



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

**Avaliação das condições de crescimento da
Serratia plymuthica para produção de
prodigiosina
Versão Final**

Felipe Ozorio Giacomelli

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Biotecnologia
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof. Dra. Isabel Cristina Aguiar de Sousa e Silva Gouveia

Covilhã, novembro de 2018

Dedicatória

Aos meus pais, Erny e Lucia!

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer aos meus pais, Erny e Lucia, pelo amor incondicional, confiança depositada e pela oportunidade de realizar este curso de mestrado aqui em Portugal. Obrigado por sempre nos ensinarem a voar e lutar pelos nossos sonhos. Aos meus irmãos, por estarem sempre juntos para qualquer coisa, seja para ajudar ou para criticar. Vocês são maravilhosos.

A minha orientadora, Professora Dr^a Isabel Gouveia, pela paciência, orientação e pelos conhecimentos transmitidos durante este período.

A Lucia Amorim e a Claudia Mouro, as melhores colegas de laboratório que eu poderia ter. Serei eternamente grato por tudo que aprendi com vocês. Obrigado pela paciência, pela amizade, pelos vários cafés!

Aos mestres que, durante estes dois anos de curso, dedicaram seu tempo para transmitir seu conhecimento aos alunos. A Faculdade de Ciências e aos departamentos de química e Ciência e Tecnologia de Têxteis pela cedência dos laboratórios e equipamentos para que esta pesquisa fosse realizada.

A todos da minha família, que mesmo de longe, me apoiaram com pensamentos positivos e muito carinho durante esta jornada. Em especial meus avós, Erny, Dalva e Niny, que buscaram na tecnologia uma forma de comunicação com os netos distantes.

A família que escolhi construir aqui na Covilhã, meus amigos que quero ser para sempre junto do coração. Quando estamos juntos, me sinto em casa. Obrigado por ajudarem a amenizar as saudades de casa.

Aos meus amigos, que mesmo lá do Brasil, nunca deixaram toda essa distância abalar nosso relacionamento. Pelo contrário, estamos ainda mais unidos!

A Universidade da Beira Interior, por toda essa estrutura cedida aos alunos. Obrigado por receberem tão bem, nós alunos, que viemos de tão longe para aqui alcançar o tão sonhado diploma.

O meu mais sincero obrigado a todos que, de uma forma ou outra, contribuíram com a realização deste mestrado.

Resumo

A cor é uma das principais características dos objetos que nos rodeiam e enquanto consumidores é um fator determinante na seleção de qualquer produto. A tendência mundial para uso de produtos mais “*eco-friendly*” e naturais está em grande expansão, e nesse mercado os pigmentos microbianos surgem como uma alternativa na substituição de corantes sintéticos em diferentes indústrias.

A prodigiosina produzida por *Serratia plymuthica*, bactéria gram negativa da família das *Enterobacteriaceae*, é um metabólito secundário de produção intracelular. Para além do potencial de tingimento, possui atividades biológicas (antifúngica, imunossupressora, anticancerígena e antimicrobiana) que podem ser exploradas, proporcionando a obtenção de materiais multifuncionais. O presente estudo teve por objetivo produzir o pigmento prodigiosina, alcançar as melhores condições de crescimento da bactéria e produção do pigmento, definir a concentração mínima inibitória (MIC) do pigmento contra *Staphylococcus aureus* (SA) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA), funcionalizar uma amostra têxtil de algodão e avaliar o efeito antibacteriano da prodigiosina após processo de funcionalização no algodão.

As melhores condições de cultivo alcançadas foram em incubações a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48h em meio de cultura PGP (glicerol como fonte de carbono e peptona como fonte de nitrogénio), taxa de oxigenação correspondente a 20% (v/v) e agitação (nos cultivos submersos) entre 150 e 200rpm. Obteve-se valores de MIC de 0,24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 1,25 mg/mL para, respectivamente, SA e PA. E a avaliação da eficácia da funcionalização demonstrou que o pigmento ficou ligado a fibra e possui atividade antibacteriana, pois reduziu o crescimento bacteriano em 97,10% (SA) e 45,26% (PA), em comparação com resultados da amostra sem prodigiosina.

Palavras-chave

Pigmentos microbianos, prodigiosina, *Serratia plymuthica*, condições de crescimento, antibacteriano

Abstract

The color of any object is, for any consumer, a determining factor in products selection. The worldwide trend towards more "eco-friendly" and natural products is expanding, and in this market microbial pigments emerge as an alternative to replace synthetic dyes in several industries.

The prodigiosin produced by *Serratia plymuthica*, a gram-negative bacterium of the family Enterobacteriaceae, is a secondary metabolite of intracellular production. Besides the coloring properties, the pigment has many biological activities (antifungal, immunosuppressive, non-carcinogenic and antimicrobial) that can be further exploited to obtain materials with multifunctional properties.

The aim of the present study was to produce the pigment prodigiosin, to achieve the best growth conditions for the bacteria and pigment production, to define the minimum inhibitory concentration (MIC) of the pigment against *Staphylococcus aureus* (SA) and *Pseudomonas aeruginosa* (PA), to functionalize a sample of cotton textile with pigment and to evaluate the antibacterial effect of prodigiosin after the functionalization process.

The best culture conditions were achieved in incubations at $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 48h in a PGP culture (glycerol as carbon source and peptone as nitrogen source), oxygenation rate of 20% (v / v) and agitation (in submerged cultures) between 150 and 200rpm. MIC values of 0.24 mg / mL and 1.25 mg / mL were obtained for, respectively, SA and PA.

And the evaluation of the effectiveness of the functionalization showed that the pigment was bound to fiber and has antibacterial activity, as it reduced bacterial growth by 97.10% (SA) and 45.26% (PA), compared to results of the sample without prodigiosin.

Keywords

Microbial pigments, prodigiosin, *Serratia plymuthica*, growth conditions, antibacterial

Índice

Lista de Figuras	XV
Lista de Tabelas	XVII
Lista de Acrônimos	XIX
CONTEXTUALIZAÇÃO E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	1
Contextualização	3
Estrutura da dissertação	4
CAPÍTULO I.....	5
INTRODUÇÃO	5
1.1 Diferença entre corantes e pigmentos.....	7
1.2 Naturais x Sintéticos	7
1.3 Pigmentos Naturais.....	7
1.4 Classificação dos pigmentos	8
1.4.1 Estrutura química.....	8
1.4.1.1 Indigoides.....	8
1.4.1.2 Carotenoides	9
1.4.1.3 Quinoides	9
1.4.1.4 Flavonoides.....	10
1.4.1.5 Taninos.....	11
1.4.1.6 Diidropirano	11
1.4.1.7 Piridina.....	11
1.4.1.8 Betalaínas	11
1.4.2 Método de Aplicação	12
1.4.2.1 Corantes Mordentes.....	12
1.4.2.2 Cuba	12
1.4.2.3 Diretos	12
1.4.2.4 Ácidos	13
1.4.2.5 Básicos	13
1.4.2.6 Dispersos.....	13

1.4.3 Origem.....	13
1.4.3.1 Origem Vegetal.....	13
1.4.3.2 Origem Animal.....	14
1.4.3.3 Origem Mineral.....	14
1.4.3.4 Origem Microbiana.....	15
1.5 <i>Serratia sp.</i>	16
1.5.1 Características gerais.....	16
1.5.2 <i>Serratia plymuthica</i>	17
1.6 Prodigiosina.....	17
1.6.1 Propriedades.....	17
1.6.2 Estrutura Química.....	18
1.7 Possíveis aplicações da prodigiosina.....	19
1.7.1 Aplicação têxtil.....	19
CAPÍTULO II.....	21
OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
CAPÍTULO III.....	25
MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Materiais.....	27
3.1.1 Reagentes.....	27
3.1.2 Recursos bacterianos.....	27
3.1.3 Especificações.....	27
3.1.4 Instrumentação.....	28
3.2. Métodos.....	28
3.2.1 Otimização das condições de crescimento bacteriano.....	28
3.2.1.1 Meio de fermentação semi-sólido.....	28
3.2.1.2 Meio de fermentação líquido.....	29
3.2.1.3 Temperatura.....	29
3.2.1.4 Taxa de agitação.....	29
3.2.1.5 Presença/ausência de Luz.....	30

3.2.1.6 Taxa de oxigenação.....	30
3.2.2 Avaliação da presença de prodigiosina	30
3.2.2.1 Teste em meio semi-sólido	30
3.2.2.2 Teste em meio líquido	30
3.2.3. Caracterização do pigmento	30
3.2.3.1. Comparação do perfil espectrofotométrico a pH ácido e básico	30
3.2.3.2. Análise por FTIR-ATR	31
3.2.3.3. Análise EDX.....	31
3.2.4. Avaliação da atividade antibacteriana	31
3.2.4.1. Determinação da concentração mínima inibitória (MIC)	31
3.2.5. Funcionalização de fibra têxtil com prodigiosina.....	31
3.2.5.1 Processo de funcionalização	32
3.2.5.2 Avaliação da eficácia de funcionalização.....	32
3.2.5.2.1. Energia dispersiva de espectroscopia de raio-X (EDX)	32
3.2.5.2.2 Determinação da intensidade da cor.....	32
3.2.6.3 Avaliação da atividade antibacteriana	33
CAPÍTULO IV	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 Otimização das condições de crescimento	36
4.1.1 Cultivo semi-sólido	36
4.1.1.1 Fonte de carbono e nitrogênio.....	36
4.1.1.2 pH.....	37
4.1.1.3 Temperatura	38
4.1.1.4 Tempo de incubação	38
4.1.2 Cultivo em Meio líquido	39
4.1.2.1 Luminosidade	40
4.1.2.2 Taxa de oxigenação.....	40
4.1.2.3 Agitação.....	41
4.2 Avaliação e caracterização do pigmento	41
4.2.1 Teste presuntivo	41
4.2.2 Comparação do perfil ácido e básico do pigmento	42

4.2.3 Análise FTIR-ATR.....	43
4.2.4 Análise EDX	43
4.3 Avaliação da atividade antibacteriana	44
4.3.1 Concentração mínima inibitória	44
4.4 Funcionalização	44
4.4.1 Aplicação do pigmento em amostra multifibras	44
4.4.2 Aplicação do pigmento na fibra de algodão	45
4.4.3 Avaliação da efetividade da funcionalização	46
4.4.3.1 Determinação da intensidade da cor	46
4.4.3.2 Análise EDX.....	47
4.4.4 Avaliação atividade antibacteriana	48
CAPÍTULO V.....	51
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS	51
5.1 Conclusão	53
5.2 Perspectivas futuras.....	53
CAPÍTULO VI	55
REFERÊNCIAS	55

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura básica indigoide. (Adaptado de Zaroni e Yamanaka, 2016).....	9
Figura 2: Betacaroteno (A) e Luteína (B). (Adaptado de Chandrika, 2009)	9
Figura 3: Estruturas básicas de corantes quinonóides: benzoquinona (A), naftoquinona (B) e antraquinona (C). (Adaptado de Yusuf et al, 2017).....	10
Figura 4: Flavona (A), Isoflavonoide (B) e Calcona (C) (adaptado de Yusuf et al, 2017)	10
Figura 5: Estrutura química da brasilina (Reprodução: Chemical Book).....	11
Figura 6: Estrutura química da berberina (Wang et al, 2018)	11
Figura 7: Betacianinas (A) e Betaxantinas (B) (adaptado de Gengatharan et al, 2015)	12
Figura 8: <i>Serratia plymuthica</i> em PGP-ágar (Reprodução: Felipe Giacomelli)	17
Figura 9: Conformações cis e trans da prodigiosina (Darshan e Manonmani, 2015)	18
Figura 10: Produção de prodigiosina em placas de cultivo com PGP (a), NA (b) e TSA (c). (Reprodução: Felipe Giacomelli).....	37
Figura 11: Produção de prodigiosina em meio PGP (a) e PG (b) (Reprodução: Felipe Giacomelli).....	37
Figura 12: Produção de prodigiosina em PGP ágar com diferentes temperaturas (Reprodução: Felipe Giacomelli).....	38
Figura 13: Placas de PGP para produção de prodigiosina em diferentes tempos de incubação (Reprodução: Felipe Giacomelli)	38
Figura 14: Avaliação da taxa de oxigenação na produção do pigmento (Reprodução: Felipe Giacomelli)	41
Figura 15: Avaliação da presença do pigmento prodigiosina por diferença de pH (A: meio líquido B: extrato bruto de pigmento extraído) (Reprodução: Felipe Giacomelli).....	42
Figura 16: Comparação dos perfis ácido e básico do pigmento extraído	42
Figura 17: Espectro FTIR-ATR da prodigiosina.....	43
Figura 18: Resultado do tingimento a 40°C em amostra multifibras. (Reprodução :Felipe Giacomelli).....	45
Figura 19: Amostras de algodão utilizadas na funcionalização. (Reprodução: Felipe Giacomelli).....	46
Figura 20: Gráfico de redução do crescimento bacteriano nas amostras de algodão funcionalizadas com prodigiosina	49

Lista de Tabelas

Tabela 1: Corantes naturais vegetais*	13
Tabela 2: Exemplos de pigmentos naturais de origem mineral classificados pela sua cor	14
Tabela 3: Exemplos de pigmentos naturais de origem microbiana	15
Tabela 4: Espécies do gênero <i>Serratia</i>	16
Tabela 5: Reagentes usados em laboratório no decorrer do trabalho.	27
Tabela 6: Equipamentos usados em laboratório no decorrer do trabalho.....	28
Tabela 7: Experiências realizadas para avaliação das condições de cultivo em diferentes meios de cultura em estado semi-sólido.....	36
Tabela 8: Testes de fermentação da <i>Serratia plymuthica</i> com variações nas condições	39
Tabela 9: Valores de absorvância obtidos para densidade ótica (600nm) e extração do pigmento (534nm)	40
Tabela 10: Valores de absorvância de D.O. e extração do pigmento com diferentes luminosidades	40
Tabela 11: Composição elementar da prodigiosina por análise de EDX	43
Tabela 12: Valores de MIC da prodigiosina obtidos para as bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
Tabela 13: Especificações das amostras funcionalizadas com prodigiosina	45
Tabela 14: Determinação da intensidade da cor das amostras funcionalizadas com prodigiosina	47
Tabela 15: Valores de % atômica de cada elemento na amostra funcionalizada com prodigiosina	47
Tabela 16: Avaliação da atividade antibacteriana de algodão funcionalizado com prodigiosina	48

Lista de Acrônimos

AATCC: American Association of Textile Chemists and Colourist

ABS: Absorbância

ATR: Attenuated total reflectance

CPMA: Color Pigment Manufacturers Association, Inc.

DIN: Deutsche Industrie Norm

EDX: Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy

ETAD: The Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigment
Manufacturers

FTIR: Fourier-Transform Infrared Spectroscopy

ISO: International Organization for Standardization

MIC: Minimal Inhibitory Concentration

NA: Nutrient Agar

NB: Nutrient Broth

OMS: Organização Mundial da Saúde

PA: *Pseudomonas aeruginosa*

PG: Peptona-Glicerol

PGP: Peptona-Glicerol-Fosfato

SA: *Staphylococcus aureus*

SDC: Society of dyers and colourists

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SEM: Scanning electron microscopy

SmF: Submerged fermentation

SSF: Solid-State fermentation

TSA: Tryptic soy agar

TSB: Tryptic soy broth

UBI: Universidade da Beira Interior

CONTEXTUALIZAÇÃO E ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

Contextualização

Há milhares de anos que o ato de colorir é empregado na cultura em vários objetos, alimentos e vestuário. Os primeiros registros históricos datam de 60 mil anos atrás, onde já se utilizava o ocre natural (Buxbaum, 2008). Na época da pré-história os pintores utilizavam os pigmentos disponíveis nas proximidades, tais como: pigmentos de terra (minerais limonita e hematita, ocre vermelho, amarelo ocre e úmido), carvão vegetal do fogo, ossos queimados e branco de calcita moída (Douma, 2008; Barnnet, Miller e Pearce, 2006).

A cor é uma parte inseparável do nosso cotidiano e sua presença é evidente em tudo que percebemos. A cor influencia nossos estados de humor e, em geral, aumenta a maneira pela qual nós desfrutamos nossos arredores. O nosso crescimento, pressão sanguínea, pulsação, temperatura, atividade muscular, sistema imunitário, etc., são todos afetados pelos raios de luz. Os raios coloridos afetam, não só os corpos, mas também as nossas emoções, disposições e faculdades mentais (Silva, 2006; Mahnke, 1996).

A indústria de pigmentos começou com o primeiro pigmento quimicamente sintetizado por Diesbach, em Berlim, em 1704 (Barnnet, Miller e Pearce, 2006). No século XIX, ultramarinos, os pigmentos verdes de cobalto da Guignet, os pigmentos de óxido de ferro e os pigmentos de cádmio foram desenvolvidos em rápida sucessão (Buxbaum, 2008). A descoberta ocasional da mauveína, em 1856, por William Perkin foi um marco na história e precursor para o desenvolvimento de centenas de corantes sintéticos e pigmentos (Garfield, 2002).

Apesar de todo avanço da produção de pigmentos no decorrer da história da arte e industrialização, Morris e Travis (1992) afirmam que os materiais e métodos quase não mudaram até a revolução industrial. Com a intensa inovação tecnológica ao redor de 1915, a Alemanha manteve o monopólio sobre a produção de corante sintético até a Segunda Guerra Mundial. Pelos anos 1990 os Estados Unidos passaram a ser a maior fonte exportadora de corantes e pigmentos, somando quase 2000 tipos de corantes sintéticos.

Com o desenvolvimento da moderna indústria da cor, surgiu a necessidade de criação de normas internacionais para regulamentar a identificação, produção, medição e teste das cores. O índice mais importante criado é o Colour Index™, atualmente atualizado e publicado online pela Society of dyers and colourists (SDC) em conjunto com a American Association of Textile Chemists and Colourist (AATCC). O Colour Index possui mais de 34.500 corantes e pigmentos produzidos, além de mais de 11 mil produtos catalogados pelo nome comercial (Colour Index, 2018).

O termo colorante caracteriza, sem discriminação, os corantes ou pigmentos. Em particular, os pigmentos (caracterizados como insolúveis nos meios que são aplicados) são muitas vezes considerados como um subgrupo de corantes. (Herbst e Hunger, 1992 apud. Zollinger, 1999)

A definição de corante é dada pela The Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigment Manufacturers, já os pigmentos são definidos pela Color Pigment Manufacturers Association. Para a ETAD corantes são substâncias orgânicas intensamente coloridas ou fluorescentes, que conferem cor a um substrato por absorção seletiva da luz, que

são solúveis. Já a CPMA define pigmentos como sólidos orgânicos ou inorgânicos particulados coloridos, pretos, brancos que usualmente são insolúveis no substrato no qual são incorporados (Colour Index™, 2018).

Geralmente, considera-se que um aditivo de cor pertence a uma das duas classes: aditivos de cor “naturais” ou aditivos de cor “sintéticos”. A distinção nem sempre é significativa porque existem alguns aditivos de cor considerados naturais que são produzidos por meio da síntese química (IACM, 2018). Os corantes sintéticos são compostos orgânicos usados em diversas indústrias, tendo seu uso justificado pelo menor custo de produção, maior diversidade de cores, maior grau de pureza e pelo alto controle da fidelidade da cor (Zanoni e Yamanaka, 2016).

Existe uma demanda em crescimento constante no mercado dos colorantes. A busca por produtos naturais que sejam seguros para a saúde, não afetem o meio ambiente e gerem uma grande conscientização nas indústrias para que reduzam o uso de produtos sintéticos. Esta demanda resultou no aumento das pesquisas de pigmentos produzidos por bactérias. (Aruldass et al., 2016).

Este trabalho pretende explorar as potencialidades dos pigmentos naturais, nomeadamente, um pigmento natural de origem microbiana, tanto ao nível da optimização do processo de produção como também a sua aplicação em substratos têxteis.

Estrutura da dissertação

Os conceitos gerais, aplicados a todos os objetivos do trabalho são apresentados no primeiro capítulo. Neste, foi realizada a revisão bibliográfica, definindo-se pigmento natural e suas classificações, enquadrando o pigmento prodigiosina e a bactéria utilizada no estudo (*Serratia plymuthica*) e caracterizando a utilização de pigmentos na indústria têxtil. Os objetivos, gerais e específicos, são apresentados no segundo capítulo.

No terceiro capítulo foram descritos os materiais, os equipamentos, o microrganismo e o meio de cultivo. São relatados também, os métodos analíticos utilizados em todas as etapas do trabalho, do crescimento da bactéria até testes de aplicação do pigmento.

No capítulo quatro são apresentados os resultados obtidos no estudo e a discussão com a literatura. As conclusões mais importantes do trabalho, mostrando resumidamente os principais resultados obtidos encontram-se no capítulo cinco.

E por fim, no sexto capítulo encontram-se as referências bibliográficas que serviram de base científica para a realização deste trabalho.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1.1 Diferença entre corantes e pigmentos

Corantes são substâncias orgânicas intensamente coloridas ou fluorescentes, que conferem cor a um substrato por absorção seletiva da luz, que são solúveis. Já os pigmentos são sólidos orgânicos ou inorgânicos particulados coloridos, pretos, brancos que são insolúveis (Colour Index, 2018).

Neste trabalho fez-se a utilização dos termos “aditivo de cor” e “colorante” quando não era especificada a classificação do produto quando a corante ou pigmento.

1.2 Naturais x Sintéticos

Os colorantes de origem sintética podem causar muitos efeitos maléficos a saúde humana (potenciais carcinogênicos, afetar os sistemas nervoso, imune e digestivo) e são grandes poluidores ambientais, visto que muitos não se degradam e acumulam ecossistema com danos irreversíveis (Venil et al., 2013). Estes produtos sintéticos, que após sua descoberta tomaram lugar dos colorantes naturais, ainda dominam o mercado ao máximo (Costa, 2017).

Atualmente a preocupação dos consumidores com produtos sintéticos vem aumentando, e em decorrência ocorre a expansão do mercado de produtos naturais. Devido ao reconhecimento dos problemas que pigmentos sintéticos podem causar, a utilização destes produtos vem sendo proibida em muitos campos de aplicação (Moritz, 2005).

A rápida evolução nas pesquisas e tecnologias é a alternativa mais promissora para diminuir ou evitar o uso de pigmentos sintéticos. O setor industrial busca vias ecologicamente aceitáveis e de menor custo para obtenção de pigmentos. Uma das estratégias para o Brasil seria a aplicação de metodologias biotecnológicas, utilizando metabólitos de microrganismos (Moritz et al., 2001 apud Cruz Filho e Teixeira, 2013). A utilização de pigmentos microbianos aumenta cada vez mais e resulta em produtos que são utilizados nas mais diversas indústrias (farmacêutica, alimentar, cosmética entre outras), apresentando excelentes vantagens econômicas e ambientais, e trazendo benefícios para a saúde dos consumidores (Paillié Jiménez, 2017).

1.3 Pigmentos Naturais

Existe uma grande tendência do aumento do consumo e da preferência dos pigmentos naturais por parte dos consumidores. No entanto, não há uma definição legislada ou universalmente aceita para o termo “natural” quando o assunto é pigmentos (Carle e Schweiggert, 2016).

Para os pigmentos naturais de uso alimentar, algumas normas publicadas pela FSA (Agência de Padrões Alimentares do Reino Unido) e pela DGCCRF (Direção-Geral da Concorrência, Defesa do Consumidor e a repressão da fraude), mas estas não são juridicamente vinculativas. Os principais fatores diferenciadores considerados com maior frequência para descrever a naturalidade são a ocorrência na natureza, o material de origem e o processo de fabricação (NATCOL, 2013).

No setor têxtil consideram-se pigmentos naturais os elementos de recursos naturais, classificados por sua fonte de origem (vegetais, animais, minerais e microbianos) ou classificados de acordo com sua fórmula química, que tingem as fibras. Geralmente um pigmento natural é sustentável, pois é renovável e biodegradável. A experiência com o tingimento natural apresentou resultado com cores ricas e brilhosas até então impossível em produtos sintéticos (Vankar, 2017).

O *Codex Alimentarius*, da Organização Mundial da Saúde (OMS), já fundamentou o não uso de alguns pigmentos sintéticos via ministérios da saúde de diversos países (Furtado, 2003). A utilização de pigmentos naturais tem se elevado devido à preocupação dos consumidores com os efeitos prejudiciais dos pigmentos sintéticos à saúde (Kumar et al., 2015). Além disso, os pigmentos naturais apresentam vantagens no marketing, por serem mais benéficos à saúde (Dufossé et al., 2005).

1.4 Classificação dos pigmentos

Os corantes naturais já foram classificados de várias maneiras (Gulrajani e Gupta, 1992). Considera-se mais relevante as classificações de acordo com a estrutura química, fonte de origem e métodos de aplicação (Yusuf et al, 2017; Zanoni e Yamanaka, 2016).

1.4.1 Estrutura química

A classificação por estrutura química ou por grupo cromóforo (sistema conjugado de duplas ligações responsável pela coloração) é conhecida como a mais correta para os colorantes, pois com essa classificação os corantes são rapidamente identificados por estarem agrupados em categorias que possuem características semelhantes (Zollinger, 1999; Hunger, 2003).

Nesta seção serão apresentadas as classificações químicas sugeridas por Yusuf et al. (2017) em sua revisão sobre os corantes e pigmentos naturais. Os produtos foram divididos em oito categorias, que são: indigoides, carotenoides, quinoides, flavonoides, taninos, diidropiranos, baseados em piridina e betalainas.

1.4.1.1 Indigoides

Os colorantes pertencentes a esta classe são os mais antigos utilizados para tingimento de tecidos, principalmente lã, linho, algodão e denim (índigo é a cor azul características das calças e jaquetas deste tecido) (Yusuf et al, 2017; Zanoni e Yamanaka, 2016; Gürses, 2016). Os principais colorantes são o índigo (extraído da *Indigofera spp.*, *Polygonum tinctorium*, *Perisicaria tinctoria* e *Isatis tinctoria*) (Garcia-Macias e John, 2004) e o corante púrpura de Tyrian (extraído das glândulas hipobranquiais de caracóis marinhos da família Muricidae) (Yusuf et al, 2017). O corante índigo mais utilizado é de origem sintética, não tanto o natural.

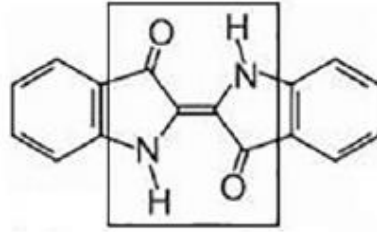


Figura 1: Estrutura básica indigoide. (Adaptado de Zanoni e Yamanaka, 2016)

1.4.1.2 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos orgânicos com cores brilhantes (variam entre vermelho, laranja ou amarelo) encontrados em organismos fotossintéticos (plantas, fungos e procariontes) (Yusuf et al, 2017). Os carotenoides são poliisoprenóides com extenso sistema de duplas ligações conjugadas (cromóforo absorvedor de luz responsável pela cor). A estrutura básica é simétrica, linear e geralmente contém 40 átomos de carbono, podendo possuir estrutura cíclica na extremidade. Estes pigmentos são separados em duas classes: os hidrocarbonetos conhecidos como carotenos (Figura 2A) e os que contém oxigênio chamados de xantofilas (Figura 2B) (Chandrika, 2009).

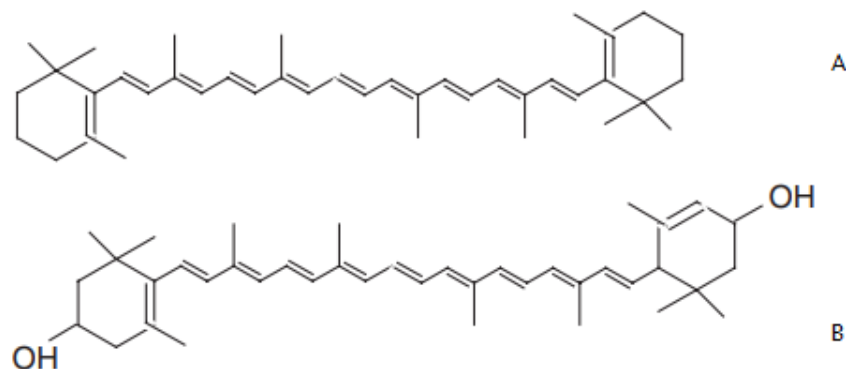


Figura 2: Betacaroteno (A) e Luteína (B). (Adaptado de Chandrika, 2009)

1.4.1.3 Quinoides

Os quinoides são amplamente distribuídos e ocorrem em grande número na natureza, variando de amarelo a vermelho. Estruturas químicas de quinonas de ocorrência natural são mais diversificadas do que qualquer outro grupo de pigmentos vegetais. Os corantes quinoides são classificados, de acordo com sua estrutura, em três diferentes grupos:

- Benzoquinona

O sistema de elétrons- π que forma o cromóforo é pequeno, por isso contém outros grupos insaturados conjugados ao anel benzoquinona. Estes corantes podem ser extraídos de cogumelos, líquens e plantas (cartamina extraída da *Carthamus tinctorius L*), sendo a última a fonte mais comum e de fácil cultivo (Bechtold e Mussak, 2009).

- Naftoquinona

Os dois representantes mais importantes para corantes deste grupo são lawsone e juglone. O lawsone (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) é um corante vermelho-alaranjado presente nas folhas de henna (*Lawsonia inermis*), bem como na flor de aguapé (*Eichhornia crassipes*). Já o juglone, 5-hidroxi-1,4-naftoquinona, é um corante marrom extraído de diferentes partes de noqueiras (*Junghlandaceae*) (Bechtold e Mussak, 2009).

- Antraquinona

Conhecidos como o maior grupo dentro da classe dos corantes de quinona, são caracterizados por possuir estrutura com um sistema de três anéis lineares, onde os grupos carbonílicos (unidade cromófora) estão no anel central (Christie, 2001). Estes podem ser extraídos de bactérias, fungos, líquens e plantas (Han et al. 2001).

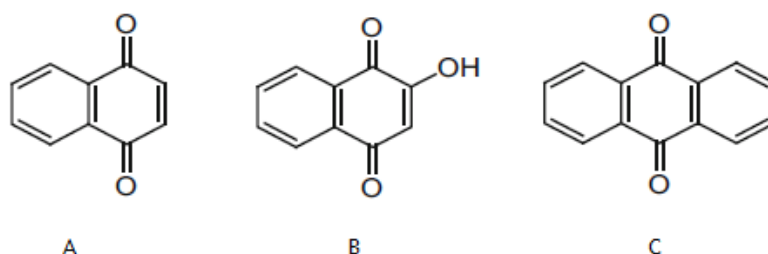


Figura 3: Estruturas básicas de corantes quinonóides: benzoquinona (A), naftoquinona (B) e antraquinona (C). (Adaptado de Yusuf et al, 2017)

1.4.1.4 Flavonoides

Maior grupo de corantes oriundos de plantas, com variação de cor entre amarelo pálido (isoflavonas), amarelo forte (calçonas, flavonas, flavonóis), laranja e vermelho (aurones) e azul (antocianinas) (Yusuf et al, 2017). Os flavonoides possuem estrutura de carbono C6-C3-C6, que varia em torno do anel de oxigênio heterocíclico característico. As antocianinas são responsáveis pelas cores laranja para vermelho a violeta e são o composto que produz a cor mais intensa do pigmento flavonoide, absorvendo a luz entre 490 e 550 nm (Giusti e Wallace, 2009).

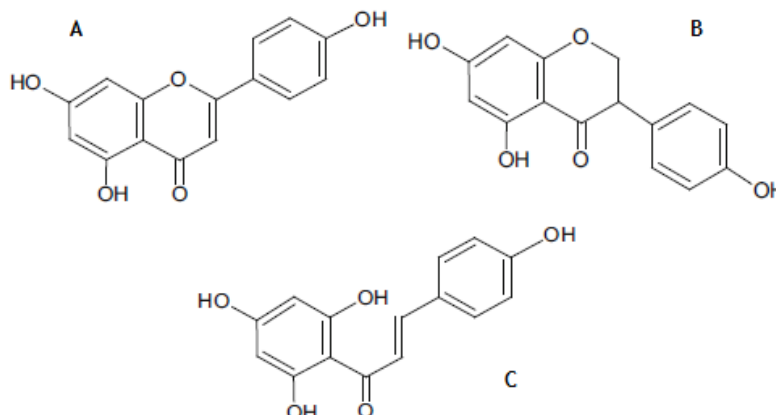


Figura 4: Flavona (A), Isoflavonoide (B) e Calcona (C) (adaptado de Yusuf et al, 2017)

1.4.1.5 Taninos

Os taninos são definidos como compostos adstringentes, fenólicos, solúveis em água e encontrado em várias partes da planta. Os taninos desempenham um papel muito importante no tingimento com corantes naturais, melhorando a afinidade das fibras em relação a diferentes corantes. Ao misturar com diferentes corantes naturais, apresenta diferentes tonalidades como amarelo, castanho, cinzento e preto (Prabhu, 2014; Yusuf et al, 2017).

1.4.1.6 Diidropirano

Esta classe compreende importantes corantes naturais para tons escuros em seda, lã e algodão (Dedhia, 1998). Alguns exemplos desta classe são brasilina (corante vermelho extraído de *Caesalpinia sappan*) e hematoxilina (corante extraído de *Haematoxylon campechianum* e utilizado na coloração de compostos celulares) (Yusuf et al, 2017).

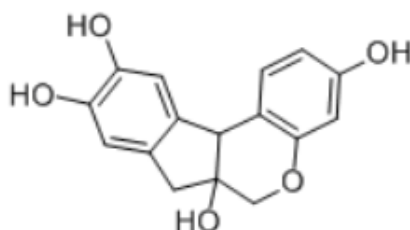


Figura 5: Estrutura química da brasilina (Reprodução: Chemical Book)

1.4.1.7 Piridina

O corante berberina, amarelo natural 18, é um alcalóide de isoquinolina com uma cor amarela brilhante. Conhecido como o único corante da classe das piridinas a berberina é encontrada em algumas espécies de plantas (*Hydrastis canadensis*, *Berberis aquifolium*, *Berberis vulgaris* e *Coptis chinensis*) (Wang et al, 2018; Schor, 2012). Este pigmento já foi utilizado para tingir couro e madeira e lã (Gulrajani, 2001).

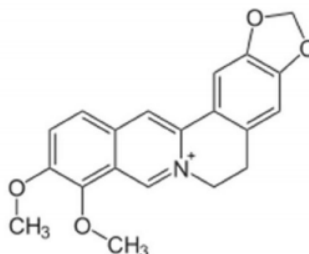


Figura 6: Estrutura química da berberina (Wang et al, 2018)

1.4.1.8 Betalaínas

Os pigmentos betalaínas caracterizam-se por ser uma classe que contém nitrogênio solúvel em água. São pigmentos vermelhos encontrados em plantas de Caryophyllales, na

beterraba, na *Opuntia lasiacantha* (Yusuf et al, 2017), e também podem ser encontrados em fungos (Strack et al, 2003).

Como mostrado na figura 7, podem ser divididas em duas subunidades (betacianinas vermelhas e betaxantinas amarelas), onde a atribuição da cor se deve as duplas ligações ressonantes da estrutura da betalaina (Gengatharan et al, 2015)

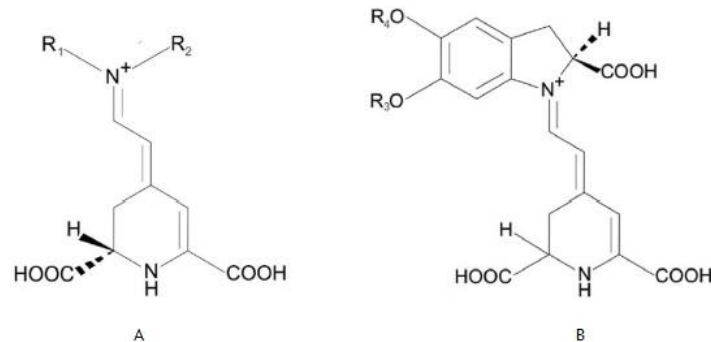


Figura 7: Betacianinas (A) e Betaxantinas (B) (adaptado de Gengatharan et al, 2015)

1.4.2 Método de Aplicação

A tecnologia atual de tingimento consiste em várias etapas que são definidas de acordo com a natureza da fibra têxtil, classificação e disponibilidade do corante para aplicação e propriedades de fixação compatíveis com o destino do material a ser tingido (Guaratini e Zanoni, 2000). Nesta seção os corantes e pigmentos serão classificados de acordo com os métodos de aplicação.

Para que o tingimento seja uniforme, algumas características devem ser atendidas, como: afinidade (corante/pigmento integrar a fibra após o tingimento), igualização (uniformidade da cor na fibra) e solidez (resistir a lavagens) (Alcantara e Daltin, 1996).

1.4.2.1 Corantes Mordentes

Corantes mordentes são aqueles que podem ser ligados a um material em que possuam pouca afinidade pela adição de um mordente (produto químico que aumenta a interação entre o corante e a fibra). A maioria desses corantes produz diferentes tons ou cores com diferentes mordentes com tonalidade e tonalidade diferentes (Yusuf et al, 2017).

1.4.2.2 Cuba

Corantes insolúveis na sua forma colorida, contudo podem sofrer redução e tornarem-se solúveis e incolor, assim aumentando a afinidade com a fibra. A oxidação dos corantes converte-os novamente na sua forma colorida insolúvel natural (Yusuf et al, 2017).

1.4.2.3 Diretos

Os corantes diretos são moléculas orgânicas solúveis em água que podem ser aplicadas direto em fibras celulósicas (exemplo: algodão), mas devido à interação química mais fraca, possui baixa resistência à lavagem (Yusuf et al, 2017).

1.4.2.4 Ácidos

Os ácidos são usados principalmente em poliamida, lã, seda e fibras de polipropileno (Ayad e El-Nasr 2012). A aplicação é feita em meio ácido e possui grupos sulfônico ou carboxílico nas moléculas. As cores resultantes são brilhantes com solidez muito variável (Gürses et al, 2016).

1.4.2.5 Básicos

Os corantes básicos conhecidos como corantes catiônicos têm carga positiva geralmente resultante do cátion amônio. Estes corantes solúveis em água são aplicados a papel, nylons e poliésteres modificados. Os corantes básicos são solúveis em água e produzem cátions coloridos em solução (Hunger 2003). Nas fibras acrílicas estes corantes apresentam uma resistência da cor boa, devido a ligação covalente existente (Gürses et al, 2016).

1.4.2.6 Dispersos

São colorantes insolúveis em água que tingem as fibras de nylon, poliéster, acetato e fibras acrílicas (Burkinshaw 2016; Gupta, 2009). O princípio do tingimento disperso é a dispersão aquosa fina, seguido por uma redução clara para evitar a coloração do corante não fixado. As moléculas de corante em solução são ligadas às fibras e, em seguida, as moléculas de corante dispersas são transferidas para solução, apesar da sua baixa solubilidade (Gürses et al, 2016).

1.4.3 Origem

Um colorante natural abrange todos os derivados fontes naturais, como plantas, animais, minerais e microrganismos. Corantes naturais são em sua maioria não-substantivos e devem ser aplicados em têxteis com a ajuda de mordentes (Samanta e Konar, 2011).

1.4.3.1 Origem Vegetal

As plantas são os maiores produtores de corantes e pigmentos naturais, podendo encontrar em várias partes da planta, como nas folhas, frutos, vegetais e flores (Schiozer e Barata, 2007). Na Índia, existem quase quatrocentos e cinquenta plantas produzindo corantes (Yusuf et al, 2017). Em seu estudo sobre os pigmentos naturais para tingimento de têxteis Vankar (2017) exemplifica muitas plantas, conhecidas por serem plantas medicinais, que possuem um alto teor de corantes naturais.

*Tabela 1: Corantes naturais vegetais**

Parte da Planta	Exemplos de corantes e pigmentos
Raiz	Cúrcuma, madder, beterraba e cebola
Casca / Ramos	Casca roxa, Acacia catechu** e sândalo

Folha	Índigo, Henna, Chá, Cardamomo e Coral jasmim
Flores (pétalas)	Marigold (<i>Calendula officinalis</i> **) e Dália (<i>Dahlia</i> **)
Frutos / Sementes	Romã e nozes.

*Adaptado de Samanta e Konar, 2011 **Nomes científicos das plantas

A utilização de corantes de origem vegetal é muito comum, mas apresenta algumas desvantagens tecnológicas, como: baixos rendimentos, dependência da sazonalidade, crescimento lento e problemas geográficos. Para ultrapassar estas desvantagens, uma alternativa é a produção de colorantes por rota biotecnológica a partir de microrganismos (bactérias, fungos, leveduras e algas) (Gupta et al., 2011).

1.4.3.2 Origem Animal

Os corantes animais vermelhos obtidos a partir da exsudação de corpos secos de insetos, nomeadamente Cochonilha (ácido carmínico), Quermes (ácido quermesico), Laccifer lacca/*Kerria lacca* (ácido laccaico) e moluscos pertencem a esta categoria. Eles são bem conhecidos para fins de tingimento desde os tempos antigos (Yusuf et al, 2017). O corante ácido carmínico é um dos corantes vermelhos mais utilizados na indústria alimentar, mas existem vários casos escritos que este produto causa reações alérgicas (urticária, angioedema e anafilaxia) quando ingerido (Barbosa, 2016).

1.4.3.3 Origem Mineral

Vários pigmentos de sais de metais inorgânicos e óxidos metálicos pertencem a esta categoria de corantes naturais. Os pigmentos minerais são oriundos de sais de metais inorgânicos e óxidos metálicos. Os pigmentos minerais são classificados pelas suas cores. Esta classe de pigmentos é normalmente utilizada para a pintura (Yusuf, 2018).

Tabela 2: Exemplos de pigmentos naturais de origem mineral classificados pela sua cor

Cor	Nome	Composição
Vermelhos	Cinábrio	Sulfeto de Mercúrio II (HgS)
	Ocre vermelho	Óxido de ferro anidro e hidratado ($Fe_2O_3 \cdot nH_2O$)
	Chumbo vermelho	Tetróxido de Chumbo (Pb_3O_4)
Amarelos	Ocre amarelo	Limonita mineral ($Fe_2O_3 \cdot H_2O$)
	Sienna	$Fe_2O_3 \cdot H_2O$ +Ácido silícico +Óxido de manganês
	Auripigmento (Orpiment)	Sulfeto de arsênico (As_2S_3)
Verdes	Terre-Verte (Terra verde)	Hidrosilicatos de Fe, Mg, Al e K (gluconita e celadenita)
	Malaquita	Hidróxido de carbonato de cobre ($Cu_2(OH)_2CO_3$)
Azuis	Azul ultramarino	Obtido do mineral lápis lazuli

	Azurite	$\text{Cu}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$
Branco	Giz branco	Carbonato de cálcio (CaCO_3)
	Branco de zinco	Óxido de zinco (ZnO)

1.4.3.4 Origem Microbiana

Microrganismos são conhecidos como uma fonte potencial para a produção de pigmentos devido às suas vantagens em relação a outras fontes, em termos de disponibilidade, estabilidade, eficiência de custos, rendimento e fácil processamento a jusante (Joshi et al. 2003; Vankar, 2017). A presença de pigmentos tem sido relatada em todo o mundo microbiano, incluindo bactérias, fungos, leveduras, microalgas e protozoários (Tuli et al, 2014).

Tabela 3: Exemplos de pigmentos naturais de origem microbiana

Microrganismo	Pigmento	Coloração
<i>Serratia spp.</i>	Prodigiosina	
<i>Monascus spp.</i>	Rubropunctatina	Vermelho ou rosa
<i>Penicillium oxalicum</i>	Antraquinona	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Zeaxantina	Amarelo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piocianina azul	Verde
<i>Janthinobacterium lividum</i>	Violaceina	Roxo
<i>Saccharomyces neoformans</i>	Melanina	Preto

Adaptado de Gupta et al., 2011

Os microrganismos apresentam vantagens de versatilidade e produtividade em relação às formas de vida mais elevadas na produção em escala industrial de pigmentos e corantes naturais, como exemplo a produção por via de fermentação (produção inerentemente mais rápida e produtiva) (Velmurugan et al., 2010).

Um microrganismo ideal para produção de pigmento deve ser tolerante ao pH, temperatura, aceitar diferentes fontes de carbono e nitrogênio para alimentação e produzir uma quantia razoável de pigmento (Kumar et al. 2015). O cultivo de microrganismos pode ser obtido através de fermentação em estado sólido e submersa, utilizando meios de cultura convencionais ou resíduos industriais (Venil e Lakshmanaperumalsamy, 2009).

Os pigmentos podem ser produzidos por fermentação em estado sólido (SSF) ou por fermentação submersa (SmF). A SSF ocorre com o crescimento da biomassa bacteriana em meio de cultura contendo ágar (Casullo de Araújo et al. 2010; Grossart et al. 2009). Já na SmF os microrganismos são cultivados em meio líquido, de forma aeróbica, com agitação constante e adequada para garantir homogeneidade de crescimento celular. (Cho et al., 2002). Existem mais aspectos que devem ser controlados para garantir eficiência em todo processo de *upstream* e *downstream*. Alguns parâmetros físicos e químicos foram estudados neste trabalho e estão apresentados nos capítulos seguintes.

Existem muitos microrganismos que possuem a capacidade de produção de pigmentos, mas nem todos possuem grandes interesses para chegar a produção em escala industrial. Pigmentos oriundos de fungos filamentosos tem uma grande possibilidade de contaminação do meio (prejudicial para a indústria) (Lima, 2015) e presença de micotoxinas. Já as microalgas necessitam de grandes investimentos para que tenham bom rendimento (Grima et al., 2003) e também se faz necessário controlar fatores adicionais (intensidade e comprimento de onda da luz e salinidade), gerando custos adicionais.

A produção de pigmentos bacterianos está sendo muito pesquisada, pois a fermentação é um processo mais rápido e mais produtivo quando comparado a outros processos químicos (Kumar et al., 2015). As bactérias produzem uma vasta gama de metabolitos secundários importantes, como enzimas, antibióticos, anticâncer, antioxidantes, e nos últimos tempos pigmentos. Nesta gama de metabolitos secundários está o pigmento prodigiosina, produzida por *Serratia spp*, *Pseudomonas magnesorubra*, *Vibrio psychroerythrous* e outras bactérias (Gerber, 1975).

1.5 *Serratia sp.*

1.5.1 Características gerais

As bactérias do gênero *Serratia* pertencem a família das *Enterobacteriaceae*, apresentam forma de bastonetes com dimensão variando entre 0,5-0,8 µm de diâmetro e 0,9-2 µm de comprimento, gram-negativas (Grimont e Grimont, 2006; Singleton e Sainsbury, 2006), quimiorganotróficas, anaeróbias facultativas e apresentam crescimento na faixa de pH entre 7 e 9 (Holt et al., 1994). Algumas espécies apresentam a característica de produção da prodigiosina, formando colônias que são vermelhas ou possuem centros, margens ou setores vermelhos (Singleton e Sainsbury, 2006).

Serratia pode ser encontrada em vários habitats, tais como: água (doce ou salgada, poluída ou impoluta), no solo (promovendo o ciclo biológico de metais), em plantas, em associações mutualistas e parasitárias com insetos e no homem (podendo causar infecções) (Grimont e Grimont, 2006; Azambuja et al., 2004; Singleton e Sainsbury, 2006)

Tabela 4: Espécies do gênero *Serratia*

Espécie	Característica
<i>S. liquefaciens</i>	Espécie heterogênea que pode ser dividida em três: <i>S. liquefaciens</i> sensu stricto, <i>S. proteamaculans</i> e <i>S. grimesii</i> .
<i>S. marcescens</i>	Espécie mais encontrada. Produzem prodigiosina. Única associada a infecções humanas (trato urinário e respiratório).
<i>S. plymuthica</i> <i>S. rubidaea</i>	A maioria das cepas produz prodigiosina
<i>S. fonticola</i>	Espécie mais atípica

S. odorifera

As culturas têm um cheiro de mofo e batata

S. ficaria

Adaptado de Singleton e Sainsbury, 2006

1.5.2 *Serratia plymuthica*

Descrita pela primeira vez, em 1896 a *Serratia plymuthica* foi a quarta espécie do gênero a ser classificada. Esta espécie é fenóticamente próxima a *S. liquefaciens*, mas a principal diferença é que a *S. plymuthica* apresenta síntese do pigmento prodigiosina (Grimont et al., 1978). *S. plymuthica* é uma bactéria em forma de bastonete, gram-negativa, fermentativa saprófita, sem motilidade, que produz prodigiosina (Vivas et al., 2000).

Esta espécie é mais encontrada em ambientes aquáticos e solo, mas já foi isolada de diferentes tipos de alimentos. O perfil patogênico deste organismo não foi determinado, pois existem poucos relatos de graves infecções humanas causadas por esta bactéria (Domingo et al., 1994; Jain et al., 2017).



Figura 8: *Serratia plymuthica* em PGP-ágar (Reprodução: Felipe Giacomelli)

1.6 Prodigiosina

1.6.1 Propriedades

Prodigiosina é um metabólito secundário de algumas espécies bacterianas, podendo ser encontrada em *Serratia spp*, *Vibrio gazogenes*, *Vibrio psychroerythrous*, *Pseudomonas magnesorubra* e alguns actinomicetos gram positivos (Khanafari et al., 2006; El-Bialy e El-Nour, 2015). Nas bactérias do gênero *Serratia* a prodigiosina é produzida apenas nas espécies *S. marcescens*, *S. plymuthica* e *S. rubidaea* (Cruz Filho e Teixeira, 2013). A coloração do pigmento é sensível ao pH, variando entre o vermelho purpúreo (condições ácidas e neutras) e laranja-amarelo (condições alcalinas) (Andreeva e Ogorodnikova, 2015; Drink et al., 2015). O pigmento é insolúvel em água, apresenta solubilidade moderada em álcool (Singleton e Sainsbury, 2006) e é solúvel em clorofórmio, bromofórmio e benzeno (Montaner Ramoneda, 2001).

Os primeiros registros referentes a prodigiosina datam de 1902, quando Kraft denominou este pigmento que era formado por *Bacillus prodigiosus*. (Kraft, 1902 apud Montaner Ramoneda,

2001). Com o passar dos anos novos pigmentos apareceram, mantendo a mesma estrutura química básica, formando a família das prodigiosinas.

A prodigiosina demonstrou estar localizada no meio intracelular das bactérias *Serratia spp.*, ou seja, se faz necessário o rompimento das paredes celulares para que este composto seja liberado, extraído e utilizado (Khanam e Chandra, 2018).

1.6.2 Estrutura Química

O grupo de pigmentos de prodigininas é caracterizado por um esqueleto de Dipirrolil-dipirrometano comum que contém um sistema de anel comum de 4-metoxi, 2-2 bi pirrol. Os três anéis pirrólicos da prodigiosina são chamados de anel A, B e C. Como demonstrado na figura 9 a prodigiosina existe nas conformações cis (ou β) e trans (ou α), onde o equilíbrio das formas é dependente do pH da solução (a forma trans tem maior susceptibilidade a protonar) (Darshan e Manonmani, 2015).

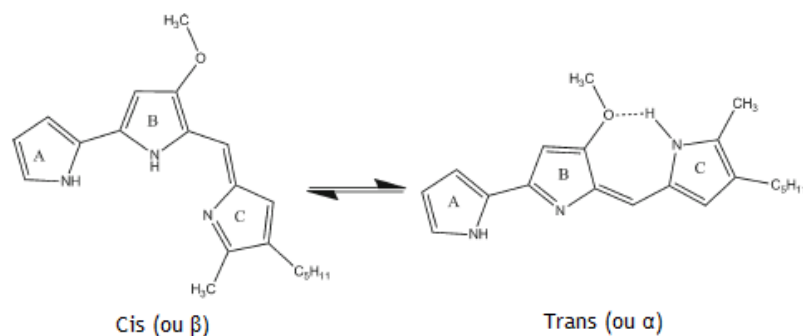


Figura 9: Conformações cis e trans da prodigiosina (Darshan e Manonmani, 2015)

A síntese do pigmento é dada com a junção de um grupo bipirrol (4- metoxi-2,2-bipirrole-5-carboxialdeído) e um precursor monopirrol (2-metil-3-n-amilpirrole). O bloco bipirrol é formado a partir dos aminoácidos prolina e serina, malonil-CoA, com S-adenosilmetionina contribuindo com o grupo metoxi. Já a porção do monopirrol é formado desde a alanina e do malonil-CoA (Jehlicka et al., 2016).

A descrição química completa, nomenclatura IUPAC, é 4-metoxi-5 - [(Z) - (5-metil-4-pentil-2Hpirrol-2-ilideno) metil] -1H, 10H-2,2'-dipirrole, onde devem se reconhecer as entidades estruturais chave, sendo elas: um pirrol substituído em 4, sendo o único substituinte uma unidade dipirrol; um pirrol substituído por dois outros pirróis nas posições 2 e 5, com um grupo metoxi adicional na posição 4; uma unidade de pirrol triplamente substituída (vinilideno na posição 2, cadeia lateral alifática em 4 e um grupo metila na posição 5) (Jehlicka et al., 2016).

1.7 Possíveis aplicações da prodigiosina

Os pigmentos prodigiosina têm sido relatados, em vários estudos, com muitos benefícios e funcionalidades. Como pigmento já foi estudado e pode ser usado para colorir alimentos, têxteis, cosméticos e farmacêutica (Namazkar and Ahmad 2013; Ryazantseva and Andreyeva 2014).

Também apresentam atividades biológicas, como: antibacteriana e antifúngica (Ibrahim et al., 2014; Suryawanshi et al., 2014; Gulani et al., 2012; Genes et al., 2011), antitumoral (Pérez-Tomás e Viñas, 2010), imunossupressora e anticâncer (Chang et al., 2011; Williamson et al., 2007; Montaner et al., 2003), antineoplásica (Montaner e Pérez-Tomas, 2001) e ainda como potencial agente surfactante em processos de biorremediação (Cunha et al., 2004).

1.7.1 Aplicação têxtil

A indústria têxtil é uma das maiores utilizadoras de pigmentos no mundo, onde a grande parte dos colorantes utilizados são de origem sintética. Os sintéticos existem em uma maior gama de cores e com preços mais acessíveis, mas também possuem riscos perigosos à saúde humana e apresentam riscos sérios ao ambiente (liberação de substâncias tóxicas e recalcitrantes) (Kumar, et al., 2015). A utilização de produtos naturais para tingir as fibras têxteis apresentam-se como uma alternativa de grande eficácia para o binômio indústria têxtil-sustentabilidade (Balan, 2017).

As cores oriundas de pigmentos naturais têm maior riqueza e brilho do que produtos sintéticos. E ainda apresentam vantagens como: não são tóxicos e alérgicos, protegem o ambiente e a vida, podem ser extraídos de diferentes formas (varia de acordo com a fonte do pigmento) (Vankar, 2017).

A fibra têxtil tingida com pigmento microbiano pode ter valor de mercado acrescido, o que pode aumentar o interesse das indústrias em utilizar esses pigmentos. Para o caso da prodigiosina a maior implicação está na alta insolubilidade em água e a maioria ser produzida no meio intracelular, necessitando métodos de extração com solventes orgânicos antes do tingimento (Ren et al., 2017).

O tingimento convencional, utilizando corantes sintéticos e produtos químicos, é responsável por um consumo significativo de água nas indústrias e causam graves danos ambientais. No sentido de mudar estes fatos, o desenvolvimento de pigmentos naturais sustentáveis e *eco-friendly*, estão sendo cada vez mais pesquisados (Weber et al., 2014).

Para a aplicação têxtil surge uma nova diferenciação entre corantes e pigmentos. Os corantes apresentam afinidade química ou física às fibras, então pode ser aplicado diretamente. Os pigmentos não apresentam essa característica, então necessitam de um ligante químico que favoreça essa ligação à fibra (Alcântara e Daltin, 1996). Também podem ser classificados de acordo com o método de aplicação, como demonstrado no item 1.3.2.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O principal objetivo deste trabalho consistiu em investigar o potencial de produção do pigmento prodigiosina pela bactéria *Serratia plymuthica*.

2.2 Objetivos específicos

- Otimizar as condições de cultivo da *Serratia plymuthica*, visando uma maior produção do pigmento;
- Avaliar o efeito antimicrobiano do pigmento sobre bactérias;
- Aplicar o pigmento em uma fibra têxtil e avaliar as características do tingimento

CAPÍTULO III

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Reagentes

Os reagentes e soluções utilizados durante o presente estudo encontram-se discriminados na tabela 5.

Tabela 5: Reagentes usados em laboratório no decorrer do trabalho.

Reagente	Marca
Acetona	Honeywell by Riedel-de Haën
Ácido cítrico monohidratado	Panreac Quimica SA
Ácido clorídrico	Sigma-Aldrich, Co
Ágar Ágar	Labkem, Labbox Labware SL
Cloreto de sódio	Sigma-Aldrich, Co
Dodecil sulfato de sódio (SDS)	Panreac Quimica AS
Etanol	Fisher Scientific
Extrato de Levedura	Sigma-Aldrich, Co
Fosfato dipotássico	Sigma-Aldrich, Co
Glicerol	Sigma-Aldrich, Co
Hidróxido de sódio	Panreac Quimica SA
Metanol	Fisher Scientific
Nutrient agar (NA)	Fluka Analytical, Sigma-Aldrich
Nutrient broth (NB)	Fluka Analytical, Sigma-Aldrich
Peptona	Sigma-Aldrich, Co
Tryptic soy agar (TSA)	Fluka Analytical, Sigma-Aldrich
Tryptic soy broth (TSB)	Fluka Analytical, Sigma-Aldrich

3.1.2 Recursos bacterianos

A bactéria *Serratia plymuthica* foi gentilmente cedida por Peter Askew (ISML, Industrial Microbiological Services Limited), sendo rotineiramente cultivada no meio de cultura Tryptic Soy Agar.

Os microrganismos utilizados nos estudos antimicrobianos foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA25).

3.1.3 Especificações

Os reagentes utilizados no presente trabalho são de grau analítico. Os meios de cultura e soluções foram preparados imediatamente antes do seu uso.

As soluções de ácido clorídrico (HCl) em diferentes concentrações (0,1M, 0,5M e 1M) foram preparadas a partir do ácido líquido (Sigma-Aldrich), onde foi calculado o volume de ácido necessário para cada diluição. Já as diluições de hidróxido de sódio (0,1M e 0,5M) foram preparadas a partir de uma solução líquida de NaOH com concentração de 2M.

Todas as soluções utilizadas no presente trabalho foram preparadas com uso de água desionizada.

3.1.4 Instrumentação

Os equipamentos utilizados no decorrer do estudo são referidos na tabela 6, juntamente com a marca e modelo.

Tabela 6: Equipamentos usados em laboratório no decorrer do trabalho.

Equipamento	Marca
Agitador Orbital	Aralab Agitorb 200
Agitador Orbital	Labinco LD-40
Aparelho de tingimento laboratorial	Datacolor AHIBA IR
Autoclave	Advantage Lab AL02-03-100
Balança Analítica	Mettler Toledo MS105
Balança Analítica	Kern 770-14
Câmara de fluxo laminar	Bioair, TopSafe 2.2
Centrífuga	JP Selecta MIXTASEL
Densímetro (medidor McFarland)	Grant bio DEN-1
Espectrofotômetro	UNICAM UV300
Espectrofotômetro FTIR	Thermo-Nicolet is10
Estufa	Binder
Medidor de pH	pH-Tester, pH-108
Mini centrífuga	Mini centrífuga Hermle Z130M
Pipetadores automáticos	Socorex
Placa de Agitação	Lbx Instruments H20SQC
Placa de Agitação	Labinco L32
Vortex	Heidolph Reax top

3.2. Métodos

3.2.1 Otimização das condições de crescimento bacteriano

3.2.1.1 Meio de fermentação semi-sólido

O crescimento da bactéria em meio semi-sólido foi testado com diferentes meios de cultura para que fosse possível concluir qual melhor composição para a produção do pigmento. Foram testados meios de fermentação com diferentes composições, nomeadamente Tryptic Soy Agar, Nutrient Agar, Luria-Bertani, Peptona-Glicerol e Peptona-Glicerol-Fosfato.

O meio Peptona-glicerol (PG) foi composto com a mistura de 1% de peptona de carne com 10% glicerol e 4% de cloreto de sódio (Montaner Ramoneda, 2001). Já o Luria-Bertani (LB) foi produzido com 10g/L de triptona, 5g/L de extrato de levedura e 10g/L de cloreto de sódio (Sambrook and Russel, 2001). O último meio testado foi o Peptona-Glicerol-Fosfato (PGP) que é composto por 5g/L de peptona de carne, 2g/L de fosfato dipotássico e 10ml/L de glicerol.

Para que o meio de cultura solidificasse nas placas foi adicionado 15g/L de ágar nas formulações.

Os ensaios decorreram em simultâneo, em diferentes estufas com temperaturas controladas e também foi avaliada a presença ou ausência de luz, para que fosse possível a comparação do efeito deste parâmetro na pigmentação produzida pelas bactérias.

3.2.1.2 Meio de fermentação líquido

Os estudos de pré-fermentação e fermentação da *Serratia plymuthica*, em meio líquido, foram testados com diferentes parâmetros. Os meios de cultura utilizados nas experiências são os mesmos dos estudos em meio sólido, mas com a ausência do ágar que tem como função solidificar o meio de cultura, resumidamente PGP (10mL/L de glicerol, 2g/L de fosfato dipotássico e 5g/L de peptona de carne), PG (1% de peptona de carne com 10% glicerol e 4% de cloreto de sódio), LB (10g/L de triptona, 5g/L de extrato de levedura e 10g/L de cloreto de sódio), NB (8g/L) e TSB (30g/L).

O estudo de comparação entre os meios de cultura, foi realizado com as mesmas condições de fatores extrínsecos, para que fosse possível definir qual o melhor meio líquido para produção do pigmento e crescimento da *Serratia plymuthica*. Os fatores externos testados foram a taxa de oxigenação, presença/ausência de luz, temperatura e taxa de agitação.

A experiência realizou-se durante 48h e foram retiradas alíquotas, a cada 24h, para medição da densidade ótica da fermentação. A densidade ótica foi medida a 600nm.

3.2.1.3 Temperatura

A temperatura é um dos parâmetros mais relevantes em uma cultura microbiana. Os microrganismos possuem um intervalo de temperatura ótima de crescimento e produção dos seus metabólitos. Os testes com a *Serratia plymuthica* foram realizados a diferentes temperaturas, para que fosse possível definir a temperatura ótima para crescimento bacteriano e produção do pigmento de interesse. Os testes realizados para avaliar o efeito da temperatura foram feitos em estufas com temperatura controlada (22, 25 e 30°C).

3.2.1.4 Taxa de agitação

A agitação auxilia para um melhor suprimento de oxigênio aos microrganismos, a manutenção das células em suspensão e o aumento da transferência de calor e massa no meio. Portanto, a taxa de agitação ótima é um fator crucial de forma a obter crescimento da bactéria em questão e conseqüente produção de metabólitos.

Nos ensaios realizados foram utilizadas diferentes condições de agitação em agitador orbital. Uma ampla faixa de rotações por minuto (0, 100, 150, 200 e 300rpm) foram testadas nos ensaios de agitação.

3.2.1.5 Presença/ausência de Luz

A presença ou ausência de luz durante o crescimento em placas e nos processos fermentativos foi testada para que fosse possível concluir sobre a influência (significante ou não) deste fator para a produção e síntese do pigmento.

Os *erlenmeyers* dos ensaios realizados com ausência de luz foram previamente revestidos com folhas de alumínio para que a proteção à luminosidade fosse eficaz. Estes frascos só foram abertos para análises e depois no final do ensaio para comparação com os demais.

3.2.1.6 Taxa de oxigenação

A taxa de oxigenação corresponde a razão entre o volume de meio de cultura e o volume total do *erlenmeyer* de fermentação. Este valor varia entre os microrganismos de acordo com suas necessidades de oxigênio para a respiração celular.

Para chegar a melhor taxa de oxigenação para o crescimento da *Serratia plymuthica* e produção do pigmento foram testadas oxigenações entre 1/2 (50% do volume do *erlenmeyer* preenchido com meio de cultura) e 1/10 (10% de meio de cultura no frasco).

3.2.2 Avaliação da presença de prodigiosina

3.2.2.1 Teste em meio semi-sólido

O teste presuntivo para confirmar a presença da prodigiosina é baseado em Ding e Williams (1983). A biomassa bacteriana foi raspada da superfície de placas incubadas a 22°C por 48h e suspensa em solução de etanol 95% (*overnight*, 22°C, 150 rpm). Após centrifugação para remoção dos restos celulares (4500rpm durante 25min), o sobrenadante foi recuperado e dividido em três alíquotas. Uma permaneceu-se neutra, a outra teve HCl adicionado para ser acidificada e a última foi alcalinizada com NaOH 2M.

3.2.2.2 Teste em meio líquido

Foi recolhida uma alíquota de extrato bruto de fermentação da *Serratia plymuthica* após 48h de incubação a 22°C. O volume total foi dividido em três tubos e aplicou-se os mesmos passos descritos no ponto 3.2.2.1.

3.2.3. Caracterização do pigmento

3.2.3.1. Comparação do perfil espectrofotométrico a pH ácido e básico

A comparação dos perfis do pigmento com as diferenças de pH foi realizada com a adição de 2mL de HCl (pH ácido) ou NaOH (pH básico) a uma alíquota de extrato bruto de fermentação. Após a adição do ácido ou da base, foi realizada uma leitura no espectrofotômetro com uma ampla faixa de absorbância (400 a 600nm).

3.2.3.2. Análise por FTIR-ATR

As medições de espectroscopia de infravermelho por transformadas de Fourier (FTIR) foram realizadas com uma faixa espectral entre 500 e 4000 cm^{-1} , 16 *scans* e resolução 4, em um espectrofotômetro Thermo-Nicolet is10.

3.2.3.3. Análise EDX

Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX ou EDS) é uma técnica analítica utilizada para a análise elementar da prodigiosina e das fibras de algodão tingidas com o pigmento.

3.2.4. Avaliação da atividade antibacteriana

3.2.4.1. Determinação da concentração mínima inibitória (MIC)

Os valores de MIC da prodigiosina foram determinados pelo teste de microdiluição em caldo, em placas de 96 poços, de acordo com a norma M07-A6 da CLSI para as estirpes bacterianas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA25).

Inicialmente, preparou-se uma solução mãe de prodigiosina com uma concentração final de 10mg/mL e efetuaram-se diluições sucessivas em Caldo de Mueller-Hinton (MHB) estéril. Em seguida, culturas líquidas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, mantidas a crescer *overnight*, foram ajustadas para 0,5 McFarland com água estéril. Após isso, suspensões bacterianas de trabalho foram preparadas adicionando 500 μL da suspensão bacteriana ajustada a 0.5 McFarland a 4500 μL de meio MHB.

A cada poço da placa de microdiluição foram adicionados 50 μL da suspensão de trabalho e 50 μL das diluições previamente preparadas de prodigiosina. Finalmente, as placas foram incubadas durante 24h, nas condições de temperatura adequadas para o crescimento das bactérias selecionadas.

Terminado o período de incubação adicionou-se resazurina a cada poço, um indicador de viabilidade celular, para avaliar se a prodigiosina, nas concentrações selecionadas, inibia o crescimento bacteriano. Desta forma, o valor de MIC corresponde à concentração mínima de prodigiosina que inibe o crescimento bacteriano.

Todas as determinações foram realizadas em triplicado.

3.2.5. Funcionalização de fibra têxtil com prodigiosina

Inicialmente, foi selecionado uma amostra de multifibras (SDC MULTI FIBRE DW FABRIC), para que fosse possível definir qual fibra teria mais afinidade ao pigmento. Em seguida selecionou-se a fibra de algodão 100% para seguir com os estudos de avaliação da efetividade da funcionalização. O algodão foi sujeito a lavagem, usando um detergente (AATCC *Standard Reference Detergent* WOB) a uma concentração de 1g/L, durante 30 minutos a 40°C. Após lavagem prévia, o tecido foi enxaguado em água destilada para remoção completa de qualquer

resíduo de detergente e posto a secar à temperatura ambiente. O processo de lavagem é recomendado para eliminar possíveis contaminações e sujidades.

3.2.5.1 Processo de funcionalização

A funcionalização do algodão ocorreu com prodigiosina extraída com etanol acidificado (Elkenawy et al., 2017). Foi executada pelo método de esgotamento (*exhaustion method*). O método utilizado foi o de esgotamento, que se baseia na imersão do material têxtil num determinado banho de incubação, durante o tempo e temperatura necessários para se efetuar o denominado “esgotamento” do banho. O processo foi o mesmo para as duas amostras utilizadas (multifibras e algodão 100%).

Inicialmente, a solução de Prodigiosina (1.0% *spf*) foi preparada sob uma razão de banho de 1:30. Posteriormente, o esgotamento foi realizado em uma máquina de tingimento laboratorial com um gradiente de temperatura de 2 °C. A funcionalização ocorreu a 40°C, com agitação constante de 15rpm, durante 60 minutos. Após esse período, as amostras foram sujeitas a 5 ciclos de lavagem de acordo com a norma EN ISO 105-C06:2010 com uma solução a 1g/L de detergente (AATCC *Standard Reference Detergent WOB*), a 40°C, durante 60 minutos.

O procedimento foi repetido com a adição de sal (20% *spf* de Cloreto de Sódio (NaCl)), bem como com a adição simultânea de sal (20% *spf* de NaCl) e *alcali* (10 g/L de Carbonato de sódio) ao banho, respectivamente. Estas duas estratégias foram estudadas de forma a avaliar a sua influência no processo de funcionalização.

3.2.5.2 Avaliação da eficácia de funcionalização

Após a funcionalização do algodão é imperativo avaliar a eficácia do processo. Neste sentido, recorreu-se a métodos que permitissem caracterizar as amostras funcionalizadas, nomeadamente que confirmassem a presença da prodigiosina nas amostras.

3.2.5.2.1. Energia dispersiva de espectroscopia de raio-X (EDX)

A análise elementar foi realizada com o objetivo de demonstrar a presença da prodigiosina no algodão, através da deteção do azoto nas amostras funcionalizadas. Sendo o algodão uma fibra celulósica, não apresenta azoto na sua conformação inicial. Portanto, a presença deste elemento nas amostras é atribuída à prodigiosina e consequentemente confirma a eficácia do processo. Esta análise foi realizada de acordo com o descrito no ponto 3.2.3.3.

3.2.5.2.2 Determinação da intensidade da cor

A determinação da intensidade da cor das amostras funcionalizadas com a prodigiosina foi realizada através de um espectrofotómetro *Datacolor Spectraflash SF300*. Inicialmente foram medidas as reflectâncias (R) em todos os comprimentos de onda do espectro do visível e posteriormente foram calculados os valores de K/S a partir da equação de *Kubelka-Munk* (1).

$$\frac{K}{S} = \frac{(1-R)^2}{2R} \quad (1)$$

Onde R representa a refletância e o K e o S o coeficiente de absorção e difusão do meio, respectivamente. Assim sendo, é de salientar que $K/S=\alpha C$, sendo C a concentração de corante na fibra e α uma constante.

A determinação da intensidade da cor é um dos parâmetros que nos permite avaliar o sucesso da funcionalização.

3.2.6.3 Avaliação da atividade antibacteriana

A avaliação do efeito antibacteriano foi realizada com base na norma japonesa *JIS L 1902:2002* (Determinação da atividade antibacteriana e eficácia dos produtos têxteis). Esta norma especifica o método de teste para avaliar a atividade e a eficácia antibacteriana das amostras têxteis funcionalizadas. Neste estudo a atividade antibacteriana das amostras de algodão funcionalizadas com a prodigiosina foi determinada pelo teste de suspensão, que fornece valores quantitativos pela redução da população bacteriana através da contagem das colônias em placa, com aplicação sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA25).

Inicialmente preparam-se as amostras a serem testadas de acordo com o descrito na norma. Em seguida, uma suspensão bacteriana de trabalho foi preparada a partir de uma cultura líquida deixada a crescer *overnight*. Posteriormente, as amostras a serem testadas foram inoculadas com a suspensão de trabalho e foram analisadas imediatamente (T_{0h}), bem como após 18-24 horas (T_{24h}) de contato com o inóculo. Diluições sucessivas foram logo em seguida efetuadas em 0.85 (w/v) NaCl e gotas de cada diluição foram plaqueadas nos respectivos meios de cultura. Finalmente, as placas foram incubadas a 37°C durante 18-24 horas.

A atividade antimicrobiana expressa em porcentagem de redução foi calculada pela equação abaixo (2), comparando o tamanho da população controle (algodão não funcionalizado), C, com o tamanho da população relativa às amostras funcionalizadas com a prodigiosina, F (Tang et al., 2012).

$$\% \text{Redução} = \frac{(C-F)}{C} \times 100 \quad (2)$$

CAPÍTULO IV

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização das condições de crescimento

4.1.1 Cultivo semi-sólido

Os testes de crescimento da *Serratia plymuthica* em placas com diferentes meios de cultura em estado semi-sólido foram realizados para concluir qual a melhor composição de nutrientes para adaptação e crescimento da bactéria e melhor produtividade de pigmento. As experiências realizadas estão na tabela 7, onde é possível observar as condições avaliadas em casa experiência. Com o objetivo de evitar interferências extrínsecas, os testes foram realizados em simultâneo em diferentes estufas para controle da temperatura.

Tabela 7: Experiências realizadas para avaliação das condições de cultivo em diferentes meios de cultura em estado semi-sólido

Experiência	Meio de Cultura	Temperatura	Luminosidade
1	PGP		
2	PG		
3	TSB		Presença de luz
4	NB		
5	LB		
6	PGP	20 °C	
7	PG		
8	TSB		
9	NB		
10	LB		
11	PGP		
12	PG		
13	TSB	25 °C	Ausência de Luz
14	NB		
15	LB		
16	PGP		
17	PG		
18	TSB	30 °C	
19	NB		
20	LB		

4.1.1.1 Fonte de carbono e nitrogênio

A *Serratia plymuthica* demonstrou maior produção de pigmento no meio de cultura contendo glicerol como fonte de carbono (figura 10), produzindo até cinco vezes mais pigmento do que quando comparada com o cultivo utilizando outra fonte de carbono (Elkenawy et al., 2017; Montaner Ramoneda, 2000; Tao et al., 2005).

Estudos anteriores demonstram que a presença de glicose, em concentração superior a 15g/L, inibe a síntese da prodigiosina pois existe uma correlação entre os metabolitos da

bactéria e o açúcar que acabam por acidificar o meio (Loren e Guinea 1978; Williams e Qadri, 1980 apud. Sole et al., 1997).

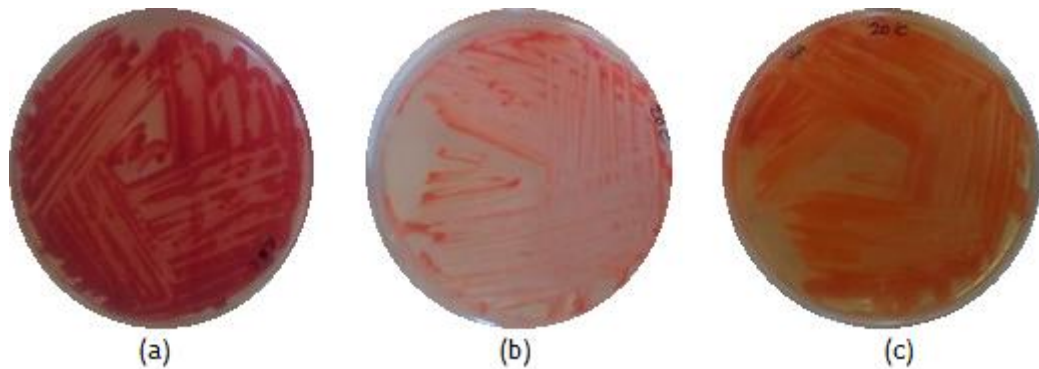


Figura 10: Produção de prodigiosina em placas de cultivo com PGP (a), NA (b) e TSA (c). (Reprodução: Felipe Giacomelli)

A melhor produção da prodigiosina ainda se deu quando se utilizou glicerol como fonte de carbono associada ao uso de peptona como fonte de nitrogênio. Estes resultados estão de acordo com estudos que retratam a melhor produção em meios contendo estes dois macronutrientes (Giri et al., 2004; Gulani, Bhattacharya e Das, 2012)

4.1.1.2 pH

O pH foi avaliado como fator crucial para a bactéria, pois o pH ácido (pH=5) reduz o potencial de produção do pigmento, quando comparado a valores mais altos (pH=9) (Sole, 1997). A adição do sal fosfato (K_2HPO_4), ao meio composto por peptona e glicerol, faz com que ocorra um ligeiro aumento no pH, o que justifica o aumento da pigmentação quando utilizado o PGP na fermentação. A figura 11 apresenta os resultados da produção com PGP contendo o sal fosfato e de meio PG com NaCl na composição.

Os meios de cultura comerciais, NA e TSA possuem pH próximo da neutralidade (Sigma-Aldrich®), o que também justifica a menor produção de prodigiosina.

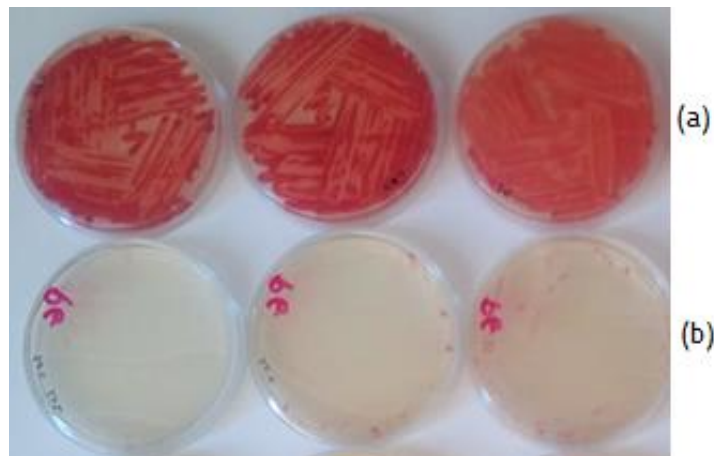


Figura 11: Produção de prodigiosina em meio PGP (a) e PG (b) (Reprodução: Felipe Giacomelli)

4.1.1.3 Temperatura

O estudo de Montaner Ramoneda (2001) relata que em temperaturas superiores ou iguais a 28°C o pigmento não é sintetizado, o que não significa que não ocorra crescimento bacteriano. As colônias bacterianas de *Serratia plymuthica* incubadas a 30°C apresentaram coloração mais esbranquiçada.

A melhor temperatura para produção e síntese do pigmento encontrada durante o estudo de foi 22°C ± 2°C, similar aos resultados de Elmenhawey et al., 2017.

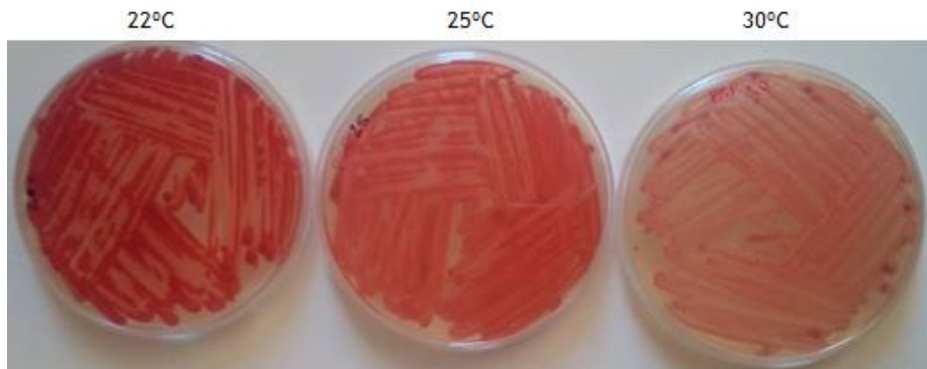


Figura 12: Produção de prodigiosina em PGP ágar com diferentes temperaturas (Reprodução: Felipe Giacomelli)

4.1.1.4 Tempo de incubação

O tempo de incubação foi avaliado para que fosse possível produzir o pigmento da forma mais rápida possível, mas garantindo que houvesse grande produção de prodigiosina. Durante as primeiras 24h de incubação já era possível notar a presença de pigmento na placa, mas nota-se uma diferença significativa na quantidade de pigmento em 48h de incubação.

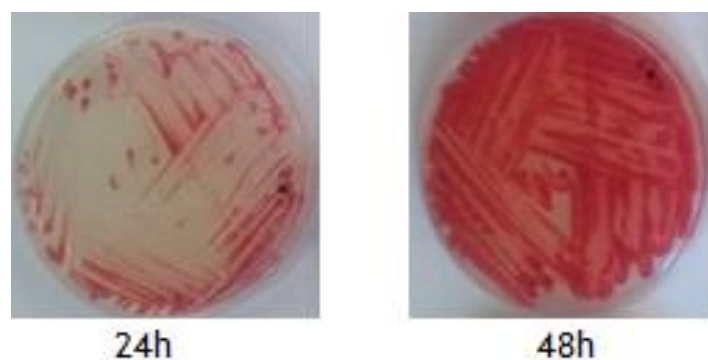


Figura 13: Placas de PGP para produção de prodigiosina em diferentes tempos de incubação (Reprodução: Felipe Giacomelli)

4.1.2 Cultivo em Meio líquido

O teste fermentação em meio líquido foi realizado para que fossem definidas as melhores condições para o crescimento da *Serratia plymuthica* e a produção do pigmento. A temperatura utilizada foi de 22°C devido os resultados obtidos nos testes de avaliação da melhor temperatura de crescimento. Realizaram-se doze experiências, demonstradas na tabela 8, que se diferenciavam pelas condições utilizadas.

Tabela 8: Testes de fermentação da *Serratia plymuthica* com variações nas condições

	<i>Meio de Cultura</i>	<i>Oxigenação</i>	<i>Iluminação</i>	<i>Agitação</i>
1	NB			
2	TSB	1/2		
3	PGP		Presença de	
4	NB		luz	
5	TSB	1/5		
6	PGP			150 rpm
7	NB			
8	TSB	1/2		
9	PGP		Ausência de	
10	NB		luz	
11	TSB	1/5		
12	PGP			

Para obter resultados mais conclusivos deste teste, realizou-se uma extração do pigmento, baseando-se no método proposto por Elkenawy et al. (2017). A extração é realizada com adição de etanol acidificado com 4% de HCl e posterior centrifugação a 4000 rpm por 35min. A medição foi realizada com leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 534nm.

A densidade ótica é um método indireto de mensurar o crescimento bacteriano, uma vez que considera a turbidez do caldo de fermentação, utilizando uma solução de NaCl 0,8% como padrão branco.

A experiência que apresentou melhores valores para D.O. em 48h foi a número 5, o que não significa que é onde está presente a maior concentração de pigmento. Após a extração observou-se que a experiência 12 era a que possuía maior pigmentação, já que o valor da absorbância em 534nm foi mais elevada que as demais. Este resultado está de acordo com as conclusões expostas no ponto 4.1.1.1, ou seja, meios contendo peptona e glicerol produzem mais pigmento vermelho por *Serratia plymuthica*.

Tabela 9: Valores de absorvância obtidos para densidade ótica (600nm) e extração do pigmento (534nm)

Experiência	D.O. 24h	D.O. 48h	Extração
1	2,03	3,11	1,212
2	3,89	4,67	0,3
3	1,96	2,30	0,402
4	3,84	3,94	0,06
5	5,94	6,99	0,162
6	2,69	3,47	1,746
7	2,10	2,62	0,354
8	4,79	5,41	0,708
9	1,74	2,04	0,138
10	3,24	3,72	0,192
11	6,20	6,20	0,258
12	2,72	3,67	2,184

4.1.2.1 Luminosidade

As variações de luminosidade (presença ou ausência) podem afetar substancialmente a síntese de prodigiosina. Processos fermentativos em ambientes escuros já chegaram a apresentar até 2,5 vezes mais pigmento que fermentações realizadas com luminosidade (Ryazantseva et al., 2012).

Nos ensaios realizados com as variações de luminosidade pode-se observar uma leve diferença de pigmentação devido os valores de apresentados na tabela 10. O processo de incubação realizado com ausência de luz apresentou maior produção de pigmento e maior valor de densidade ótica.

Tabela 10: Valores de absorvância de D.O. e extração do pigmento com diferentes luminosidades

Luminosidade	D.O. 24h	D.O. 48h	Extração
Claro	2,69	3,47	1,746
Escuro	2,72	3,67	2,184

4.1.2.2 Taxa de oxigenação

A taxa de oxigenação é um parâmetro físico de grande importância para a produção do pigmento pela *Serratia plymuthica*. Como apresentado na figura 14, as melhores fermentações foram as realizadas com oxigenação de 1/5, ou seja, apenas 20% do volume do frasco era preenchido com meio de cultura. Este fato pode ser justificado pela bactéria ser um organismo aeróbico facultativo.



Figura 14: Avaliação da taxa de oxigenação na produção do pigmento (Reprodução: Felipe Giacomelli)

4.1.2.3 Agitação

A agitação é um parâmetro físico muito importante para garantir altos rendimentos nos processos fermentativos. O principal objetivo da agitação adequada é a dispersão das bolhas de ar, dessa forma cumprindo com o suprimento de oxigênio para as bactérias e mantendo as os microrganismos em suspensão e não aderidos ao frasco (Aiba et al., 1973).

Os testes realizados sem agitação não apresentaram mudança na coloração durante o período de fermentação (48h), concluindo-se que não houve produção do pigmento. Foram testadas diferentes velocidades de agitações e a faixa mais adequada para o microrganismo em estudo foi entre 150 e 200rpm, pertencendo a faixa de valores apresentada por Suryawanshi et al., 2014.

4.2 Avaliação e caracterização do pigmento

Existem estudos na literatura que mencionam a *Serratia plymuthica* como espécie produtora de prodigiosina (Cruz Filho e Teixeira, 2013; Grimont e Grimont, 2006; Khanafari et al., 2006; Pore et al., 2016), mas poucos trabalhos utilizam o potencial desta bactéria para síntese do pigmento. Devido está escassez de trabalhos que especifiquem a produção de prodigiosina pela espécie *S. plymuthica*, buscou-se formas de avaliar e caracterizar o pigmento produzido para garantir que realmente faz parte da família das prodigiosinas.

4.2.1 Teste presuntivo

O método descrito por Gerber (1975) baseia-se na mudança de cor do pigmento quando exposto a diferentes faixas de pH. O pigmento altera-se para uma cor mais amarelada quando em solução alcalina e para rosa intenso em solução ácida.

Os resultados obtidos são positivos de acordo com o método e também se encontram em acordo com estudos mais recentes de avaliação da prodigiosina (Gulani, Bhattacharya e Das,

2012; Picha et al., 2015; Ramani et al., 2014). A coloração encontrada na figura 15B é mais intensa pois trata-se do pigmento extraído do extrato bruto de placas

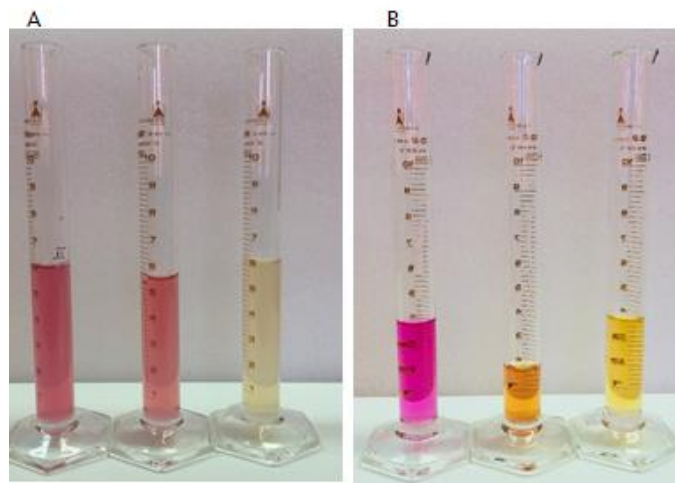


Figura 15: Avaliação da presença do pigmento prodigiosina por diferença de pH (A: meio líquido B: extrato bruto de pigmento extraído) (Reprodução: Felipe Giacomelli)

4.2.2 Comparação do perfil ácido e básico do pigmento

O pigmento é sensível a variação de pH, apresentando perfis diferentes para pH ácido ou básico. Goldschmidt e Williams (1968) apresentaram em seus estudos que a prodigiosina tinha pico máximo de absorção em 534nm. Como é possível observar na figura 16, o perfil do pigmento em exposição ácida apresenta seu pico máximo em 535nm (Abs = 2,17), estando muito próximo do valor presente na literatura para a prodigiosina.

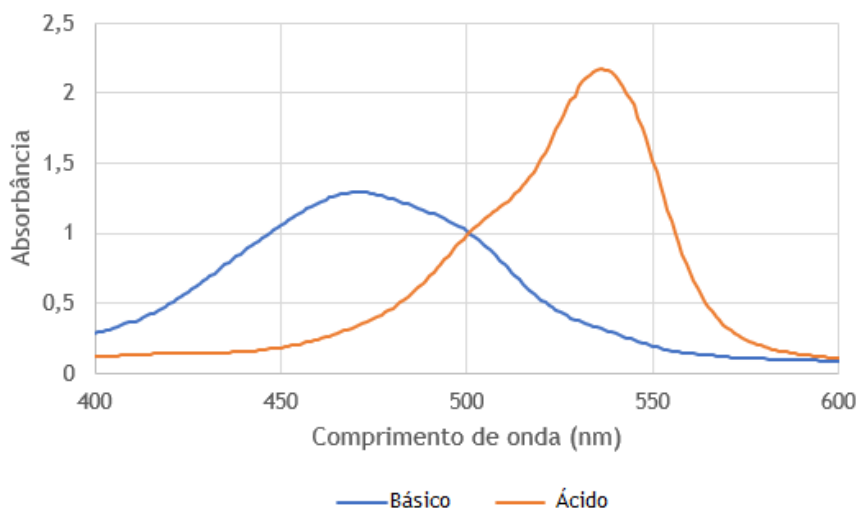


Figura 16: Comparação dos perfis ácido e básico do pigmento extraído

Já a leitura espectrofotométrica para o perfil básico é diferente. O pH mais elevado para o pigmento extraído desloca o pico máximo de absorbância para os 470nm (Abs = 1,3).

Este deslocamento no gráfico era esperado e está de acordo com as pesquisas de Hubbard e Rimington (1950) e Williams, Green e Rappoport (1956), que apresentam esta mesma mudança de pico de absorvância.

4.2.3 Análise FTIR-ATR

Através do espectro FTIR da prodigiosina, figura 17, é possível identificar os picos característicos do pigmento vermelho natural extraído. A $3331,89\text{ cm}^{-1}$ é visível um pico amplo e forte relativo às ligações O-H (1), a $2980,59\text{ cm}^{-1}$ um pico relacionado ao estiramento das ligações C-H e C=O (2), os grupos N-H e os anéis fenólicos foram evidentes a $1650,98\text{ cm}^{-1}$ (3) e a $1544,64\text{ cm}^{-1}$ um pico referente às ligações C=C dos anéis aromáticos e ligações amida (4). Além disso, enquanto os picos a $1162,85$ e $1041,53$ revelam a vibração de deformação C-N das aminas (5) e o estiramento das ligações C-O (6), respectivamente (Faraag et al., 2017; Khanam e Chandra, 2018; Suryawanshi et al., 2014).

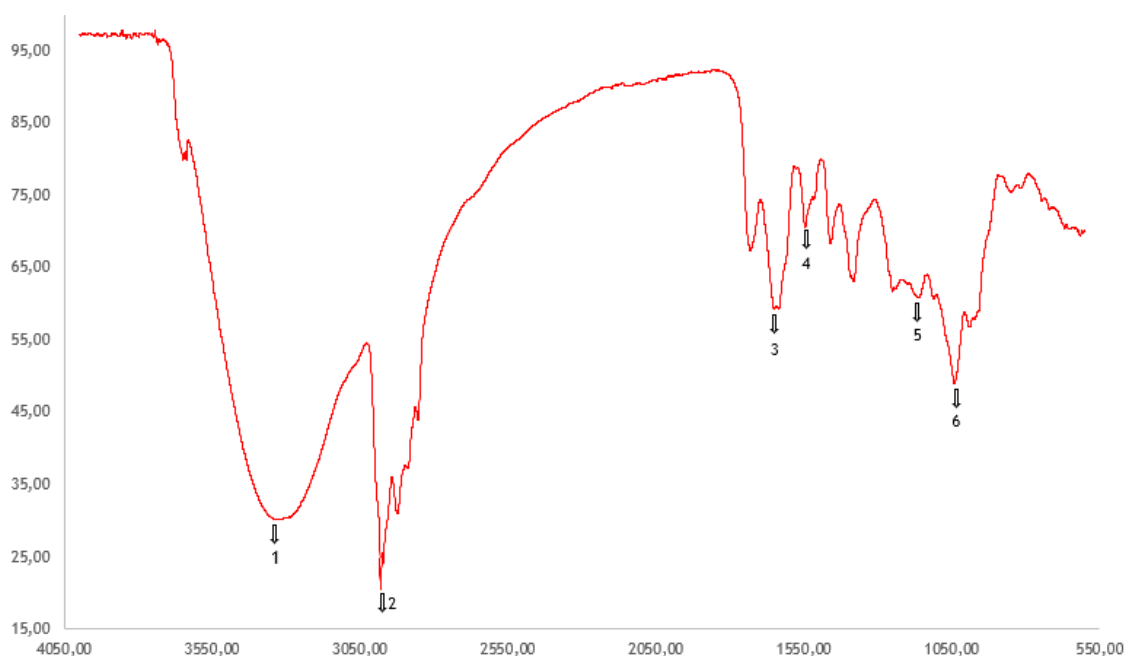


Figura 17: Espectro FTIR-ATR da prodigiosina.

4.2.4 Análise EDX

A tabela 11 exibe as concentrações dos elementos na caracterização química da amostra realizada por espectroscopia de raios X por dispersão em energia. O pigmento prodigiosina é caracterizado pela presença de nitrogênio.

Tabela 11: Composição elementar da prodigiosina por análise de EDX

Elemento	C norm (Wt %)	C Atom (At %)
Carbono	44,45	54,70
Oxigênio	33,26	30,72

Nitrogênio	7,60	8,02
Cloro	8,46	3,53
Fósforo	2,60	1,24
Potássio	1,77	0,67
Outros	1,86	1,12

A presença de Cl na amostra é justificada pela utilização de ácido clorídrico para acidificação do etanol no momento da extração do pigmento. Já o potássio e o fósforo são oriundos do sal utilizado no meio de cultura.

4.3 Avaliação da atividade antibacteriana

4.3.1 Concentração mínima inibitória

Os valores de MIC obtidos para a prodigiosina *contra Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa* encontram-se registrados na tabela 12. e serão analisados comparativamente com os já referenciados na literatura.

Tabela 12: Valores de MIC da prodigiosina obtidos para as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

MIC (mg/mL)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Prodigiosina	0,24	1,25

Relativamente à prodigiosina, neste estudo foram obtidos valores de MIC de 0,24 mg/mL para o *Staphylococcus aureus* e de 1,25 mg/mL para a *Pseudomonas aeruginosa*. Os valores são superiores aos encontrados na literatura (Lapenda et al., 2015; Suryawanshi et al., 2014), mas comprovam a diferença significativa nos valores de MIC entre as bactérias SA e PA.

4.4 Funcionalização

4.4.1 Aplicação do pigmento em amostra multifibras

O tingimento de uma amostra multifibras serviu para que fosse possível concluir qual fibra possui maior afinidade com a prodigiosina extraída de *Serratia plymuthica*. A figura 18 mostra os resultados para o processo de funcionalização realizado a 40°C em diferentes concentrações de pigmento sobre o peso da fibra. A amostra multifibras é composta por acetato (1), algodão (2), nylon (3), poliéster (4), acrílico (5) e lã (6).

Os testes iniciais para a funcionalização foram realizados com diferentes concentrações de pigmento e em amostra multifibras, pois não se conhecia a concentração e a fibra ideal para aplicação.

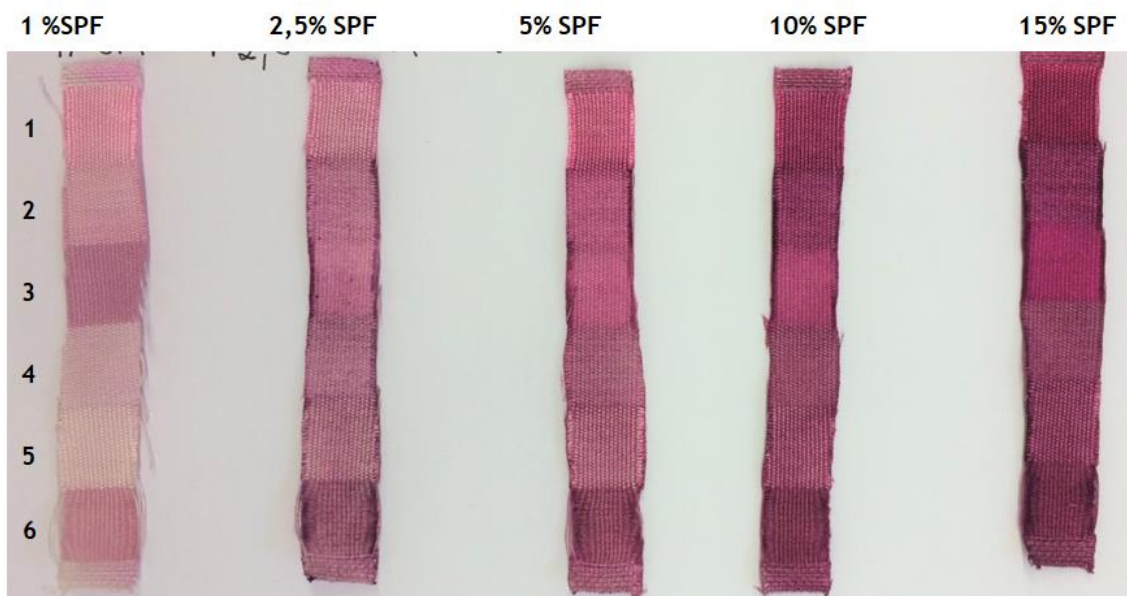


Figura 18: Resultado do tingimento a 40°C em amostra multifibras. (Reprodução :Felipe Giacomelli)

Após os passos de lavagem manual, notou-se que a fibra que mais reteve o pigmento foi o nylon (3) e a concentração de 2,5% sobre o peso da fibra era o ideal para o tingimento. As concentrações maiores acarretavam em desperdício de pigmento no banho e manchas indesejáveis na fibra.

Os demais estudos de tingimento e funcionalização de fibras têxteis foram realizados em algodão, já que é a principal fibra utilizada nas indústrias têxteis. Também destaca-se o potencial de biodegradabilidade da fibra para estar de acordo com a sustentabilidade do estudo com pigmentos naturais.

4.4.2 Aplicação do pigmento na fibra de algodão

O pigmento vermelho extraído da *Serratia plymuthica* foi aplicado em amostras de algodão branqueado sem impurezas. As amostras continham diferenças nas composições dos banhos de tingimento, como é visível na tabela 13.

Tabela 13: Especificações das amostras funcionalizadas com prodigiosina

Amostras	Especificação
1	Controle (Algodão não funcionalizado)
2	Algodão + Prodigiosina
3	Algodão + Prodigiosina + Sal
4	Algodão + Prodigiosina + Sal + Alkali
5	Algodão + Prodigiosina + 5 ciclos de lavagem

6	Algodão + Prodigiosina + sal + 5 ciclos de lavagem
7	Algodão + Prodigiosina + sal + alcali + 5 ciclos de lavagem

Na figura 19 estão as imagens das fibras de algodão após tingimento e secagem a 40°C. Os números apresentados seguem as especificações da tabela 13. As amostras 2 e 3 foram as que mais tingiram, pode-se explicar pela afinidade da fibra com o pigmento. Já a amostra 4 não demonstrou esta afinidade, então conclui-se que o álcali possui efeito negativo para o tingimento.

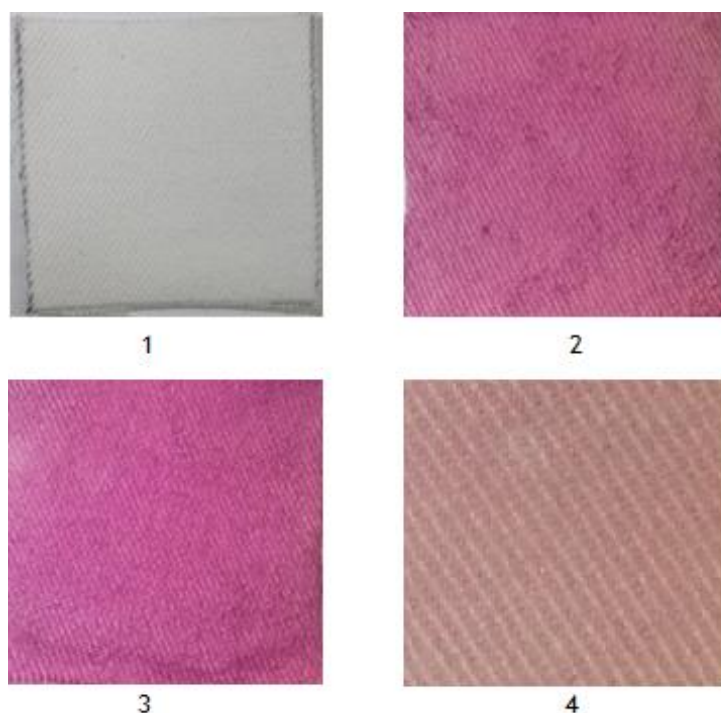


Figura 19: Amostras de algodão utilizadas na funcionalização. (Reprodução: Felipe Giacomelli)

4.4.3 Avaliação da efetividade da funcionalização

4.4.3.1 Determinação da intensidade da cor

A determinação da intensidade da cor das amostras funcionalizadas com prodigiosina serviu para avaliar se houve incorporação do pigmento bacteriano a fibra de algodão. Neste contexto, e de acordo com a tabela 14, é possível concluir que existiu a incorporação do pigmento ao algodão. A análise foi efetuada através da medição dos valores de Reflectância (% Reflectância) e de K/S. Todas as medições foram realizadas a 560/540nm.

Tabela 14: Determinação da intensidade da cor das amostras funcionalizadas com prodigiosina

Amostras	% Refletância (%R)	K/S
1	84,66	0,01
2	24,51	1,16
3	17,30	1,98
4	34,95	0,61
5	33,94	0,64
6	25,59	1,08
7	40,49	0,44

Analisando a tabela 14 conclui-se, pelos valores de reflectância obtidos, que o algodão funcionalizado com a prodigiosina na presença de sal apresentou uma coloração mais intensa (K/S 1,98) e conseqüentemente valores de reflectância mais baixos (%R 17,30). Já a adição do álcali ao banho de funcionalização reduziu os valores de K/S para 0,61 e 0,44, confirmando o resultado da subsecção 4.4.1 (este componente é desvantajoso no processo de funcionalização).

Assim, a dissociação do sal em íons/eletrolitos quando incorporado no banho de funcionalização demonstrou exibir um papel importante na migração do pigmento, bem como na afinidade do mesmo pela fibra. Além disso, a funcionalização na presença de sal permitiu que o esgotamento se processasse de forma mais uniforme, obtendo-se amostras uniformemente coradas e menos manchadas.

Através da tabela 14 é ainda possível observar que após as amostras serem sujeitas a 5 ciclos de lavagem os valores de K/S baixaram. Esta redução deveu-se ao facto do pigmento adsorvido à superfície das fibras acabar por sair à medida que o algodão foi lavado. No entanto, comparando os valores obtidos para as amostras de algodão funcionalizadas na presença e ausência de sal podemos verificar que o decréscimo no valor de K/S foi menos significativo na presença de sal. O que comprova mais uma vez o efeito benéfico do sal no processo de funcionalização.

4.4.3.2 Análise EDX

A análise elementar de EDX foi realizada também para as amostras funcionalizadas, com finalidade de comprovar a existência da prodigiosina funcionalizada na amostra. A tabela 15 mostra os valores de % atômica de cada elemento presente na amostra.

Tabela 15: Valores de % atômica de cada elemento na amostra funcionalizada com prodigiosina

C (at.%)	O (at.%)	N (at.%)
----------	----------	----------

Algodão (controle)	55,61	44,39	--
Algodão + prodigiosina + 5 lavagens	54,73	42,78	2,49
Algodão + prodigiosina + sal + 5 lavagens	54,44	42,96	2,51
Algodão + prodigiosina + sal + álcali + 5 lavagens	54,88	44,62	0,45

O algodão, uma fibra celulósica, não contém nitrogênio na sua composição elementar, como pode ser confirmado pela amostra controle exibida na tabela 15. Assim, a quantidade de nitrogênio de cada amostra correlaciona-se com a eficácia do processo de funcionalização.

As demais experiências possuem porcentagens de nitrogênio na amostra, confirmando a presença do pigmento. Nota-se que a amostra funcionalizada com prodigiosina e sal possui maior porcentagem atômica de nitrogênio (2,51%), confirmando que estas condições favorecem uma melhor funcionalização.

4.4.4 Avaliação atividade antibacteriana

A eficácia da atividade antibacteriana foi avaliada após 24h de incubação das bactérias SA e PA no algodão funcionalizado com prodigiosina e expressa em porcentagem de redução do crescimento bacteriano (%R), como demonstrado na tabela 16.

Os resultados demonstraram um efeito inibitório contra ambas as bactérias selecionadas. Contudo, a partir da tabela 16 e a da figura 19 é possível observar que as amostras de algodão funcionalizadas com a prodigiosina exibiram uma maior redução do crescimento bacteriano contra *S. aureus*, comparativamente com a amostra de algodão não funcionalizada. Desta forma verificou-se uma redução no crescimento de *S. aureus* de 83,17% para o algodão funcionalizado com a prodigiosina, 97,10% para o algodão funcionalizado com a prodigiosina na presença de sal e 28,88% na funcionalização com presença de sal e álcali.

Os valores elevados de redução de crescimento de SA na presença de prodigiosina se devem a propriedade do pigmento de induzir a produção de autolisinas nas células de bactérias gram-positivas, levando à lise e morte celular (Ren et al., 2017).

Tabela 16: Avaliação da atividade antibacteriana de algodão funcionalizado com prodigiosina

Amostra	<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	CFU/mL	Redução crescimento (%)	CFU/mL	Redução crescimento (%)

Algodão	0h	$1,90 \times 10^4$	-	0h	$1,3 \times 10^4$	-
	24h	$1,92 \times 10^8$	-	24h	$9,50 \times 10^8$	-
Algodão + prodigiodina + 5 ciclos de lavagens		$3,23 \times 10^7$	83,17%		$6,65 \times 10^8$	30,00%
Algodão + prodigiodina + sal + 5 ciclos de lavagens		$5,56 \times 10^6$	97,10%		$5,20 \times 10^8$	45,26%
Algodão + prodigiodina + sal + alcali + 5 ciclos de lavagens		$1,37 \times 10^8$	28,88%		$7,40 \times 10^8$	22,11%

Já para a bactéria PA observou-se uma redução no crescimento bacteriano de 30,00% para o algodão funcionalizado com a prodigiosina, enquanto com a adição de sal e sal e álcali obtiveram-se porcentagens de redução de crescimento de 45,26% e 22,11%, respectivamente. Já em bactérias gram-negativas, como é o caso da PA, a prodigiosina pode impedir a síntese de RNA e proteínas, a divisão celular, a integridade da membrana externa e a respiração celular, mas não matam ou lisam as células bacterianas. A este fato se deve a menor redução da taxa de crescimento (Ren et al., 2017).

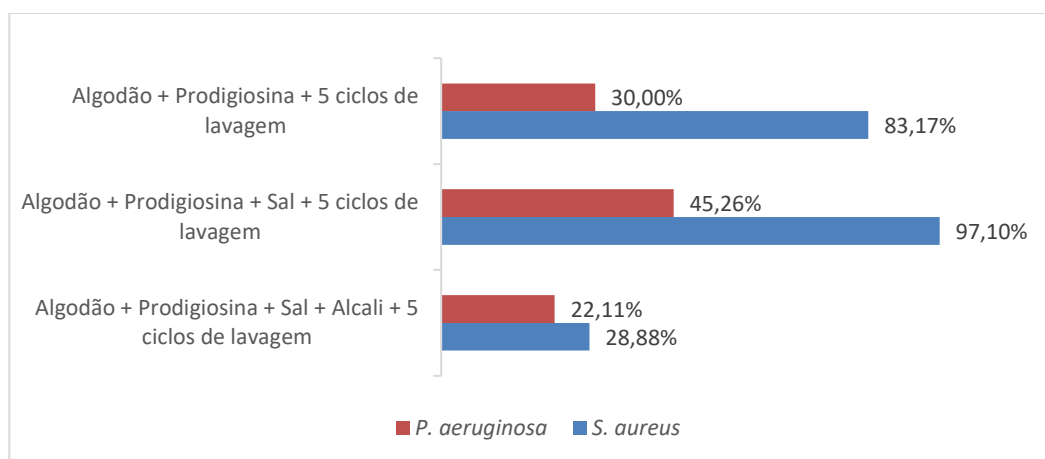


Figura 20: Gráfico de redução do crescimento bacteriano nas amostras de algodão funcionalizadas com prodigiosina

Desta forma, os resultados obtidos, encontram-se em concordância com estudos de Danevcic et al. (2016) e Nakashima et al. (2005). A atividade antibacteriana da prodigiosina em bactérias gram-positivas é melhor do que em bactérias gram-negativas.

A prodigiosina apresenta valores menores de atividade antibacteriana quando aplicada em amostras têxteis (Alihosseini et al., 2008). Também é importante ressaltar que a atividade do pigmento é dependente da sua concentração.

Os resultados do presente trabalho também levam a conclusão que a adição de sal ao banho melhora a funcionalização do algodão com a prodigiosina, bem como o efeito antibacteriano exibido pelas amostras. Contrariamente, a adição simultânea de sal e álcali ao

banho, não favorece o processo de funcionalização e nem a incorporação da prodigiosina na fibra de algodão, por isso as porcentagens de inibição bacteriana são inferiores.

CAPÍTULO V

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

5.1 Conclusão

Os corantes e pigmentos de origem bacteriana são metabólitos secundários de grande importância à humanidade, uma vez que podem ser explorados para aplicação nas mais variadas indústrias (têxtil, alimentícia, farmacêutica, entre outras). Esta classe de colorantes surge como alternativa aos atualmente utilizados, já que não são tóxicos, não poluem o meio ambiente, possuem ciclos rápidos de produção e não dependem de questões climáticas ou geográficas.

O presente trabalho confirmou estudos presentes na literatura, onde apresentam a *Serratia plymuthica* como outra espécie do gênero com potencial de produção do pigmento. Também foi possível concluir, através de várias experiências realizadas, as melhores condições de cultivo para esta espécie.

Concluímos que a bactéria cresce em uma ampla faixa de temperatura, mas a produção de pigmentos é melhor em temperaturas mais baixas (22°C), resultando em colônias bem pigmentadas. Em relação ao meio de cultura alguns fatores são de extrema importância para a produção da prodigiosina, como por exemplo as fontes de carbono e nitrogênio e pH. O pigmento é melhor produzido na presença de glicerol e peptona, com adição de sal fosfato para manter o pH ideal. A taxa de oxigenação também é um fator importante, uma vez que com baixa oxigenação diminuí os valores de oxigênio dissolvido e reduzem a produção do pigmento.

Também foi avaliado o potencial do pigmento para tingimento têxtil e sua atividade biológica antibacteriana após funcionalização da fibra. O processo de tingimento pelo método de esgotamento mostrou-se eficaz, já que foi confirmado que a prodigiosina interagiu com a fibra. Quanto a atividade antibacteriana os resultados foram extremamente positivos, uma vez que reduziu em mais de 95% o crescimento de bactérias gram-positivas e em mais de 45% o crescimento de gram-negativas.

5.2 Perspectivas futuras

A produção de prodigiosina por *Serratia plymuthica* é pouco estudada, quando se pesquisa na literatura, pois a produção geralmente é realizada pela *S. marcescens* (espécie mais estudada e definida). A otimização, utilizando ferramentas estatísticas, da *S. plymuthica* para produção do pigmento surge como um bom campo de investigação para novos trabalhos.

Seria possível, após mais estudos de melhoramento da produção, aplicar a prodigiosina em mais indústrias. Possuindo um pigmento puro pode-se utilizar como aditivo de cor para alimentos e medicamentos, além de conferir propriedades biológicas após a coloração.

Também é de grande importância a continuação dos estudos para comprovação das demais atividades biológicas da prodigiosina, que já foram descritas quando produzida por *S. marcescens*.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS

- Aiba, S., Humphrey, A. E., & Millis, N. F. (1973). *Biochemical engineering* (No. TP 156. F4. A32 1973).
- Alcântara, M. R., & Daltin, D. (1996). A química do processamento têxtil. *Química nova*, 19(3), 320-330.
- Alihosseini, F., Ju, K. S., Lango, J., Hammock, B. D., & Sun, G. (2008). Antibacterial colorants: characterization of prodiginines and their applications on textile materials. *Biotechnology progress*, 24(3), 742-747.
- Aruldass, C. A., Aziz, A., Venil, C. K., Khasim, A. R., & Ahmad, W. A. (2016). Utilization of agro-industrial waste for the production of yellowish-orange pigment from *Chryseobacterium artocarpi* CECT 8497. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 113, 342-349.
- Azambuja, P., Feder, D., & Garcia, E. S. (2004). Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Experimental parasitology*, 107(1-2), 89-96.
- Ayad, M. M., & El-Nasr, A. A. (2012). Anionic dye (acid green 25) adsorption from water by using polyaniline nanotubes salt/silica composite. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 3(1), 3.
- Balan, D. D. S. L. (2017). Corantes naturais de aplicação têxtil: avaliação preliminar da toxicidade de urucum *Bixa orellana* L. (Malvales: Bixaceae) e hibisco *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvales: Malvaceae). *Revista Brasileira de Gestão Ambiental e Sustentabilidade*, 4(7), 151-157.
- Barbosa, M. X. L. (2016). Aditivos químicos em alimentos ultraprocessados consumidos por adolescentes: Análise dos corantes quanto ao potencial alergênico (*Bachelor's thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Norte*).
- Barnett, J. R., Miller, S., & Pearce, E. (2006). Colour and art: A brief history of pigments. *Optics & Laser Technology*, 38(4-6), 445-453.
- Bechtold, T., & Mussak, R. (2009). Natural colorants-quinoid, naphthoquinoid and anthraquinoid dyes. In *handbook of natural colorants*, 151-182.
- Burkinshaw, S. M. (2016). *Physico-chemical aspects of textile coloration*. John Wiley & Sons.
- Buxbaum, G. (Ed.). (2008). *Industrial inorganic pigments*. John Wiley & Sons.
- Carle, R., & Schweiggert, R. (Eds.). (2016). *Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Industrial Applications for Improving Food Color*. Woodhead Publishing.
- Casullo de Araújo, H. W., Fukushima, K., & Takaki, G. M. C. (2010). Prodigiosin production by *Serratia marcescens* UCP 1549 using renewable-resources as a low-cost substrate. *Molecules*, 15(10), 6931-6940.
- Chandrika, U. G. (2009). Carotenoid dyes-properties. In *Handbook of natural colorants*, 221-236.
- Chang, C. C., Chen, W. C., Ho, T. F., Wu, H. S., & Wei, Y. H. (2011). Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. *Journal of bioscience and bioengineering*, 111(5), 501-511.
- Cho, Y. J., Hwang, H. J., Kim, S. W., Song, C. H., & Yun, J. W. (2002). Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor. *Journal of Biotechnology*, 95(1), 13-23.
- Christie, R. M. (2001). *Colour chemistry*. Royal Society of Chemistry.

Colour Index. Definitions of a dye and a pigment. Consultado em 20/08/2018, disponível em <<https://colour-index.com/definitions-of-a-dye-and-a-pigment>>.

Colour Index. Four Edition Online. Consultado em 20/08/2018, disponível em <http://colour-index.com/assets/files/upl/CI_leaflet.pdf>.

Costa, J. P. V. D. (2017). Soro de queijo como substrato potencial à produção de pigmentos por *Monascus ruber*.

Cunha, C. D., Do Rosario, M., Rosado, A. S., & Leite, S. G. F. (2004). *Serratia* sp. SVGG16: a promising biosurfactant producer isolated from tropical soil during growth with ethanol-blended gasoline. *Process Biochemistry*, 39(12), 2277-2282.

Cruz Filho, R. F., & Teixeira, M. F. S. (2013). Avaliação do potencial biotecnológico de pigmento produzido por bactérias do gênero *Serratia* isoladas de substrato amazônico. *Espaço Científico Livre Projetos Editoriais*, Duque de Caxias.

Danevcic, T., Boric Vezjak, M., Tabor, M., Zorec, M., & Stopar, D. (2016). Prodigiosin induces autolysins in actively grown *Bacillus subtilis* cells. *Frontiers in microbiology*, 7, 27.

Darshan, N., & Manonmani, H. K. (2015). Prodigiosin and its potential applications. *Journal of food science and technology*, 52(9), 5393-5407.

Dedhia, E. M. (1998). Natural dyes. *Colourage*, 45(3), 45-49.

Ding, M. J., & Williams, R. P. (1983). Biosynthesis of prodigiosin by white strains of *Serratia marcescens* isolated from patients. *Journal of clinical microbiology*, 17(3), 476-480.

Drink, E., Dugourd, P., Dumont, E., Aronsohn, N., Antoine, R., & Loison, C. (2015). Optical properties of prodigiosin and obatoclax: action spectroscopy and theoretical calculations. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(39), 25946-25955.

Domingo, D., Limia, A., Alarcon, T., Sanz, J. C., Del Rey, M. C., & Lopez-Brea, M. (1994). Nosocomial septicemia caused by *Serratia plymuthica*. *Journal of clinical microbiology*, 32(2), 575-577.

Douma, M., curator. (2008). Pigments through the Ages. Acessado em 25/08/2018, disponível em <http://www.webexhibits.org/pigments>.

Dufossé, L., Galaup, P., Yaron, A., Arad, S. M., Blanc, P., Murthy, K. N. C., & Ravishankar, G. A. (2005). Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality?. *Trends in Food Science & Technology*, 16(9), 389-406.

El-Bialy, H. A., & El-Nour, S. A. A. (2015). Physical and chemical stress on *Serratia marcescens* and studies on prodigiosin pigment production. *Annals of microbiology*, 65(1), 59-68.

Elkenawy, N. M., Yassin, A. S., Elhifnawy, H. N., & Amin, M. A. (2017). Optimization of prodigiosin production by *Serratia marcescens* using crude glycerol and enhancing production using gamma radiation. *Biotechnology reports*, 14, 47-53.

Elmenschawey, A., Abdelrazak, A., Mowafey, A. M., & Osman, Y. (2017). Optimization of Bioreactor Cultivation Parameters by Taguchi Orthogonal Array Design for Enhanced Prodigiosin Production.

Faraag, A. H., El-Batal, A. I., & El-Hendawy, H. H. (2017). Characterization of prodigiosin produced by *Serratia marcescens* strain isolated from irrigation water in Egypt. *Nat. Sci*, 15, 55-68.

Furtado, M. (2003). Corantes: indústria de alimentos adere aos corantes naturais. *Revista Química e Derivados*, 421(1).

- Garcia-Macias, P., & John, P. (2004). Formation of natural indigo derived from woad (*Isatis tinctoria* L.) in relation to product purity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7891-7896.
- Garfield, S. (2002). *Mauve: how one man invented a color that changed the world*. WW Norton & Company.
- Genes, C., Baquero, E., Echeverri, F., Maya, J. D., & Triana, O. (2011). Mitochondrial dysfunction in *Trypanosoma cruzi*: the role of *Serratia marcescens* prodigiosin in the alternative treatment of Chagas disease. *Parasites & vectors*, 4(1), 66.
- Gengatharan, A., Dykes, G. A., & Choo, W. S. (2015). Betalains: natural plant pigments with potential application in functional foods. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 645-649.
- Gerber, N. N. (1975). Prodigiosin-like pigments. *CRC critical reviews in microbiology*, 3(4), 469-485.
- Giri, A. V., Anandkumar, N., Muthukumar, G., & Pennathur, G. (2004). A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC microbiology*, 4(1), 11.
- Giusti, M. M., & Wallace, T. C. (2009). Flavonoids as natural pigments. In *Handbook of Natural Colourants*, 257-275.
- Goldschmidt, M. C., & Williams, R. P. (1968). Thiamine-induced formation of the monopyrrole moiety of prodigiosin. *Journal of bacteriology*, 96(3), 609-616.
- Grima, E. M., Belarbi, E. H., Fernández, F. A., Medina, A. R., & Chisti, Y. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology advances*, 20(7-8), 491-515.
- Grimont, F., & Grimont, P. A. (2006). The genus *serratia*. In *The prokaryotes* (pp. 219-244). Springer, New York, NY.
- Grimont, P. A. D., Grimont, F., Richard, C., Davis, B. R., Steigerwalt, A. G., & Brenner, D. J. (1978). Deoxyribonucleic acid relatedness between *Serratia plymuthica* and other *Serratia* species, with a description of *Serratia odorifera* sp. nov. (type strain: ICPB 3995). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 28(4), 453-463.
- Grossart, H. P., Thorwest, M., Plitzko, I., Brinkhoff, T., Simon, M., & Zeeck, A. (2009). Production of a Blue Pigment (Glaukothalin) by Marine *Rheinheimera* spp. *International journal of microbiology*, 2009.
- Guaratini, C. C., & Zanoni, M. V. B. (2000). Corantes têxteis. *Química nova*, 71-78.
- Gulani, C., Bhattacharya, S., & Das, A. (2012). Assessment of process parameters influencing the enhanced production of prodigiosin from *Serratia marcescens* and evaluation of its antimicrobial, antioxidant and dyeing potentials. *Malays J Microbiol*, 8(2), 116-122.
- Gulrajani, M. L. (2001). Present status of natural dyes. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, 26, 191-201
- Gulrajani, M. L., & Gupta, D. (Eds.). (1992). *Natural dyes and their application to textiles*. Department of Textile Technology, Indian Institute of Technology.
- Gupta, V. K. (2009). Application of low-cost adsorbents for dye removal-A review. *Journal of environmental management*, 90(8), 2313-2342.

- Gupta, C., Garg, A. P., Prakash, D., Goyal, S., & Gupta, S. (2011). Microbes as potential source of biocolours. *Pharmacologyonline*, 2, 1309-1318.
- Gürses, A., Açıkyıldız, M., Güneş, K., & Gürses, M. S. (2016). *Dyes and Pigments*. Springer, Cham.
- Holt, J. G.; Krieng, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T.; Williams, S.T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins, 187.
- Hubbard, R., & Rimington, C. (1950). The biosynthesis of prodigiosin, the tripyrrylmethene pigment from *Bacillus prodigiosus* (*Serratia marcescens*). *Biochemical Journal*, 46(2), 220.
- Hunger, K. (Ed.). (2003). *Industrial dyes: chemistry, properties, applications*. Wiley-VCH Publishers.
- IACM: International Association of Color Manufacturers (2018). Types of color additives. Disponível em <<https://www.iacmcolor.org/types-of-color-additives>>, consultado em 03/09/2018.
- Ibrahim, D., Nazari, T. F., Kassim, J., & Lim, S. H. (2014). Prodigiosin-an antibacterial red pigment produced by *Serratia marcescens* IBRL USM 84 associated with a marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *J. Appl. Pharm. Sci*, 4, 1-6.
- Jain, S., Arora, S., Saha, R. S., & Kaur, I. R. (2017). *Serratia plymuthica*: A community-acquired uropathogen. *Indian Journal of Medical Sciences*, 69(1), 31-32.
- Jehlicka, J., Nemeč, I., Varnali, T., Culka, A., Svatos, A., Frank, O., ... & Edwards, H. G. (2016). The pink pigment prodigiosin: Vibrational spectroscopy and DFT calculations. *Dyes and Pigments*, 134, 234-243.
- Joshi, V. K., Attri, D., Bala, A., & Bhushan, S. (2003). Microbial pigments. *Indian Journal of Biotechnology*, 2, 362-369
- Khanafari, A., Assadi, M. M., & Fakhr, F. A. (2006). Review of prodigiosin, pigmentation in *Serratia marcescens*. *Online Journal of Biological Sciences*, 6(1), 1-13.
- Khanam, B., & Chandra, R. (2018). Comparative analysis of prodigiosin isolated from endophyte *Serratia marcescens*. *Letters in applied microbiology*, 66(3), 194-201.
- Kaya, N. & Epps, H. (2004). Relationship between color and emotion: A study of college students. *College Student J*, 38(3), 396.
- Kumar, A., Vishwakarma, H. S., Singh, J., Dwivedi, S., & Kumar, M. (2015). Microbial pigments: production and their applications in various industries. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, 5(1).
- Lapenda, J. C., Silva, P. A., Vicalvi, M. C., Sena, K. X. F. R., & Nascimento, S. C. (2015). Antimicrobial activity of prodigiosin isolated from *Serratia marcescens* UFPEDA 398. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(2), 399-406.
- Lima, L. K. F. (2015). Viabilidade econômica do processo de obtenção de biomassa pigmentante de *Rubrivivax gelatinosus*.
- Loren, J. G., & Guinea, J. (1978). Effect of glucose concentration on the biosynthesis of prodigiosin by *serratia marcescens* (author's transl). *Revista espanola de fisiologia*, 34(3), 247-252.
- Mahnke, F. H., & Mahnke, R. H. (1996). *Color, Environment, and Human Response: The Beneficial Use of Color in the Architectural...*

Montaner Ramoneda, B. (2001). *Caracterización y purificación de un principio activo de origen bacteriano con actividad antitumoral*. Universitat de Barcelona.

Montaner, B., & Pérez-Tomás, R. (2001). Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells. *Life sciences*, 68(17), 2025-2036.

Montaner, B., & Perez-Tomas, R. (2003). The prodigiosins: a new family of anticancer drugs. *Current cancer drug targets*, 3(1), 57-65.

Moritz, D. E. (2005). *Produção de pigmento monascus por Monascus ruber CCT 3802 em cultivo submerso*. (Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, UFSC, Florianópolis).

Morris, P. J., & Travis, A. S. (1992). A history of the international dyestuff industry. *American Dyestuff Reporter*, 81, 59-59.

Nakashima, T., Kurachi, M., Kato, Y., Yamaguchi, K., & Oda, T. (2005). 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 and immunology*, 49(5), 407-415.

Namazkar, S., & Ahmad, W. A. (2013). Spray-dried prodigiosin from *Serratia marcescens* as a colorant. *Biosci. Biotechnol. Res. Asia*, 10(1), 69-76.

NATCOL: Natural Food Colours Association (2013). Position on the Term “Natural Colour”. Disponível em <<http://www.natcol.org/node/17>>, consultado em 01/09/2018.

Pailliè Jiménez, M. (2017). Produção e caracterização de pigmentos produzidos por *Chryseobacterium* KR6 e *Lysobacter* A03.

Picha, P., Kale, D., Dave, I., & Pardeshi, S. (2015). Comparative studies on prodigiosin production by *Serratia marcescens* using various crude fatty acid sources—its characterization and applications. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 2, 254-267.

Perez-Tomas, R., & Vinas, M. (2010). New insights on the antitumoral properties of prodiginines. *Current medicinal chemistry*, 17(21), 2222-2231.

Pore, T. S., Khanolkar, A. B., & Naiem, H. N. (2016). Production, Purification, Identification Of Prodigiosin From *Serratia* Sp. And Its Antimicrobial Activity.

Prabhu, K. H., & Teli, M. D. (2014). Eco-dyeing using *Tamarindus indica* L. seed coat tannin as a natural mordant for textiles with antibacterial activity. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18(6), 864-872.

Ramani, D., Nair, A., & Krithika, K. (2014). Optimization of cultural conditions for the production of prodigiosin by *Serratia marcescens* and screening for the antimicrobial activity of prodigiosin. *International Journal of Pharmacology and Biological Sciences*, 5(3), 383-392.

Ren, Y., Gong, J., Fu, R., Li, Z., Li, Q., Zhang, J., ... & Cheng, X. (2017). Dyeing and antibacterial properties of cotton dyed with prodigiosins nanomicelles produced by microbial fermentation. *Dyes and Pigments*, 138, 147-153.

Ren, Y., Gong, J., Fu, R., Li, Z., Yu, Z., Lou, J., ... & Zhang, J. (2017). Dyeing and functional properties of polyester fabric dyed with prodigiosins nanomicelles produced by microbial fermentation. *Journal of cleaner production*, 148, 375-385.

Ryazantseva, I., & Andreyeva, I. (2014). Application of prodigiosin as a colorant for polyolefines. *Advances in Biological Chemistry*, 4(01), 20.

- Ryazantseva, I. N., Saakov, V. S., Andreyeva, I. N., Ogorodnikova, T. I., & Zuev, Y. F. (2012). Response of pigmented *Serratia marcescens* to the illumination. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 106, 18-23.
- Samanta, A. K., & Konar, A. (2011). Dyeing of textiles with natural dyes. In *Natural dyes*. InTech.
- Sambrook, J., Russell, D. W., Janssen, K., & Argentine, J. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual on the web*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Singleton, P., & Sainsbury, D. (2006). *Dictionary of microbiology and molecular biology* (Ed. 3). John Wiley & Sons.
- Schiozer, A. L., & Barata, L. E. S. (2007). Estabilidade de corantes e pigmentos de origem vegetal. *Revista Fitos*.
- Schor, J. (2012). Clinical applications for berberine. *Natural Medicine Journal*, 4(12).
- Sigma-Aldrich. Nutrient Agar. Disponível em <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/70148>>. Consultado em 01/10/2018
- Sigma-Aldrich. Tryptic Soy Agar. Disponível em <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/22091>>. Consultado em 01/10/2018
- Silva, F. J. C. M. D. (2006). A materialidade da cor. *Artitextos*, (02).
- Society of Dyers and Colourists & AATCC. Colour Index. Disponível em <<https://colour-index.com>>. Consultado em 27/08/2018.
- Sole, M., Francia, A., Rius, N., & Loren, J. G. (1997). The role of pH in the 'glucose effect' on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Letters in applied microbiology*, 25(2), 81-84.
- Strack, D., Vogt, T., & Schliemann, W. (2003). Recent advances in betalain research. *Phytochemistry*, 62(3), 247-269.
- Suryawanshi, R. K., Patil, C. D., Borase, H. P., Salunke, B. K., & Patil, S. V. (2014). Studies on production and biological potential of prodigiosin by *Serratia marcescens*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 173(5), 1209-1221.
- Tao, J. L., Wang, X. D., Shen, Y. L., & Wei, D. Z. (2005). Strategy for the improvement of prodigiosin production by a *Serratia marcescens* mutant through fed-batch fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(6-7), 969-972.
- Tang, B., Wang, J., Xu, S., Afrin, T., Tao, J., Xu, W., ... & Wang, X. (2012). Function improvement of wool fabric based on surface assembly of silica and silver nanoparticles. *Chemical engineering journal*, 185, 366-373.
- Tuli, H. S., Chaudhary, P., Beniwal, V., & Sharma, A. K. (2014). Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. *Journal of food science and technology*, 52(8), 4669-4678.
- Vankar, P. (2017). *Natural Dyes for Textiles: sources, chemistry and applications*. Elsevier Ltd.
- Venil, C. K., & Lakshmanaperumalsamy, P. (2009). An insightful overview on microbial pigment, prodigiosin. *Electron J Biol*, 5(3), 49-61.
- Venil, C. K., Zakaria, Z. A., & Ahmad, W. A. (2013). Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7), 1065-1079.

- Velmurugan, P., Lee, Y. H., Venil, C. K., Lakshmanaperumalsamy, P., Chae, J. C., & Oh, B. T. (2010). Effect of light on growth, intracellular and extracellular pigment production by five pigment-producing filamentous fungi in synthetic medium. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(4), 346-350.
- Vivas, J., González, J. A., Barbeyto, L., & Rodríguez, L. A. (2000). Identification of environmental *Serratia plymuthica* strains with the new Combo panels type 1S. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(2), 227-229.
- Zanoni, M., & Yamanaka, H. (2016). *Corantes: Caracterização química, toxicológica, métodos de detecção e tratamento*. São Paulo: Cultura Acadêmica.
- Zollinger, H. (1999). *Color: A multidisciplinary approach*. Verlag Helvetic Chimica Acta.
- Yusuf, M. (Ed.). (2018). *Handbook of Renewable Materials for Coloration and Finishing*. John Wiley & Sons.
- Yusuf, M., Shabbir, M., & Mohammad, F. (2017). Natural colorants: Historical, processing and sustainable prospects. *Natural products and bioprospecting*, 7(1), 123-145.
- Yusuf, M., Shahid, M., Khan, M. I., Khan, S. A., Khan, M. A., & Mohammad, F. (2015). Dyeing studies with henna and madder: A research on effect of tin (II) chloride mordant. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19(1), 64-72.
- Wang, H., Zhu, C., Ying, Y., Luo, L., Huang, D., & Luo, Z. (2018). Metformin and berberine, two versatile drugs in treatment of common metabolic diseases. *Oncotarget*, 9(11), 10135.
- Waring, D. R., & Hallas, G. (Eds.). (2013). *The chemistry and application of dyes*. Springer Science & Business Media.
- Weber, G., Chen, H. L., Hirsch, E., Freitas, S., & Robinson, S. (2014). Pigments extracted from the wood-staining fungi *Chlorociboria aeruginosa*, *Scytalidium cuboideum*, and *S. ganodermophthorum* show potential for use as textile dyes. *Coloration Technology*, 130(6), 445-452.
- Williams, R. P., Green, J. A., & Rappoport, D. A. (1956). Studies on pigmentation of *Serratia marcescens*: Spectral and Paper Chromatographic Properties of Prodigiosin1. *Journal of bacteriology*, 71(1), 115.
- Williamson, N. R., Fineran, P. C., Gristwood, T., Chawrai, S. R., Leeper, F. J., & Salmond, G. P. (2007). Anticancer and immunosuppressive properties of bacterial prodiginines. *Future microbiology*, 2 (6), 605-618