



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

THIAGO LUIZ BRITO SOUZA

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE PIGMENTOS NATURAIS DE
***Serratia marcescens* UFPEDA 223**

Recife
2018

THIAGO LUIZ BRITO SOUZA

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE PIGMENTOS NATURAIS DE
Serratia marcescens UFPEDA 223**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dra^a. Gláucia Manoella de Souza Lima.

Coorientadora: Cristiane Moutinho Lagos de Melo.

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz,
CRB4/1752

Souza, Thiago Luiz Brito

Produção e avaliação biológica de pigmentos naturais de *Serratia marcescens* UFPEDA 223 / Thiago Luiz Brito Souza - 2018.

52 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Gláucia Manoella de Souza Lima

Coorientadora: Cristiane Moutinho Lagos de Melo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Recife, 2018.

Inclui referências e anexo.

1. Prodigiosina 2. Atividade Antimicrobiana 3. Citotoxicidade

I. Lima, Gláucia Manoella de Souza (Orientadora) II. Melo, Cristiane Moutinho Lagos de (Coorientadora) III. Título

572.59 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-202

THIAGO LUIZ BRITO SOUZA

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE PIGMENTOS NATURAIS DE
Serratia marcescens UFPEDA 223**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: 28/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra^a. Gláucia Manoella de Souza Lima
UFPE - Departamento de Antibióticos

Prof^a. Dra^a. Norma Buarque de Gusmão
UFPE - Departamento de Antibióticos

Prof^a. Dra^a. Jeanne Cristina Lapenda Lins Cantalice
UFPE - Departamento de Antibióticos

RESUMO

Indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos utilizam grande quantidade de pigmentos coloridos. Tradicionalmente, pigmentos podem ser sintéticos ou naturais, sendo estes extraídos de plantas, micro-organismos e insetos. Os pigmentos naturais têm recebido maior destaque por geralmente serem menos tóxicos. *Serratia marcescens* é um bacilo Gram-negativo com capacidade de secretar diferentes metabólitos secundários, como os pigmentos vermelhos. Como exemplo disso, a prodigiosina, é o principal pigmento vermelho produzido por essa espécie, responsável por diversas propriedades farmacológicas. Com base nisso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de pigmentos naturais por *S. marcescens* UFPEDA 223, além de investigar as atividades antimicrobianas e citotóxicas. A produção de pigmento foi avaliada inicialmente em diferentes meios de cultivo, atingindo seu pico após 60 h de fermentação em Caldo TSB sem agitação, com produtividade máxima de 0,05 UA/h. O planejamento fatorial (3^2) mostrou que o pico da produção (2,4 UA) foi atingido com pH 5 e temperatura de 30° C. O pigmento foi extraído com acetona (1:3 m/v) e a análise por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) evidenciou a presença de duas bandas, cujos fatores de retenção foram 0,36 e 0,7. A atividade biológica foi determinada a partir da avaliação da citotoxicidade por meio do ensaio de viabilidade celular, do efeito proliferativo e da atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram positivas e negativas. Os resultados mostraram que o pigmento nas concentrações de 6 ug/mL e 3 ug/mL promoveu a proliferação de esplenócitos, com alto índice de viabilidade celular. O pigmento apresentou atividade apenas para *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, com concentração mínima inibitória de 125 ug/mL. Estes resultados demonstram ser bastante promissores quando comparados com o antibiótico padrão Oxacilina (CMI 128 µg / mL). Deste modo, com base nos dados encontrados neste estudo, *S. marcescens* UFPEDA 223 mostrou-se promissora para a produção do pigmento avermelhado. No entanto, apesar dos resultados satisfatórios para a citotoxicidade e atividade antimicrobiana, são necessários outros testes para concluir sua atividade biológica, bem como finalizar as etapas da caracterização química do pigmento.

Palavras-chaves: Prodigiosina. Atividade Antimicrobiana. Citotoxicidade.

ABSTRACT

Industries of food, cosmetics and pharmaceuticals use large amount of colored pigments. Traditionally, pigments can be synthetic or natural, these being extracted from plants, microorganisms and insects. The natural ones have received greater prominence for being less toxic. *Serratia marcescens* is a Gram-negative bacillus with the ability to secrete different secondary metabolites, such as red pigments. As an example, prodigiosin is the main red pigment produced by this species, responsible for several pharmacological properties. Based on this, the present work had the objective of evaluating the production of natural pigments by *S. marcescens* UFPEDA 223 and to analyze the influence of different physical, chemical and kinetic parameters in this production, besides investigating the antimicrobial and cytotoxic activities of this pigment. The pigment production was evaluated initially by means of the cultivation in different media of Nutrition Broth (CN), BHI and TSB for 48 hours, after this period a greater reddish pigmentation was observed in the CN and TSB. The spectrophotometric analyzes confirmed wavelength pigmentation of 480 nm in TSB Broth without stirring, 0.38 AU, reaching a peak of production after 60 h of fermentation with a maximum yield of 0.05 AU / hr. The factorial design at three levels of variation (32), performed for the variables Temperature and pH, showed that the microorganism obtained a higher pigment production of 2.4 AU with pH 5 and a temperature of 30° C. The pigment was extracted with acetone (1: 3 m / v) and the extract was analyzed by Thin Layer Chromatography (CCD). Two bands were detected, one at the application point and the other with Rf of 0.7. The biological activity was determined from the evaluation of cytotoxicity through the cell viability assay, the proliferative effect and the antimicrobial activity against Gram positive and negative bacteria. The results showed that the pigment at concentrations of 6 µg / mL and 3 µg / mL promoted proliferation of splenocytes, with high cell viability index. The pigment presented activity only for *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, with a minimum inhibitory concentration of 125 ug / mL. These results appear to be quite promising when compared to the standard antibiotic Oxacillin (CMI 128 µg / mL and CMB ≥ 128 µg / mL). Thus, based on the data found in this study, *Serratia marcescens* UFPEDA 223 was shown to be promising for the production of reddish pigment, since the optimization of this process, together with the low cost, fits the profile of interest for industrial scale production. However, despite satisfactory results for cytotoxicity and antimicrobial activity, further testing is required to complete its

biological activity, as well as finalize the chemical characterization stages of the pigment.

Key-words: Prodigiosine. Antimicrobial Activity. Cytotoxicity.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	OBJETIVOS	11
1.1.1	Objetivo geral	11
1.1.2	Objetivos específicos	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	<i>Serratia marcescens</i>	12
2.2	Metabólitos secundários	13
2.3	Pigmentos	14
3.3.2	Histórico	15
3.3.3	Cor e estrutura	16
3.3.4	Pigmentos naturais versus artificiais	18
3.3.5	Aplicações na indústria de alimentos	23
3.3.6	Aplicações na indústria têxtil	24
3.3.7	Aplicações na indústria farmacêutica	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	Micro-organismo	27
3.2	Reativação do Micro-organismo	27
3.3	Produção e detecção da produção de pigmento	27
3.4	Determinação da concentração celular	28
3.5	Extração e avaliação do pigmento	28
3.6	Parâmetros cinéticos	29
3.7	Planejamento Fatorial	30
3.9	Atividade antimicrobiana da prodigiosina (Teste de Difusão em Ágar)	31
3.10	Atividades Imunomodulatórias	32
4.10.1	Isolamento dos Esplenócitos	32
4.10.2	Avaliação da citotoxicidade através do ensaio de viabilidade celular	33
4.10.3	Ensaio de proliferação com Carboxifluoresceína Diacetato Succinimidil Éster (CFSE)	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	Detecção da produção de pigmento	34
4.2	Determinação da concentração celular e da produção de pigmento	36
4.3	Planejamento Fatorial	38
4.4	Análise cromatográfica do pigmento	39
4.5	Atividade Antimicrobiana	41
4.6	Avaliação da citotoxicidade através do ensaio de viabilidade celular	41
4.7	Ensaio de proliferação celular com CFSE	43
5	CONCLUSÃO	45
6	PERSPECTIVA	46
	REFERÊNCIAS	47
	ANEXO A	51

1 INTRODUÇÃO

Os pigmentos são sólidos insolúveis, amplamente distribuídos na natureza, podem ser de origem orgânica e/ou inorgânica, encontrados nas células e tecidos, sob a forma de grânulos, alguns com importantes funções, mas que em determinadas circunstâncias podem constituir causa ou efeito de alterações funcionais (CRUZ FILHO, 2013; FERREIRA et al., 2000).

Tradicionalmente, os pigmentos de origem natural são extraídos de plantas e insetos, ou são obtidos por síntese química, porém o uso de micro-organismos tem ganhado destaque, visto que estes produzem sem causar danos ambientais. Tais características são responsáveis pelo seu grande destaque na produção de produtos biotecnológicos, visto que os pigmentos microbianos são naturais e melhores substitutos para corantes químicos usados em indústrias e laboratórios. Adicionalmente, a produção de biopigmentos por micro-organismos é um método promissor, pois eles apresentam rápida taxa de crescimento e viabilidade de desenvolvimento de bioprocessos (MONTEIRO, 2016; SHAHID et al., 2013).

Serratia marcescens é um bacilo Gram-negativo pertencente à família Enterobacteriaceae, amplamente distribuídos no ar, água, solo e criaturas vivas, incluindo plantas e animais. Além da sua capacidade de secretar diferentes produtos extracelulares, tais como quitinase, protease, lipase e nuclease em diversas condições, alguns metabólitos secundários, como os pigmentos vermelhos, podem ser produzidos através de suas vias de metabólicas (ZANG et al., 2014).

A prodigiosina, por exemplo, é um pigmento vermelho produzido por *Serratia marcescens*, responsável pelas características farmacológicas relatadas como anticâncer, antimicrobiana, antioxidante e imunossupressora. Um aspecto importante a ser considerado é o fato de que as cepas produtoras de pigmentos demonstraram causar infecções em menor frequência que as cepas não pigmentadas, minimizando, portanto, o risco de infecção durante a produção em massa de pigmento (ELKENAWY, 2017). Outro pigmento produzido por *S. marcescens* é o β -caroteno, um membro dos carotenóides, com coloração vermelho-alaranjado, abundantemente encontrado em plantas e frutas, biosintetizado a partir de pirofosfato de geranilgeranilo (ABDELHAFEZ, 2016).

Os corantes artificiais, tradicionalmente usados nos processamentos alimentícios, continuam sendo os corantes mais utilizados pelas indústrias, por apresentarem menores custos de produção e maior estabilidade frente aos naturais, no entanto está ocorrendo um aumento da preferência do consumidor, sobretudo das indústrias, por alimentos mais saudáveis, o que tem levado à substituição dos corantes artificiais pelos naturais. Contudo, essa substituição enfrenta dificuldades principalmente nas condições de processamento e armazenamento dos alimentos, nesse sentido, a busca por alternativas que viabilizem essa substituição tem sido o foco de muitos pesquisadores. Muitos corantes naturais além de atribuir cor aos alimentos que os contém, também possuem propriedades benéficas à saúde humana, ou seja, possuem características funcionais e não só estéticas, como por exemplo, antioxidantes e anti-inflamatórias. Com isso, sua utilização torna-se muito conveniente e interessante, pois além de melhorar a aparência dos alimentos, podem ajudar a promover a saúde de quem os consome (MONTEIRO, 2016).

Nessa perspectiva, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a produção de pigmentos naturais por *Serratia marcescens* e verificar atividade antimicrobiana e efeito citotóxico do pigmento isolado.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

- Avaliar a produção e atividade biológica de pigmentos naturais de *Serratia marcescens* UFPEDA 223.

1.1.2 Objetivos específicos

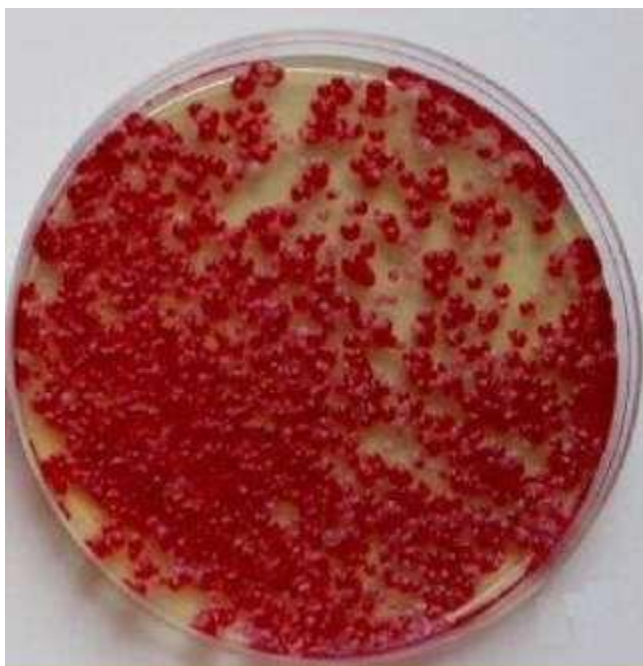
- Realizar uma triagem da produção de pigmento em diferentes meios de cultura;
- Avaliar a influência de diferentes parâmetros químicos e físicos na produção do pigmento;
- Obter parâmetros cinéticos da produção de pigmento e de biomassa;
- Avaliar a atividade antimicrobiana e efeito citotóxico do pigmento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Serratia marcescens*

S. marcescens é uma bactéria Gram negativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae*., popularmente conhecida pela coloração rubra de suas colônias (Figura 1). Esta espécie é saprófita, sendo isolada de diferentes nichos ecológicos como solo, ar, plantas, águas e animais. Pode-se distinguir *S. marcescens* de outros gêneros pertencentes da mesma família pela produção de enzimas como lipases, gelatinase e DNases, entretanto, uma série de outros traços que podem contribuir para sua patogênese é relatada, como motilidade e a atividade das enzimas extracelulares, nuclease, protease e hemolisina. Outra característica fisiológica marcante desta espécie é a produção de pigmento vermelho (RACHON et al., 2017; CANTALICE, 2014; GULANI E BHATTACHARYA, 2012).

Figura 1: Colônias de *Serratia marcescens* com pigmentação avermelhada característica



Fonte: <https://br.pinterest.com/pin/199284352232346695/>

S. marcescens é produtora de metabólitos secundários e enzimas de importância industrial como quitinases, proteases, nucleases, bacteriocinas e surfactantes e pigmentos naturais como a prodigiosina. Em condições quentes e

úmidas, *S. marcescens* formam colônias avermelhadas que se dissolvem em um fluido viscoso com aspecto mucilaginoso e uma semelhança com o sangue (NORA et al., 2017; HARRIS et al., 2004).

Embora *S. marcescens* produza principalmente um pigmento vermelho brilhante chamado prodigiosina, algumas cepas de *Serratia* podem apresentar um perfil amplo de pigmentação que pode variar do vermelho ao amarelo. Essa diversidade de cores pode ser influenciada por uma gama de fatores, como concentração de oxigênio, pH, luz e temperatura. A condição ótima de produção pigmento pode variar uma vez que não é necessariamente a mesma da condição de crescimento (DING & WILLIAMS, 1983).

2.2 Metabólitos secundários

3.2.1 Definição

Dá-se o nome de metabolismo ao conjunto de reações que continuamente estão ocorrendo em cada célula. Portanto, os compostos químicos formados, degradados, ou simplesmente transformados são chamados metabólitos.

Segundo Santos (1999) todos os seres vivos derivam de um precursor comum. Isso explica, por exemplo, porque as principais macromoléculas (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos), que vem a ser os constituintes químicos celulares, são essencialmente as mesmas, quer num organismo vegetal, quer num animal. Por serem considerados processos essenciais à vida e comuns aos seres vivos, têm sido definidos como integrantes do metabolismo primário. Ou seja, o metabolismo primário compreende as várias reações químicas envolvidas na transformação de moléculas de nutrientes em unidades constitutivas essenciais da célula.

Vegetais, microorganismos e, em menor escala animais, entretanto, apresentam um metabolismo diferenciado (enzimas, coenzimas e organelas) capaz de produzir, transformar e acumular outras substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor. Nesse grupo, encontram-se substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número limitado de organismos, sendo a bioquímica e o metabolismo específicos e únicos, caracterizando-se como elementos de diferenciação e especialização. A todo

este conjunto metabólico costuma-se definir como metabolismo secundário, cujos produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação da espécie, em seu ecossistema (SANTOS,1999).

2.3 Pigmentos

3.3.1 Terminologia

A palavra “pigmento” tem origem latina e originalmente denominava uma cor (no sentido de matéria corante), mas foi mais tarde estendida para indicar adereços coloridos (maquiagem, por exemplo). No início da Idade Média, a palavra foi usada também para descrever os mais diversos tipos de extratos de plantas e vegetais, especialmente aqueles usados para coloração de alimentos. A palavra pigmento ainda vem sendo usada nesse sentido na terminologia biológica: matéria corante presente em animais, plantas ou micro-organismos e que ocorre em grânulos dentro das células ou membranas celulares, como depósitos nos tecidos, ou suspensa nos fluidos corpóreos (DUFOSSÉ, 2006; ULLMANN, 1985).

O significado moderno associado à palavra “pigmento” (em inglês, pigment) foi originado no século XX, significando uma substância constituída de pequenas partículas que é praticamente insolúvel no meio aplicado, e é usada devido às suas propriedades corantes, protetivas ou magnéticas (Ullmann, 1985). Essa definição aplica-se bem aos pigmentos de origem mineral, como dióxido de titânio ou negro de fumo; para materiais corantes solúveis, geralmente compostos orgânicos, é mais adequado usar a expressão “corante” (em inglês, dye). No entanto, ambos os termos (corante e pigmento) são usados para denominar substâncias usadas para conferir cor a alimentos, às vezes indistintamente. No presente trabalho, para manter consonância com os termos usados na literatura técnica, prefere-se citar substâncias corantes vegetais ou animais, indistintamente de sua solubilidade ou insolubilidade, como pigmentos (SHUN-YA N e YOICHI, 2009).

3.3.2 Histórico

Na antiguidade, os corantes naturais eram extraídos essencialmente de flores, sementes, frutos, cascas e raízes de plantas ou de insetos e moluscos através de complexos processos, envolvendo diversas operações como maceração, destilação, fermentação, decantação, precipitação, filtração, etc (VELOSO, 2012). Os índios, por exemplo, extraíam corantes de plantas com a finalidade de tingirem artefatos, vestimentas e os próprios corpos (como proteção contra picada de insetos, raios solares ou para indicarem um estado de espírito como festejos, guerras, etc.) (VELOSO, 2012). Egípcios adicionavam extratos naturais e vinhos para melhorar a aparência de seus produtos (DOWNHAM; COLLINS, 2000). Até 1850 todos os corantes alimentícios provinham de três fontes: vegetais comestíveis (cenoura=laranja, beterraba=vermelho, pele de uva escura=preta, etc); extratos de origem animal ou vegetal normalmente não consumidos tais como (ácido camínico=vermelho, estigma de açafrão=amarelo) e resultados das transformações de substâncias naturais (caramelo=marrom) (SOUZA, 2000). Com as descobertas dos corantes sintéticos nos séculos XVIII e XIX, bem como da influência da cor na aparência e, conseqüentemente de uma maior aceitação dos produtos pelos consumidores, o interesse das indústrias pelo uso dos corantes artificiais aumentou, inclusive na tentativa de mascarar alimentos de baixa qualidade.

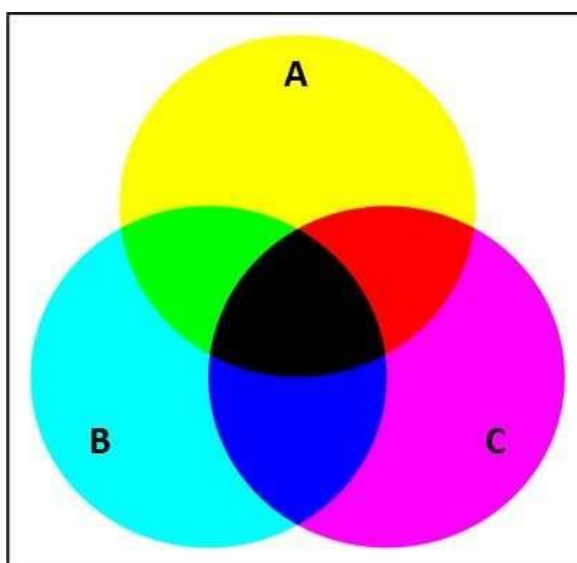
Desde então os corantes sintéticos foram cada vez mais usados, especialmente por apresentarem maior uniformidade, estabilidade incentivando novas descobertas (BOLEY, 1980). No final do século XIX mais de 90 corantes eram utilizados pela indústria alimentícia. Em 1906, apareceu nos EUA a primeira legislação relativa à utilização de corantes pela indústria alimentícia. Desde essa época, pesquisas comprovam que muitos corantes sintéticos são tóxicos e podem causar anomalias em recém nascidos, distúrbios cardíacos e cânceres (POLÔNIO, 2002).

Muitos alimentos foram coloridos indiscriminadamente, como ketchup, mostarda, geleias e ainda outros, que mesmo sendo proibido, tiveram adição de corantes, como por exemplo vinhos brancos de má qualidade que foram transformados em vinhos tintos. Já foram relatados acréscimos de corantes artificiais em cervejas, cidras e aperitivos (PRADO e GODOY, 2003).

3.3.3 Cor e estrutura

A cor de cada pigmento está associada à absorção ou reflexão da luz em comprimentos de onda determinados, o que é uma característica da molécula do pigmento. A interferência com a luz visível está associada a transições eletrônicas dos elétrons de valência (Gordon, 1995): a energia (e conseqüentemente a frequência, e portanto a cor) da luz está associada à diferença de energia envolvida entre os estados dos elétrons nessas transições. A cor percebida depende da cor absorvida, de acordo com a complementaridade das cores (Figura 2).

Figura 2 – cores primárias subtrativas absorvem comprimentos de onda determinados. Cada círculo representa um filtro absorvendo cor, por isso a combinação das cores é a ausência de cor, o negro.



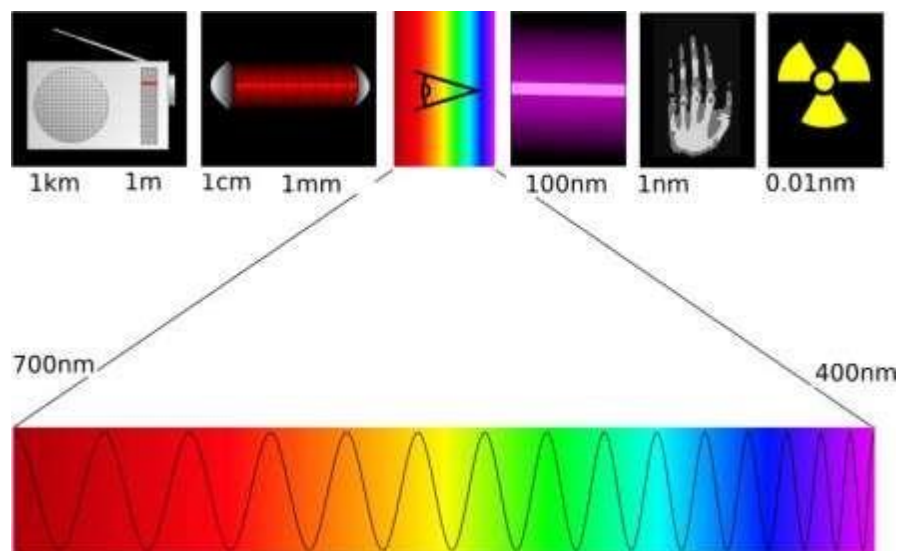
B: filtro que absorve a luz vermelha – observa-se ciano C: filtro que absorve a luz verde – observa-se magenta A: filtro que absorve a luz azul – observa-se amarelo

As cores primárias subtrativas são o amarelo, o ciano e a magenta. Assim, se da luz branca for absorvido o componente amarelo, percebe-se a cor azul; de forma análoga, quando a cor de um composto é amarela, esse composto deve absorver luz no comprimento de onda correspondente ao azul (Bodner e Pardue, 1995). É por isso que, para a análise de pigmentos vermelhos, a absorção máxima se dá para comprimentos de onda baixos – correspondendo ao azul, e vice-versa.

A absorção de fótons de luz com energias específicas é um fenômeno bem conhecido e explorado em técnicas de análise como a espectrofotometria. Na

prática, quando se trata de substâncias corantes, há bandas de absorção – faixas de comprimentos de onda, ao invés de linhas espectrais como em íons inorgânicos simples. No entanto, o princípio de “formação” da cor é o mesmo (Figura 3).

Figura 3 – O espectro eletromagnético na faixa visível. Comprimentos de onda maiores (700nm) correspondem ao vermelho, enquanto comprimentos de onda menores (400nm) correspondem ao violeta.



Fonte: <http://www.fisica-interessante.com/fisica-ondas-cores.html>

A energia requerida por elétrons capazes de excitação depende do orbital que esses elétrons ocupam. A energia requerida é menor (e, portanto, maiores comprimentos de onda, menos energéticos, serão adequados) quando duplas ligações ocorrerem. Se uma série de duplas ligações duplas conjugadas está presente, a energia de excitação é ainda menor, a ponto de poder ser promovida pela luz visível – portanto, pode-se observar cor. À medida que o comprimento do sistema de duplas ligações conjugadas aumenta, o comprimento de onda de máxima absorção também aumenta. (Margalith, 1992). Por exemplo, enquanto o antraceno (três anéis aromáticos lineares) é incolor, o naftaceno (4 anéis lineares) é laranja e o pentaceno (5 anéis lineares) é azul (MERCK, 1996). Em pigmentos naturais, esses sistemas conjugados são observados com frequência – por exemplo, nos carotenóides, compostos que conferem a cor a tomates, cenouras e outros vegetais. A formação de sistemas conjugados com heteroátomos como oxigênio ou nitrogênio (apresentando igualmente orbitais p conjugados) também é relevante em compostos como quinonas, índigo e carmim.

3.3.4 Pigmentos naturais versus artificiais

Antes do advento dos pigmentos sintéticos, os pigmentos naturais eram a única fonte de cor disponível e, por consequência, eram amplamente utilizados e comercializados, fornecendo uma importante fonte de criação de riqueza em diversas partes do mundo. Utilizados para fins diversos, além do seu uso como a coloração de fibras naturais (lã, algodão, seda), peles e couro, eles também foram utilizados na produção cosmética e pinturas para artistas (DANIELA, 2006).

A partir de meados de 1850, com a síntese da malva (o primeiro pigmento sintético), a prática de colorir alimentos tomou um impulso tão expressivo que o aspecto toxicológico dos corantes nem sempre era considerado. Em alguns casos, no entanto, existe razoável toxicidade, e desde 1971, o efeito cancerígeno de substâncias diversas no organismo humano vem sendo estudado (Nazaré, 2001).

Dúvidas crescentes concernentes à segurança de vários corantes artificiais vêm estimulando a sua substituição por corantes naturais (Kim et al., 1995). Alguns dos corantes artificiais, como azorubrina ou tartrazina, podem causar alergias (Multon, 1992, in Fabre, 1993); mesmo a lista de corantes artificiais permitidos vem diminuindo devido a novas informações sobre efeitos adversos de um ou outro corante. Há 9 corantes artificiais correntemente permitidos em medicamentos, alimentos e cosméticos (“FD&C colors”) nos EUA, dos quais dois têm uso restrito. Por outro lado, há 21 tipos de corantes naturais (dos quais cinco têm uso restrito), liberados para os mesmos usos. Esses corantes naturais são de fontes diversas: desde sucos de frutas e vegetais e extratos (como o de casca de uva, por exemplo), até caramelo, o corante mais usado (FDA, 1998).

A tabela na próxima página (Tabela 1) mostra os corantes permitidos para alimentos segundo a legislação brasileira, pelo estabelecido na Resolução nº 4, da ANVISA, de 24 de novembro de 1988. Essa resolução foi adaptada em termos de quantidades permitidas de cada corante, por classe de alimento, através de resoluções posteriores de 1999, 2000 e 2001. (ANVISA, 2004).

Quadro 1 - Corantes de uso permitido em alimentos e bebidas no Brasil (BRASIL, 2018)

Corantes naturais	Corantes sintéticos idênticos aos naturais	Corantes artificiais
Açafrão	Beta-caroteno, Beta-apo- 8'-carotenal, Éster etílico do ácido Beta-apo-8'- carotenóico	Amarelo crepúsculo
Ácido carmínico		Azul Brilhante
Antocianinas		Bordeaux S ou Amaranto
Cacau		Eritrosina
Carmin		Indigotina
Carotenóides: α , β e γ -caroteno, bixina, norbixina, capsantina,		Ponceau 4R
capsorubina, licopeno		Tartrazina
Carvão vegetal		Vermelho 16.035
Clorofila, clorofilas e clorofilinas cúpricas e seus sais		
Choconilha		
Cúrcuma, Curcumina		
Hemoglobina		
Índigo		
Páprica		
Riboflavina	Riboflavina e riboflavina – 5 – fosfato de sódio	
Urucum		
Urzela: orceína, orceína sulfonada		
Vermelho de beterraba		
Xantofilas: cantaxantina, criptoxantina, flavoxantina, luteína, rodoxantina, rubixantina, violaxantina	Xantofilas: cantaxantina, criptoxantina, flavoxantina, luteína, rodoxantina, rubixantina, Violaxantina	

A análise do Quadro 1 mostra que a legislação brasileira permite o uso de diversos pigmentos naturais, mas é bastante restritiva com relação aos artificiais, com apenas 8 pigmentos artificiais liberados para uso em alimentos.

Após a introdução dessa classe de pigmentos em 1856 (Tabela 1), a popularização do uso dos pigmentos sintéticos cresceu gradativamente pela conveniência atrelada ao seu baixo custo (ZOLLINGER, 1991). Os pigmentos orgânicos de origem natural, por sua vez, quase foram completamente substituídos pelas moléculas sintéticas. As aplicações atuais de pigmentos sintéticos estão na indústria têxtil, indústria de curtimento de couro, produção de papel, tecnologia de alimentos, pesquisa agrícola, células eletroquímicas fotográficas e corantes capilares (CHIDAMBARAM, 2013).

Tabela 1. Histórico dos estudos dos pigmentos

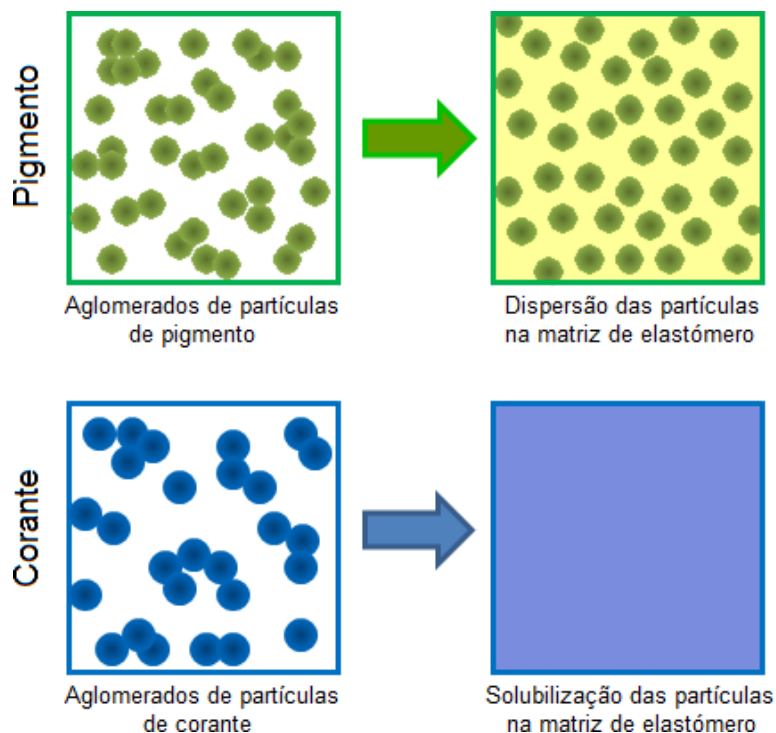
Ano	Desenvolvimento
1856	O pigmento malva de Perkin foi descoberto e os corantes de coaltar foram sintetizados
1884	<i>Monascus</i> sp. Foi tradicionalmente cultivada e utilizada no oriente para fazer vinho de arroz vermelho, vinho vermelho shaohsing e arroz chinês vermelho
1902	Investigação do pigmento de <i>S. marcescens</i> e atribuição de nome prodigiosina
1954	O primeiro pigmento carotenóide de <i>Cryptococcus</i> foi comercializado
1960	Confirmação da estrutura de prodigiosina por síntese química
1963	Produção de pigmentos carotenóides de <i>Rhodotorula</i> sp. Começado
Início da década de 1970	A astaxantina foi isolada de <i>Phoffia rhodozyma</i> (em homenagem ao Prof. Herman Jan Phaff) cultivada em exsudados de árvores de folha caduca no Japão e no Alasca
Final da década de 1970 e início da década de 1980	Produção de betacaroteno de <i>Dunaliella salina</i>
1985	A Betatene Limited Corporation foi criada para o cultivo de <i>Dunaliella salina</i> em grande escala para a produção de produtos naturais de betacaroteno

Fonte: (CHIDAMBARAM et al., 2013; WILLIAMSON et al., 2006)

No Brasil, segundo a ABIQUIM (Associação Brasileira de Química), o mercado de importações relacionado a corantes e pigmentos movimentou, em 2007, cerca de 515 bilhões de dólares. (ABIQUIM, 2010). Sabe-se que o destaque atribuído aos compostos sintéticos na indústria de alimentos desde as últimas décadas, deve-se à escassa disponibilidade e ao alto preço dos produtos naturais. Entretanto, como consequência dos efeitos toxicológicos cientificamente comprovados de alguns compostos sintéticos, a busca por produtos naturais tem ganhado cada vez mais importância, despertando o interesse de estudiosos para a busca de fontes naturais de corantes e pigmentos (SOWBHAGYA, 2010; LI, 2009).

Apesar de serem considerados como sinônimos em casos particulares, os pigmentos e os corantes apresentam diferenças fundamentais ligadas à sua solubilidade no meio em que estão aplicados, uma vez que os corantes são solúveis e os pigmentos se apresentam insolúveis (Figura 2). Ambos são compostos aditivos utilizados para conferir cor aos materiais, no entanto, do ponto de vista biológico, os pigmentos são compostos químicos que conferem cor a quase todo o tipo de células dos seres vivos. (ATKINS, 2006)

Figura 4: Esquema representativo da natureza química diferenciada entre corantes e pigmentos em interação com uma matriz de elastômero.



Fonte: http://ctborracha.com/?page_id=1688

A solubilidade de um determinado colorante, por sua vez, está condicionada a dois importantes fatores: a presença de grupos funcionais em sua estrutura química que pode culminar em diferenciações entre corantes e pigmentos, e consequentemente a sua interação molecular com determinado polímeros. Isso explica o porquê de um mesmo colorante se apresentar como pigmento para um determinado polímero e como corante para outro (SARON; FELISBERTI, 2006).

A pesquisa e a produção de corantes e pigmentos de composição natural, bem como a sua comercialização, aumentou exponencialmente após a proibição do uso de corantes sintéticos na indústria alimentar e farmacêutica, oficializada pelos órgãos ligados a vigilância sanitária. (FURTADO, 2004). A utilização de corantes naturais tem aumentado nos últimos anos em decorrência das propriedades tóxicas dos pigmentos sintéticos e seus subprodutos para o meio ambiente e o homem, podendo desencadear processos alérgicos e até mesmo levar ao desenvolvimento de tumores (KONGRUANG, 2011).

Essa produção de pigmentos naturais pode ser viabilizada por meio de processos fermentativos utilizando diferentes espécies de Micro-organismos. No caso das bactérias, os biopigmentos podem ser excretados pelas células e/ou armazenados em seu interior, a exemplo de *Serratia*, produtora de pigmentos de interesse biotecnológico (HADDIX; WERNER, 2000).

Os pigmentos naturais são metabólitos oriundos de organismos vivos como plantas, bactérias e fungos. Os corantes de origem microbiana, também denominados de biocorantes, estão diretamente relacionados à diversidade bioquímica destes organismos, uma vez que estes podem estar sujeitos a constantes interações metabólicas e ambientais e com isto podem originar novos metabólitos secundários de importância biotecnológica. Os biocorantes apresentam uma grande variedade não apenas em relação a estrutura química mas também pela gama de cores que podem ser produzidos, das quais podemos destacar indigo, melaninas, flavinas, carotenóides, fenazinas, quinonas, violaceína e prodigiosinas (KRAMAR et al., 2014; EBINUMA, 2013; MENDONÇA, 2011).

Pigmentos de origem microbiana representam uma promissora alternativa em relação a outros aditivos extraídos de vegetais uma vez que não apresentam problema de sazonalidade. Entre os pigmentos microbianos, podemos citar os pigmentos produzidos por *Serratia*, como a prodigiosina e compostos carotenóides.

A produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* depende da influência de vários fatores como sais inorgânicos, fonte carbono e nitrogênio. O pH e temperatura também são influenciados diretamente na produção de prodigiosina. A temperatura ótima de crescimento da bactéria é de 30 a 37°C, contudo a faixa de temperatura para detecção de pigmentos pode variar de 26 a 30 °C.. A literatura descreve que o pigmento se forma em uma faixa relativamente pequena de temperatura (12 a 36°C), quando comparada com a ampla faixa de temperatura de crescimento da bactéria, de (4 a 42°C). Contudo, a temperatura ótima para *S. marcescens* é de 30 a 37°C, e a requerida para o aumento da pigmentação é entre 27 a 30°C (CANTELICE, 2014).

O pigmento vermelho, prodigiosina, apresenta excelente atividade biológica com ação antifúngica, antibacteriana, antitumoral, antimalárico (NAKASHIMA et al., 2006, MORAES, 2009).

3.3.5 Aplicações na indústria de alimentos

A alimentação, além de necessária à saúde, é uma fonte de prazer. A idéia de consumo dos produtos dá-se, primeiramente, pela visão; alimentos coloridos, vistosos, são muito mais atraentes para o consumidor, e essa cor deve-se, sobretudo, ao uso de corantes. A cor é associada a muitos aspectos de nossa vida, influenciando nossas decisões, sobretudo as que envolvem os alimentos. A aparência, segurança, aceitabilidade e características sensoriais dos alimentos são todas afetadas pela cor. Embora esses efeitos sejam associações inerentes às características psicológicas, eles interferem na escolha dos produtos. Dentre as estratégias das indústrias para enriquecimento e favorecimento do produto que é processado, o corante exerce um efeito estimulante no apetite do consumidor (Malik *et al.*, 2012).

A cor é uma propriedade importante dos alimentos, e a natureza nos ensina cedo a esperar certas cores em determinados alimentos. Nossa aceitação de alimentos no futuro acaba dependendo grandemente dessa expectativa. No entanto, diversos fatores como sazonalidade, armazenamento e efeitos de processamento podem alterar a cor de um alimento, o que requer que um fabricante adicione corantes para satisfazer a expectativa dos consumidores. (FDA, 1998):

- reforçar a cor perdida devido à exposição à luz, ao ar, e a extremos de temperatura, umidade e condições de armazenamento.
- corrigir variações naturais da cor (embora mascarar qualidade inferior seja inaceitável).
- reforçar cores que ocorrem naturalmente, mas em níveis menores do que aqueles associados a um determinado alimento.
- conferir cor a alimentos que, de outra forma, seriam quase incolores.
- conferir cores vivas a alimentos “divertidos”, como doces festivos.
- proteger aromas e vitaminas que podem ser afetados pela luz do sol durante o armazenamento.
- fornecer uma variedade atrativa de alimentos ao consumidor.

3.3.6 Aplicações na indústria têxtil

A indústria têxtil produz e usa aproximadamente 1,3 milhão de toneladas de corantes, pigmentos e precursores de tintas, com valor aproximado de US \$ 23 bilhões, quase todos fabricados sinteticamente. No entanto, os corantes sintéticos têm algumas limitações, principalmente: (i) o processo de produção exige produtos químicos perigosos, criando preocupações com a segurança do trabalhador, (ii) podem gerar resíduos perigosos, e (iii) esses corantes não são amigáveis com o meio ambiente (CHADNI *et al.*, 2017).

Até a segunda metade do século XIX, todos os corantes utilizados nos têxteis eram naturalmente derivados. No entanto, com a síntese de malvaína por Perkin em 1856, a indústria de corantes sintéticos cresceu a uma taxa vigorosa e quase totalmente erradicada pelo uso de corantes naturais. O grande número de corantes sintéticos em uso hoje testemunha a criatividade e a inovação dos químicos têxteis para satisfazer com sucesso as demandas dos corantes para processos de aplicação simples e reprodutíveis e a demanda do consumidor por produtos de qualidade a um preço razoável (OGUGBUE AND SAWIDIS, 2011).

A biossíntese de corantes (corantes naturais) para aplicações têxteis atraiu maiores interesses nos últimos anos. Os corantes atualmente utilizados são quase exclusivamente feitos de recursos não renováveis, como o óleo fóssil. A produção dos corantes sintéticos é economicamente eficiente e tecnicamente avançada com cores que cobrem todo o espectro de cores. No entanto, os corantes sintéticos enfrentam os seguintes desafios: dependência de recursos de petróleo não renováveis e sustentabilidade da operação atual, toxicidade ambiental e preocupações com a saúde humana de alguns corantes sintéticos. Assim, a biossíntese de pigmentos através de processos de fermentação pode servir como principais cromóforos para modificações químicas adicionais, o que pode levar a corantes com um amplo espectro de cores (Poorniammal *et al.*, 2013).

Praticamente, a fermentação de microorganismos como fungos e bactérias pode ser uma fonte valiosa de corantes de fabricação. Os Micro-organismos produzem uma grande variedade de pigmentos estáveis, como carotenóides, flavonóides, quinonas e rubraminas, e a fermentação tem maiores rendimentos em pigmentos e menores resíduos em comparação com o uso de plantas e animais. Além disso, alguns corantes naturais, especialmente compostos de tipo

antraquinona, mostraram atividade antibacteriana notável além de fornecer cores brilhantes, que poderiam servir como corantes funcionais na produção de têxteis antimicrobianos coloridos (SHIRATA *et al.*, 2000).

Alihosseini *et al.* caracterizaram a prodigiosina do pigmento vermelho brilhante de *Vibrio* spp. e sugeriu que poderia ser usado para colorir muitas fibras, incluindo lã, nylon, acrílicos e seda. Yusof relatou a capacidade de usar pigmento de *S. marcescens* para colorir cinco tipos de tecidos, a saber, acrílico, poliéster microfibra, poliéster, seda e algodão usando tamarindo como mordente. No entanto, os desempenhos de tintura são diferentes, dependendo dos tipos de fibra. A partir dos testes de resistência à cor, os tecidos tingidos também têm a capacidade de manter sua cor sob várias condições externas, como transpiração, lavagem e fricção / crocking. Também foi relatada capacidade similar de tingimento têxtil para *Janthinobacterium lividum* e pigmentou bem quando aplicada em seda, algodão e lã (púrpura azulado, todas as fibras naturais) e nylon e vinylon (azul escuro, ambas as fibras sintéticas). O tingimento foi realizado por um procedimento simples consistindo em mergulhar no extracto de pigmento ou em ebulição com as células bacterianas. A variação de cor foi conseguida alterando o tempo de imersão e a temperatura do banho de tintura.

3.3.7 Aplicações na indústria farmacêutica

A maioria dos estudos que investigam Micro-organismos mostrou a eficácia e as potenciais aplicações clínicas de metabolitos secundários pigmentados no tratamento de várias doenças e também possuem certas propriedades como antibióticos, anticancerígenos e compostos imunossupressores. Registaram-se progressos significativos neste campo, e as investigações de compostos bioativos produzidos por esses micróbios estão aumentando rapidamente. Como tal, o número de compostos isolados das bactérias está aumentando mais rápido quando comparado com outras fontes (MANIKPRABHU AND LI, 2015).

As antocianinas estão envolvidas em uma ampla gama de atividades biológicas que afetam positivamente as propriedades da saúde e diminuem o risco de câncer, reduzem o insulto inflamatório e modulam a resposta imune (Malik *et al.*, 2012).

O gênero *Streptomyces* ou *Serratia* pode produzir uma substância vermelha do esqueleto de pirrolyppromethene, que é uma das seguintes substâncias: prodigiosina, metacicloprodigiosina, desmetoxi prodigiosina e prodigiosina 25-C. Estas substâncias sabem ter um efeito antibiótico e antipalúdico, especialmente a prodigiosina 25-C que mostra atividade imunossupressora. A atividade imunossupressora da prodigiosina foi descrita pela primeira vez por Nakamura e colegas de trabalho em 1989. Essas pesquisas mostraram a presença de prodigiosina e metacicloprodigiosina em caldo de cultura de *Serratia* e observou a inibição seletiva da proliferação policlonal de células T em comparação com a das células B. Além disso, a potência citotóxica da prodigiosina também foi investigada nos painéis de células celulares padrão de células tumorais humanas derivadas de câncer pulmonar, cólon, renal, ovário, cerebral, melanoma e leucemia. A inibição da proliferação celular, bem como a indução de morte celular, foram observadas nessas linhas celulares. A atividade anticancerígena in vitro também foi relatada para diferentes análogos de prodigiosina e derivado de indole sintético de prodigiosina. Os efeitos antiproliferativos e citotóxicos da prodigiosina foram observados não apenas em linhas de células tumorais cultivadas, mas também em células de câncer primárias humanas de pacientes com leucemia linfocítica crônica de células B. O uso de prodigiosina para o tratamento de diabetes mellitus também foi relatado por Hwanmook et al. onde a prodigiosina foi considerada um componente ativo para prevenir e tratar diabetes mellitus (Umadevi and Krishnaveni, 2013).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos descritos nesse trabalho foram realizados no Laboratório de Genética de Micro-organismos (LABGEM) do Departamento de Antibióticos – UFPE.

3.1 Micro-organismo

A linhagem de Micro-organismo utilizada foi a de *Serratia marcescens* UFPEDA 223, bacilo Gram-negativo obtido da Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE.

Taxonomia: Proteobacteria, Classe Gammaproteobacteria, Ordem Enterobacteriales, família Enterobacteriaceae.

3.2 Reativação do Micro-organismo

A linhagem selecionada foi cultivada nos diferentes meios: Caldo BHI, Caldo TSB e Caldo Nutritivo (ANEXO A). A reativação das cepas foram realizadas sob cultivo em tubos inclinados contendo Ágar Nutritivo, devidamente esterilizados. Foram efetuados repiques mensais para a manutenção das cepas e, em seguida ao repique, foram incubadas à temperatura ambiente (28 °C) por 48 horas. As culturas repicadas foram conservadas em refrigerador à 4° C para posterior utilização.

3.3 Produção e detecção da produção de pigmento

A linhagem de *Serratia marcescens* UFPEDA 223 foi cultivada em diferentes meios líquidos de fermentação para selecionar o melhor meio de cultivo para a produção de pigmentos avermelhados. A suspensão bacteriana foi preparada em tubo de ensaio, homogeneizadas em solução salina (0,9%) e ajustada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm, o qual é equivalente a 10^8 UFC/mL. Para o preparo do pré-inóculo, com auxílio de uma pipeta automática e ponteiras esterilizadas, 500 uL da suspensão de *S. marcescens* foram transferidos para frascos erlenmeyer (250 mL) contendo 50 mL do meio Caldo Nutritivo e

mantidos sob condição estática à 28°C por 24 horas. Após este período, 5 mL deste pré-inóculo foi transferido para erlenmeyer (250mL), contendo 50 mL de meio líquido para fermentação por 48 horas à 28° C. Os meios utilizados foram Caldo BHI, Caldo Nutritivo e Caldo TSB. Para cada meio de cultura, foram testadas as condições de fermentação sem agitação (E) e com agitação à 150 rpm (A). O teste foi realizado em triplicata.

3.4 Determinação da concentração celular

Para a análise do crescimento celular, *S. marcescens* foi submetida às mesmas condições citadas anteriormente no item 4.2.2, selecionando o meio TSB para o cultivo e sem agitação. Para determinação da curva de crescimento, foram adotados os seguintes pontos: 0h, 6h, 12h, 24h, 36h, 48h, 60h e 72 horas. As fermentações foram realizadas em triplicatas. Os cultivos foram mantidos a 28°C.

A biomassa foi quantificada mediante gravimetria, utilizando 50 mL do líquido fermentado que foi centrifugado em tubos falcon por 10 min. à 14.645 g. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e a massa celular foi resuspendida em água destilada esterilizada e submetida à uma segunda centrifugação pra retirada de componentes residuais. Após, o conteúdo celular foi separado por inversão lenta. A concentração celular foi obtida pelos pesos da biomassa úmida e calculados em g/L.

3.5 Extração e avaliação do pigmento

Para extração dos pigmentos avermelhados, foi utilizado acetona na proporção de 1:3 (m/v) ao conteúdo celular. Em seguida, a mistura foi agitada em vortex e deixada em repouso à temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente, o conteúdo foi centrifugado a 14.645 g por 5 min. para sedimentação celular, e o solvente com os pigmentos extraídos foram levadas às análises espectrofotométricas.

Os pigmentos vermelhos foram quantificados em Espectrofotômetro UV-VIS - 200 a 1000 - Série 2000, no intervalo de comprimentos de onda de 400 nm a 600 nm. Os resultados foram dados em unidade de absorbância (AU).

Para a determinação da concentração de pigmentos, foi definido por Hajjaj et al. (1998), que 1 unidade de absorbância UA_{480} corresponde a 15 mg.L^{-1} de pigmento.

3.6 Parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos foram realizados de acordo com Meinicke, 2008.

A produtividade máxima em células ($P_{\text{células}}$) foi calculada pela diferença entre a maior concentração celular (biomassa) em um instante t e a concentração celular (biomassa) inicial dividida pelo intervalo de tempo correspondente, conforme Equação 3.1.

$$P_{\text{células}} = \frac{(X_{\text{max}t}) - (X_{t_0})}{t - t_0} \quad 3.1$$

Sendo:

$P_{\text{células}}$: produtividade máxima de crescimento (formação de células) no instante de tempo $(t - t_0)$ (g.h^{-1});

$X_{\text{MÁX}t}$: máxima formação de biomassa no instante de tempo t ; X_{t_0} : formação de biomassa no tempo t_0 ;

t : tempo para atingir o valor máximo biomassa; t_0 : tempo inicial do cultivo.

A produtividade máxima de pigmentos foi calculada pela diferença entre a maior concentração de pigmentos (UA) em um instante t e a concentração inicial de pigmentos dividida pelo intervalo de tempo correspondente, conforme Equação 3.2.

$$P_M = \frac{(UA_{\text{max}t}) - (UA_{t_0})}{t - t_0} \quad 3.2$$

Sendo:

P_M : produtividade máxima de formação de pigmentos no instante de tempo $(t - t_0)$
 $(UA \cdot h^{-1})$;

UA_t : máxima quantidade de pigmento no instante de tempo t ; UA_{t_0} : quantidade de pigmento no tempo t_0 ;

t : tempo para atingir o valor máximo de UA ; t_0 : tempo inicial do cultivo.

3.7 Planejamento Fatorial

Após o estabelecimento das condições de meio, tempo e agitação, nova fermentação foi executada seguindo um delineamento fatorial cujas variáveis estudadas foram: pH e Temperatura, em três níveis de variação (3^2), conforme a Tabela 2. Os valores escolhidos para o nível 0 desse teste tomaram como base os valores iniciais de sua produção. Neste ensaio foram utilizados dez frascos com meio de cultura onde foi evidenciada a maior pigmentação, nove meios de cultivo mais a repetição do ponto central. Todos os ensaios realizados em triplicata.

Tabela 2 - Variáveis e níveis de variação do delineamento 3^2 .

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
pH	5	7	9
Temperatura ($^{\circ}$ C)	25	30	35

3.8 Isolamento e purificação do pigmento

Após a avaliação das variáveis na produção de pigmento, foi realizada uma fermentação em larga escala utilizando 6 frascos de fernbach de 2.800 mL de capacidade com 560 mL de TSB. O pH do meio foi ajustado para 5 e o tempo total de fermentação foi 60 horas. No total foram produzidos 3.360 mL de líquido fermentado. Para a extração do pigmento, seguiram-se as mesmas etapas citadas

anteriormente no item 3.5.3. A mistura de solvente e pigmento foi submetida à rotaevaporação e armazenada sob abrigo de luz em refrigerador à 4° C para posterior utilização.

O extrato foi solubilizado em 3 mL de metanol conforme Nakashima et al., (2006), e submetido à cromatografia em camada delgada analítica (Placa preparativa) usando sílica gel (Merck) como adsorvente. As frações coletadas posteriormente, foram submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD) para determinação do valor de referencia (Rf) das amostras e identificação. O valor de referência da amostra foi calculado segundo a fórmula ($R_f = ds / dm$) com base nas distâncias percorridas pelo solvente (ds) e do soluto (dm) segundo Chaves et al., (1997). As amostras foram aplicadas sobre folhas de alumínio revestidas por sílica gel, em seguida colocadas em cubas de vidro contendo o sistema de solvente metanol: clorofórmio: acetona (2:3: 4 v/v). O valor de referência da amostra foi comparado com o Rf da prodigiosina padrão (Sigma).

A cromatografia em camada delgada analítica (Placa preparativa) foi realizada em cromatoplasmas de sílica sobre suporte de alumínio da Merck. As placas preparativas utilizadas foram preparadas com sílica gel 60 PF₂₅₄ (5 - 40 m) da Merck. Estas placas foram preparadas dispersando-se uma suspensão de sílica gel em água destilada sobre placas de vidro de 20 x 20 cm, utilizando-se o espalhador da "Quickfit". A espessura das placas de sílica gel foi de 1,00 mm. Essas cromatoplasmas foram preparadas usando 50 g de sílica gel e 150ml de água destilada. Para as colunas cromatográficas foi utilizado como suporte sílica gel 60 (60 -200 m) da Merck. As revelações dos cromatogramas analíticos foram efetuadas com irradiação no ultravioleta (254 e 356 nm).

3.9 Atividade antimicrobiana da prodigiosina (Teste de Difusão em Ágar)

A atividade antimicrobiana da prodigiosina foi determinada frente às linhagens *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 416, *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Staphylococcus aureus* (Meticilina Resistente) UFPEDA 691 e *Enterococcus faecalis* UFPEDA 69, segundo o método de difusão em Ágar. As suspensões de micro-organismos foram obtidas pela adição do inóculo microbiano a solução salina a 0,9% esterilizada. A suspensão do microorganismo teste foi ajustada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm, o qual

é equivalente a 10^8 UFC/mL. Após preparada, a suspensão de micro-organismo foi colocada em um frasco de 250 mL contendo 120 mL de Ágar Mueller-Hinton a 0,5% fundido, previamente preparado, possibilitando a homogeneização da mistura. Em placas de Petri (20 x 100 mm) contendo 10 mL de Ágar Nutritivo, ocorreu a distribuição dessa mistura com ponteiros estéreis vertidas em pontos equidistantes sobre o meio, de modo a demarcar cada poço das diferentes concentrações a serem testadas. Após resfriamento, à temperatura ambiente, e solidificação do meio, as ponteiros foram retiradas e foram inoculados em cada poço, 25 μ L das amostras de extrato bruto nas concentrações de 1000, 500, 250, 125 e 62,5 mg/mL. Adicionalmente, foi realizado um controle negativo utilizando somente acetona para a verificação de sua interferência nos resultados. As placas foram incubadas a 37°C por 24h. Após o período de incubação realizou-se a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para resultados quantitativos.

3.10 Atividades Imunomodulatórias

4.10.1 Isolamento dos Esplenócitos

Todo procedimento experimental foi realizado de acordo com a metodologia de Melo et al. (2011). Após a eutanásia dos camundongos, por deslocamento cervical, foi realizado a remoção do baço assepticamente e colocado em tubo Falcon, contendo meio RPMI 1640 com Soro Fetal Bovino (SFB). Em fluxo vertical, os baços foram transferidos para placas de Petri contendo meio preparado, onde foram macerados para obtenção das suspensões celulares. As suspensões foram transferidas para tubos Falcon, contendo cerca de 10mL do meio incompleto. O homogenato dos baços macerados sobrepostos em um camada Ficoll-Paque TM Plus, com a densidade ajustada a 1.076 g/mL, foram centrifugados em temperatura ambiente em 500 g por 25 min. A interface da camada de células, que contém células do sistema imunológico, foi recuperada com uma pipeta Pasteur, lavada duas vezes em tampão fosfato salino (PBS) e centrifugada a 500 g por 10 min. As células foram quantificadas em câmara de Neubauer, e a viabilidade celular determinada pelo método de exclusão, utilizando o azul de tripan. As células utilizadas constaram viabilidade maior que 98%.

4.10.2 Avaliação da citotoxicidade através do ensaio de viabilidade celular

Análise de viabilidade celular foi realizada através de anexina V-FITC e iodeto de propídio. Os esplenócitos (10⁶ células) de cada animal, foram centrifugados a 4 °C em 450 g durante 10 min, o sobrenadante foi descartado e 1ml de PBS foi adicionado ao precipitado e centrifugado a 4 °C em 450 g durante 10 min, sendo descartado o segundo sobrenadante. O sedimento foi resuspenso em um tampão de ligação (10 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂ e 1.8 mM CaCl₂), e foi adicionado, a cada tubo de citômetro devidamente identificado, a anexina V conjugada com isotiocianato de fluorescência (FITC) (1:500) e o iodeto de propídio (PI, 20lg/ml; 10⁶ células). A citometria de fluxo foi realizada em um FACSCalibur (Beckton Dickinson Biosciences) e as análises realizadas utilizando-se o software CELL QUEST PRO (Beckton Dickinson). A análise dos resultados foram realizadas em gráficos dot plot, onde Anexina-FITC⁻/PI⁺ células consideradas células necróticas e Anexina-FITC⁺/PI⁻ representam esplenócitos na fase inicial de apoptose e duplo negativo considerado o dot plot de células viáveis.

4.10.3 Ensaio de proliferação com Carboxifluoresceína Diacetato Succinimidil Éster (CFSE).

Para o ensaio de proliferação celular foram utilizados esplenócitos de camundongos, cultivados para isolamento de células imunes (4.10⁶ células / poço) em placas de cultura de 96 poços (TPP, St. Louis, Suíça) a 37 °C e 5% de CO₂. O potencial mitogênico do pigmento através do CFSE foi avaliado após 24 h e 48 horas. As células foram transferidas para tubos de centrifugação de polipropileno de

15 ou 50 ml, e lavadas por duas vezes em DPBS 1X para remover quaisquer proteínas séricas residuais. O CFSE de estoque foi adicionado à suspensão de células, as quais foram suspensas em banho-maria a 37 °C durante 10-15 minutos. Em seguida foi adicionado o DPBS 1X nas células, o sobrenadante foi decantado e misturado suavemente para romper o sedimento celular, adicionou-se 10 mL de meio completo com FBS a 10% seguido de centrifugação. As células foram resuspendidas em meio completo e realizado a análise por citometria de fluxo.

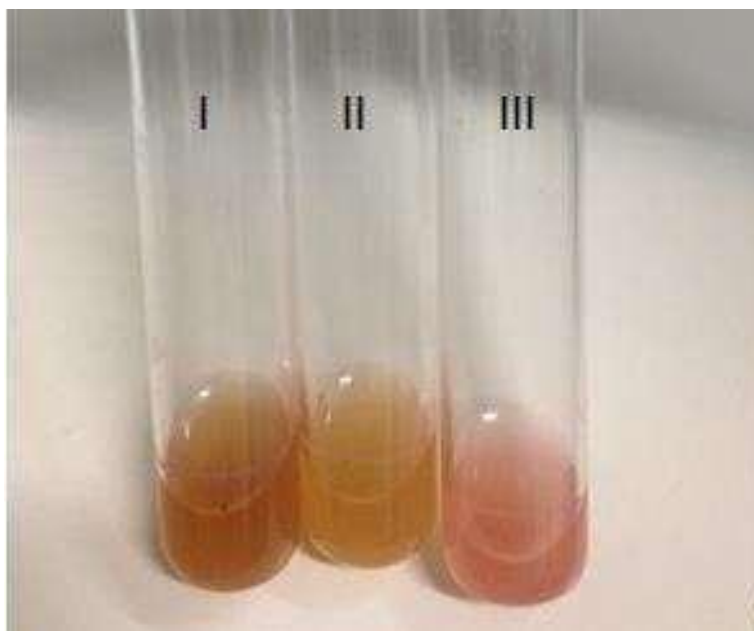
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Detecção da produção de pigmento

Nesta etapa foi avaliada a influência de diferentes meios de cultura na produção de pigmentos. Nos três meios estudados, TSB, BHI e Caldo Nutritivo (CN), foi possível observar a produção de pigmento por *S. marcescens* UFPEDA 223, contudo, visualmente é possível deduzir que houve uma maior pigmentação no caldo TSB e BHI, levando em consideração a coloração inicial dos meios utilizados (Figura 3). As leituras espectrofotométricas da produção de pigmento nos diferentes meios testados no período de 48 horas mostraram que não houve produção de pigmento quando submetidos à agitação.

O estudo da agitação em processos fermentativos também é indispensável para o estabelecimento das condições ideais para o crescimento do micro-organismo. Diversos autores relatam que o principal objetivo das condições de agitação é o suprimento de oxigênio aos micro-organismos através da dispersão de bolhas de ar, a manutenção das células em suspensão e o aumento das trocas de calor e massa no meio (NEVES, 2003).

Figura 5. Aspecto visual da produção de pigmento nos meios Tryptic Soy Broth, Caldo Nutritivo e Brain Heart Infusion, I, II e III respectivamente.



Fonte: O autor

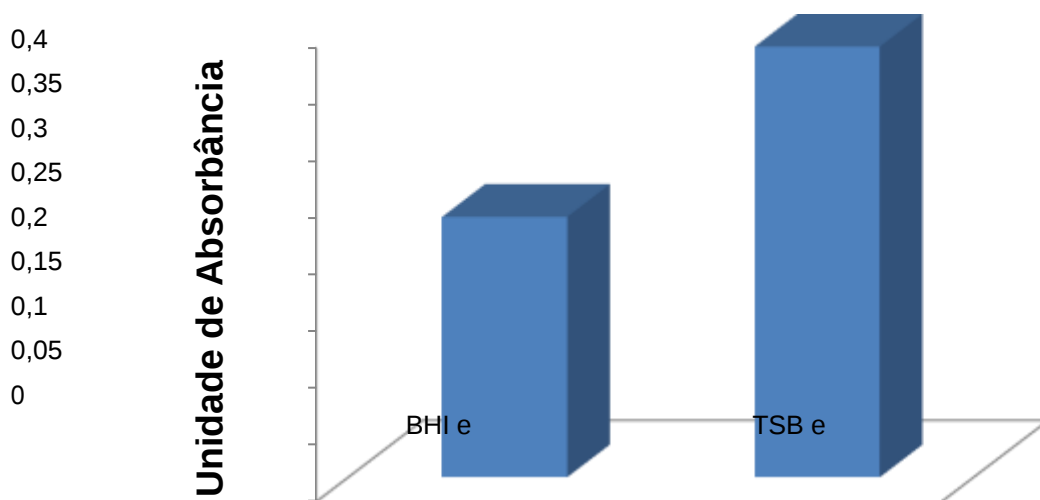
Os cultivos sem agitação apresentaram picos de absorção no comprimento de onda de 480 nm, mostrando uma maior produção no Caldo TSB, 0,38 UA, enquanto que no Caldo BHI foi de 0,23 UA (Gráfico 1). Em contrapartida, o Caldo Nutritivo não apresentou produção detectável, gerando resultado próximo de zero. Sendo assim, foi adotado o Caldo TSB para todos os processos fermentativos dos demais testes.

Isso pode ser explicado pelo fato de que apesar de todos os meios testados apresentarem fontes de Carbono, Nitrogênio e Vitaminas em sua composição, o Caldo TSB apresenta duas fontes de nitrogênio na composição e com isso favorecendo crescimento abundante do micro-organismo. E, ainda mais importante nesse sentido, é a concentração de glicose no meio (2,5 g/L), principal carboidrato utilizado pelos micro-organismos no processo de fermentação (Anexo A).

Os resultados dessas análises diferem dos resultados de Cruz Filho (2013), que relata que a agitação afeta positivamente na maior produção de pigmento, enquanto que no presente trabalho a agitação se apresenta como um fator desfavorável à produção desses pigmentos, uma vez que em todas as amostras cultivadas sob agitação não foram capazes de produzir pigmentos. Foi evidenciado neste trabalho que aumento de aeração interfere diretamente na produção do pigmento, desviando ou bloqueando a rota metabólica de produção do pigmento, explicando o fato de o micro-organismo obteve uma maior produção de pigmento na fermentação estática.

O ambiente possui uma importância especial na adaptação dos micro-organismos, visto que a presença de fontes de carbono e nitrogênio (C/N), aeração, agitação, microelementos, entre outros, são fatores limitantes ao seu crescimento. A escolha de um substrato apropriado possui um importante papel na execução de processos fermentativos, uma vez que a seleção de uma fonte C/N adequada ao metabolismo do micro-organismos é crucial para o seu desenvolvimento (OLIVEIRA, 2017).

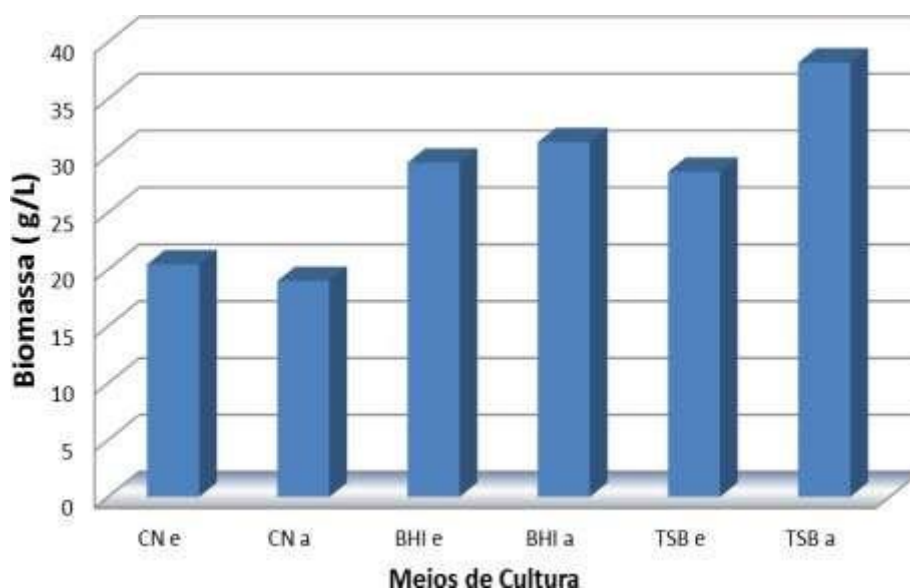
GRÁFICO 1: Produção de pigmentos representada em Unidade de Absorbância (UA) em 48 horas de fermentação nos diferentes meios testados, sem agitação (e).



4.2 Determinação da concentração celular e da produção de pigmento

De todas as condições testadas, aquela que obteve uma maior concentração celular foi o meio TSB com agitação, cujo valor foi 38,2 g/L. As menores concentrações de biomassa foram obtidas no Caldo Nutritivo, apresentando na fermentação com agitação o menor valor de biomassa, correspondente a 19 g/L, enquanto que a fermentação com agitação foi observado 20,4 g/L. (Gráfico 2).

Gráfico 2: Concentração de biomassa relacionada aos meios CN, BHI e TSB nas condições de fermentação estática e sob agitação (150 rpm).



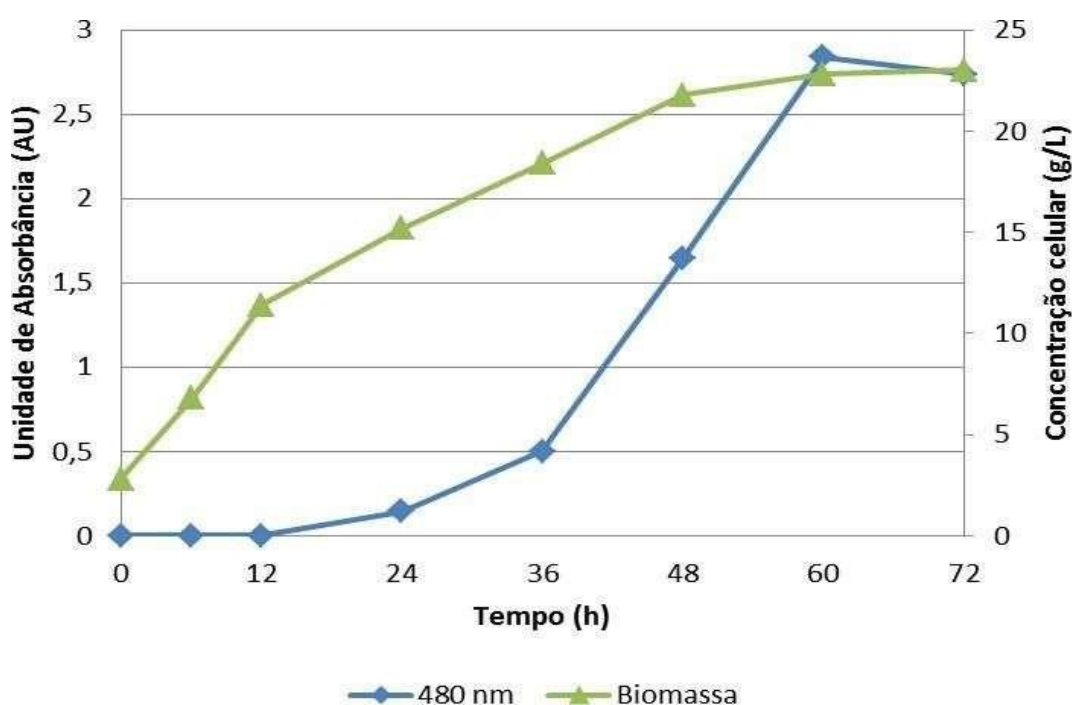
Legenda: e (Estático/Sem agitação); a (Agitação/150 rpm).

Embora o meio TSB com agitação tenha apresentado uma maior concentração de biomassa, na fermentação sem agitação, ainda que com menor volume celular (28,6 g/L), apresentou os melhores valores para a produção de pigmentos. Após definidos o melhor meio de cultura e a melhor condição de agitação, foi possível observar o crescimento de *S. marcescens* ao longo do tempo (Gráfico 3).

No intervalo de 0 a 60 horas é possível verificar sua rápida multiplicação celular, cujos picos de concentração dos pigmentos ocorrem no tempo de 60 horas, comprimento de onda de 485 nm, 2,84 AU, correspondendo a uma concentração de pigmento de 42,6 mg.L⁻¹.

Segundo Kobayashi e Ichikawa (1991), fatores como o tempo podem influenciar diretamente na produção de pigmento entre as diferentes cepas bacterianas. Isso pode ser observado ao verificar que os resultados deste trabalho discordam dos resultados de Lins (2010), cujo pigmento atingiu seu pico de produção em 24 horas e 48 horas de fermentação, respectivamente. Isso pode ser explicado pelo fato de que tais estudos utilizaram diferentes linhagens da mesma espécie, sendo assim, as exigências metabólicas de cada cepa são diferentes.

GRÁFICO 3: – Crescimento de *S. marcescens* relacionado à produção de pigmentos em 50 mL de TSB a 29 °C, sem agitação.



4.3 Planejamento Fatorial

O desenho fatorial foi usado para identificar o efeito principal de duas variáveis que afetam simultaneamente a produção de pigmento de *Serratia marcescens*, o pH e a temperatura. A prática convencional na otimização média de componentes e parâmetros, que permite testar uma variável de cada vez, é demorada e não permite a avaliação dos efeitos combinados de todas as variáveis envolvidas no processo de fermentação (ELKENAWY, 2017).

A cor dos pigmentos está associada à sua estrutura química, e a sua coloração em meio ácido ou básico dependerá justamente das modificações ocorridas na molécula do pigmento, quando o mesmo é submetido a diferentes valores de pH (RIBEIRO, 2008).

A temperatura é outro fator crítico para a produção de pigmentos. Segundo Wei (2006), os pigmentos são produzidos dentro de uma faixa de temperatura de 12 a 36 °C, enquanto que a faixa de temperatura de crescimento da bactéria é de 4 a 42 °C.

Os resultados do planejamento fatorial mostraram que a maior produção de pigmentos foi alcançada no cultivo 2, sob pH 5 e temperatura de 30 °C, cuja concentração de pigmento foi de 36 mg.L⁻¹ (Tabela 3). É possível observar ainda que o aumento da temperatura do processo fermentativo interferiu negativamente nessa produção, uma vez que os cultivos 3 e 9 foram o que apresentaram menores valores, 0,005 e 0,06167 UA, respectivamente.

Meinicke (2008) mostrou que o pH 6,5 favoreceu a produção de pigmentos vermelhos, com inibição da produção em pH ácido. O mesmo foi relatado por Vendruscolo (2009) que verificou a produção de pigmentos vermelhos em pH 5 e 6. Segundo Lins (2010), a faixa de temperatura de crescimento de *Serratia marcescens* é de 30 a 37 °C, no entanto, quando se leva em consideração a produção de pigmentos observa-se que a temperatura requerida para o aumento dessa produção é de 27 a 30 °C. Desse modo, os resultados obtidos para as variáveis Temperatura e pH, obtidos através do planejamento fatorial, estão em consonância com os citados na literatura para o melhoramento da produção de pigmentos produzidos por *S. marcescens*.

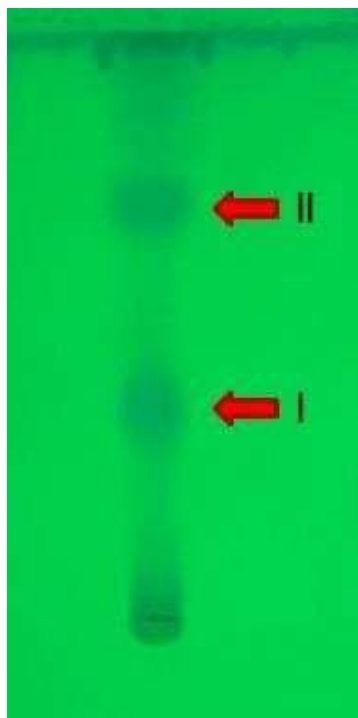
Temperatura e pH.

	Níveis		pH	Temperatura °C	Pigmentos vermelhos A ₄₈₀ (UA)	Concentração do pigmento (mg.L ⁻¹)	Produtividade e Máxima (UA.h ⁻¹)	Biomassa (g/L)
	pH	Temperatura						
Cultivo 1	(-1)	(-1)	5	25	1,825 (0,020)	27,37	0,030	31,46
Cultivo 2	(-1)	(0)	5	30	2,400 (0,025)	36	0,04	32,46
Cultivo 3	(-1)	(+1)	5	35	0,005 (0,025)	0,075	0,00008	30,80
Cultivo 4	(0)	(-1)	7	25	2,109 (0,035)	31,64	0,035	31,66
Cultivo 5	(0)	(0)	7	30	1,991 (0,023)	29,865	0,033	33,92
Cultivo 6	(0)	(+1)	7	35	1,276 (0,035)	19,14	0,021	16,12
Cultivo 7	(+1)	(-1)	9	25	2,190 (0,052)	32,85	0,036	27,20
Cultivo 8	(+1)	(0)	9	30	0,979 (0,011)	14,685	0,016	29,32
Cultivo 9	(+1)	(+1)	9	35	0,061 (0,020)	0,915	0,001	15,20
Cultivo 10	(0)	(0)	7	30	1,991 (0,025)	29,865	0,033	33,92

4.4 Análise cromatográfica do pigmento

O extrato de Acetona do pigmento foi submetido à cromatografia em camada delgada (CCD) e o resultado desse teste revelou 2 bandas (I e II), como pode ser observado no cromatograma apresentado na Figura 4, indicadas pelas setas vermelhas. É possível ainda visualizar que tanto no ponto de aplicação quanto na linha de chegada da fase móvel há presença de material. As cromatofolhas de alumínio CCD foram reveladas em câmara com lâmpada UV e os fatores de retenção (R_f) do teste foi R_{fI}= 0,36 e R_{fII}= 0,70.

Figura 6: Cromatografia em Camada Delgada (CCD) revelada em luz UV



Os resultados da CCD concordam com os dados da literatura. Vora et al (2014) em seu estudo, estudou a mesma estirpe bacteriana isolada de amostra de solo da área de Kharaghoda e verificou valores de R_f para o pigmento extraído de 0,64-0,96. Estudo similar, realizado por Cantalice (2010), encontrou diferentes frações para o pigmento produzido por *S. marcescens*; para a fração vermelha o R_f foi de 0,59, para a fração azul foi de 0,22.

Apesar desses resultados, não se pode ainda afirmar que o pigmento avermelhado produzido pela *S. marcescens* UFPE 223 trata-se de prodigiosina, pois é necessário concluir as etapas de caracterização química. Com a realização da placa preparativa foi possível observar, após revelações dos cromatogramas analíticos com irradiação no ultravioleta, a presença de algumas frações, das quais estão sendo realizadas as purificações para futuras análises de Ressonância Magnética Nuclear. Somente após concluída essas análises, poderemos confirmar se o pigmento em questão é de fato a prodigiosina, bem como realizar outros testes de atividade biológica.

4.5 Atividade Antimicrobiana

Os resultados da atividade antimicrobiana revelou que o pigmento apresentou sensibilidade para *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, com concentração mínima inibitória de 125 ug/mL. Estes resultados demonstram ser bastante promissores quando comparados com o antibiótico padrão Oxacilina (CMI 128 µg / mL).

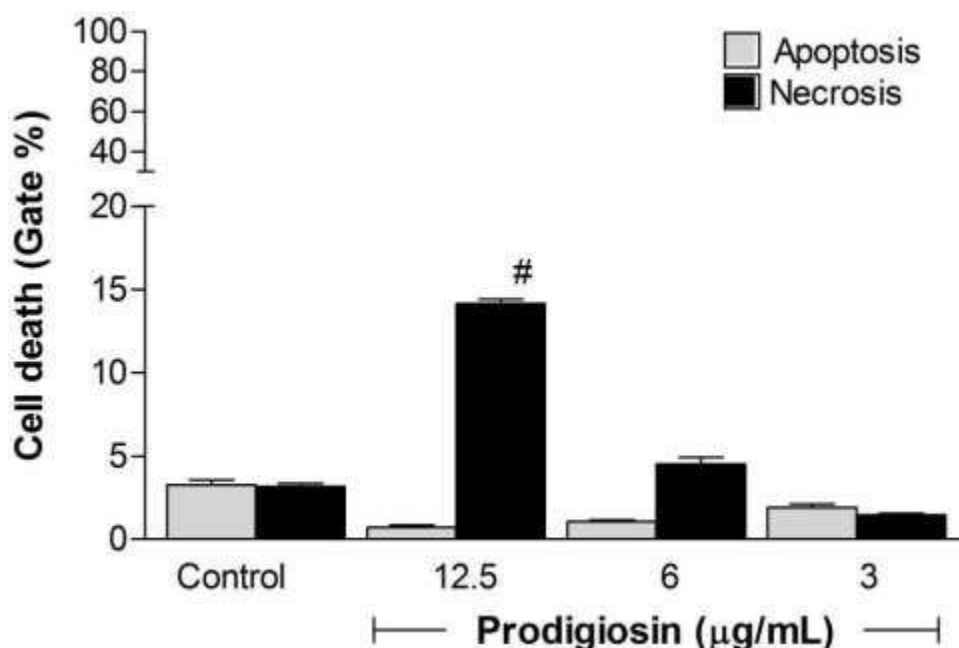
A avaliação da atividade antimicrobiana do pigmento permitiu a determinação da Concentração Inibitória Mínima levando em consideração a presença de halo de inibição de crescimento nos respectivos poços das diferentes concentrações testadas para o extrato acetônico do pigmento. A atividade antimicrobiana *in vitro* é avaliada pela mensuração da CIM que pode ser feita pela medição de halos ou pela determinação dos níveis de resistência, entretanto estes procedimentos não determinam o tempo de ação sobre os micro-organismos (May et al., 2000) e faz com que outros parâmetros farmacodinâmicos possam ser usados para determinar a eficácia antibacteriana, como por exemplo a cinética bacteriana (Mackenzie et al., 2002).

Os recentes avanços na identificação e compreensão dos novos mecanismos de ação dos antimicrobianos mostram que diversos fatores podem ser responsáveis pela potência de determinada substância, contribuindo de maneira diferenciada para a atividade antimicrobiana (Catão, 2007).

4.6 Avaliação da citotoxicidade através do ensaio de viabilidade celular

Os ensaios *in vitro* deste estudo tiveram por objetivo avaliar o perfil citotóxico e imunomodulador do pigmento produzido por *S. marcescens* UFPEDA 223 frente à esplenócitos de camundongo Balb/c. Nos ensaios de citotoxicidade, o pigmento avermelhado na concentração de 12,5 ug/mL se mostrou altamente tóxico, cuja população linfocitária se apresentou necrótica (Gráfico 4). No entanto, não exibe um perfil tóxico às concentrações de 6 e 3 µg/mL, garantindo assim a segurança experimental das concentrações escolhidas para os ensaios de proliferação no presente estudo.

Gráfico 4 - Teste de morte celular em células do baço de camundongo utilizando anexina V e Iodeto de Propídio. Para o controle, foi testada a suspensão de células sem a adição de pigmento. Barras verticais significam a média dos experimentos realizados em triplicata.



A utilização de células do sistema imune é essencial para estudo de atividades imunomodulatórias. Estas células são utilizadas com o intuito de simular processos *in vivo* que ocorrem quando qualquer substância é capaz de se ligar a sublinhagens linfocitárias específicas do hospedeiro. Esses ensaios podem ser utilizados para análises de viabilidade celular, proliferação celular e atividade citotóxica (MELO et al., 2010).

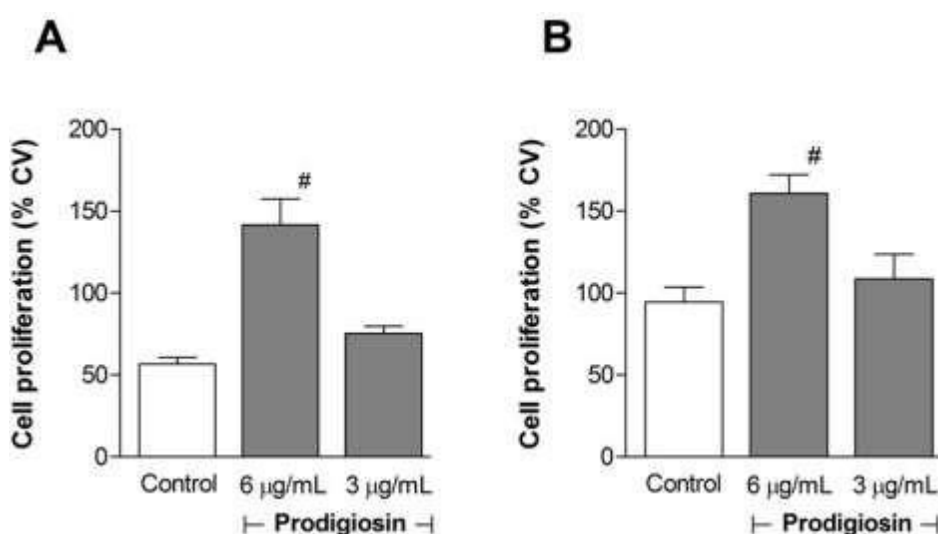
O ensaio de morte celular foi realizado para analisar o tratamento com o extrato acetônico da *S. marcescens* frente à esplenócitos de camundongo e determinar os valores de viabilidade dessas células em diferentes concentrações do extrato. Anexina V é uma proteína utilizada para marcação de células apoptóticas, ao conjugar a Anexina V ao FITC (isotiocianato de fluoresceína) é possível identificar e quantificar as células apoptóticas em citometria de fluxo. O marcador nuclear fluorescente Iodeto de Propídio (PI) é utilizado para marcar células necróticas. Corar células simultaneamente com Anexina V-FITC e com PI é possível a distinguir qual o perfil de morte apresentado pelas células experimentais (STURM et al., 2006).

Nosso estudo discorda com os achados de Cantalice (2014) que também analisou, quanto à citotoxicidade, o pigmento produzido por *S. marcescens* e seus resultados apresentaram perfil de dano celular à linhagens de células tumorais em concentrações menores que 6,0 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que no nosso estudo as células, apesar de serem esplenócitos saudáveis, se apresentaram viáveis nas mesmas concentrações.

4.7 Ensaio de proliferação celular com CFSE

Os resultados das estimulações nas concentrações que resultaram em células viáveis para o ensaio de citotoxicidade, exibidos na figura abaixo, mostraram que o pigmento produzido por *S. marcescens* foi capaz de estimular a resposta proliferativa nas populações celulares, porém a maior resposta mitogênica celular foi observada quando estimuladas pelo pigmento na concentração de 6,0 $\mu\text{g/mL}$ após 48 horas do início do estímulo.

Figura 5 - Atividade proliferativa induzida pelo pigmento avermelhado produzido por *Serratia marcescens*. Os esplenócitos receberam estímulo *in vitro* com o pigmento nas concentrações de 6 $\mu\text{g/mL}$ e 3 $\mu\text{g/mL}$, os índices de proliferação foram avaliados por incorporação do CFSE em 24 horas (A) e 48 horas (B). Os resultados foram expressos pelos índices de proliferação (PI).



A análise do potencial mitogênico induzido pelo pigmento em esplenócitos estimulados *in vitro* foi obtido através do ensaio de proliferação celular com CFSE. Esses ensaios concedem informações relacionadas à memória imunológica que

esses compostos-alvo são capazes de induzir em animais previamente inoculados e consistem um dos principais mecanismos para compreender a resposta imunológica das células imunes em relação a agentes estimulantes (MELO et al., 2011).

A carboxifluoresceína diacetato succinimidil Éster (CFSE) é utilizada para rotulagem *in vitro* e *in vivo* de células com o intuito de rastrear múltiplas gerações usando diluição de corante e análise por citometria de fluxo. O uso desta técnica gerou um grande interesse pelo rastreamento de células *in vivo* e também pelo rastreamento de sua atividade mitótica (FULCHER e WONG, 1999).

5 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo até o presente momento confirmam que a linhagem de *Serratia marcescens* UFPEDA 223 é produtora de pigmento vermelho. Apesar de desconhecida, ainda, a natureza química do pigmento em questão, as análises dos parâmetros avaliados até o presente momento permitiram selecionar as melhores condições visando uma maior produção de pigmento pela espécie. Deste modo, com base nos dados encontrados neste estudo, *S. marcescens* UFPEDA 223 mostrou-se promissora para a produção do pigmento avermelhado.

6 PERSPECTIVA

Sabe-se que o principal pigmento produzido por *S. marcescens* é a prodigiosina, no entanto, a estrutura química do pigmento produzido pela *Serratia marcescens* UFPEDA223 só será elucidada após o término dos testes de caracterização do composto, que encontram-se em processo de finalização.

REFERÊNCIAS

- ABDELHAFEZ, Ahmed A.; HUSSEINY, Sherif M.; ALI, Ali Abdel-Aziz; SANAD, Hala M. Optimization of β -carotene production from agro-industrial by-products by *Serratia marcescens* ATCC 27117 using Plackett–Burman design and central composite design, **Annals of Agricultural Sciences**; v. 61, n. 1, p. 87-96, 2016.
- ABIQUIM, Associação Brasileira da Indústria Química. **Corantes e Pigmentos**: Classificação. Disponível em: < http://abiquim.org.br/corantes/cor_historia.asp >. Acesso em: 12 out. 2010.
- ALEXANDER, RH; REICHENBACH, DD; MERENDINO, KA. *Serratia marcescens* endocarditis: a review of the literature and report of a case involving a homograft replacement of the aortic valve. **Arch Surg**; v. 98, p. 287-291, 1969.
- ANÍA, B. J. *Serratia*. Disponível em: < <http://emedicine.medscape.com/article/228495-overview#showall> >
- ATKINS, P. W; **Moléculas**. Tradução de Paulo Sergio Santos; Fernando Galembeck. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2006.
- Bioremediation and Detoxification of Synthetic Wastewater Containing riaryl methane Dyes by *Aeromonas hydrophila* Isolated from Industrial Effluent. Ogugbue CJ, awidis T **Biotechnol Res Int**. 2011; 2011():967925.
- BRASIL. CNNPA nº 44, de 1977. **Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos**, do Ministério da Saúde. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/44_77.htm =>. Acesso em: 11 de Fevereiro de 2018.
- C. GULANI , S. BHATTACHARYA , A. D. Avaliação dos parâmetros do processo que influenciam a produção melhorada de prodigiosina de *Serratia marcescens* e avaliação de seus potenciais antimicrobianos, antioxidantes e de tingimento.
- CANTALICE, Jeanne Cristina Lapenda Lins. **Avaliação da atividade antimicrobiana, citotóxica e efeitos genotóxicos da prodigiosina produzida por *serratia marcescens* ufpeda 398**. 2014. 216. f. Tese (Doutorado) - Curso de Doutorado, Ufpe, Recife, 2014.
- CATÃO, R.M.R. **Atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre bactérias e fungos leveduriformes** 126p. Tese (Doutorado - Área de Concentração em Farmacologia) - Departamento de Farmácia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.
- CHADNI Z., RAHAMAN M. H., JERIN I., HOQUE K. M. F., REZA M. A. Extraction and optimisation of red pigment production as secondary metabolites from *Talaromyces verruculosus* and its potential use in textile industries. **Mycology** 8 48–57. 10.1080/21501203.2017.1302013

CHIDAMBARAM KULANDAISAMY VENIL, ZAINUL AKMAR ZAKARIA, WAN AZLINA AHMAD, Bacterial pigments and their applications. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1065-1079, 2013.

CRUZ FILHO, Raimundo Felipe da. **Avaliação do potencial biotecnológico de pigmentos produzidos por bactérias do gênero Serratia isoladas de substratos amazônicos**. 2013. 41 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Duque de Caxias, 2013.

DANIELA CRISTEA, GERARD VILAREM. Improving light fastness of natural dyes on cotton yarn, **Dyes and Pigments**, v. 70, n 3, p. 238-245, 2006.

DING, M J, AND R P WILLIAMS. "Biosynthesis of Prodigiosin by White Strains of Serratia Marcescens Isolated from Patients." **Journal of Clinical Microbiology** ; v. 17, n. 3, p. 476–480, 1983.

DODSON, WH. Serratia marcescens septicaemia. **Arch Intern Med**; v. 121, p. 145-150, 1968.

Donnenberg MS. Enterobacteriaceae. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. **Princípios e Práticas de Doenças Infecciosas** . 7º. Philadelphia, Pa: Churchill Livingstone - Elsevier; v. 2, p. 2815-2833, 2010.

ENGEL HJ, COLLIGNON PJ, WHITING PT, KENNEDY KJ. Serratia sp. Bacteremia em Canberra, Austrália: um estudo populacional em 10 anos. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**; v. 28, n. 7, p. 821-824, 2009.

FURTADO, Marcelo. Corantes: Indústria de alimentos adere aos corantes naturais. **Química & Derivados**, 2004.

GIRI, A.V., N. ANANDKUMAR, G. MUTHUKUMARAN AND G. PENNATHUR. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from Serratia marcescens isolated from soil. **BMC Microbiology**, v. 4, n. 11, 2004.

GRIMONT, F AND GRIMONT, P.A.D. **The genus Serratia**. Springer, p. 219-244, 2006.

GUPTA N, HOCEVAR SN, MOULTON-MEISSNER HA, STEVENS KM, MCINTYRE MG, JENSEN B, et al. Surto de Serratia marcescens Infecções no sangue em pacientes que recebem nutrição parenteral preparada por uma farmácia compostora. **Clin Infect Dis**; 2014.

H. ZOLLINGER. **Color chemistry: syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments** (3rd edn.), Wiley-VCH, Zurich, 1991.

HADDIX, P. L.; WERNER, T. F. Spectrophotometric assay of gene expression: Serratia marcescens pigmentation. **Bioscene. St.Lois**, v. 26, n. 4, p. 3-13, 2000.

HAJJAJ, H.; P. J. BLANC, P. J.; GOMA, G. Sampling techniques and comparative extraction procedures for quantitative determination of intra- and extracellular metabolites in filamentous fungi. **Fems Microbiology Letters**, v.164, n.1, p. 195-200, 1998.

HEJAZI, A. AND F.R. FALKINER. *Serratia marcescens*. **J. Med. Microbiol.**, v. 46, p. 903-912, 1997.

JEHLIČKA, Jan; NĚMEC, Ivan; VARNALI, Tereza; CULKA, Adam; SVATOŠ, Aleš; FRANK, Ota; OREN, Aharon; EDWARDS, Howell G.M. The pink pigment prodigiosin: Vibrational spectroscopy and DFT calculations, **In Dyes and Pigments**: v. 134, p. 234-243, 2016.

KONEMAN, E. K. et al. **Diagnóstico Microbiológico**: Texto e Atlas colorido. 6o ed. São Paulo: Guanabara-Koogan, 2008.

LINS, Jeanne Cristina Lapenda. **Produção e caracterização de prodigiosina isolada de *Serratia marcescens* UCP 1549**. 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciência Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

MACKENZIE, F.M.; MILNE, K.E.; GOULD, I.M. Calculation of composite recovery time: a new pharmacodynamic parameter. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.50, p.281-4, 2002.

MALIK K., TOKKAS J., GOYAL S. Microbial pigments: a review. **Int. J. Microb. Res. Technol.** 1 361–365.

MANIKPRABHU D., LI W. J.. “**Antimicrobial agents from actinomycetes Chemistry and applications,**” in **Antimicrobials Synthetic and Natural Compounds**, eds Dhanasekaran D., Thajuddin N., Panneerselvam A., editors. (Boca Raton, FL: CRC Press;), 99–116, 2015.

MAY, J. et al. Time-kill studies of tea tree oils on clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.45, n.5, p.639-43, 2000.

MCCONIACK RC, KUNIN CM. Control of a single source nursery endemic due to *Serratia marcescens*. **Pediatrics**; 37:750-755, 1966.

MEINICKE, Rose Marie. **ESTUDO DA PRODUÇÃO DE PIGMENTOS POR *Monascus ruber* CCT 3802 UTILIZANDO GLICEROL COMO SUBSTRATO EM CULTIVO SUBMERSO**. 2008. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

MONTEIRO, Aline Bessa Parmigiani. **Produção de pigmento vermelho pelo fungo *monascus ruber* por fermentação em estado sólido e sua aplicação na elaboração de pães**. 2016. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos., Universidade Federal de Goiás, Goiania, 2016.

MUSHAM, C.K., JARATHI, A. AND AGARWAL, A. Acute Epiglottitis Due to *Serratia marcescens* in an Immune Competent Adult. **The American Journal of the Medical Sciences**; v. 344, p. 153-154, 2012.

N. R. WILLIAMSON, P. C. FINERAN, F. J. LEEPER, G. P. C. SALMOND, The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines, **Nature**; v. 4, p. 887–899, 2006.

NEVES, Luiz Carlos Martins das. **Obtenção da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase utilizando 'Saccharomyces cerevisiae' W303-181**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Fermentações) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NORA M. ELKENAWY, AYMEN S. YASSIN, HALA N. ELHIFNAWY, MAGDY A. AMIN, Optimization of prodigiosin production by *Serratia marcescens* using crude glycerol and enhancing production using gamma radiation, **In Biotechnology Reports**; v. 14, p. 47-53, 2017.

OLIVEIRA, Camila Fernanda Dias de. **produção de pigmentos por monascus ruber cct 3802 a partir do xarope de maltose como substrato**. 2017. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos., Universidade Federal de Goiás, Goiania, 2017.

POORNIAMMAL R., PARTHIBAN M., GUNASEKARAN S., MURUGESAN R., THILAGAVATHY R. Natural dye production from *Thermomyces* sp. fungi for textile application. **Indian J. Fiber Textile Res.** 38 276–279.

RIBEIRO, L. C. E SILVA, N. S.; **Vitaminas e Pigmentos**. Goiânia. CEFET - GO, 2008

SAMONIS G, VOULOUMANOU EK, CHRISTOFAKI M, DIMOPOULOU D, MARAKI S, TRIANTAFYLLOU E, et al. Infecções de *Serratia* em um hospital geral: características e resultados. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** ; v. 30, n. 5), p. 653-60, 2011.

SARON, Clodoaldo; FELISBERTI, Maria Isabel. **Ação de colorantes na degradação e estabilização de polímeros**. Quím. Nova, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 124-128, 2006.

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

SHIRATA A., TSUKAMOTO T., YASUI H., HAYASAKA T., HAYASAKA S., KOJIMA A., et al. Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing. **Japan Agric. Res. Q.** 34 131–140.

VORA, Jaykant & K Jain, N & A MODI, H. (2014). Extraction, Characterization and Application studies of red pigment of halophile *Serratia marcescens* KH1R KM035849 isolated from Kharaghoda soil.

ANEXO A

➤ Composição dos Meios de Cultura

Caldo BHI (Brain Heart Infusion)	
Sólidos de Infusão de Cérebro	12,5 g
Sólidos de infusão de Coração Bovino	5 g
Peptona Proteose	10 g
Cloreto de sódio	5 g
Glicose	2 g
Fosfato dissódico	2,5 g

Caldo Nutritivo (CN)	
Digestão Peptica de Tecido Animal	5 g
Extrato de Carne Bovina	1,5 g
Extrato de Levedura	1,5 g
Cloreto de Sódio	5 g

Caldo TSB (Tryptic Soy Broth)	
Peptona de caseína	17 g
Peptona de soja	3 g
Glicose	2,5 g
Cloreto de sódio	5 g
Fosfato dipotássico.	2,5 g

