



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS

RENATA ANDREIA DOS SANTOS

PRODUÇÃO DE PRODIGIOSINA POR *Serratia marcescens* UCP 1549 SOB FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Recife, 2020

RENATA ANDREIA DOS SANTOS

PRODUÇÃO DE PRODIGIOSINA POR *Serratia marcescens* UCP 1549 SOB FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Biotecnologia e Meio Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima

Co-orientadora: Profa. Dra. Galba Maria Campos Takaki
Dra. Dayana Montero Rodríguez

Recife, 2020

SANTOS, R. A.

Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549 sob fermentação em estado sólido e avaliação do seu potencial antimicrobiano, 2020.

Dissertação Mestrado - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação. Curso de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2020.

1. Bactéria. 2. Pigmento. 3. Fermentação estática. 4. Atividade biológica.

Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais.
Centro de Ciências e Tecnologia.

PRODUÇÃO DE PRODIGIOSINA POR *Serratia marcescens* UCP 1549 SOB FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL ANTIMICROBIANO

RENATA ANDREIA SANTOS

Examinadores:

Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima (Orientador)
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Profa. Dra. Rosileide Fontenele da Silva Andrade (Titular Interno)
Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Profa. Dra. Hélvia Walewska Casullo de Araújo (Titular Externo)
Universidade Estadual da Paraíba – UEPB

Defendida em: 19/02/2020.

Coordenador (a): Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

DEDICATÓRIA

Dedico esse título de mestre a minha mãe Maria Rosileide Batista da Silva que sempre me apoiou e ao meu filho Felipe Gabriel Santos Amaral que é a minha inspiração e o amor da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS e a minha família, por todos os desafios ultrapassados durante minha trajetória.

A meu orientador, Prof. Dr. Marcos Antônio Barbosa de Lima pelo apoio nessa caminhada.

À minha co-orientadora, Prof.^a Dr.^a Galba Maria de Campos Takaki, pelo incentivo, dedicação à pesquisa e confiança em mim depositada.

A minha co-orientadora, Dr^a Dayana Montero Rodríguez por transmitir conhecimento, incentivo e pela sincera ajuda nos momentos difíceis dessa jornada.

A todos os professores que fazem parte do Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais.

Aos técnicos de laboratório André Felipe Santos de Lima e Severino Humberto de Almeida pela total disponibilidade e contribuição para a realização desse trabalho.

Aos colegas de turma pelo companheirismo, amizade, aprendizado e experiência na concretização desta jornada acadêmica.

A todos os colegas que integram o NPCIAMB pela compreensão, paciência e troca de conhecimentos e pelo constante incentivo. Muito obrigada, meus amigos.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO I	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 <i>Serratia marcescens</i>	16
3.2 Prodigiosina.....	21
3.2.1 Famílias das prodigininas.....	23
3.2.2 Fatores que influenciam a produção de prodigiosina.....	25
3.2.3 Funções biológicas das prodigininas.....	27
3.2.4 Aplicações da prodigiosina.....	27
3.2.4.1 Anticancerígena.....	27
3.2.4.2 Antitumoral.....	27
3.2.4.3 Imunossupressora.....	28
3.2.4.4 Citotóxica.....	28
3.2.4.5 Antifúngica.....	29
3.2.4.6 Antimalaria/Larvicida.....	30
3.2.4.7 Antitripanossomal.....	30
3.2.4.8 Antialgal.....	31
3.2.4.9 Antimicrobiana.....	31
3.2.4.10 Antioxidante/fotoprotetora.....	32
3.2.5 Potencial biotecnológica de prodigiosina.....	32

3.2.6	Uso de substratos agroindustriais na produção de prodigiosina.....	33
3.4	Fermentação em estado sólido (FES).....	34
3.4.1	Produção de prodigiosina por fermentação em estado sólido (FES).....	35
	REFERÊNCIAS.....	37
	CAPÍTULO II	56
	Resumo.....	57
	Introdução.....	59
	Material e Métodos.....	60
	Resultados e Discussão.....	65
	Conclusão.....	74
	Agradecimentos.....	75
	Referências.....	75
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
	ANEXOS.....	83

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 – <i>S. marcescens</i> "bacilos curtos" (coloração de Gram).....	17
Figura 2 – Cultivo de <i>Serratia marcescens</i> UCP/WFCC 1549 em meio Luria Bertani (LB) sólido mostrando o pigmento vermelho que a bactéria produz.....	18
Figura 3 – Estrutura química da prodigiosina	21
Figura 4 – Estrutura química do prodigioseno.....	23
Figura 5 – Membros da família das prodigininas: a) Prodigiosina, b) Undecilprodigiosina, c) Cicloprodigiosina, d) Metacicloprodigiosina, e) Prodigiosina R1, f) Estreptorubina B.....	24

CAPÍTULO II

Figura 1 – Espectro de absorvância dos pigmentos extraídos de <i>S. marcescens</i> UCP 1549 cultivada nos meios contendo os substratos agroindustriais: (A) farelo de trigo, (B) bagaço de cana-de-açúcar, (C) resíduo de macarrão instantâneo, (D) casca de tangerina, (E) casca de abacaxi, (F) coroa de abacaxi.....	69
Figura 2 – Solubilização em etanol 95% dos pigmentos extraídos a partir dos meios contendo os substratos agroindustriais: (A) farelo de trigo, (B) bagaço de cana-de-açúcar, (C) resíduo de macarrão instantâneo, (D) casca tangerina, (E) casca de abacaxi e (F) coroa de abacaxi.....	69
Figura 3 – Espectro de infravermelho do pigmento produzido por <i>Serratia marcescens</i> UCP 1549 em diferentes valores de temperatura, salinidade e pH.....	70
Figura 4 – Estabilidade da prodigiosina produzida por <i>Serratia marcescens</i> UCP 1549 em diferentes valores de temperatura, salinidade e pH.....	71
Figura 5 – Avaliação da toxicidade da prodigiosina produzida por <i>Serratia marcescens</i> UCP 1549 por fermentação em estado sólido para <i>Artemia salina</i>	73

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 – Demonstrativo do histórico da descoberta de <i>Serratia marcescens</i>	19
Tabela 2 – Produção de prodigiosina por fermentação em estado sólido utilizando diferentes substratos, condições e referências.....	36

CAPÍTULO II

Tabela 1 – Rendimento de biomassa e pigmento produzido por <i>Serratia marcescens</i> UCP 1549 por fermentação em estado sólido em meios contendo substratos agroindustriais.....	66
Tabela 2 – Composição elementar dos substratos agroindustriais utilizados na fermentação em estado sólido para a produção de prodigiosina por <i>Serratia marcescens</i> UCP 1549.....	67
Tabela 3 – Produção de prodigiosina utilizando diferentes substratos em fermentação em estado sólido.....	67
Tabela 4 – Avaliação da toxicidade da prodigiosina produzida por <i>Serratia marcescens</i> UCP 1549 por fermentação em estado sólido para sementes de repolho (<i>Brassica oleracea</i>), alface (<i>Lactuca sativa</i>), cebola (<i>Allium cepa</i>) e pepino (<i>Cucumis sativus</i>) nas concentrações de 0.1, 0.5 e 1%.....	72
Tabela 5 – Concentrações mínimas de inibição (MIC) de prodigiosina produzidas por <i>S. marcescens</i> UCP 1549 contra diferentes cepas bacterianas testadas.....	74

RESUMO

Neste trabalho foi investigado o potencial de *Serratia marcescens* UCP 1549, bactéria Gram-negativa isolada do solo do semi-árido de Pernambuco, na produção de prodigiosina sob fermentação em estado sólido (FES). Diferentes substratos agroindustriais (farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, resíduo de macarrão instantâneo, casca de tangerina, casca de abacaxi e coroa de abacaxi), foram utilizados na formulação do meio de produção de prodigiosina por FES, durante 120 h em 28 °C, no meio constituído por 5 g de farelo de trigo e solução umedecedora contendo sais (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e 5% de óleo de soja pós-fritura, foi realizada a filtração e centrifugação dos extratos obtidos e a extração do pigmento. Obtendo-se o máximo rendimento do pigmento vermelho (119,8 g/kg de substrato seco). Esse pigmento foi identificado como prodigiosina pelo pico máximo de absorbância a 535 nm, R_f de 0.9 em CCD e os grupos funcionais identificados pelo espectro de infravermelho (FTIR). A prodigiosina demonstrou estabilidade em diferentes valores de temperatura (0 °C, 10 °C, 50 °C, 70 °C e 100 °C), pH (2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14) e concentrações de NaCl (0.1%, 0.2%, 0.5%, 1% e 5%) confirmando seu potencial de aplicação nas diversas áreas industriais, farmacêutica e médica. O pigmento bruto produzido não demonstrou efeitos fitotóxicos nas concentrações (0.1%, 0.5% e 1%) para sementes de repolho (*Brassica oleracea*), alface (*Lactuca sativa*), cebola (*Allium cepa*) e pepino (*Cucumis sativus*). Os testes de toxicidade utilizando o microcrustáceo *Artemia salina*, como bioindicador aquático demonstrou baixa toxicidade da prodigiosina nas concentrações (0.01 mg/L, 0,1 mg/L, 1 mg/L, 10 mg/L e 100 mg/L). O pigmento de *Serratia marcescens* na ação antimicrobiana demonstrou uma mínima concentração inibitória (MIC) significativo para as bactérias *Klebsiella pneumoniae* (UCP 1574), *Staphylococcus aureus* (UCP 1576) e *Enterococcus faecalis* (UCP 1577). Portanto, os resultados obtidos evidenciaram o potencial biotecnológico de *S. marcescens* UCP 1549 na produção de prodigiosina por FES, utilizando substratos agroalimentares, o que pode contribuir na redução dos custos de produção, além de minimizar o impacto ambiental.

Palavras-chave: Bactéria. Pigmento. Fermentação estática. Atividade biológica.

ABSTRACT

In this work, the potential of *Serratia marcescens* UCP 1549, gram-negative bacterium isolated from the soil of the semi-arid region of Pernambuco, in the production of prodigiosin under solid state fermentation (FES). Therefore, different agro-industrial substrates (wheat bran, sugarcane bagasse, instant noodle residue, tangerine bark, pineapple peel and pineapple crown), were used in the formulation of the means of production of prodigiosin by FES, obtaining the maximum yield of the red pigment (119.8 g/kg of dry substrate) in the medium consisting of 5 g of wheat bran and humidifiable solution containing sais (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) and 5% post-frying soybean oil. The pigment was identified as prodigiosin by the maximum peak absorbance at 535 nm, Rf of 0.9 in CCD and the functional groups identified by the infrared spectrum (FTIR). Prodigiosin showed stability at different temperature values (0 ° C, 10 ° C, 50 ° C, 70 ° C and 100 ° C), pH (2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14) and concentrations of NaCl (0.1%, 0.2%, 0.5%, 1% and 5%) confirming its potential for application in various industrial, pharmaceutical and medical areas. The raw pigment produced did not show phytotoxic effects in concentrations (0.1%, 0.5% and 1%) for cabbage seeds (*Brassica oleracea*), lettuce (*Lactuca sativa*), onion (*Allium cepa*) and cucumber (*Cucumis sativus*). Toxicity tests using the microcrustacean *Artemia salina*, as an aquatic bioindicator, demonstrated low prodigiosin toxicity in concentrations (0.01 mg / L, 0.1 mg / L, 1 mg / L, 10 mg / L and 100 mg / L). The pigment of *S. marcescens* in antimicrobial action showed a minimum inhibitory concentration (MIC) significant for the bacteria *Klebsiella pneumoniae* (UCP 1574), *Staphylococcus aureus* (UCP 1576) and *Enterococcus faecalis* (UCP 1577). Therefore, the results obtained showed the biotechnological potential of *S. marcescens* UCP 1549 in the production of prodigiosin by FES, using agrifood substrates, which can contribute to reduce production costs, in addition to minimizing the environmental impact.

Keywords: Bacteria. Pigment. Static fermentation. Biological activity.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A produção de pigmentos microbianos tem recebido grande atenção nos últimos anos devido às suas características ecológicas, como baixa toxicidade, alta eficiência e alta biodegradabilidade, ao contrário dos corantes sintéticos (HADDIX, SHANKS, 2020)

A prodigiosina é um pigmento natural vermelho produzido principalmente pela bactéria Gram-negativa *Serratia marcescens* (CHANG et al., 2011; SUMATHI et al., 2014; ELKENAWY et al., 2017). Ela é constituída por um alcalóide tripirrol de cadeia linear (pirrol, 3-metoxipirrol, 2-metil-amilpirrol) e apresenta um grande potencial nas indústrias farmacêutica, de alimentos, e petroquímica, dentre outras (KUMAR et al., 2015; VARJANI e UPASANI, 2017; HADDIX, SHANKS, 2020).

Apesar do grande potencial comercial, a produção em larga escala de prodigiosina é limitada devido ao alto custo de produção, bem como aos problemas operacionais que ocorrem quando são produzidos por fermentação submersa. Por consequência, várias pesquisas têm sido desenvolvidas para a avaliação de subprodutos e resíduos agroindustriais como fontes alternativas de carbono e nitrogênio, tornando-se uma estratégia atraente, sustentável e provavelmente de baixo custo. Além disso, outra alternativa que tem chamado a atenção dos pesquisadores e vem sendo cada vez mais aplicada é a fermentação em estado sólido (FES), para garantir a viabilidade do processo de produção (MONTERO-RODRIGUEZ et al., 2016; NALINI e PARTHASARATHI, 2018).

A FES é um processo, caracterizado por ocorrer na ausência ou quase ausência de água, que vem sendo utilizado para a produção de vários metabólitos microbianos de elevado valor agregado, incluindo os pigmentos (THOMAS et al., 2013; SALA et al., 2019). Além disso, a FES oferece a possibilidade de aproveitar resíduos e subprodutos agroindustriais baratos como fonte de carbono/energia para produção de biocompostos de interesse industrial ou como suporte inerte para o crescimento de micro-organismos (LIZARDI-JIMÉNEZ e HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, 2017; SADH et al., 2018).

Por outro lado, para a utilização de metabolitos de origem microbiana na indústria são necessários estudos de toxicidade para avaliar seus efeitos aleloquímicos em diferentes modelos biológicos que são usados como indicadores. Dentre eles, o uso de sementes em testes de toxicidade oferece várias vantagens, entre elas baixo custo de manutenção e resultados rápidos, permitindo a avaliação do potencial ecotóxico dos compostos em ambientes terrestres (FARRÉ, BARCELÓ, 2003; PRIAC et al., 2007). Os ensaios de letalidade também são essenciais para testes preliminares, pois permitem avaliar a toxicidade geral de compostos com potencial atividade biológica (CAVALCANTE et al., 2000).

A avaliação da estabilidade desses biocompostos também é fundamental, pois a aplicação dos pigmentos naturais nas diversas indústrias depende da estabilidade contra variáveis ou condições extremas de temperatura, pH e salinidade (VELMURUGAN et al., 2011; ZHANG et al., 2019).

Nesse contexto, a *S. marcescens* UCP 1549, bactéria que foi isolada do semi-árido de Pernambuco, tem sido investigada quanto à sua habilidade de produzir prodigiosina utilizando diferentes resíduos agroindustriais (ARAÚJO et al., 2010; LINS et al., 2014; MONTERO-RODRIGUEZ et al.; 2016; 2018). Contudo, tendo em vista que a produção deste pigmento por FES tem sido pouco explorada ainda (XU et al., 2011; ARIVIZHIVENDHAN et al., 2015; XIA et al., 2016), novas investigações foram realizadas neste trabalho. O pigmento produzido foi extraído e caracterizado, e sua atividade antimicrobiana foi avaliada, bem como estabilidade e toxicidade, a fim de obter um composto seguro para seu uso na indústria e no ambiente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549 sob fermentação em estado sólido utilizando substratos agroindustriais e seu potencial antimicrobiano.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial de *S. marcescens* UCP 1549 na utilização de substratos agroindustriais para produção de prodigiosina por FES;
- Realizar a quantificação e caracterização do pigmento produzido;
- Investigar a estabilidade da prodigiosina;
- Comprovar a toxicidade da prodigiosina;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da prodigiosina.
- Validar os dados estatisticamente.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 *Serratia marcescens*

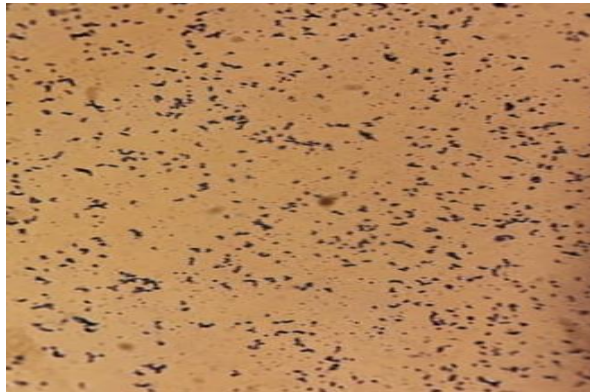
O gênero *Serratia* da família Enterobacteriaceae é uma bactéria Gram-negativa em forma de bastonete, com diâmetro que varia de 0,5-0,8 µm e 0,9-2,0 µm de comprimento, anaeróbia facultativa, de crescimento quimioautotrófico e flagelo peritriquo. Essa bactéria fermenta manitol, sacarose e salicilina com produção de ácido e algumas bolhas de gás. É indol negativo para vermelho de metila e positivo para Voges Proskauer (BREED et al., 1957; KIM, et al., 2009; CARVALHO et al., 2010; ARAÚJO, FUKUSHIMA, TAKAKI, 2010; HADDIX, SHANKS, 2020).

As reações bioquímicas para *S. marcescens* são a formação de ácido a partir da arabinose, lactose, sacarose e xilose, produz hemólise em ágar sangue entre 24 à 48h de incubação (PARKER, DUERDEN, 1990).

A bactéria *S. marcescens* é saprófita e habita em vários nichos ecológicos como: água, solos, ar, plantas e intestinos de animais homeotérmicos e alimentos ricos em amidos (GRIMONT, 1993; KIM et al., 2009). Conseguem se desenvolver em condições extremas, até na presença de desinfetantes, antisépticos e em água destilada. Essa bactéria pode ser encontradas em temperaturas entre 20-30° C e pH 9 (HOLT et al., 1994; SINGH et al., 2010).

S. marcescens é um patógeno oportunista, responsável por várias infecções nosocomiais em pacientes imunodeprimidos, provocando quadros infecciosos no trato urinário e respiratório, casos de septicemia, meningites e endocardites (STOCK et al., 2003; CARVALHO et al., 2010).

Esta bactéria também se caracteriza pela capacidade que tem algumas espécies de produzir o pigmento prodigiosina, de cor vermelho sangue (KALIVODA et al., 2010; MONTERO-RODRÍGUEZ, 2018) (Figura 1).

Figura 1 - *S. marcescens* "bacilos curtos" (coloração de Gram)

Fonte: Autoria própria (2019).

Existem dois tipos de *S. marcescens*: cepas pigmentadas (vermelhas) e não pigmentadas (brancas). Podem ser distinguidos de outros gêneros pertencentes à família das Enterobacteriaceae pela produção de três enzimas: DNase, lipase e gelatinase (ELKENAWY et al., 2017).

Além da prodigiosina outros compostos semelhantes fazem parte desta família de pigmentos naturais, como o undecilprodigiosina e o cicloprodigiosina (CLIFT, THOMPSON, 2009).

A *S. marcescens* é uma bactéria oportunista para plantas e animais podendo ser perigosa para o homem, já que às vezes é patogêna, causando infecções hospitalares e urinárias. Infecções por *Serratia* são responsáveis por aproximadamente 2% das infecções nosocomiais no trato respiratório baixo, trato urinário, feridas cirúrgicas, pele e mucosas em pacientes adultos. Na maioria dos casos, essas infecções ocorreram em pessoas que têm um sistema imunológico comprometido ou aqueles que são envelhecidos (CARVALHO et al., 2010). Como característica é uma fermentadora lenta de lactose, geralmente é resistente a maioria dos antibióticos conhecidos (ELKENAWY et al., 2017).

O alcalóide tripirol *S. marcescens* é produtora de metabólitos secundários e enzimas de importância industrial como quitinases que produz chitobiase (chi A, chi B e chi C), proteases, lipases, nucleases, biossurfactante como a serrawettina que lhe confere a propriedade de aderência no processo de colonização de superfícies, bacteriocinas e surfactantes e pigmentos naturais como a prodigiosina. Uma chitobiase

é uma proteína putativa de ligação à quitina. A *S. marcescens* é a mais efetiva bactéria que faz a degradação da quitina (MATSUYAMA et al., 2011; HAMRE et al., 2015; THAKUR et al., 2016; ANDERSON et al., 2017; SUBBANNA et al., 2018). Dentre elas, a enzima L-asparaginase tem chamado recentemente o interesse devido à possibilidade de aplicação nas áreas terapêutica e alimentícia (BATTOOL et al., 2015; CACHUMBA et al., 2016; SANAWER et al., 2017).

A bactéria *S. marcescens* (Figura 2) é o principal micro-organismo produtor de prodigiosina, porém existem estudos que comprovam a produção deste pigmento por outras espécies diferentes de *Serratia* como é o caso da *S. plymuthica*, *S. liquefaciens*, *S. rubidaea* e *S. odoriferae* (ARAÚJO, FUKUSHIMA, TAKAKI, 2010; XU, XIA, YANG, 2011; DARSHAN, MANONMANI, 2015; HADDIX, SHANKS, 2020).

Figura 2 - Cultivo de *Serratia marcescens* UCP 1549 em meio Luria Bertani (LB) sólido mostrando o pigmento vermelho sangue (prodigiosina)



Fonte: Autoria própria (2019).

De acordo com a literatura a *Serratia marcescens* foi talvez a suposta bactéria que contaminou a polenta de Bizio, e influenciou a queda de Tiro ou a ascensão do cristianismo na Idade Média, mas muito provavelmente, vários desses eventos são devidos à sua presença, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1- Demonstrativo do histórico da descoberta de *Serratia marcescens*

Ano / Local	Ocorrências	Consequências
332 a.c./ Tiro onde hoje é o Líbano	A tropa de Alexandre o grande no momento do corte do pão viu “gotas de sangue”.	Foi entendido na época como um presságio. (Invadiu com vitória Tiro).
Idade média em 1169/ Europa, em Alsen na Dinamarca	Um padre observou “sangue” no pão da missa.	Previsão de grande derramamento de sangue cristão. (naquela época saquearam a região causando várias mortes)
1263/ Bolsena Itália	Papa Urbano IV e sua corte; Padre Pedro de Praga. Na cerimônia eucariástica o Padre Pedro de Praga que estava passando por uma crise de fé, viu o pão consagrado pingando “sangue” até que manchou seu hábito.	“O milagre de Bolsena” fez Urbano IV criar a festa de Corpus chisti para toda a igreja católica.
1383/ Alemanha Igreja de Wilsnack	Bispo Havelberg e Padre observou o pão com aparência de ensanguentado	Milagre permaneceu os peregrinos chegaram aos milhares. (a cura ocorreu miraculosamente).
1819/ Legnaro (Pádua)	Antônio Pittarelo um agricultor observou uma tigela de polenta “sangrenta”	Superstição
1819/ Itália	Várias famílias relataram um material com aparência de sangue na polenta e preparação de sopa de arroz e também alguns relatos na preparação de galinha.	Culpou os espíritos malignos e famílias que haviam encontrado “o sangue” em seus alimentos foram acusadas de atividades demoníacas.
1819/ Itália	Drº Vincenzo Sette pesquisou a polenta vermelha	A importância para ciência microbiológica no momento. Descreveu que era um fungo chamado <i>Zarogalactina imetropha</i> .
1819 a 1823/ Itália	Bartolomeo Bizio também pesquisou a polenta vermelha.	Classificou como um fungo mais deu o nome definitivo <i>Serratia marcescens</i> (<i>Serratia</i> : Serafino Serrati; um físico que criou o motor a vapor em 1787 e <i>marcescens</i> do latim “marcerado mucho” por causa

		do aspecto mucoso adquirido pelas antigas colônias desta bactéria).
1848/ Berlin, Alemanha	Ehrenberg (médico especialista em protozoários). Estudou um ensopado de batatas salpicado de gotas de “sangue”	Renomeou o micro-organismo como Monas prodigiosina ou <i>M.prodigiosa</i>
1889	Toni e Trevisan pesquisaram o micro-organismo	Classificou como Enterobactéria baseado nas suas propriedades bioquímicas passando a ser denominada <i>Serratia sp</i>

Ambos Sette (1819) como Bizio (1823) erraram em afirmar que a *Serratia* era um fungo, mas eles estabeleceram a base para estudos microbiológicos subsequentes, foram os primeiros a mostrar evidências que o material vermelho da comida era devido a organismos vivos e que poderia ser transmitido por inoculação como se fossem sementes. Sette e Bizio conseguiram extrair o pigmento de bactérias e testou seu uso como tinta de seda ou lã, mas a grande sensibilidade para a luz da prodigiosina os fez desistir (BENNETT, BENTLEY, 2000; BENETT, 2006; MONTERO-RODRÍGUEZ, 2017).

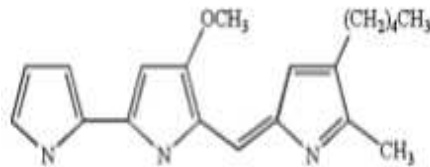
Os biotipos pigmentados de *S. marcescens*, quando isoladas de ambientes naturais, são raramente responsáveis por surtos; enquanto que os biotipos não pigmentados de hospitais, são mais resistentes a antibióticos e produzem citoxinas (BARBOSA et al., 2004; DEORUKHKAR et al., 2007).

A bactéria *S. marcescens* foi reconhecida como agente patogênico humano apenas na década de 1960. Antes dessa data, na década de 1950 o pigmento vermelho encontrado em algumas estirpes, era usado como marcador biológico, sendo utilizado para ser estudado nos processos de infecção bacteriana (LEDERMANN, 2003). Essa bactéria quando isolada de adultos infectados geralmente não sintetiza a prodigiosina (SINGLTON et al., 2001; TAN, 2002; SINGH et al., 2010). No entanto, a pigmentação esta presente em apenas uma pequena percentagem de culturas isoladas sob condição aeróbica. A produção do pigmento é bastante variável, dependendo das espécies e o tempo de crescimento (KHANAFARI et al., 2006; ARAUJO, 2010).

3.2 Prodigiosina

A prodigiosina é um pigmento vermelho natural que pertence à família das prodigininas produzido pela Enterobacteria *Serratia marcescens* (XU, XIA, YANG, 2011). A prodigiosina quimicamente é caracterizada como alcalóide tripirrol de cadeia linear (pirrol, 3-metoxipirrol, 2- metil-amilpirrol), com peso molecular de 323,44 Dalton e de fórmula estrutural $C_{20}H_{25}N_3O$ (KALIVODA et al., 2010; CHANG et al., 2011) (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura química da prodigiosina



Fonte: Ahmad et al. (2012).

Esse pigmento caracteriza-se por ser sensível a luz, insolúvel em água e álcool, além de ser solúvel em clorofórmio, benzeno, acetona, éter etílico, acetato de etila. A sua coloração sofre alteração dependendo do pH do meio (SUMATHI et al., 2014). A prodigiosina quando produzida em pH ácido, apresenta um coloração vermelho intenso, com absorvância máxima em 537 nm e quando em meios alcalinos a coloração pode variar de laranja a amarelo, com absorvância máxima em 470 nm (BENNETTI, BENTLEY, 2000; NAKASHIMA et al. 2005).

O maior interesse nas pesquisas da prodigiosina foi evidenciado principalmente nas áreas médica, industrial e farmacêutica, por apresentar algumas atividades biológicas tais como, antimicrobiana, antimalárica, indutor de apoptose em linfócitos T e B e mais recentemente, antitumoral sendo considerada atóxica às células sadias. Destaca-se que a prodigiosina possui uma produção fácil e rápida no meio de cultura de baixo custo, contribuindo para a sustentabilidade ambiental (SUMATHI et al., 2014; BATOOL et al., 2015; CACHUMBA et al., 2016; ELKENAWY et al., 2017; SANAWER et al., 2017).

A prodigiosina e seus derivados são agentes pró-apoptóticos eficazes contra várias linhas celulares de câncer, com múltiplos alvos celulares incluindo células resistentes a múltiplos fármacos, demonstrando baixa ou ausência de toxicidade para linhas celulares normais (DARSHANE, MANONMANI, 2015). Contudo o pigmento apresenta efeitos tóxicos no nível de DNA, por meio de clivagem oxidativa, induzindo a célula a iniciar o processo apoptótico (BENNETTE, THOMPSON, 2009; DOZIE-NWACHUKWU, 2017).

Além disso, vários estudos têm sido realizados, visando à aplicação da prodigiosina como corante natural de tecidos, olefinas, têxteis, papel, velas, sabões, entre outros (AHMAD et al., 2012; MEHTA, SHAH, 2015; REN et al., 2017). Com relação à ação larvicida tem sido comprovada contra os estágios larval e pupal dos mosquitos *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi* (PATIL et al., 2011; SURYAWANSHI et al., 2015). Adicionalmente foi demonstrada sua ação protetora de microrganismos contra a radiação ultravioleta sendo sugerida sua aplicação na área de cosméticos, como novo aditivo aos protetores solares (BORIĆ et al., 2011; SURYAWANSHI et al., 2015).

Por conseguinte aos inúmeros benefícios são proporcionados pela prodigiosina produzida microbiologicamente por *S. marcescens*, aumentando assim a necessidade de preconizar um meio de produção que proporcione maior rendimento de prodigiosina, com baixo custo. Um exemplo é o estudo usando nanotecnologias, que possibilita formas mais econômicas e sustentáveis empregando nanopartículas de prata com carvão ativado (ARIVIZHICENDHAN, 2017).

Outro exemplo para aumentar o rendimento do pigmento vem sendo o uso de fontes de carbonos (Tabela 2), como a glicose ou frutose e o amido. E, ainda, quando adicionado óleos vegetais, como óleo de coco, gergelim, milho, canola dentre outros, também foi observado máxima produção da prodigiosina (ARAÚJO, FUKUSHIMA; TAKAKI, 2010; SUMATHI et al., 2014; LIN et al., 2019). Uma análise comparativa realizada por Elkenawy et al. (2017) com quatro fontes de carbono diferentes, glicerol bruto (oriundo do biodiesel), bagaço de semente de algodão, bolo de soja e bolo de sementes pretas; e cinco fontes de nitrogênio: peptona, ureia, sulfato de amônio e nitrato de amônio. Observa-se que a fonte de nitrogênio e carbono mais eficiente foi o

glicerol bruto e a peptona com 610 unidades/célula de produção de prodigiosina. Em seguida, a bactéria foi submetida à radiação gama dobrando a quantidade de sua produção.

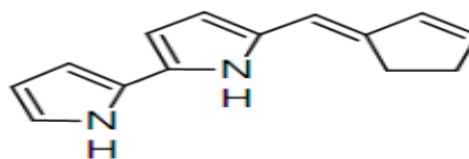
Estudos realizados com o crescimento microbiano demonstraram que o mesmo pode ser afetado por fatores físicos, como ondas sonoras. E, ainda, a *S. marcescens* demonstrou diminuição no crescimento e aumento na produção de prodigiosina pela influência de música clássica (SARVAIYA, KOTHARI, 2015).

Segundo Casullo, Fukushima e Takaki (2010) os resultados para a *S. marcescens* são bastante promissores na formação de emulsões de elevado potencial biotecnológico nos processos de biodessulfurização de combustíveis fósseis, podendo ser selecionado como produtor de biosurfactante. O aumento da escala de produção de prodigiosina foi evidenciado utilizando efluentes agroindustriais além de contribuir para a remoção da manipueira, poluente de águas residuais. Assim, o uso da manipueira como substrato em fermentação submersa sem agitação demonstram uma alternativa de baixo custo e conseqüentemente minimização do impacto ambiental.

3.2.1 Famílias das prodigininas

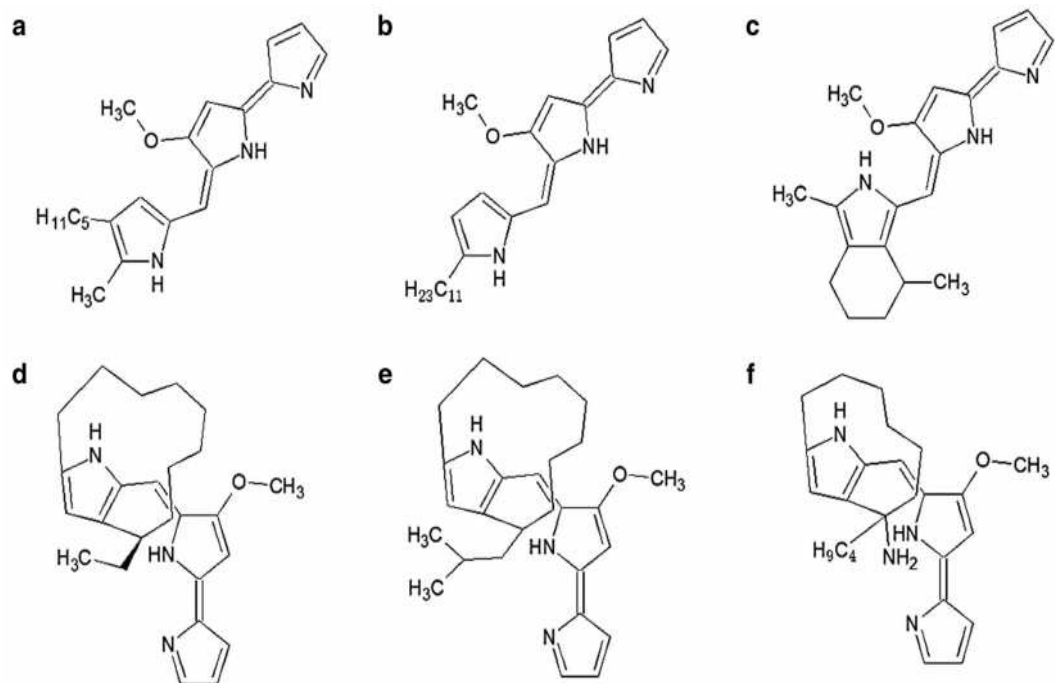
As prodigininas bacterianas são uma família de diferentes compostos que englobam um grupo de pigmentos que apresentam em sua estrutura química um esqueleto comum de três pirróis denominado de prodigioseno (Figura 4) (VAN HOUTDT et al., 2007). Dentre elas, a prodigiosina e undecilprodigiosina pertencem a um grupo de tripirroles lineares, enquanto metacicloprodigiosina, prodigiosina R1 e estreptorubina B pertencem ao grupo das prodigininas cíclicas, como se mostra na Figura 5 (STANKOVIC et al., 2014; KIM et al., 2016).

Figura 4 - Estrutura química do prodigiosina



Fonte: Elahian et al. (2013)

Figura 5 - Membros da família das prodigininas: a) prodigiosina, b) undecilprodigiosina, c) cicloprodigiosina, d) metacicloprodigiosina, e) prodigiosina R1, f) estreptorubina B



Fonte: Adaptado de Kim et al. (2016).

A molécula de prodigiosina é formada por (C₂₀H₂₅N₃₀), dois desses anéis são diretamente ligados uns aos outros e o terceiro é anexado através de uma ponte de metano formando uma estrutura de pirrolidipirrometano (BENNETT, BENTLEY 2000; WILLIAMSON et al., 2006). Prodigiosina e undecilprodigiosina pertencem a um grupo de tripyrroles lineares enquanto metacicloprodigiosina, prodigiosina R1 e streptorubina B pertencem a três outros grupos estruturais de prodigininas cíclicas. O sistema conjugado com sete ligações duplas é responsável por sua pigmentação vermelho escuro, cristais piramidais quadrados com reflexo verde (BENNETT, BENTLEY, 2000; FURSTNER, 2003).

O 4-núcleo metoxipirrólico de prodigininas carrega uma carga catiônica em pH fisiológico que é crítico para DNA combinatório. As prodigininas foram encontradas como intercaladores atípicos com um sistema de anéis não fundidos mostrando a preferência de locais de adenina / timina (AT) (MELVIN et al., 1999). A oxidação por cobre forma um cátion radical que introduz a fita dupla clivagem de DNA (MELVIN et

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

al., 2000). Contudo essa interação é controversa, pois a intercalação e clivagem de DNA pode ser parte do mecanismo de prodigiosina citotoxicidade em células eucarióticas (FURSTNER, GRABOWSKI, 2001; MONTANER et al., 2005).

Por outro lado, novas descobertas sugerem que a prodigiosina purificada não exibe efeito genotóxico no DNA in vitro ou in vivo em células bacterianas (GURYANOV et al., 2013). A cauda hidrofóbica longa de undecilprodigiosina facilita o papel como prótons variáveis (SATO et al., 1998). Na coloração Gram-negativo a *S. marcescens* produtora da prodigiosina é geralmente associada à membrana celular (RYAZANTSEVA et al., 2012), enquanto em Gram-positivo *Streptomyces sp.*, undecilprodigiosina é micélio associados na fase inicial da produção de pigmentos (STANKOVIC et al., 2012).

Os espectros específicos de absorção UV-visível e o brilho a cor vermelha das prodigiosinas faz delas boas moléculas repórter (fluorescência máxima a cerca de 570 nm). Após interação com locais ricos em ATP no DNA, a prodigiosina emite fluorescência. Essa fluorescência vermelha natural vem sendo utilizada recentemente para diminuir o tempo, baixo custo, análises semi-quantitativas sensíveis, específicas e precisas de biossíntese de undecilprodigiosina em *Streptomyces coelicolor* com uma visualização espaço-temporal na síntese de undecilprodigiosina através de uma cultura sólida; a auto-fluorescência vermelha também esta sendo usada para imagem, em atividade antifúngica para patógeno vegetal em undecilprodigiosina e *Streptomyces* (MELVIN et al., 1999; MESCHKE et al., 2012; TENCONI et al., 2013).

O interesse neste grupo de compostos tem sido estimulado por suas atividades antitumorais, imunossupressoras e antimaláricas em níveis não tóxicos (FURSTNER, 2003; MONTANER, PÉREZ-TOMÁS, 2003; WILLIAMSON et al., 2007; PEREZ-TOMAS, VINAS, 2010; PAPIREDDY et al., 2011; STANKOVIC et al., 2014).

3.2.2 Fatores que influenciam a produção de prodigiosina

Existem vários fatores nutricionais e físico-químicos que influenciam a produção de prodigiosina por *S. marcescens*. Os requisitos mínimos que necessita um meio de cultivo para que a *S. marcescens* sintetise a prodigiosina são: sais inorgânicos e

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

glicerol como fonte de carbono e sais de amônio como fonte de nitrogênio, temperatura, pH, agitação, a luz e concentração de oxigênio dissolvido (NAKASHIMA et al., 2005; CHANG et al., 2011; SUMATHI et al., 2014; ARIVIZHICENDHAN, 2017).

Com um nível de 4% NaCl, de concentração é obtido um bom rendimento de prodigiosina, e com 8% de NaCl ocorre inibição da síntese da prodigiosina (RJAZANTSEVA et al., 1994).

O tempo de incubação para obter uma boa síntese do pigmento depende do meio de crescimento e das condições do cultivo e temperatura que no geral ocorre em 48 horas de incubação (MOMTERO-RODRIGUEZ, 2018).

A faixa de temperatura ótima de crescimento para *S. marcescens* é de 28°C, no entanto, para obter uma boa pigmentação é de 27 à 30°C (MONTANER, 2000; MOMTERO-RODRIGUEZ, 2018).

A produção máxima de prodigiosina a exposição à luz durante o cultivo foram de 2 a 3 dias, na ausência de luz, ocorre entre 3 a 4 dias. Contudo o maior rendimento de prodigiosina ocorre nos cultivos sem a presença de luz (SOMEYA, 2004). Apesar de a literatura descrever que a luz é responsável pela fototransformação da prodigiosina (TOMLINSON, 2006; SONG, et. al., 2006).

A síntese de prodigiosina depende também das condições ambientais e é regulada em todos os produtores de prodigiosina cepas. Em *S. marcescens*, a produção de prodigiosinas é regida pela complexa rede de quorum sensing (QS) - vias regulatórias controladas e independentes de QS (THOMSON et al., 2000; WILF, SALMOND, 2012). Essa propriedade da produção de prodigiosina foi empregada no desenvolvimento de uma cepa biossensora SP19 de *Serratia* com sínteses e suas próprias moléculas de sinalização QS N-acyllactonas homoserinas, mas sensíveis à presença de cadeia de lactonas de N-acil homoserina (POULTER et al., 2010; STANKOVIC et al., 2014).

A *S. marcescens* se propaga no meio ambiente por meio de natação, enxameação e dispersão do ar. Contudo a produção de prodigiosina é importante tanto na enxameação como na dispersão do ar (MATSUYAMA et al., 1986; STANKOVIC et al., 2014).

3.2.3 Funções biológicas das prodigiosinas

As prodigiosinas apresentam várias funções biológicas como dissipador metabólico; melhor motilidade (dispersão pelo ar); proteção à radiação UV; proteção antioxidante; proteção contra compostos antimicrobianos; atividades antimicrobianas contra bactérias Gram-positivas; sinalização e comunicação (GERBER, 1975; STARIC, et al., 2010; ZHU et al., 2010; BORIC et al., 2011; STANKOVIC et al., 2012; STANKOVIC et al., 2014; SORATHIYA, SHAH, 2019; YOU et al., 2019).

Esse pigmento também possui potente ação antimalárica, ação antiprotozoico contra *Entamoeba histolytica*, efeito lítico sobre tripanossomídeos como *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma rangely*, atividade lítica para *Leishmania brasilienses* (NAKASHIMA et al., 2006; MAHAJAN et al., 2013; HERRÁREZ, et al. 2019).

3.2.4 Aplicações da prodigiosina

3.2.4.1 Anticancerígena

As prodigiosinas exibem atividade anticancerígena induzindo apoptose especificamente em células tumorais. Elas possuem múltiplos alvos celulares e diferentes mecanismos para induzir a apoptose dependendo do tipo de câncer. Em concentrações não citotóxicas, as prodigiosinas impedem o crescimento do câncer provocando a parada do ciclo celular (CHANG et al., 2011; ELAHIAN et al., 2013; LIN et al., 2019).

A ação anticancerígena da prodigiosina atua como imunossupressora de linfócitos T e B e inibindo principalmente a interleucina – 2Ra, sem causar toxicidade in vivo (HAN et al., 2001; BARREIRO, 2009). A propriedade anticancerígena das prodigiosinas tem sido investigada em vários estudos com células cancerígenas hematopoéticas, células de câncer do estômago, colo de útero, mamas e próstata (DIAZ-RIUZ et al., 2001; CLIFT, THOMSON, 2009; LI et al., 2018).

3.2.4.2. Antitumoral

As propriedades anticancerígenas da prodigiosina podem ter sido um fator contribuinte na indução de necrose tumoral e a subsequente apoptose de células

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

cancerígenas quando Coley toxinas foram usadas para tratar múltiplas formas de câncer entre 1893 e 1960 (BENNETT, BENTLEY, 2000).

Segundo Stankovic (2014) foram testadas prodigiosinas em mais de 60 células cancerígenas com uma concentração média inibitória de 2 μM e atividade potente inibitória confirmada no linfócito T em proliferação.

As Prodigiosinas também podem agir como agentes intercalantes de DNA causando fragmentação de DNA e morte celular tumoral (MELVIN et al., 2000).

3.2.4.3 Imunossupressora

A prodigiosina, undecilprodigiosina e metacicloprodigiosina foram identificados para inibir a proliferação de células T murinas in vitro e in vivo em concentrações não citotóxicas (MAGAE et al., 1996; NAKAMURA et al., 1986; HAN et al., 1998).

A undecilprodigiosina exibiu um modo de ação diferente a drogas imunossupressoras atualmente utilizadas FK506, ciclosporina A e rapamicina (SONGIA et al., 1997; STANKOVIC et al., 2014).

Devido a efeitos tóxicos significativos em doses efetivas, as prodigiosinas ainda não são imunossupressores clinicamente adequados. No entanto, derivados produzidos sinteticamente da undecilprodigiosina são promissores farmacêuticos, mostrando imunossupressores igualmente potentes à atividade in vitro e in vivo, mas acentuadamente reduzida toxicidade em camundongos (STEPKOWSKI et al., 2001; WANG et al., 2001; STANKOVIC et al., 2014).

3.2.4.4 Citotóxica

Nos últimos anos, alguns estudos foram descritos mostrando os efeitos citotóxicos em linhagens de células tumorais como pulmão, cólon, rins, mama, e baixa toxicidade observada em células normais (LIU et al., 2005). O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos realizou testes com 60 diferentes tipos de linhagens tumorais onde a prodigiosina apresentou uma índice de toxicidade induzindo a apoptose em 50% de uma dada população de células estudadas, na concentração de 2,1 $\mu\text{M}/\text{mL}$, sendo o pigmento prodigiosina considerado como uma droga com potencial

em atividade citotóxica dirigidas às células tumorais (WILLIAMNSON et al., 2006; PERÉZ-TOMÁZ e VIÑAS, 2010).

Foram observados efeitos citotóxicos da prodigiosina, in vivo, em camundongos xenoabióticos enxertados com linhagens Huh-7 (linhagem de células hepáticas tumorais), a prodigiosina não sofre ação das bombas de resistência às substâncias citotóxicas (HO et al., 2009). Em pesquisas citotóxicas, Zhang et al., (2005), mostram que, após a administração de doses diárias da prodigiosina (5mg / Kg e 10 mg / Kg) no tratamento do melanoma BL16 em ratos, foi observada redução de nódulos metastáticos em 50% dos animais e um aumento da sobrevivência dos ratos. Regourd et al. (2007), demonstram que esses efeitos ocorrem devido a inibição do mecanismo de migração celular e ligação à matriz extracelular, resultantes da redução da expressão das proteínas RhoA e RhoGTPase, responsáveis pelo processo de adesão e motilidade celular. Porém os efeitos genotóxicos para prodigiosina não foram descritos ainda na literatura.

3.2.4.5 Antifúngica

A atividade da prodigiosina contra fungos patogênicos foi experimentalmente usada como um agente fungicida contra *occidioides immitis* (WILLIAMS, HEARN, 1967). O antifúngico composto por prodigiosinas possui uma ampla aplicação, incluindo espécies de *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Saccharomyces*, *Cryptococcus* e *Histoplasma*. Recentemente, foi descoberto outro potencial antifúngico das prodigiosinas com efeito considerável sobre nove isolados clínicos do gênero *Trichophyton* causador do pé de atleta que é tratado por um número muito limitado de fármacos (NAKASHIMA et al., 2005). Pesquisas recentes sugerem que as prodigiosinas também podem encontrar aplicação como agentes antifúngicos no combate à doença que atingem a agricultura, sendo demonstrado que undecilprodigiosina purificada reduziu a formação de hifas de *V. dahliae* e microsclerotia em *Arabidopsis thalianas* (STANKOVIC et al., 2014; YOU et al., 2019).

A *S. marcescens* também produz quitinases no biocontrole de plantas patogênicas fúngicas (MONREAL, REESE, 1969; JONES et al., 1986). Porém recentemente, prodigiosina e enzimas quitinolíticas apresentaram atividade sinérgica

em antifúngicos com ação de *S. marcescens*; no entanto, a prodigiosina apresentou uma atividade antifúngica em patógenos de plantas em concentrações mais altas do que em combinação (SOMEYA et al., 2001; DUZHAK et al., 2012).

3.2.4.6 Antimalaria/ Larvicida

A atividade antimalárica da prodigiosina ocorreu na década de 1960, porém esta característica não foi muito estudada. Mais recentemente foi realizada uma pesquisa de análise comparativa do índice de similaridade molecular das características estruturais que influenciam a atividade antimalárica de prodigiosina (CASTRO, 1967; SINGH et al., 2013; SORATHIYA, MANISHA, 2019).

A prodigiosina, undecilprodigiosina, e metacicloprodigiosina exibiram atividade *in vitro* potente contra o *Plasmodium falciparum* (CASTRO, 1967), estudos *in vivo* com camundongos (cinco por tratamento) mostrou que doses antimaláricas foram aplicadas sem cura parasitária ou teve efeitos tóxicos no hospedeiro (GERBER, 1975a). Os experimentos *in vivo* com heptilprodigiosina injetada por via subcutânea de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA mostraram sobrevida, mas também causou lesões escleróticas no local da injeção (LAZARO et al., 2002). Por outro lado, análogos de prodigiosina monossubstituídos ou bisubstituídos, reduziu potencialmente a parasitemia (em mais de 90%). *Plasmodium yoelii* após administração oral não mostrou toxicidade evidente (PAPIREDDY et al., 2011).

Estes resultados revelaram que apesar das prodigiosinas naturais não serem muito eficientes na cura da malária, o potencial antimalárico satisfatório ainda pode ser encontrado dentro das novas prodigiosinas sintéticas (MAHAJAN et al., 2013).

Outras pesquisas com prodigiosina de *S. marcescens* NMCC46 relatou ser eficiente agente larvicida de mosquito contra espécies de *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi*, podendo ser um caminho da aplicação de prodigiosina como inseticidas (PATIL et al., 2012).

3.2.4.7 Antitripanossomal

Na década de 1950 ocorreu o primeiro relato de atividade antitripanossomal por prodigiosina produzida por bactéria, onde foi estabelecida a atividade *in vitro* contra o

Trypanosoma cruzi determinando a concentração ativa de 10 µg ml⁻¹ (MCRARY et al., 1953).

Recentemente pesquisas confirmaram que a prodigiosina de *S. marcescens* interfere na fosforilação oxidativa processos nas mitocôndrias do *T. cruzi* levando a morte celular parasitária sem efeitos tóxicos sobre as células humanas (GENES et al., 2011; STANKOVIC et al., 2014; HERRÁREZ, et al., 2019).

3.2.4.8 Antialgal

Segundo Stankovic e colaboradores (2014) a prodigiosina produzida por *S. marcescens* teve efeito antialgal em *Prototheca zopfi* (MIC 25 µg ml⁻¹).

A atividade algicida de prodigiosinas bacterianas foi examinada com *Hahella chejuensis* KCTC 2396, onde os γ- proteobactérias poderiam ter um papel importante no biocontrole de ambientes marinhos (JEONG et al., 2005; STANKOVIC et al., 2014).

3.2.4.9 Antimicrobiana

As prodigiosinas possuem efeito antibacteriano não apenas como agentes antibióticos, mas indiretamente, impedindo a formação de biofilme bacteriano, como atividade anti-incrustante contra bactérias incrustantes marinhos como *Alteromonas sp.*, *Gallionella sp.* e *cianobactérias* (PRIYA et al., 2013).

A prodigiosina produz atividades antimicrobianas, sendo encontradas concentrações mínimas inibitórias (IMC's) quando comparados com os antibióticos convencionais tetraciclina, clorafenicol e gentamicina frente a diversas espécies bacterianas como *Staphylococcus aureus* FDA 209P (IMC 3.1 µg/mL), *Streptococcus pyogenes* (IMC 1.56 µg/mL), *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (IMC 3.1 µg/mL), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (IMC 12.5 µg/mL), *Escherichia coli* K12 (IMC > 100 µg/mL), *Klebsiella pneumoniae* PCI 602 (IMC > 100 µg/mL), *Salmonella typhimurium* IID 971 (IMC 25 µg/mL), *Serratia marcescens* IAM 1184 (IMC > 100 µg/mL), *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1 (IMC > 100 µg/mL), *Proteus vulgaris* HX 19 (IMC 50 µg/mL) (NAKASHIMA et al., 2005). Foram descritas também sensibilidades a prodigiosina observadas pelo teste de difusão de disco em ágar, onde foram observados significativos halos de inibição do crescimento bacteriano para as espécies *Escherichia*

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

coli, *E. aerogenes*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa*, afirmando assim o seu uso como um potente antibiótico natural (KHANAFARI et al., 2006; ALIHOSSEINI et al., 2008; IBRAHIM et al., 2014; LAPENDA et al., 2015; SORATHIYA, MANISHA, 2019; HERRÁEZ et al., 2019).

3.2.4.10 Antioxidante/fotoprotetora

A prodigiosina desempenha um papel de regulador negativo de superprodução de energia celular durante o crescimento aeróbico de *S. marcescens* pelo desacoplamento do transporte de prótons e ATP síntese através da fosforilação oxidativa, diminuindo a produção de ATP por emissão de energia (HADDIX et al., 2008).

Segundo Suryawanshi e colaboradores os pigmentos bacterianos prodigiosina e violaceína exibem atividade antioxidante e antimicrobiana e são capazes de aumentar o fator de proteção solar (FPS) de protetores solares comerciais. Esses pigmentos têm potencial biotecnológico bacteriano para uso em protetores solares comerciais, precisando ser testados em células de mamíferos para obter uma melhor segurança (SURYAWANSHI et al., 2015).

3.2.5 Potencial biotecnológica de prodigiosina

A prodigiosina possui inúmeras propriedades, tendo despertado bastante interesse na sua produção industrial na aplicação nas áreas médica, industrial e farmacêutica, por apresentar algumas atividades biológicas tais como: antimicrobiana, antimalárica, indutor de apoptose em linfócitos T e B, antitumoral sendo considerada atóxica às células saudáveis. Além de possuir produção fácil e rápida no meio de cultura de baixo custo, contribuindo para a preservação da biodiversidade (CASULLO, FUKUSHIMA, TAKAKI, 2010; ELKENAWY et al., 2017; MONTERO-RODRIGUEZ et al., 2018).

Nos últimos anos, pesquisas sobre a atividade citotóxica da prodigiosina têm sido intensificadas, sendo descritos efeitos citotóxicos em linhagens de células

tumorais como pulmão, cólon, rins, mama, e baixa toxicidade observadas em células normais (LIU et al., 2005).

A produção biotecnológica da prodigiosina também vem sendo investigada avaliando o potencial do uso de pigmentos (prodigiosina e violaceína) como aditivos para filtros solares comerciais. Os mesmos foram capazes de aumentar o FPS dos filtros solares comerciais (SURYAWANSHI et al., 2015).

3.2.6 Uso de substratos agroindustriais na produção de prodigiosina

Os resíduos agroindustriais são materiais ricos em macro e micronutrientes, porém quando não aproveitados, ou devidamente tratados podem causar sérios problemas de poluição no solo e em águas superficiais e subterrâneas (MONTERO-RODRIGUEZ, 2016; RAVINDRAN, JAISWAL, 2016).

A escolha de resíduos agroindustriais na produção de prodigiosina favorece o crescimento e metabolismo microbianos, ajuda o meio ambiente e minimiza o custo em sua produção, despertando interesse de pesquisadores na busca de substratos alternativos para a obtenção de produtos de elevado valor comercial (VELMURUGAN et al., 2011; FERREIRA-LEITÃO et al., 2017).

Diante da necessidade de encontrar substratos alternativos agroindústrias para produção de prodigiosina, vários estudos foram realizados, com o objetivo de achar substratos que propicie uma maior produção de prodigiosina e que tenha um baixo custo, tais como: bagaço de cana-de-açúcar, resíduo de macarrão instantâneo, casca de tangerina, casca e coroa de abacaxi e farelo de trigo (ARAUJO, 2010; VELMURUGAN et al., 2011; XIA et al., 2016; ELKENAWY et al., 2017).

O bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo obtido da cana-de-açúcar depois de esmagado na produção de açúcar e etanol, a sua composição química depende da variedade de culturas, condições climáticas, localização e modo de crescimento, uso de fertilizantes e condições químicas e físicas do solo (CHANDEL et al., 2011; 2012; CANILHA et al., 2012).

O resíduo de macarrão instantâneo são os subprodutos gerados da produção de macarrão instantâneos pelas indústrias alimentícias, geralmente são utilizados para a produção de ração animal (YANG et al., 2014).

A casca de tangerina é rica em carotenoides que são precursores da vitamina A, e atividade antioxidante, também é rica em fibra alimentar. Os resíduos sólidos das indústrias de citros (cascas, sementes e polpas) são geralmente transformados em farelo para ração animal (ASSIS et al. 2010; RODRIGUES, 2013).

O fruto do abacaxi é a parte comercializável que corresponde 23% do total da planta, enquanto que o caule, a folha, o talo, a casca e a coroa de abacaxi são considerados subproduto agrícola e não tem sido aproveitado devidamente. A composição desse resíduo pode ser alterado devido a qualidade e variedade da fruta, e a sua composição química varia com o período que é produzido (OLIVEIRA, 2008).

O farelo de trigo possui aproximadamente 12% de água, 13-18% de proteína, 3,5% de gordura e 56% de carboidratos. Contudo devido as grandes quantidades de biomassa de farelo acumulada e o baixo valor nutricional, outras aplicações vêm sendo realizadas para este subproduto (APPRICH et al., 2014).

Segundo Luti (2018) em sua pesquisa com farelo de trigo, milho moído e casca de arroz adicionado óleo de soja em fermentação em estado sólido, foi evidenciado um maior rendimento de prodigiosina no farelo de trigo. Esse fato também é evidenciado por Montero-Rodriguez et al. (2018).

3.3 Fermentação em estado sólido (FES)

A fermentação em estado sólido (FES) surgiu como uma alternativa eficaz sobre a fermentação submersa. A FES fornece os nutrientes básicos aos microrganismos, servindo de âncora para a célula, propiciando uma maior concentração de produtos, fácil aeração, diminuição do consumo de energia, fácil extração do produto, menos espaço para equipamentos e diminuição da contaminação microbiana (VELMURUGAN et al., 2011; LIZARDI-JIMÉNEZ, HERNÁNDEZ MARTÍNEZ, 2017).

Desta forma, a FES é bastante promissora para o desenvolvimento de vários bioprocessos, dentre eles podemos citar: a biorremediação, biodegradação,

desintoxicação, biotransformação, produtos de alto valor agregado, como metabólitos secundários (alcalóides, antibióticos, fatores de crescimento vegetal etc), além de biocombustíveis, ácidos orgânicos, biopesticidas, compostos aromáticos e enzimas (FURSTNER, 2003; LIZARDI-JIMÉNEZ, HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, 2017).

3.4.1 Produção de prodigiosina por fermentação em estado sólido (FES)

A FES como tecnologia, ainda é pouco estudada na produção de prodigiosina, como é demonstrado na Tabela 2.

As principais vantagens da FES são: fácil inoculação, processo contínuo, fácil acompanhamento da formação do produto e consumo do substrato e o controle dos parâmetros fermentativos como pH, temperatura, oxigenação. Como principais desvantagens, têm-se o grande volume de resíduos gerados e a dificuldade de separação produto/substrato, dificuldade de remoção de calor, condições estáticas, dificuldade de se medir parâmetros como pH, oxigênio dissolvido, elevados consumo energético e custo tecnológico (EL-BAKRY et al., 2015; SOCCOL et al., 2017; YANG et al., 2018).

Porém, as limitações não superam as vantagens da FES, principalmente o baixo custo, que torna mais viável a produção da prodigiosina, pois o custo para obtenção desse pigmento corresponde a 30 % da sua produção, devido principalmente ao substrato e o tipo de fermentação (EL-BAKRY et al., 2015; LUTI et al., 2018).

Nos últimos anos o interesse em produzir prodigiosina através de FES aumentou as vantagens econômicas e operacionais que este processo tem quando comparado com a fermentação submersa (XIA et al., 2016; LIZARDI-JIMÉNEZ, HERNÁNDEZ MARTÍNEZ, 2017).

Tabela 2- Produção de prodigiosina por fermentação em estado sólido utilizando diferentes substratos e condições

Micro-organismo	Substrato	Condições	Referências
<i>S. marcescens</i>	Resíduos de cozinha, casca de arroz e resíduos de celulose	Inoculo: 1% Umidade: 200% pH 8,0 Temperatura: 28°C Tempo: 60 h	Xu, Xia, Yang (2011)
<i>S. marcescens</i>	Flambagem de curtume	Umidade: 50%; pH 7,0 Temperatura: 20°C Tempo: 96 h	Arivizhivenha et al. (2015)
<i>S. marcescens</i> Xd-1	Bagaço/glicerol e peptona de soja	Inóculo: 10% Umidade: 83,5% pH: 8,0 Temperatura: 28 ° C Tempo: 48 h	Xia et al. (2016)
<i>S. marcescens</i>	Bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo	Inoculo:5% Temperatura: 28°C Tempo: 12 dias	Montero-Rodriguez (2016)
<i>Streptomyces</i> sp.	Amido e farelo de soja/ farelo de trigo	pH 7,0 Temperatura: 28°C Tempo: 7, 14 e 21 dias	Abraham, Chauhan (2018)
<i>S. marcescens</i> UCP 1549	Farelo de trigo	Inoculo: 5% Temperatura: 28°C Tempo: 12 dias	Montero-Rodriguez (2018)

Arivizhivendhan et al. (2015) obtiveram 70,40 g de prodigiosina/ kg de farelo de trigo suplementado com resíduo sólido proteico gerados pela indústria do couro em biorreator durante 96 h. Porém, Xu et al. (2011) tinham informado a produção 4,16 g de prodigiosina /kg de lixo de cozinha e casca de arroz, após 60 h de FES. Mais recentemente, o bagaço tem sido utilizado como matriz inerte na obtenção de prodigiosina utilizando glicerol e peptona de soja, com rendimento 40,86 g/kg de sólido seco (XIA et al., 2016).

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, J.; CHAUHAN, R. Profiling of red pigment produced by *Streptomyces sp.* JAR6 and its bioactivity. **3 Biotechnology**, v. 8, n.1, p.22, 2018.

AHMAD, W.; AHMAD, W.Y.W.; ZAKARIA, Z.A.; YUSOF, N.Z. Isolation of PigmentProducing Bacteria and Characterization of the Extracted Pigments. **Springer Briefs in Molecular Science**, p. 25-44, 2012.

ALIHOSSEINI, F.; JU, K.S.; LANGO, J.; HAMMOCK, B.D.; SUN, G. Antibacterial colorants: characterization of prodiginines and their applications on textile materials. **Biotechnology Progress**, v. 24, p. 742-747, 2008.

ANDERSON, M.T.; MITCHELL, L.A.; MOBLEY, H. L. Cysteine biosynthesis controls *Serratia marcescens* phospholipase activity. **Journal of Bacteriology**, 2017.

APPRICH, S.; TIRPANALAN, Ö.; HELL, J.; REISINGER, M.; BÖHMDORFER, S.; SIEBENHANDL-EHN, S.; KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery 2: Valorization of products. **LWT-Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 222-231, 2014.

ARAÚJO, H. W. C., FUKUSHIMA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Prodigiosin production by *Serratia marcescens* UCP 1549 using renewable-resources as a low cost substrate. **Molecules**, v.15, n.10, p. 6931-6940, 2010.

ARAUJO, H.W.C.; ANDRADE, R.F.S.; MONTERO-RODRÍGUEZ, D.; SANTOS, V.P.; MAIA, P.C.V.S.; COSTA FILHO, C.F.B.; SILVA, C.A.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Biochemical identification of molecular newly isolated pigmented bacterium, and improved production of biosurfactant. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, p. 945-954, 2017.

ARAÚJO, H.W.C.; ANDRADE, R.F.S.; MONTERO-RODRÍGUEZ, D.; RUBIO-RIBEAUX, D.; SILVA, C.A.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. **Microbial Cell Factories**, v. 18, n. 1, p. 2, 2019.

ARIVIZHIVENDHAN, V.; MAHESH, M.; MARY, R.R.; SEKARAN, G. Bioactive Prodigiosin Isolated from *Serratia marcescens* using Solid State Fermenter and its Bactericidal Activity Compared with Conventional Antibiotics. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 7, p. 305-312, 2015.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

ARIVIZHIVENDHAN, V.; MAHESH, M.; BOOPATHY, R.; KARTHIKEYAN, S.; MARY, R. R.; SEKARAN, G. Functioned silver nanoparticle loaded activated carbon for the recovery of bioactive molecule from bacterial fermenter for its bactericidal activity. **Applied Surface Science**, v. 427, p. 813-824, 2018.

BAUER, A.M.; KIRBY, M.N.; SHERRIS, J.C. Antibiotics susceptibility test by a standardized single disk methods. **American journal of clinical pathology**, v. 45, p. 493-494, 1996.

BARROS, F.F.C.; PONEZI, A.N.; PASTORE, G.M. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 9, 1071-1078, 2008.

BENNETT, J.; BENTLEY, R. Seeing red: The story of prodigiosin. **Advances in Applied Microbiology**, v. 47, p. 1-32, 2000.

BORIĆ, M.; DANEVČIČ, T.; STOPAR, D. Prodigiosin from *Vibrio sp.* DSM 14379; a new UV-protective pigment. **Microbial Ecology**, v.62, n.3, p. 528-536, 2011.

BURGER, S.R.T.; BENNETT, J.W. Droplet enrichment factors of pigmented and nonpigmented *Serratia marcescens*: possible selective function for prodigiosin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 487-490, 1985.

BRUMANO, L. P.; SOLER, M. F.; DA SILVA, S. S. Recent advances in sustainable production and application of biosurfactants in Brazil and Latin America. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 31-39, 2016.

CANG, Song et al. High production of prodigiosin by *Serratia marcescens* grown on ethanol. **Biotechnology letters**, v. 22, n. 22, p. 1761-1765, 2000.

CAMILIOS NETO, D.; MEIRA, J.A.; ARAÚJO, J.M.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Optimization of the production of *rhamnolipids* by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, p. 441- 448, 2008.

CAMILIOS-NETO, D.; BUGAY, C.; SANTANA-FILHO, A.P.; JOSLIN, T.; SOUZA, L.M.; SASSAKI, G.L MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Production of *rhamnolipids* in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean oil. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 89, p. 1395 -1403, 2011.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

CANILHA, L.; SANTOS, V.; ROCHA, G.J.M.; SILVA, J.B.M.; GIULIETTI, M.A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 1467-1475, 2011.

CARVALHO, R.G. C.; CARNEIRO, I. C. R. S.; PINHEIRO, M. S.; PINHEIRO, S. C.; AZEVEDO, P. S. R.; SANTOS, S. D.; COSTA, R. A. F.; LIMA, K. V. B. Caracterização fenotípica e genotípica de *Serratia marcescens* provenientes de Unidade Neonatal de Referência em Belém, Pará, Brasil. **Revista Pan-Amaz Saúde**, v. 1, n. 1, 2010.

CASTRO, A.J. Antimalarial activity of prodigiosin. **Nature**, v. 213, p. 903-904, 1967.

CASTRO, A.J.; GALE, G.R.; MEANS, G.E.; TERTZAKIAN, G. Antimicrobial properties of pyrrole derivatives. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 29-32, 1967.

CHANG, C.C. ; CHEN, W.C.; HO, T.F.; WU, H.S.; WEI, Y.H. Development of natural antitumor drugs by microorganisms. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, n. 5, p. 501-511, 2011.

CHANDEL, A.K.; SINGH, O.; WEEDY. Lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: advancing the generation of 'biofuel'. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 1289 -1303, 2011.

CHANDEL, A.K.; DA SILVA, S.S.; CARVALHO, W.; SINGH, O.V. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of chemical technology and biotechnology**. v. 87, n 1, p. 11 - 20, 2012.

CHEN, W.C.; JUANG, R.S.; WEI, Y.H. Application of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biocemical Engineering Journal**, v. 103, p. 158-169, 2015.

CLEMENTS, T.; NDLOVU, T.; KHAN, S.; KHAN, W. Biosurfactants produced by *Serratia* species: Classification, biosynthesis, production and application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2018.

CLIF, M.D.; THOMSON, R.J. Development of a Merged Conjugate Addition/Oxidative Coupling.Sequence. Application to the Enantioselective Total Synthesis of Metacycloprodigiosin and Prodigiosin R1. **Journal Chemical Society**, v. 131, n.40, p.14579 -14583, 2009.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

COSTA, J.A.V.; TREICHEL, H.; SANTOS, L.O.; MARTINS, V.G. Solid-State Fermentation for the Production of Biosurfactants and Their Applications. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. **Elsevier B.V. All rights reserved**, 2018.

COSTA, A.M.; BUENO, K. T. L.; ROSA, A.P.C.; COSTA, J.A.V. The antioxidant activity of nanoemulsions based on lipids and peptides from *Spirulina sp.* LEB18, LWT. **Journals & Books**, v. 99, p. 173 -178, 2019.

DARSHANE, N.; MANONMANI, H.K. Prodigiosin and its possible applications. **Journal Food Technology**, v. 52, 2015.

DAVARAJ, N.; DHANASEKARAN, D.; THAJUDDIN, N.; PANNEERSELVAM, A. Production of prodigiosin from *Serratia marcescens* and its Cytotoxicity activity. **Journal of Pharmacy Research**, v. 2, p. 590 - 593, 2009.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: Production, purification and characterization. **Colloids and Surfaces B. Biointerfaces**, v. 79, p. 246 - 253, 2010.

DEORUKHKAR, A.A., CHANDER, R., GHOSH, S.B. & SAINIS, K.B. Identification of a red-pigmented bacterium producing a potent anti-tumor N-alkylated prodigiosin as *Serratia marcescens*. **Research Microbiology**, v. 158, p. 399-404, 2007.

DO NASCIMENTO FILHO, W.B.; FRANCO, C.R. Avaliação do potencial dos resíduos produzidos através do processamento agroindustrial do Brasil. **Revista virtual de química**, v. 7, n. 6, p. 1968 -1987, 2015.

DOZIE-NWACHUKWU, S.O.; DANYUO, Y.; OBAYEMI, J.D.; ODUSANYA, O.S.; MALATESTA, K.; SOBOYEJO, W.O. Extraction and encapsulation of prodigiosin in chitosan microspheres for targeted drug delivery, v. 71, p. 268 -278, 2017.

DIAZ-RUIZ.; MONTANER, B.P.; PÉREZ-TOMÁZ, R. Prodigiosin induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in gastric cancer cell line HGT-1. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 887- 899, 2001.

DUZHAK, A.B.; PANFILOVA, Z.I.; DUZHAK, T.G.; VASYUNINA, E.A.; SHTERNSHIS, M.V. Role of prodigiosin and chitinases in antagonistic activity of the bacterium *Serratia marcescens* against the fungus *Didymella applanata*. **Biochemistry**, v. 77, p. 910 - 916, 2012.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

ELLIOTT, D.C.; ORTH, R.J.; GAO, J.; WERPY, T.A.; EAKIN, D.E.; SCHMIDT, A.J. Biorefinery concept development based on wheat flour milling. In **Jounal Crockett, & C. L. Peterson** (Eds.), *Bioenergy 2002*. Pacific Regional Biomass Energy Program, Boise, 2002.

ELAHIAN, F.; MOGHIMI, B.; DINMOHAMMADI, F.; GHAMGHAMI, M.; HAMIDI, M.; MIRZAEI, A.S. The anticancer agent prodigiosin is not a multidrug resistance protein substrate. **DNA Cell Biology**, v. 32, n. 3, p. 90-97, 2013. Texto disponível em: <<https://doi.org/10.1089/dna.2012.1902>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

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

EI-BAKRY, M.; ABRAHAM, J.; CERDA, A.; BARRENA, R.; PONSÁ, S.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. From wastes to high value added products: Novel aspects of SSF in the production of enzymes. **Process Biochemical**, v. 29, p.109 -117, 2015.

ELSHIKH, M.; AHMED, S.; FUNSTON, S.; DUNLOP, P.; MCGAW, M.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Rezazurin-based 96-wel plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. **Biotechnology Letters**, v.38, p. 1015-1019, 2016.

FERREIRA-LEITÃO, V.S.; CAMMAROTA, M.C.; GONÇALVES A. E.C.; VASCONCELOS DE SÁ, L.R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, D.M.G. The Protagonism of Biocatalysis in Green Chemistry and Its Environmental Benefits. **Catalysts**, v. 7, n. 1, p. 9, 2017.

FURSTNER, A.; GRABOWSKI, E.J. Studies on DNA cleavage by cytotoxic pyrrole alkaloids reveal the distinctly different behavior of roseophilin and prodigiosin derivatives. **ChemBioChem**, v. 9, p. 706-709, 2001.

FURSTNER, A. Chemistry and biology of roseophilin and the prodigiosin alkaloids: a survey of the last 2500 years. **Angewandte Chemie**, v. 42, n. 31, p. 3582-3603, 2003.

GENES, C.; BAQUERO, E.; ECHEVERRI, F.; MAYA, J.D.; TRIANA, O. Mitochondrial dysfunction in *Trypanosoma cruzi*: the role of *Serratia marcescens* prodigiosin in the alternative treatment of Chagas disease. **Parasites Vectors**, v. 4, p. 66, 2011.

GERBER, N.N. Prodigiosin-like pigments. **CRC Crit Revista Microbiology**, p. 469 - 485, 1975a.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

GERBER, N.N. New prodiginine (prodigiosin-like) pigment from *Streptomyces*. Antimalarial activity of several prodiginines. **Journal of Antibiotics**, v. 28, p. 194 –199, 1975b.

GIRI, A.; ANANDKUMAR, G.; MUTHUKUMARAN, G.; PENNATHU. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. **BMC Microbiology**, v. 4, p.11-18, 2004.

GURYANOV, I.D.; KARAMOVA, N.S.; YUSUPOVA, D.V.; GNEZDILOV, O.I.; KOSHKAROVA, L.A. Bacterial pigment prodigiosin and its genotoxic effect. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 39, p. 106 -11, 2013.

GUDIÑA, E.J., ROCHA, V., TEIXEIRA, J.A., RODRIGUES, L.R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. **Lett Journal of Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 419 - 424, 2010.

HADDIX, P.L.; JONES, S.; PATEL, P.; BURNHAM, S.; KNIGHTS, K.; POWELL, J.N.; LAFORM, A. Kinetic analysis of growth rate, ATP, and pigmentation suggests an energy-spilling function for the pigment prodigiosin of *Serratia marcescens*. **Journal Bacteriology**. v. 190, p. 7453-7463, 2008.

HADDIX, P.L.; SHANKS, R.M.Q. Production of prodigiosin pigment by *Serratia marcescens* is negatively associated with cellular ATP levels during high-rate, low-cell-density growth. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 243-255, 2020. Disponível em: < <https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0548>>. Acesso em: 28 fev. 2020.

HAGE-HUÈLSMANN, J.; GRUÈNBERGER, A.; THIES, S.; SANTIAGO-SCHUBEL, B.; KLEIN, A.S.; PIETRUSZKA, J.; BINDER, D.; HILGERS, F.; DOMROSE, A.; DREPPER, T.; KOHLHEYER, D.; JAEGER, K.; LOESCHCKE, A. Natural biocide cocktails: Combinatorial antibiotic effects of prodigiosin and Biosurfactants, 2018. Texto disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200940>>. Acesso em: 06 maio 2019.

HAMRE, A.G.; JANA, S.; HOLEM, M.M.; MATHIESEN, G.; VALJAMAE, P.; PAYNE, C.M.; SORLIE, M. Thermodynamic relationships with processivity in *Serratia marcescens* family 18 chitinases. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 30, p. 9601- 9613, 2015.

HAN, S.B.; KIM, H.M.; KIM, Y.H.; LEE, C.W.; JANG, E.S.; SON, K.H.; KIM, S.U.; KIM, Y.K. T-cell specific immunosuppression by prodigiosin isolated from *Serratia marcescens*. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 20, p.1-13, 1998.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

HAN, S.B.; PARK, Y.J.; JEON, Y.K.; KIM, H.M.; YANG, K.H. Prodigiosin blocks T cell activation by inhibiting interleukin 2Ra expression and delays progression of autoimmune diabetes and collagen- induced arthritis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 299, p. 415-425, 2001.

HEJAZI, A.; FALKINER, F.R. *Serratia marcescens*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 46, p. 903 - 912, 1997.

HERRÁEZ, R.; MUR, A.; MERLOS, A.; VIÑAS, M.; VINUESA, T. Using prodigiosin against some gram-positive and gram-negative bacteria and *Trypanossoma cruzi*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, p. 1 - 8, 2019.

HO, T.F.; MA, C.J.; LU, C.H.; TSAI, Y.T.; WEI, Y.H.; CHANG, J.S.; LAI, J.K.; CHEUH, P.J.; YEH, C.T.; TANG, P.C.; CHANG, J.; KO, J.L.; LIU, F.S.; YEN, H.; CHANG, C.C. Undecylprodigiosin selectively induces apoptosis in human breast carcinoma cells independent of p53. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 225, p. 318 - 328, 2007.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Genus *Serratia*, p. 187. In Bergey's manual of determinative bacteriology, **ed. 9th**, 1994.

IBRAHIM, D.; NAZARI, T.F.; KASSIM, J.; LIM, S.H. Prodigiosin-an antibacterial red pigment produced by *Serratia marcescens* IBRL USM 84 associated with a marine sponge *Xestospongia testudinaria*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 4, p. 1 – 6, 2014. Texto disponível em: Disponível em: <<https://doi.org/10.7324/JAPS.2014.40101>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

JEONG, H.; YIM, J.H.; LEE, C.; CHOI, S.H.; PARK, Y.K.; YOON, S.H.; HUR, C.G.; KANG, H.Y.; KIM, D.; LEE, H.H.; PARK, K.H.; PARK, S.H.; PARK, H.S.; LEE, H.K.; OH, T.K.; KIM, J.F. Genomic blueprint of *Hahella chejuensis*, a marine microbe producing an algicidal agent. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 7066 -73, 2005.

JONES, J.D.G.; GRADY, K.L.; SUSLOW, T.V.; BEDBROOK, J.R. Isolation and characterization of genes encoding two chitinase enzymes from *Serratia marcescens*. **EMBO Journal**, v. 5, p. 467- 473, 1986.

KAUR, S.; DHILLON, G.S.; SARMA, S.J.; BRAR, S.K.; MISRA, K.; OBEROI, H.S. Waste biomass: a prospective renewable resource for development of bio-based economy/processes.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

In Biotransformation of Waste Biomass into High Value Biochemicals. **Springer New York**, p. 3 - 28, 2014.

KALIVODA, E.J.; STELLA, N.A.; ASTON, M.A.; FENDER, J.E.; THOMPSON, P.P.; KOWALSKI, R.P.; SHANKS, R.M.Q.; CAMPBELL, C.T. Cyclic AMP negatively regulates prodigiosin production by *Serratia marcescens*. **Research Microbiology**, v. 161, n. 2, p.158 - 67, 2010.

KIM, Y; KIM, K.; SEO, J.; SHRESTHA, S.; KIM, H.H., NALINI, M.; YI, Y. Identification of an entomopathogenic bacterium, *Serratia sp.* ANU101, and its hemolytic activity. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 314-322, 2009.

KOBAYASHI, N.; ICHIKAWA, Y. A protein associated with prodigiosin formation in *Serratia marcescens*. **Microbiology and Immunology**, v. 33, p. 257- 263, 1989.

KHANAFARI, A.; ASSADI, M.M.; FAKHR, F.A. Review of prodigiosin, pigmentation in *Serratia marcescens*. **Journal of Biological Sciences**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2006.

KIM, H.S.; YOO, B.D.; LEE, C.H.; SUH, H.H; OH, H.M.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **Journal of Fermentation Bioengineering**, v. 84, n. 1, p. 41- 46, 1997.

LAPENDA, J.C.; SILVA, P.A.; VICALVI, M.C.; SENA, K.X.F.R.; NASCIMENTO, S.C. Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398. **World J Microbiology Biotechnology**, v. 31, p. 399 - 406, 2015.

LAZARO, J.E.; NITCHEU, J.; PREDICALA, R.Z.; MANGALINDAN, G.C.; NESSLANY, F.; MARZIN, D.; CONCEPCION, G.P.; DIQUET, B. Heptyl prodigiosin, a bacterial metabolite, is antimalarial in vivo and non-mutagenic in vitro. **Journal of Natural Toxins**, v. 11, p. 367- 377, 2002.

LEDERMAN, W.D. Shakespeare and prodigious history of *Serratia marcescens* as a biological market. **Revista Chil**, v. 74-75, 2003.

LETOFFE, S.; NATO, F.; GOLDBERG, M.E.; WANDERSMAN, C. Interactions of HasA, a bacterial haemophore, with haemoglobin and with its outer membrane receptor HasR. **Molecular Microbiology**, v. 33, p. 546 -55, 1999.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

LI, D.; LIU, J.; WANG, X.; KONG, D.; DU, W.; LI, H.; HSE, C.H.; SHUPE, T.; ZHOU, D.; ZHAO, K. Biological Potential and Mechanism of Prodigiosin from *Serratia marcescens* Subsp. *lawsoniana* in Human Choriocarcinoma and Prostate Cancer Cell Lines. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3465, 2018.

LIN, C.; JIA, X.; FANG, Y. ; CHEN, L.; ZHANG, H.; LIN, R.; CHEN, J. Enhanced production of prodigiosin by *Serratia marcescens* FZSF02 in the form of pigment pellets. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 40, p. 58-64, 2019.

LIU, R.; CUI, C.B.; DUAN, L.; GU, Q.Q; ZHU, W.M. Potent in vitro anticancer activity of metacycloprodigiosin and undecylprodigiosin from a sponge-derived actinomycete *Saccharopolyspora sp. nov.* **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, p.1341-1344, 2005.

LIZARDI-JIMÉNEZ, M.A.; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R. Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass, **3 Biotechnology**, v. 7, p. 44, 2017.

LUNA, J.M.; SARUBBO, L.; TAKAKI, G.M.C. A New Biosurfactant Produced by *Candida glabrata* UCP 1002: Characteristics of Stability and Application in Oil Recovery. **Braz. Arch. Biology and Technology**, v. 52, n. 4, p. 785-793, 2009.

LUO, M.F.; XING, J.M.; GOU, S.; LI, H.Z.; LIU, J.Y.C.; CHEN, J.Y. Desulfurization of dibenzothiophene by lyophilized cells of *Pseudomonas delafieldii* R-8 in the presence of dodecane. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 1-6, 2003.

LUTI, K.J.K.; YONIS, W.R.; MAHMOUD, S.T. An Application of Solid State Fermentation and Elicitation with Some Microbial Cells for the Enhancement of Prodigiosin Production by *Serratia marcescens*. **Journal of Al-Nahrain University**, v. 21, n. 2, p. 98-105, 2018.

MAGAE, J.; MILLER, M.W.; NAGAI, K.; SHEARER, G.M. Effect of metacycloprodigiosin, an inhibitor of killer T cells on murine skin and heart transplants. **Journal of Antibiotics**, v. 49, p. 86-90, 1996.

MAHAJAN, D.M.; MASAND, V.H.; PATIL, K.N.; HADDA, T.B.; JAWARKAR, R.D.; THAKUR, S.D.; RASTIJA, V. COMSIA and POM analyses of anti-malarial activity of synthetic prodiginines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 4827- 4835, 2012.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

MAHAJAN, D.T.; MASAND, V.H.; PATIL, K.N.; HADDA, T.B.; RASTIJA, V. Integrating GUSAR and QSAR analyses for antimalarial activity of synthetic prodiginines against multi drug resistant strain. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, p. 2284 -2292, 2013.

MAIER, R.M.; SOBERON-CHAVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids*: biosynthesis and potential, 2002.

MANDERVILLE, R.A. Double-strand DNA cleavage by copperprodigiosin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, p. 6333 - 6334, 2000.

MATSUYAMA, T.; MURAKAMI, T.; FUJITA, M.; FUJITA, S.; YANO, I. Extracellular vesicle formation and biosurfactant production by *Serratia marcescens*. **Journal of general microbiology**, v. 132, p. 865 -875, 1986.

MATSUYAMA, T., TANIKAWA, T.; NAKAGAWA, Y. *Serrawettins* and other surfactants produced by *Serratia*. In Biosurfactants. **Springer Berlin Heidelberg**, p. 93 -120, 2011.

MATHLOM, G.S.; HAYDER, N.H.; MAHMOOD, M.S. Synergistic effect of biosurfactant and prodigiosin produced by *Serratia marcescens* as antimicrobial agente. **Current Research in Microbiology and Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 1601 -1615, 2018.

MCRARY, W.L.; BEAVER, E.L.; NOBLE, E.R. In vitro effects of prodigiosin and other antibiotics on *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 2, p. 125 -128, 1953.

MEHTA, M.; SHAH, G. Extraction of pigment from *Serratia marcescens* and its application in candle industry. **Advances in Applied Research**, v. 7, n. 2, p. 144 -146, 2015.

MELVIN, M.S.; FERGUSON, D.C.; LINDQUIST, N.; MANDERVILLE, R.A. DNA binding by 4-methoxypyrrolic natural products. Preference for intercalation at ATsites by tambjamine E and prodigiosin. **Journal of Organic Chemistry**, v. 64, p. 6861- 6869, 1999.

MELVIN, M.S.; TOMLINSON, J.T.; SALUTA, G.R.; KUCERA, G.L.; LINDQUIST, N.; MESCHKE, H.; WALTER, S.; SCHREMPF, H. Characterization and localization of prodiginines from *Streptomyces lividans* suppressing *Verticillium dahliae* in the absence or presence of *Arabidopsis thaliana*. **Environmental Microbiology**, v. 14, p. 940 - 952, 2012.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

MITCHELL, D.A; KRIEGER, N.; STUART, D.M.; PANDEY, A. New developments in solid state fermentation. II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1211 -1225, 2000.

MNIF, I.; ELLEUCH, M.; CHAABOUNI, S.E.; GHRIBI, D. Bacillus subtilis SPB1 biosurfactant: Production optimization and insecticidal activity against the carobmoth *Ectomyelois ceratoniae*. **Crop Protection**, v. 50, p. 66 -72, 2013.

MOHEBALI, G.; BALL, A.S. Biocatalytic desulfurization (BDS) of petrodiesel fuels. **Microbiology**, v. 154, p. 2169 -2183, 2008.

MONTANER, B., et al. Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, p. 585-393, 2000.

MONTANER, B.; PÉREZ-TOMÁS, R. The prodigiosins: a new family of anticancer drugs. **Curr Cancer Drug Targets**, v. 3, p.57- 65, 2003.

MONTANER, B.; CASTILLO-AVILA, W.; MARTINELL, M.; OLLINGER, R.; AYMAMI, J.; GIRALT, E.; PEREZ-TOMAS, R. DNA interaction and dual topoisomerase I and II inhibition properties of the anti-tumor drug prodigiosin. **Toxicological Sciences**, v. 85, p.870 - 879, 2005.

MORALES, D.P.; TAYLOR, A. S.; FARMER, S.C. Desulfurization of Dibenzothiophene and Oxidized Dibenzothiophene Ring Systems. **Molecules**, v. 15, p. 1265-1269, 2010.

MOROHOSHI, T.; SHIONO, T.; TAKIDOUCHI, K.; KATO, M.; KATO, N.; KATO, J., IKEDA, T. Inhibition of Quorum Sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by Synthetic Analogs of N-Acylhomoserine Lactone. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 6339-6344, 2007.

MONREAL, J.; REESE, E.T. The chitinase of *Serratia marcescens*. **Can Journal Microbiology**, v. 15, p. 689 - 696, 1969.

MONTERO-RODRÍGUEZ, D; ANDRADE, R.F.; RIBEIRO, D.L R.; RUBIO-RIBEAUX, D.; LIMA, R.A.; ARAÚJO, H.W.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Bioremediation of petroleum derivative using biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 in low-cost medium. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 4, n. 7, p. 550 -562, 2015.

MONTERO-RODRÍGUEZ, D. et al. A low-cost solid fermentation medium for potential prodigiosin production by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549. In: **Microbes in the**

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

Spotlight: Recent Progress in the Understanding of Beneficial and Harmful Microorganisms, p. 312 -315, 2016.

MONTERO-RODRÍGUEZ, D.; ANDRADE, R.F.S.; RUBIO-RIBEAUX, D.; SILVA, T.A.L.; SILVA, G.K.B.; ARAÚJO, H.W.C.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Suitability of wheat bran as promising substrate for coproduction of prodigiosin and biosurfactant by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549. In: Méndez-Vilas A, editor. **Exploring microorganisms: recent advances in applied microbiology**. Badajoz: **BrownWalker Press**, p. 149 -153, 2018.

NAKASHIMA, T.; KURACHI, M.; KATO, Y.; YAMAGUCHI, K.; ODA, T. Characterization of bacterium isolated from the sediment at Coastal area of Omura Bay in Japan and several biological activities of pigment produced by this isolate. **Microbiology Immunology**, v. 49, p. 407- 415, 2005.

NAKASHIMA, T.; KATO, Y.; YAMAGUCHI, K.O.T. Evaluation of the anti-Trichophyton activity of a prodigiosin analogue produced by gamma-proteobacterium, using stratum corneum epidermis of the Yucatan micropig. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 11, p.123 -128, 2005.

NAKASHIMA, T.; KURACHI, M.; KATO, Y.; YAMAGUCHI, K.; ODA, T. Producing mechanism of an algicidal copound against red tide phytoplankton in a marine bacterium *γ-proteibacterium*. **Applied Microbiology Biotchenology**, v. 73, n. 3, p. 684 - 90, 2006.

NAKAMURA, A.; NAGAI, K.; ANDO, K.; TAMURA, G. Selective suppression by prodigiosin of the mitogenic response of murine splenocytes. **Journal of Antibiotics**, v. 39, p.1155 -1159, 1986.

NALINI, S.; PARTHASARATHI, R. Production and characterization of rhamnolipids produced by *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its application as biocontrol agente. **Bioresource Technology**, v. 173, p. 231 - 238, 2014.

NALINI, S.; PARTHASARATHI, R. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production from *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its biocontrol efficacy against Fusarium wilt of eggplant. **Annals of Agrarian Science**, v. 16, p. 108 -115, 2018.

NEVES, M.A.; KIMURA, T.; SHIMIZU, N.; SHIIBA, K. Production of alcohol by simultaneous saccharification and fermentation of low-grade wheat flour. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 481 - 490, 2015.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

OLIVEIRA, E.C.P.; LAMEIRA, O.A.; SOUSA, F.I.B.; SILVA, R.J.F. Estrutura foliar de curauá em diferentes intensidades de radiação fotossinteticamente ativa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.2, p.163 -169, 2008.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2, p. 81-84, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T, Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69 - 80, 2000.

PAPIREDDY, K.; SMILKSTEIN, M.; KELLY, J.X.; SALEM, S.M.; ALHAMADSHEH, M.; HAYNES, S.W.; CHALLIS, G.L.; REYNOLDS, K.A. Antimalarial activity of natural and synthetic prodiginines. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.54, p. 5296 - 5306, 2011.

PATIL, C.D.; PATIL, S.V.; SALUNKE, B.K.; SALUNKHE, R.B. Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* NMCC46 as a mosquito larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Parasitology**, v. 109, n. 4, p. 1179 - 87, 2011.

PEREZ-THOMAS, R.; MONTANER, B.; LLAGOSTERA, E.; SOTO-CERRATO, V. The prodigiosins, proapoptotic drugs with anticancer properties. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1447-1452, 2003.

PEREZ-TOMAS, R.; VINAS, M. New insights on the antitumoral properties of prodiginines. **Current Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 2222 - 2231, 2010.

PORTUGAL-PEREIRA, J.; SORIA, R.; RATHMANN, R.; SCHAEFFER, R.; SZKLO, A. Agricultural and agro-industrial residues-to-energy: Techno-economic and environmental assessment in Brazil. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 521 - 533, 2015.

POULTER, S.; CARLTON, T.M.; SU, X.; SPRING, D.R.; SALMOND, G.P. Engineering of new prodigiosin-based biosensors of *Serratia* for facile detection of short-chain N-acyl homoserine lactone quorum sensing molecules. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, p. 322 -328, 2010.

PRIYA, K.A.; SATHEESH, S.; ASHOKKUMAR, B.; VARALAKSHMI, P.; SELVAKUMAR, G.; SIVAKUMAR, N. Antifouling activity of prodigiosin from estuarine isolate of *Serratia marcescens* CMST 07. **Microbiological Research in Agroecosystem Management**, Springer, New Delhi, v. 16, 2013.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S.S. Novel Sucrose Lipid Produced by *Serratia marcescens* and It's Application in Enhanced Oil Recovery. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 3, n. 4, p. 533 - 537, 2000.

RAVINDRAN, R.; JAISWAL, A.K. Exploitation of food industry waste for high-value products. **Trends in biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 58 - 69, 2016.

REGOURD, J.; ALI, A.S.A.; THOMPSON, A. Synthesis and Anti-Cancer Activity of C-Ring-Functionalized Prodigiosin Analogues. **Canada Journal Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 1528-1536, 2007.

REN, Y.; GONG, J.; FU, R.; LI, Z.; LI, Q.; ZHANG, J.; CHENG, X. Dyeing and antibacterial properties of cotton dyed with prodigiosins nanomicelles produced by microbial fermentation. **Dyes and Pigments**, v. 138, p. 147-153, 2017.

RYAZANTSEVA, I.N.; SAAKOV, V.S.; ANDREYEVA, I.N.; OGORODNIKOVA, T.I.; ZUEV, Y.F. Response of pigmented *Serratia marcescens* to the illumination. **Journal Photochem Photobiology B**, v. 106, p. 18-23, 2012.

RODRÍGUEZ, D.M. et al. Solid-State Fermentation for Simultaneous Production of Prodigiosin and Biosurfactant by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549. v. 60, 2018.

ROCHA e SILVA, N.M.P.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SANTOS; V.A.; SARUBBO, L.A. Screening of *Pseudomonas species* for biosurfactant production using low-cost substrates Biocatal. **Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 132 -139, 2014.

SARVAIYA, N.; KOTHARI, V. Effect of Audible Sound in Form of Music on Microbial Growth and Production of Certain Important Metabolites. **Microbiology**, v. 84, n. 2, p. 227- 235, 2015.

SATO, T.; KONNO, H.; TANAKA, Y.; KATAOKA, T.; NAGAI, K.; WASSERMAN, H.H.; OHKUMA, S. Prodigiosins as a new group of H⁺/Cl⁻ symporters that uncouple proton translocators. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 21455 - 21462, 1998.

SCHLOSS, P.D.; ALLEN, H.K.; KLIMOWICZ, A.K.; MLOT, C.; GROSS, J.A.; SAVENGSUKSA, S.; MCELLIN, J.; CLARDY, J.; RUESS, R.W.; HANDELSMAN, J. Psychrotrophic strain of *Janthinobacterium lividum* from a cold Alaskan soil produces prodigiosin. **DNA Cell Biology**, v. 29, p. 533 - 541, 2010.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

Serratia marcescens: milagre do bacilo. Texto disponível em: <
<http://pt.allanswers.site/quimica/serratia-marcescens-milagre-bacilo.php>>. Acesso em 24 mar.
2019.

SILVA, S.N.R.L.; FARIAS, C.B.B.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 79, p. 174 -183, 2010.

SINGH, B.; VISHWAKARMA, R.A.; BHARATE, S.B. QSAR and pharmacophore modeling of natural and synthetic antimalarial prodiginines. *Current Computer-Aided Drug Design*, v. 9, p. 350 - 359, 2013.

SINGH, P.; PATIL, Y.; RALE, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of Applied Microbiology*, v. 126, n. 1, p. 2-13, 2019.

SINGHANIA, R.R.; SUKUMARAN, R.K.; PATEL, A.K.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 46, n. 7, p. 541-549, 2010.

SOCOL, C.R.; DA COSTA, E.S.F.; LETTI, L.A.J.; KARP, S.G.; WOICIECHOWSKI, A.L.; DE SOUZA V.L.P. Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*, 2017.

SONG, M.J.; Bae, J.; Lee, D.S.; Kim, C.H.; Kim, J.S.; Kim, S.W.; Hong, S.I. Purification and characterization of Prodigiosin produced by integrated bioreactor from *Serratia sp.* KH-95. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 101, p. 157 -161, 2006.

SONGIA, S.; MORTELLARO, A.; TAVERNA, S.; FORNASIERO, C.; SCHEIBER, E.A.; ERBA, E.; COLOTTA, F.; MANTOVANI, A.; ISETTA, A.M.; GOLAY, J. Characterization of the new immunosuppressive drug undecylprodigiosin in human lymphocytes: retinoblastoma protein, cyclin-dependent kinase-2, and cyclin-dependent kinase-4 as molecular targets. *Journal Immunology*, v. 158, p. 3987- 3995, 1997.

SOMEYA, N.; NAKAJIMA, A.; HIRAYAE, K.; HIBI, A.; AKUTSU, K. Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by biocontrol bacterium, *Serratia marcescens* strain B2 against gray mold pathogen, *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology*, v. 67, p. 312 - 317, 2001.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

SORATHIYA, H.H.; SHAH, N.M. Studies on bioactive prodigiosin of *Serratia marcescens* isolated from natural sources. **International Journal of Sciences & Applied Research**, v. 6, n. 1, p. 26 -36, 2019.

SUBBANNA, A.R.N.S.; RAJASEKHARA, H.; STANLEY, J.; MISHRA, K.K.; PATTANAYAK, A. Pesticidal prospectives of chitinolytic bacteria in agricultural pest management. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 116, p. 52 - 66, 2018.

SUMATHI, C.; MOHANA, P.D.; SWARNALATHA, S.; DINESH, M.G.; SEKARAN, G. Production of Prodigiosin Using Tannery Fleshing and Evaluating Its Pharmacological Effects. **The Scientific World Journal**, p. 8, 2014.

SURYAWANSHI, R.K.; PATIL, C.D.; BORASE, H.P.; NARKHEDE, C.P.; STEVENSON, A.; HALLSWORTH, J.E.; PATIL, S.V. Towards an understanding of bacterial metabolites prodigiosin and violacein and their potential for use in commercial sunscreens. **International journal of cosmetic science**, v. 37, n. 1, p. 98 -107, 2015.

SURYAWANSHI, R.K.; PATIL, C.D.; BORASE, H.P.; NARKHEDE, C.P.; SALUNKE, B.K.; PATIL, S.V. Mosquito larvicidal and pupaecidal potential of prodigiosin from 46 *Serratia marcescens* and understanding its mechanism of action. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 123, p. 49 - 55, 2015.

STANKOVIC, N.; RADULOVIC, V.; PETKOVIC, M.; VUCKOVIC, I.; JADRANIN, M.; VASILJEVIC, B.; NIKODINOVIC-RUNIC, J. *Streptomyces* sp. JS520 produces exceptionally high quantities of *undecylprodigiosin* with antibacterial, antioxidative, and UV-protective properties. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 96, p. 1217 -1231, 2012.

STANKOVIC, N.; SENEROVIC, L.; ILIC-TOMIC, T.; VASILJEVIC, B.; NIKODINOVIC-RUNIC, J. Properties and applications of undecylprodigiosin and other bacterial prodigiosins. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 98, p. 3841 - 3858, 2014.

STEPKOWSKI, S.M.; NAGY, Z.S.; WANG, M.E.; BEHBOD, F.; ERWIN-COHEN, R.; KAHAN, B.D.; KIRKEN, R.A. PNU156804 inhibits Jak3 tyrosine kinase and rat heart allograft rejection. **Transplantation Proceedings**, v. 33, p. 3272 - 3273, 2001.

STOCK, I.; GRUEGER, T.; WIEDEMANN, B. Natural antibiotic susceptibility of strains of *Serratia marcescens* and the *S. liquefaciens* complex: *S. liquefaciens* sensu stricto, *S.*

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

proteamaculans and *S. grimesii*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, p. 35 - 47, 2003.

SZYDEK, L.D. Influence of *Serratia marcescens* pigmentation on cell concentrations in aerosols produced by bursting bubbles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, p.173 -178, 1985.

TSUJI, R.F.; YAMAMOTO, M.; NAKAMURA, A.; KATAOKA, T.; MAGAE, J.; NAGAI, K.; YAMASAKI, M. Selective immunosuppression of prodigiosin 25-C and FK506 in the murine immune system. **Journal of Antibiotics**, v. 43, p. 1293 -1301, 1990.

TENCONI, E.; GUICHARD, P.; MOTTE, P.; MATAGNE, A.; RIGALI, S. Use of red autofluorescence for monitoring prodiginine biosynthesis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 93, p. 138 -142, 2013.

TOMLINSON, J.T.; PARK, G.; JACOB, A.M.; GREGORY, L.K.; KEVIN, H.; RICHARD, A.M. Protoinduced cytotoxicity and thioadduct formation by a prodigiosin analogue. **Organic Letters**, v. 8, n. 21, p. 4951 - 4954, 2006.

THAKUR, S.; SHARMA, N.K.; THAKUR, N.; BHALLA, T.C. Organic solvent tolerant metallo protease of novel isolate *Serratia marcescens* PPB-26: production and characterization. **3 Biotechnology**, v. 6, n. 2, p.180, 2016.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146 -161, 2013.

THOMSON, N.R.; CROW, M.A.; MCGOWAN, S.J.; COX, A.; SALMOND, G.P.C. Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. **Molecular Microbiology**, v. 36, p. 539 - 556, 2000.

VELMURUGAN, P.; HUR, H.; BALACHANDAR, V.; KAMALA-KANNAN, S.; LEE, K-J.; LEE, S-M.; CHAE, J.; SHEA, P.; OH, B-T. "Monascus pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate". **Papers in Natural Resources**, p. 378, 2011. Texto disponível em: < <http://digitalcommons.unl.edu/natrespapers/378>>. Acesso em: 18 mar. 2018.

WANG, M.; KIRKEN, R.; BEHBOD, F.; ERWIN-COHEN, R.; STEPKOWSKI, S.M.; KAHAN, B.D. Inhibition of Jak3 tyrosine kinase by PNU156804 blocks rat heart allograft rejection. **Transplantation Proceedings**, v. 33, p. 201, 2001.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

WANG, Y.; ZHAO, K. Progress in Microbial Production of Prodigiosin. **Journal of Biological and Medical Sciences**, v. 2, n. 2, 2018.

WHITE, C.; SHARMAN, A.K.; GADD, G.M. An integrated microbial process for the bioremediation of soil contaminated with toxic metals. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 258 - 263, 1999.

WILLIAMS, R.P.; HEARN, W.P. Prodigiosin in: gottlieb d, shaw pd. antibiotics. **Springer New York**, v. 2, p. 410 - 432, 1967.

WILLIAMSON, P.C.; FINERAN, F. J.; LEEPER, G.; SALMOND, P.C.; NEIL R. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginine. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 887 - 899, 2006.

WILLIAMSON, N.R.; FINERAN, P.C.; GRISTWOOD, T.; CHAWRAI, S.R.; LEEPER, F.J.; SALMOND, G.P.C. Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines. **Future Microbiology**, v. 2, p. 605 - 618, 2007.

WILF, N.M.; SALMOND, G.P. The stationary phase sigma factor, RpoS, regulates the production of a carbapenem antibiotic, a bioactive prodigiosin and virulence in the enterobacterial pathogen *Serratia* sp. ATCC 39006. **Microbiology**, v. 158, p. 648 - 658, 2012.

XIA, Y.; WANG, G.; LIN, X.; SONG, X.; AI, L. Solid-state fermentation with *Serratia marcescens* Xd-1 enhanced production of prodigiosin by using bagasse as an inertia matrix. **Ann Microbiology**, v. 66, p. 1239 -1247, 2016.

XU, F.; XIA, S.; YANG, Q. Strategy for Obtaining Inexpensive Prodigiosin Production by *Serratia Marcescen*. In 3rd International Conference on Chemical, **Biological and Environmental Engineering**, v. 20, 2011.

XU, Q.; NAKAJIMA, M.; LIU, Z.; SHIINA, T. Biosurfactants for Microbubble Preparation and Application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 4620 - 475, 2011b.

YAMASHITA, M.; NAKAGAWA, Y.; LI, H.; MATSUYAMA, T. Silica-gel dependent production of prodigiosina and *serrawettins* by *serratia marcescens* in a liquid culture. **Microbe Environml**, v. 16, n. 4, p. 250 – 254, 2001.

YANG, A.; ZUO, L.; CHENG, Y.; WU, Z.; LI, X.; TONG, P.; CHEN, H. Degradation of major allergens and allergenicity reduction of soybean meal through solid-state fermentation with microorganisms. **Food & Function**, p. 1277 - 1912, 2018.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

YANG, X.; LEE, J. H.; YOO, H. Y.; SHIN, H. Y.; THAPA, L. P.; PARK, C.; KIM, S.W. Production of bioethanol and biodiesel using instant noodle waste. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 8, 2014.

YIP, C-H.; YARKONI, O.; AJIOKA, J.; WAN, K-L.; NATHAN, S. Recent advancements in high-level synthesis of the promising clinical drug, prodigiosin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2019.

YOU, Z.; ZHANG, S.; LIU, X.; ZHANG, J.; WANG, Y.; PENG, Y.; WU, W. Insights into the anti-infective properties of prodiginines. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 7, p. 2873 - 2887, 2019.

ZHANG, J.; SHEN, Y.; LIU, J.; WEI, D. Antimetastatic effect of prodigiosin through inhibition 50 of tumor invasion. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 407 - 414, 2005.

ZHU, H.; HE, C.C.; CHU, Q.H. Inhibition of quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* by pigments extracted from *Auricularia auricular*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 52, p. 269 - 274, 2010.

CAPÍTULO II

Artigo submetido à Revista Environmental Technology**(Qualis A2)****Produção aprimorada de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549 usando substratos de alimentos agroalimentares na fermentação em estado sólido****Renata Andreia dos Santos¹, Dayana Montero-Rodríguez², Lucas Albuquerque Rosendo da Silva³, Galba Maria de Campos-Takaki^{4,*}, Marcos Antônio Barbosa de Lima^{4,5}**

¹Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-900, Recife, Brasil;

²Programa Nacional de Pós-Doutorado PNPd-CAPES, Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-900, Recife, Brasil;

³Graduação em Engenharia Química, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-900, Recife, Brasil;

⁴Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais e Biotecnologia, Universidade Católica de Pernambuco, 50050-900, Recife, Brasil;

⁵Departamento de Biologia, Área de Microbiologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Brasil,

*e-mail do autor para correspondência: galba_takaki@yahoo.com.br; Telef.: +51-81-21194044; Fax: +55-81-21194043.

Resumo

A prodigiosina é um pigmento vermelho natural produzido principalmente pela bactéria *Serratia marcescens*, que é um composto farmacêutico promissor devido às suas propriedades antimicrobianas, imunossupressoras e antiproliferativas. No entanto, seu marketing industrial ainda é limitado devido ao alto custo de produção associado à baixa produtividade. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo investigar a produção de prodigiosina por *S. marcescens* UCP 1549 em fermentação em estado sólido (FES), como uma alternativa sustentável que permite minimizar os custos de produção e o impacto ambiental. Assim, diferentes substratos agroindustriais foram utilizados na formulação do meio de produção de prodigiosina por FES, obtendo-se o rendimento máximo de pigmento vermelho (119,8 g / kg de substrato seco) em meio

composto por 5 g de farelo de trigo e solução impregnante contendo sais (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e 5% de óleo de soja residual. O pigmento foi confirmado como prodigiosina pelo pico máximo de absorbância a 535 nm, Rf 0,9 em TLC e os grupos funcionais identificados pelo espectro infravermelho (FTIR). A prodigiosina mostrou estabilidade em diferentes valores de temperatura, pH e concentrações de NaCl, confirmando sua potencial aplicação em várias áreas industriais. Além disso, o pigmento não apresentou efeitos fitotóxicos nas sementes de repolho (*Brassica oleracea*), alface (*Lactuca sativa*), cebola (*Allium cepa*) e pepino (*Cucumis sativus*) e não mostrou toxicidade para a *Artemia salina* microcrustáceo em diferentes concentrações. Além disso, a prodigiosina demonstrou propriedades antimicrobianas. Esses resultados confirmam a aplicabilidade do FES como uma tecnologia sustentável e promissora para a produção de prodigiosina, tornando o bioprocesso econômico e competitivo para fins industriais.

Palavras-chave: fermentação estática; pigmento; *Serratia marcescens*.

Abstract

Prodigiosin is a natural red pigment produced mainly by the bacterium *Serratia marcescens*, which is a promising pharmaceutical compound due to its antimicrobial, immunosuppressive and antiproliferative properties. However, its industrial marketing is still limited due to the high cost of production associated with low productivity. In this sense, this work aimed to investigate the production of prodigiosin by *S. marcescens* UCP 1549 in solid-state fermentation (SSF), as a sustainable alternative that allows minimizing the production costs and environmental impact. Thus, different agro-industrial substrates were used in the formulation of the prodigiosin production medium by SSF, obtaining the maximum yield of red pigment (119.8 g/kg dry substrate) in medium consisting of 5 g wheat bran and impregnating solution containing salts (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) and 5% waste soybean oil. The pigment was confirmed as prodigiosin by the maximum absorbance peak at 535 nm, Rf 0.9 in TLC and the functional groups identified by infrared spectrum (FTIR). Prodigiosin

showed stability at different values of temperature, pH and NaCl concentrations, confirming its potential application in various industrial areas. Moreover, the pigment showed no phytotoxic effects to seeds of cabbage (*Brassica oleracea*), lettuce (*Lactuca sativa*), onion (*Allium cepa*) and cucumber (*Cucumis sativus*) and not show any toxicity to the microcrustacean *Artemia salina* in different concentrations. In addition, prodigiosin demonstrated antimicrobial properties. These results confirm the applicability of SSF as a sustainable and promising technology for the production of prodigiosin, making the bioprocess economic and competitive for industrial purposes.

Keywords: *Serratia marcescens*; static fermentation; pigment; wheat bran.

1. Introdução

A demanda mundial de pigmentos de origem microbiana vem aumentando nos últimos anos devido ao potencial biotecnológico de aplicação dessas biomoléculas em diversas indústrias, além das vantagens, quando comparados com os de origem sintética (Venil et al., 2014; Kumar et al., 2015; Varjani & Upasani, 2017; Mishra et al., 2019; HADDIX, SHANKS, 2020).

A prodigiosina é um pigmento natural vermelho, produzido principalmente pela bactéria Gram-negativa *Serratia marcescens*, que tem despertado grande interesse devido ao seu amplo potencial, como agente antimicrobiano, antimalárico, imunossupressor e antitumoral (Elkenawy et al., 2017; Li et al., 2018; Yip et al., 2019). No entanto, a sua produção industrial ainda é limitada, devido ao elevado custo de produção, associado ao baixo rendimento e ao uso de substratos onerosos.

Diversas investigações têm sido realizada para obtenção da prodigiosina utilizando subprodutos e resíduos agroindustriais, como fontes alternativas de carbono e de nitrogênio, sendo uma estratégia promissora e de baixo custo (Aruldas et al., 2014; Xia et al., 2016; Abraham & Chauhan, 2018). Particularmente, no Brasil, a *S. marcescens* UCP 1549, bactéria isolada do semiárido de Pernambucano, tem demonstrado excelente potencial para produzir prodigiosina, como demonstrado na literatura (Araújo et al., 2010; Lapenda et al., 2014; Montero-Rodríguez et al., 2016;

2018). No entanto, a busca de novas estratégias é justificada, no sentido de aumentar a produtividade e reduzir os custos.

Neste contexto, a fermentação em estado sólido (FES) é um processo, caracterizado por ocorrer na ausência ou quase ausência de água, que vem sendo utilizado para a produção de vários metabólitos microbianos de elevado valor agregado, como os biopigmentos (Thomas et al., 2013; Sala et al., 2019). Além disso, a FES oferece a possibilidade de aproveitar resíduos e subprodutos agroindustriais baratos como fonte de carbono/energia para produção de biocompostos de interesse industrial ou como suporte inerte para o crescimento de micro-organismos (Lizardi-Jiménez e Hernández-Martínez, 2017; Sadh et al., 2018). Contudo, esta tecnologia tem sido pouco explorada na produção de prodigiosina. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a produção de prodigiosina por *S. marcescens* UCP 1549 por FES, utilizando diferentes substratos agroindustriais. Além disso, foi investigada a estabilidade, a toxicidade e a ação antimicrobiana e fotoprotetora do pigmento.

2. Materiais e métodos

2.1 Micro-organismo

A *S. marcescens* UCP 1549, foi originalmente isolada do semi-árido do estado de Pernambuco, Brasil, identificada por Araujo et al. (2017) e cedida pela Coleção de Cultura da Universidade Católica de Pernambuco, Recife, Brasil. A bactéria foi mantida em meio sólido Luria Bertani (LB) (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, NaCl 10 g/L e ágar 15 g/L) a 5°C.

2.2 Seleção de substratos agroindustriais para a produção de prodigiosina

Foram utilizados seis substratos agroindustriais na formulação dos meios de cultura para a produção de prodigiosina: farelo de trigo, bagaço de cana-de-açúcar, resíduo de macarrão instantâneo, casca de tangerina, casca de abacaxi e coroa de abacaxi. O bagaço de cana-de-açúcar foi doado pela Usina Japungu, Santa Rita -PB,

Brasil. O farelo de trigo, os abacaxis e as tangerinas foram adquiridos do comércio informal na cidade de Recife- PE, Brasil.

O resíduo de macarrão instantâneo foi cedido pela indústria de macarrão instantâneo. O farelo de trigo e o resíduo de macarrão instantâneo não receberam nenhum tipo de pré-tratamento. O bagaço de cana-de-açúcar foi mantido inicialmente a -4°C até ser utilizado, depois foi descongelado à temperatura ambiente, seco em estufa a 70°C durante 24 h e triturado em um misturador. Os abacaxis e tangerinas foram lavados e os resíduos foram separados das polpas utilizando uma faca de cozinha, secos em estufa a 70°C por 72 h e triturados um misturador. Depois, todos os substratos foram tamisados separadamente. A fração utilizada foi obtida entre 16 e 32 *mesh* (correspondendo a 1,0 e 0,5 mm, respectivamente). Além disso, foi utilizado óleo de soja pós-fritura (OSPF), que foi gentilmente adquirido do comércio informal na cidade de Recife- PE, Brasil.

A análise elementar foi realizada no analisador elementar CHNS / O da Perkin-Elmer Série II2400 para determinar o conteúdo de carbono, nitrogênio, hidrogênio e enxofre presentes em um grama de cada substrato usado para a formulação dos meios de produção.

2.3 Fermentação em estado sólido

As colônias de *S. marcescens* foram transferidas para frascos de Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, contendo 100 mL do meio LB, incubados em agitador orbital por 18 h, a temperatura de 28°C e 150 rpm. Quando a densidade óptica a 600 nm atingiu a turbidez de 0,8-1,0 a cultura foi utilizada como inóculo. Frascos Erlenmeyers de 250 mL de capacidade, contendo 5 g do substrato sólido seco foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min e umedecidos com solução de impregnação, segundo Camilios-Neto et al. (2011) e Montero-Rodríguez et al. (2018), correspondendo a: KH_2PO_4 3 g/L, K_2HPO_4 7 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L e 5% de OSPF. Em seguida, foi inoculado 5% do pré-inóculo de *S. marcescens* crescido no meio LB e os frascos foram incubados por 120 h a 28°C , sob condições estáticas.

2.4 Extração e quantificação da biomassa produzida por fermentação em estado sólido (FES)

Após o período de fermentação, 100 mL de água destilada foram adicionados a cada frasco Erlenmeyer e o conteúdo foi agitado por 1 h a 200 rpm e 30°C em um agitador orbital. Em seguida, as suspensões foram filtradas com gaze (Nalini e Parthasarathi, 2014). Este procedimento foi realizado por três vezes. Os extratos obtidos foram centrifugados durante 20 min a 10000 rpm e a biomassa foi separada do sobrenadante, lavada três vezes com água destilada, seguido de centrifugação durante 15 min a 10000 rpm. Em seguida foi submetida à liofilização e quantificada por gravimetria.

2.5 Extração e quantificação do pigmento vermelho

O pigmento vermelho produzido foi extraído da biomassa liofilizada utilizando o sistema de solvente clorofórmio: metanol (2:1, 1:1 e 1:2, v/v), evaporado e quantificado por peso seco (Araújo et al., 2010).

2.6 Identificação do pigmento vermelho

A identificação preliminar do pigmento bruto foi realizada solubilizando o pigmento em etanol a 95% e a solução colorida foi dividida em duas porções. Uma parte foi acidificada com uma gota de HCl concentrado e a outra foi alcalinizada com uma gota de solução concentrada de NaOH (Gerber & Lechevalier, 1976). A cor vermelha ou rosa em condição ácida e a cor amarela ou marrom em condição alcalina confirmaram um teste presuntivo positivo para identificar a prodigiosina (Sathishkumar & Aparna, 2014; Mansi & Gaurav, 2015).

Posteriormente, o pigmento vermelho foi solubilizado em 3 mL de metanol e submetido à purificação por cromatografia de exclusão em coluna (coluna 22 x 1 cm) preenchida com Sephadex LH-20 (ativada a 800°C por 1 h), como adsorvente. A diluição foi realizada pelo sistema de solvente clorofórmio: metanol (1:1, v/v) e, em seguida, modificado para clorofórmio: metanol: acetona (4:2:3, v/v), visando à máxima

remoção de impurezas. A fração vermelha foi coletada e analisada por espectrofotometria UV-Vis, sendo determinada a faixa de absorvância no intervalo 400-700 nm. A produção de prodigiosina foi confirmada pela presença de pico máximo de absorvância a 535 nm (Araújo et al., 2010).

Além disso, a fração vermelha foi submetida à cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de alumínio revestida de sílica gel, após a aplicação a amostra foi colocada em cuba de vidro contendo o sistema de solventes clorofórmio: metanol: (9:1, v/v). O valor de referência da fração vermelha foi calculado e comparado com o da prodigiosina, segundo a literatura (Araújo et al., 2010; Lapenda et al., 2015).

O pigmento extraído foi submetido a análise espectroscópica FTIR no equipamento Shimadzu, IR-TRACER 100, utilizando acessório de refletância total atenuada (ATR) constituído por um cristal misto “diamante/ZnSe”. Os picos obtidos foram comparados com a literatura para confirmar a presença da prodigiosina.

2.7 Estabilidade do pigmento

A estabilidade do pigmento produzido por *S. marcescens* foi investigada seguindo a metodologia proposta por Perumal et al. (2009) e Velmurugan et al. (2011), com modificações. Tubos de ensaio de vidro contendo 10 mL do pigmento bacteriano foram incubados independentemente a diferentes temperaturas (0, 10, 50, 70 e 100°C) por 10 min. Após o resfriamento até a temperatura ambiente, a absorvância foi medida usando um espectrofotômetro UV-Vis e a estabilidade percentual foi calculada. Outro conjunto de tubos contendo 10 mL do extrato etanólico foram ajustados a pH 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14, homogeneizados por 10 min e a absorvância medida. Por outro lado, os tubos de ensaio contendo 10 mL de extrato foram alterados com solução salina a 0,1%, 0,2%, 0,5%, 1% e 5% (v/v) (NaCl) e por 1 h para determinar a estabilidade. A estabilidade percentual (% E) foi calculada:

$$\%E = \frac{A_1 \times 100}{A_0}$$

Onde A_0 é a absorvância do pigmento antes do tratamento e A_1 é a absorvância após o tratamento. A absorvância foi medida no espectrofotômetro a 535 nm do pigmento.

2.8 Toxicidade do pigmento

A fitotoxicidade da prodigiosina produzida por *S. marcescens* foi investigada para sementes de repolho (*Brassica oleracea*), alface (*Lactuca sativa*), cebola (*Allium cepa*) e pepino (*Cucumis sativus*). O teste baseia-se na determinação de três variáveis: o percentual de germinação das sementes (SG%), o percentual de crescimento radicular (GP%) e o percentual do índice de germinação (IG%), conforme Tiquia et al. (1996). Inicialmente, as sementes foram lavadas com água destilada estéril e desinfetadas em uma solução de hipoclorito de sódio a 1% e novamente lavadas para remover o excesso de hipoclorito. Em seguida, dez sementes de cada planta foram transferidas separadamente para placas de Petri estéreis contendo Whatman no. 1 papel de filtro umedecido com soluções de prodigiosina nas concentrações de 0,1, 0,5 e 1% e incubado a 28°C por 120 h. o experimento foi realizado em triplicata e após o período de incubação foram determinados o SG%, o RG% e o IG%.

Além disso, o teste de toxicidade com *Artemia salina* microcrustáceo foi realizado em três etapas: incubação, exposição à substância e contagem do número de nauplii vivos e mortos após exposição ao composto em 48 h (ABNT, 2016). Inicialmente, os ovos de *A. salina* foram transferidos para um recipiente com 100 mL de solução marinha e incubados a 30°C por 48 h. Após esse período, quando as larvas de *A. salina* eclodiram, 20 nauplii foram transferidos para frascos de volume de 20 mL, contendo uma solução de prodigiosina nas concentrações de 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 mg / l, e incubados a 25 °C por 48 horas. h. O bioensaio foi baseado apenas na porcentagem de organismos mortos em relação ao número total (20 larvas) em 5 ml de uma solução aquosa contendo sal marinho sintético (33,3 g / l) e em 5 ml das diferentes concentrações de amostras de prodigiosina. Após 48 h de incubação, os organismos sobreviventes foram quantificados e a concentração letal de 50% (CL50) das amostras foi determinada (Mc Laughlin et al., 1985; Jan & Khan, 2016). As análises foram realizadas em duplicado.

2.9 Atividade antimicrobiana da prodigiosina

A atividade antimicrobiana da prodigiosina foi determinada para quantificar a

inibição do crescimento de cepas bacterianas: *Klebsiella pneumoniae* (UCP 1574), *Staphylococcus aureus* (UCP 1576), *Enterococcus faecalis* (UCP 1577) e *Escherichia coli* (UCP 1578), de acordo com o padrão M07-A6 do CLSI. Os testes foram realizados de acordo com o método de microdiluição em placas de 96 poços (Elshikh et al., 2016).

As cepas foram semeadas em microdiluição nas placas de 96 poços, onde 100 μ L da solução de prodigiosina com uma concentração final de 0,0115 g / mL foram adicionados à primeira coluna e foram realizadas diluições sucessivas com caldo Muller Hinton (MHB) e no outras colunas foram adicionados 50 μ L do meio MHB, em sequência o inóculo das bactérias *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. coli*. Anteriormente, as cepas eram mantidas a 37 °C durante a noite e, em seguida, ajustadas com água destilada estéril a uma densidade óptica de 625 nm com absorvância entre 0,08 a 0,1 (0,5 McFarland; 107 - 108 UFC / mL).

Em seguida, a placa de 96 poços foi incubada a 37°C por 24 h. Após este período, adicionou-se resazurina (indicador de viabilidade celular) a uma concentração de 0,0005 g / L em 3,5 mL de água destilada estéril. Após o período de 2-4 h, os poços foram observados em azul, indicando a concentração inibitória mínima (CIM) da prodigiosina.

3. Resultados e discussão

3.1 Produção de pigmento por *Serratia marcescens* em fermentação em estado sólido

Vários meios diferenciais e seletivos têm sido usados para o crescimento de micro-organismos produtores de prodigiosina (ARULDASS et al., 2014; LAPENDA et al., 2015). No entanto, devido ao elevado custo dos meios convencionais sintéticos, existe a necessidade de formular um meio econômico que permita a biossíntese deste pigmento a nível industrial. Neste sentido, o uso de produtos e subprodutos agroindustriais fornece uma alternativa viável para reduzir substancialmente os custos dos substratos (ARAÚJO et al., 2010; KURBANOGU et al., 2015; ELKENAWY et al., 2017; MONTERO-RODRÍGUEZ et al., 2018). Além disso, a FES constitui uma tecnologia alternativa à produção de prodigiosina por fermentação submersa, que

apresenta algumas desvantagens econômicas e operacionais, mas ainda são poucas as pesquisas envolvendo a produção deste pigmento por FES (Xu et al., 2011; Arivizhivendhan et al., 2015; Xia et al., 2016).

Neste contexto, diferentes substratos agroindustriais foram investigados no presente estudo para a produção de biomassa e de pigmento vermelho por FES. Como se mostra na Tabela 1, se comprovou o crescimento da bactéria em todos os substratos avaliados. No entanto, a maior produção de biomassa se constatou no farelo de trigo (219,62 g/kg de substrato seco) e resíduo de macarrão instantâneo (308,80 g/kg de substrato seco). De acordo com a composição elementar dos substratos, apresentada na Tabela 2, a relação C/N no farelo de trigo é 15,6 enquanto que no resíduo de macarrão instantâneo 25,1, o que justifica o maior rendimento de biomassa.

Tabela 1. Rendimento de biomassa e pigmento produzido por *Serratia marcescens* UCP 1549 por fermentação em estado sólido em meios contendo substratos agroindustriais.

Substratos	Biomassa (g/kg de substrato seco)	Pigmento vermelho (g/kg de substrato seco)
Farelo de trigo	219,62	119,80
Bagaço de cana-de-açúcar	18,91	17,98
Resíduo de macarrão instantâneo	308,80	66,20
Casca de tangerina	29,80	22,10
Casca de abacaxi	24,80	18,57
Coroa de abacaxi	39,80	31,47

Contudo, o maior rendimento de pigmento vermelho (119,80 g/kg substrato seco) foi constatado no meio contendo farelo de trigo. Então, uma menor relação C/N favoreceu uma maior produção de prodigiosina. Segundo Stankovic et al. (2014) a fonte de C, o tipo de fonte de N e a relação entre C/N influenciam na produção de prodigiosina. O rendimento de pigmento vermelho obtido neste trabalho foi superior aos reportados previamente usando FES, segundo demonstrado na Tabela 3.

Tabela 2. Composição elementar dos substratos agroindustriais utilizados na fermentação em estado sólido para a produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549.

Substratos	Composição elementar (%)			
	Carbono (C)	Hidrogênio (H)	Nitrogênio (N)	Enxofre (E)
Farelo de trigo	38,27	7,50	2,45	0,18
Bagaço de cana-de-açúcar	37,28	4,76	0,59	0,08
Resíduo de macarrão instantâneo	44,73	7,72	1,78	0,11
Casca de tangerina	34,68	7,52	1,27	0,10
Casca de abacaxi	34,48	7,75	0,91	0,10
Coroa de abacaxi	37,52	6,80	1,35	0,05

Tabela 3. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* utilizando diferentes substratos em fermentação em estado sólido.

Micro-organismo	Substrato	Tempo de incubação (h)	Rendimento de prodigiosina (g/kg substrato seco)	Referência
<i>S. marcescens</i>	Resíduos de cozinha e casca de arroz	60	4,16	Xu et al. (2011)
<i>S. marcescens</i>	Flambagem de curtume	96	70,40	Arivizhivenha et al. (2015)
<i>S. marcescens</i> Xd-1	Glicerol e peptona de soja (bagaço como suporte inerte)	48	40,68	Xia et al. (2016)
<i>S. marcescens</i>	Farelo de trigo	48	47,5	Luti et al. (2018)
<i>S. marcescens</i> UCP 1549	Bagaço de cana-de-açúcar (solução umedecedora)	288	11,53	Montero-Rodríguez et al. (2018)

<i>S. marcescens</i> UCP 1549	contendo sais e 3% OSPF) Bagaço de cana- de-açúcar e farelo de trigo (solução umedecedora contendo sais e 3% OSPF)	288	15,35	Montero- Rodríguez et al. (2018)
<i>S. marcescens</i> UCP 1549	Farelo de trigo (solução umedecedora contendo sais e 5% OSPF)	120	119,80	Presente trabalho

3.2 Identificação do pigmento vermelho produzido por *Serratia marcescens* sob fermentação em estado sólido (FES)

Os pigmentos extraídos foram submetidos à espectrofotometria UV-Vis, e apenas no pigmento produzido em farelo de trigo foi constatado o pico máximo de absorvância a 535 nm, confirmando a presença de prodigiosina (Figura 1) em seguida os pigmentos extraídos a partir dos meios contendo os substratos agroindustriais foram solubilizados em etanol 95% (Figura 2) (PATIL et al., 2011; SURYAWANSHI et al., 2014).

Além disso, o pigmento vermelho produzido por *S. marcescens* UCP 1549 foi analisado por CCD e se determinou o $R_f = 0.9$, indicando a presença de prodigiosina, em concordância com o reportado previamente por Araújo et al. (2010), Priya et al. (2013) e Phatake & Dharmadhikari (2016).

Por outro lado, a Figura 3 mostra o espectro de absorção do pigmento vermelho após ser analisado por espectroscopia de infravermelho ATR, que apresentou bandas de absorção muito fortes a $2922,70 \text{ cm}^{-1}$ (C-H aromático), referente ao grupo metileno e pirrol e $1014,71 \text{ cm}^{-1}$. Na região da impressão digital (*fingerprint*) do pigmento se caracterizou por bandas de intensidade media: $1707,36 \text{ cm}^{-1}$ (C=O). A ampla banda de absorção de NH foi evidente a $3288,96 \text{ cm}^{-1}$, correspondente ao grupo amida. Do espectro, os principais grupos funcionais que resultaram em pigmentos vermelhos

foram pirrol, metileno, como demonstrado na literatura (Patil et al., 2011; Aruldass et al., 2014).

Figura 1. Espectro de absorvância dos pigmentos bruto extraídos de *S. marcescens* UCP 1549 cultivada nos meios contendo os substratos agroindustriais: (A) farelo de trigo, (B) bagaço de cana-de-açúcar, (C) resíduo de macarrão instantâneo, (D) casca de tangerina, (E) casca de abacaxi, (F) coroa de abacaxi.

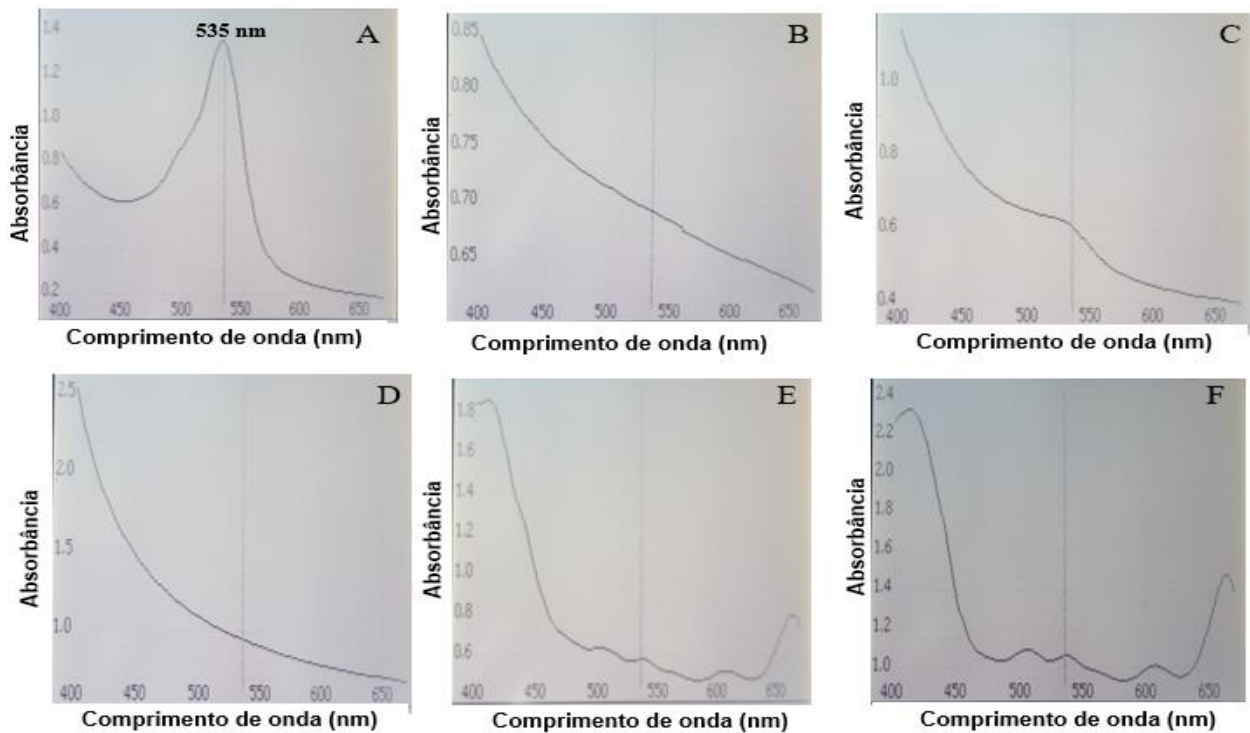


Figura 2. Solubilização em etanol 95% dos pigmentos extraídos a partir dos meios contendo os substratos agroindustriais: (A) farelo de trigo, (B) bagaço de cana-de-açúcar, (C) resíduo de macarrão instantâneo, (D) casca de tangerina, (E) casca de abacaxi e (F) coroa de abacaxi.

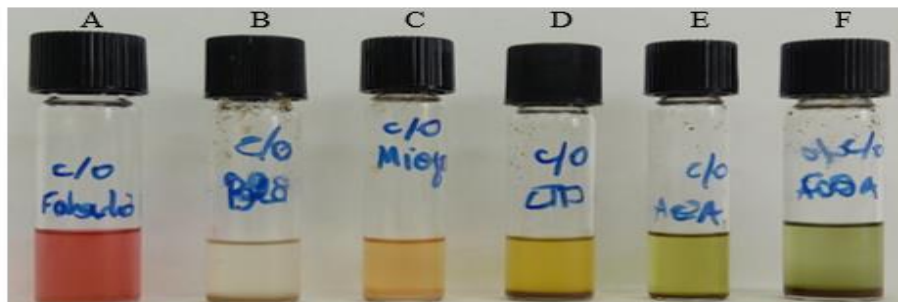
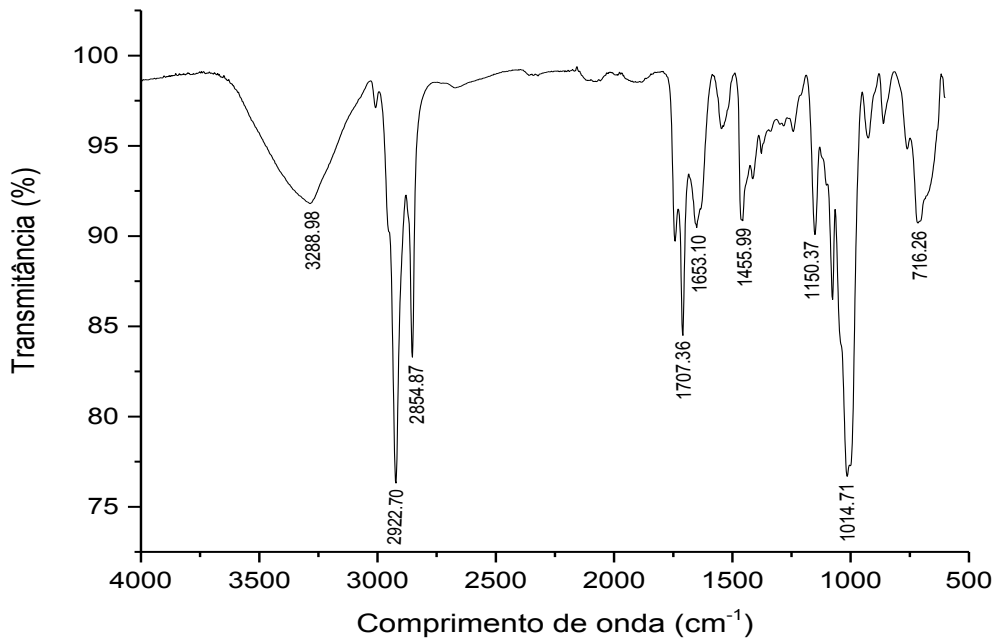


Figura 3. Espectro de infravermelho do pigmento produzido por *Serratia marcescens* UCP 1549 em fermentação em estado sólido.



3.3 Estabilidade relativa da prodigiosina

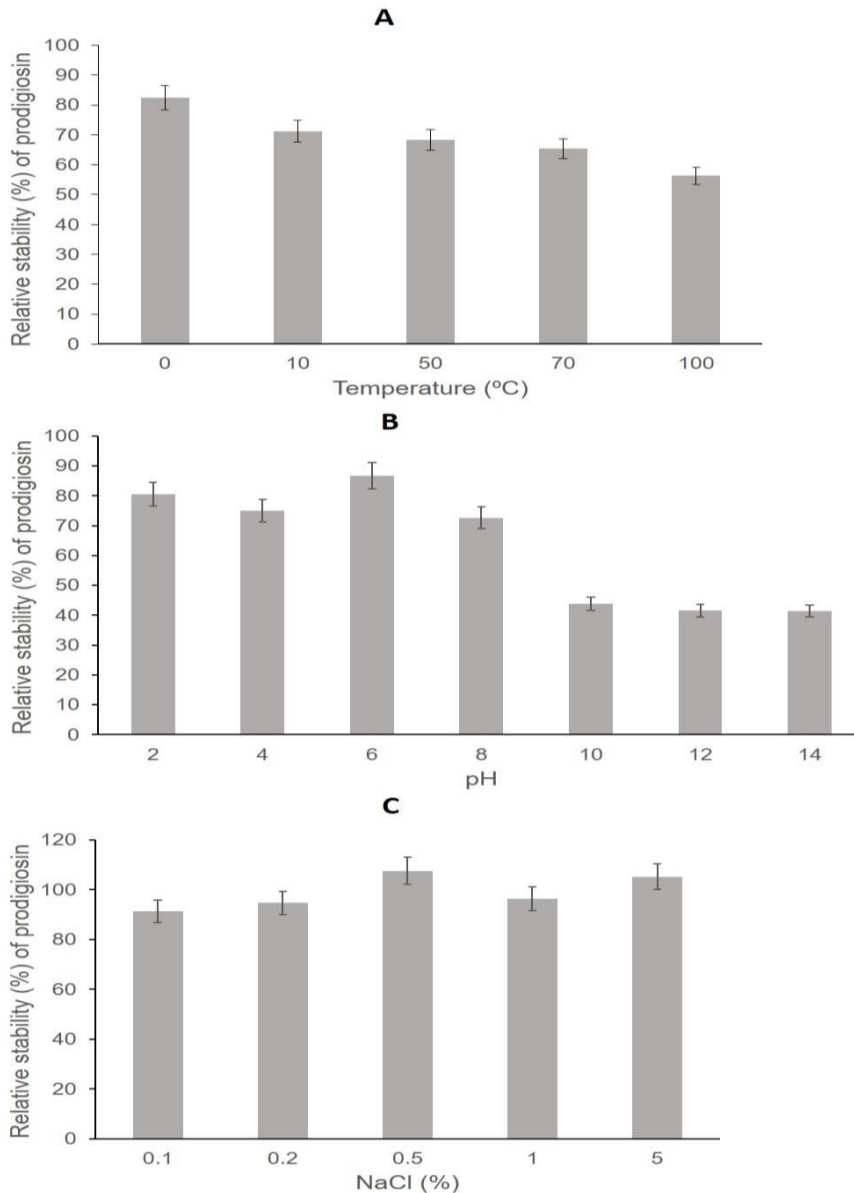
O potencial de aplicação da prodigiosina nas diversas áreas industriais depende da estabilidade relativa frente a condições variáveis ou extremas de temperatura, pH e salinidade e UV (Velmurugan et al., 2011).

Neste sentido, a Figura 4 ilustra os efeitos da temperatura, pH e concentração de NaCl no espectro de absorvância da prodigiosina produzida por *S. marcescens* UCP 1549. A prodigiosina extraída foi submetida a vários tratamentos físico-químicos e os resultados são apresentados na Figura 4.

Segundo ficou evidenciado, a prodigiosina demonstrou estabilidade quando foi submetida a diferentes valores de temperatura e salinidade, e à luz UV. No entanto, no caso do pH, apresentou menor estabilidade em condições alcalinas (pH 10-14), onde houve uma mudança de cor de rosa para amarelo, e por consequência, uma diminuição da absorvância a 535 nm. Estes resultados corroboraram o obtido previamente no teste presuntivo, onde em pH básico também se verificou uma

mudança de cor do extrato etanólico do pigmento vermelho, confirmando a presença da prodigiosina. Yuang et al. (2005) obtiveram resultados similares quando verificaram a estabilidade da prodigiosina produzida por *Pseudomonas sp.* em pH 2 e 5, enquanto o pigmento apresentou instabilidade em condições alcalinas.

Figura 4. Estabilidade da prodigiosina produzida por *Serratia marcescens* UCP 1549 em diferentes valores de temperatura, salinidade e pH.



A estabilidade dos pigmentos de origem natural como a prodigiosina produzida por *S. marcescens* UCP 1549, confirma seu potencial de aplicação como alternativa aos corantes sintéticos, em diversos processos industriais, onde geralmente são submetidos a condições adversas, como elevada temperatura e pH ácido.

3.4 Toxicidade da prodigiosina

O uso de plantas em testes de toxicidade oferece várias vantagens, entre elas baixo custo de manutenção e resultados rápidos, com uma avaliação de benefício especial dos potenciais compostos ecotóxicos em ambientes terrestres (Farré & Barceló, 2003; Priac et al., 2007). Neste estudo, o índice de germinação (IG), que combina medidas de germinação relativa das sementes e alongamento relativo das raízes (Santos et al., 2018; Pele et al., 2019), foi utilizado para avaliar o efeito fitotóxico da prodigiosina produzida por *S. marcescens* UCP 1549 em sementes de repolho (*Brassica oleracea*), alface (*Lactuca sativa*), cebola (*Allium cepa*) e pepino (*Cucumis sativus*) (Tabela 4).

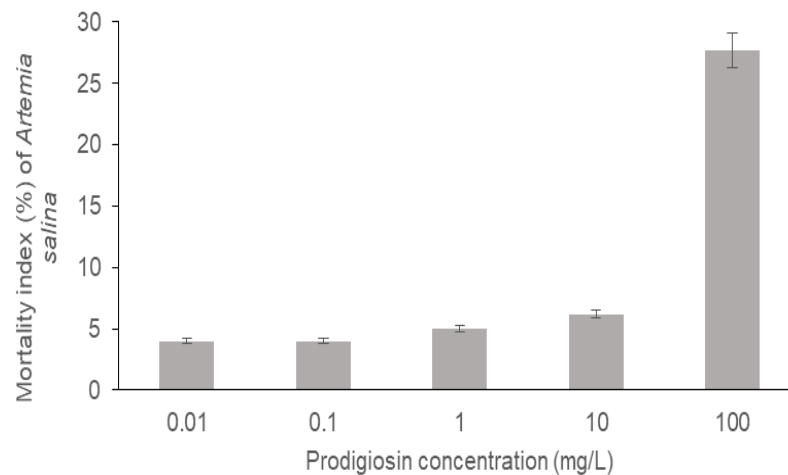
Considerando que um valor GI de 80% é comumente usado como um indicador da ausência de fitotoxicidade (Boutin et al., 2010), os resultados obtidos no presente estudo indicam que as concentrações testadas de prodigiosina não tiveram efeito inibitório sobre o alongamento das raízes ou na germinação de sementes na maioria dos vegetais analisados. Somente a concentração de prodigiosina a 1% apresentou diminuição na taxa de germinação da alface (67,9%). Curiosamente, nas demais espécies de plantas testadas, houve crescimento de raízes secundárias abundantes, principalmente repolho, com valores de IG acima de 200%. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que contém efeito fitotóxico da prodigiosina produzida por *S. marcescens*, indicando que é um composto não tóxico.

Tabela 4. Avaliação da fitotoxicidade da prodigiosina produzida por *Serratia marcescens* UCP 1549 em fermentação em estado sólido para sementes de repolho (*Brassica oleracea*), alface (*Lactuca sativa*), cebola (*Allium cepa*) e pepino (*Cucumis sativus*) nas concentrações de 0.1, 0.5 e 1 %.

Índice de germinação (%)	Concentração de prodigiosina (%)		
	0,1	0,5	1
Pepino	120,5	97,3	97,3
Alface	108,0	80,8	67,9
Repolho	250,0	250,0	217,5
Cebola	80,0	160,0	139,9

Além disso, a Figura 5 mostra os resultados do teste de toxicidade envolvendo microcrustáceos de *A. salina*. Todas as concentrações de prodigiosina testadas demonstraram toxicidade muito baixa para *A. salina* após 24 h de exposição. Os valores de CL50 não foram calculados devido ao baixo percentual de mortalidade (menos de 50%). Por exemplo, 82,3% dos microcrustáceos permaneceram vivos a uma concentração de 100 mg / l, enquanto que em concentrações mais baixas (0,1-10 mg / l) mais de 90% permaneceram vivos, demonstraram o baixo grau de toxicidade da prodigiosina. O controle (contendo apenas água do mar e *A. salina*) indicou que as larvas não foram afetadas, validando as condições do experimento. Segundo Cavalcante et al. (2000), ensaios de letalidade permitem avaliar a toxicidade geral e, portanto, devem ser considerados essenciais para testes preliminares envolvendo o estudo de compostos com potencial atividade biológica.

Figura 5. Índice de mortalidade de *Artemia salina* após 24 h de incubação em amostras de água salina contendo prodigiosina produzida por *S. marcescens* UCP 1549.



3.5 Atividade antimicrobiana da prodigiosina

No presente estudo, a atividade antimicrobiana da prodigiosina produzida por *S. marcescens* UCP 1549 foi avaliada em diferentes cepas bacterianas e a Tabela 5 mostra os valores de MIC obtidos para cada uma.

Tabela 5. Concentrações inibitórias mínimas (MIC) da prodigiosina produzida por *S. marcescens* UCP 1549 contra diferentes estirpes bacterianas testadas.

Microorganismos	MIC (ug/ml)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (UCP 1574)	245.760
<i>Staphylococcus aureus</i> (UCP 1576)	15.360
<i>Enterococcus faecalis</i> (UCP 1577)	30.720
<i>Escherichia coli</i> (UCP 1578)	983.040

Vários estudos relatam a atividade antimicrobiana da prodigiosina produzida por *S. marcescens* contra *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Gallionella sp.*, *B. subtilis* e *B. pumilus* (Gulani et al., 2012; Stankovic et al., 2014; Herráez et al., 2019).

Diferentes estudos relataram efeito inibitório da prodigiosina em *E. coli*. O valor de MIC da prodigiosina para *E. coli* MG1655 foi determinado como sendo $103,4 \pm 6,3$ mg / L (Danevčič et al., 2016), que é moderado em comparação com alguns outros agentes antimicrobianos conhecidos de *E. coli* (Sulavik et al., 2001) . Por outro lado, vários estudos não mostraram efeito da prodigiosina nas células de *E. coli* (Lapenda et al., 2015). Como o mecanismo de ação da prodigiosina sobre *E. coli* não é conhecido, é difícil conciliar os dados conflitantes da ação antibacteriana da prodigiosina.

4. Conclusões

O presente estudo investigou a FES utilizando a bactéria *S. marcescens* como uma tecnologia sustentável e promissora na conversão de substratos agroindustriais que provavelmente terão um baixo custo na produção de prodigiosina. Esse biocomposto demonstrou baixa toxicidade, estabilidade e propriedades antimicrobianas de alto valor agregado, com aplicabilidade industrial, minimizando o impacto ambiental. Resaltando que esse é o primeiro estudo de toxicidade para sementes de plantas e estabilidade da prodigiosina.

Agradecimentos

Este trabalho contou com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Apoio à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE). Os autores agradecem ao Laboratório Multiuso de Análises Químicas LABMAQ, Departamento de química, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e do Núcleo de Pesquisa em Ciências do Ambiente e Biotecnologia (NPCIAMB), Universidade Católica de Pernambuco, Brasil, pelo uso de laboratórios.

Referências bibliográficas

- Abraham, J.; Chauhan, R. Profiling of red pigment produced by *Streptomyces sp.* JAR6 and its bioactivity. 3 Biotechnology, v. 8, n.1, p. 22, 2018.
- Almansoor, A.F. et al. Biosurfactant production by the hydrocarbon-degrading bacteria (HDB) *Serratia marcescens*: Optimization using central composite design (CCD). J. Ind. Eng. Chem, v. 47, p. 272 - 280, 2017.
- Araújo, H.W.C.; Fukushima, K.; Takaki, G.M.C. Prodigiosin production by *Serratia marcescens* UCP 1549 using renewable-resources as a low cost substrate. Molecules, v.15, p. 6931- 6940, 2010.
- Araujo, H.W.C. et al. Biochemical identification of molecular newly isolated pigmented bacterium, and improved production of biosurfactant. Afr J Microbiol Res, v. 11, p. 945 - 954, 2017.
- Araújo, H.W.C. et al. Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. Microb Cell Fact, v.18, n.1, p. 2, 2019.
- Arivizhivendhan, K.V. et al. Bioactive prodigiosin-impregnated cellulose matrix for the

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

removal of pathogenic bacteria from aqueous solution. RSC Adv, v.5, p. 68621 - 68631, 2015.

Arivizhivendhan, K.V. et al. Bioactive prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* using solid state fermenter and its bactericidal activity compared with conventional antibiotics. J. Microb. Biochem. Technol, v. 7, p. 305 -312, 2015.

Aruldass, C.A. et al. Brown sugar as a low-cost medium for the production of prodigiosin by locally isolated *Serratia marcescens* UTM1. Int. Biodeterioration & Biodegrad, p. 1 - 6, 2014.

Camilios-Neto, D. et al. N. Production of *rhamnolipids* in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean oil. Appl. Microbiol. Biotechnol, v. 89, p. 1395 -1403, 2011.

Cavalcante, M.F. et al. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* leach. Química Nova, v. 23, n. 1, p. 20 - 22, 2000.

Chandankere, R. et al. Properties and characterization of biosurfactant in crude oil biodegradation by bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa. Elsevier, v.122, p.140 -148, 2014.

Danevčič, T. et al. Prodigiosin Induces Autolysins in Actively Grown *Bacillus subtilis* Cells. Front Microbiol, v. 70, n. 27, 2016.

Danevčič, T. et al. Prodigiosin-A multifaceted *Escherichia coli* antimicrobial agent. PLoS One, v. 11, n.9, 2016.

Elkenawy, N.M. et al. Optimization of prodigiosin production by *Serratia marcescens* using crude glycerol and enhancing production using gamma radiation. Biotechnology Reports, v. 14, p. 47- 53, 2017.

Elshikh, M. et al. Rezazurin-based 96-wel plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. Biotechnol Lett, v. 38, p. 1015 -1019, 2016.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

Erandapurathukadumana Sreedharan, H.; Harilal, C. C.; Pradeep, S. Response surface optimization of prodigiosin production by phthalate degrading *Achromobacter denitrificans* SP1 and exploring its antibacterial activity. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, p. 1 - 8, 2020.

Gerber, N.N.; Lechevalier, M.P. Prodiginine (prodigiosin-like) pigments from *Streptomyces* and other aerobic *Actinomycetes*. *Can. J. Microbiol.* 22, 658 - 667, 1976.

Herráez, R. Using prodigiosin against some gram-positive and gram-negative bacteria and *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, p. 1- 8, 2019.

Jan, S.; Khan, M.R. Protective effects of *Monotheca buxifolia* fruit on renal toxicity induced by CCI, in rats. 17, 16, 1, 289, 2016. Disponível em: < www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27530158>. Acesso em:12/12/2019.

Khanafari, A.; Assadi, M.; Fakhr, A. Review of prodigiosin, Pigmentation in *Serratia marcescens*. *Online Journal of Biological Sciences*, v. 6, p. 1 - 13, 2006.

Kumar, A. et al. Microbial pigments: production and their applications in various industries. *Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci*, v. 5, p. 203 - 212, 2015.

Kurbanoglu, E.B. Enhanced production of prodigiosin by *Serratia marcescens* MO-1 using ram horn peptone. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 2, 2015.

Lapenda, J.C. et al. Production and toxicological evaluation of Prodigiosin from *Serratia marcescens* UCP/WFCC1549 on Mannitol Solid Medium. *Int J Appl Res Nat Prod*, v. 7, n. 2, p. 32 - 38, 2014.

Lapenda, J.C. et al. Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549. *World J Microbiol Biotechnol*, v. 31, p. 399 - 406, 2015.

Lins, J.L. et al. Production and toxicological evaluation of prodigiosin from *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 on mannitol solid medium. *Int. J. App. Res. Nat.*

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

Prod, v. 7, p. 32 -38, 2014.

Lizardi-Jiménez, M.A.; Hernández-Martínez, R. Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. 3 Biotech, v. 7, p. 44, 2017.

Luti, K.J.; Yonis, R.W.; Mahmoud, S.T. An application of solid state fermentation and elicitation with some microbial cells for the enhancement of prodigiosin production by *Serratia marcescens*. Al-Nahrain J. Sci, v. 21, p. 98 -105, 2018.

Maybauer, O. et al. The importance of antibiotics in animal models of sepsis. 25 th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine Brussels, Belgium, p. 21 - 25, 2005.

Mc laughlin, J.L.; Saizarbitoria, T.C.; Anderson, J.E. Tres biosensayos simples para químicos de productos naturales. Revista de la Sociedad Venezolana de Química, v. 18, p. 13 -18, 1985.

Montero-Rodríguez, D. et al. Bioremediation of petroleum derivative using biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 in low-cost medium. Int. J. Curr. Microbiology. App. Sci, v. 4, n. 7, p. 550 - 562, 2015.

Montero-Rodríguez, D. et al. A low-cost solid fermentation medium for potential prodigiosin production by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549, in: Méndez-Vilas, A. (Ed.), Microbes in the Spotlight: Recent Progress in the Understanding of Beneficial and Harmful Microorganisms. BrownWalker Press, Florida, p. 312 - 315, 2016.

Montero-Rodríguez, D. at al. Suitability of wheat bran as promising substrate for coproduction of prodigiosin and biosurfactant by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549, in: Méndez-Vilas, A. (Ed.), Exploring Microorganisms: Recent Advances in Applied Microbiology. BrownWalker Press, Florida, p. 149 -153, 2018.

Nakashima, T. et al., Characterization of bacterium isolated from the sediment a Coastal area of Omura Bay in Japan and several biological activities of pigment produced by this isolate. Microbiology Immunology, v. 49, p. 407- 415, 2005.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

Nalini, S.; Parthasarathi, R. Production and characterization of rhamnolipids produced by *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its application as biocontrol agent. *Biores. Technol*, v. 173, p. 231- 238, 2014.

Nalini, S.; Parthasarathi, R. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production from *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its biocontrol efficacy against *Fusarium wilt* of eggplant. *Annals of Agrarian Science*, v.16, n.2, p. 108 - 115, 2018.

Patil, C.D. et al. Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* NMCC46 as a mosquito larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. *Parasitol Res*, v.109, p. 1179 -1187, 2011.

Priya, K.A. et al. Antifouling activity of prodigiosin from estuarine isolate of *Serratia marcescens* CMST 07. *Microbiological Research in Agroecosystem Management*, Springer, New Delhi, v. 16, p. 11 - 21, 2013.

Phatake Y.B.; Dharmadhikari S.M. Physical parameters optimization for enhancement of prodigiosin production by using *Serratia* spp. *World J Pharm Med Res*, v. 2, p. 40 -48, 2016.

Ramos, S. et al. Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 19, p. 376 – 381, 2009.

Sadh, P. K.; Duhan, S.; Duhan, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, v. 5, n. 1, p. 1, 2018.

Sala, A. et al. Current developments in the production of fungal biological control agents by solid-state fermentation using organic solid waste. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, p. 1- 40, 2019.

Santos, P. et al. Boaventura, Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test) *Phytomedicine*, v. 10, p. 209, 2003.

- Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549
- Sobrinho, H.B.S. et al. Assessment of toxicity of a biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 cultivated with industrial residues in a bioreactor. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.16, p. 4, 2013.
- Souza, C.S. et al. Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo. In: *Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás*. (3º, 2nd-5th October, 2005, Salvador, BA, Brasil). Abstracts, 2005.
- Sulavik, M.C. et al. Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 45, n. 4, p. 1126 - 36, 2001.
- Sumathi, C. et. al. Production of prodigiosin using tannery fleshing and evaluating its pharmacological effects. *The Scientific World J*, v.8, 2014.
- Suryawanshi, R. K. et al. Studies on production and biological potential of prodigiosin by *Serratia marcescens*. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 173, p. 1209-1221, 2014.
- Stankovic, N. et al. Properties and applications of undecylprodigiosin and other bacterial prodigiosins. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 98, p. 3841 - 3858, 2014.
- Thomas, L.; Larroche, C.; Pandey, A. Current developments in solid-state fermentation. *Biochem Eng J*, v. 81, p. 146 -161, 2013.
- Varjani, S.J.; Upasani, V.N. Critical Review on Biosurfactant analysis, purification and characterization using *rhamnolipid* as a model biosurfactant. *Bioresour Technol*, 2017.
- Venil, C.K. et al. Current perspective on bacterial pigments: emerging sustainable compounds with coloring and biological properties for the industry - an incisive evaluation. *RSC Adv*, v. 4, p. 39523 -39529, 2014.
- Velmurugan, P. et al. Monascus pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. *Papers in Natural Resources*, p 378, 2011.
- Xia, Y. et al. Solid-state fermentation with *Serratia marcescens* *Xd-1* enhanced

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

production of prodigiosin by using bagasse as an inertia matrix. Ann Microbiol, v. 66, p.1239 -1247, 2016.

Xu, F.; Xia, S.; Yang, Q. Strategy for obtaining inexpensive prodigiosin production by *Serratia marcescens*. In 3rd International Conference on Chemical, Biological and Environmental Engineering, 2011.

Young, T.P.; Petersen, D.A.; Clary, J.J. The ecology of restoration: historical links, emerging issues and unexplored realms. Ecology Letters, v. 8, n. 6, p. 662 - 673, 2005.

Yip, C.H. et al. Recent advancements in high-level synthesis of the promising clinical drug, prodigiosin. Applied Microbiology and Biotechnology, p. 1 -14, 2019.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- *Serratia marcescens* UCP 1549 demonstrou habilidade para produção de prodigiosina por fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo.
- O pigmento produzido foi identificado como prodigiosina por espectrofotometria UV-Vis, CCD e FTIR.
- A prodigiosina produzida não mostrou toxicidade para *Artemia salina* e sementes de repolho (*Brassica oleracea*), alface (*Lactuca sativa*), cebola (*Allium cepa*) e pepino (*Cucumis sativus*) nas concentrações de 0.1, 0.5 e 1 %.
- A prodigiosina produzida demonstrou estabilidade em diferentes valores de pH, temperatura e concentração de NaCl.
- A prodigiosina adquire demonstrou ação inibitória (MIC) contra as cepas das bactérias *Klebsiella pneumoniae* (UCP 1574), *Staphylococcus aureus* (UCP 1576) e *Enterococcus faecalis* (UCP 1577).

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

ANEXOS

Artigo submetido à Revista Environmental Technology**(Qualis A2)****Enhanced production of prodigiosin by *Serratia marcescens* UCP 1549 using agrifoods substrates in solid-state fermentation**

Renata Andreia dos Santos^{1,2}, **Dayana Montero Rodríguez**^{2,3}, **Lucas Albuquerque Rosendo da Silva**^{2,4}, **Sérgio Mendonça de Almeida**^{2,5}, **Galba M. Campos-Takaki**^{2,*},
Marcos Antônio Barbosa de Lima^{2,6}

¹Post-graduation Program in Development of Environmental Processes, Catholic University of Pernambuco, 50500-900, Recife-PE, Brazil;

²Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, 50050-590, Recife-PE, Brazil;

³National Post-Doctorate Program (PNPD-CAPES), Post-Graduation Program in Development of Environmental Processes, Catholic University of Pernambuco, 50500-900, Recife-PE, Brazil;

⁴Graduate Program in Chemical Engineering, Catholic University of Pernambuco, 50500-900, Recife-PE, Brazil;

⁵Department of Biology, Catholic University of Pernambuco, 50500-900, Recife-PE, Brazil;

⁶Laboratory of Agricultural and Environmental Microbiology, Department of Biology, Federal Rural University of Pernambuco, 52171-900, Recife-PE, Brazil.

ORCiDs:

Renata Andreia dos Santos <https://orcid.org/0000-0002-5964-229X>

Dayana Montero Rodríguez <https://orcid.org/0000-0001-8954-7309>

Galba Maria Campos-Takaki <https://orcid.org/0000-0002-0519-0849>

Sérgio Mendonça de Almeida <https://orcid.org/0000-0002-1336-6525>

Marcos Antônio Barbosa de Lima <https://orcid.org/0000-0001-5987-224X>

*Corresponding author: G.M.C.T. Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil. e-mail:

galba_takaki@yahoo.com.br Phone: +55-81-21194044; Fax: +55-81-21194043.

Abstract

Prodigiosin is a natural red pigment produced mainly by the bacterium *Serratia marcescens*, which is a promising pharmaceutical compound due to its antimicrobial, immunosuppressive and antiproliferative properties. However, its industrial marketing is still limited due to the high cost of production associated with low productivity. In this sense, this work aimed to investigate the production of prodigiosin by *S. marcescens* UCP 1549 in solid-state fermentation (SSF), as a sustainable alternative that allows minimizing the production costs and environmental impact. Thus, different agro-industrial substrates were used in the formulation of the prodigiosin production medium by SSF, obtaining the maximum yield of red pigment (119.8 g/kg dry substrate) in medium consisting of 5 g wheat bran and impregnating solution containing salts (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) and 5% waste soybean oil. The pigment was confirmed as prodigiosin by the maximum absorbance peak at 535 nm, R_f 0.9 in TLC and the functional groups identified by infrared spectrum (FTIR). Prodigiosin showed stability at different values of temperature, pH and NaCl concentrations, confirming its potential application in various industrial areas. Moreover, the pigment showed no phytotoxic effects to seeds of cabbage (*Brassica oleracea*), lettuce (*Lactuca sativa*), onion (*Allium cepa*) and cucumber (*Cucumis sativus*) and not show any toxicity to the microcrustacean *Artemia salina* in different concentrations. In addition, prodigiosin demonstrated antimicrobial properties. These results confirm the applicability of SSF as a sustainable and promising technology for the production of prodigiosin, making the bioprocess economic and competitive for industrial purposes.

Keywords: *Serratia marcescens*; static fermentation; pigment; wheat bran.

1. Introduction

Worldwide demand for microbial pigments has increased in recent years due to the biotechnological potential of applying these biomolecules in several industries, in addition to its

advantages, when compared to the synthetic origin (Venil et al., 2014; Kumar et al., 2015; Varjani & Upasani, 2017; Mishra et al., 2019; Haddix, Shanks, 2020). In this context, prodigiosin is a natural red pigment, produced mainly by the Gram-negative bacteria *Serratia marcescens*, which has aroused great interest due to its wide potential, as an antimicrobial, antimalarial, immunosuppressive and antitumor agent (Elkenawy et al., 2017; Li et al., 2018; Yip et al., 2019).

Despite of their promising properties, the large-scale production of prodigiosin is still limited due to the high cost of production, associated with low yield and use of expensive substrates. Cheap agro-industrial byproducts and wastes have been used as alternative substrates to guarantee a profitable process of pigment production (Aruldas et al., 2014; Xia et al., 2016; Abraham & Chauhan, 2018). Particularly in Brazil, *S. marcescens* UCP 1549, a bacterium isolated from the semiarid region of the state of Pernambuco, has shown excellent potential to produce prodigiosin, as demonstrated in the literature (Araújo et al., 2010; Lapenda et al., 2014; Montero-Rodríguez et al., 2016; 2018). However, the search for new strategies is justified, in order to increase productivity and reduce costs.

In this sense, another strategy that have gained researchers' attention in order to obtain cost-effective industrial bioprocess is solid-state fermentation (SSF). This is a promising technology that has many advantages over traditional submerged fermentation, including higher production yield, more effectiveness, more eco-friendly and easy recovery of product (Soccol et al., 2017; Costa et al., 2018; Sala et al., 2019). However, few studies have been carried out for the production of prodigiosin through SSF (Xu et al., 2011; Arivizhivendhan et al., 2015; Xia et al., 2016). Thus, the aim of this study was to evaluate the production of prodigiosin by *S. marcescens* UCP in 1549 by SSF using different agro-industrial substrates. In addition, the stability, toxicity and antimicrobial action of the pigment were investigated.

2. Materials and Methods

2.1 Microorganism

S. marcescens UCP 1549, originally isolated from semi-arid soil, was previously identified by morphological and molecular methodologies described by Araujo et al. (2017). The strain

was kindly provided by the Culture Collection of the Catholic University of Pernambuco, Recife, Brazil, and it was registered in the World Federation for Culture Collections (WFCC). The bacterium was maintained in Luria Bertani (LB) solid medium (tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L and agar 15 g/L) at 5°C.

2.2 Agro-industrial substrates

Six agro-industrial substrates were used in formulation of production media: wheat bran (WB), sugarcane bagasse (SCB), instant noodle waste (INW), tangerine peels (TP), pineapple peels (PAP) and pineapple crown (PAC). SCB was kindly donated by Usina Japungu, Santa Rita-PB, Brazil, INW was kindly provided by the instant noodle industry, and WB, tangerines and pineapples were bought at a local market in city of Recife-PE, Brazil.

WB and INW did not receive any kind of pre-treatment. SCB was initially maintained at -4°C until it use, then it was thawed at room temperature, oven-dried at 70°C for 24 h and ground in a blender. Pineapples and tangerines were washed and the wastes were separated from the edible pulps, oven dried at 70°C for 72 h and ground in a blender. Then, all substrates were sieved and the fraction used was either that retained between 16 and 32 mesh sieves (opening of 1.0 and 0.5 mm, respectively). In addition, it was used waste soybean oil (WSO), kindly supplied by a local restaurant in the city of Recife (Pernambuco, Brazil).

2.3 Preparation of inoculum

Stored culture of *S. marcescens* was transferred first to LB medium and incubated for 18 h at 28°C. Then, two colonies were transferred to 50 mL of LB broth and incubated at 28°C and 150 rpm in an orbital shaker. Once the optical density at 600 nm reached 0.8-1.0, this culture was used as inoculum.

2.4 Solid-state fermentation

SSF was carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 5 g of each dry solid substrate separately. The flasks were autoclaved at 121°C for 15 min and then, corresponding amount of impregnating solution inoculated with seed culture at 5 % was mixed into solid substrates. The amount of impregnating solution for each dry substrate was defined as described by Camilios-

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

Neto et al. (2011). The impregnating solution itself contained KH_2PO_4 3 g/L, K_2HPO_4 7 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L and 5% WSO according to Montero-Rodríguez et al. (2018). The inoculated flasks were incubated at 28°C for 120 h, under static conditions.

2.5 Extraction and quantification of biomass produced by SSF

After the fermentation period, 50 mL of distilled water was added to each Erlenmeyer flask and contents were agitated for 1 h at 200 rpm and 30°C on an orbital shaker. Then, the suspensions were filtered using cheesecloths and the liquid excess was squeezed out manually (Nalini and Parthasarathi, 2014). This procedure was carried out three times and the extracts were collected and centrifuged for 20 min at 10000 g. The pellets obtained were separated from the supernatants and washed three times with distilled water by centrifugation for 20 min at 10000 g. Followed, the biomasses were frozen, subjected to lyophilisation and quantified by gravimetry (Montero-Rodríguez et al., 2018).

2.6 Extraction and quantification of pigment

The pigments produced were extracted from the lyophilized biomasses using the method used by Araújo et al. (2010) with modifications. Briefly, 1 g of biomass was subjected to solvents system chloroform: methanol of increasing polarity (2:1, 1:1 and 1:2, v/v) and pigment was evaporated to dryness and quantified by dry weight. Every step of extraction and the storage of pigment were carried out in the dark.

2.7 Characterization and identification of pigment

Preliminary identification of the crude pigment was performed after solubilization of the pigment in 95% ethanol and analysis by UV-Vis spectrophotometry, and the absorbance was determined in the range 400-700 nm. Prodigiosin production was confirmed by the presence of a maximum absorbance peak at 535 nm (Araújo et al., 2010).

Subsequently, the red pigment was solubilized in 3 mL of methanol and subjected to purification by column exclusion chromatography (column 22 x 1 cm) filled with Sephadex LH-20 (activated at 800 ° C for 1 h), as absorbent. The elution process was carried out by the solvent system chloroform: methanol (1:1, v/v) and then modified to chloroform: methanol:

acetone (4:2:3, v/v), to the maximum removal of impurities (Lapenda et al., 2014). The red fraction was collected and subjected to thin layer chromatography (TLC). For this, the sample was applied to an aluminum foil sheet covered with silica gel and placed in glass cube containing the mixture chloroform–methanol (9:1, v/v) as mobile phase (Araújo et al., 2010; Priya et al., 2013). The retention factor (R_f) was calculated according to the formula R_f : distance travelled by the compound/ distance travelled by the solvent front and then, it was compared to the standard prodigiosin R_f referred in the literature (Krishna et al., 2011; Lapenda et al., 2015).

The extracted pigment was submitted to Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic analysis on the Shimadzu equipment, IR-TRACER 100, using an attenuated total reflection (ATR) accessory consisting of a mixed “diamond/ZnSe” crystal. The peaks obtained were compared with the literature to confirm the presence of prodigiosin.

2.8 Pigment stability

The stability of the pigment produced by *S. marcescens* was investigated following the methodology proposed by Perumal et al. (2009) and Velmurugan et al. (2011), with modifications. Briefly, glass test tubes containing 10 mL of the bacterial pigment were incubated independently at different temperatures (0, 10, 50, 70 and 100°C) for 10 min. After cooling to room temperature, absorbance was measured using a UV–visible spectrophotometer and percent stability was calculated. Another set of tubes containing 10 mL of the ethanolic extract was adjusted to pH 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14, homogenized for 10 min and the absorbance measured. In addition, test tubes containing 10 mL of extract were amended with 0.1%, 0.2%, 0.5%, 1% and 5% (v/v) salt solution (NaCl) and kept at rest for 1 h to determine stability. Stability (%E) was calculated according to Formula 1:

$$\%E = \frac{A_1 \times 100}{A_0}$$

where A_0 is pigment absorbance before treatment and A_1 is absorbance after treatment. Absorbance of the pigment was measured spectrophotometrically at 535 nm.

2.9 Toxicity of prodigiosin

The phytotoxicity of prodigiosin produced by *S. marcescens* were investigated for seeds of

cabbage (*Brassica oleracea*), lettuce (*Lactuca sativa*), onion (*Allium cepa*) and cucumber (*Cucumis sativus*). The test is based on the determination of three variables: the percentage of seed germination (SG%), the percentage of root growth (RG%) and the percentage of the germination index (IG%), according to Tiquia et al. (1996). Initially the seeds were washed with sterile distilled water and disinfected in a 1% sodium hypochlorite solution and again washed to remove excess hypochlorite. Then, ten seeds from each plant were transferred separately to sterile Petri dishes containing Whatman no. 1 filter paper moistened with prodigiosin solutions of concentrations of 0.1, 0.5 and 1%, and incubated at 28°C for 120 h. the experiment was carried out in triplicate and after the incubation period, SG%, RG% and GI% were determined.

In addition, toxicity test using *Artemia salina* microcrustacean was carried out in three stages: incubation, exposure to the substance and counting the number of live and dead nauplii after exposure to the compound in 48 h (ABNT, 2016). Initially, *A. salina* eggs were transferred to a container with 100 mL of marine solution and incubated at 30°C for 48 h. After this period when the larvae of *A. salina* hatched, 20 nauplii were transferred to 20 mL volume flasks, containing a solution of prodigiosin in concentrations of 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 mg/l, and incubated at 25 °C for 48 h. The bioassay was based only on the percentage of dead organisms in relation to the total number (20 larvae) in 5 ml of an aqueous solution containing synthetic marine salt (33.3 g/l) and 5 ml of the different concentrations of prodigiosin samples. After 48 h of incubation, the surviving organisms were quantified and the 50% lethal concentration (LC₅₀) of the samples was determined (Mc Laughlin et al., 1985; Jan & Khan, 2016). The analyzes were performed in duplicates.

2.10 Antimicrobial activity

Antimicrobial activity of prodigiosin was determined to quantify the growth inhibition of bacterial strains: *Klebsiella pneumoniae* (UCP 1574), *Staphylococcus aureus* (UCP 1576), *Enterococcus faecalis* (UCP 1577) and *Escherichia coli* (UCP 1578), according to the M07-A6 standard from CLSI. The tests were carried out according to the microdilution method in 96-well plates (Elshikh et al., 2016).

The strains were seeded in microdilution in the 96-well plates, where 100 ul of the prodigiosin solution with a final concentration of 0.0115 g/mL was added to the first column and

successive dilutions were made with Muller Hinton broth (MHB) and in the other columns 50 µl of the MHB medium was added, in sequence the inoculum of the bacteria *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis* and *E. coli* was added. Previously, the strains were kept at 37 °C overnight, and then adjusted with sterile distilled water to an optical density of 625 nm with absorbance between 0.08 to 0.1 (0.5 McFarland; 10^7 - 10^8 CFU/mL).

Then the 96-well plate was incubated at 37°C for 24 h. After this period, resazurin (indicator of cell viability) was added at a concentration of 0.0005 g/L in 3.5 mL of sterile distilled water. After the period of 2-4 h the wells were observed in blue, indicating the minimum inhibitory concentration (MIC) of prodigiosin.

3. Results and Discussion

3.1 Production of pigment by *Serratia marcescens* in solid-state fermentation

Various differential and selective media have been used for growth of prodigiosin-producing microorganism (Borić et al., 2011; Lapenda et al., 2015; Rakh et al., 2017). However, due to the high cost of synthetic components, there is a need to design new and inexpensive medium to enhance the biosynthesis of this pigment. In this sense, the use of agro-industrial substrates would provide a profitable alternative to reducing production costs of prodigiosin. Several agricultural products and byproducts such as corn steep liquor, cassava wastewater, pineapple waste and peanut oil cake have been successfully utilized for its production (Giri et al., 2004; Araújo et al., 2010; Naik et al., 2012; Mishra et al., 2019). In addition, SSF is an alternative technology to the production of prodigiosin by submerged fermentation, which has some economic and operational disadvantages, but there are still little researches involving the production of this pigment by SSF (Xu et al., 2011; Arivizhivendhan et al., 2015; Xia et al., 2016).

In this context, different agro-industrial substrates were investigated in the present study for the production of biomass and red pigment by SSF. As shown in Table 1, the growth of the bacteria in all evaluated substrates was verified. However, the highest biomass production was found in WB (219.62 g/kg dry substrate) and INW (308.80 g/kg dry substrate). According to the elemental composition of the substrates, shown in Table 2, the C/N ratio in WB is 15.6 while in

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

INW is 25.1, which justifies the higher biomass yield, when compared with the other substrates.

Table 1. Yield of biomass and pigment produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 by solid-state fermentation in media containing agro-industrial substrates.

Substrates	Biomass (g/kg dry substrate)	Pigment (g/kg dry substrate)
Wheat bran	219.62	119.80
Sugarcane bagasse	18.91	17.98
Instant noodle waste	308.80	66.20
Tangerine peels	29.80	22.10
Pineapple peels	24.80	18.57
Pineapple crown	39.80	31.47

Table 2. Elemental composition of agro-industrial substrates used in solid-state fermentation for pigment production by *Serratia marcescens* UCP 1549.

Substrates	Elemental composition (%)			
	Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Sulfur
Wheat bran	38.27	7.50	2.45	0.18
Sugarcane bagasse	37.28	4.76	0.59	0.08
Instant noodle waste	44.73	7.72	1.78	0.11
Tangerine peels	34.68	7.52	1.27	0.10
Pineapple peels	34.48	7.75	0.91	0.10
Pineapple crown	37.52	6.80	1.35	0.05

However, the highest pigment yield (119.80 g/kg dry substrate) was found in the medium containing WB. According to Stankovic et al. (2014) the source of C, the type of source of N and the relationship between C/N influence the production of prodigiosin. The red pigment yield

obtained in this work was higher than those previously reported using SSF, as shown in Table 3.

3.2 Identification of pigment produced by *S. marcescens* UCP 1549 in SSF

The extracted pigments were subjected to UV-Vis spectrophotometry, and only in the pigment produced in WB was verified the maximum absorbance peak at 535 nm, confirming the presence of prodigiosin (Figure 1) (Patil et al., 2011; Suryawanshi et al., 2014). In addition, the red pigment produced by *S. marcescens* UCP 1549 was analyzed by TLC and the $R_f = 0.9$ was determined, indicating the presence of prodigiosin, in agreement with previous report of Araújo et al. (2010), Priya et al. (2013) and Phatake & Dharmadhikari (2016).

On the other hand, Figure 2 shows the absorption spectrum of the red pigment after being analyzed by ATR-FTIR spectroscopy, which showed very strong absorption bands at 2922.70 cm^{-1} (aromatic C-H) and 1014.71 cm^{-1} . In the fingerprint region of the pigment, it was characterized by bands of medium intensity: 1707.36 cm^{-1} (C=O). The wide NH absorption band was evident at 3288.96 cm^{-1} . The spectrum obtained is similar to that of prodigiosin, as shown in the literature (Patil et al., 2011; Aruldass et al., 2014).

Table 3. Comparison of prodigiosin production by *Serratia marcescens* in solid-state fermentation.

Microorganism	Substrates	Incubation time (h)	Yield of prodigiosin (g/kg dry solid)	Reference
<i>S. marcescens</i>	Waste kitchen and rice husk	60	4.16	Xu et al. (2011)
<i>S. marcescens</i>	Tannery fleshing	96	70.40	Arivizhivenha et al. (2015)
<i>S. marcescens</i> Xd-1	Glycerol and soy peptone (bagasse as inertial matrix)	48	40.68	Xia et al. (2016)
<i>S. marcescens</i>	WB	48	47.5	Luti et al.

(2018)				
<i>S. marcescens</i> UCP 1549	SCB (impregnating salts solution containing 3% WSO)	288	11.53	Montero- Rodríguez et al. (2018)
<i>S. marcescens</i> UCP 1549	WB and SCB (impregnating salts solution containing 3% WSO)	288	15.35	Montero- Rodríguez et al. (2018)
<i>S. marcescens</i> UCP 1549	WB (impregnating salts solution containing 5% WSO)	120	119.80	Present study

* WB: wheat bran; WSO: waste soybean oil; SCB: sugarcane bagasse

Figure 1. Absorbance spectrum of pigments extracted from biomass of *S. marcescens* UCP 1549 grown in media containing the agro-industrial substrates: (A) wheat bran, (B) sugarcane bagasse, (C) instant noodle waste, (D) tangerine peels, (E) pineapple peels, (F) pineapple crown.

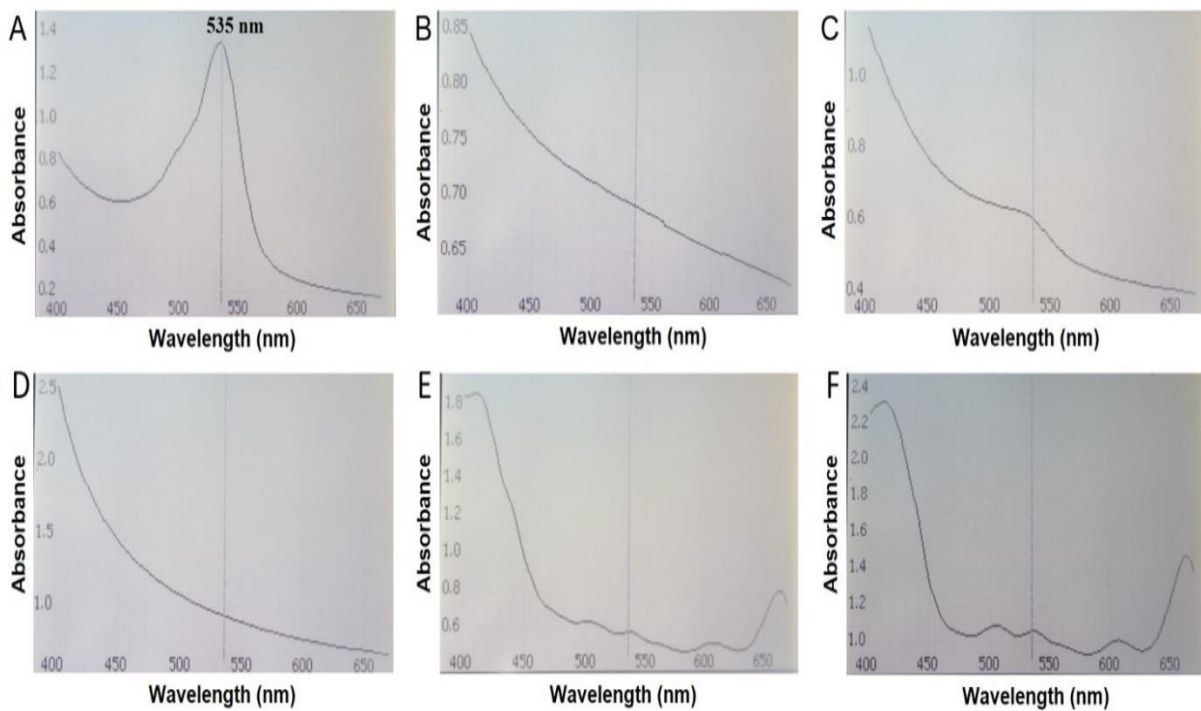
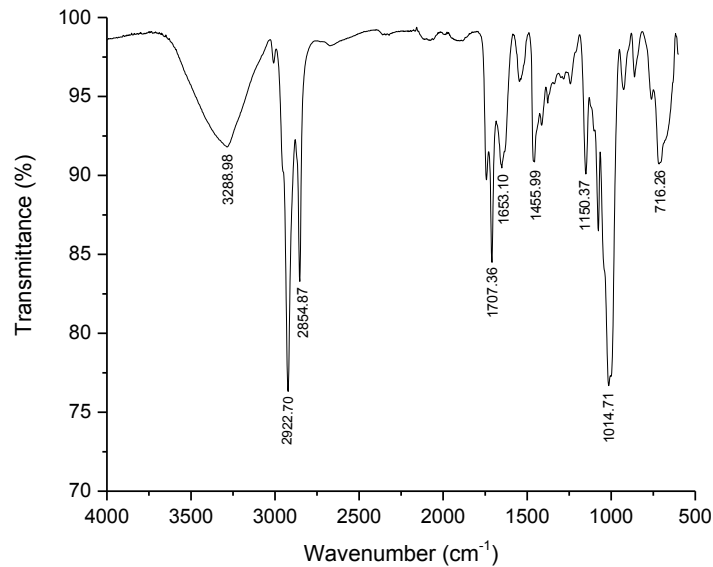


Figure 2. Infrared spectrum of the pigment produced by *S. marcescens* UCP 1549 in solid-state fermentation.

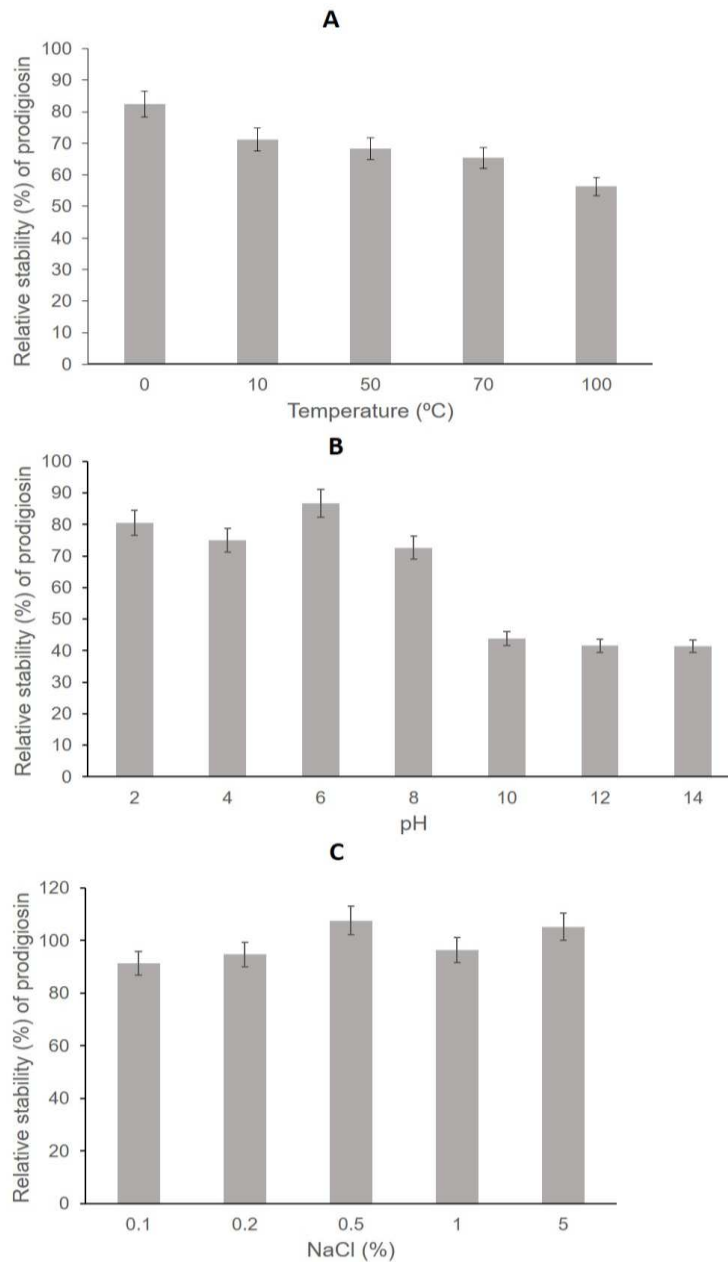


3.3 Relative stability of prodigiosin

The potential application of natural pigments in various industrial fields depends on the stability against variables or extreme conditions of temperature, pH and salinity (Velmurugan et al., 2011). In this sense, Figure 3 illustrates the effects of temperature, pH and NaCl concentration on the absorbance spectrum of prodigiosin produced by *S. marcescens* UCP 1549.

As evidenced, prodigiosin showed stability when it was subjected to different values of temperature and salinity. However, in the case of pH, it showed less stability in alkaline conditions (pH 10-14), where there was a color change from pink to yellow, and consequently, a decrease in absorbance at 535 nm. Yuang et al. (2005) obtained similar results when they verified the stability of prodigiosin produced by *Pseudomonas* sp. at pH 2 and 5, while the pigment showed instability in alkaline conditions. The color change can be attributed to protonation/dissociation below/above the molecular dissociation constant of the pigment molecules. The presence/absence of color for a specific pigment is a function of pH due to ionization of aromatic—OH groups and tautomerism of —O(—) with =O. Changes in the relative proportions of dissociated/undissociated molecules (with respective colors) would produce the resulting coloration (Velmurugan et al., 2011).

Figure 3. Relative stability of prodigiosin produced by *S. marcescens* UCP 1549 at different values of temperature (A), pH (B) and salinity (C).



The stability of pigments of natural origin such as the prodigiosin produced by *S. marcescens* UCP 1549, confirms their potential for application as an alternative to synthetic dyes, in several industrial processes, where they are generally subjected to adverse conditions, such as high temperature and acidic pH.

3.4 Toxicity of prodigiosin

Use of plants in toxicity tests offers several advantages, among them low maintenance cost and rapid results, with a special benefit assessment of the potential eco-toxic compounds in terrestrial environments (Farré & Barceló, 2003; Priac et al., 2007). In this study, the germination index (GI), which combines measures of relative seed germination and relative root elongation (Santos et al., 2018; Pele et al., 2019), was used to evaluate the phytotoxic effect of prodigiosin produced by *S. marcescens* UCP 1549 on seeds of cabbage (*Brassica oleracea*), lettuce (*Lactuca sativa*), onion (*Allium cepa*) and cucumber (*Cucumis sativus*) (Table 4).

Considering that a GI value of 80% is commonly used as an indicator of the absence of phytotoxicity (Boutin et al., 2010), the results obtained in the present study indicate that the tested concentrations of prodigiosin did not have an inhibitory effect on the elongation of the roots or in the germination of seeds in most of the analyzed vegetables. Only the 1% concentration of prodigiosin showed a decrease in the lettuce germination rate (67.9%). Interestingly, in the remaining plant species tested, there was the growth of abundant secondary roots, especially cabbage, with values of GI values above 200%. To our knowledge, this is the first study containing phytotoxic effect of prodigiosin produced by *S. marcescens*, indicating that is a nontoxic compound.

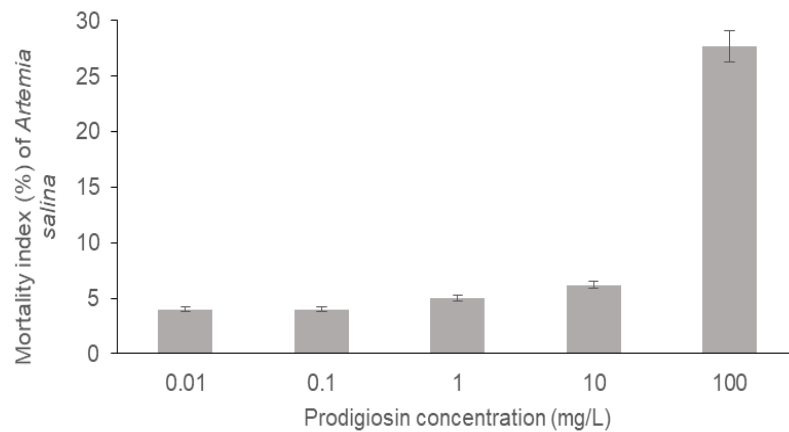
Table 4 - Phytotoxicity of prodigiosin produced by *S. marcescens* UCP 1549 in solid-state fermentation for seeds of cabbage (*Brassica oleracea*), lettuce (*Lactuca sativa*), onion (*Allium cepa*) and cucumber (*Cucumis sativus*).

Germination index (%)	Prodigiosin concentration (%)		
	0.1	0.5	1
<i>B. oleracea</i>	250.0	250.0	217.5
<i>L. sativa</i>	108.0	80.8	67.9
<i>A. cepa</i>	80.0	160.0	139.9
<i>C. sativus</i>	120.5	97.3	97.3

In addition, Figure 4 displays the results of the toxicity test involving *A. salina* microcrustacean. All tested prodigiosin concentrations demonstrated very low toxicity to *A.*

salina after 24 h of exposure. LC₅₀ values were not calculated due to the low percentage of mortality (less than 50%). For example, 82.3% of the microcrustaceans remained alive at a concentration of 100 mg/l, whereas at lower concentrations (0.1-10 mg/L) more than 90% remained alive, demonstrated the low degree of toxicity of the prodigiosin. The control (containing only seawater and *A. salina*) indicated that the larvae were not affected, thereby validating the conditions of the experiment. According to Cavalcante et al. (2000), lethality assays allow the assessment of general toxicity and should therefore be considered essential to preliminary tests involving the study of compounds with potential biological activity.

Figure 4. Mortality index of *Artemia salina* after 24 h of incubation in saline water samples containing prodigiosin produced by *S. marcescens* UCP 1549.



3.5 Antimicrobial activity of prodigiosin

In present study, the antimicrobial activity of prodigiosin produced by *S. marcescens* UCP 1549 was evaluated in different bacterial strains and Table 5 shows the MIC values obtained for each one.

Several studies report the antimicrobial activity of prodigiosin produced by *S. marcescens* against *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Gallionella* sp., *B. subtilis* and *B. pumilus* (Gulani et al., 2012; Stankovic et al., 2014; Herráez et al., 2019).

Table 5. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of prodigiosin produced by *S. marcescens* UCP 1549 against different bacterial strain tested.

Microorganisms	MIC (ug/ml)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (UCP 1574)	245.760
<i>Staphylococcus aureus</i> (UCP 1576)	15.360
<i>Enterococcus faecalis</i> (UCP 1577)	30.720
<i>Escherichia coli</i> (UCP 1578)	983.040

Different studies reported inhibitory effect of prodigiosin on *E. coli*. The MIC value of prodigiosin for *E. coli* MG1655 was determined to be 103.4 ± 6.3 mg/L (Danevčič et al., 2016), which is moderate compared to some other known *E. coli* antimicrobial agents (Sulavik et al., 2001). On the other hand, several studies showed no effect of prodigiosin on *E. coli* cells (Lapenda et al., 2015). Because the mechanism of prodigiosin's action on *E. coli* is not known, the conflicting data of prodigiosin antibacterial action are difficult to reconcile.

4. Conclusions

Present study verified SSF as a sustainable and promising technology in the conversion by *S. marcescens* of low-cost agro-industrial substrates into prodigiosin, a non-toxic biocompound with antimicrobial properties, with high value and industrial applicability, while minimizing the reduction of environmental impact.

Acknowledgments

This work was financially supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco). The authors are grateful to Nucleus of Research in Environmental Sciences and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco, PE-Brazil, for the use of laboratories.

References

- Abraham, J.; Chauhan, R. Profiling of red pigment produced by *Streptomyces sp.* JAR6 and its bioactivity. *3 Biotechnology*, v. 8, n.1, p.22, 2018.
- Almansoor, A.F. et al. Biosurfactant production by the hydrocarbon-degrading bacteria (HDB) *Serratia marcescens*: Optimization using central composite design (CCD). *J. Ind. Eng. Chem*, v. 47, p. 272-280, 2017.
- Araújo, H.W.C.; Fukushima, K.; Takaki, G.M.C. Prodigiosin production by *Serratia marcescens* UCP 1549 using renewable-resources as a low cost substrate. *Molecules*, v.15, p. 6931-6940, 2010.
- Araujo, H.W.C. et al. Biochemical identification of molecular newly isolated pigmented bacterium, and improved production of biosurfactant. *Afr J Microbiol Res*, v. 11, p. 945-954, 2017.
- Araújo, H.W.C. et al. Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. *Microb Cell Fact*, v.18, n.1, p. 2, 2019.
- Arivizhivendhan, K.V. et al. Bioactive prodigiosin-impregnated cellulose matrix for the removal of pathogenic bacteria from aqueous solution. *RSC Adv*, v.5, p. 68621-68631, 2015.
- Arivizhivendhan, K.V. et al. Bioactive prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* using solid state fermenter and its bactericidal activity compared with conventional antibiotics. *J. Microb. Biochem. Technol*, v. 7, p. 305-312, 2015.
- Aruldass, C.A. et al. Brown sugar as a low-cost medium for the production of prodigiosin by locally isolated *Serratia marcescens* UTM1. *Int. Biodeterioration & Biodegrad*, p. 1-6, 2014.
- Camilios-Neto, D. et al. N. Production of *rhamnolipids* in solid-state cultivation using a mixture of sugarcane bagasse and corn bran supplemented with glycerol and soybean oil. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, v. 89, p. 1395-1403, 2011.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

Cavalcante, M.F. et al. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* leach. Química Nova, v. 23, n. 1, p. 20-22, 2000.

Chandankere, R. et al. Properties and characterization of biosurfactant in crude oil biodegradation by bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa. Elsevier, v.122, p.140-148, 2014.

Danevčič, T. et al. Prodigiosin Induces Autolysins in Actively Grown *Bacillus subtilis* Cells. Front Microbiol, v. 70, n. 27, 2016.

Danevčič, T. et al. Prodigiosin-A multifaceted *Escherichia coli* antimicrobial agent. PLoS One, v. 11, n.9, 2016.

Elkenawy, N.M. et al. Optimization of prodigiosin production by *Serratia marcescens* using crude glycerol and enhancing production using gamma radiation. Biotechnology Reports, v. 14, p. 47-53, 2017.

Elshikh, M. et al. Rezazurin-based 96-wel plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. Biotechnol Lett, v. 38, p. 1015-1019, 2016.

Erandapurathukadumana Sreedharan, H.; Harilal, C. C.; Pradeep, S. Response surface optimization of prodigiosin production by phthalate degrading *Achromobacter denitrificans* SP1 and exploring its antibacterial activity. Preparative Biochemistry & Biotechnology, p. 1-8, 2020.

Gerber, N.N.; Lechevalier, M.P. Prodiginine (prodigiosin-like) pigments from *Streptomyces* and other aerobic *Actinomycetes*. Can. J. Microbiol. 22, 658-667, 1976.

Herráez, R. Using prodigiosin against some gram-positive and gram-negative bacteria and *Trypanosoma cruzi*. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases, p. 1- 8, 2019.

Jan, S.; Khan, M.R. Protective effects of *Monothecha buxifolia* fruit on renal toxicity induced by CCI, in rats. 17, 16, 1, 289, 2016. Disponível em: < www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27530158>. Acesso em:12/12/2019.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

Khanafari, A.; Assadi, M.; Fakhr, A. Review of prodigiosin, Pigmentation in *Serratia marcescens*. Online Journal of Biological Sciences, v. 6, p. 1- 13, 2006.

Kumar, A. et al. Microbial pigments: production and their applications in various industries. Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci, v. 5, p. 203-212, 2015.

Kurbanoglu, E.B. Enhanced production of prodigiosin by *Serratia marcescens* MO-1 using ram horn peptone. Brazilian Journal of Microbiology, v. 46, n. 2, 2015.

Lapenda, J.C. et al. Production and toxicological evaluation of Prodigiosin from *Serratia marcescens* UCP/WFCC1549 on Mannitol Solid Medium. Int J Appl Res Nat Prod, v. 7, n. 2, p. 32-38, 2014.

Lapenda, J.C. et al. Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398. World J Microbiol Biotechnol, v. 31, p. 399-406, 2015.

Lins, J.L. et al. Production and toxicological evaluation of prodigiosin from *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 on mannitol solid medium. Int. J. App. Res. Nat. Prod, v. 7, p. 32-38, 2014.

Lizardi-Jiménez, M.A.; Hernández-Martínez, R. Solid state fermentation (SSF): diversity of applications to valorize waste and biomass. 3 Biotech, v. 7, p. 44, 2017.

Luti, K.J.; Yonis, R.W.; Mahmoud, S.T. An application of solid state fermentation and elicitation with some microbial cells for the enhancement of prodigiosin production by *Serratia marcescens*. Al-Nahrain J. Sci, v. 21, p. 98-105, 2018.

Maybauer, O. et al. The importance of antibiotics in animal models of sepsis. 25 th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine Brussels, Belgium, p. 21- 25, 2005.

Mc laughlin, J.L.; Saizarbitoria, T.C.; Anderson, J.E. Tres biosensayos simples para químicos de productos naturales. Revista de la Sociedad Venezolana de Química, v. 18, p. 13-18, 1985.

Montero-Rodríguez, D. et al. Bioremediation of petroleum derivative using biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549 in low-cost medium. Int. J. Curr.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

Microbiology. App. Sci, v. 4, n. 7, p. 550-562, 2015.

Montero-Rodríguez, D. et al. A low-cost solid fermentation medium for potential prodigiosin production by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549, in: Méndez-Vilas, A. (Ed.), Microbes in the Spotlight: Recent Progress in the Understanding of Beneficial and Harmful Microorganisms. BrownWalker Press, Florida, p. 312-315, 2016.

Montero-Rodríguez, D. et al. Suitability of wheat bran as promising substrate for coproduction of prodigiosin and biosurfactant by *Serratia marcescens* UCP/WFCC 1549, in: Méndez-Vilas, A. (Ed.), Exploring Microorganisms: Recent Advances in Applied Microbiology. BrownWalker Press, Florida, p. 149-153, 2018.

Nakashima, T. et al., Characterization of bacterium isolated from the sediment a Coastal area of Omura Bay in Japan and several biological activities of pigment produced by this isolate. Microbiology Immunology, v. 49, p. 407- 415, 2005.

Nalini, S.; Parthasarathi, R. Production and characterization of rhamnolipids produced by *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its application as biocontrol agent. Biores. Technol, v. 173, p. 231-238, 2014.

Nalini, S.; Parthasarathi, R. Optimization of rhamnolipid biosurfactant production from *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its biocontrol efficacy against Fusarium wilt of eggplant. Annals of Agrarian Science, v.16, n.2, p. 108-115, 2018.

Patil, C.D. et al. Prodigiosin produced by *Serratia marcescens* NMCC46 as a mosquito larvicidal agent against *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. Parasitol Res, v.109, p. 1179-1187, 2011.

Priya, K.A. et al. Antifouling activity of prodigiosin from estuarine isolate of *Serratia marcescens* CMST 07. Microbiological Research in Agroecosystem Management, Springer, New Delhi, v. 16, p. 11-21, 2013.

Phatake Y.B.; Dharmadhikari S.M. Physical parameters optimization for enhancement of prodigiosin production by using *Serratia* spp. World J Pharm Med Res, v. 2, p. 40-48, 2016.

Ramos, S. et al. Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

Northeastern folk medicine. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 19, p. 376 – 381, 2009.

Sadh, P. K.; Duhan, S.; Duhan, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. Bioresources and Bioprocessing, v. 5, n. 1, p. 1, 2018.

Sala, A. et al. Current developments in the production of fungal biological control agents by solid-state fermentation using organic solid waste. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, p. 1- 40, 2019.

Santos, P. et al. Boaventura, Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test) Phytomedicine, v. 10, p. 209, 2003.

Sobrinho, H.B.S. et al. Assessment of toxicity of a biosurfactant from *Candida sphaerica* UCP 0995 cultivated with industrial residues in a bioreactor. Electronic Journal of Biotechnology, v.16, p. 4, 2013.

Souza, C.S. et al. Isolamento e seleção de microrganismos degradadores de derivados de petróleo. In: *Congresso Brasileiro de P&D em Petróleo e Gás*. (3º, 2nd-5th October, 2005, Salvador, BA, Brasil). Abstracts, 2005.

Sulavik, M.C. et al. Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. Antimicrob Agents Chemother, v. 45, n. 4, p. 1126-36, 2001.

Sumathi, C. et. al. Production of prodigiosin using tannery fleshing and evaluating its pharmacological effects. The Scientific World J, v.8, 2014.

Suryawanshi, R. K. et al. Studies on production and biological potential of prodigiosin by *Serratia marcescens*. Appl Biochem Biotechnol, v. 173, p. 1209-1221, 2014.

Stankovic, N. et al. Properties and applications of undecylprodigiosin and other bacterial prodigiosins. Appl Microbiol Biotechnol, v. 98, p. 3841-3858, 2014.

Thomas, L.; Larroche, C.; Pandey, A. Current developments in solid-state fermentation. Biochem Eng J, v. 81, p. 146-161, 2013.

Varjani, S.J.; Upasani, V.N. Critical Review on Biosurfactant analysis, purification and characterization using *rhamnolipid* as a model biosurfactant. Bioresour Technol, 2017.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

Venil, C.K. et al. Current perspective on bacterial pigments: emerging sustainable compounds with coloring and biological properties for the industry - an incisive evaluation. *RSC Adv*, v. 4, p. 39523-39529, 2014.

Velmurugan, P. et al. Monascus pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. *Papers in Natural Resources*, p 378, 2011.

Xia, Y. et al. Solid-state fermentation with *Serratia marcescens* *Xd-1* enhanced production of prodigiosin by using bagasse as an inertia matrix. *Ann Microbiol*, v. 66, p.1239-1247, 2016.

Xu, F.; Xia, S.; Yang, Q. Strategy for obtaining inexpensive prodigiosin production by *Serratia marcescens*. In 3rd International Conference on Chemical, Biological and Environmental Engineering, 2011.

Young, T.P.; Petersen, D.A.; Clary, J.J. The ecology of restoration: historical links, emerging issues and unexplored realms. *Ecology Letters*, v. 8, n. 6, p. 662- 673, 2005.

Yip, C.H. et al. Recent advancements in high-level synthesis of the promising clinical drug, prodigiosin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, p. 1-14, 2019.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

Participação em eventos no período do mestrado

SANTOS, R.A; FERREIRA, I.N.S.; MONTERO-RODRIGUEZ, D.; CAMPOS-TAKAKI, G.M; LIMA, M.A.B. Avaliação de substratos agroindustriais para produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549. Simpósio de coleções biológicas do nordeste-UNICAP, 2019.

ARAÚJO, H.W.C.; MONTERO-RODRIGUEZ, D.; ANDRADE, R.F.S.; SANTOS, R.A; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Avaliação de substratos agroindustriais para produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549. Simpósio de coleções biológicas do nordeste-UNICAP, 2019.

SANTOS, R. A.; ROSENDO, L. A; MONTERO- RODRÍGUEZ, D.; CAMPOS TAKAKI, G.M.; LIMA, M. A. B. Produção sustentável de prodigiosina e biossurfactante por *Serratia marcescens* UCP 1549 em estado sólido. XVII Encontro Nacional de Estudantes de Engenharia Ambiental & V Fórum Latino- Americano de Engenharia e Sustentabilidade, 2019.

ROSENDO, L. A.; PINHO, A.V.; SANTOS, R. A.; MONTERO- RODRÍGUEZ, D.; CAMPOS TAKAKI, G.M. Influência da temperatura e agitação na produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP1549 utilizando farelo de milho como substrato alternativo. XVII Encontro Nacional de Estudantes de Engenharia Ambiental & V Fórum Latino-Americano de Engenharia e Sustentabilidade, 2019.

SANTOS, R.A.; FERREIRA, I.N.S.; MENDONCA, R.S.; MONTERO RODRÍGUEZ, D.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; LIMA, M.A.B. Fermentação em estado sólido como alternativa sustentável para a produção de biossurfactante por *Serratia marcescens* UCP 1549. X SBEA - Meio Ambiente: gestão e controle ambiental, avaliações de impacto ambiental, normas e padrões ambientais, gestão costeira, análises de risco, Produção Mais Limpa, Mudanças Climáticas e Créditos de Carbono, 2019.

SANTOS, P.N.; FONSECA, T.C.S; ALVES, M.F.; SANTOS, R.A.; MONTERO RODRÍGUEZ, D.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Reaproveitamento de resíduos agroindustriais na produção de biossurfactante por *Penicillium rugulosum* UCP 0143.

X SBEA - Meio Ambiente: gestão e controle ambiental, avaliações de impacto ambiental, normas e padrões ambientais, gestão costeira, análises de risco, Produção Mais Limpa, Mudanças Climáticas e Créditos de Carbono, 2019.

Santos, R.A. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* UCP 1549

MENDONÇA, R.S.; SOUZA, A.F.; FERREIRA, I.N.S.; SANTOS, R.A.; MONTERO RODRÍGUEZ, D.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Low-cost production of biodispersant by *Absidia Cylindrospora* UCP 1301 for application in oil spill remediation. X SBEA - Meio Ambiente: gestão e controle ambiental, avaliações de impacto ambiental, normas e padrões ambientais, gestão costeira, análises de risco, Produção Mais Limpa, Mudanças Climáticas e Créditos de Carbono, 2019

SANTOS, R. A.; SILVA, L. A. R.; FERREIRA, I.N.S.; NOVAES, C.F.; DOS SANTOS, P.N.; FRANÇA, E. S.; SOBRAL, D. M.; MONTERO-RODRÍGUEZ, D.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; LIMA, M.A.B. Solid-state fermentation for low-cost production of prodigiosin by *Serratia marcescens* UCP 1549. 30º Congresso brasileiro de microbiologia, 2019.

MONTERO-RODRÍGUEZ, D.; ANDRADE, R. F. S.; SOUZA, A. F.; RUBIO-RIBEAUX, D.; SILVA, G. K. B.; LUNA, M. A. C.; MENDONÇA, R. S.; ALVES, M. F.; SANTOS, R. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Novel production of biosurfactant by *Mucor hiemalis* UCP 1309 using solid-state fermentation. 30º Congresso brasileiro de microbiologia, 2019.

SOBRAL, D. M.; MONTERO-RODRÍGUEZ, D.; GOMES, M. D. P.; RUBIO-RIBEAUX, D.; FERREIRA, I. N. S.; NOVAES, C. F.; SANTOS, R. A.; NASCIMENTO, I. D. F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; SANTOS, V. A. Efficiency of decolorization of methylene blue using biomass of *Cunninghamella echinulata* UCP 1297 obtained in low-cost medium. 30º Congresso brasileiro de microbiologia, 2019.