisada (15 a 45 °C) quando meio BHI foi utilizado, entretanto, no cultivo com melaço de soja, o consumo de açúcar foi consideravelmente inferior.

Para cepa de *Kocuria sp.* PSR 51, a faixa ótima para a produção de carotenoides específicos ocorreu a 30 °C em cultivo com meio BHI, sendo que essa temperatura tende a aumentar com o cultivo em melaço de soja (Figura 4.8A). Já a concentração de carotenoides totais apresentou condições ótimas de produção em meio BHI e temperatura em torno de 30 °C (Figura 4.8B).

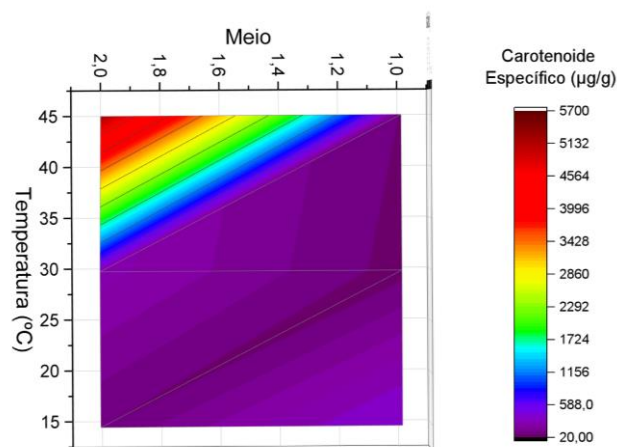
Maiores produção de biomassa (Figura 4.8C) e consumo de açúcares (Figura 4.8D) foram observados em meio BHI, iniciando-se em aproximadamente a 35 °C e estendendo-se até 45 °C. Esses resultados corroboram os valores obtidos na etapa anterior de avaliação das variáveis do processo.

Figura 4.7 - Gráfico de Contorno apresentando a relação entre as variáveis meio de cultivo, sintético *Brain Heart Infusion* (1) e melaço de soja (2), e temperatura no cultivo de *A. koreensis* PSR 37. (A) produção de carotenoides totais; (B) produção de carotenoides específicos; (C) produção de biomassa e (D) consumo de açúcares.

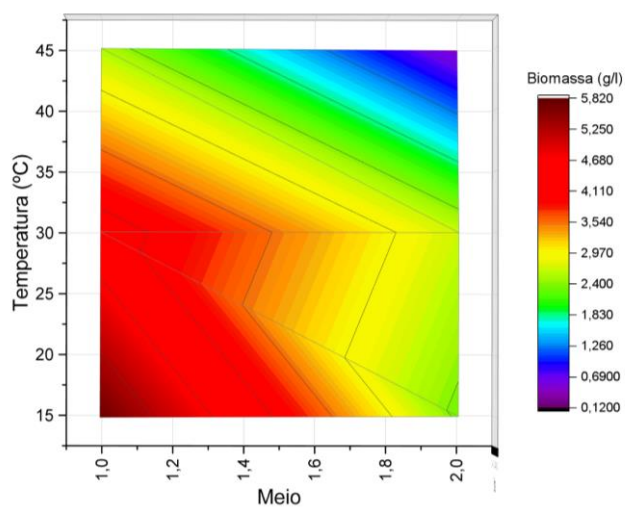
(A)



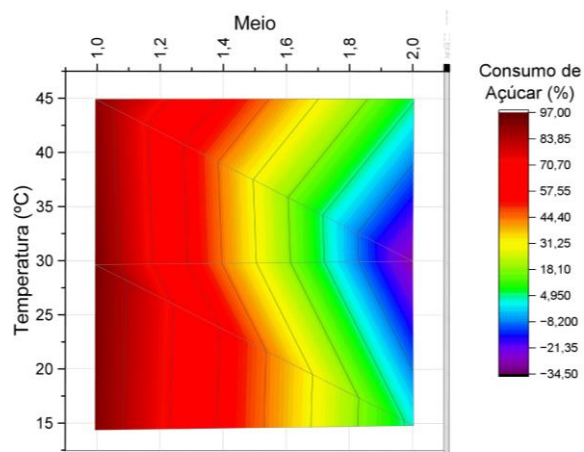
(B)



(C)



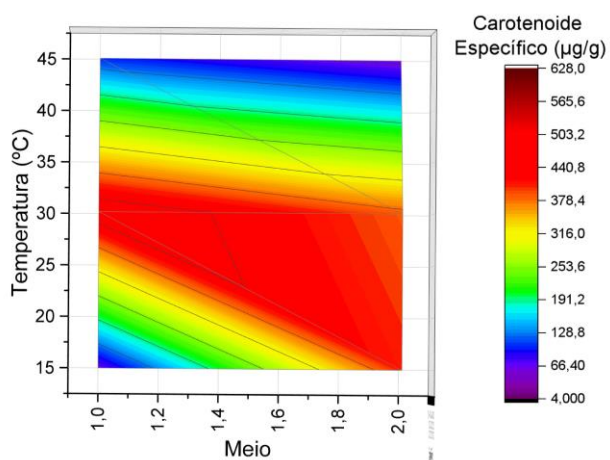
(D)



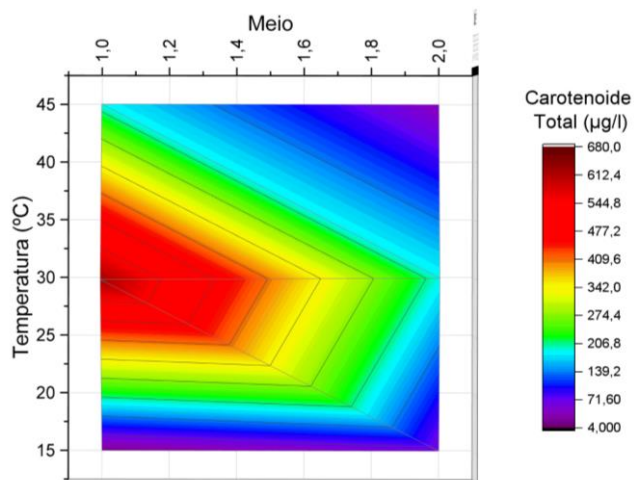
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.8 - Gráfico de Contorno apresentando a relação entre as variáveis meio sintético *Brain Heart Infusion* (1) e melaço de soja (2), e temperatura no cultivo de *Kocuria sp.* PSR 51. (A) produção de carotenoides específicos; (B) produção de carotenoides totais; (C) produção de biomassa e (D) consumo de açúcares.

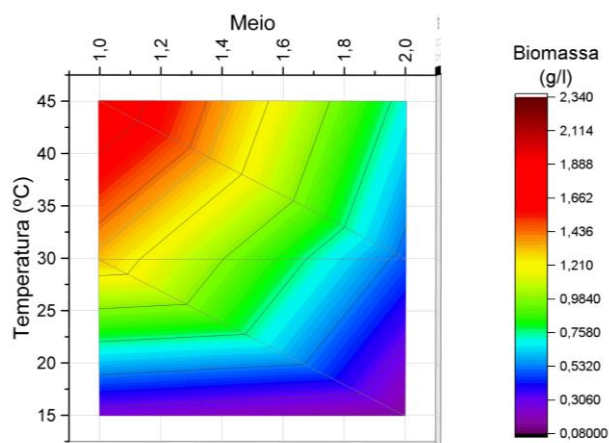
(A)



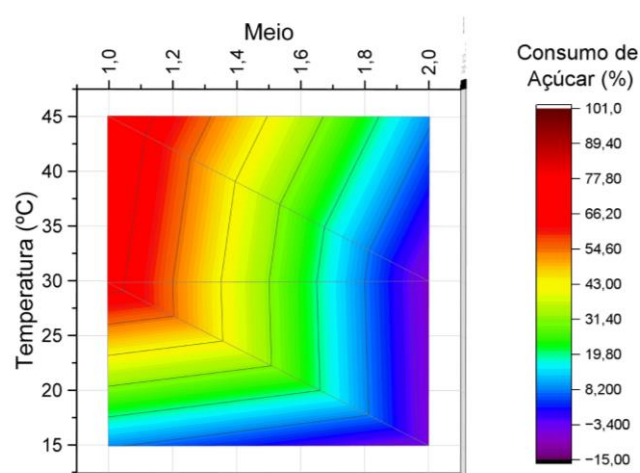
(B)



(C)



(D)



Fonte: elaborado pelo autor.

A temperatura configura-se como um fator crucial que afeta significativamente o metabolismo celular e biossíntese de metabólitos. As concentrações de enzimas envolvidas na produção de carotenoides atuam como reguladores dos níveis de produção nos microrganismos (ZHAI et al., 2014). Evidências científicas sugerem que a síntese de carotenoides pode ser ativada em condições de baixa temperatura, indicando sua possível participação em um mecanismo de resposta adaptativa controlado e regulado por baixas temperaturas (SAUBENOVA et al., 2024).

Diferentemente dos resultados obtidos neste trabalho, Ram et al. (2020) relataram elevadas concentrações de biomassa em temperaturas mais baixas, como 20 °C, para *Arthrobacter gandavensis* MTCC 25325. No entanto, a produção de zeaxantina foi maximizada em cultivos à 40 °C (RAM et al., 2020). A formação de biomassa e carotenos aumentou com o aumento da temperatura até 30 °C sofrendo uma redução acentuada em cultivos realizados acima de 30 °C com uma cepa de *Arthrobacter globiform* (ZHAI et al., 2014).

Os carotenoides desempenham parte no mecanismo de adaptação ao frio de algumas espécies de bactérias. Por exemplo, *Arthrobacter agilis* DSM 20550 e *Arthrobacter bussei* DSM 109896, caracterizadas por sua pigmentação rosa devido à produção de bacterioruberina, demonstraram aumento no conteúdo desse pigmento quando a temperatura de crescimento foi reduzida de 30 para 10 °C (FLEGLER; LIPSKI, 2022).

O crescimento de biomassa na faixa de temperatura observada como ótima neste trabalho (15 a 30 °C) corrobora com resultados obtidos para *A. agilis* MB813. Essa cepa exibiu uma taxa máxima de crescimento a 30°C e manteve crescimento em uma ampla faixa de

temperatura, de 5 a 40°C, e ausência de crescimento a 50 °C. A biomassa máxima acumulada foi similar à obtida nas temperaturas de 10, 20 e 30°C, enquanto um declínio de dez vezes no acúmulo de biomassa foi observado no cultivo a 40 °C (FONG et al., 2001).

Um estudo realizado por Timkina et al. (2022) avaliou 4 diferentes cepas de *Kocuria sp* em relação à temperatura de cultivo sobre o crescimento de biomassa. Os cultivos foram realizados a 30 °C em meio Luria Bertani, e apresentaram as maiores taxas de crescimento específica, variando entre 0,068–0,083 h⁻¹. No entanto, todas as cepas estudadas demonstraram capacidade de crescimento a 45 °C. *Kocuria sp.*, um microrganismo pertencente a classe *Actinobacteria*, apresenta um grande número de representantes dessa classe, com capacidade de adaptação à altas temperaturas (TIMKINA et al., 2022). Entretanto, a síntese de carotenoides é ativada em condições de baixa temperatura, sendo considerada parte de uma resposta adaptativa regulada frente a essas condições (SAUBENOVA et al., 2024). Esse comportamento explicaria alto crescimento de biomassa a 45 °C e a maior concentração de carotenoides totais em cultivos à 30 °C.

Estudos com *Kocuria palustris* isolado da Caatinga denotaram produção média de carotenoides 1718 µg/L a 30°C, valor 1,3 vezes superior ao obtido a 40 °C (1327 µg/L), corroborando com os dados obtidos neste estudo (MENDES-SILVA et al., 2021).

4.3.2 Caracterização do pigmento extraído

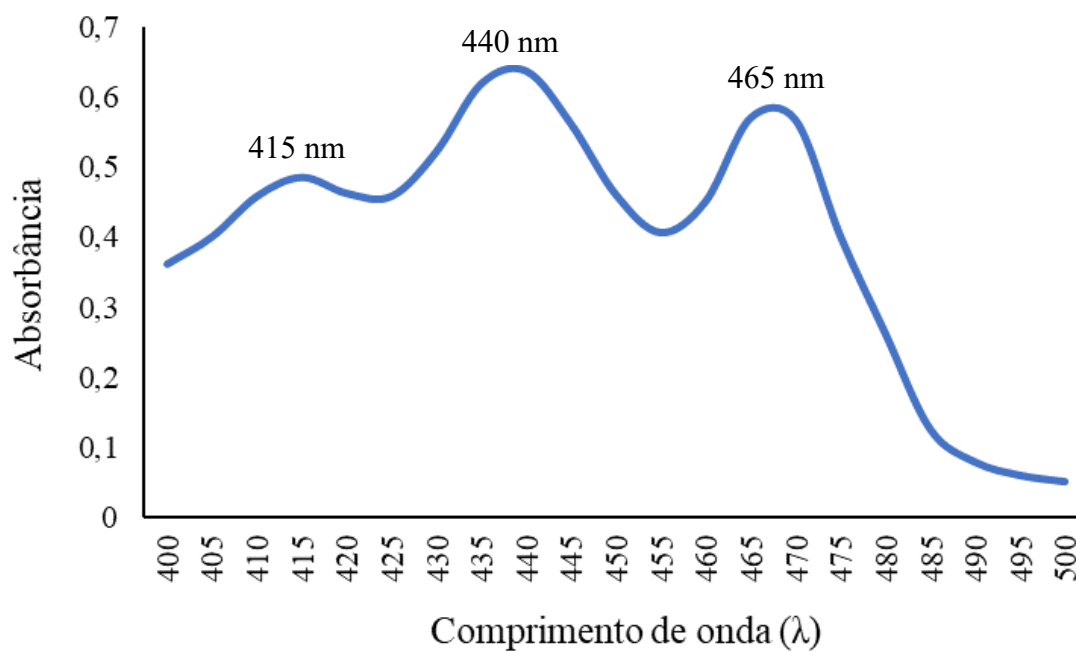
4.3.2.1 Espectrofotometria UV-visível

Os espectros dos extratos de carotenoides revelaram a presença de três picos distintos na região compreendida entre aproximadamente 400 e 500 nm, padrão espectral típico de carotenoides.

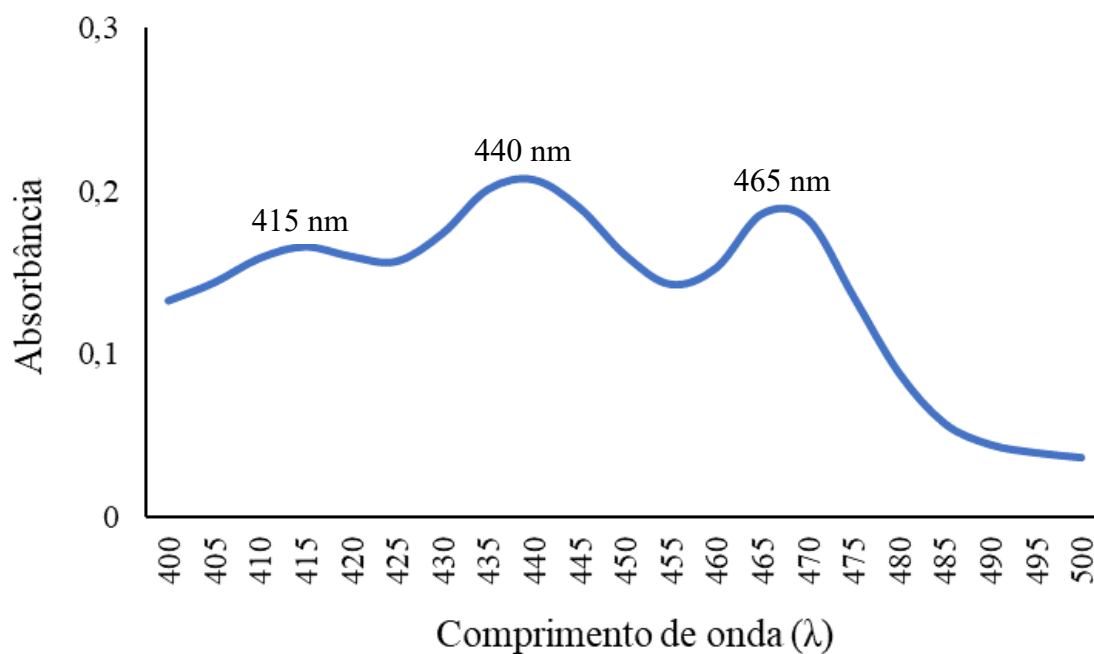
Os pigmentos amarelos extraídos de *Arthrobacter koreensis* PSR 37 e *Kocuria sp.* PSR 51 exibiram uma ampla banda de absorção máxima, com três picos bem definidos no espectro azul, localizados em 415, 440 e 465 nm (Figuras 4.9A e 4.9B).

Figura 4.9 – Espectros UV-Vis dos pigmentos produzidos por *Arthrobacter koreensis* PSR 37 (A) e *Kocuria* sp. PSR 51 (B).

(A)



(B)



Fonte: elaborado pelo autor.

As características espectrais encontradas estão em consonância com a propriedade dos carotenoides de absorver luz no espectro visível, particularmente na faixa azul, conferindo coloração amarela a alaranjada aos pigmentos (IBRAHIM et al., 2024).

A espectroscopia de absorção é amplamente utilizada na caracterização de pigmentos, explorando sua capacidade de absorver luz em comprimento de onda específicos nas regiões do ultravioleta (UV) e visível do espectro, enquanto o restante da radiação é transmitido ou refletido. A estrutura molecular responsável por essa absorção da luz é denominada grupamento cromóforo, o qual, nos carotenoides, é caracterizado pela presença de cadeia de duplas ligações conjugadas (Valduga et al., 2009).

Cada tipo de carotenoide possui um espectro de absorção eletrônica característico (Valduga et al., 2009), o que permite sua identificação e diferenciação. No presente trabalho, a varredura espectral foi realizada em intervalos de 5 nm, sendo observado picos de absorbância nos comprimentos de onda de 415, 435 e 465 nm. Esses resultados são similares aos descritos por Ashenafi et al. (2013), que reportaram picos característicos de diferentes pigmentos carotenoides solubilizados em solução metanol e água deionizada (80:20, v/v), conforme apresentado na Tabela 4.3.

TABELA 4.3 – Características espectrais de padrões de carotenoides solubilizados em metanol e água deionizada (80:20, v/v)

Composto	Comprimento de onda (nm)
Violaxantina	418, 441, 470
Neoxantina	413, 437, 465,5
Luteína	423, 446, 474
Zeaxantina	426, 452,5, 479
B-caroteno	426, 453, 480

Fonte: (Ashenafi et al., 2023)

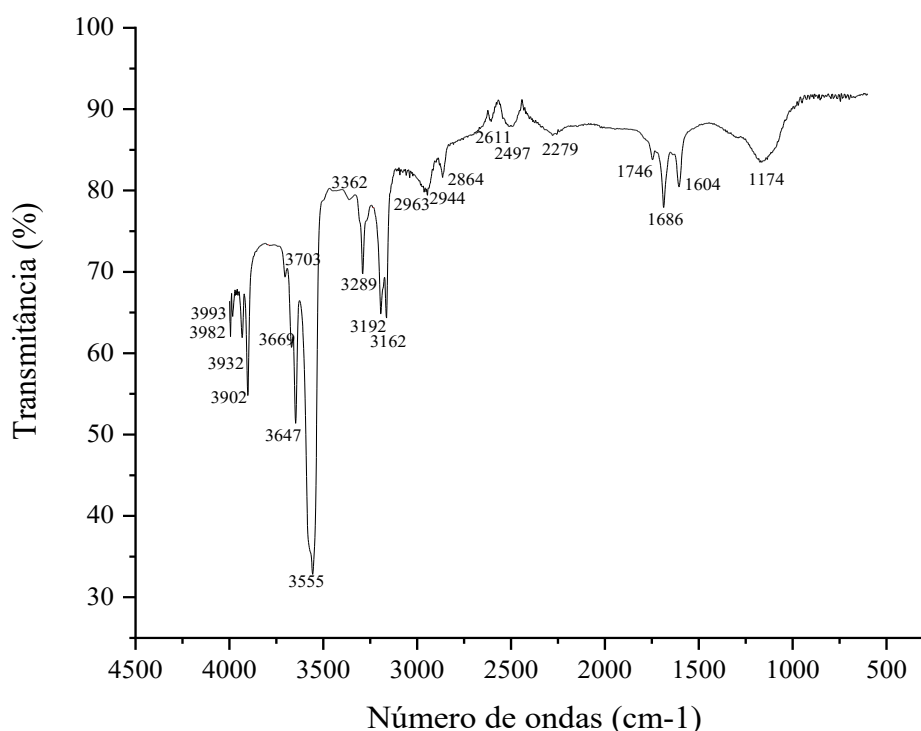
Análises espectrais realizadas por Mendes-Silva, et. al. (2021) do pigmento extraído de *Kocuria palustris* evidenciaram três picos principais de absorção, com valores máximos em 415,5 nm, 439,7 nm e 468,9 nm, característicos do carotenoide sarcinaxantina e de seus derivados, sarcinaxantina diglucosídeo e monoglucosídeo.

Assim, o perfil de absorção obtido na varredura espectral dos pigmentos extraídos de *A. koreensis* PSR 37 e *Kocuria sp.* PSR 51 apresenta características espectroscópicas consistentes com a natureza dos carotenoides.

4.3.2.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) do pigmento extraído de *Arthrobacter koreensis* PSR 37 e *Kocuria sp.* PSR 51 em meio de cultivo BHI

O espectro de FTIR do extrato pigmentar de *A. koreensis* PSR 37 exibiu um conjunto de bandas de absorção características localizadas em 1174, 1604, 1686, 1746, 2279, 2497, 2611, 2864, 2944, 2963, 3162, 3192, 3289, 3362, 3555, 3647, 3669, 3703, 3902, 3932, 3982 e 3993 cm^{-1} , conforme ilustrado na Figura 4.10.

Figura 4.10 – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier do pigmento extraído de *Arthrobacter koreensis* PSR 37



Fonte: elaborado pelo autor.

De acordo com a análise de Noby et al. (2018), a presença de uma banda na região de aproximadamente 1650 cm^{-1} está associada ao estiramento da ligação alceno $\text{C}=\text{C}$, indicando a existência de cadeias alifáticas insaturadas no extrato pigmentar. Adicionalmente, bandas

foram observadas em 1388 e 1159 cm^{-1} correspondentes às vibrações de estiramento C–H e C–OH, respectivamente (NOBY; KHATTAB; SOLIMAN, 2023).

A banda observada em 1746 cm^{-1} é característica do estiramento da ligação carbonila (C=O), as bandas localizadas entre 2840 e 3000 cm^{-1} indicam presença de grupos alcanos, com presença de cicloalcanos observado na banda de 2944 cm^{-1} (SILVERSTEIN, R. M., 2007). Outros sinais relevantes foram identificados como vibrações de estiramento dos grupos CH_3/CH_2 observados 2963 cm^{-1} e 2864 cm^{-1} (AFRA et al., 2017).

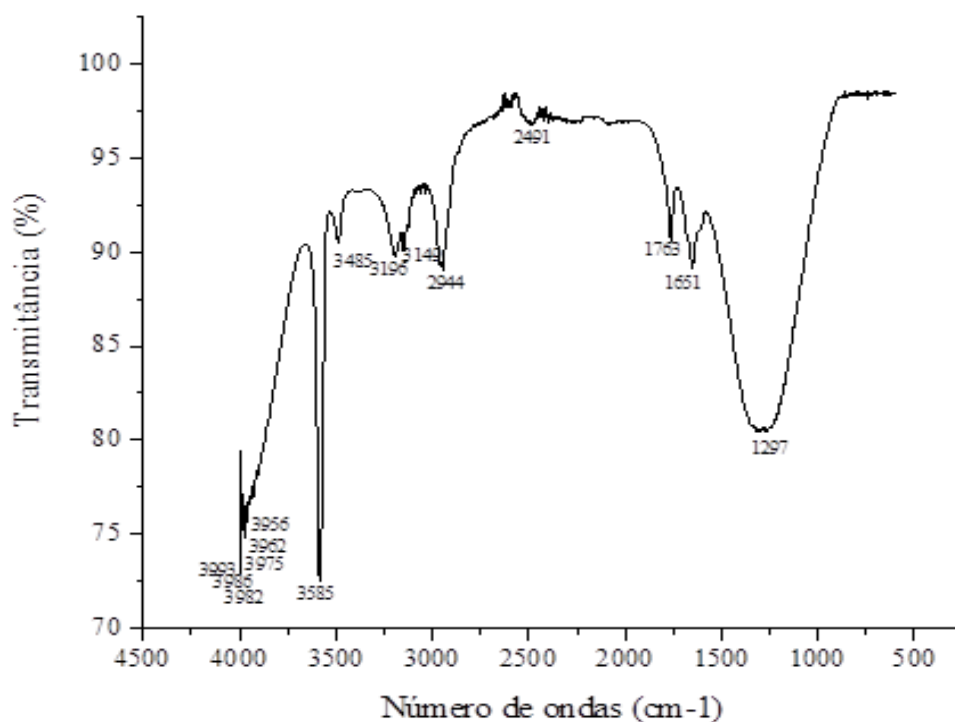
Para o extrato pigmentar de *Kocuria sp.* PSR 51, o espectro de FTIR apresentou bandas principais em 3485, 3196, 3149, 2944, 1763, 1651, 1297 cm^{-1} (Figura 4.11). As bandas em 2944 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de alongamento assimétrico das ligações C-H de grupos alifáticos (IBRAHIM et al., 2024; MULIK; KUMBHAR; BHADEKAR, 2017).

A banda em 1651 cm^{-1} pode ser associada ao estiramento da ligação C=C, indicando a presença do grupo olefínicos, típicos de estruturas polienicas encontradas em carotenoides (MULIK; KUMBHAR; BHADEKAR, 2017). A banda em 1763, corresponde ao estiramento da ligação carbonila (C=O), provavelmente está relacionada a grupos ésteres na estrutura do pigmento (MULIK; KUMBHAR; BHADEKAR, 2017).

Observou-se ainda uma banda larga na região entre 3200-3500 cm^{-1} , indicativo de vibrações de estiramento do grupo hidroxila (OH). A presença desse grupo funcional pode explicar a elevada solubilidade do pigmento em solventes polares, como etanol e metanol (3485 cm^{-1}) (SAHAR A. MAL et al., 2020).

A presença de ligação C=C foi observada por uma banda entre 1600-1680 cm^{-1} , com destaque para a banda em 1651 cm^{-1} , atribuída ao grupo funcional olefínico (SAHAR A. MAL et al., 2020). Além disso, o espectro FTIR mostrou bandas características de estruturas poliênicas, típicas de carotenoides, associadas ao estiramento C=C. Essas bandas indicam a presença de unidades alifáticas e podem contribuir, em menor extensão, para a vibrações relacionadas ao estiramento da ligação carbonila (C=O) (IBRAHIM et al., 2024).

Figura 4.11 – Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier do pigmento extraído de *Kocuria sp.* PSR 51



Fonte: elaborado pelo autor.

4.3.3 Produção de carotenoide em resposta ao estresse celular induzido por radiação ultravioleta

As cepas de *A. koreensis* PSR 37 e *Kocuria sp.* PSR 51 apresentaram viabilidade celular mesmo após exposição a doses de radiação UV-C de até 280 J/m², por um período de 2 min e 30 s. Além disso, ambas as bactérias exibiram resistência à radiação ambiental UV-A e UV-B, quando submetidas à irradiação por meio de simulador solar (SS) com dose de 400 kJ/m² ao longo de 120 minutos.

Os resultados referentes à produção de pigmentos após a aplicação de estresse celular por radiação UV-C e radiação ambiental não indicaram aumento significativo na produção de carotenoides. A análise de variância (ANOVA) seguida do teste Tukey foi aplicada para verificar a existência de diferenças significativas ($p < 0,05$), entre as concentrações de carotenoides totais, específicos e produção de biomassa (Tabela 4.4).

Entretanto, observou-se uma diminuição significativa na produção de carotenoide, acompanhada por um aumento da produção de biomassa pelas cepas submetidas a radiação ambiental.

TABELA 4.4 – Produção de carotenoides e biomassa de *Arthrobacter koreensis* PSR 37 e *Kocuria sp.* PSR 51 sem exposição à radiação, exposição à radiação UV-C e à radiação ambiental (UV-A e UV-B).

Tratamentos	Cepa selvagem	Radiação UV-C	Radiação ambiental	Cepa selvagem	Radiação UV-C	Radiação ambiental
	<i>Arthrobacter koreensis</i> PSR 37			<i>Kocuria sp.</i> PSR 51		
Carotenoides totais (µg/L)	2255±271 (A)	2079±176 (A)	1373±127 (B)	621±94 (A)	792±31 (A)	870±190 (A)
Carotenoides específicos (µg/g)	392,3±47,2 (A)	376,19±9,99 (A)	188,6±19,5 (B)	471±72 (A)	160±9 (B)	137±37 (B)
Biomassa (g/L)	5,7467±0,0643 (B)	5,520±0,317 (B)	7,2867±0,0902 (A)	1,3±0,09 (A)	4,9±0,09 (B)	5,4±0,67 (B)

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, por linha, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Fonte: Elaborado pelo autor.

Em um estudo realizado para avaliar a influência da luminosidade na produção de carotenoides, a exposição à luz resultou em um aumento de 4,9% na produção de carotenoides, possivelmente em função de suas propriedades de fotoproteção (MENDES-SILVA et al., 2021).

Entretanto, a produção específica de carotenoides, expressa como quantidade de pigmento produzido por unidade de biomassa (µg/g), observada nas cepas irradiadas com radiação UV-C e radiação ambiental, foi significativamente inferior àquela apresentada pela cepa selvagem. Esse resultado pode ser atribuído ao fato de a produção de biomassa pelas cepas irradiadas ser aproximadamente quatro vezes maior em comparação à cepa não irradiada. Estudos que avaliaram a produção de pigmentos em isolados bacterianos indicam a existência de uma relação inversa entre o crescimento celular e a produção específica de carotenoides (MENDES-SILVA et al., 2021).

Em leveduras, a radiação ultravioleta pode desencadear mecanismos de defesa frente ao estresse oxidativo, incluindo a síntese de moléculas fotoprotetoras pela célula, como carotenoides. Além disso, esse estresse pode também estar associado ao aumento da produção de biomassa, dependendo das condições de cultivo e da intensidade da radiação aplicada (GARCIA-CORTES et al., 2021).

Para garantir a sobrevivência em ambientes com elevada exposição à radiação UV, os microrganismos empregam várias estratégias adaptativas, incluindo a biossíntese de carotenoides fotoprotetores. Entretanto, estudos recentes demonstraram que a resistência à radiação UV-B é significativamente maior na fase estacionária de crescimento em comparação à fase logarítmica (PAREDES CONTRERAS et al., 2025). Essa observação pode explicar a diminuição da produção de carotenoides verificada após a exposição à radiação UV-B no presente trabalho, uma vez que as cepas analisadas foram cultivadas por um período de 24 horas antes de serem submetidas à irradiação UV-A e UV-B (simulador solar) e UV-C, possivelmente atingindo ou se aproximando da fase estacionária de crescimento.

Resultados semelhantes foram obtidos para cepas de *Pantoea stewartii*, isoladas de milho, que apresentaram maior susceptibilidade à radiação UV durante a fase logarítmica. Em contrapartida, na fase estacionária, a cepa apresentou maior tolerância à radiação UV (MOHAMMADI; BURBANK; ROPER, 2012).

Estudos sobre irradiação UV indicam que a produção de carotenoides está mais fortemente correlacionada com a sobrevivência sob exposição à radiação UV-B do que à UV-C. No caso específico dos testes de irradiação UV-C, a cepa LAPM80 de *Arthrobacter sp.* não apresentou diferença significativa na sobrevivência entre as duas fases logarítmica e estacionária de crescimento. Apesar da alta produção de carotenoides na fase estacionária, essa característica não pareceu conferir proteção contra danos induzidos pela radiação UV-C, diferentemente do observado para a radiação UV-B (PAREDES CONTRERAS et al., 2025).

Assim, é provável que os carotenoides produzidos pela cepa estudadas não desempenhem um papel protetor significativo na sobrevivência à irradiação UV-C. Alternativamente, a irradiância à qual as células foram submetidas pode não ter sido suficiente para induzir níveis de mutagenicidade capazes de promover o aumento da carotenogênese.

4.3.5 Atividade antimicrobiana e Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana de extratos do pigmento de *A. koreensis* PSR 37 e *Kocuria sp.* PSR 51 indicam que esses pigmentos apresentaram efeito contra as bactéria Gram-positiva *S. aureus*, Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa* e levedura *C. albicans*. Para todos os microrganismos testados, o percentual de inibição do crescimento foi superior a 90% quando utilizadas concentrações de 4,5 mg/L e 6,0 mg/L dos pigmentos microbianos provenientes de *A. koreensis* PSR 37 e *Kocuria sp.* PSR 51, respectivamente (Tabela 4.5).

Estudos anteriores sobre o potencial antimicrobiano de pigmentos bacterianos apoiam os achados do presente trabalho. Resultados semelhantes foram encontrados por Shoubey et al. (2021) que investigaram a atividade antimicrobiana de extratos de pigmentos de *Arthrobacter*, isolados de solo e água, demonstrando inibição de *E. coli* e *P. aeruginosa* pelo método de difusão em disco (SANCHITA CHOUBEY; SNEHA VITTAL CHAPADE; SUPRIYA ASHOK GARUD, 2021). De forma semelhante, pigmentos de *Arthrobacter gandavensis* demonstraram atividade antimicrobiana contra cepas de patógenos humanos *K. pneumonia*, *E. sakazakii* e *S. typhi* também utilizando o método de difusão em disco (NUMAN et al., 2018).

Estudos com extratos de pigmentos de *Kocuria sp.* GMA, isolada do solo de um poço de petróleo no Egito, demonstraram inibição de *E. coli* (65,4 %), *S. aureus* (56,8 %) e *P. aeruginosa* (69,0 %), embora a levedura *C. albicans* tenha apresentado apenas 12,85% de inibição (Ibrahim et al., 2024). Pigmentos de *Kocuria flava* demonstraram ampla atividade antimicrobiana contra microrganismos associados a infecções humanas, incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos (SAHAR A. MAL et al., 2020). Metwally et al. (2022) relataram que pigmentos de *Kocuria sp.* RAM1 apresentaram diversas propriedades, dentre elas, atividade antimicrobiana contra seis diferentes bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (METWALLY et al., 2022).

TABELA 4.5 – Atividade antimicrobiana dos extratos contendo pigmentos de *Arthrobacter koreensis* PSR 37 e *Kocuria sp.* PSR 51 avaliado com teste de microdiluição em placa.

Extrato de pigmentos	Cepa alvo	% Inibição			
		C1	C2	C3	C4
<i>Arthrobacter koreensis</i> PSR 37	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 26923)	83,88	82,58	95,41	94,38
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	83,20	89,77	95,74	85,59
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	55,84	87,07	94,06	94,37
	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	55,54	85,75	89,46	92,80
<i>Kocuria sp.</i> PSR 51	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 26923)	85,64	90,52	95,94	98,59
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	63,53	89,45	91,49	93,91
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	80,76	98,89	98,54	100,00
	<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)	92,55	93,32	94,76	97,21

C1–C4 correspondem às concentrações testadas. Para *Arthrobacter koreensis*: 1,8; 2,7; 3,6 e 4,5 mg/L. Para *Kocuria sp.*: 3,0; 4,5; 6,0 e 7,5 mg/L. Ensaios realizados em sextuplicata. Fonte: Elaborado pelo autor.

O mecanismo da atividade antimicrobiana de extratos de pigmentos carotenoides pode ocorrer pela inibição do *quorum sensing* de bactérias patogênicas, diminuindo a expressão de fatores de virulência, como relatado por Gökalsýn et al. (2017) em um estudo realizado com o pigmento zeaxantina, o qual demonstrou ser capaz de inibir sistemas de detecção de quórum de *P. aeruginosa* (GÖKALSIN et al., 2017).

4.3.6 Atividade fotoprotetora *in vitro*

Os extratos de carotenoide obtidos através da produção em meio sintético BHI, na concentração de 0,04 g/mL, apresentaram um FPS de $32,70 \pm 0,46$ e $31,86 \pm 0,27$ para *A.*

koreensis PSR 37 e *Kocuria sp.* PSR 51, respectivamente. De acordo com a Resolução Brasileira RDC nº 629, de 10 de março de 2022 (BRASIL, 2022), o valor mínimo do FPS para um protetor solar é 6,0 sendo, sendo valores entre 30 e 50 classificados como de alto nível de proteção. Dessa forma, os resultados obtidos neste estudo superam os níveis exigidos para protetores solares no Brasil, evidenciando o potencial desses pigmentos como ingredientes bioativos em formulações de fotoprotetoras.

Em comparação, estudos com pigmentos de *Kocuria palustris* demonstraram FPS de 9,36 (MENDES-SILVA et al., 2021), enquanto pigmentos carotenoides de cor laranja originados de *Brevibacterium sp.* apresentaram FPS de 5,3, (PATKI et al., 2021). Uma análise mais ampla envolvendo 17 produtores de pigmentos isolados de solo impactados por atividades antropogênicas, revelou fatores de proteção na faixa de 0,4 – 8,34 (CHOKSI; VORA; SHRIVASTAVA, 2020). Esses dados destacam a variabilidade do potencial fotoprotetor entre diferentes espécies bacterianas e evidenciam a notável eficácia do carotenoide produzido por *A. koreensis* PSR 57 e *Kocuria sp.* PSR 51 como um agente de proteção solar.

Carotenoides como licopeno, astaxantina e β -caroteno estão entre os carotenoides mais frequentemente caracterizados e usados como fotoprotetores devido às suas propriedades antioxidantes (KIKI, 2023). Os carotenoides extraídos de microrganismos têm despertado interesse para aplicações filtros solares e outros produtos anti-UV, pois apresentam atividade antioxidante, boa solubilidade e estabilidade em emulsões oleosas (MENDES-SILVA et al., 2020). Essas características tornam esses pigmentos candidatos promissores para o desenvolvimento de produtos de proteção solar eficazes e seguros.

4.3.7 Atividade antioxidante

A razão entre a quantidade de pigmentos (mg) de *A. koreensis* e *Kocuria sp.* e a quantidade de DPPH (mg) foi utilizada para determinar a atividade antioxidante, possibilitando a caracterização do perfil antioxidante dos pigmentos (Figura 4.12).

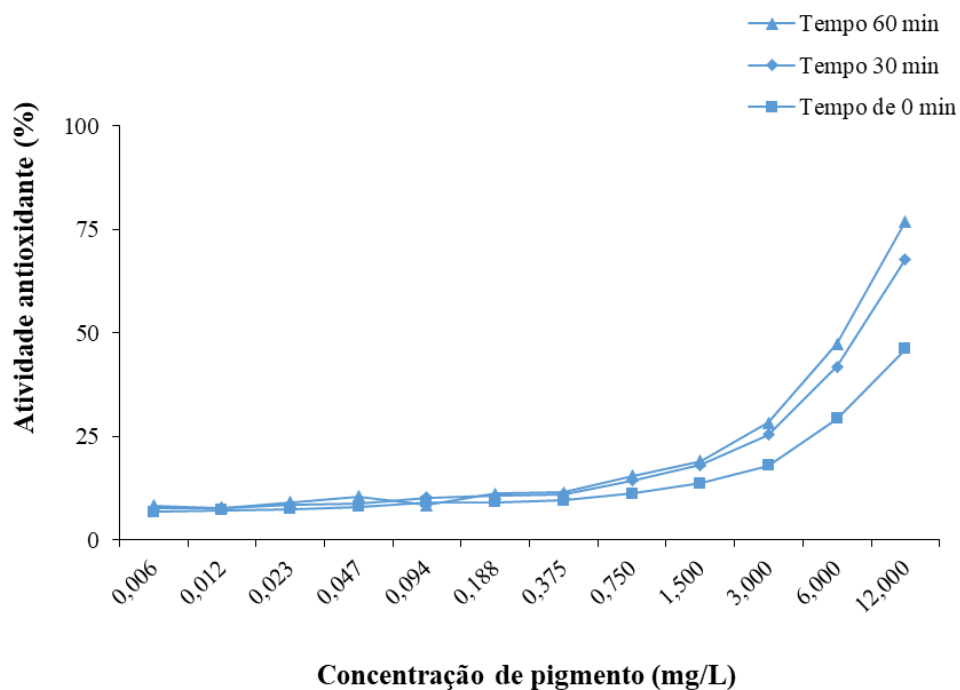
Os extratos de pigmento de *A. koreensis* e *Kocuria sp.* na concentração de 12 mg/L apresentaram capacidade de sequestro do radical DPPH de 67,91% após 30 minutos de incubação e 76,90% após 60 minutos, e de 80,4% após 30 minutos e 89,67% após 60 minutos, respectivamente. Esses resultados evidenciam que a atividade antioxidante foi influenciada pelo tempo de exposição.

Envolvidos nos mecanismos de defesa de microrganismos, os pigmentos microbianos como os carotenoides desempenham papel protetor das células, prevenindo danos oxidativos.

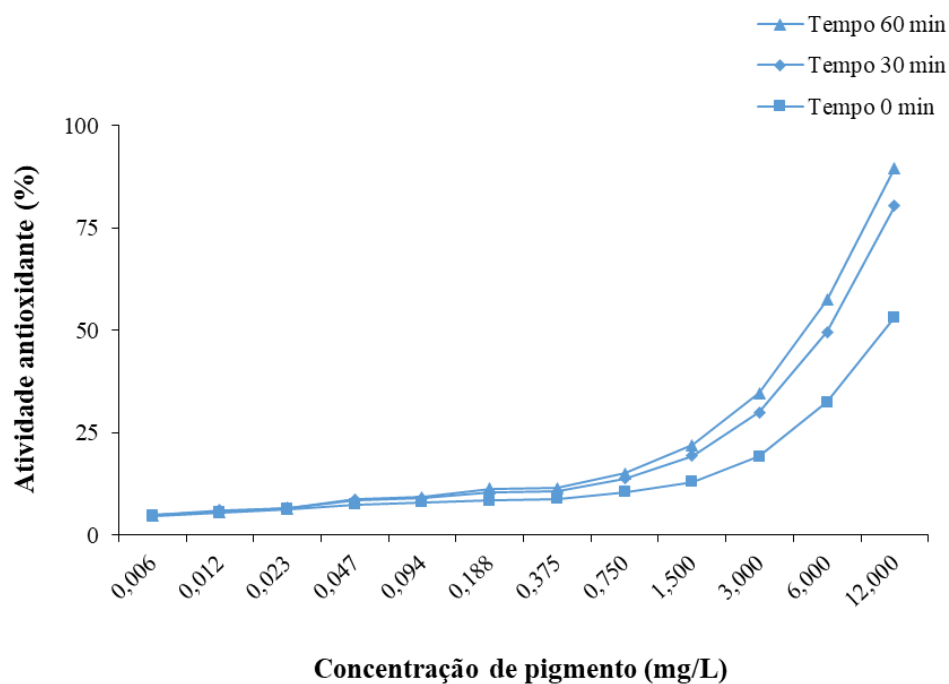
Os antioxidantes neutralizam os radicais livres que, em um sistema biológico está associado ao surgimento de câncer, doenças cardiovasculares e autoimunes (Banerjee; Sarkar; Rao, 2024).

Figura 4.12 – Atividade antioxidante do pigmento de *A. koreensis* PSR 37 (A) e *Kocuria sp.* PSR 51 (B). Tempos 0, 30 e 60 minutos

(A)



(B)



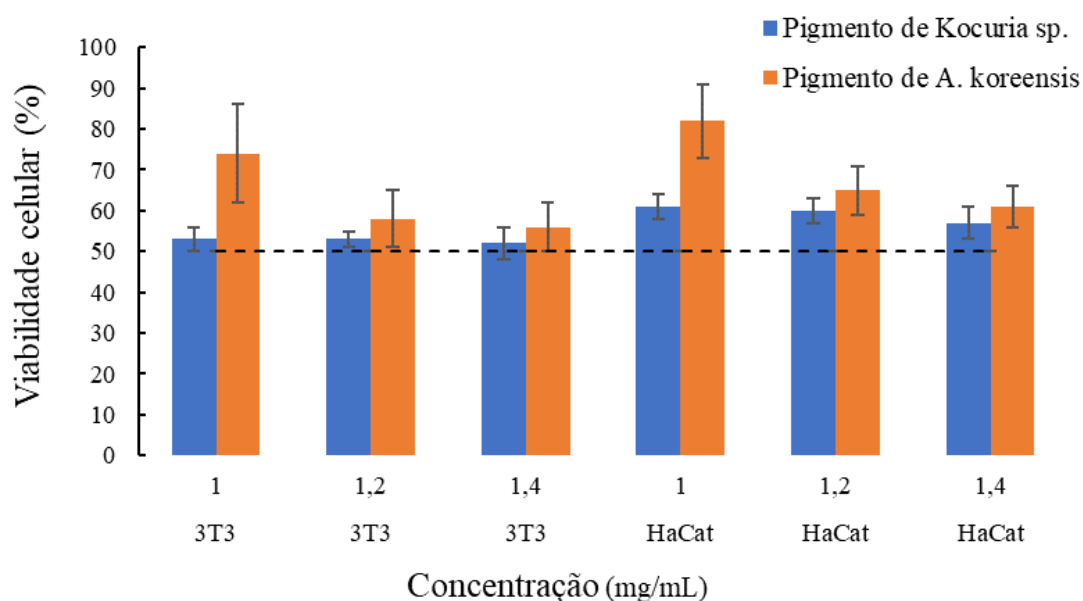
Fonte: Elaborado pelo autor.

Extratos contendo carotenoides extraídos de duas diferentes cepas de *K. palustris* apresentaram percentuais de inibição de 76,53 e 53,2%, enquanto o padrão utilizado, apresentou valores mais elevados, corroborando os resultados observados neste estudo (Mendes-Silva et al., 2021). Em extratos contendo pigmentos de *A. gandavensis*, o potencial de sequestro do radical livre DPPH foi de 53,45 na concentração de 1000 µg/mL e de 44,02 na concentração de 100 µg/mL (Numan et al., 2018), demonstrando que o efeito redutor dos pigmentos é dependente da dose, de maneira consistente com o verificado neste estudo.

4.3.8 Atividade de citotoxicidade

O ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT) foi empregado para avaliar os efeitos dos pigmentos produzidos por *A. koreensis* e *Kocuria sp.* sobre a viabilidade de linhagens celulares não tumorais 3T3 e HaCaT. As concentrações testadas (1,0, 1,2 e 1,4 mg/L) resultaram em percentuais de viabilidade celular superiores a 50%, indicando que os compostos não apresentam citotoxicidade significativa nas condições experimentais avaliadas, uma vez que mais da metade das células manteve atividade metabólica mitocondrial (Figura 4.13).

Figura 4.13 – Percentual de viabilidade celular a partir do ensaio de redução do tetrazólio (MTT) em células 3T3 e HaCaT dos pigmentos produzidos por *Arthrobacter koreensis* (PSR 37) e *Kocuria sp.* PSR 51.



Fonte: elaborado pelo autor.

Apesar da ausência de ensaios com linhagens tumorais, os dados obtidos contribuem de forma relevante para a caracterização do perfil de segurança celular e permitem inferências iniciais sobre o potencial antitumoral do pigmento avaliado. Carotenoides de *Kocuria sp.* RAM1 apresentaram citotoxicidade seletiva contra as linhagens MCF-7, Caco-2 e HeLa, sem apresentar efeito citotóxico em células na concentração de 125 µg/mL, enquanto que na concentração de 500 µg/mL, a viabilidade celular foi reduzida em 64,51% (Metwally et al., 2022). Um requisito essencial para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais é a baixa citotoxicidade em células não neoplásicas. Nesse contexto, pigmentos bacterianos têm sido descritos como apresentando forte atividade antitumoral combinado a toxicidade mínima em células normais, reforçando seu potencial como drogas seletivas (Santos; Ferreira; Figueiredo, 2022).

4.4 CONCLUSÕES

A cepa *Arthrobacter koreensis* PSR 37 isolada de painéis fotovoltaicos apresentou como resposta para maximização da produção de carotenoides totais o uso de meio de cultura sintético BHI, com tempo de cultivo de 72 h e temperatura de incubação de 15 °C. Para a cepa de *Kocuria sp.* PSR 51, a maximização da produção ocorreu com o uso de meio de cultura sintético BHI, tempo de cultivo de 72 h, temperatura de incubação de 30 °C. Entretanto, para ambas as cepas, as radiações UV-C, UV-A e UV-B utilizadas para indução de mutação e aumento da produção de carotenoides não apresentaram resultados significativos.

O melão de soja não foi considerado um bom substrato para a produção de carotenoides ao ser utilizado de forma bruta nas condições testadas.

O pigmento produzido por *A. koreensis* PSR 37 exibiu forte atividade antimicrobiana (maior que 90%) contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus*, Gram-negativas *E. coli* e *P. aeruginosa*. Já para a levedura *C. albicans*, o percentual de inibição maior do que 90% foi alcançado com concentração de 4,5 mg/L. Entretanto, pigmentos provenientes da cepa de *Kocuria sp.* PSR 51 atingiram o percentual de inibição de 90 % para todos os microrganismos testados, na concentração utilizada.

O pigmento apresentou elevado FPS, superior ao estabelecido pela legislação brasileira, indicando promissor potencial como fotoprotetor. A capacidade antioxidante do pigmento foi limitada na concentração avaliada, porém apresentou aumento progressivo ao longo do tempo de exposição. Adicionalmente, os extratos pigmentares exibiram baixa citotoxicidade,

indicando que os pigmentos investigados apresentam um perfil de segurança favorável, o que viabiliza a realização de estudos subsequentes empregando linhagens celulares tumorais. De maneira geral, os achados deste trabalho evidenciam o potencial biotecnológico promissor do pigmento obtido.

REFERÊNCIAS

- AFRA, S. et al. A novel red pigment from marine *Arthrobacter* sp. G20 with specific anticancer activity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 5, p. 1228–1236, nov. 2017.
- AGARWAL, H. et al. Bacterial Pigments and Their Multifaceted Roles in Contemporary Biotechnology and Pharmacological Applications. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 614, 28 fev. 2023.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). Resolução nº 629, de 10 de março de 2022. Dispõe sobre protetores solares e produtos multifuncionais em cosméticos e internaliza a Resolução GMC MERCOSUL nº 08/2011. Disponível em <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-629-de-10-de-marco-de-2022-386099957> (acessado em 29 de Novembro de 2024).
- AKULAVA, V. et al. Screening for pigment production and characterization of pigment profile and photostability in cold-adapted Antarctic bacteria using FT-Raman spectroscopy. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 450, p. 115461, maio 2024.
- ALLAHKARAMI, S. et al. Isolation and identification of carotenoid-producing *Rhodotorula* sp. from Pinaceae forest ecosystems and optimization of in vitro carotenoid production. **Biotechnology Reports**, v. 32, p. e00687, dez. 2021.
- AMARAL AZEVEDO, Mariana. **Avaliação da produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de painéis fotovoltaicos: screening, otimização e uso de substrato alternativo**. 2024. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental) – Universidade Federal de São Carlos, Sorocaba, 2024. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/home>. Acesso em: ago/2024.
- ASHENAFI, E. L. et al. Spectral properties and stability of selected carotenoid and chlorophyll compounds in different solvent systems. **Food Chemistry Advances**, v. 2, p. 100178, out. 2023.
- BCC Research. The Global Market for Carotenoids. 2022. Disponível em: <https://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/the-global-market-for-carotenoids.html> (acessado em 26 Novembro 2024).
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 1, p. 911–917, 1 jan. 1959.
- BRAHMA, D.; DUTTA, D. Antioxidant property of beta-cryptoxanthin produced by *Kocuria marina* DAGII. **Materials Today: Proceedings**, v. 57, p. 1833–1837, 2022.
- CHOKSI, J.; VORA, J.; SHRIVASTAVA, N. Bioactive Pigments from Isolated Bacteria and Its Antibacterial, Antioxidant and Sun Protective Application Useful for Cosmetic Products. **Indian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 379–382, set. 2020.
- CONAB. Nova estimativa para a produção de grãos na safra 2023/2024 está em 297,54 milhões de toneladas. 2024. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas->

noticias/5579-nova-estimativa-para-a-producao-de-graos-na-safra-2023-2024-esta-em-297-54-milhoes-de-toneladas (acessado em 27 Novembro 2024).

CORREA DA SILVA, A. P. F. et al. Soy Molasses as Culture Medium for Bacillus Species Aiming at Plant Growth Promotion. **Fermentation**, v. 10, n. 8, p. 403, 6 ago. 2024.

ELSHIKH, M. et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 6, p. 1015–1019, jun. 2016.

FLEGLER, A.; LIPSKI, A. The C50 carotenoid bacterioruberin regulates membrane fluidity in pink-pigmented *Arthrobacter* species. **Archives of Microbiology**, v. 204, n. 1, p. 70, jan. 2022.

FONG, N. J. C. et al. Carotenoid accumulation in the psychrotrophic bacterium *Arthrobacter agilis* in response to thermal and salt stress. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 5–6, p. 750–756, 1 set. 2001.

GÖKALSIN, B. et al. Reducing Virulence and Biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* by Potential Quorum Sensing Inhibitor Carotenoid: Zeaxanthin. **Microbial Ecology**, v. 74, n. 2, p. 466–473, ago. 2017.

IBRAHIM, G. S. et al. Bio-production and characterization of carotenoid yellow pigment from *Kocuria* sp. GMA and exploring its sustainable antioxidant, antimicrobial and antibiofilm properties. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 67, n. 8, p. 57–68, 1 ago. 2024.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL), I. A. L. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 2008.

KANWUGU, O. N. et al. Effect of different sugar sources on *P. rhodozyma* Y1654 growth and astaxanthin production. p. 923.3Kb, 2020.

KIKI, M. J. Biopigments of Microbial Origin and Their Application in the Cosmetic Industry. **Cosmetics**, v. 10, n. 2, p. 47, 10 mar. 2023.

MANSUR JS, Breder MVR, Mansur MCA, Azulay RD. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *Anais Brasileiro Dermatol*, 1986; 61:121–124

MARCELINO, P. R. F. et al. Biosurfactants production by yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 212–223, mar. 2019.

MENDES-SILVA, T. D. C. D. et al. Biotechnological Potential of Carotenoids Produced by Extremophilic Microorganisms and Application Prospects for the Cosmetics Industry. **Advances in Microbiology**, v. 10, n. 08, p. 397–410, 2020.

MENDES-SILVA, T. D. C. D. et al. Production of carotenoid sarcinaxanthin by *Kocuria palustris* isolated from Northeastern Brazil Caatinga soil and their antioxidant and photoprotective activities. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 44–53, set. 2021.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1 mar. 1959.

Ministério da Saúde ANdVS. Resolução - RDC N_30 de 1_de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico MERCOSUL sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. In: Brasil MdS, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ed.): Diário oficial da União.

MOHAMMADI, M.; BURBANK, L.; ROPER, M. C. Biological Role of Pigment Production for the Bacterial Phytopathogen *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 19, p. 6859–6865, out. 2012.

MOURA, J. B. et al. Extremophilic taxa predominate in a microbial community of photovoltaic panels in a tropical region. **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, n. 16, p. fnab105, 26 ago. 2021.

MULIK, A.; KUMBHAR, P.; BHADEKAR, R. PRODUCTION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF PIGMENTS PRODUCED BY KOCURIA SP BRI 36: INFLUENCE OF HEAVY METALS. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 10, p. 137, 2 out. 2017.

NOBY, N.; KHATTAB, S. N.; SOLIMAN, N. A. Sustainable production of bacterioruberin carotenoid and its derivatives from *Arthrobacter agilis* NP20 on whey-based medium: optimization and product characterization. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 10, n. 1, p. 46, 24 jul. 2023.

NUMAN, M. et al. Chemical profile and in-vitro pharmacological activities of yellow pigment extracted from *Arthrobacter gandavensis*. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 74–82, dez. 2018.

PAREDES CONTRERAS, B. V. et al. Enhanced UV-B photoprotection activity of carotenoids from the novel *Arthrobacter* sp. strain LAPM80 isolated from King George Island, Antarctica. **Heliyon**, v. 11, n. 1, p. e41400, jan. 2025.

PATKI, J. M. et al. Analysis of the applicative potential of pigments extracted from bacterial isolates of mangrove soil as topical UV protectants. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, p. e19127, 2021.

QUINTERO, M. et al. Bioprospecting from marine coastal sediments of Colombian Caribbean: screening and study of antimicrobial activity. **Journal of Applied Microbiology**, v. 125, n. 3, p. 753–765, set. 2018.

RAM, S. et al. Ameliorating process parameters for zeaxanthin yield in *Arthrobacter gandavensis* MTCC 25325. **AMB Express**, v. 10, n. 1, p. 69, dez. 2020.

RAPOPORT, A. et al. Carotenoids and Some Other Pigments from Fungi and Yeasts. **Metabolites**, v. 11, n. 2, p. 92, 6 fev. 2021.

REZAEYAN, Z. et al. High carotenoid production by a halotolerant bacterium, *Kocuria* sp. strain QWT-12 and anticancer activity of its carotenoid. **EXCLI Journal**; **16:Doc840**; ISSN **1611-2156**, 2017.

SANCHETI, A.; THOMPSON, E. R.; JU, L.-K. Factors influencing the enzymatic hydrolysis of soy molasses into fermentation feedstock. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 170, p. 110302, out. 2023.

SANCHITA CHOUBEY; SNEHA VITTAL CHAPADE; SUPRIYA ASHOK GARUD. Optimization of Pigment Production by *Micrococcus* and *Arthrobacter* species Isolated from Soil and Water. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 3, p. 1902–1907, 6 jul. 2021.

SAUBENOVA, M. et al. Production of Carotenoids by Microorganisms. **Fermentation**, v. 10, n. 10, p. 502, 30 set. 2024.

SELECTA. Ficha Técnica Melaço de Soja Soybean Molasses Nutricional Information. 2023. Disponível em <https://cjselecta.com.br/unidades-de-negocios/produtos-cj/melaco-de-soja/> (acessado em 29 Novembro 2024).

SIDIN, R. S.; RETNANINGRUM, E. Antibacterial Activity of Carotenoid Pigments Produced by Heterotrophic Bacteria from Seawater in Krakal Coastal Area, Yogyakarta, Indonesia. **Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 74–84, 30 ago. 2022.

SILVERSTEIN, R. M. **Identificação de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2007

SUTTHIWONG, N. et al. *Arthrobacter arilaitensis* strains isolated from ripened cheeses: Characterization of their pigmentation using spectrophotometry. **Food Research International**, v. 65, p. 184–192, nov. 2014.

VALDUGA, E. et al. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, 2009.

YANG, H. et al. Propionic acid production from soy molasses by *Propionibacterium acidipropionici*: Fermentation kinetics and economic analysis. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 1–9, fev. 2018.

YU, X. et al. Purification, Identification, and Properties of a Novel Carotenoid Produced by *Arthrobacter* sp. QL17 Isolated from Mount Qomolangma. **Antioxidants**, v. 11, n. 8, p. 1493, 29 jul. 2022.

ZHAI, Y.-G. et al. CAROTENE PRODUCTION FROM AGRO-INDUSTRIAL WASTES BY *Arthrobacter globiformis* IN SHAKE-FLASK CULTURE. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n. 4, p. 355–369, 19 maio 2014.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho investigou o potencial de microrganismos isolados de painéis fotovoltaicos na produção de pigmentos, abordando aspectos inovadores e com relevância biotecnológica. Os resultados obtidos permitiram avaliar de forma crítica as hipóteses inicialmente propostas.

A utilização do melaço de soja como substrato alternativo para a produção de pigmentos, microbianos representou uma abordagem inédita na literatura. Apesar do caráter inovador, o melaço não se mostrou eficiente para induzir aumento na síntese de pigmentos nas condições avaliadas, indicando que ajustes no processamento ou suplementação do substrato podem ser necessários para otimizar a produção.

A exposição dos microrganismos à radiação UV-A, UV-B e UV-C, proposta como estratégia de estresse para estimular a produção de pigmentos, não resultou nos efeitos esperados. Este achado sugere que os parâmetros de intensidade, dose e o tempo de exposição usados não foram suficientes para promover alterações metabólicas significativas nos microrganismos estudados, embora permaneça como uma abordagem promissora para estudos futuros.

Ainda assim, os pigmentos obtidos demonstraram propriedades biotecnológicas relevantes. Foram observadas atividades antimicrobiana, fotoprotetiva e antioxidante, associadas a baixos níveis de citotoxicidade em células não tumorais. Esses achados confirmam o potencial de aplicação dos pigmentos microbianos isolados em diferentes setores, incluindo farmacêutico, cosmético e industrial, corroborando a hipótese de que microrganismos de ambientes extremos podem produzir compostos bioativos de interesse biotecnológico.

5.1 PERSPECTIVAS FUTUTURAS

1. Avaliar a produção de pigmentos com diferentes concentrações, suplementações ou combinações do melaço de soja, visando a otimização da produção;
2. Investigar o efeito da radiação UV utilizando diferentes doses, espectros e tempos de exposição, a fim de compreender melhor seu papel na indução da produção de pigmentos;
3. Explorar o potencial antitumoral dos pigmentos em células tumorais, ampliando o escopo de aplicações biotecnológicas;

4. Avaliar a estabilidade e funcionalidade dos pigmentos em formulações comerciais, consolidando sua viabilidade para aplicações industriais.

REFERÊNCIAS

- AKULAVA, V. et al. Screening for pigment production and characterization of pigment profile and photostability in cold-adapted Antarctic bacteria using FT-Raman spectroscopy. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 450, p. 115461, maio 2024.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa - IN nº 211, de 1º de março de 2023**. Estabelece a lista de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em leite e produtos lácteos. Brasília, DF: Anvisa, [2023]. Disponível em: https://anvisa.gov.br/legis/datalegis.net/action/ActionDatalegis.php?acao=categorias&cod_modulo=310&menuOpen=true. Acesso em: 9 mar. 2026.
- CHOKSI, J.; VORA, J.; SHRIVASTAVA, N. Bioactive Pigments from Isolated Bacteria and Its Antibacterial, Antioxidant and Sun Protective Application Useful for Cosmetic Products. **Indian Journal of Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 379–382, set. 2020.
- DI SALVO, E. et al. Natural Pigments Production and Their Application in Food, Health and Other Industries. **Nutrients**, v. 15, n. 8, p. 1923, 16 abr. 2023.
- IBRAHIM, G. S. et al. Bio-production and characterization of carotenoid yellow pigment from *Kocuria* sp. GMA and exploring its sustainable antioxidant, antimicrobial and antibiofilm properties. **Egyptian Journal of Chemistry**, v. 67, n. 8, p. 57–68, 1 ago. 2024.
- YABUZAKI, Junko. **Carotenoids Database**. 1 nov. 2020. Disponível em: <http://carotenoiddb.jp/> Acesso em: 10 fev. 2025
- LÓPEZ, G.-D. et al. Bacterial Carotenoids: Extraction, Characterization, and Applications. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1239–1262, 18 ago. 2023.
- MACHADO, W. R. C. et al. Optimization of agro-industrial coproducts (molasses and cassava wastewater) for the simultaneous production of lipids and carotenoids by *Rhodotorula mucilaginosa*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 42, p. 102342, jul. 2022.
- MARIUTTI, L. R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoid esters analysis and occurrence: What do we know so far? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 648, p. 36–43, jun. 2018.
- MENDES-SILVA, T. D. C. D. et al. Production of carotenoid sarcinaxanthin by *Kocuria palustris* isolated from Northeastern Brazil Caatinga soil and their antioxidant and photoprotective activities. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 53, p. 44–53, set. 2021.
- MOURA, J. B. et al. Extremophilic taxa predominate in a microbial community of photovoltaic panels in a tropical region. **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, n. 16, p. fnab105, 26 ago. 2021.
- PAREDES CONTRERAS, B. V. et al. Enhanced UV-B photoprotection activity of carotenoids from the novel *Arthrobacter* sp. strain LAPM80 isolated from King George Island, Antarctica. **Heliyon**, v. 11, n. 1, p. e41400, jan. 2025.

RAM, S. et al. Bacteria as an alternate biofactory for carotenoid production: A review of its applications, opportunities and challenges. **Journal of Functional Foods**, v. 67, p. 103867, abr. 2020.

RATHER, L. J. et al. Research progress, challenges, and perspectives in microbial pigment production for industrial applications - A review. **Dyes and Pigments**, v. 210, p. 110989, fev. 2023.

SHARMA, R.; GHOSHAL, G. Optimization of carotenoids production by *Rhodotorula mucilaginosa* (MTCC-1403) using agro-industrial waste in bioreactor: A statistical approach. **Biotechnology Reports**, v. 25, p. e00407, mar. 2020.

TERRONES RODRÍGUEZ, N. A. et al. Optimization of Total Carotenoid Production by *Rhodotorula mucilaginosa* from Artichoke Agroindustrial Waste Using Response Surface Methodology. **Environmental Research, Engineering and Management**, v. 79, n. 2, p. 111–121, 18 jul. 2023.

VENIL, C. K.; DEVI, P. R.; AHMAD, W. A. Agro-Industrial Waste as Substrates for the Production of Bacterial Pigment. Em: ZAKARIA, Z. A.; BOOPATHY, R.; DIB, J. R. (Eds.). **Valorisation of Agro-industrial Residues – Volume I: Biological Approaches**. Applied Environmental Science and Engineering for a Sustainable Future. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 149–162.

YU, X. et al. Purification, Identification, and Properties of a Novel Carotenoid Produced by *Arthrobacter* sp. QL17 Isolated from Mount Qomolangma. **Antioxidants**, v. 11, n. 8, p. 1493, 29 jul. 2022.