



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PRODIGIOSINA
ISOLADA DE *Serratia marcescens* UCP 1549

JEANNE CRISTINA LAPENDA LINS

RECIFE, 2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PRODIGIOSINA
ISOLADA DE *Serratia marcescens* UCP 1549

JEANNE CRISTINA LAPENDA LINS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para a obtenção do grau Mestre em Ciências Biológicas.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva

RECIFE, 2010

Lins, Jeanne Cristina Lapenda

**Produção e caracterização de prodigiosina isolada de *Serratia marcescens*
UCP 1549 / Jeanne Cristina Lapenda Lins. – Recife: O Autor, 2010.**

50 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Galba Maria de Campos Takaki

Co-orientador: Carlos Alberto Alves da Silva

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Ciências Biológicas, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Pigmentos 2. Biotecnologia 3. *Serratia marcescens* I. Título.

572.59

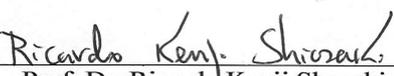
CDD (22.ed.)

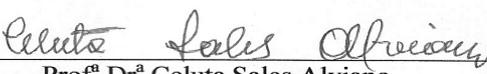
UFPE/CCB-2011-158

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PRODIGIOSINA ISOLADA DE
***Serratia marcescens* UCP 1549**
JEANNE CRISTINA LAPENDA LINS

Membros Titulares:


Profª Drª Galba Maria de Campos Takaki (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco-UNICAP-PE/.


Prof. Dr. Ricardo Kenji Shosaki
Universidade do Estado de Pernambuco-UPE –Petrolina-PE


Profª Drª Celuta Sales Alviano
Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ-RJ

Membros Suplentes:

Profª Drª Silene Carneiro do Nascimento
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE-PE

Profª Drª Norma Buarque de Gusmão
Universidade Federal de Pernambuco-UFPE-PE

Recife PE, 24 de Fevereiro de 2010

*Dedico e agradeço imensamente aos
meus pais Gilson Lins e Tereza Cristina por tudo
fizeram e continuam fazendo por mim.
Este é um dia especial, pois compartilho com
eles mais um momento muito importante na
minha vida, na vida deles...*

“Dedico este trabalho ao meu eterno amor Eduardo Cantalice pelo seu apoio, paciência e dedicação do princípio até os dias atuais”.

“Somos aquilo que fazemos repetidamente. Portanto a excelência, não é um ato, mas um hábito”.

Aristóteles

"Se tentou e fracassou, se planejou e viu seus planos ruírem, lembre-se de que os maiores homens da história foram produtos da coragem, e a coragem bem sabemos, nasce no berço da adversidade."

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

Graças a ti Senhor Jesus este dia chegou! Toda Honra, Glória e Majestade sejam dadas a ti, meu Deus fiel e Senhor criador de toda a Ciência. Obrigada Jesus por tornar este sonho realidade.

A professora Galba Maria de Campos Takaki, minha orientadora, pelos ensinamentos compartilhados nos dois anos que se passaram. Foram dois anos de muito aprendizado por isso, receba a minha eterna gratidão.

Ao Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Prof. Dr. Pe. Pedro Rubem Oliveira S. J., pelo uso dos laboratórios do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais.

Agradeço também aos professores Dr^a. Norma Gusmão e Dr. Haroudo Sátiro, pela maravilhosa orientação, durante o período em que estive realizando experimento no laboratório de Farmacognosia, que refletiu em mudanças positivas que contribuíram na minha formação atual.

A Prof^a. Dr^a. Silene Carneiro do Nascimento pelo apoio no momento em que mais precisei bem como, pela confiabilidade creditada a minha pessoa.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas e todos os seus membros Coordenadores, Professores, e em especial, a Adenilda Eugênia, carinhosamente Adê, secretária do Programa e acima de tudo, minha amiga.

Ao técnico Severino Humberto de Almeida e ao laboratorista André Felipe de Lima, pelo apoio, paciência e colaboração.

A querida amiga Carla Maciel, pela força e contribuição no desenvolver deste trabalho.

À colega de laboratório Alícia Jara, pela ajuda na elaboração desse trabalho.

À CAPES, pela bolsa concedida no período de execução deste trabalho.

Em fim, a todos aqueles que de perto ou de longe torcem pela minha vitória,
OBRIGADA!

RESUMO

Prodigiosinas é uma família de pigmentos naturais, de cor vermelha caracterizado por um esqueleto comum pirrolilpirrometano, produzido por várias bactérias, porém primeiro produzido por *Serratia marcescens*. Este pigmento é uma droga promissora, devido às suas características de atividade antifúngica, imunossupressores e antiproliferativa. As condições ótimas para o aumento do crescimento em *S. marcescens* está relacionada ao aumento da produção do pigmento, sob o ponto de vista industrial. Neste trabalho, foram utilizados os meios convencionais Peptona glicerol e Manitol, bem como os meios alternativos, Caldo de arroz, de gergelim e de amendoim, visando à produção de prodigiosina pela bactéria isolada do solo semi-árido, *Serratia marcescens* UCP 1549, utilizando fermentação em estado sólido, a 28^o C, durante 48 horas de cultivo. A produção da prodigiosina foi observada nos meios convencionais, principalmente meio Manitol, sendo obtidos 1,2g/g de biomassa, porém não foi detectada nos meios alternativos. O pigmento foi purificado por cromatografia de exclusão, empregando-se Sephadex LH-20, obtendo-se 96 frações que foram reunidas, sendo caracterizada por espectrofotometria e espectrometria de massa (GC-MS), sendo sugerido ser Undecilprodigiosina. Estudos foram realizados com a atividade citotóxica para *Artemia salina* demonstrando uma CL₅₀ de 78,33µg/mL. A fitotoxicidade para sementes de alface (*Lactuca sativa*) e pimentão (*Capsicum annuum*) com inibição da germinação das sementes a partir de concentrações superiores a 40µg/mL, representando mais de 50% de inibição. Os resultados obtidos sugerem alto potencial biotecnológico na produção de Undecilprodigiosina pela nova linhagem de *S. marcescens* UCP 1549, como também indica como promissores os resultados com o meio Manitol em estado sólido, os processos de extração e purificação do pigmento.

Palavras-chaves: *Serratia marcescens*, Àgar manitol, Undecilprodigiosina, Citotoxicidade

ABSTRACT

Prodigiosins, a family of natural red pigments characterized by a common pyrrolylpyrromethane skeleton, are produced by various bacteria that first characterized from *Serratia marcescens*. This pigment is a promising drug owing to its reported characteristics of having antifungal, immunosuppressive and anti-proliferative activity. The optimal conditions to enhance the growth of *S. marcescens* are related to increase production of the pigment under the industrial point of view. In this study, we used the conventional media Peptone glycerol and Mannitol, as well as alternative medium broth of rice, sesame and peanut, for the production of Prodigiosin by *Serratia marcescens* UCP 1549 bacteria isolated from semi-arid soil using solid state fermentation, at 28⁰ C for 48 hours. The production of Prodigiosin was observed in the conventional media, mainly Agar mannitol, obtaining 1.2 g / g of biomass, but was not detected in the alternative media. The pigment was purified by exclusion chromatography, using Sephadex LH-20, yielding 96 fractions were collected, and characterized by spectrophotometry and mass spectrometry (GC-MS), and suggested to be Undecylprodigiosin. Studies were performed with the cytotoxic activity in *Artemia salina* demonstrated an LC50 of 78.33 mg / mL. The Phytotoxicity to lettuce (*Lactuca sativa*) and pepper (*Capsicum annum*) seeds showed inhibition of seed germination from concentrations greater than or 40, representing more than 50% of inhibition. The results obtained suggest high biotechnological potential to production by the new strain *S. marcescens* UCP 1549, as well as promising results indicates the Mannitol in the solid state, the processes of extraction and purification of pigment.

Keywords: *Serratia marcescens*, Mannitol Agar, Undecylprodigiosin, Cytotoxicity

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 <i>Serratia marcescens</i> : Histórico	3
2.2 Família Enterobacteriaceae	3
2.3 O microorganismos: <i>Serratia marcescens</i>	4
2.4 Descrição da Prodigiosina	5
2.4.1 Microorganismos produtores de prodigiosina	6
2.4.2 Fatores que influenciam a produção de prodigiosina	7
2.4.3 Prováveis mecanismos de ação da prodigiosina	10
2.4.4 Atividade biológica da prodigiosina	11
2.5 Outros produtos sintetizados por <i>S. marcescens</i>	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 Geral	13
3.2 Específicos	13
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
5- CAPÍTULO I- ARTIGO	21
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
7. CONCLUSÕES	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto geral de <i>S. marcescens</i> cultivada em placa com pigmentação vermelha característica em 24h (student.cbcemd.edu/.../lab2/sminsol.html)	05
Figura 2. Estrutura química da prodigiosina	05
Figura 3. Núcleo do Prodigioseno	06
Figura 4. Microscopia eletrônica de algumas bactérias produtoras de prodigiosina; A- <i>Serratia</i> spp, B- <i>Streptomyces</i> spp, C- <i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	07
Figura 5. Biossíntese da prodigiosina por <i>Serratia marcescens</i>	09

LISTA DE FIGURAS**Artigo**

Figura 1A. Espectro de absorção da fração vermelha purificada produzida em meio Manitol, com máxima absorbância em 533nm _____ 36

Figura 2B. Espectro de absorção da fração azul purificada produzida em meio Manitol, com máxima absorbância em 206nm _____ 36

Figura 3. Espectro de massa da fração vermelha purificada produzida em meio Manitol _____ 37

LISTA DE TABELAS**Artigo**

Tabela 1. Produção de biomassa por *S. marcescens* (UCP1548) em meios convencionais e alternativos a 28°C por 48 horas _____ 35

Tabela 2. Produção da prodigiosina por *S. marcescens* (UCP1548) em meios convencionais e alternativos a 28°C por 48 horas _____ 35

Tabela 3. Massas moleculares encontradas na biblioteca de correspondência de valores m/z para prodigiosina e seus respectivos produtos _____ 37

Tabela 4. Avaliação da fitotoxicidade da prodigiosina para sementes de alface crespa (*Lactuca sativa*) e pimentão casca dura (*Capsicum annuum*) nas concentrações de 100, 50, 20, 5 e 2,5 µg/mL _____ 38

1. INTRODUÇÃO

Bactérias Gram-negativas do gênero *Serratia* pertencem à família *Enterobacteriaceae*, e são consideradas patógenos oportunistas causando doenças em plantas, animais e humanos. Algumas linhagens de *Serratia marcescens* provocam graves infecções nosocomiais, sendo a espécie responsável por inúmeros casos de infecções hospitalares do trato respiratório, urogenital e via parental de usuários de drogas (STOCK *et al.*, 2003).

S. marcescens, bactéria cosmopolita, tem sido isolada de solos, água, plantas e do ar (LEEPER, 2006). Este microorganismo destaca-se pela habilidade que algumas cepas têm em excretar produtos extracelulares como enzimas quitinolíticas, proteases, lípases, nucleases, bacteriocinas, surfactantes e com maior destaque pelas inúmeras atividades biológicas descritas para o pigmento prodigiosina (WILLIAMSON, 2006).

Prodigiosina é um metabólito secundário produzido por *S. marcescens*, sob a forma de um pigmento vermelho pertencente à vasta família de pigmentos vermelhos naturais, denominado de prodigionina, que abrange diversos membros como Undecilprodigiosina e o Cicloprodigiosina dentre outros (KHANAFARI, 2006).

A prodigiosina tem despertado grande interesse principalmente, farmacológico considerando a ação bactericida, antifúngica, antimalárico, algicida e recentemente como imunossupressora pela indução da apoptose em linfócitos T e B e antitumoral, sendo considerada atóxica para células saudas (D'ALESSIO *et al.*, 2000; MONTANER *et al.*, 2000; HAN *et al.*, 2001; NOBUTAKA *et al.*, 2001; ISAKA *et al.*, 2002; AZAMBUJA *et al.*, 2004; NAKASHIMA *et al.*, 2006; SHUN-YA N e YOICHI, 2009).

Os mecanismos antitumorais da prodigiosina ainda são poucos conhecidos, sendo alvo de muitas pesquisas, contudo, mecanismos apoptóticos têm sido propostos para algumas prodigiosinas análogas (MONTANER, 2000). A prodigiosina produzida por *S. marcescens* também induz apoptose em linhas celulares cancerígenas hematopoiéticas e gastrointestinais sem causar qualquer dano às células saudas (MONTANER, 2000; DIAZ-RUIZ, 2001; CLIFT e THOMSON, 2009). E ainda, em seus efeitos farmacológicos a prodigiosina pode atuar em nível do DNA, através de sua clivagem oxidativa e induzindo a célula a iniciar o processo apoptótico (WILLIAMSON, 2006; PRYCE e SARAH, 2009).

Considerando, as diversas atividades biológicas apresentadas por este pigmento bem como, a alta seletividade para células cancerígenas, cuja atividade sugere como sendo a prodigiosina é uma nova e promissora biomolécula devido à ação específica, diferentemente

das terapias cancerígenas convencionais (AZUMA, 2000; DIAZ-RUIZ, 2001; HAN, 2001; KWON e PARK, 2009; KALIVODA e STELLA, 2010).

Neste sentido, estudos foram realizados com uma nova linhagem de *Serratia marcescens* isolada de solo do semi-árido, visando à busca de meios de produção de prodigiosina.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Serratia marcescens*: Histórico

Durante muitos anos o microrganismo produtor de prodigiosina foi chamado de *Bacillus prodigiosus*, sendo conhecido como a bactéria dos milagres por está associada aos fenômenos religiosos da época. DeToni e Trevisan (1889) foram os primeiros a classificá-lo como Enterobactéria, baseando-se em suas propriedades bioquímicas, passando então a ser denominando de *Serratia* sp (BENNETTE e BENTLEY, 2000). Em 1924, o pesquisador Bizio descreveu pela primeira vez a *Serratia marcescens* como sendo um fungo responsável pela pigmentação roxa do chamado “sangramento da hóstia”, em memória ao físico italiano Serafino Serrati, inventor do barco a vapor (RODRIGUES, 2006). O termo “marcescens” procede do latim e faz referência a decomposição e putrefação, fenômenos associados à primeira descrição que se fez deste microrganismo. Muitas são as histórias descritas desta bactéria. Durante a Idade Média, em algumas ocasiões apareciam manchas vermelhas nas hóstias sagradas sendo estas, confundidas com gotas de sangue. Estes fenômenos foram associados a milagres, contudo, tratava-se de colônias pigmentadas de *Serratia marcescens* (GAUGHRAN, 1969; MONTANER, 2000) (Figura 1).

2.2 Família *Enterobacteriaceae*

A *S. marcescens* pertence à família *Enterobacteriaceae*. A família *Enterobacteriaceae* apresentá-se sob a forma de bacilos Gram-negativos, medindo em geral 0,3-1,8µm. Estes microrganismos podem ser imóveis ou móveis com flagelos peritríquios. São anaeróbios facultativos e quimioorganotróficos, tendo tanto o metabolismo aeróbico como o fermentativo. A maioria das espécies da família se desenvolve bem à temperatura de 37°C. Entretanto, algumas espécies apresentam temperatura ótima de crescimento entre 25 e 30°C e apresentam maior atividade metabólica. Existem gêneros psicrotóxicos encontrados no solo, água e no trato gastrointestinal dos seres humanos e animais (HOLT *et al.*, 1994; ICMSF, 2000).

As enterobactérias catabolizam D-glicose e outros carboidratos com produção de ácido e gás. Bioquimicamente, são oxidase negativa, catalase positiva, exceto a *Shigella dysenteriae*

e espécies de *Xenorhabdus* (FELIPE, 2008). São amplamente distribuídas na natureza, podendo também ser encontradas no solo, água, frutas, vegetais, animais e nos seres humanos. Há uma grande heterogeneidade na ecologia e hospedeiros, sendo potencialmente patogênicas para o homem, animais e insetos. Inúmeras espécies causam diarreias, incluindo febre tifóide e disenteria bacilar. Muitas espécies que não estão associadas com doenças diarréicas são freqüentemente referenciadas como patógenos oportunistas. Muitas destas espécies assim como as que causam doenças diarréicas podem causar uma variedade de infecções extra-intestinais, incluindo bacteremias, meningite, feridas e infecções do trato respiratório e urinário (PASTA, 2008).

Na família *Enterobacteriaceae* constam 30 gêneros sendo responsáveis por 50% das infecções nosocomiais, principalmente causadas por *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp, *Proteus* sp, *Providencia* sp, e *Serratia marcescens* sendo esta última, responsável pelo maior número de casos de infecções hospitalares (CAREY E SAIMAN, 2008).

2.3 O microorganismos: *Serratia marcescens*

Serratia marcescens é um bacilo Gram-negativo, pertencente ao Gênero *Serratia* sp. cuja família compreende a *Enterobacteriaceae*. *S. marcescens* é saprófito, cosmopolita habitando diversos nichos ecológicos como água, solo, ar, plantas e animais, e sendo freqüentemente encontrada em alimentos ricos em amido (CERRATO, 2007). É capaz de sobreviver em condições extremas como na presença de desinfetantes e anti-sépticos (SOARES, 2002).

Trata-se de um patógeno oportunista, responsável por alguns casos de infecções hospitalares. As infecções causadas por *Serratia marcescens* na maioria das vezes, inicia-se por contaminação exógena, como por exemplo, por disseminação através de Dípteros hematófagos que finda por disseminar dentro de hospitais (LUZ-ALVEZ, 2007). A principal porta de entrada mais freqüente de infecção é o trato urogenital podendo ser encontrado ainda no trato respiratório, em feridas após intervenções cirúrgicas e via parental de usuários de drogas resultando em quadros graves de infecções como septicemia, meningites, endocardites e infecção de feridas pós-cirúrgicas (BLATT E MIRANDA, 2005; VASCONCELOS, 2006).

Devido à sua presença constante no ambiente, e sua preferência por condições de umidade, *S. marcescens* é comumente encontrada em casas de praias (especialmente em

reboco azulejo, chuveiro cantos, banheiros, poças de água e bacias), onde ela se apresenta com uma coloração vermelha intensa. A erradicação completa do organismo é muito difícil, mas pode ser realizado através da aplicação de antimicrobianos (AZAMBUJA E GARCIA, 2004)



Figura 1. Aspecto geral de *S. marcescens* cultivada em placa com pigmentação vermelha característica em 24h (student.ccbcmd.edu/.../lab2/sminsol.html).

2.4 Descrição da Prodigiosina

A prodigiosina, pigmento vermelho natural compreendido na família das prodigininas, apresenta estrutura de um tripirrol linear de peso de 323,44 dalton cuja fórmula molecular é $C_{20}H_{25}N_3O$ (Figura 2) (KALIVODA E STELLA, 2010).

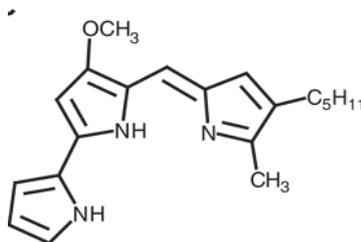


Figura 2. Estrutura química da Prodigiosina (WILLIMANSON *et al.*, 2006)

Este pigmento caracteriza-se por ser fotossensível, insolúvel em água, moderadamente em álcool e solúvel em clorofórmio, bromofórmio (parente mais próximo do clorofórmio), benzeno, acetona, éter etílico e acetato de etila, sofrendo alteração de cor dependendo do pH

do meio (YU, 1979; KIM, 2007). Em pH ácido apresenta um pigmento vermelho intenso com absorvância máxima de 537 nm e em meios alcalinos a pigmentação pode variar de laranja a amarelo com absorvância máxima de 470 nm (NAKASHIMA, 2005).

A prodigiosina desperta grande interesse devido a sua notada ação imunossupressora, bem como mediador do efeito apoptótico em células cancerígenas humanas e não apresentando toxicidade a células sadias (HO e PENG, 2009)

A estrutura química da prodigiosina corresponde ao 2-metil-3-pentil-6-metoxiprodigioseno que se caracteriza por apresentar uma estrutura linear tripirrólica comum, conhecida como prodigioseno (Figura 3) que representa o esqueleto químico comum dos representantes dessa ampla família (KIM, 2008).

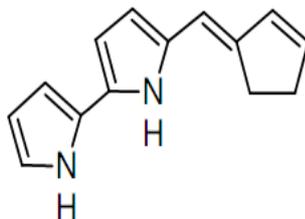


Figura 3. Núcleo do Prodigioseno (RODRIGO *et al.*, 2007)

2.4.1 Microorganismos produtores de prodigiosina

Atualmente, existem 10 espécies de *Serratia* das quais apenas *S. plymuthica*, *S. rubidade* e alguns biogrupos de *S. marcescens* são capazes de produzir o pigmento prodigiosina (PANDEY e CHANDER, 2009). Muitas cepas do ambiente e poucos isolados clínicos produzem o pigmento vermelho prodigiosina

A prodigiosina é produzida por alguns microrganismos (Figura.5) como *Serratia* sp, *Actinomyces* como a espécie *Streptomyces coelicolor*, algumas bactérias marinhas como *Hahella chejuensis* e *Pseudoalteromonas denitrificans* (JEONG, 2005). Muitas linhagens de *S. marcescens* sintetizam a prodigiosina (2-metil-3-pentil-6-metoxiprodigiosina) onde a produção do pigmento por estas bactérias tem sido relatada ao longo devido à coloração vermelha característica do pigmento (CAROLINE E SERGIO, 2009).

Em adicional, a prodigiosina pode ser produzida por *S. marcescens* através de marcadores biológicos e tem sido avaliada como sendo um metabólito secundário modelo produzido por *S. marcescens* e também por *Streptomyces* spp (THOMSON, 2000).

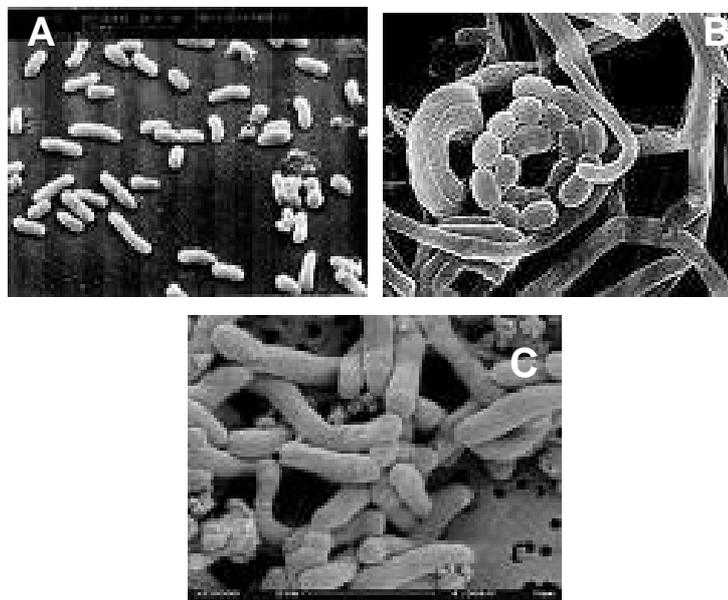


Figura 4. Microscopia eletrônica de varredura de algumas bactérias produtoras de prodigiosina. **A-** *Serratia* sp ;**B-** *Streptomyces* sp; **C-** *Pseudoalteromonas denitrificans* (CERRATO, 2007)

2.4.2 Fatores que influenciam a produção de prodigiosina

A síntese de prodigiosina em *Serratia marcescens* está relacionada aos seguintes fatores: sais inorgânicos como o cloreto de sódio, o glicerol como fonte carbono e sais de amônia como fonte de nitrogênio (KIM e LEE, 2009). O meio de cultivo contendo glicose como fonte de carbono fornece energia, contudo não induz a síntese de prodigiosina (JEWERY *et al.*, 2005). Para favorecer a formação máxima do pigmento, o crescimento deve ser feito em meios contendo glicerol como fonte de carbono (ALIHOSSEINI e LANGO, 2009). A produção de prodigiosina pode ocorrer em abundância apenas na presença de glicerol e peptona (GOLDSCHNIDT E WILLIAMS, 1968; DÍAZ-RUIZ, 2001).

Serratia marcescens é um microrganismo facultativo podendo crescer tanto na presença como ausência de oxigênio, contudo a síntese de prodigiosina pode ser influenciada pelas condições de oxigenação. Assim, o pigmento é produzido tanto em condições aeróbias

como em anaeróbias, contudo apresenta melhor rendimento sob condições aeróbias (WAN E CHEN, 2005).

O pH, íons e detergentes também são fatores limitantes para a obtenção da prodigiosina (SOLE *et al.*, 1997). O aumento de NaCl para 4% favorece a produção de prodigiosina, contudo 8% de NaCl causa inibição na síntese de prodigiosina. De qualquer maneira, deve-se levar em conta que estes resultados podem variar de acordo com a linhagem em estudo (RJAZANTSEVA *et al.*, 1994).

A temperatura é outro fator crítico para a produção do pigmento. A literatura descreve que o pigmento se forma em uma faixa relativamente pequena de temperatura (12 a 36°C), quando comparada com a ampla faixa de temperatura de crescimento da bactéria, de (4 a 42°C). Contudo, a temperatura ótima para *S. marcescens* é de 30 a 37°C, e a requerida para o aumento da pigmentação é entre 27 a 30°C (WEI, 2006).

Assim, a presença de luz condiciona a velocidade de síntese e quantidade de pigmento produzido pela bactéria. A produção da prodigiosina está diretamente relacionada à presença ou ausência de luz durante o cultivo. A máxima produção do pigmento em cultivo com luz ocorre entre 2-3 dias; enquanto que, na ausência de luz o tempo necessário é de 3-4 dias. Curiosamente um maior rendimento se obtém nos cultivos sem luz. Por outro lado, a luz é responsável pela fototransformação da prodigiosina (SOMEYA, 2004). Após a sua formação, a prodigiosina deve ser armazenada em ambiente escuro, pois a luz causa alteração na molécula causando a degradação do pigmento (TOMLINSON, 2006).

Estudos realizados posteriormente, sugerem que a biossíntese da prodigiosina é realizada por duas rotas lineares, que mais tarde se bifurcam através da condensação enzimática dos produtos terminais das duas vias, o 2-metil-3-n-amil-pirrol (MAP) e o 4-metoxi-2, 2'-bipirrol-5-carbaldeído (MBC), resultando na formação da prodigiosina (FURSTER *ET AL.*, 2003).

A síntese da prodigiosina inicia-se com a formação de uma série de intermediários por duas rotas independentes, que finalmente convergem para formar o pigmento. Existem alguns mutantes de *S. marcescens* que interrompe a síntese de alguns percursos, entre eles o mutante 933, que forma o bipirrol MBC (4-metoxi-2,2'-bipirrol-5-carboxaldeído), o mutante WF que sintetiza o monopirrol MAP (2-metil-3-amilpirrol), e o mutante OF, que forma a

norprodigiosina (2-metil-3-pentil-6-hidroxiprodigioseno) (Figura 4) (WILLIAMNSON *et al.*, 2006).

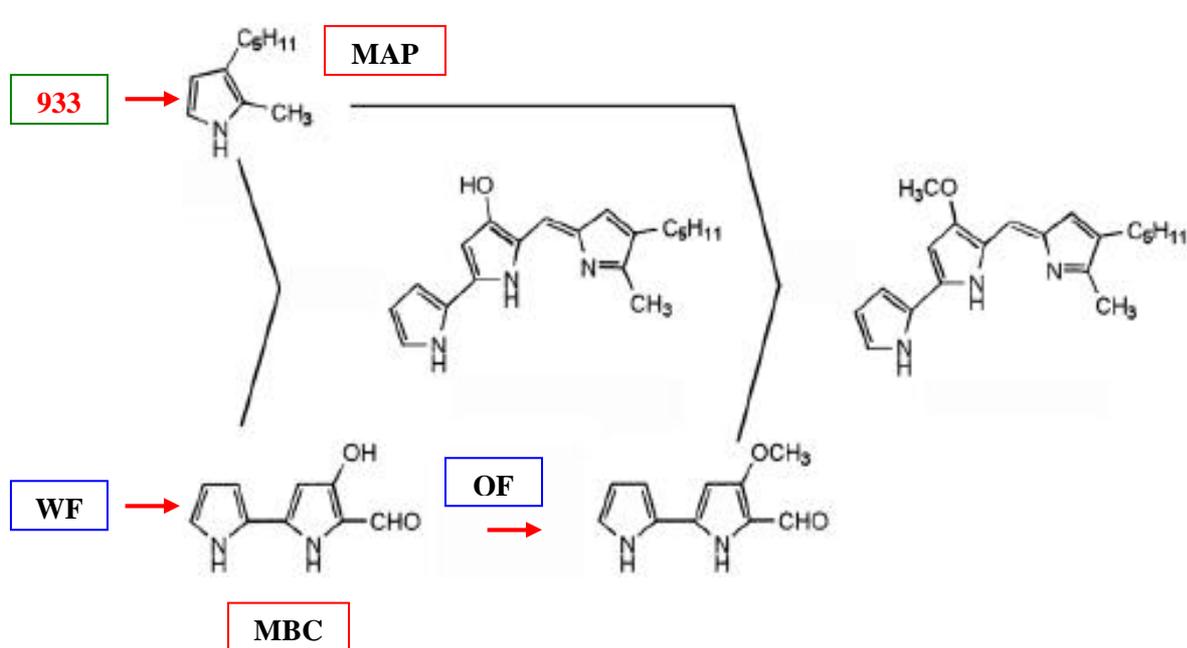


Figura 5. Biossíntese da prodigiosina por *Serratia marcescens* (WILLIAMNSON *et al.*, 2006)

Os biogrupos altamente semelhantes de *S. marcescens* apresentam habilidade de sintetizar prodigiosina e os que não produzem prodigiosina, costumam ser deficientes na enzima de condensação (THOMSON, 2000).

A localização da produção da prodigiosina por em *S. marcescens* é bastante controversa. Assim, tem sido descrita em nível da parede celular, localizada no periplasma ou na parte externa da membrana citoplasmática, como também tem sido descrito, em vesículas de secreção que contêm proteases, nucleases e uma proteína de 100 kDa semelhante a prodigiosina (KALIVODA e STELLA, 2009).

A literatura descreve ainda, que a relação entre a produção de prodigiosina e a motilidade de *Serratia sp*, cause uma variação na composição dos flagelos quer por adição, deleção ou substituição de aminoácidos, pode mudar a antigenicidade do flagelo. A mudança produzida na superfície do flagelo está associada à patogenicidade, pois é uma forma de escapar do sistema imunológico do hospedeiro sugerindo que a formação do flagelo é

inversamente proporcional a biosíntese de prodigiosinas, explicando o mecanismo da maioria dos isolados clínicos que não produzem o pigmento (KOBAYASHI E ICHIKAWA, 1991).

A síntese química da prodigiosina tem sido realizada por alguns pesquisadores através de percussores biológicos como MAP e o MBC (WASSERMAN *et al.*, 1999; FINERAN, 2005; WALSH, 2006).

2.4.3 Prováveis mecanismos de ação da prodigiosina

A partir de alguns resultados obtidos experimentalmente têm-se sugerido a existência de quatro possíveis mecanismos de ação para as prodigiosinas (WILLIAMNSON *et al.*, 2006):

Clonagem do DNA

Como moléculas hidrofóbicas, as prodigiosinas poderiam difundir-se livremente através das membranas e interagir com o DNA causando uma clivagem da dupla fita de DNA. Com o dano ao DNA, a célula desencadearia um programa de parada de ciclo para iniciar sua reparação, caso o dano seja muito grave não seria possível ser reparada e a célula poderia ativar o seu programa apoptótico.

Variação do pH intracelular

A molécula poderia ser incorporada à bicamada lipídica da membrana citoplasmática, onde por endocitose poderia alcançar o endossoma ou algum outro compartimento ácido. As bombas de ATPases seriam desacopladas exercendo sua função de Cl^- / H^+ suporte e induziria à neutralização deste compartimento, provocando por sua vez a acidificação do citoplasma e, em alguns casos, a morte por apoptose (MADERVILLE *et al.*, 2001; PÉREZ-TOMÁS e MONTANER, 2003).

Ativação ou inibição de receptores de membranas

A molécula poderia inibir/ ativar, de forma direta (não sendo descrito nenhum receptor específico destas moléculas até o presente momento) ou de forma indireta, receptores de

membranas chave na regulação do ciclo celular ou a apoptoses das células (LLAGOSTERA e SOTO-SERRATO, 2003).

Interação com a membrana externa da mitocôndria

As prodigiosinas poderiam difundir-se livremente através das membranas plasmáticas e interagir com a membrana externa mitocondrial, desacoplando a cadeia de fosforilação oxidativa e provocar a saída de moléculas apoptogênicas, como por exemplo o citocromo C, o qual desencadearia o processo apoptótico (SOTO-SERRATO e MONTANER, 2004).

2.4.4 Atividade biológica da prodigiosina

As prodigiosinas têm sido atribuídas diversas atividades como potente antimalárico apresentando elevada ação sobre contra *Plasmodium falsiparum*, antiprotozoico contra *Entamoeba histolytica*, efeito lítico sobre tripanossomídeos como *Trypanossoma. cruzi* e *Trypanossoma. rangeli*, atividade lítica para *Leishmania braziliensis*. A prodigiosina apresenta ação antifúngica, antibacteriana demonstrando grande efeito sobre bactérias Gram-positivas e efeito algicida pela prodigiosina PG-L-1 produzida pela bactéria marinha *Hahella chejuensis*, que possui atividade lítica contra dinoflagelados (ISAKA, 2002; AZAMBUJA *et al.*, 2004; NAKASHIMA *et al.*, 2006, MORAES, 2009).

Mais recentemente, a produção desse pigmento tem despertado grande interesse devido às atividades imunossupressoras e anticancerígenas, atuando como um imunossupressor de linfócitos T e B e inibindo principalmente a interleucina - 2R α , sem causar toxicidade *in vivo* (D'ALESSIO *et al.*, 2000; HAN *et al.*, 2001, TUNCA e BARREIRO, 2009). O PNU156804, um análogo do Undecilprodigiosina que inibe de forma eficaz a proliferação de linfócitos T e B evitando a rejeição de transplantes humanos (STEPKOWSHI *et al.*, 2002).

A propriedade anticancerígena das prodigiosinas tem sido provada em diversos estudos com células cancerígenas hematopoéticas, bem como, em células de câncer de estômago e de colo do útero (DIAZ-RIUZ *et al.*, 2001). Este pigmento tem a capacidade de induzir a morte celular em diversos tipos de células cancerígenas como é o caso da Cicloprodigiosina hidrocloreídrica que tem demonstrado esta propriedade *in vitro* e *in vivo*, especialmente em câncer de mama (YAMAMOTO, *et al.*, 2001; YAMAMOTO, *et al.*, 2002, CLIFT E THOMSON, 2009).

Destaca-se também, a eficiência anticancerígena dos derivados da prodigiosina chamados de Obatoclax mesilate (GX15-070MS) e o 2-(1H-pirrol-2-il)-5[(2H-pirrol-2ilideno)metil]-1H-pirrol (TRUDEL *et al.*, 2007).

2.5 Outros produtos sintetizados por *S. marcescens*

Além da prodigiosina, a *S. marcescens* é produtora também de diversas substâncias, entre esses produtos estão a *Serrawetina*, um biosurfactante que lhe proporciona aderência no processo de colonização de superfícies, enzimas como quitinases, lípases e cloroperoxidasas, proteínas que se ligam a grupos hemo e a benzona, uma endonuclease já comercializada (MEISS *et al.*, 1995; MONTANER *et al.*, 2000, HORNG *et al.*, 2010).

E ainda, com o nome de prodigiosano tem-se descrito na literatura um polissacarídeo obtido de *S. marcescens*, provavelmente um lipopolissacarídeo com antitumoral e que vem sendo utilizado também no tratamento de várias infecções. Este biopolímero não deve ser confundido com a prodigiosina, pois são completamente distintos assemelhando-se apenas na raiz do nome (MONTANER, 2000; DIAZ-RUIZ, 2001, ZHOU *et al.*, 2010, GRISTWOOD *et al.*, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Realizar a produção da prodigiosina pela nova linhagem de *Serratia marcescens* UCP1549, em meios convencionais e alternativos, além de isolar, purificar, caracterizar e avaliar a toxicidade da biomolécula.

3.2 Específicos

- Avaliar o crescimento e produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* em diferentes meios de cultivo convencionais e alternativos;
- Realizar a produção de prodigiosina nos meios selecionados, isolar e purificar a prodigiosina obtida no meio selecionado;
- Identificar e caracterizar a prodigiosina obtida no meio selecionado;
- Avaliar os efeitos tóxicos da prodigiosina para *Artemia salina* e sementes de alface crespa (*Lactuca sativa*) e pimentão (*Capsicum annuum*).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZAMBUJA P; FEDER D; GARCIA E. S. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Experimental parasitology* . 2004,107: 89-96.

AZUMA, T., N. WATANABE, H. YAGISAWA, H. HIRATA, M. IWAMURA AND Y. KOBAYASHI. Induction of apoptosis of activated murine splenic T cells by cycloprodigin hydrochloride a novel immunosuppressant. *Immunopharmacology*. 2000: 46: 29-37.

BALDINO, C. M.; PARR, J.; WILSON, C. J.; NG, S.-C.; YOHANNES, D.; WASSERMAN, H. H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006,167: 01-704.

BENENETT, J. W. E BENTLEY, R. Seeing red: the story of prodiginosin. *Adv. Appl. Microbiol.* 2000, 47: 1-32.

BIZIO, B. Lettera di Bartilomeu Bizio al chiarissimo canônico Ângelo Bellani sopra il fenomeno della polenta porporina. Biblioteca Italiana o sia Giornale di Letteratura, Scienze, e Arti, Tomo 30, Anno 8, Aprile, Maggio, Giugno, 1923, 275-295. Traducción al inglés:

BLACK, J.G. Microbiologia: fundamentos e perspectivas. Traduzido por Eiler Fritsch Toros. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. cap. 13, p. 316-347. Título do original: Microbiology, 2002.

BLATT, J. M & MIRANDA, M.C. Profile of the microorganisms which cause of urinary tract infections in interned patients. *Revista Panamericana Infectologia*, v.17, n.4, p.10-14, 2005.

CAREY, A.J & SAIMAN, L. Hospital- Acquired Infections in the NICU: Epidemiology for the New millennium. *Clin Perinatol* vol 35:223-249, 2008.

CAROLINE S. M, SERGIO H. S, JOSÉ M. A, DANIELE P. C, FERNANDO A. G., WANDERLEY S, REGINALDO P. B, ELOI S. G, PATRÍCIA A. Prodigiosin is not a determinant factor in lysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* after interaction with *Serratia marcescens* D-mannose sensitive fimbriae. *Exp Parasitol.* 2009, 122: 84-90.

CERRATO, V.S. Caracterización del efecto anticanceroso e identificación de dianas moleculares del principios activos derivados de *Serratia marcescens*. (Tese de Doutorado submetida a Universidad de Barcelona), 2007.

CHAMBERS, H. F.; SANDER, M. A. Fármacos antimicrobianos. In: GILMAN, A. G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, A. (Eds.) *As bases da farmacologia terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro, . cap. 43, p. 757-776, 1996.

CHANG. S; SANADA. M; JOHDO. O; OHTA. S; NAGAMATSU. Y; YOSHIMOTO A. High production of prodiginosin by *Serratia marcescens* grown on etanol. *Biotechnol Lett.* Vol. 22: 1761-1765, 2000.

CLIFT M.D, THOMSON R.J. Development of a merged conjugate addition/oxidative coupling sequence. Application to the enantioselective total synthesis of metacycloprodigiosin and prodigiosin R1. *J Am Chem Soc.* 2009, 131:14579-83.

DE TONI JB, TREVISAN V. Schizomycetaceae Naeg. *Sylloge Funnorum.* vol 81:923, 1889.

D`ALESSIO, R; BARGIOTTI, A; CARLINE, O; COLLOTA,F; FERRARI, M. GNOCCHI, P; ISETTA, A; MONGELLI, N; MOTTA, P; ROSSI, A; ROSSI, M; TIBOLLA, M; VANOTTI, E. Synthesis and immunosuppressive activity of novel prodigiosin derivatives. *J. Med. Chem.* vol 43(13): 2557-65, 2000.

DÍAZ-RUÍZ, C; MONTANER, B; PÉREZ-TOMÁS, R. Prodigiosin induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in gastric cancer cell line HGT-1. *Histol. Histopathol.* vol 16(2): 415-21, 2001.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J.W. "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms" *Clin. Microbiol. Rev.*, v.15, p.167193, 2002.

FINERAN, P. C., SLATER, H., EVERSON, L., HUGHES, K. & SALMOND, G. P. Biosynthesis of tripyrrole and β -lactam secondary metabolites in *Serratia*: integration of quorum sensing with multiple new regulatory components in the control of prodigiosin and carbapenem antibiotic production. *Mol. Microbiol.* 56, 1495–1517, 2005.

FLEMING, Alexander, 1929- On the antibacterial action of cultures of a penicillium with special referen to their use in the isolation of *B. influenzae*. "British Journal of Experimental Pathology", vol. 10, 226-236, 2005.

FONSECA, C.B; RODRIGUES, J.C; NETO, L.B; CARDOSO, A.C; CAVINATTO, J.N. Osteoarticular Infections Caused by *Serratia Marcescens* Multi-drug Resistance. *Pedriatria (São Paulo)*, 16(4): 195-198, 1994.

FÜRSTNER, A. Chemistry and biology of roseophilin and the prodigiosin alkaloids: a survey of the last 2500 years. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42, 3582–3603, 2003.

GAUGHRAN, E.R. From superstition to science: the history of a bacterium. *Trans N. Y Acad Sci.* vol 31(1):3-24, 1969.

GERBER, N.N. Prodigiosin-like pigments. *CRC Crit. Rev Microbiol.* vol 3(4): 469-85, 1975a.

GERBER, N.N; GAUTHIER, M. New Prodigiosin-like pigments from *Alteromonas rubra*. *Appl. Environ Microbiol.* vol 37(6):1176-9, 1979.

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

GOLDSCHMIDT MC, WILLIAMS RP. Thiamine-induced formation of the monopyrrole moiety of prodigiosin. *J Bacteriol.*vol 96:609-16, 1968.

HAN S.B., S.H. PARK, Y.J; JEON, Y.K. KIM, H.M. KIM AND K.H. YANG. Prodigiosin blocks T cell activation by inhibiting interleukin 2Ra expression and delays progression of autoimmune diabetes and collagen- induced arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 299: 415-425, 2001.

HO T.F, PENG Y.T, CHUANG S.M, LIN S.C, FENG B.L, LU C.H, YU W.J, CHANG J.S, CHANG C.C. Prodigiosin down-regulates survivin to facilitate paclitaxel sensitization in human breast carcinoma cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009, 235: 253-60.

HOLT, G.J; KRIEG, N.R; SNEATH, P.H.A; STALEY, J.T; WILLIAMS, S.T. “ *Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*”. Ninth ed., Willimans & Wilnks ed. Baltimore, USA., 1994.

HORNG, YU-T; CHANG, K-C; LIU, Y-N; LAI, H-C; SOO, P-C. The RssB/RssA two-component system regulates biosynthesis of the tripyrrole antibiotic, prodigiosin, in *Serratia marcescens*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2010

HUBBARD,R; RIMINGTOM, C. The biosynthesis of prodigiosin, the tripyrrulmethene pigment from *Bacillus prodigiosus (Serratia marcescens)*. *Biochemil. J.* vol 46(2): 220-5, 1950.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). *Microrganismos de los alimentos. Su significado y métodos de enumeración.* 2. ed. Zaragoza: Editorial Acribia,. p.147-150, 2000.

ISAKA, M., JATURAPAT, A., KRAMYU, J., TANTICHAROEN, M., THEBTARANONTH,Y. Potentin vitro antimalarial activity of metacycloprodigiosin isolated from *Streptomyces spectabilis* BCC 4785. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* vol 46, 1112–1113, 2002.

JEONG, H; YIM J.H; LEE, C; CHOI, S.H; PARK, Y.K; YOON, S.H; HUR, C.G; KANG, H.Y; KIM, D; LEE, H.H; PARK, K.H; PARK S.H; PARK, H.S; LEE, H.K; OH, T.K; KIM, J.F. Genomic blueprint of *Hahella chejuensis*, a marine microbe producing an algicidal agent. *Nucleic. Acids. Res.* vol 33-(22): 7066-73, 2005.

JUNGDON. B; HYUNSOO. M; KYEONG-KEUN. O; CHANG-HO. K; DAE. S.L; SEUNG. W.K; SULK-IN. H. A novel bioreactor with an internal adsorbent for integrated fermentation and recovery of prodigiosin like pigments produced from *Serratia* sp. *Biotechnol Letts,* vol 23:1315-1319, 2001.

LEEPER, F. J. & SALMOND, G. P. Disruption of the copper efflux pump (CopA) of *Serratia marcescens* ATCC 274 pleiotropically affects copper sensitivity and production of the tripyrrole secondary metabolite, prodigiosin. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 151–158, 2006.

LUZ-ALVES, W.C; GORAYEB, IS; SILVA, J.C.L; LOUREIRO, E.C.B. Bacteria transported by horseflies (Diptera: Tabanidae) in the northeast of Pará State, Brazil. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Ciências Naturais,* Belém, v. 2, n. 3, p. 11-20, set-dez. 2007.

KALIVODA E.J, STELLA N.A, ASTON M.A, FENDER J.E, THOMPSON P.P, KOWALSKI R.P, SHANKS R.M. Cyclic AMP negatively regulates prodigiosin production by *Serratia marcescens*. *Res Microbiol*. 2010.

KWON S.K, PARK Y.K, KIM J.F. Genome-Wide Screening and Identification of Factors Affecting Prodigiosin Biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 1:1468-09.

KAWAUCHI, K; SHIBUTANI, K; YAGISAWA, H; KAMATA, H; NAKATSUJI, S; ANZAI, H; YOKOYAMA, Y; IKEGI, Y; MORIYAMA, Y; HIRATA, H. A possible immunosuppressant, cycloprodigiosin hydrochloride, obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans*. *Biochemic. Biophys Res Commun.* vol 237(3): 543-7, 1997.

KHANAFARI, A; ASSADI, M.M; FAKHR, F.A. Review of Prodigiosin, Pigmentation in *Serratia marcescens*. *Online Journal of Biological Sciences.* vol 6 (1): 1-13, 2006.

KERR, J.F.R., C.M. WINTERFORD, B.V. Harmon. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 73: 2013-2026, 1994.

KIM S.J, LEE H.K, YIM J.H. Statistical optimization of medium components for the production of prodigiosin by *Hahella chejuensis* KCTC2396. *J Microbiol Biotechnol.* 2009, 18:1903-7.

KIM, H.S; HAYASHI, M; SHIBATA, Y; WATAYA, Y; MITAMUTA T; HORII, T; KAWAUCHI, K; HIRATA, H; TSUBOI, S; MORIYAMA Y. Cycloprodigiosin hydrochloride obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans* is a potent antimalarial agent. *Biol. Pharm. Bull.* vol 22(5): 532-4, 2008.

KOBAYASHI N, ICHIKAWA Y. Separation of the prodigiosin-localizing crude vesicles which retain the activity of protease and nuclease in *Serratia marcescens*. *Microbiol Immunol.* vol 35:607-14, 1991.

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

MEISS G, FRIEDHOFF P, HAHN M, GIMADUTDINOW O, PINGOUD A. Sequence preferences in cleavage of dsDNA and ssDNA by the extracellular *Serratia marcescens* endonuclease. *Biochemistry.* vol 34:11979-88, 1995.

MERLINO, C.P; BARTOLOMEO BÍZIO`S. Letter to the most Eminent priest, Angelo Belani, Concerning the phenomenon of the red colored polenta. *Journal Bacteriology*, v. 9, n.6, p. 527-43, 1924.

MONTANER, B; NAVARRO, S; PIQUÉ, M; VILASECA, M; MARTINELL, M; GIRALT, E; GIL, J; PERÉZ-TÓMAS, R. Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *Br J. Pharmacol.* vol 131(3):585-93, 2000.

MONTANER, B; CASTILLO-AVILA, W; MARTINELL, M; OLLINGER, R; AYMAMI, J; GIRALT, E; PÉREZ-TOMÁZ, R. DNA interaction and dual topoisomerase I and II inhibition properties of the anti-tumor drug prodigiosin. *Toxicol. Sci* vol 85(2):870-9, 2005.

MORAES, C.S; SEABRA, S.H; CUNHA-ALBUQUERQUE, J.S; CASTRO, D.P; GENTA, F.A; SOUZA, W; BRAZIL, R.P; GARCIA, E.S; AZAMBUJA, P. Prodigiosin is not a determinant factor in lysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* after interaction with *Serratia marcescens* D-mannose sensitive fimbriae. *Experimental Parasitology*. 122: 84-90, 2009.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S; PFALLER, M. A; *Microbiologia media*. Washington D. C.: American Society of Microbiology Press, 1999.

NAKASHIMA, T; KURACHI, M; KATO, Y; YAMAGUCHI, K; ODA, T. Characterization of bacterium isolated from the sediment Coastal area of Omura Bay in Japan and several biological activities of pigment produced by this isolated. *Microbiol. Immunol*, 49 (5): 407-415, 2005.

NAKASHIMA, T; KURACHI, M; KATO, Y; YAMAGUCHI, K; ODA, T. Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium *γ-proteobacterium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* vol 73(3): 684-90, 2006.

NOBUTAKA, S., N. MASAMI, H. KAZUYUKI, H. TADAAKI A. Katsumi. Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by biocontrol bacterium, *Serratia marcescens* strain B2 against gray mold pathogen, *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Plant Pathol.*, 67: 312-319, 2001

PANDEY R, CHANDER R, Sainis KB. Prodigiosins as anti cancer agents: living upto their name. *Curr Pharm Des.* 2009, 15:732-41.

PASTA, A.A.C; FRAÇÃO, F.H.A; MAGALHÃES, G.L.G; QUESADA, R.M.B. Prevalência e Perfil de Susceptibilidade antimicrobiana em cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β-lactamases de espectro estendido (ESBL), isoladas de pacientes do Hospital Universitário/Uel. *RBAC*, 40(2): 137-141, 2008.

PEREIRA, S.C.L; Caracterização molecular e de fatores de virulência de *Klebsiella* spp. Isolada de diestas enterais. (Dissertação submetida a Universidade Federal de Viçosa), 2001.

PEREIRA, A. L; PITA, J. R. Alexander Fleming (1881-1955), da descoberta da penicilina (1928) ao premio Nobel (1945). *Revista da faculdade de letras e história*, Vol 6, p 129-151, 2005.

PRYCE L. H, SARAH J, PRATIK P, SARAH B, KAORI K, JOAN N. POWELL AND AMBER L. Prodigiosin pigment of the bacterium *Serratia marcescens* may function to spill excess cellular energy. *Journal of the Alabama Academy of Science* 2009, 36:124-4023.

RAMOS, S.C.S; OLIVEIRA, J.C.S; CAMARA, C.A.G; CASTELLAR, I; CARVALHO, A.F.F.U; LIMA-FILHO, J.V. Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 19(2A): 376-381, 2009.

REISSBRODT, R; RABSCH, W. Further differentiation of *Enterobacteriaceae* by means of siderophore-pattern analysis. *Zentbl Bacteriol . Microbiol. Hyg. Ser. A*, v. 268, p. 306-317, 1988.

REIS, M. O. R. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcolólico das folhas de *Persea gratissima* Gaertn – ABACATEIRO (*Lauraceae*). Dissertação submetida a Universidade de Franca. 2006.

RIBEIRO, C. M. Avaliação da atividade microbiana de plantas utilizadas na medicina popular da Amazônia. Dissertação submetida à universidade do Pará. 2008.

RJAZANTSEVA IN, ANDREEVA IN, OGORODNIKOVA TI. Effect of various growth conditions on pigmentation of *Serratia marcescens*. *Microbios*. vol 79:155-61, 1994.

RODRIGUES, A.P; HOLANDA A. R. M; LUSTOSA, G. P; NÓBREGA, S. M. B; WILLMA J; LUCIANA B. S; COUTINHO H. D. M. Virulence Factors and Resistance Mechanisms of *Serratia marcescens*. *Acta. Microbiol. Let. Immunool Hungarica*. vol 53(1):89-93, 2006.

SANDOC, J. A. T.; WITHERDEN, I. R.; COVE, J. H.; HERITAGE, J.; WILCOX, M. H. "Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medicaldevice-related infection potential in vivo" *J. Med. Microbiol.*, v. 52, p. 547-550, 2003.

SOARES, V.S; HERNANDES, S.E.D; OGASSAWARA, R.L.N; KWABARA, H.N; GARCIA, L.BE CARDOSO, C.L. Remoção de *Serratia marcescens* (*Enterobacteriaceae*) das mãos pelo uso de diferentes agentes degermantes. *Acta Scientiarum*. v. 24, n. 3, p. 719-725, 2002.

SOMEYA, N; NAKAJIMA, M; HAMAMOTO, H; YAMAGUCHI, I AND AKUTSU, K. Effects of light conditions on prodigiosin stability in the biocontrol bacterium *Serratia marcescens* strain B2. *J. Gen. Plant Pathology*. 70(6): 367-370, 2004.

SHUN-YA N. AND YOICHI H. Prodigiosin biosynthesis gene cluster in the roseophilin producer *Streptomyces griseoviridis*. *The Journal of Antibiotics*. 2009, 62: 271–276.

STEPKOWSHI, S.M; ERWIN-COHEN, R.A; BEHBOD, F; WANG, M.E; QU, X; TEJPAL, N; NAGAY, Z.S; KAHAN, B.D; KIRKEN, R.A. Selective inhibitor of Janus tyrosine kinase 3, PNU156804, prolongs allograft survival and acts synergistically with cyclosporine but additively with rapamycin. *Blood*. vol 99(2): 680-9, 2002.

THOMSON, N.R; GROW, M.A; MACGOWAN, S.J; COX, A.& SALMOND, G.P. Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Mol. Microbiol*. vol 36: 539-556, 2000.

TOMLINSON, J.T; PARK, G; JACOB A. M; GREGORY L. K; KEVIN H; RICHARD A. M. Photoinduced Cytotoxicity and Thioadduct Formation by a Prodigiosin Analogue. *Organic Letters* vol. 8, No. 21; 4951-4954, 2006.

TUNCA S, BARREIRO C, COQUE JJ, MARTÍN JF. Two overlapping antiparallel genes encoding the iron regulator DmdR1 and the Adm proteins control siderophore [correction of sedephore] and antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Febs J*. 2009, 276:4814-27.

TRUDEL, S; LI, Z.H; RAUW, J; TIEDEMANN, R.E; WEN, X.Y; STEWART,A.K. Pre-clinical studies of the pan-Bel inhibitor obatoclax (GXO15-070) in multiple myeloma. *Blood*. vol 109(12): 5430-8, 2007.

VAN HOUDT, R., GIVSKOV, M., MICHIELS, C.W. Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiology Reviews* 31, 407–424, 2007

VASCONCELOS, F.F; MENEZES, E.A; CUNHA, F.A; SALVIANO, M.N.C; FERREIRA, M.R; ÂNGELO & OLIVEIRA, I.R.N. Perfil de resistência da bactéria da espécie *Serratia marcescens* isolada de infecções hospitalares no Hospital Geral de Fortaleza (H.G.F.)*. *RBAC*, vol. 38(1): 35-37, 2006.

XU D, KIM T.J, PARK Z.Y, LEE S.K, YANG S.H, KWON H.J, SUH J.W. A DNA-binding factor, ArfA, interacts with the bldH promoter and affects undecylprodigiosin production in *Streptomyces lividans*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009, 379: 319.

ZHOU, W; JIN, ZHI-XIONG AND WAN, YONG-JI. Apoptosis of human lung adenocarcinoma A549 cells induced by prodigiosin analogue obtained from an entomopathogenic bacterium *Serratia marcescens*. *Applied Microbiology And Biotechnology* Volume 88, Number 6, 2011.

WAI, Y.H & CHEN, W.C. Enhanced production of prodigiosin-like pigment from *Serratia marcescens* SMΔR by medium improvement and oil-supplementation strategies. *J of Biosc. And Bioeng.* 99(6): 616-622, 2005.

WASSERMAN HH, PETERSEN AK, XIA M, WANG J. Pyrrole-singlet oxygen reactions leading to a,a'-bipyrroles. Synthesis of prodigiosin and analogs. *Tetrahedron Lett.* vol 40:7587-89, 1999.

WEI. H.Y; CHEN. C.W. Enhanced production od prodigiosin-like pigment from *Serratia marcescens* SMΔR by medium improvement and oil-supplementation strategies. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* vol 99: 616-622, 2005.

WEI, J. R. et al. A mobile quorum-sensing system in *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.* 188, 1518–1525, 2006.

WILLIAMNS, R. P & QUADRI, S.M.H. The pigments of *Serratia*. In “ The Genus *Serratia*”. (Eds Von Graevenitz, A, and Rubin, S.J, Boca Raton, F.L. CRC Press Inc): 31-75, 1980.

WILLIAMSON, N.R; FINERAM, P.C; LEEPER, F. J; SALMOND, G.P.C. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines. *Nat. Rev. Microbiol.* vol 4(12): 887-99, 2006.

YAMAMOTO, C; TAKEMOTO, H; KUNO, K; YAMAMOTO, D; BANDEN, T; KAMATA, K; HIRATA, H. WATANABE, T; INOUE, K. Cycloprodigiosin hydrochloride, a H⁺/Cl⁻ symporter, induces apoptosis in human color cell cancer lines *in vitro*. *Onc. Rep* vol 8(4): 821-4, 2001.

**UNDECILPRODIGIOSINA PRODUZIDA POR UMA NOVA
LINHAGEM DE *Serratia marcescens* UCP 1549 EM
FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Manuscrito a ser submetido para publicação
no periódico **Research Microbiology**

UNDECILPRODIGIOSINA PRODUZIDA POR UMA NOVA LINHAGEM DE *Serratia marcescens* UCP 1549 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Jeanne C. L. Lins ¹, Carla C. S. Maciel ², Alícia M. A. T. Jará, Haroudo S. Xavier, Carlos Alberto A. da Silva, *Galba Maria de C. Takaki.

*Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais- NPCIAMB, Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Católica, 50.050-900, Recife PE, Brasil.

*Correspondência do autor: e-mail: takaki@unicap.br, Fone: +55 81 21194017

Resumo

Neste trabalho foi investigada a produção de pigmento da família da prodigiosina por uma nova linhagem de *Serratia marcescens* UCP 1549 em fermentação em estado sólido nos meios convencionais Peptona glicerol e Manitol e meios alternativos (arroz, gergelim e amendoim, adicionados de ágar), 28^o C, durante 48 horas de cultivo. A produção de pigmento foi observada apenas nos meios convencionais. O pigmento foi purificado por cromatografia de exclusão em Sephadex LH-20, obtendo-se 96 frações, as quais foram reunidas e caracterizadas por espectrofotometria e espectrometria de massa (GC-MS). Os resultados obtidos sugerem ser Undecilprodigiosina. A atividade citotóxica para *Artemia salina* demonstrou uma CL₅₀ igual a 78,33µg/mL. A fitotoxicidade para sementes de alface e pimentão inibiram a germinação das sementes a partir de concentrações superiores a 40µg/mL, apresentando mais de 50% de inibição. Os resultados obtidos sugerem alto potencial biotecnológica na produção de Undecilprodigiosina pela nova linhagem de *S. marcescens* UCP 1549, o meio Manitol por fermentação em estado sólido, além da modificação do processos de purificação, como promissores.

Palavra chave: *Serratia marcescens*, Undecilprodigiosina, Fitotoxicidade

1. Introdução

A prodigiosina é um pigmento vermelho produzido por bactérias Gram-negativas e bactérias Gram-positivas como *Actinomicetos* sp, *Serratia marcescens*, *Vibrio psychrorythrus*, *Pseudomonas magnesorubra*, *Alteromonas rubra* [1, 2, 11]. Prodigiosina pertence à família das prodigioninas que se caracteriza por apresentar uma estrutura tripirrólica linear, denominada de prodigiosinideo, comum a todos os membros pertencentes a esta família como o Undecilprodigiosina, Cicloprodigiosina, Metacicloprodigiosina, Dipirrolildipirrometano, dentre outros [4, 6, 12]. Este pigmento vem despertando um crescente interesse de diversas áreas do conhecimento, principalmente, a farmacologia por se

tratar de uma substância com atividade biológica como antibacteriana, antifúngica, antimalárica, antiprotozoário, e mais recentemente, como indutora da apoptose e antitumoral [3, 5, 9, 13]. A prodigiosina é um excelente imunomodulador em concentrações não tóxicas, enquanto que, os compostos químicos empregados nos tratamentos convencionais antitumorais são tóxicos para as células saudáveis. Além disso, tem sido comprovado que as prodigiosinas apresentam efeito positivo para o aumento das chances de sobrevivência de camundongos submetidos a transplantes de coração [7, 8, 10, 14].

Neste sentido, neste trabalho foi realizada a produção de prodigiosina por uma nova linhagem de *Serratia marcescens* (UCP1549), isolada de solo do semi-árido, utilizando meios convencionais de produção como Meio Manitol e Peptona Glicerol bem como, os meios naturais alternativos Caldo de farinha de arroz (CArr), Caldo de farinha de gergelim (CG) e Caldo de farinha de amendoim (CA). Estudos foram realizados com o isolamento, caracterização química e avaliação da citotoxicidade da prodigiosina para *Artemia salina* e sementes de Alface (*Lactuca sativa*) e pimentão (*Capsicum annuum*).

2. Material e Métodos

2.1 Microorganismo

O microrganismo *Serratia marcescens* UCP 1549, empregado como produtor de prodigiosina, foi isolado de solo de bananeiras do semi-árido de Pernambuco Brasil sendo gentilmente cedido pela coleção de cultura pertencente ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco, tendo registrado no Federation Culture Collection-FCC. A bactéria foi mantida em Ágar Nutriente a 5°C.

2.2 Substratos

Foram utilizados como substratos agroindustriais farinha de arroz, farinha de gergelim e farinha de amendoim, adquiridos de indústrias de alimentos naturais e de qualidade alimentar. Alface Crespa (*Lactuca sativa*) e sementes de Pimentão Cascadura (*Capsicum annuum*) foram adquiridas da marca Topseed Garden, Brasil.

2.3 Drogas, solventes orgânicos e reagentes

As drogas, solventes orgânicos e reagentes foram todos de qualidade analítica e cromatográfica, de procedência Merck.

2.4 Condições de Cultivo

Serratia marcescens foi inoculada em Erlenmeyers (250mL) contendo 100mL do meio Caldo Nutriente (Peptona 10g; NaCl 5 g; Extrato de Levedura 3 g/ L) e incubada a 28°C por 24h a 150rpm. A produção do pigmento se procedeu utilizado meio sólido (20mL) em placas de Petri (100 x 95mm) contendo *S. marcescens* (2mL). Os meios de produção empregados foram Peptona glicerol *PG* (Peptona 10g, Glicerol 10%), o meio Manitol *MM* (Peptona 5g, Extrato de levedura 2g, Manitol 20g); Caldo de farinha de amendoim *CA* (Farinha de amendoim 40g); Caldo de farelo de arroz *CArr* (Farelo de arroz 40g) e Caldo de farinha de gergelim *CG* (Farinha de gergelim 40g) adicionados de 17g de Agar em g/L, tendo o pH igual a 7 e incubadas a 28°C por 48 horas. Após esse período, a biomassa foi removida delicadamente da superfície e transferida para vidro de relógio, previamente pesado, onde foi estimada a quantidade de biomassa expressa em g/L.

2.5 Extração da prodigiosina

O pigmento obtido foi extraído das células usando os sistemas de orgânicos: Clorofórmio : Metanol nas proporções (2:1; 1:1 e 1:2 v/v), sendo ao final extraído com Metanol. Posteriormente, os filtrados obtidos foram reunidos e concentrados empregando evaporador rotatório à temperatura de 45°C, sendo obtido o extrato bruto de prodigiosina [32, 33].

2.6 Purificação da prodigiosina

O extrato bruto de prodigiosina foi dissolvido em 3 mL de metanol, submetido a cromatografia de exclusão (coluna 22 x 1cm), preenchida com Sephadex LH-20, como adsorvente. O processo de eluição foi realizado usando Clorofórmio : Metanol : Acetato de etila (5:30:65 v/v) [32, 33]. A modificação do sistema de solvente foi Clorofórmio : Metanol : Acetona (4 : 2: 3 v/v), tendo sido coletadas 96 frações de 10 mL. As frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se placas de alumínio de sílica gel, sendo submetidas ao mesmo sistema de solvente (Clorofórmio : Metanol :

Acetona 4 : 2: 3 v/v), visando uma possível separação dos produtos. Em seguida foi determinado o valor de referência *Rf* das frações. Com a confirmação de uma só substância as frações foram reunidas, correspondendo ao pigmento vermelho purificado.

2.7 Caracterização da prodigiosina

A caracterização do pigmento foi realizada por espectrofotometria numa faixa de 200–700nm, em clorofórmio como solvente. A espectrometria de massa tipo GCMS, deve ser utilizada quando se conhece o espectro de massa do composto, no caso a prodigiosina e seus derivados, de acordo com a literatura [28, 43]. Em seguida foi realizada uma busca computadorizada na biblioteca de correspondência de valores *m/z* e seus respectivos compostos já cadastrados. A coincidência dos espectros de massas foi utilizada para evidenciar a provável estrutura do composto produzido por *S. marcescens*.

2.8 Avaliação da Toxicidade

O teste de toxicidade para *Artemia salina* foi realizado em três etapas: incubação, exposição a substância e contagem do número de náuplios vivos e mortos após exposição ao composto em 48 horas [39]. Inicialmente, os ovos de *A. salina* foram transferidos para um recipiente contendo 100mL de solução marinha e incubados a temperatura de 30°C por 24 horas. Após este período onde ocorreu a eclosão das larvas (náuplios) de *A. salina*, 10 náuplios foram transferidos para frascos de 5mL de volume, contendo uma solução da prodigiosina nas concentrações de 100, 50, 20, 5 e 2,5 µg/mL sendo incubados a 30°C por 48 horas. Após este período, foi contabilizado o número de náuplios vivos e mortos e determinado o valor da concentração letal CL₅₀, utilizando o programa estatístico PROBIT.

Testes foram realizados para avaliar a fitotoxicidade para sementes de alface crespa (*Lactuca sativa*) e pimentão cascadura (*Capsicum annuum*). O teste baseia-se na observação de três variáveis: a porcentagem de sementes germinadas (SG%), a porcentagem de crescimento das raízes (CR%) e a porcentagem do índice de germinação (IG%) de sementes de espécies de plantas empregadas como padrões como Alface Crespa (*Lactuca sativa*) e sementes de Pimentão Cascadura (*Capsicum annuum*) [44]. Inicialmente as sementes foram lavadas com

água destilada estéril e desinfetadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% e novamente lavadas para retirada do excesso de hipoclorito. Em seguida, as sementes lavadas foram em número de dez sementes foram transferidas para placas de Petri estéreis contendo papel filtro umedecidas nas soluções de concentrações de 100, 50, 20, 5 e 2,5µg/mL, sendo incubadas a 28°C por 120 horas. Após este período foi avaliado o número de sementes germinadas (SG %), o tamanho de crescimento das raízes (CR%) e o índice de germinação (IG%), sendo todo o experimento realizado em triplicata.

3. Resultados

3.1 Produção da prodigiosina

Em 48 horas de cultivo obteve-se 48,50 g/L de biomassa em MM e 17,50 g/L de biomassa em PG. Contudo, o mesmo não foi observado para meios alternativos como Caldo de farelo arroz com 3.74 g/L, Caldo de farelo de amendoim com 2.36 g/L e Caldo de farelo de gergilim com 1.13 g/L de biomassa demonstrando que nestes meios, os valores de biomassa obtidos foram inferiores quando comparados aos meios convencionais (Tabela 1).

A máxima produção de pigmento bruto ocorreu em MM com 1.2 g/g, seguido do PG com 1.0 g de pigmento bruto /g de biomassa. Todavía não sendo observada produção de pigmento nos meios alternativos (Tabela 2).

3.2 Extração, purificação e caracterização da prodigiosina

Foram extraídos 660 mg/g do pigmento purificado produzido em MM sendo obtido durante o processo de purificação cerca de 150 mg/g do pigmento total purificado, que correspondeu a fração azul. A fração vermelha isolada das células de *S. marcescens* crescida em meio PG purificada correspondeu a 370 mg/g do pigmento.

O pigmento isolado foi identificado por espectrometria (200 - 700nm) onde a fração vermelha apresentou máxima absorção a 533nm e a fração azul a 206nm respectivamente (Figura 1 A e B). Após a purificação foram determinados por cromatografia em camada delgada (CCD) os valores de referência (*R_f*) para a fração vermelha (*R_f* 0,59) e azul (*R_f* 0,22),

respectivamente sendo os dados obtidos confirmados com os dados descritos para prodigiosina identificada descrita na literatura [26]. A caracterização do pigmento foi feita por espectrometria em massa- GCMS, onde o peso molecular da fração vermelha produzida nos meios MM e PG correspondeu a 392.3m/z (Figura 2 e Tabela 3).

3.3 Avaliação da toxicidade

O pigmento vermelho testado apresentou toxicidade para *A. salina* superior a 78,33µg/mL ($CL_{50} = 78,33\mu\text{g/mL}$), com nível de significância (0,05), o que confere 95% de confiabilidade dos dados obtidos.

Foram observados resultados tóxicos para as sementes de alface e pimentão (Tabela4). O Índice de Germinação (IG) das sementes de alface obtido na concentração de 100µg/mL correspondeu a 44,5% e para sementes de pimentão foi de 0%, representando alta toxicidade para estas sementes. Em concentrações de 50µg/mL, observou-se também, um aumento na porcentagem do índice de germinação (IG) para as sementes de alface com 86,1%, sendo o máximo (IG) obtido de 93,6% na concentração de 2,5µg/mL. Contudo, em concentrações mais baixas de 50µg/mL o Índice de Germinação obtido para sementes pimentão foi de 49%, o que representa para estas sementes, inibição em mais de 50%. Foi observado também que as sementes de pimentão cascadura apresentaram maior sensibilidade ao pigmento, com índice de germinação abaixo de 50% igual a 43,5 em comparação as sementes de alface.

4. Discussão

A produção da prodigiosina seguiu a metodologia já descrita onde os meios de cultura convencionais utilizados neste trabalho (Tabela1) proporcionaram ao microorganismo fonte de carbono necessária para a sua multiplicação, obtendo máximo rendimento de biomassa produzida em 48horas [18]. Foram observados baixos rendimentos para os meios alternativos empregados na produção da prodigiosina. A fase de crescimento inicial, que antecede a fase propriamente dita de produção do pigmento, pode interferir na produção do pigmento e

conseqüentemente do máximo rendimento obtido [20]. A máxima produção de prodigiosina ocorre na presença de luz, sendo estas observações confirmadas no trabalho realizado [19].

Pigmentos ativos sintetizados por processos bacterianos apresentam potencial atividade medicinal [15]. Muitos estudos têm sido desenvolvidos em busca do melhoramento da produção desses metabólitos por bactérias como ajuste da temperatura, tempo de agitação e crescimento do microorganismo em diferentes meios de cultura [16,17].

Foi observado um rendimento máximo de prodigiosina de 0.52mg/mL a 28°C em meio convencional Ágar nutriente e nos meios alternativos como Caldo de farinha de arroz, amendoim e gergelim não obteve produção de prodigiosina [19].

Em bioreator utilizando meio de cultura contendo dextrose obteve-se um rendimento de 13mg /mL de pigmento produzido e ainda em meio contendo etanol como fonte de carbono foi obtido 3mg /mL [22, 23]. Todavia a máxima obtenção foi de 0.69mg /mL em meios alternativos suplementados com ácido oléico [24].

A extração do pigmento com soluções ácidas e básicas não eliminam impurezas presentes, mesmo após a purificação por cromatografia [25]. Neste sentido, a metodologia utilizada para a purificação foi descrita por [26]. Foi observada após o processo de purificação a separação de uma fração. Esta fração azul é produzida em uma das rotas biossintéticas paralelas que formam o monopirrol MAP e o bipirrol BMC, ambos precursores da prodigiosina, cujas rotas biossintéticas se convergem para formar os anéis tripirrólicos do pigmento [28]. Portanto, o pigmento purificado apresentou dados semelhantes à prodigiosina já descrita na literatura, correspondendo ao espectro de absorção e o *R_f*, da literatura [27].

Os resultados obtidos são confirmados pelas investigações já descritas na literatura [29]. A caracterização do pigmento foi feita por espectrometria em massa tendo os dados comparados com a literatura, o pigmento obtido com massa molecular de 392.3m/z é descrito como sendo a prodigiosina- Undecilprodigiosina, pertencente a família das prodigioninas, a qual apresenta atividade imunossupressora e antitumoral. Neste sentido, sugerimos que o

pigmento produzido, extraído e purificado neste trabalho, corresponde ao membro pertencente à família das prodigioninas [30].

A toxicidade para *Artemia salina* vem sendo realizada para avaliar os efeitos citotóxicos de compostos ou efluentes no meio salino [31]. Assim, os ensaios de toxicidade vêm sendo realizados com microcrustáceo *A. salina* por ser considerado um bioindicador ambiental bastante sensível a qualquer composto tóxico ambiental [32]. Neste sentido foram avaliados os efeitos tóxicos considerando três parâmetros: toxicidade baixa ou ausente quando a toxicidade for maior que 250µg/mL, toxicidade moderada quando a CL₅₀ for maior que 80 e menor que 250µg/mL, e alta toxicidade quando a CL₅₀ for inferior a 80µg/mL. Quanto menor for o valor da CL₅₀ em 48 horas, mais tóxico será o composto frente a um organismo teste, e maior é a atividade citotóxica, sugerindo maior potencial como antitumoral [34].

A Undecilprodigiosina-prodigiosina isolada de *S. marcescens* apresenta significativa toxicidade aguda frente á *A. salina*, em concentrações mais elevadas, quando comparada ao Lapachol, que é uma droga de referência (CL₅₀=68mg/mL) [35]. Contudo, quando comparada ao complexo de ferro 2-formilpiridina p-toluiltiossemicarbazona [Fe(H₂Fo₄pT)Cl₃], que é um complexo considerado muito ativo, cuja CL₅₀= 0,94, sugerindo-se que o pigmento isolado possa apresentar uma potente atividade antitumoral, de acordo com a literatura [35]. Os dados descritos na literatura sugerem o efeito antitumoral e apoptótico da prodigiosina, Cicloprodigiosina e Undecilprodigiosina para algumas linhagens de células cancerígenas, como carcinoma hepático (BEL-7404), células leucêmicas promielocíticas humanas (HL60) e embrionárias de camundongos (NIH-3T3) [37-40]. Desta forma, com base nos dados descritos pela literatura o pigmento vermelho correspondente a Undecilprodigiosina, produzido, isolado e caracterizado neste trabalho, sugere-se que o mesmo possa apresentar também atividade antitumoral, a qual será avaliada em trabalhos futuros.

A toxicidade para a germinação de sementes de alface crespa (*Lactuca sativa*) e de outras sementes, como pimentão cascadura (*Capsicum annuum*), representa um modelo

amplamente utilizado para investigar o potencial aleloquímico de substâncias químicas, e ou de extratos de plantas sobre outros organismos [38]. Pela significativa importância econômica que estas duas espécies de plantas representam para o mercado agroindustrial brasileiro, foram avaliados os efeitos fitotóxicos do pigmento Undecilprodigiosina isolado de *S. marcescens* em sementes de alface crespo e pimentão (Tabela 4).

Sabe-se que quanto mais próximo de 100% for o índice de germinação (IG), menor será o efeito tóxico que o composto apresenta [40], sendo observado em concentrações de 50µg/mL aumento na porcentagem do índice de germinação (IG) para as sementes de alface com 86,1%, sendo o máximo (IG) obtido de 93,6% na concentração de 2,5µg/mL demonstrando que, quanto mais baixa for a concentração de prodigiosina, maior será o Índice de Germinação obtido e menor será o efeito tóxico causado pelo pigmento a estas sementes.

Em adicional, o pigmento prodigiosina foi considerado tóxico para sementes de alface e pimentão quando comparado com o composto químico descrito na literatura, o ácido bórico que é uma substância tóxica que em concentrações elevadas de 80µg/mL, torna-se altamente tóxico as sementes de alface e pimentão, inibindo o crescimento e germinação destas sementes [40]. Foi observado ainda que as sementes de pimentão cascadura apresentam maior sensibilidade para alguns compostos químicos, sendo alvo de pesquisas que visam o melhoramento da semeadura destas sementes [41].

Logo o pigmento vermelho produzido em Meio Manitol em estado sólido por uma nova linhagem de *Serratia marcescens* (UCP 1549) demonstrou ser a Undecilprodigiosina por espectrofotometria e espectrometria de massa. O isolamento e purificação do pigmento permitiram isolar e identificar a biomolécula Undecilprodigiosina. A atividade citotóxica da biomolécula é moderada para *Artemia salina*, contudo é alta para sementes de alface crespa e pimentão cascadura na concentração mais alta. Os dados obtidos neste trabalho demonstram o potencial promissor da biomolécula Undecilprodigiosina produzida por *S. marcescens* UCP1549.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao suporte financeiro do CNPq, FACEPE e a CAPES pela bolsa de Mestrado concedida.

6. Referências

1. Hejazi A and Falkner F.R. *Serratia marcescens*. *Journal Med. Microbiol.* 1997; 46:903-912.
2. Giri A, Anandkumar G, Muthukumaran G and Pennathur. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *serratia marcescens* isolated from soil. *Bmc microbiology*. 2004; 4:11.
3. Carbonell T, Della colleta T, Yano A, Darini C, Levy and Fonseca B. Clinical relevance and virulence factors of pigmented *Serratia marcescens*. *Immunol. Microbiol.* 2000; 28:143-149.
4. Ding M *et al.*, 1983. Biosynthesis of prodigiosin by white strain of *Serratia marcescens* isolated from patients. *J. Clin. Microbiol.* 17:476-80.
5. Pryce L and Terry F. Spectrophotometric assay of gene expression: *Serratia marcescens* pigmentation. *Bioscience*. 2000; 26:3-13.
6. Chang S, Sanada M, Johdoo O, Otha S, Nagamatsu Y, Yoshimoto A. High production of prodigiosin by *Serratia marcescens* grown on ethanol. *Biotechnol Lett.* 2000; 22: 1761-1765.
7. Solé M, Francia A, Rius and Lorén J. The role of pH in the “glucose effect” on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Lett. Appl. Microbiol.* 1997; 25:81-84.
8. Kim, H, Hayashi M, Shibata Y, Wataya Y, Mitamuta T, Horii T, Kawauchi K, Hirata H, Tsuboi S, Moriyama Y. Cycloprodigiosin hydrochloride obtained from *Pseudoalteromonas denitrificans* is a potent antimalarial agent. *Biol. Pharm. Bull.* 2008; 22: 532-4.
9. Kim C, Sung-Ho and Suk-In. Isolation and Characteristics of prodigiosin like red pigment produced by *Serratia* sp. KH-95. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998; 26: 238-289.
10. Gerber N. Prodigiosin-like pigments. *Rev Microbiol.* 1975a; 3: 469-85.
11. Rowan S and Fisher D. Mechanisms of apoptotic cell death. *Leukemia*. 1997;11: 457-465.

12. Kerr J, Winterford C. Harmon. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 1994; 73: 2013-2026.
13. Montaner B, Navarro S, Piqué M, Vilaseca M, Martinell M, Giralt E, Gil J, Pérez-Tómas R. Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. *Br J. Pharmacol*. 2000; 131:585-93, 2000.
14. Han S, Park S, Jeon Y, Kim Y, Kim m and Yang K. Prodigiosin blocks T cell activation by inhibiting interleukin 2Ra expression and delays progression of autoimmune diabetes and collagen- induced arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2001; 299: 415-425.
15. Clift M, Thomson R. Development of a merged conjugate addition/oxidative coupling sequence. Application to the enantioselective total synthesis of metacycloprodigiosin and prodigiosin R1. *J Am Chem Soc*. 2009, 14;131:14579-83.
16. Campa's C. *et al.*, 2003. Prodigiosin induces apoptosis of B and T cells from B-cell chronic lunphocytic leukemia. *Leukemia*. 17:746-750.
17. Kalesperis G. *et al.*, 1975. Toxigenic studies with the antibiotic pigments from *Serratia marcescens*. *Can. J. Microbiol*. 21:213-20.
18. Azambuja P, Feder, Garcia E. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite *Trypanosoma cruzi* in the vector. *Experimental parasitology*. 2004;107: 89-96.
19. Baldino C, Parr J, Wilson C, Yohannes D, Wasserman H. *H. Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2006; 16: 701-704.
20. Azuma T, Watanabe H, Yagisawa H, Hirata M, Iwamura and Kobayashi Y. Induction of apoptosis of activated murine splenic T cells by cycloprodigiosin hydrochloride a novel immunosuppressant. *Immunopharmacology*. 2000; 46: 29-37.
21. Benenett J, Bentley R. Seeing red: the story of prodigiosin. *Adv. Appl. Microbiol*. 2000; 47: 1-32.
22. Díaz-Ruíz C, Montaner B, Pérez-Tomás R. Prodigiosin induces cell death and morphological changes indicative of apoptosis in gastric cancer cell line HGT-1. *Histol. Histopathol*. 2001;16: 415-21.
23. Fineran P, Slater H, Everson L, Hughes K and Salmond G. Biosynthesis of tripyrrole and β -lactam secondary metabolites in *Serratia*: integration of quorum sensing with multiple new regulatory components in the control of prodigiosin and carbapenem antibiotic production. *Mol. Microbiol*. 2005; 56:1495–1517.
24. Gerber N, Gauthier M. New Prodigiosin-like pigments from *Alteromonas rubra*. *Appl. Environ Microbiol*. 1970; 37:1176-9.
25. Goldschmidt M, Williams R. Thiamine-induced formation of the monopyrrole moiety of prodigiosin. *J Bacteriol*. 1968; 96:609-16.

26. Hubbard R, Rimington C. The biosynthesis of prodigiosin, the tripyrrulmethene pigment from *Bacillus prodigiosus* (*Serratia marcescens*). *Biochemil. J.* 1950; 46: 220-5.
27. Isaka M, Jaturapat A, Kramyu J, Tanticharoen M, Thebtaranonth Y. Potent in vitro antimalarial activity of metacycloprodigiosin isolated from *Streptomyces spectabilis* BCC 4785. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2002; 46:1112–1113.
28. Jeong H, Yim H, Lee C, Choi H, Park Y, Yoon S, Hur G, Kang H, Kim D, Lee H, Park K, Park S, Lee K, Kim J. Genomic blueprint of *Hahella chejuensis*, a marine microbe producing an algicidal agent. *Nucleic. Acids. Res.* 2005; 33: 7066-73.
29. Leeper, F. J. and Salmond, G. P. Disruption of the copper efflux pump (CopA) of *Serratia marcescens* ATCC 274 pleiotropically affects copper sensitivity and production of the tripyrrole secondary metabolite, prodigiosin. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33, 151–158, 2006.
30. Jungdon B, Hyunsoo M, Kyeong-Keun O, Chang-Ho K, Seung W, Sulk-in. A novel bioreactor with an internal adsorbent for integrated fermentation and recovery of prodigiosin like pigments produced from *Serratia* sp. *Biotechnol Letts.* 2001; 23:1315-1319.
31. Khanafari A, Assadi M, Fakhr A. Review of Prodigiosin, Pigmentation in *Serratia marcescens*. *Online Journal of Biological Sciences.* 2006; 6: 1-13.
32. Nakashima T, Kurachi M, Kato Y, Yamaguchi K, Oda T. Characterization of bacterium isolated from the sediment at Coastal area of Omura Bay in Japan and several biological activities of pigment produced by this isolated. *Microbiol. Immunol.* 2005; 49: 407-415.
33. Nakashima T, Myiazaki Y, Matsuyama Y, Muraoka W, Yamaguchi K and Tatsuya Oda. Producing mechanism of an algicidal compound against red tide phytoplankton in a marine bacterium *γ-proteobacterium*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* Vol 73, 2006
34. Ramos S, Oliveira S, Camara G, Castellar I, Carvalho U. Antibacterial and cytotoxic properties of some plant crude extracts used in Northeastern folk medicine. *Brazilian Journal of Pharmacognosy.* 2009; 19: 376-381.
35. Danielly A.C, Wemerson N.M, Igara O.L, Aline L. X, Vivian B, Machado C, Margareth F.F.M.D, Maria F. A, Leônia M.B and Maria F.V.S. First secondary metabolites From *Herissantia crispa* l (brizicky) and the toxicity activity against *Artemia salina* leach. *Quim. Nova,* 2009, 32: 48-50.
36. Moraes S, Seabra H, Cunha-albuquerque S, Castro P, Genta A, Souza W, Brazil P, Garcia S, Azambuja P. Prodigiosin is not a determinant factor in lysis of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* after interaction with *Serratia marcescens* D-mannose sensitive fimbriae. *Experimental Parasitology.* 2009; 122: 84-90.

37. Santos P.L.P.S, Pinto G.B, Takahashi J.A, Silva L.G.F, Boaventura M.A.D. Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). *Phytomedicine* 2003, 10:209.
38. Maybauer O. *et al.*, 2005. The importance of antibiotics in animal models of sepsis. 25th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine Brussels, Belgium. 21–25.
39. CETESB. São Paulo (1991). Água do Mar – Teste de Toxicidade Aguda com *Artemia*. Norma Técnica L5.021, São Paulo.
40. Santos P, Pinto G, Takahashi A, Silva L, Boaventura. Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test), *Phytomedicine*. 2003; 10, 209.
41. Montaner B, Castillo-avila W, Martinell M, Ollinger R, Aymami J, Giralt E, Pérez-tomáz, R. DNA interaction and dual topoisomerase I and II inhibition properties of the anti-tumor drug prodigiosin. *Toxicol. Sci.* 2005; 85: 870-9.
42. Ortega M.C, Moreno M.T, Ordovás J. *et al.*. Behaviour of different horticultural species in phytotoxicity bioassays of bark substrates. *scientia horticultrae*, 1996, 34: 2323-2329.
43. Davaraj N, Dharumaduari D, Noorudin T and Annamalai P. Production of prodigiosin from *Serratia marcescens* and its Cytotoxicityactivity. *Journal of Pharmacy Research*. 2009; 2: 590-593.
44. Tquia M, Tam Y and Hodgkiss J. Effects of composting on phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Envirol. Pollution*. 1996; 93: 249-256.

Meios de cultura	Biomassa (g / L)
Manitol (MM)	48.50
Peptona glicerol (PG)	17.50
Caldo de arroz (CArr)	3.74
Caldo de amendoim (CA)	2.36
Caldo de gergilim (CG)	1.13

Tabela 1. Produção de biomassa por *Serratia marcescens* (UCP 1549) em meios convencionais e alternativos a 28°C por 48 horas.

Meios de cultura	Prodigiosina em mg/L
Manitol (MM)	660
Peptona glicerol (PG)	350
Caldo de arroz (CArr)	---
Caldo de amendoim (CA)	---
Caldo de gergilim (CG)	---

Tabela 2. Produção de prodigiosina por *Serratia marcescens* (UCP 1549) em meios convencionais e alternativos a 28°C por 48 horas.

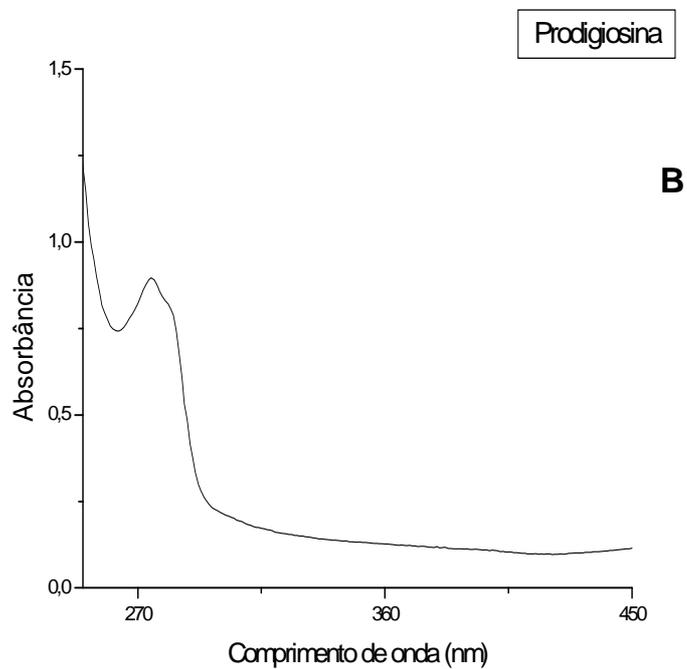
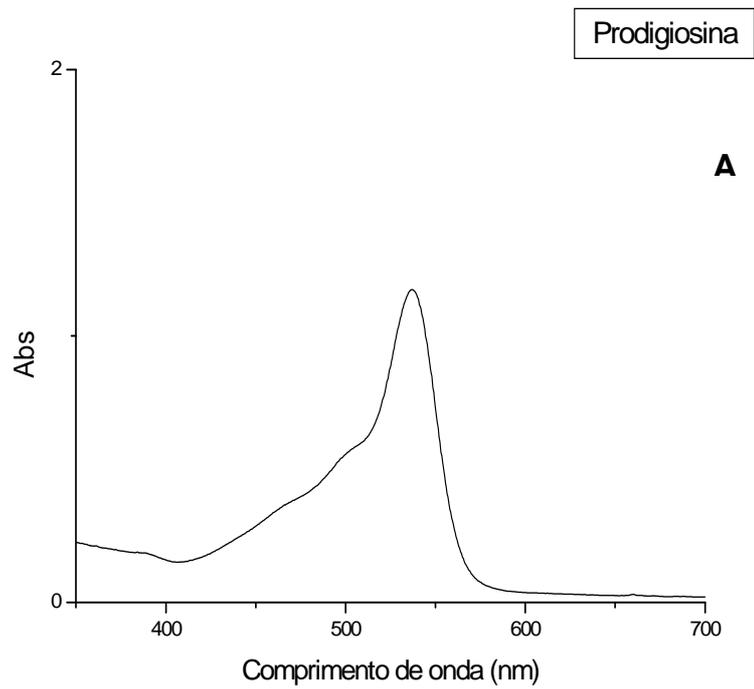


Figura 1. A e B. Espectro de absorção da fração vermelha e azul purificada com máxima absorbância em 533 nm e 206 nm respectivamente.

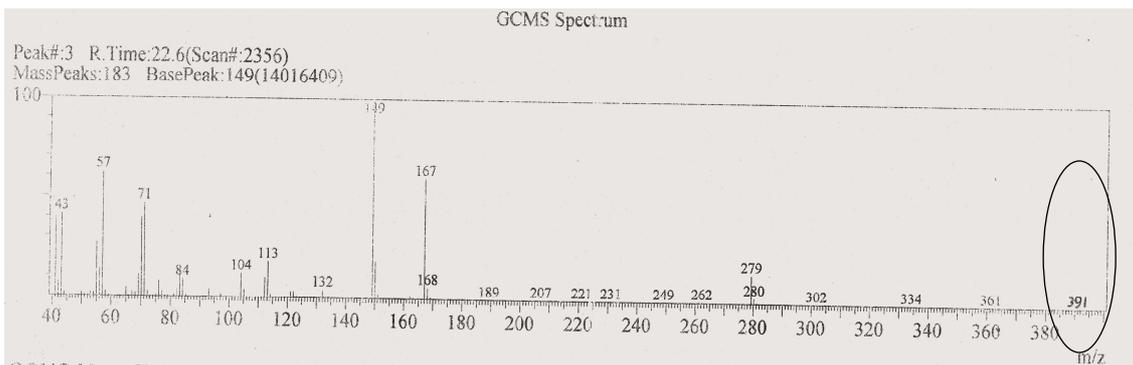


Figura 3. Espectrometria de massa da fração vermelha purificada produzida em meio Manitol.

Tabela 3. Massas Moleculares encontradas na biblioteca de correspondência de valores m/z para prodigiosinas e seus respectivos produtos

GCMS Mass Table										m/z	
R.Time:22.6(Scan#:2353)											
MassPeaks:182 BasePeak:149(13839299)											
#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.	#	m/z	Rel. Int.
1	41.05	38.66	47	90.05	0.04	93	142.20	0.01	139	203.05	0.03
2	42.05	6.79	48	91.10	0.36	94	143.15	0.03	140	204.15	0.02
3	43.05	41.41	49	92.05	0.24	95	144.25	0.03	141	207.10	0.08
4	44.05	1.88	50	93.05	3.66	96	145.15	0.03	142	208.25	0.03
5	45.00	0.15	51	94.10	0.30	97	146.15	0.07	143	209.10	0.02
6	46.95	0.01	52	95.10	0.31	98	147.10	0.17	144	216.15	0.03
7	50.00	1.72	53	96.15	0.14	99	149.15	100.00	145	217.40	0.01
8	51.00	0.83	54	97.15	1.23	100	150.10	20.01	146	221.15	0.07
9	52.00	0.33	55	98.20	0.13	101	151.15	2.02	147	222.10	0.03
10	53.00	2.03	56	99.10	0.04	102	152.15	0.17	148	223.25	0.01
11	54.05	1.97	57	100.05	0.02	103	153.15	0.01	149	229.60	0.01
12	55.00	26.22	58	101.00	0.04	104	155.30	0.02	150	231.15	0.05
13	56.05	13.61	59	101.40	0.02	105	157.10	0.06	151	232.40	0.02
14	57.05	64.32	60	102.05	0.02	106	158.05	0.03	152	233.50	0.01
15	58.05	3.02	61	104.05	11.20	107	158.50	0.02	153	235.40	0.01
16	59.00	0.22	62	105.10	3.97	108	159.15	0.03	154	237.80	0.01
17	60.15	0.01	63	106.15	0.31	109	160.05	0.02	155	241.20	0.02
18	61.15	0.01	64	107.05	0.07	110	161.05	0.11	156	245.20	0.01
19	62.10	0.01	65	108.25	0.01	111	162.10	0.81	157	249.15	0.03
20	63.00	0.11	66	109.15	0.02	112	163.10	0.52	158	250.40	0.01
21	64.00	0.17	67	110.15	0.22	113	164.15	0.09	159	253.40	0.01
22	65.05	4.37	68	112.15	10.10	114	165.15	0.14	160	259.40	0.01
23	66.05	0.46	69	113.20	17.38	115	167.10	59.37	161	261.20	0.39
24	67.05	2.31	70	114.20	1.43	116	168.10	5.76	162	262.20	0.30
25	68.10	1.71	71	115.20	0.19	117	169.10	0.77	163	263.10	0.07
26	69.10	10.27	72	116.20	0.04	118	170.10	0.06	164	264.35	0.01
27	70.10	39.54	73	117.15	0.06	119	171.15	0.02	165	265.50	0.01
28	71.10	46.53	74	118.10	0.06	120	172.10	0.02	166	277.00	0.02
29	72.10	3.03	75	119.10	0.07	121	173.65	0.01	167	279.20	14.13
30	73.10	0.15	76	121.10	3.44	122	175.05	0.04	168	280.20	2.62
31	74.05	0.27	77	122.10	2.97	123	176.05	0.02	169	281.20	0.36
32	75.10	0.65	78	123.10	0.98	124	176.45	0.01	170	282.10	0.03
33	76.10	7.36	79	124.10	0.12	125	177.20	0.04	171	282.90	0.01
34	77.10	2.53	80	125.15	0.02	126	178.30	0.01	172	292.10	0.02
35	78.10	0.25	81	126.35	0.01	127	179.10	0.17	173	293.40	0.01
36	79.10	0.65	82	127.20	0.03	128	180.05	0.27	174	333.20	0.02
37	80.10	0.11	83	128.05	0.03	129	180.95	0.04	175	334.35	0.02
38	81.10	0.88	84	129.20	0.17	130	182.55	0.01	176	335.35	0.01
39	82.15	3.06	85	130.25	0.04	131	183.95	0.01	177	361.25	0.02
40	83.15	14.52	86	132.05	3.94	132	185.05	0.02	178	362.45	0.01
41	84.15	8.35	87	133.10	0.69	133	189.15	0.06	179	375.45	0.01
42	85.15	0.81	88	134.10	0.14	134	191.05	0.02	180	390.30	0.05
43	86.20	0.05	89	135.15	0.18	135	192.00	0.01	181	391.30	0.11
44	87.15	0.02	90	136.10	0.03	136	194.20	0.01	182	392.25	0.03
45	88.25	0.01	91	137.75	0.01	137	199.55	0.01			
46	89.00	0.03	92	141.10	0.02	138	202.15	0.01			

Parâmetros x Plantas	Concentrações de Undecilprodigosina ($\mu\text{g/mL}$)/Inibição (%)				
	2,5	5,0	25,0	50,0	100,0
<i>Germinação das sementes (%)</i>					
Alface crespo	100,0	100,0	96,0	90,0	89,0
Pimentão cascadura	100,0	100,0	89,0	78,0	0,0
<i>Crescimento da Raiz (%)</i>					
Alface crespo	99,1	93,1	93,1	86,1	50,0
Pimentão cascadura	75,0	63,6	62,7	60,0	0,0
<i>Índice de Germinação (%)</i>					
Alface crespo	93,6	90,0	89,1	86,1	43,5
Pimentão cascadura	75,0	63,6	53,4	49,0	0,0

Tabela 4. Avaliação da fitotoxicidade da prodigosina para sementes de alface crespa (*Lactuca sativa*) e pimentão (*Capsicum annuum*) nas concentrações de 100, 50, 20, 5 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foi obtido 48,50 g/L de biomassa em Meio Manitol e 17,50g/L de biomassa em Peptona Glicerol. Contudo, o mesmo não foi observado para meios alternativos como Caldo de farelo arroz com 3.74g/L , Caldo de farelo de amendoim com 2.36g/L de biomassa e Caldo de farelo de gergilim com 1.13g/L de biomassa, sendo observado que nestes meios os valores de biomassa obtidos foram inferiores quando comparados aos meios convencionais (Tabela 1). A máxima produção de pigmento obtida foi em MM com 1.2g/g de biomassa e PG com 1.0g/g de biomassa, contudo não sendo observada produção de pigmento nos meios alternativos.

A produção máxima de prodigiosina com os meios convencionais está apresentada na Tabela 2. Observou-se que o pigmento não foi produzido nos meios naturais alternativos.

A máxima produção de prodigiosina ocorre na presença de luz, sendo estas observações confirmadas no trabalho realizado (BALDINO *et al.*,2006).

Pigmentos ativos sintetizados por processos bacterianos apresentam potencial atividade medicina (CLIFT *et al.*,2009). Muitos estudos têm sido desenvolvidos em busca do melhoramento da produção desses metabólitos por bactérias como ajuste da temperatura, tempo de agitação e crescimento do microorganismo em diferentes meios de cultura (KALESPERIS *et al.*, 1975; CAMPAS *et al.*, 2003) .

Foi observado um rendimento máximo de prodigiosina de 0.52mg/mL a 28°C em meio convencional Ágar nutriente e nos meios alternativos como Caldo de farinha de arroz, amendoim e gergelim não obteve produção de prodigiosina BALDINO *et al.*,2006).

Em bioreator utilizando meio de cultura contendo dextrose obteve-se um rendimento de 13mg /mL de pigmento produzido e ainda em meio contendo etanol como fonte de carbono foi obtido 3mg /mL (DÍAZ-RUÍZ *et al.*,2001; FINERAN *et al.*, 2005). Todavia a máxima obtenção foi de 0.69mg /mL em meios alternativos suplementados com ácido oléico (GERBER *et al.*, 1970).

A extração do pigmento com soluções ácidas e básicas não eliminam impurezas presentes, mesmo após a purificação por cromatografia (GOLDSCHMIDT *et al.*, 1968). Neste sentido, a metodologia utilizada para a purificação foi descrita por (HUBBARD *et al.*, 1950) tendo sido obtido 660mg/g de biomassa do pigmento purificado produzido em Ágar manitol. Cerca de 150mg/ g de biomassa do pigmento total foi extraído de Ágar manitol, correspondeu a fração azul, Contudo, a fração isolada das células de *S. marcescens* crescida em Ágar peptona glicerol após a purificação correspondeu a 370mg / g de biomassa de prodigiosina.

Esta fração azul é produzida em uma das rotas biossintéticas paralelas que formam o monopirrol MAP e o bipirrol BMC, ambos precursores da prodigiosina, cujas rotas biossintéticas se convergem para formar os anéis tripirrólicos do pigmento (ISAKA *et al.*, 2000; JEONG *et al.*, 2005).

O pigmento isolado foi analisado por espectrometria numa faixa de 200 - 700nm onde a fração vermelha apresentou máxima absorvância a 533nm e a fração azul a 206nm respectivamente (Figura 1 A e B). A cromatografia em camada delgada apresentou os valores de referência (*Rf*) de 0,59 e 0,22, respectivamente para as frações vermelha e azul, sendo os valores obtidos comparados com os dados da literatura (HUBBARD *et al.*, 1950).

Portanto, o pigmento purificado apresentou dados semelhantes à prodigiosina já descrita na literatura, correspondendo ao espectro de absorção e o *Rf*, da literatura. A massa molecular obtida por espectrometria de massa-GCMS, para a fração vermelha do pigmento produzida em Ágar manitol e Ágar peptona glicerol foi de 392.3m/z (Figura 2 e Tabela 3). Os resultados obtidos são confirmados pelas investigações já descritas na literatura (LEEPER *et al.*, 2006; JUNGDON *et al.*, 2001). Os autores descrevem o pigmento de massa molecular de 392.3m/z como a prodigiosina- Undecilprodigiosina, pertencente a família das prodigioninas, a qual apresenta atividade imunossupressora e antitumoral. Neste sentido, sugerimos que o pigmento produzido, extraído e purificado neste trabalho, corresponde ao membro pertencente à família das prodigioninas.

A toxicidade para *Artemia salina* vem sendo realizada para avaliar os efeitos citotóxicos de compostos ou efluentes no meio salino (KANAFARI *et al.*, 2006). Assim, os ensaios de toxicidade vêm sendo realizados com microcrustáceo *A. salina* por ser considerado um bioindicador ambiental (MORAES *et al.*, 2009).

O pigmento prodigiosina purificado apresentou uma toxicidade para *A. salina* superiores a 78,33µg/mL ($CL_{50} = 78,33\mu\text{g/mL}$), com nível de significância (0,05), o que confere 95% de confiabilidade dos dados obtidos.

Neste sentido, o efeito tóxico é avaliado segundo os parâmetros: baixa ou ausência de toxicidade quando a CL_{50} for maior que 250µg/mL, toxicidade moderada quando a CL_{50} for maior que 80 e menor que 250µg/mL, e alta toxicidade quando a CL_{50} for inferior a 80µg/mL. Quanto menor for o valor da CL_{50} em 48 horas, mais tóxico será o composto frente a um organismo teste, e maior é a atividade citotóxica, sugerindo maior potencial como antitumoral (RAMOS *et al.*, 2009).

Neste sentido, a Undecilprodigiosina-prodigiosina isolada de *S. marcescens* apresenta significativa toxicidade aguda frente á *A. salina*, em concentrações mais elevadas, quando comparada ao Lapachol, que é uma droga de referência ($CL_{50}=68\text{mg/mL}$) (DANIELLY *et al.*, 2009). Contudo, quando comparada ao complexo de ferro 2-formilpiridina p-toluiltiossemicarbazona $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{Fo}_4\text{pT})\text{Cl}_3]$, que é um complexo considerado muito ativo, cuja $CL_{50}= 0,94$, sugerindo-se que o pigmento isolado possa apresentar uma potente atividade antitumoral, de acordo com a literatura (DANIELLY *et al.*, 2009).

Os dados descritos na literatura sugerem o efeito antitumoral e apoptótico da prodigiosina, Cicloprodigiosina e Undecilprodigiosina para algumas linhagens de células cancerígenas, como carcinoma hepático (BEL-7404), células leucêmicas promielocíticas humanas (HL60) e embrionárias de camundongos (NIH-3T3) [37: 40].

Desta forma, com base nos dados descritos pela literatura o pigmento vermelho correspondente a Undecilprodigiosina, produzido, isolado e caracterizado neste trabalho, sugere-se que o mesmo possa apresentar também atividade antitumoral, a qual poderá ser avaliada em trabalhos futuros.

A toxicidade para a germinação de sementes de alface crespa (*Lactuca sativa*) e de outras sementes, como pimentão cascadura (*Capsicum annuum*), representa um modelo amplamente utilizado para investigar o potencial aleloquímico de substâncias químicas, e ou de extratos de plantas sobre outros organismos (MAYBAUER *et al.*, 2005). Pela significativa importância econômica que estas duas espécies de plantas representam para o mercado agroindustrial brasileiro, foram avaliados os efeitos fitotóxicos do pigmento Undecilprodigiosina isolado de *S. marcescens* em sementes de alface crespo e pimentão (Tabela 4).

Para as sementes de alface o Índice de Germinação (IG) obtido na concentração de 100µg/mL foi de 44,5%, enquanto que para sementes de pimentão foi de 0%, representando alta toxicidade para estas sementes. Contudo, em concentrações mais baixas de 50µg/mL o Índice de Germinação obtido para sementes pimentão foi de 49%, o que representa para estas sementes, inibição em mais de 50%.

Sabe-se que quanto mais próximo de 100% for o índice de germinação (IG), menor será o efeito tóxico que o composto apresenta (SANTOS *et al.*, 2003). Assim, em concentrações de 50µg/mL, observou-se também, um aumento na porcentagem do índice de germinação (IG) para as sementes de alface com 86,1%, sendo o máximo (IG) obtido de 93,6% na concentração de 2,5µg/mL, o que demonstra que, quanto mais baixa for a concentração de prodigiosina, maior será o Índice de Germinação obtido e menor será o efeito tóxico causado pelo pigmento a estas sementes (Tabela 4).

Em adicional, o pigmento prodigiosina foi considerado tóxico para sementes de alface e pimentão quando comparado com o composto químico descrito na literatura, o ácido bórico que é uma substância tóxica que em concentrações elevadas de 80µg/mL, torna-se altamente tóxico as sementes de alface e pimentão, inibindo o crescimento e germinação destas sementes (SANTOS *et al.*, 2003). Foi observado também que as sementes de pimentão cascadura apresentaram maior sensibilidade ao pigmento em comparação as sementes de alface. As sementes de pimentão cascadura apresentam maior sensibilidade para alguns compostos químicos, sendo alvo de pesquisas que visam o melhoramento da sementeira destas sementes (MONTANER *et al.*, 2005).

7. CONCLUSÕES

O pigmento vermelho produzido em meio Manitol em estado sólido por uma nova linhagem de *Serratia marcescens* (UCP 1549) demonstrou ser Undecilprodigiosina por espectrofotometria e espectrometria de massa. Sendo confirmado após isolamento e purificação do pigmento permitindo a identificação e o isolamento da biomolécula, Undecilprodigiosina. A biomolécula apresentou moderada toxicidade para *Artemia salina* e se mostrou alta para sementes de alface crespa e pimentão cascadura na concentração mais alta. Os resultados obtidos demonstram-se promissores para a biomolécula Undecilprodigiosina produzida por uma nova linhagem *S. marcescens* UCP1549.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

- [1. The contents of Research in Microbiology](#)
- [2. Types of papers](#)
- [3. How to submit a manuscript](#)
- [4. Papers length](#)
- [5. General format](#)
- [6. Organization of research paper and brief notes](#)
- [7. Organization of reviews](#)
- [8. Forum issues](#)
- [9. Conventions](#)
- [10. Proofs and reprints](#)
- [11. Revision](#)
- [12. Copyright](#)

1. The contents of Research in Microbiology



Papers are published in Research in Microbiology under one of the following subheadings:

- Phylogeny and evolution,
- Ecology and population dynamics,
- Physiology and metabolism,
- Molecular genetics and genomics,
- Mobile elements,
- Viruses of prokaryotes,
- Interactions of microbes with their environment (pathogenic and non-pathogenic)

The overriding criteria for publication are originality, high scientific quality and up-to-date relevance. Papers should be written with a wide audience of microbiologists in mind. Purely descriptive papers, as well as those which do not report on significant advances in scientific research, are discouraged and may be rejected without review. Incomplete characterizations of new bacterial strains, bacterial communities, enzymes or antimicrobial compounds, for instance, will not be considered. Papers dealing with methods and theoretical microbiology may be published if they are associated with significant novel approaches and results. Papers

on host-pathogen interactions, virulence and disease fall within the scope of the journal only if they cover the biology of the microbes

2. Types of papers



Original articles in two formats: research papers or brief notes

Reviews

Letters to the Editor

News

3. How to submit a manuscript



Electronic submission of papers using on-line manuscript submission instructions is available at : <http://pasteur.fontismedia.com/res>

PLEASE NOTE:

English grammar, syntax and spelling must be carefully prepared and checked before submission of the paper. The authors are encouraged to include a cover letter for the Editor and to provide the names and e-mail addresses of 3 potential referees. A PDF version of the paper containing figures and tables is needed for the reviewing process. The authors should also provide their paper as a Word document and submit figures separately according to on-line submission instructions. In addition, if the submitted manuscript contains a reference to other related papers in press or considered for publication, PDFs of these papers should be added to the submission as supplementary information.

4. Papers length



Research papers: abstract 200 words, main text (Introduction, Materials and methods, Results and Discussion) in the range of 4000 word, about 40 references, and a combination of a total of six to eight figures and tables. Longer papers can be considered for publication of extra length is justified in the cover letter.

Brief notes: abstract 100 words, main text 1800 words, references up to 18, and a combination of a total of 3 figures and tables.

Reviews: abstract 100 words, main text 4000 words, references 70.

Letters to the Editor: 800-word maximum, including a total of 5 references or less, no abstract, no methods, no tables or figures.

News: 600 words.

5. General format of papers



Double-space (32 lines per page maximum) throughout (including references, figure legends and table footnotes).

2.5-cm (1 inch) margins on all four sides.

Font size of at least 12 points.

Each page numbered top right (title page is 1).

Lines numbered

Each new paragraph indented

Either American or English spelling, but not both.

In general, do not use capital letters (except for first letter) for titles, author names, section headings, etc.

When referring to figures in the main text, figure is abbreviated to Fig., i.e., Fig. 1. When referring to tables, Arabic numerals are used, i.e., Table 2.

6. Organization of research papers and brief notes



Manuscript should be arranged in the following order (each item should appear on a separate page):

a) Title page; b) Abstract + keywords; c) Introduction; d) Materials and methods; e) Results; f) Discussion; g) Acknowledgements; h) References; i) Legends to figures; j) Tables; k) Figures; l) Supplementary material for on-line submission

Abbreviations: A list of unusual abbreviations may appear below the keywords. In general, however, they must be defined in the text the first time they are used, followed by the abbreviation in parentheses. Thereafter, they are to be used throughout the paper.

Chapters for Introduction, Materials and methods, Results and Discussion are numbered in bold; subheadings are in italics; e.g.: **1. Introduction**; then 1.1 Subheading. Results and Discussion may be grouped together.

a) Title page

Title: it should be informative and concise and not exceed 25 words. It should not contain non-standard acronyms or abbreviations nor be in capital letters.

Authors' names: full first name of each author is followed by last name. Do not use capital letters; use commas to separate names; do not use "and" before name of last author. Each name should be followed by a superscript letter a, b, etc. to designate the affiliation. The name of the author responsible for correspondence and proof correction should be followed by an asterisk (*) after the superscript letter.

Affiliations: give complete address (department and/or laboratory, college, university, and full postal address) of each institute at which the work was carried out, preceded by the appropriate superscript letter (a, b, etc.). Affiliations should follow the list of names, and each address should be given in a separate paragraph.

The e-mail address of each author is given at the bottom of the title page. The e-mail address of the corresponding author is followed by the note "*Correspondence and reprints".

b) Abstract and keywords

The abstract is on page 2; it is accessible to a wide audience, summarizing the objectives and major conclusions and indicating the relevance of the work. Do not use references, footnotes or abbreviations in the abstract. The word "Abstract" is in bold.

Keywords: place them below the abstract; provide a list of at least three keywords existing in the MeSH thesaurus. They are in lower case letters, separated by semi-colons. They are used for indexing your paper and should express the precise content.

c) Introduction

The Introduction outlines the background of the study; it should not summarize results nor be an extensive review of the literature. Do not use subheadings in the Introduction.

d) Materials and methods

Avoid detailed description of standard procedures, procedures performed using commercial kits or procedures fully described in a former paper.

e) Results

f) Discussion

Discuss major findings. Avoid repeating parts of the Introduction and Results. Do not defend the main conclusions with unpublished data or with data from manuscripts in preparation.

g) Acknowledgements

Personal acknowledgements precede those of agencies and institutions; use only a single paragraph.

h) References

Unpublished work and personal communications are indicated as such in the text but not listed. Only published work and manuscripts in press (indicate the journal) appear in the references list. The list of references at the end of the paper, **in alphabetic order** appears after the **Acknowledgements**. Verify that each reference has its counterpart in the list and vice-versa; **incorrect or incomplete referencing will delay publication**.

All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author,s name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
(Espinosa-Urgel, 2009)
2. Two authors: both authors, names and the year of publication; (Vaneechoutte and Fani, 2009)
3. Three or more authors: first author's name followed by et al., and the year of publication.
(Vosahlikova et al., 2007)

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

In the list of References:

References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Follow the styles shown below:

Reference to a journal publication:

Davidovich, C., Belousoff, M., Yonath, A., 2009. The evolving ribosome: from non-coded peptide bond formation to sophisticated translation machinery. *Res. Microbiol.*160, 487-492.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B. , 1999. How to prepare an electronic version of your article, in:

Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E- Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

i) Legends to figures

The text for figure titles and their corresponding legends starts on a separate page following the reference list.

j) Tables

Tables are consecutively numbered according to their order of appearance in the main text. Each table carries a short title at the top (Table 2, etc.) describing its content in relation to the main text. Except for the heading and bottom of the table, avoid horizontal dividing lines; vertical lines between columns are completely omitted from any table. Instead, the first column is left-aligned and other columns are generally centered. Only the first letter of each heading is capitalized, and any units (Roman characters) appear in parentheses after or under the corresponding heading. Footnotes are collected under the table and referred to in the table by superscript letters (a,b, etc.).

k) Figures

Figures are numbered (Arabic numerals) consecutively by order of appearance in the main text (Fig. 1). Figures should be provided in the PDF version for the review process. The lettering and the graph symbols (squares, triangles, circles, etc.) should have a finished printed size of at least 9 pt. Authors of accepted papers should supply graphic files of halftone illustrations, saved as TIFF, EPS or BMP. Line art should have a resolution of approximately 1 000 dpi. Half-tone graphics (photographs or graphics with shades of gray) should have a resolution of 300 dpi. A figure that is a combination of both a half-tone and line art should have a resolution of at least 500 dpi. When necessary, indicate magnification by a scale bar. Visit <http://authors.elsevier.com/ArtworkInstructions.html?dc=AI>

There is no charge for reproduction of black and white illustrations. **Color figures are charged to the author.**

Make sure that all figures and tables are included at the end of the manuscript, even if original are submitted separately.

l) Supplementary material for on-line submission

Supplementary material in the form of tables or figures can be accepted for publication on line at the Editor's discretion.

7. Organization of reviews

page top 

The main text may be divided into sections with subheadings; it should end with a concluding section. The use of tables, charts, pictures and maps is strongly encouraged. Style used for Title, Abstract page, Tables, Figures and References follows the instructions above.

8. Forum issues

page top 

They may follow the style of original papers or reviews; the convener will specifically define the style of paper for each Forum issue. The Publications Office will forward instructions to invited authors.

9. Conventions

page top 

Microorganisms: follow guidelines of the Nomenclature Committees, ICSP <http://www.the-icsp.org/> and ICTV. Genus and species are written in full the first time the name appears in the text; subsequently, only use the first letter of the genus, followed by the species (e.g. *Escherichia coli*, then *E. coli*). When proposing new names or a new combination of names for the organisms they describe, authors are invited to apply guidelines ICSP and IJSEM (Int J Syst Evol Microbiol 50, 2239-44 and 2247-49 and Int J Syst Evol Microbiol 52 1043-47 for new rules for species definition, or visit <http://intl-ijms.sgmjournals.org/misc/ifora.shtml>), and to provide evidence that type strains are deposited in two recognized culture collections in two different countries. For genetic nomenclature of IS and transposons, visit <http://www-is.biotoul.fr> and <http://www.ucl.ac.uk/eastman/tn/>

Nucleotide sequences: they should be deposited in the NCBI or EMBL databases prior to submission. Their accession number should be provided in the submitted manuscript and the sequences should be made public prior to publication.

Units of measurement: follow the Système International (SI). Always respect the space between the number and the units (e.g. 100 °C, 25 mg). Use small l for liter).

Genetic loci are italicized; protein products of the loci are not italicized. Latin words in current use, such as *in vitro/vivo/situ*, *via*, as well as abbreviations for expressions such as *cf.*, *e.g.*, *i.e.*, *et al.*, appear in Roman type.

10. Proofs and reprints

page top 

Proofs are sent to the author responsible for correspondence. After **careful correction**, return them to the publisher **within 48 h**. If there is no response the article will be published as it appeared in the first proofs. Aside from typographical errors, no changes can be made in the references.

Elsevier provides either 25 free reprints of each article or the PDF version. To purchase additional reprints, fill in the order form which accompanies the proofs and return it to the publisher together with the corrected proofs.

11. Revision

page top 

A paper sent back to the author for revision **should be returned to us within 2 months**, together with a letter describing all modifications performed as well as answers to critics' remarks item by item; otherwise, it will be considered as a new submission. The Publications Office may request additional modifications after acceptance of a paper if the length is excessive or if the format does not conform to instructions.

12. Copyright

page top 

Submission implies that the paper reports original research, has not been published previously, is not under consideration for publication elsewhere and will not be published in

whole or in part elsewhere (in the same or in another language). As soon as the article is published, the author is considered to have transferred his or her rights to the publisher. Requests for reproduction should be sent to the Publisher:

<http://www.elsevier.com/locate/permissions>