



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR/CCEN



PIOCIANINA COMO BIOCORANTE DE MATERIAL TÊXTIL

THIAGO GONÇALVES CAVALCANTI

JOÃO PESSOA

2021

Thiago Gonçalves Cavalcanti

PIOCIANINA COMO BIOCORANTE DE MATERIAL TÊXTIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador:

Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes

João Pessoa

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

C376p Cavalcanti, Thiago Gonçalves.
Piocianina como biocorante de material têxtil / Thiago
Gonçalves Cavalcanti. - João Pessoa, 2021.
80 f. : il.

Orientação: Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Biologia celular e molecular. 2. Pseudomonas
aeruginosa. 3. Reuso de resíduos industriais. 4.
Pigmentos bacterianos. 5. Tingimento por exaustão. 6.
Fibra de algodão. I. Gomes, Ulrich Vasconcelos da
Rocha. II. Título.

UFPB/BC

CDU 576+577.2(043)



Ata da Sessão Pública para avaliar o Trabalho de Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Mestrando **THIAGO GONÇALVES CAVALCANTI**, submetido para obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular – Área de Concentração em Biologia Celular e Molecular.

Aos vinte e quatro dias do mês fevereiro do ano de dois mil e vinte e um, às nove horas, em ambiente virtual, reuniram-se em cerimônia pública, os membros da banca examinadora, composta pelos Professores Doutores: **Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes– UFPB (Orientador/Presidente)**, **Rafael de Almeida Travassos – UFPB (Examinador interno)** e **Douglas Guedes Ferreira - UFF (Examinador Externo)** a fim de examinarem o candidato **THIAGO GONÇALVES CAVALCANTI** ao grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular e Molecular. Iniciando, a Secretária Regina Emy Sales de Miranda do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular fez a abertura da sessão. Em seguida passou a palavra ao Professor Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes, Presidente da banca, o qual comunicou aos presentes qual o fim da reunião e os procedimentos de encaminhamentos da mesma. A seguir, concedeu à palavra ao candidato para que o mesmo fizesse, oralmente, a exposição do trabalho intitulado: **“Piciocianina como biocorante de material têxtil.”** Concluída a exposição, o Senhor Presidente solicitou que fosse feita a arguição por cada um dos examinadores. Após o candidato ser arguido por cada membro examinador, lhe foi concedido a palavra para que respondesse e esclarecesse as questões levantadas. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora passou a proceder a avaliação e julgamento do mestrando. Em seguida, o Senhor Presidente declarou que a Banca Examinadora considerou, segundo o artigo 65 do Regulamento Geral dos Programas de Pós-Graduação Stricto Sensu da Universidade Federal da Paraíba, **APROVADA** a dissertação apresentada e defendida pelo mestrando **Thiago Gonçalves Cavalcanti** concedendo-lhe, assim, o grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em Biologia Celular Molecular. Logo após a avaliação da comissão julgadora, o orientador preencherá um formulário, juntamente com o relatório final de dissertação de mestrado, a fim de que o mesmo seja homologado pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. E, para constar, eu, Regina Emy Sales de Miranda, secretária da reunião, lavrei a presente ata, que assino junto com os membros da banca examinadora. João Pessoa, 24 de fevereiro de 2021.

Regina Emy Sales de Miranda

Regina Emy Sales de Miranda
Secretária

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Rafael de Almeida Travassos
Examinador interno

Prof. Dr. Douglas Guedes Ferreira
Examinador Externo

Thiago Gonçalves Cavalcanti
Thiago Gonçalves Cavalcanti
Mestrando

Emitido em 24/02/2021

ATA Nº 2/2021 - PPBCM (11.01.14.48)
(Nº do Documento: 2)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 03/03/2021 14:43)
RAFAEL DE ALMEIDA TRAVASSOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
1956521

(Assinado digitalmente em 03/03/2021 14:42)
ULRICH VASCONCELOS DA ROCHA GOMES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
2009494

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpb.br/documentos/> informando seu número: **2**,
ano: **2021**, documento (espécie): **ATA**, data de emissão: **03/03/2021** e o código de verificação: **d3f930c939**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes, agradeço imensamente pela paciência, apoio, companheirismo e dedicação em contribuir para o meu crescimento pessoal e acadêmico. Me sinto privilegiado por tudo o que aprendi. Muito obrigado.

Aos meus pais, Ednaldo e Mônica, e ao meu irmão Ednaldo por proporcionarem toda assistência, incentivo e amor. Da mesma maneira, agradeço à minha família pela torcida e estímulo à conclusão desta etapa.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular pelo aprendizado adquirido na sala de aula e nas aulas práticas em laboratório.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Molecular (DBM), em especial, Regina Emy.

Aos amigos e colegas deste Programa de Mestrado, que durante esta etapa me apoiaram e incentivaram. Em especial, Lucemberg Faustino, pelo companheirismo.

Aos companheiros de laboratório por todo apoio e companheirismo, em especial Bianca Oliveira.

Aos amigos da época de graduação que foram de fundamental importância no apoio à dedicação a esse Mestrado, em especial Rafael Limongi e Lucemberg faustino.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB) pela oportunidade e estrutura atribuída para a realização do mestrado e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, os meus sinceros respeitos e agradecimentos.

CAVALCANTI, Thiago Gonçalves. Piocianina como biocorante de material têxtil. João Pessoa, 2021. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal da Paraíba, 2021.

RESUMO

A bioprospecção de microrganismos permite a utilização de produtos do metabolismo para o benefício da sociedade, empregando por exemplo, moléculas biodegradáveis em substituição a substâncias não ecologicamente corretas, tais como pigmentos bacterianos como substitutos naturais para corantes sintéticos empregados no tingimento de fibras. Este trabalho teve por objetivo produzir, extrair e caracterizar piocianina de dois isolados selvagens de *Pseudomonas aeruginosa*, TGC02 e TGC04, e empregar o pigmento em duas fibras têxteis. Caldo King A suplementado com bagaço de malte 2% (m/v) foi utilizado para a produção do pigmento e produziu-se cerca de 30 mL de solução de piocianina (585 µg/mL), com alto grau de pureza. Foram determinados parâmetros cinéticos de produção máxima de células, produção máxima de pigmento e coeficiente de rendimento. Além disso determinou-se a concentração celular e taxa de crescimento. O tingimento com 50 e 100 µg/mL de piocianina nas fibras de algodão e poliéster/elastano ocorreu pelo método da exaustão, utilizando bicarbonato de sódio como mordente. O desempenho de TGC02 e TGC04 foi similar. Houve incremento da população em até 9,5 vezes a partir do inóculo, produzindo uma concentração máxima de piocianina cerca de 1,0 µg/mL.h⁻¹, aumentando significativamente a partir de 36h de bioprocessamento, permanecendo crescente e parecendo modular a população celular. O coeficiente de rendimento foi de até 240 µg/mL.UA⁻¹. A piocianina foi mais funcional ao algodão, produzindo duas tonalidades de azul, sem sofrer alterações significativas após lavagem e secagem. Adicionalmente, foram registrados os maiores percentuais de absorção do pigmento e os menores percentuais de exaustão. O oposto foi verificado na fibra de poliéster/elastano. A adsorção do pigmento foi baixa, influenciando na cor obtida, cuja percepção à luz branca foi de um lilás-azulado muito pálido. Os tons variaram em função da concentração aplicada. Concluiu-se que a piocianina pode ser uma alternativa de agente de coloração para a fibra de algodão.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, reuso de resíduos industriais, pigmentos bacterianos, tingimento por exaustão, fibra de algodão

CAVALCANTI, Thiago Gonçalves. Pyocyanin as biocolorant of textile material. João Pessoa, 2021. Masters Dissertation (Programme of Post-Graduation in Cellular and Molecular Biology) – Universidade Federal da Paraíba, 2021.

ABSTRACT

Bioprospecting of microbes allows the use of their metabolites, such as biodegradable molecules in substitution of not eco-friendly compounds, for example of pigments as good natural substitutes for synthetic dyes. This work aimed to produce, to extract and to characterize pyocyanin from two wild isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, TGC02 and TGC04, and to apply the pigment as dyeing agent in two fibers. King A broth added with 2% (w/v) of malt bagasse were used to produce about 30 ml of pyocyanin (585 µg/ml) with a high degree of purity. Kinetic parameters of maximum cell production, maximum pigment production and yield coefficient were determined. In addition, cell concentration and growth rate were determined. The dyeing of 50 and 100 µg/mL of pyocyanin in cotton and polyester/elastane fibers was done using the exhaustion method, using sodium bicarbonate as mordant. Both isolates were similar in terms of microbial parameters. The cell population was increased up to 9.5 times from the inoculum, producing a maximum concentration of pyocyanin about 1.0 µg/mL.h⁻¹, and increased significantly after 36 h and seemed to modulate the microbial growth. The yield coefficient was up to 240 µg/mL.UA⁻¹. Pyocyanin was more functional to the cotton fiber and produced two shades of blue, without undergoing significant changes after washing and drying. Additionally, the highest percentages of pigment absorption and the lowest percentages of exhaustion were recorded. The opposite was found in the polyester/elastane fiber. The adsorption of the pigment was low, influencing the color resulted, whose perception in white light was a very pale lilac-bluish color. Additionally, the shades poorly varied as a function of the concentration of pyocyanin applied. In conclusion, pyocyanin may be used as alternative biocolorant on cotton fibers.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, reuse of industrial waste, bacterial pigments, exhaust dyeing, cotton fiber

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura comum das fenazinas	11
Figura 2 – Ciclo de auto-oxidação da piocianina e formação de compostos reativos de oxigênio por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . A forma oxidada apresenta-se na coloração azul enquanto a forma reduzida, na coloração vermelha	12
Figura 3 – Via proposta para biossíntese de piocianina por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a partir do ácido corísmico	12
Figura 4 – Aspectos da piocianina diluída em clorofórmio (A) e água destilada (B)	20
Figura 5 – Espectro fragmentado da amostra do pigmento (250 ng/mL)	21
Figura 6 – Curva de crescimento e produção de piocianina por TGC02	22
Figura 7 – Curva de crescimento e produção de piocianina por TGC04	22
Figura 8 – Taxa de crescimento dos isolados <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TGC02 e TGC04	23
Figura 9 – Piocianina diluída em solução hidroalcóolica 1:1 (v/v) em pH 8,05	24
Figura 10 – Aspecto das fibras de algodão e poliéster/elastano tingidas com piocianina	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção de piocianina pelos isolados selvagens de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
Tabela 2 – Parâmetros cinéticos da produção de piocianina pelos isolados selvagens de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
Tabela 3 – Descrição sistemática da cor aparente obtida das soluções de piocianina	25
Tabela 4 – Descrição sistemática da cor aparente obtida na fibra de algodão	25
Tabela 5 – Descrição sistemática da cor aparente obtida na fibra de poliéster/elastano	26
Tabela 6 – Parâmetros do tingimento da fibra de algodão (OD ₆₉₀)	26
Tabela 7 – Parâmetros do tingimento da fibra de poliéster/elastano (OD ₆₉₀)	26

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

#	Codificação hexadecimal da cor
AC	Ácido corísmico
ATP	Adenosina trifosfato
LAMA	Laboratório de Microbiologia Ambiental
MM	Massa molecular
m/z	Relação massa/carga
MPCBA	Ácido 5-metilfenazina-1-carboxílico betaína
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
OD	Densidade óptica
PCA	ácido fenazino-1-carboxílico
PYO	Piocianina
RGB	Modelo de cor <i>red, green, blue</i> (vermelho, verde, azul)
XYZ	Modelo de cor matiz, saturação e brilho

Observação: as abreviaturas, siglas e símbolos utilizados neste documento, que não constarem nesta lista, foram descritas no texto, são convenções adotadas universalmente ou inclusas no sistema métricos internacional.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Local da realização da pesquisa	15
3.2 Microrganismos	15
3.3 Fibras	15
3.4 Síntese, extração e quantificação do pigmento	16
3.5 Obtenção da piocianina	17
3.6 Caracterização química do pigmento produzido	17
3.7 Determinação da concentração celular e taxa de crescimento	17
3.8 Parâmetros cinéticos	18
3.9 Tingimento da fibra	18
3.10 Determinação do percentual de absorção do pigmento	19
3.10 Determinação do potencial de exaustão do tingimento	19
3.11 Determinação da cor aparente após lavagem	19
4. RESULTADOS	20
4.1 Ensaio para viabilidade dos isolados	20
4.2 Produção e caracterização da piocianina	20
4.3 Parâmetros cinéticos	21
4.4 Tingimento do tecido	24
5. DISCUSSÃO	27
5.1 Produção da piocianina	27
5.2 Parâmetros cinéticos	30
5.3 Processo de tingimento	34
6. CONCLUSÕES	40
REFERÊNCIAS	41
APÊNDICE A – Colour me blue: the history and biotechnological potential of pyocyanin (<i>Molecules</i>)	
APÊNDICE B – Uso de piocianina no tingimento de fibra de algodão (<i>Internacional Journal of Development Research</i>)	

1 INTRODUÇÃO

A cor é uma interação perceptual com origem na habilidade do olho humano discriminar entre diferentes comprimentos de onda de luz de dentro de uma estreita faixa de radiação eletromagnética (SIUDA-KRZYWICKA et al., 2019). O uso de cores pelo homem possivelmente nasceu da necessidade característica da espécie em se adornar, embelezar objetos ou representar figuras que simbolizam a natureza ou divindades (LEGGETT, 2009).

Neste contexto, o tingimento de materiais figura como uma das atividades humanas mais antigas, confundindo-se à própria história da civilização e com registros que datam a Idade do Bronze (WISNIAK, 2004). Acredita-se ainda que a descoberta de pigmentos naturais pode ter ocorrido empírica e ingenuamente, ou mesmo por persistência e curiosidade de nossos ancestrais, ao observarem plantas, insetos e a secreção de gastrópodes marinhos¹ como fontes de agentes de cor (MELO, 2009).

O tingimento de materiais consiste numa modificação física ou química do substrato, de forma que a luz refletida sobre ele, provoque percepção de cor ao olho humano. Os componentes que interagem num sistema de tingimento são: a fibra, a água, o agente de cor e os aditivos (PERKINS, 1995). Os primeiros registros do uso de pigmentos para tingimento de vestimentas coincidem entre 3500-2500 a.C., em diferentes culturas em diferentes regiões do globo, tais como China (HAN, 2015), subcontinente indiano (GOKHALE et al., 2004), Japão (YOSHIOKA, 2010), Egito (AHMED et al., 2019), Pérsia (SHIBAYAMA et al., 2015), Roma (YUSUF et al., 2017) e Grécia (BRECOULAKI, 2014). Em complemento, na América pré-colombiana, diferentes fontes naturais eram utilizadas como corantes, com destaques para: cochonilha, garança, índigo e pau-brasil, que mais tarde no século XVI nomeará o território colonizado por Portugal (FERREIRA et al., 2004).

Os pigmentos e corantes sintéticos possuem grupos funcionais que podem deslocar elétrons. Quando a luz visível ($\lambda=380-760$ nm) atinge estas moléculas, a radiação é absorvida num determinado comprimento de onda. Em seguida, o olho humano detecta os comprimentos de onda não absorvidos. Se por exemplo, um determinado objeto absorve um comprimento de onda medindo cerca de 600 nm, o cérebro o percebe na cor azul por meio desta informação (CHARKOUDIAN et al., 2010).

¹ Principais espécies *Murex brandaris*, *Bolinus brandaris*, *Hexaplex trunculus* e *Stramonita haemastoma*

O azul tem destaque na história como a cor mais preciosa, representando nobreza e calma. Este sentimento está presente em diversas civilizações antigas, especialmente por questões religiosas ou evocando a natureza, especialmente o mar e o céu de um dia claro (McGOVERN et al. 1990). Sentimentos positivos em torno da cor, fazem do azul a preferência da maior parcela da humanidade, identificado desde os primeiros estudos sobre o tema, datados do século XIX (HURLBERT e LING, 2017). Em complemento, a cor azul é universalmente mais utilizada, tendo o *jeans* como maior representante desta simbologia na cultura moderna (LEGRAND, 2013).

De forma natural, a cor azul pode ser obtida da extração de antocianinas em bagaço de frutas como a uva e o mirtilo (BECHTOLD et al., 2007), contudo, o índigo é o principal e mais valioso pigmento azul de ocorrência natural. O índigo e o púrpura-de-Tiro foram considerados por antigas civilizações como os mais valiosos pigmentos naturais e igualmente estão registrados em diferentes documentos antigos, incluindo o Talmude e a Bíblia (ZIDERMAN, 1986). O composto majoritário, indigotina, pode ser extraído de algumas plantas, especialmente *Indigofera* spp., assim como das *Polygonum tinctorium*, *Perisicaria tinctoria* e *Isatis tinctoria* (GARCIA-MACIAS e JOHN, 2004). Por ser compatível com diferentes tipos de fibras, a história do índigo se confunde com a história das relações comerciais da Idade média, passando pelo período das circun-navegações até à revolução industrial, quando passou a ser sintetizado (LEGRAND, 2013).

O primeiro agente de cor industrial moderno, mauveína, foi sintetizado em 1856 pelo químico britânico William Henry Perkin (1838-1907), revolucionando a indústria da cor, por produzir materiais de baixo custo, altamente estáveis e possibilitando produção em larga escala, podendo substituir com eficácia os pigmentos naturais (GMOSER et al., 2018). No entanto, o fato de os corantes sintéticos estarem relacionados a impactos negativos à saúde e ao ambiente, a demanda por pigmentos extraídos de fontes naturais tem sido uma tendência mundial crescente. O fato de o pigmento ser natural, agrega forte apelo ao produto, servindo como bons substitutos aos corantes sintéticos, e consequentemente possuem grande aceitação pública, atraindo interesse científico e da indústria, em razão aos benefícios e possibilidades de aplicações (MALIK et al., 2012). Neste cenário, há poucas décadas foi cunhado o termo biocorante (tradução do inglês *bio-colour*), como sinonímia para denominar e identificar qualquer matéria natural empregada com o propósito de atribuir cor ou tingir um material (HEER e SHARMA, 2017). Esta matéria natural pode ser de origem vegetal,

animal ou microbiana. Dentre os microrganismos, as bactérias despontam como potenciais produtoras de pigmentos num campo de estudo que está em franca expansão (PARMAR et al., 2015).

Os pigmentos naturais de origem bacteriana apresentam diversas vantagens, a saber: são moléculas ambientalmente corretas em termos de disposição de resíduos e exposição ocupacional; são de cultivo simples em meios com substratos de baixo custo; são fáceis para manipular e selecionar linhagens mais produtoras; há possibilidade de manipulação de genes dos organismos produtores; possibilitam grande espectro de cores; há disponibilidade de biomassa produtora; os processos fermentativos de obtenção são inerentemente mais rápidos quando comparados a qualquer outro processo de síntese química; a extração do pigmento utiliza técnicas simples de extração líquido-líquido; a complexidade estrutural para produção de pigmentos se adapta às demandas da indústria e; a biomassa produzida pode ser reciclada como fonte para produção de energia ou substrato de crescimento de novas culturas (USMAN et al., 2017; VENIL et al., 2013).

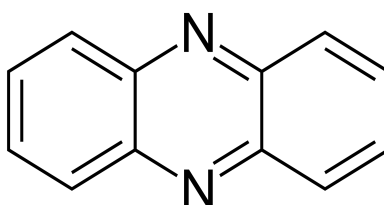
Contudo, há de se destacar que certas propriedades indesejadas dos pigmentos e organismos produtores são relevantes, tais como, instabilidade à luz, calor e variações de pH, bem como as alterações na capacidade de exibir o pigmento e variações nos tons, em razão das imperfeições nos parâmetros operacionais aplicados. Além disso, estas variações podem implicar na redução do percentual anual de produção (SARVAMANGALA e APARNA, 2016).

Os pigmentos bacterianos, como demais pigmentos naturais são metabólitos secundários das mais variadas colorações, dotados de estrutura molecular heterogênea e baixa massa molecular (HAJJAJ et al., 1998). O metabólito secundário não é um requisito essencial para promover o crescimento de um dado organismo, porém está atrelado aos fenômenos de sua persistência e manutenção num determinado ambiente (CHADNI et al., 2017; KURBANOGLU et al., 2015). Muitas bactérias produzem pigmentos e a eles, estão atribuídas diferentes funções, tais como: fotossíntese (NOWICKA e KRUK, 2016), proteção contra radiação ultravioleta (MOELLER et al., 2005), captação de ferro (CORNELIS e DINGEMANS, 2013), antibiose/amensalismo (VIANA et al., 2017) e na sinalização que modula expressões gênicas dependente de densidade celular, ou *quorum sensing* (LIU e NIZET, 2009), dentre outros.

A piocianina é uma fenazina de exuberante coloração azul (MM= 210,23 g/mol), produzido exclusivamente por 90-95% das linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*

(MAVRODI et al., 2001). Em comum, todas as fenazinas compreendem anéis heterocíclicos contendo nitrogênio (Figura 1), que se diferem nas propriedades físico-químicas, baseadas no tipo e posição dos grupos funcionais presentes (PIERSON e PIERSON, 2010).

Figura 1 – Estrutura comum das fenazinas



Fonte: adaptado de Blankenfeldt e Parsons (2014)

A síntese de fenazinas ocorre em *Bacteria* e nas *Archaea* e estão relacionadas às diferentes colorações exibidas por estes microrganismos. Embora sejam expressadas por um número limitado de gêneros bacterianos, ao menos 10 tipos de fenazinas podem ocorrer simultaneamente em um único organismo, contudo mais de 50 fenazinas de ocorrência natural foram descritas, por exemplo, iodinina (púrpura), clororafina (verde-esmeralda), ácido fenazino-1-carboxílico (amarelo), mixina (vermelho) e piorrubina (ferrugem), entretanto, a piocianina é o composto mais importante da classe (SHANMUGAIAH et al., 2009; MARGALITH, 1992).

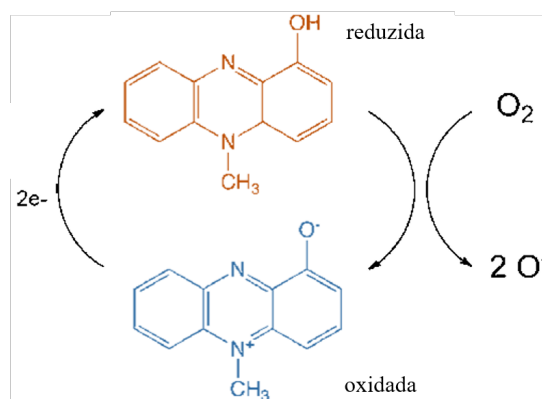
A piocianina² foi descrita em meados do século XIX e isolada em 1924, tornando-se a primeira fenazina natural obtida em laboratório (SCHOENTAL, 1941). A molécula se apresenta como um *zwitterion*, ou seja, um composto químico eletricamente neutro, porém dotado de cargas opostas em diferentes átomos. O grupo fenol a atribui um caráter ácido, $pK_a = 4,9$ (HALL et al., 2016). A molécula apresenta três estados (Figura 2): ionizado em pH fisiológico (cor azul), protonado, em ambiente ácido (cor vermelha) e neutro (azul). Assim, a piocianina pode atravessar a membrana e penetrar nas células, assumindo um papel multifuncional para *P. aeruginosa* (ÖZCAN e KAHARAMAN, 2015).

Em complemento, a bactéria pode mediar um ciclo de auto-oxidação da piocianina (Figura 2). Dois elétrons são transferidos para a forma oxidada, gerando a

² Nome derivado da junção das palavras gregas empregadas para designar pus e a cor azul, em referência às primeiras observações, na segunda metade do século XIX, de secreções purulentas azuladas, cuja coloração era causada pela presença do pigmento nas infecções por *Pseudomonas aeruginosa*

forma reduzida, que pode ser novamente convertida à sua forma oxidada pelo oxigênio molecular, formando também compostos reativos de oxigênio (HUNTER, et al., 2012).

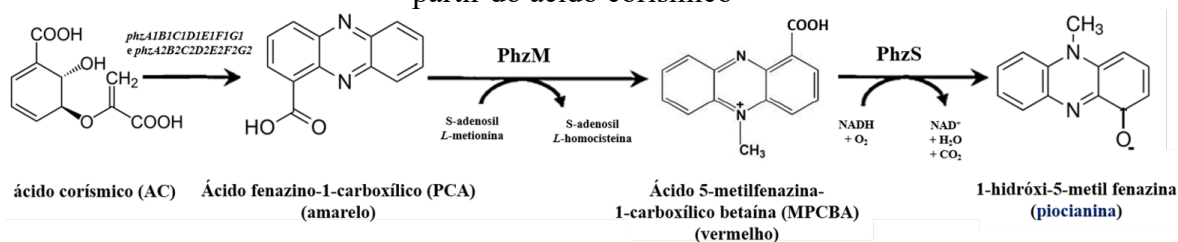
Figura 2 – Ciclo de auto-oxidação da piocianina e formação de compostos reativos de oxigênio por *Pseudomonas aeruginosa*. A forma oxidada apresenta-se na coloração azul enquanto a forma reduzida, na coloração vermelha



Fonte: adaptado de Hunter et al. (2012)

A piocianina ou sanazina, é composta por duas subunidades de N-metil-1-hidroxifenazina e tem o ácido corísmico (AC) como precursor (Figura 3). A conversão do AC em ácido fenazino-1-carboxílico (PCA) é controlada por sete genes, codificados por dois operons (*phzA1B1C1D1E1F1G1* e *phzA2B2C2D2E2F2G2*). Em seguida, dois passos a partir do PCA, são sugeridos para a síntese de piocianina, regulados por outros dois genes, *phzM* e *phzS*. No primeiro, o ácido 5-metilfenazina-1-carboxílico betaína (MPCBA) é formado por meio de uma metiltransferase fenazina-específica (PhzM). O segundo passo é catalisado pela mono-oxigenase flavina dependente (PhzS), envolvendo a hidroxilação da betaína do MPCBA em 1-hidróxi-5-metil fenazina, isto é, a própria piocianina (JAYASEELAN; RAMASWAMY e DHARMARAJ, 2014; MAVRODI et al., 2001).

Figura 3 – Via proposta para biossíntese de piocianina por *Pseudomonas aeruginosa* a partir do ácido corísmico



Fonte: adaptado de Parsons et al. (2007)

A bactéria produtora de piocianina, *P. aeruginosa*, é um bacilo Gram-negativo membro do grupo das pseudomonadas fluorescentes. As células medem cerca de 0,5 µm de largura por 1,5 µm de comprimento e são dotadas de um flagelo polar (ABDUL-HUSSEIN e ATIA, 2016). Além da piocianina, a espécie pode sintetizar outros cinco pigmentos: fluoresceína, amarelo (ALLYDICE-FRANCIS et al., 2012), pioverdina, verde (YIN et al., 2017), piorrubina A e B, tons de ferrugem (ABU et al., 2013) e piomelanina, marrom claro (FERGUSON, CAHILLI; QUIILTY, 2007), estes três últimos, também fenazinas.

A produção de piocianina em meios tradicionais empregados na rotina de um laboratório de Microbiologia, fundamenta-se no estado energético da bactéria, que é reduzido em condições de baixa concentração de nutrientes, resultando na diminuição da taxa de crescimento e aumentando a concentração do pigmento. A escassez nutricional, especialmente relacionada aos íons PO_4^{-3} e Ca^{+2} , força as linhagens produtoras de piocianina desenvolverem o pigmento, que se difunde no meio (WHOOLEY e MCLOUGHLIN, 1982). Esta produção ocorre geralmente no início da fase estacionária, que depende do tempo de geração das linhagens. A bactéria sob estas condições de cultivo tende a apresentar um tempo de geração variando entre 3 e 6h (TAGMANINI e GONZÁLES, 1997), justificando a aparição da coloração azul-esverdeada entre 48-72h após o início da incubação.

A maioria dos estudos envolvendo a produção de piocianina implicitamente trata a síntese como mecanismo de resposta às agressões do ambiente, no entanto, se concentra em temas voltados à saúde, tais como, multirresistência (KERR e SNELLING, 2009), atividade antimicrobiana (MARTINS et al., 2014), *quorum sensing* (DIETRICH et al., 2016) e alterações imunológicas ou respostas inflamatórias (SALES-NETO et al., 2016). Baseado na premissa de que a síntese de piocianina está associada ao mecanismo de resposta da *P. aeruginosa* às altas pressões seletivas exercidas pelo ambiente (BAHARI et al. 2017), o pigmento pode ter participação nos processos que envolvem a produção de agentes de cor, com especial atenção à indústria têxtil.

Assim, o presente trabalho objetivou produzir piocianina e utilizá-la como pigmento de tingimento de dois tipos de fibras têxteis. Sempre que o termo **pigmento** foi empregado, se referiu às moléculas orgânicas de ocorrência natural, sintetizadas por microrganismos, enquanto o termo **corante** se referiu aos compostos sintéticos, utilizados como aditivos de cor em diferentes produtos e materiais (MARGALITH, 1992).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir piocianina utilizando substrato alternativo ao meio de produção e aplicar o pigmento como agente de cor em fibras de material celulósico natural e fibra sintética.

2.2 Objetivos específicos

- ❖ Selecionar isolados produtores de pigmento;
- ❖ Extrair e quantificar a piocianina produzida;
- ❖ Caracterizar o pigmento produzido;
- ❖ Determinar parâmetros cinéticos da produção da piocianina;
- ❖ Produzir variedades da cor aparente do biocorante;
- ❖ Determinar o percentual de absorção do pigmento no tingimento;
- ❖ Avaliar o percentual de exaustão do pigmento sobre a fibra;
- ❖ Classificar a cor aparente, obtida no tingimento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local da realização da pesquisa

O estudo foi conduzido no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA) do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

3.2 Microrganismos

Foram empregados isolados de *Pseudomonas aeruginosa* TGC02 e TGC04, provenientes de solo de postos de gasolina de João Pessoa e mantidos no banco de culturas do LAMA. O projeto está cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o código AA1970F (título da atividade: O microcosmo azul: desvendando as interações da *Pseudomonas aeruginosa* com o meio).

3.3 Fibras

Foram utilizados dois tipos de amostras de tecido branco, comercialmente disponíveis no mercado, sendo uma celulósica natural e a outra sintética (Quadro 1). De cada fibra foram preparados dois tipos de amostras com as seguintes dimensões: 1 cm (comprimento) x 1 cm (largura) para os ensaios descritos nos itens 3.9 e 3.11 e amostras de 15 cm (comprimento) x 4 cm (largura), equivalente à massa de 1g de tecido para o ensaio descrito no item 3.10.

Quadro 1 – Especificações das amostras de tecido

Tipo de fibra	Marca (modelo)	Especificações técnicas
Algodão 100%	FioSul (215 0101)	Cor branca, malha fio 30.1, fibra média, fiação penteada e gramatura de 160 g/m ²
Poliéster 92%-elastano 8%	Costa Rica (Suplex 178CLA)	Cor branca, meia malha ramada 1,70 m, com gramatura de 290 g/m ²

Observação: especificações técnicas obtidas com os fabricantes

3.4 Síntese, extração e quantificação do pigmento

Inicialmente os isolados *P. aeruginosa* TGC02 e TGC04 foram testados quanto a produção do pigmento para posterior seleção neste trabalho. Foi utilizado o protocolo adotado por Oliveira et al. (2019), modificando apenas o meio de crescimento das células empregadas no pré-inóculo. De forma breve, o pré-inóculo foi cultivado em agar cetrimida (Acumedia, Lansing, USA), incubado por 48 h à 29±1 °C (EL FEGHALI e NAWAS, 2018). Após, as células do cultivo recente foram suspensas em NaCl 0,85%, com turbidez padronizada com o tubo nº 1 da escala de MacFarland ($\approx 10^8$ UFC/mL). A seguir, alíquotas de 2 mL foram transferidas para frascos contendo 200 mL de caldo King A (KING; WARD e RANEY, 1954), suplementado com 2% (m/v) de bagaço de malte de cerveja (OLIVEIRA et al., 2019), cujo teor de nitrogênio total era de 1.45 mg/kg, determinado pelo método Kjeldahl (USEPA, 1993). Os frascos foram incubados sob agitação de 150 rpm à 29±1 °C por 72 h (EL-FOULY et al., 2015).

A extração da piocianina foi realizada em triplicata, empregando o protocolo descrito por Devnath et al. (2017), com pequenas modificações. Após a incubação, alíquotas de 50 mL foram tomadas e misturadas a 10 mL de clorofórmio. Após agitação em vórtex (Warmnest VX-28) durante 1 minuto, a fase orgânica (com coloração azul) foi separada e em seguida, acidificada com 5 mL de HCl 0,2 mol/L, agitando-se novamente por 1 minuto. Após repouso, a fase acidificada, contendo a piocianina protonada (com coloração vermelha), foi neutralizada com gotas de solução-tampão Tris-Base concentrada (1,5 mol/L), retornando à coloração azul. Esta operação foi repetida por três vezes.

A concentração de piocianina (PYO), em µg/mL, foi determinada como descrito por Hassani et al. (2012). Após um repouso de 1 h, uma alíquota de 10 µL da fase neutralizada foi diluída em 990 µL de água destilada e a absorbância da solução foi medida a 690 nm (Quimis U2M). O valor da absorbância (ABS) foi inserido numa equação, obtida por meio da curva padrão ($r^2 = 0,9999$), preparada com piocianina com grau de pureza $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich).

$$[\text{PYO}] = [(\text{ABS} - 4 \times 10^{-5}) \div 8,9968] \quad (\text{Eq. 1})$$

3.5 Obtenção da piocianina

A piocianina foi exaustivamente extraída com clorofórmio como descrito no item 3.4, porém a razão inicial de meio e clorofórmio foi maior, 2:1, uma vez que o propósito foi conseguir maior quantidade de pigmento. As alíquotas obtidas do sobrenadante do meio de produção foram filtradas a vácuo. Ao filtrado foi adicionada solução de Na_2SO_4 (10 mg/mL) com intuito de remover umidade. Em seguida foi tratada em papel de filtro analítico Whatman nº 1, eliminando o solvente por rotaevaporação (Buchi Rotavapor®, R-3). O produto obtido era um pó de coloração azul intensa e brilhante.

3.6 Caracterização química do pigmento produzido

Cerca de 1 mg da amostra (mistura dos pigmentos dos dois isolados) foi tratada com solução de água destilada-metanol grau HPLC (1:1), obtendo-se cerca de 250 ng/mL de pigmento. A caracterização química deste produto foi realizada pelo Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA-UFPB), empregando espectrometria de massa de baixa resolução (Bruker, Ion Trap-amaZonX), com infusão direta da amostra por ionização por *eletrospray* (ESI), em equipamento com as seguintes especificações: capilar 7 kV, bloqueio de saída -200 V, saída 140 V, ESI no modo negativo e positivo, *offset* da placa final -500 V, nebulizador 8 psi, atmosfera de nitrogênio seco com fluxo de 5.0 L/min e temperatura de 220°C. Os espectros (m/z 50-1000) foram registrados a cada 2 segundos.

3.7 Determinação da concentração celular e da taxa de crescimento

Os isolados de *P. aeruginosa* foram semeados em agar cetrimida como descrito no item 3.2. O volume de 100 μL do inóculo foi transferido para o frasco contendo 200 mL de caldo King A, suplementado com bagaço de malte de cerveja 2% (m/v). A incubação ocorreu sob agitação de 150 rpm à 29 °C. Para determinação da curva de crescimento e tempo de geração foram coletadas em triplicata, alíquotas de 500 μL nos tempos: 0, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60 e 72 horas. Ao material coletado foram adicionados 500 μL de solução de glicerol 40%. Os mesmos intervalos foram utilizados para coleta de 1000 μL para os ensaios destinados à cinética da produção de piocianina. Os microtubos foram mantidos à -20°C. A concentração celular média foi determinada por densidade óptica (OD) a 600 nm (CAWLEY et al., 2019), construindo um gráfico de crescimento em função do tempo. A taxa de crescimento foi calculada por intervalo de tempo como descrito e expresso por Sezonov et al. (2007). As relações da OD_{600}

entre a massa e concentração celular média foram calculadas segundo Kim et al. (2012), em que 1 unidade de densidade óptica (600 nm) da suspensão de *P. aeruginosa* equivale a 2,085 mg/mL e $2,4 \times 10^8$ células/mL, respectivamente.

3.8 Parâmetros cinéticos

Foram determinados três parâmetros: produtividade máxima de células ($Q_{p_{cel}}$), produtividade máxima de piocianina ($Q_{p_{pyo}}$), e o coeficiente de rendimento (Y_{px}), empregando as Equações 2 a 4 (BÜHLER et al., 2013):

$$Q_{p_{cel}} = [(X_t - X_{t0}) \div (t - t_0)] \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que: X_t – máxima formação de biomassa no tempo t , X_{t0} – biomassa no tempo 0, t – tempo para atingir valor máximo da biomassa e t_0 – tempo inicial do cultivo.

$$Q_{p_{pyo}} = [(P_t - P_{t0}) \div (t - t_0)] \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que: P_t – máxima concentração de piocianina no tempo t , P_{t0} – concentração de piocianina no tempo 0, t – tempo para atingir valor máximo da concentração de piocianina e t_0 – tempo inicial do cultivo.

$$Y_{px} = [(P_1 - P_0) \div (UA_1 - UA_0)] \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que: P_1 e P_0 – concentração final e inicial de piocianina e UA_1 e UA_0 – unidade de absorvância no tempo final e inicial, respectivamente.

3.9 Tingimento da fibra

Inicialmente o tecido foi imerso em água destilada à 50°C por 30 min para remoção das impurezas. Posteriormente foi enxaguado e seco à temperatura ambiente e cortado em amostras medindo 1 cm de largura por 1 cm de comprimento (LV et al., 2012).

O protocolo do tingimento foi conduzido como descrito por Kramar et al. (2014) pelo método da exaustão. As soluções de tingimento foram preparadas diluindo as quantidades correspondentes ao tom desejado em solução etanol/água 1:1 v/v em pH 8, ajustado com solução de NaHCO_3 1,5 mol/L, sob agitação contínua por 10 min à 40°C. A mistura dos pigmentos produzidos por TGC02 e TGC04 permitiu preparar dois tons de azul, correspondentes a 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de piocianina em solução hidroalcolica. Em seguida, amostras de tecido, umedecidas com água destilada foram adicionados e agitadas à 40 °C por 5 min. O processo continuou com o aumento gradual da temperatura para 85 °C dentro de 15 min e depois mantido por mais 60 min. Ao final,

resfriou-se à 40 °C por 5 min e procedeu-se uma cuidadosa lavagem e enxágue com água destilada morna e deixadas para secar à temperatura ambiente.

3.10 Determinação do percentual de absorção do pigmento

As amostras foram submetidas ao tingimento empregando NaHCO₃ (0,05g/g de tecido) como mordente. Para isso, amostras de 1g das fibras foram imersas em 50 mL da solução de piocianina, na tonalidade pré-definida, como descrito no item 3.9. As amostras foram deixadas em repouso por uma noite à temperatura ambiente. Após, foram lavadas com água fria e deixadas para secar ao sol (CHADNI et al., 2017). Para a determinação do percentual de absorção do pigmento nas fibras, foi medida a OD₆₉₀ da solução de tingimento, antes e após o procedimento, aplicando a Equação 5.

$$\%_{\text{abs}} = [(OD_{690} \text{ antes} - OD_{690} \text{ após}) \div OD_{690} \text{ antes}] \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

3.11 Determinação do potencial de exaustão do tingimento

Para determinar a extensão da exaustão do pigmento, foram medidas as OD₆₉₀ da solução de tingimento, antes e após o tingimento à quente, realizado como descrito no item 3.9. O percentual de exaustão foi calculado empregando a Equação 6 (LV et al., 2012).

$$\%_{\text{exaustão}} = [(OD_{690} \text{ antes} - OD_{690} \text{ após}) \div OD_{690} \text{ antes}] \times 100 \quad (\text{Eq. 6})$$

3.12 Determinação da cor aparente após lavagem

A cor aparente foi determinada nas amostras tingidas após lavagem com solução detergente neutro 0,5% (v/v) à 40 °C por 30 min, enxágue com água destilada morna e secagem à 60 °C (ABNT, 2010). Para codificação hexadecimal (#) e representação da cor aparente nos formatos RGB (*red, green and blue*) e XYZ (matiz, saturação e brilho), foi utilizado o densitômetro FalaCor® versão 1.6.1. As amostras tingidas foram dispostas em um suporte com uma lâmpada de LED branca (Nitrolux®, 12V, 2,4W/m, 50-60 Hz), disposta a 10 cm de distância da amostra, de modo que os feixes incidiram a 90° e as imagens foram produzidas com um aparelho celular (Motorola, g(6) play) num ângulo de 45° da amostra.

4 RESULTADOS

4.1 Ensaio para verificação da viabilidade dos isolados

Houve produção de piocianina pelos isolados TGC02 e TGC04, contudo, nos frascos com presença do bagaço de malte de cerveja, a produção do pigmento foi significativamente maior (Tabela 1), representando um incremento de mais de três vezes para ambos isolados.

Tabela 1 – Produção de piocianina pelos isolados selvagens de *Pseudomonas aeruginosa*

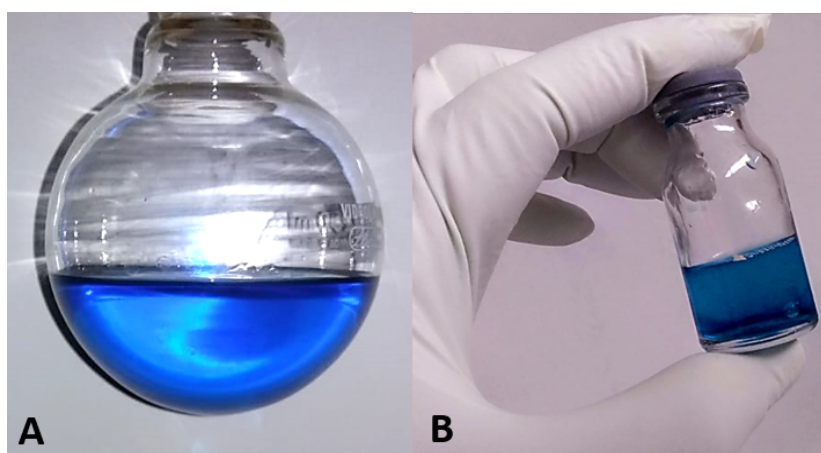
Isolado	Meios de produção	
	Caldo King A	Caldo King A modificado
TGC02	17,8±0,1	58,2±0,1
TGC04	16,9±0,1	58,3±0,1

Visto que não houve diferenças com relação à produção de pigmento entre os isolados TGC02 e TGC04, ambos foram considerados para este trabalho. O meio de produção selecionado foi caldo King A, suplementado com bagaço de malte de cerveja 2% (m/v).

4.2 Produção e caracterização de piocianina

Foram produzidos cerca de 30 mL de solução de piocianina com concentração de 585 µg/mL. Para isto, foi gasto aproximadamente 2000 mL de clorofórmio. A Figura 4 ilustra os aspectos da amostra diluída, destacando a marcante coloração azul.

Figura 4 – Aspectos da piocianina diluída em clorofórmio (A) e água destilada (B)



Crédito das fotos: Bianca Oliveira (A) e o autor (B)

A Figura 5 representa a caracterização molecular da amostra do pigmento obtido. No eixo das abcissas estão os valores de massa (m/z) e no eixo das ordenadas, a intensidade relativa (razão entre intensidade do pico e o pico base). Foram observados pequenos ruídos e um pico maior medindo 210,8909 m/z , sugestivo da piocianina como o composto majoritário da amostra (MM PYO = 210,23 g/mol). Foi possível também identificar um precursor medindo 211,8817 m/z , valor aproximado ao do precursor da piocianina em análises espectrais (211,0870 m/z).

Figura 5 – Espectro fragmentado da amostra do pigmento (250 ng/mL)

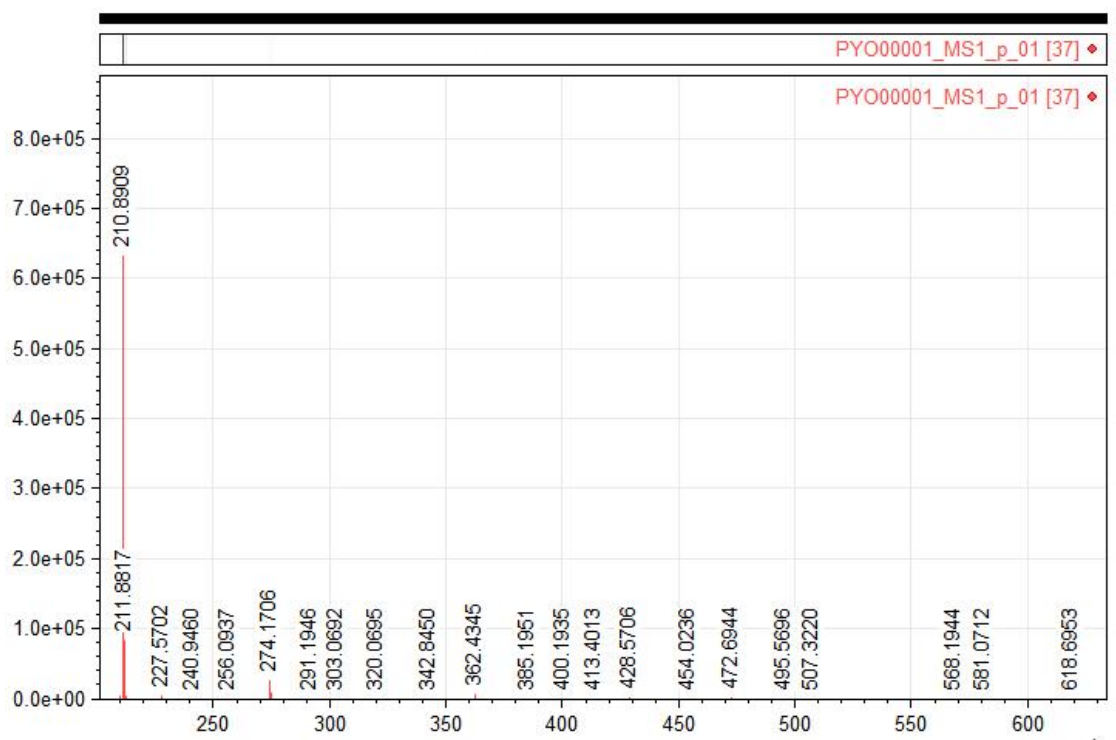


Imagem produzida pelo equipamento. PYO - pyocyanin

4.3 Parâmetros cinéticos

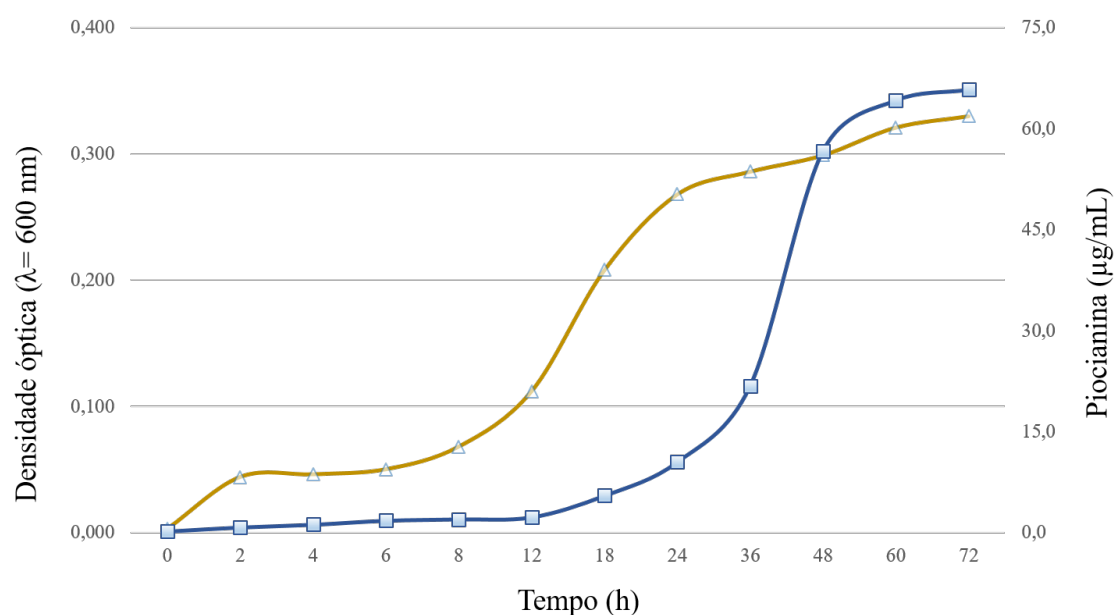
Houve crescimento satisfatório dos isolados TGC02 e TGC04 e o tempo de duplicação durante o crescimento nas primeiras 24 h foi cerca de 3,5 h. Os valores máximos de piocianina foram alcançados com 72 h de bioprocessamento, coincidindo também com os valores máximos de densidade óptica.

Os parâmetros escolhidos para caracterizar fisiologicamente as células foram o número de células por mililitro e a massa celular média, calculada em unidades arbitrárias, proporcionais à OD₆₀₀. Assim, os resultados também foram similares para os isolados TGC02 e TGC04: a população inicial a partir do inóculo foi de 10⁵ células/mL, aumentando cem vezes até o fim do ensaio. Isto representou uma massa celular média

de $0,082 \pm 0,001$ mg/mL, incrementada em 9 vezes para TGC02 ($0,739 \pm 0,012$ mg/mL) e 9,5 vezes para TGC04 ($0,773 \pm 0,015$ mg/mL).

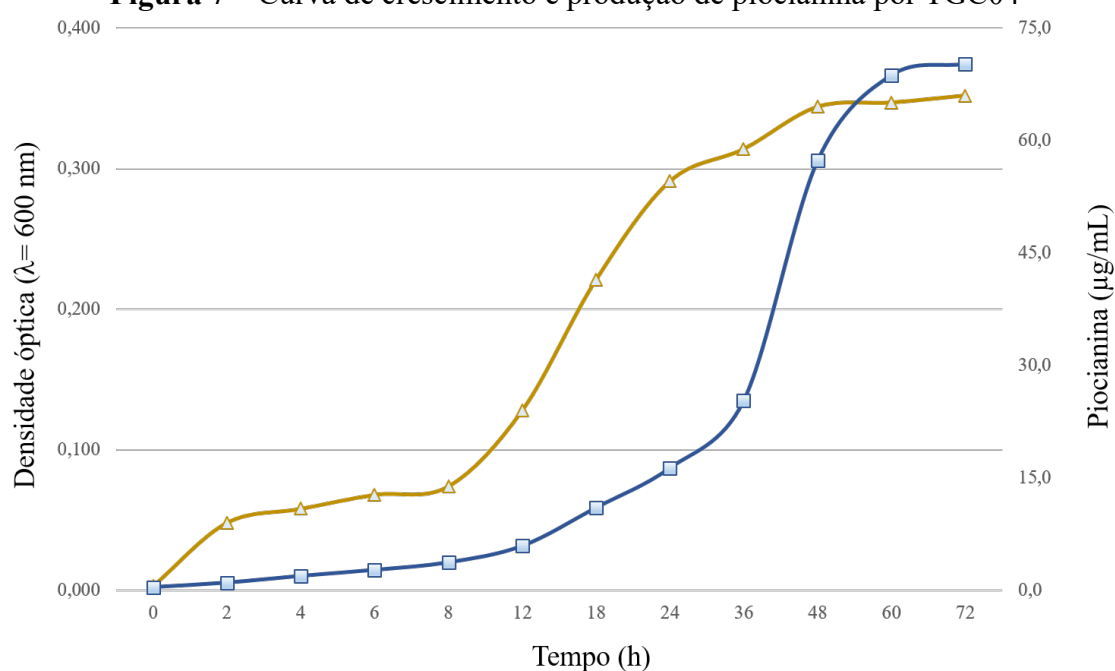
As Figuras 6 e 7 ilustram as curvas de crescimento celular e da produção de piocianina ao longo de 72 h de bioprocesso.

Figura 6 – Curva de crescimento e produção de piocianina por TGC02



A linha amarela com triângulo representa a biomassa e a linha azul com quadrado, a concentração de piocianina

Figura 7 – Curva de crescimento e produção de piocianina por TGC04

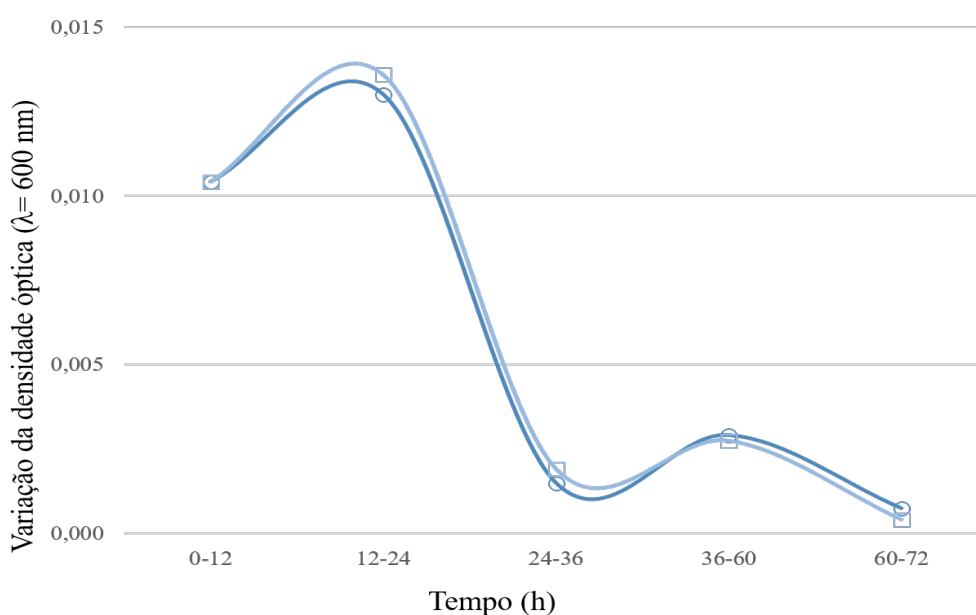


A linha amarela com triângulo representa a biomassa e a linha azul com quadrado, a concentração de piocianina

A concentração máxima de piocianina produzida pelos isolados selvagens *P. aeruginosa* TGC02 e TGC04 foi respectivamente, $65,8 \pm 0,1$ e $70,2 \pm 0,1$ $\mu\text{g/mL}$. Um aumento significativo na síntese do pigmento ocorreu a partir de 36 h de incubação.

Para uma melhor visualização da relação entre a cinética de produção de piocianina com os estágios de crescimento dos isolados de *P. aeruginosa*, foi calculada a taxa de crescimento de TGC02 e TGC04, por meio da variação da OD₆₀₀ para cada intervalo de 12 h (Figura 8).

Figura 8 – Taxa de crescimento dos isolados
Pseudomonas aeruginosa TGC02 e TGC04



A linha escura com círculo representa isolado TGC02 e a linha clara com o quadrado, o isolado TGC04

Por considerar a variação de dois parâmetros: absorbância e tempo, a representação gráfica da taxa de crescimento é uma curva descendente, em que o comportamento da linha no início representa as variações mais pronunciadas, relacionadas às fases iniciais de crescimento após inoculação. Por outro lado, a estabilidade populacional alcançada no final da fase logarítmica e característica da fase estacionária, a variação se torna mais sutil. Assim, foi possível verificar que a partir das 36 h de incubação, quando os valores de piocianina começaram a aumentar significativamente, TGC02 e TGC04 começavam a entrar na fase estacionária. Adicionalmente, o intervalo entre 36-60 h foi crucial, uma vez que a concentração de

piocianina pareceu modular a multiplicação celular. Contudo, os isolados TGC02 e TGC04 ainda se encontravam na fase estacionária ao final do experimento.

Os parâmetros cinéticos avaliados neste estudo se encontram na Tabela 2. Por ter apresentado um tempo de geração menor, o isolado TGC04 obteve os maiores valores de produtividade máxima de células, produtividade máxima de piocianina e coeficiente de rendimento, comparados ao isolado TGC02.

Tabela 2 – Parâmetros cinéticos da produção de piocianina pelos isolados selvagens de *Pseudomonas aeruginosa*

Ensaio	TGC02	TGC04
$Q_{p_{cel}}$ (mg/L.h ⁻¹)	$9,13 \times 10^{-3} \pm 0,02$	$9,74 \times 10^{-3} \pm 0,01$
$Q_{p_{pyo}}$ (μg/mL.h ⁻¹)	$0,93 \pm 0,01$	$0,99 \pm 0,01$
Y_{px} (μg/mL.UA ⁻¹)	$212,38 \pm 0,01$	$240,83 \pm 0,01$
g (h)	$3,76 \pm 0,04$	$3,59 \pm 0,02$

$Q_{p_{cel}}$ – produtividade máxima de células; $Q_{p_{pyo}}$ – produtividade máxima de piocianina; Y_{px} – coeficiente de rendimento; g – tempo de geração nas primeiras 24h

4.4 Tingimento do tecido

Foram produzidas duas tonalidades com a piocianina disponível. Nas Figura 9 e na Tabela 3 estão apresentados o aspecto das soluções de tingimento, bem como as descrições sistemáticas das cores aparentes, produzidas com 50 e 100 μg/mL de piocianina.

Figura 9 – Piocianina diluída em solução hidroalcolica 1:1 (v/v) em pH 8,05



Fonte: autor

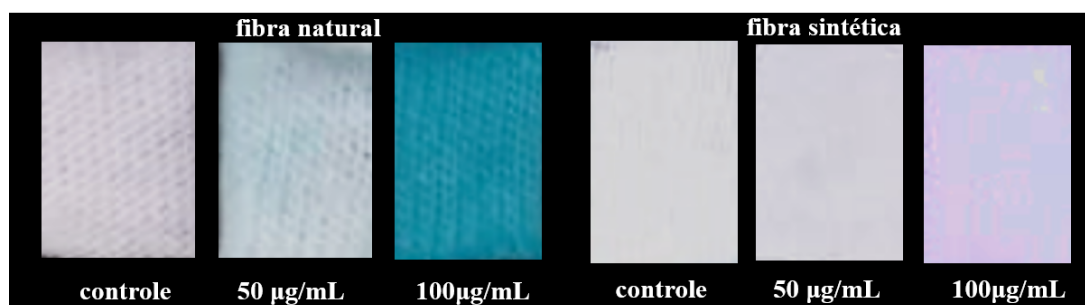
Tabela 3 – Descrição sistemática da cor aparente obtida das soluções de piocianina

Cor	PYO	Hex	RGB	XYZ
	100	#016B93	1,107,147	0.1046, 0.1262, 0.2905
	50	#69A2B5	105,162,181	0.2697, 0.3217, 0.4778

PYO – piocianina ($\mu\text{g/mL}$), Hex – codificação hexadecimal

RGB – sistema *red, green, blue*; XYZ – Sistema matiz (X), saturação (Y) e brilho (Z)

O algodão foi a fibra que melhor adsorveu o pigmento após o tratamento, produzindo duas tonalidades de azul, sem sofrer alterações significativas após lavagem e secagem. O oposto foi verificado na fibra de poliéster/elastano. A adsorção do pigmento foi baixa, influenciando na solidez da cor, cuja percepção à luz branca foi de um lilás-azulado muito pálido. A figura 10 apresenta os resultados do processo de tingimento.

Figura 10 – Aspecto das fibras de algodão e poliéster/elastano tingidas com piocianina

Fonte: autor

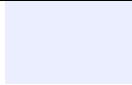
As descrições sistemáticas das cores aparentes produzidas com as fibras testadas estão sumarizadas nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Descrição sistemática da cor aparente obtida na fibra de algodão

Cor	Hex	RGB	XYZ	Piocianina
	#0B91D0	11,145,208	0.2007, 0.2420, 0.4780	100 $\mu\text{g/mL}$
	#69A2B5	105,162,181	0.2697, 0.3217, 0.4778	50 $\mu\text{g/mL}$
	#FFFFFF	255,255,255	0.9642, 1.0000, 0.8252	Controle

Hex- codificação hexadecimal, RGB – formato *red, green, blue*; XYZ – formato matiz, saturação e brilho

Tabela 5 – Descrição sistemática da cor aparente obtidas na fibra de poliéster/elastano

Cor	Hex	RGB	XYZ	Piocianina
	#EBEEFF	235 238 255	0.8346 0.8584 0.8088	100 µg/mL
	#69A2B5	105 162 181	0.2697 0.3217 0.4778	50 µg/mL
	#FEFEFE	254 254 254	0.9556 0.9911 0.8179	Controle

Hex- codificação hexadecimal, RGB – formato *red, green, blue*; XYZ – formato matiz, saturação e brilho

Nos resultados apresentados nas Tabelas 6 e 7 observa-se que a piocianina teve mais afinidade com a fibra de algodão do que com a sintética, tendo sido mais funcional à primeira. Os tons variaram em função da concentração aplicada. A maior retenção de pigmento é representada pelos maiores valores percentuais de absorção e do potencial de exaustão, em comparação à fibra de poliéster/elastano.

Tabela 6 – Parâmetros do tingimento da fibra de algodão (OD₆₉₀)

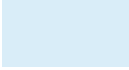
Cor		
Piocianina (µg/mL)	100	50
Absorção do pigmento (%)	65,0±0,2	47,2±0,1
Potencial de exaustão (%)	77,5±0,1	75,3±0,3

Tabela 7 – Parâmetros do tingimento da fibra de poliéster/elastano (OD₆₉₀)

Cor		
Piocianina (µg/mL)	100	50
Absorção do pigmento (%)	11,4±0,2	3,8±0,5
Potencial de exaustão (%)	36,8±0,3	28,6±0,2

5 DISCUSSÃO

5.1 Produção da piocianina

Certas características dos pigmentos naturais, tais como, biodegradabilidade, não carcinogenicidade e baixa toxicidade fazem deles uma fonte atraente para uso humano (JOSHI et al., 2003). Embora o preço do biocorante ainda não seja comercialmente competitivo: 1 mg de piocianina custa entre US\$ 90-130, o uso industrial de pigmentos bacterianos aumentou muitas vezes nas últimas décadas por conta das diversas vantagens sobre os compostos sintéticos (DUFOSSÉ, 2006).

Apesar disso, o uso de corantes ainda domina o movimento no mercado. O gasto com cerca de 1,5 milhões de toneladas de corantes e seus precursores, produzidos e consumidos no início do século XXI custou cerca de US\$ 23 bilhões para a indústria (MAPARI et al., 2005). O maior setor consumidor de corantes é o de alimentos (SHARMA, 2014; NAGPAL et al., 2011), seguido pela indústria cosmética (EL-BANNA et al., 2012; DURAN et al., 2012). Em comparação, o uso de pigmentos na indústria têxtil é menor que os dois primeiros setores citados, contudo, representa uma parcela significativa. Seguindo a lógica, a maioria dos corantes da indústria têxtil ainda é de origem sintética, evocando preocupações em termos dos riscos à saúde e dos impactos ambientais que podem causar, tornando cada vez mais limitante sua utilização, encorajando interesse pela bioprospecção (NUMAN et al., 2018).

A principal abordagem em termos da produção de pigmentos bacterianos se baseia na estratégia do *quorum sensing*, isto é, mecanismo que modula a resposta da bactéria às células vizinhas baseada no controle da expressão gênica em função da densidade celular. Esta resposta é produzida pelo acúmulo de moléculas autoindutoras produzidas em concentrações basais e assimiladas pelas células próximas num processo de sinalização e comunicação celular (RAINA et al., 2011). Assim, pigmentos comercialmente desejados podem ser superproduzidos por meio da indução da comunicação celular. São fornecidos os nutrientes mínimos requeridos pela bactéria e maior quantidade de autoindutores (RAINA et al., 2011). Isto pode otimizar a produtividade e o rendimento do processo, como foi observado em alguns estudos para obtenção de prodigiosina (THOMSON et al., 2000) e violaceína (McCLEAN et al., 1997).

Neste contexto, baseado na premissa de que a presença da piocianina pode organizar a população e sincronizar a expressão de genes que promovem a síntese de

mais piocianina (VAN DER BERGE et al., 2015), sua presença no meio utilizado no pré-inóculo visou garantir que o pigmento estivesse presente no momento da introdução do inóculo, bem como permitiu o aumento gradual da concentração de piocianina ao longo das 72 h seguintes de incubação. Para isso, o agar cetrimida foi utilizado como meio de preparação do pré-inóculo, uma vez que esse meio de cultura possui dois componentes importantes, os quais podiam estimular a síntese de piocianina nos isolados TGC02 e TGC04: o primeiro, glicerol, composto mandatório nos meios para obtenção de piocianina (LEISINGER e MARGRAFF, 1979) e o segundo, brometo de cetiltrimetilamônio, que age como um detergente catiônico, liberando seletivamente nitrogênio e fósforo para *Pseudomonas aeruginosa* (LOWBURY e COLLINS, 1955).

O fósforo, na forma de PO_4^{3-} , é o nutriente crucial para regulação de diferentes metabólitos secundários em microrganismos e especialmente, *P. aeruginosa* é muito sensível à variação da concentração do íon fosfato (WHOOLEY e McLOUGHLIN, 1982). Valores limitantes de fosfato implicam redução de energia e a piocianina age como uma resposta contra o estresse nutricional, regulando a concentração intracelular de ATP (TUNER e MESSENGER, 1986). Este é um dos mecanismos propostos para uma das suas maiores características exibidas pela *P. aeruginosa*: versatilidade, resiliência e persistência em ambientes com elevadas pressões seletivas (MORADALI et al., 2017).

Materiais não convencionais e de baixo custo, por exemplo: chifre de carneiro (KURBANOGU et al., 2015), glicerol bruto obtido da produção de biodiesel (BÜHLER et al., 2013) e resíduos de origem agroindustrial são reportados como substratos alternativos potenciais para a produção de diferentes pigmentos microbianos (CHADNI et al., 2017; ÀRULDASS et al., 2015; BHARATHI et al., 2011; SAENGE et al., 2011). Ressalta-se que o aproveitamento de resíduos, no contexto do emprego de substratos não convencionais como fontes de carbono e energia, permite destinação mais nobre a estes materiais. Em complemento, o uso destes substratos pode desvelar outros impactos positivos, tais como a redução de custos. E, no contexto deste trabalho, a ressignificação de resíduos da indústria cervejeira artesanal.

Para a produção de piocianina, o reuso de resíduos como substrato já foi demonstrado. Oliveira et al. (2019) obtiveram entre aproximadamente 20 e 60 $\mu\text{g/mL}$ do pigmento, estudando diferentes concentrações de bagaço de malte de cerveja. Adicionalmente, Cavalcanti et al. (2017) observaram produção de piocianina em reatores contendo tortas de amendoim, algodão e gergelim durante a remoção de

hidrocarbonetos por *P. aeruginosa* no solo. Este achado atribuiu à piocianina uma possível participação nos mecanismos utilizados pela bactéria durante a assimilação de compostos recalcitrantes como fontes de carbono e energia, possivelmente associado aos mecanismos de *quorum sensing* para síntese de biossurfatantes e outros agentes tensoativos (DAS e MA, 2013; VIANA et al., 2018).

Os carotenoides são os compostos mais investigados no contexto da produção de biocorantes para a indústria têxtil (KRAMAR et al., 2014). Na extensa literatura consultada, não há praticamente referência direta à exploração da piocianina com fins de coloração de fibras. Apenas um estudo identificou um pigmento descrito como solúvel em clorofórmio, de cor azul, produzido após 48 h de incubação à 37 °C, durante a fase estacionária de uma bactéria isolada de solo contaminado por petróleo. O manuscrito não apresentou detalhes sobre a identificação da bactéria, tampouco da caracterização do pigmento, mostrando apenas um espectrograma com $\lambda_{\text{max}} = 380$ nm (CHATTERJEE e BHOWAL, 2016).

Apesar das poucas informações prestadas pelo estudo, as características descritas sugerem que o organismo em questão se tratava de *P. aeruginosa* e o pigmento, a piocianina. Numa das primeiras investigações mais aprofundadas sobre a produção do pigmento, foi descrito que na sua forma oxidada (azul), o composto exibiu bandas de absorção com λ_{max} entre 238-311 nm (KURASHI, 1958). Mais de meio século depois, o melhoramento da acurácia das técnicas e equipamentos, permitiu a identificação do $\lambda_{\text{max}} = 380$ nm e um segundo, mais baixo, por volta de 700 nm, relacionado às formas protonada e ionizada do pigmento (MOAYEDI et al., 2017; MULLER, 2011).

Na caracterização do pigmento realizada para o presente trabalho, a presença do maior pico em 210,89 *m/z* foi indicativa de piocianina, cuja massa molecular é um valor relativamente próximo, 210,23 g/mol (VIPIN et al., 2017). Os ruídos relativos à sensibilidade do equipamento na identificação de analitos complexos, como os extratos naturais são característicos, podem justificar esta diferença. Contudo, os estudos que utilizam uma transição de *m/z* para caracterizar a identidade de um analito são considerados autoconfirmativos, uma vez que o analito pode ser identificado pela relação *m/z*, cujo padrão também analisado, permite conhecer o tempo de retenção característico do determinado composto (WATSON e SPARKMAN, 2007).

O aparente desinteresse pela piocianina como pigmento têxtil pode estar associado à condição de oportunista creditada à *P. aeruginosa*. Entretanto, cabe ressaltar

que pigmentos extraídos de microrganismos patógenos ou de plantas e animais venenosos não são os responsáveis por essas características, embora alguns casos, certos pigmentos são associados aos fatores de virulência do microrganismo produtor, como no caso da piocianina (MORKUNAS et al., 2012).

Cabe ressaltar que para um determinado organismo produtor de pigmento, estes metabólitos estão associados a fenômenos com muito mais importância. Funções importantes às células são realizadas por estes pigmentos, como por exemplo, proteção e suplantação dos estresses ambientais (ABAD et al., 2010; HASSETT et al., 1992), além de atividades fisiológicas importantes como a fotossíntese (MOORE et al., 2020). Em complemento, os pigmentos podem também servir como sinalização biológica para uma complexa diversidade de interações entre diferentes organismos (LI e NIZET, 2009). Esta sinalização pode orientar uma infinidade de informações, seja por exemplo, perigo para possíveis predadores (LEV-YADUN, 2016), seja dominância (PÉREZ-RODRÍGUES, 2017) e até conspícua³ de parceiros sexuais (KEMP et al., 2012)

Determinados pigmentos naturais também demonstram atividade biológica e/ou farmacológica, podendo ser considerados potenciais agentes para aplicação em diversas funções que não apenas como agente de cor. Dentre as funções exploradas em biocorantes se destacam: ação antitumoral (YADAV et al., 2014), antioxidante (GUYOMARC'H et al., 2000), imunorreguladora (ANTONISAMY e IGNACIMUTHU, 2010), anti-inflamatória (KANG et al., 2011), protetora contra radiação ultravioleta (KIM et al., 2007), antiparasitária (ARUN e SINGH, 2013), antimicrobiana (MELLOULI et al., 2003) e antibiofilme (BONIFÁCIO et al., 2020). Em complemento, a avaliação *in silico* sugeriu uma atividade antiviral potencial de alguns pigmentos, como o caso da prodigiosina, cuja atividade ocorre por meio de interação proteína-ligante (SURYAVANSHI et al., 2016).

5.2 Parâmetros cinéticos

Em condições ótimas de incubação, a produção de piocianina em meios sintéticos, especialmente King A, ocorre a partir de 48 h após o início do crescimento, coincidindo com o final da fase logarítmica e o início da fase estacionária (CABEEN, 2014). Entretanto, diante escassez e estresse nutricional, é comum para que *P. aeruginosa* mantenha seu crescimento, a piocianina seja produzida em níveis basais

³ Identificação da diferenciação de gêneros pelas cores, como ocorre em aves e artrópodes, por exemplo

(DAS e MANEFIELD, 2012). Isto permite a conservação da viabilidade, uma vez que o pigmento regula a concentração de ATP intracelular (McDERMOTT et al., 2012).

Embora determinados estresses ambientais não favoreçam a *P. aeruginosa* durante as fases de crescimento, a piocianina exerce um importante papel relacionado à adequação da viabilidade celular em um ambiente estressante, bem como de sua colonização e permanência. Neste cenário, é sugerido que a piocianina seja reconhecida como um metabólito multifuncional (ÖZCAN e KAHRAMAN, 2015), ou ao menos assumir que, embora seja um metabólito secundário por ser produzido tardiamente, a importância primária deve ser reconhecida, uma vez que o pigmento consegue sincronizar as células em resposta a um estado fisiológico particular (DIETRICH et al., 2006).

Ressalta-se que a piocianina, por desempenhar diferentes papéis fundamentais à *P. aeruginosa*, não se enquadra na definição clássica do termo metabólito secundário, isto é, molécula de baixa molecular produzida durante a idiofase, quando o crescimento é limitado pela exaustão nutricional, contudo não está envolvida diretamente no metabolismo, no crescimento ou na reprodução de seus produtores (PATHMA et al., 2011). Na era das ômicas, um conceito mais abrangente para os metabólitos secundários está emergindo, especialmente por considerar a diversidade de compostos produzidos por uma única espécie, bem como da importância ecológica que exercem nas interações microbianas (TYC et al., 2017).

A produção de piocianina também é regulada por comunicações químicas dependentes de concentração celular usados para coordenar comportamentos em grupo (BORGES et al., 2018; LI et al., 2017). Em razão disto, o tempo de duplicação é um fator importante para *P. aeruginosa*. Sob condições controladas de crescimento, a bactéria pode duplicar a população entre cerca de 3-6 h (TAMAGNINI e GONZALES, 1997). O tempo de duplicação dos isolados selvagens deste estudo coincidiu com o intervalo teórico, alcançando entre 3,0-3,5 h, valores próximos aos observados por Viana et al. (2017) e menores aos obtidos num estudo de competição entre *P. aeruginosa* e bactérias coliformes (VASCONCELOS; LIMA e CALAZANS, 2010).

A quantidade de piocianina pode ser variável para uma mesma linhagem ou isolado, submetida às mesmas condições de incubação, em diferentes ocasiões. Isso possivelmente relaciona-se aos possíveis estresses a que as bactérias são expostas quando mantidas em laboratório (GARAY-ARROYO et al., 2004). Em meio aquoso, ao qual incluem o caldo King A, com formulação original ou modificada, podem ser

obtidos entre 0,31 até 80 $\mu\text{g/mL}$ de piocianina (HASSANI et al., 2011; EL-SHOUNY; AL-BIDANI e HAMZA 2011). Contudo, diversos estudos relatam uma média de produção entre aproximadamente 10 e 65 $\mu\text{g/mL}$ (OLIVEIRA et al., 2019; VIANA et al., 2018; DAS e DAS, 2015; EL-FOULY, 2015; BARAKAT et al., 2015). Ressalta-se que as obtenções de concentrações acima de 60 $\mu\text{g/mL}$ de piocianina foram conseguidas aumentando o tempo de incubação para 96 ou até 120 h, bem como incrementaram-se os meios com maiores concentrações de peptona (AGRAWAL e CHAUAN, 2016; GHARIEB et al., 2013). Esta estratégia é contrária ao aplicado no presente trabalho, uma vez que repetidas operações de extração e concentração permitiram a obtenção de uma quantidade significativa de pigmento.

A máxima produção de células ocorreu por volta de 60 h, num processo de estabilização da população iniciado por volta de 48 h de incubação, enquanto a piocianina continuou sendo produzida. Além disso, a associação entre o crescimento celular com a produção de piocianina entre 8 e 72 h sugere que TGC02 e TGC04 utilizaram o substrato tanto para a formação de biomassa, como para a produção de pigmento. Esta observação também foi reportada num estudo prévio (SAHA; THAVASI e JAYALAKSHMI, 2008). A máxima produção de biomassa foi alcançada em 66 h de processo e permaneceu estável enquanto a piocianina continuou sendo produzida até 72 h. Os autores atribuíram a manutenção da estabilidade da população, à variação de fenazinas produzidas durante a fase de crescimento, em respostas aos sinais difundidos no meio.

A massa celular média é um parâmetro conhecido por variar bastante em função do meio de cultura empregado e essa variação é maior nos meios de enriquecimento. A diferença entre a massa celular média, de um meio rico para um meio pobre em nutrientes, pode exceder um fator 5 vezes durante a fase estacionária (KUBITSCHKE, 1974; SCHAECHTER; MAALØE e KJELDGAARD, 1958). Contudo, a determinação da massa celular média é um indicador sensível do estado fisiológico das células (KIM et al., 2012). Quando a OD_{600} se aproxima de 0,3 ($\approx 10^7$ células/mL), o crescimento se torna desequilibrado, marcado inicialmente por uma repentina inclinação da curva e geralmente indicando um estado estacionário, que continua até a saturação, quando ocorre redução da taxa de crescimento, culminando numa curva decrescente, marcando também o final da fase estacionária (SEZONOV et al., 2007).

Todavia, a redução da concentração celular média nem sempre está relacionada apenas ao empobrecimento gradual de nutrientes no meio. O acúmulo de metabólitos é um segundo fator associado à inibição ou à desaceleração da taxa de crescimento (PINHAL et al., 2019). Neste contexto, sugere-se que a piocianina também pode modular o crescimento de *P. aeruginosa* a partir dos estágios finais da fase logarítmica e início da fase estacionária. Neste estudo, isto parece ter ocorrido quando a concentração do pigmento se encontrava por volta de 60 µg/mL.

Esta hipótese é sustentada por resultados de estudos prévios (DAS e DAS, 2015; DANTAS et al., 2013; DIETRICH et al., 2006). Sugere-se que o fenômeno é diretamente relacionado à formação do sistema de transporte de íons, bem como geração de CN^- , produto do metabolismo da glicina (LUNDGREN et al., 2013). Ainda não está claro o papel do íon cianeto para a bactéria. Como fator de virulência, o CN^- é extremamente tóxico e se liga irreversivelmente ao terminal das oxidases da cadeia respiratória, inibindo a respiração aeróbica (LENNEY e GILCHRIST, 2006).

A piocianina também promove aumento da expressão de genes e operons que funcionam no transporte e controle redox, assim como diminui a expressão de genes e operons envolvidos na aquisição de Fe^{3+} . Em contraste, a redução da expressão de piocianina também permite que as células não sejam fisiologicamente perturbadas (EL-FOULY et al., 2015).

Cabe destacar que *P. aeruginosa* possui um sistema de resistência ao estresse oxidativo, bem como para os efeitos tóxicos causados pela piocianina nas células sensíveis ao pigmento. A ativação desse mecanismo é associada à concentração de fosfato intracelular. De forma breve, ocorre a expressão de catalase, superóxido dismutase e oxidoredutases, que promovem um ciclo redox mediado pelo NADPH, neutralizando a piocianina de seu estado protonado e com isso, balanceando o meio intracelular, mantendo a célula estável no ambiente e prolongando seu estado estacionário (HASSET et al., 1992). Existe igualmente um mecanismo para evitar os efeitos tóxicos do cianeto. A bactéria parece fazer uso de mecanismos ativos de desintoxicação e síntese da cadeia respiratória, na qual as oxidases são insensíveis ao CN^- (CUNNINGHAM e WILLIAM, 1995).

5.3 Processo de tingimento

A cor de um determinado produto ou material é o primeiro, o mais importante e o mais prazeroso parâmetro atribuído pelo observador. Isso deve ser visto mais além do que um mero valor estético e sensorial de determinado produto, porque sobre a cor estão atribuídas percepções importantes associadas à segurança, frescor, aceitação, reconhecimento, pertencimento e decisão (TULI et al., 2015).

As malhas são formadas pelo entrelaçamento do fio consigo mesmo, num processo denominado por trama ou urdume, quando os fios são organizados longitudinalmente, com laçadas passadas sobre laçadas, sem ponto fixo de ligação entre eles, atribuindo flexibilidade, elasticidade, porosidade e estabilidade dimensional (LOBO; LIMEIRA e MARQUES, 2014). As malhas de algodão assumem um importante lugar em termos da utilização de fibras têxteis naturais pela humanidade, ao longo da história. Por mais de 7000 anos, elas foram envoltas de riqueza e exploração humana. O algodão é um material hidrofílico empregado nos tecidos laváveis em diversos fios de malharia. Ele é constituído por cerca de 90-93% de celulose derivada de *Gossypium* spp. e exibe diferentes propriedades, pelas quais seu uso é bastante difundido (LAWS, 2013).

Por outro lado, o poliéster é uma fibra sintética de cadeia longa, com propriedades hidrofóbicas e quimicamente composta por ao menos 85% em peso de um éster, produto da reação de um álcool di-hídrico e o ácido tereftálico, derivados de hidrocarbonetos do petróleo. O material é muito comum no mercado porque é uma fibra de baixo custo e muito durável. Além disso, pode ser combinado com diferentes outras fibras, naturais ou sintéticas, como o elastano. Esta combinação resulta no aumento da resistência à abrasão, bem como a durabilidade (GUARATINI e ZANONI, 2000).

Os corantes têxteis são substâncias que impregnam as fibras reagindo ou não com o material durante o processo de tingimento. Nas fibras naturais, especialmente o algodão, são empregados corantes de diferentes classes, contudo os que apresentam os melhores resultados são os corantes reativos, que se fundem à fibra, e os corantes diretos, hidrossolúveis e que se ligam à fibra por meio de forças iônicas, interações de Van der Waals e pontes de hidrogênio. Isto pode explicar os maiores percentuais de absorção do pigmento e do potencial de exaustão terem sido observados na fibra de algodão, comparada à fibra sintética, que em tese exige um corante com natureza hidrofóbica ou se for um corante hidrofílico, exigirá um processamento de forma a se

apresentar como um sistema de dispersão, por exemplo, micelas (HU et al., 2012; CHNG e CHAO, 2007).

Nas fibras sintéticas como o poliéster, os corantes mais empregados são do tipo dispersos. Como o próprio nome sugere, estes corantes são dispersões aquosas ou suspensões coloidais que formam soluções sólidas nas fibras. Neste contexto, a velocidade e o sucesso do tingimento de uma fibra dependem de diferentes variáveis tanto da fibra, como do agente de cor. As variáveis mais importantes da fibra são o tipo e a permeabilidade. Em complemento, as características mais importantes do corante/pigmento são a natureza e as interações com a fibra. Estas características são dependentes de fatores físico-químicos cruciais, por exemplo, atração elétrica, adsorção e difusão do corante, estado de agregação, solubilização e ligações químicas, dos tipos iônica, covalente e de pontes de hidrogênio (GUARATINI e ZANONI, 2000).

O processo de tingimento de uma fibra ocorre em duas fases. Na primeira, denominada por fase cinética, ocorrem a transferência do corante do banho para a fibra, a adsorção do composto à fibra e finalmente a difusão. A segunda fase, termodinâmica, está relacionada à expansão do corante por todo o espaço entre a fibra e o banho até que o equilíbrio seja atingido no sistema (GAMAL et al., 2010; VIEIRA et al., 2009). Isto está também relacionado à saturação do pigmento à fibra e este fenômeno é governado pelas isotermas de adsorção⁴, relações lineares da concentração do corante no banho e na fibra, em uma dada temperatura, finalizado no ponto de saturação da fibra (MACHADO et al., 2014).

Os biocorantes ou pigmentos bacterianos são aplicados às fibras em processos semelhantes aos corantes por meio de dois métodos: por banho à quente, do pigmento extraído de uma célula produtora ou por mergulho à quente, no extrato colorido. A intensidade da cor pode variar dependendo do tempo de duração do banho e do mergulho, pH e concentração do pigmento (RÄIÄNEN, 2018; AHMAD et al., 2011). Certos pigmentos bacterianos, como por exemplo prodigiosina e violaceína, podem ser aplicados com sucesso em diferentes fibras naturais e sintéticas, tais como seda, algodão, lã, náilon, poliéster e fibras acrílicas (VENIL; ZAKARIA e AHMAD, 2013; ALIHOSSEINI et al., 2008).

⁴ Relação de equilíbrio entre a concentração de determinado material na fase fluida e a concentração nas partículas adsorventes, em uma dada temperatura

As fenazinas são moléculas hidrofílicas produzidas por muitos gêneros bacterianos e juntos representam todas as cores do espectro visível (TUNER e MESSENGER, 1986). São conhecidos mais de 100 tipos de fenazinas e outras mais de 6000 moléculas contendo fenazinas como composto central (PIERSON e PIERSON, 2010). A piocianina é um pigmento com potencial para utilização na indústria têxtil porque não altera a cor aparente quando submetida às temperaturas altas. Saha; Thavasi e Jayalakshmi (2008) verificaram esta propriedade por meio de um método simples de difusão do pigmento em agar, aplicado ainda com ele no estado líquido. Entretanto, a variação da cor da piocianina tem mais relação às flutuações do pH (BARON e ROWE, 1981).

O desempenho do tingimento depende das propriedades da fibra, bem como do método aplicado. Além disso, o resultado do tingimento é diferente para cada espécie de fibra testada (SHIRATA et al., 2000). Infelizmente, por não apresentarem afinidade química forte à diferentes fibras, o uso de biocorantes, especialmente de natureza hidrofílica, pode se tornar limitado. Esta característica faz mandatória a aplicação de mordentes⁵, tais como sais metálicos, taninos ou ácidos orgânicos fracos que atuam incorporando os pigmentos ao formarem complexos com a fibra, consequentemente dificultando a remoção. A depender do mordente empregado, cores muito fortes podem ser produzidas (WISNIAK, 2004). Uma estratégia mais inovadora foi testada com algodão, utilizando copolímeros de PEG-VTES⁶, que reduziram a tensão superficial, permitindo a resistência do corante/pigmento à fibra ao longo do tingimento (CHAO et al., 2012).

Ressalta-se que o bicarbonato de sódio foi o mordente usado neste estudo, indicado para fins de tingimento de fibras naturais (YAQUB et al., 2018). Outros mordentes podem produzir tingimentos com máxima qualidade de coloração, porém foi escolhido por sua natureza alcalina, a qual garantiu a manutenção da piocianina em seu estado ionizado, percebido pelo olho humano como da cor azul. Embora os mordentes ácidos costumem ser mais eficazes do ponto de vista da produção de cores fortes e maior solidez, em pH ácido (≤ 4), a piocianina muda para seu estado protonado, assumindo uma coloração vermelha (HERIYANTO et al., 2012) e esta cor não era desejada para os objetivos do presente trabalho.

⁵ Do latim *mordere* (morder) em referência à ação quelante

⁶ Combinação de polietilenoglicol e viniltrióxissilano

Ressalta-se que o uso do bicarbonato de sódio como mordente pode produzir resultados comparáveis aos obtidos quando os ácidos tanínico e oxálico são empregados. Resultados similares também podem ser alcançados com aplicação do extrato do tanino, extraído de sementes de tamarindo (WIN; KHAING e KHAING, 2019; MARISELVAM et al., 2018).

Os problemas relacionados ao tingimento e solidez da cor da fibra sintética, com natureza hidrofóbica, representada neste estudo pelo poliéster/elastano, poderiam ser resolvidos, por exemplo, utilizando nanosistemas contendo os biocorantes (REN et al., 2017), bem como, de uma forma mais simplificada, realizar uma triagem do mordente (SINGH e BHARATI, 2015). O sulfato de cobre, por exemplo, é considerado um dos melhores mordentes na obtenção de bons resultados, em termos de tons fortes de azul e amarelo. Além disso, garante rapidez durante o tingimento (ZUBAIRU e MSHELIA, 2015). No entanto, o mordente foi preterido em razão do apelo ecológico deste estudo. O cobre é associado a riscos à saúde e ao ambiente (FAGNANO et al., 2020). Além disso, o sal poderia mascarar o resultado final sobre a matiz azul pretendida apenas com o uso da piocianina.

A cor aparente resultante em ambas as fibras tingidas com piocianina foi entre o azul claro e o lilás-azulado. Segundo Lobo; Limeira e Marques (2014), a solidez da cor no tecido é uma propriedade alcançada com o mordente durante o processo de tingimento. Entretanto, o conjunto das variáveis em todo o processo de tingimento, ou seja, propriedades da fibra, do pigmento, do mordente e da água, interferem nos resultados. Em complemento, a adsorção do pigmento numa fibra envolve dois processos que podem estar diretamente relacionados aos tons atingidos. O primeiro ocorre pela precipitação do pigmento no interior da fibra. O segundo, por meio de reações químicas entre o pigmento com a fibra. Quanto maior a afinidade química entre os dois, mais fortes as tonalidades se apresentam (SHANG, 2013).

A piocianina é um pigmento muito solúvel em água, além de exibir termoestabilidade à 90 °C por até 72 h, com um ponto de ebulição de 350 °C (HERIYANTO et al., 2012). Por sua natureza hidrofílica, a piocianina tende a se adsorver melhor às superfícies hidrofílicas, como ocorrido no algodão. Por outro lado, pouco interage com materiais hidrofóbicos, representado neste estudo pelo poliéster/elastano. Adicionalmente, o poliéster não apresenta grupos ácidos ou básicos, limitando a fixação de corantes, que tendem a não resistir à lavagem ou sofrem

sublimação (GUARATINI e ZANONI, 2000). Isto pode justificar as diferenças marcantes nas cores aparentes, resultantes nas fibras testadas.

Contrariamente ao obtido por este estudo, Kramar et al. (2014) alcançaram os melhores resultados, em termos de tingimento, nos tecidos sintéticos. Foram utilizados dois extratos de coloração vermelha, isolados de *Streptomyces* sp. do solo. Os autores observaram um tingimento muito pobre sobre o algodão, enquanto o poliéster foi tingido, ainda que em menor intensidade, ao comparar os resultados das outras fibras sintéticas testadas: viscose, poliamida, acrílico e triacetato. Os diferentes tons podiam ser conseguidos, variando o pH. A análise molecular revelou que os extratos possuíam derivados de prodigiosina. Os compostos majoritários eram formados por cadeias alifáticas conectadas a um corpo de prodigiosina, composto por três anéis heterocíclicos. Por se tratar de uma mistura complexa e não uma molécula purificada, os autores atribuíram isto à pouca adsorção do pigmento ao algodão e a afinidade aos polímeros sintéticos. Eles ainda fizeram uma ressalva sobre o fato da prodigiosina extraída de *Serratia marcescens* quando purificada, pode alcançar funcionalidade com as fibras naturais, especialmente o algodão.

Identificado, mas não caracterizado, um novo pigmento, de coloração azul intensa foi apresentado por Fujikawa e Akimoto (2011). Os autores descreveram o organismo produtor como uma linhagem selvagem de *Pantoea agglomerans*. A espécie foi incluída na lista de bactérias hábeis em produzir pigmentos azuis ou roxos, ressaltando o fato de que essas cores são muito raras, em termos microbianos. Especialmente o pigmento foi sensível à temperatura, variando do azul intenso à um amarelo-pálido, sendo discutido num contexto de aplicação como indicador de temperatura durante a estocagem de produtos sensíveis às alterações drásticas de temperatura, tais como alimentos e insumos farmacêuticos. Contudo, o estudo parece não ter evoluído, uma vez que não houve trabalhos em sequência, de acordo com a pesquisa bibliográfica levantada, tampouco a molécula recebeu nome, até o conhecimento da publicação desta Dissertação.

Por outro lado, de Britto et al. (2020) isolaram piocianina num estudo focado na atividade da molécula como um potencial agroquímico⁷. De forma secundária, os autores aplicaram uma solução do pigmento diretamente sobre amostras de algodão branco, em seguida lavaram com sabão e desvincaram à quente, num período de 24 h.

⁷ Molécula bioativa natural com potencial uso como pesticida

Como resultado desta curiosidade, o resultado foi bastante interessante, uma vez que foram obtidas cores sólidas e duradouras, variando entre tons de rosa, possivelmente obtida por não haver correção do pH, no entanto, os autores destacam em sua conclusão, que a piocianina apresenta-se como fonte alternativa para uso como agente de cor para materiais têxteis, de origem natural, dotado de forte durabilidade e um interessante espectro de cores.

Neste contexto, sendo reconhecidas mundialmente as questões ecológicas e éticas, o consenso do mundo de hoje é a garantia de um futuro mais sustentável, carecendo de esforços concretos por parte de cada cidadão. Por razões óbvias, esta mudança de atitude também alcança a indústria têxtil, que deve evoluir e convergir à tecnologia verde, ambientalmente correta.

6 CONCLUSÕES

- ❖ O bagaço de malte serviu como uma boa alternativa de substrato para produção de biomassa e piocianina com alto grau de pureza;
- ❖ A piocianina pareceu regular o crescimento celular dos isolados selvagens *Pseudomonas aeruginosa* TGC02 e TGC04;
- ❖ Os isolados TGC02 e TGC04 produziram piocianina em quantidade suficiente para ser preparada duas tonalidades de cor, proporcionais à concentração do pigmento em solução hidroalcolica;
- ❖ A fibra de algodão demonstrou maior afinidade à piocianina, resultando matizes azuis sólidas;
- ❖ Nas condições experimentais aplicadas, o biocorante não foi ideal para o tingimento da fibra de poliéster/elastano. Contudo, sugere-se futuras investigações para otimização e melhoramento da funcionalidade da aplicação da piocianina como agente de cor em diferentes fibras, incluindo as sintéticas.

REFERÊNCIAS

- ABAD, A.; FERNÁNDEZ-MOLINA, J.V.; BIKANDI, J.; RAMÍREZ, A.; MARGARETO, J.; SENDINO, J.; HERNANDO, F.L.; PONTÓN, J.; GARAIZAR, J.; REMENTERIA, A. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol.* v. 27, n. 4, p. 155-182, 2010.
- ABDUL-HUSSEIN, Z. R.; ATIA, S. S. Antimicrobial effect of pyocyanin extracted from *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Exp Biol.* v. 6, n. 1, p. 1-4, 2016.
- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO 105-C06:2010. Têxteis — Ensaio de solidez da cor à lavagem doméstica e comercial. Rio de Janeiro: ABNT, 2010. 10p.
- ABU, E. A.; SU, S.; SALLANS, L.; BOISSY, R.E.; GREATENS, A.; HEINEMAN, W.R.; HASSETT, D. J. Cyclic voltammetric, fluorescence and biological analysis of purified aeruginosin A, a secreted red pigment of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology.* v. 159, p. 1736-1747, 2013.
- AGRAWAL, A.H.; CHAUHAN, P.B. Effect of cultivation media components on pyocyanin productions and its application in antimicrobial property. *Int J Curr Adv Res.* v. 5, n. 4, p. 829-833, 2016.
- AHMAD, W.A.; AHMAD, W.Y.W.; ZAKARIA, Z.A.; YUSOF, N.Z. Application of bacterial pigments as colorant. In: AHMAD, W.A.; AHMAD, W.Y.W.; ZAKARIA; YUSOF, N.Z. **Application of bacterial pigments as colorant**. New York: Springer, p. 57–74, 2011.
- AHMED, H.E. Natural dyes in historical Egyptian textiles. *Latest Trends Textile Fashion Desing.* v. 3, n. 2, p. 309-310, 2019.
- ALIHOSSEINI, F.; JU, K.S.; LANGO, J.; HAMMOCK, B.D.; SUN, G. Antibacterial colorants: characterization of prodiginines and their applications on textile materials. *Biotechnol Prog.* v. 24, n. 3, p. 742–747, 2008.
- ANTONISAMY, P.; IGNACIMUTHU, S. Immunomodulatory, analgesic and antipyretic effects of violacein isolated from *Chromobacterium violaceum*. *Phytomedicine.* v. 17, n. 3-4, p. 300–304, 2010.
- ÀRULDASS, C.A.; RUBIYATNO; VENIL, C.K.; AHMAD, W.A. Violet pigment production from liquid pineapple waste by *Chromobacterium violaceum* UTM5 and evaluation of its bioactivity. *RSC Adv.* n. 64, p. 51524-51536, 2015. doi: 10.1039/C5RA05765E.
- ALLYDICE-FRANCIS, K.; BROWN, P.D. Diversity of antimicrobial resistance and virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* associated with fresh vegetables. *Int J Microbiol.* doi: 10.1155/2012/426241, 2012.

- ARUN, N.; SINGH, D. Differential response of *Dunaliella salina* and *Dunaliella tertiolecta* isolated from brines of Sambhar Salt Lake of Rajasthan (India) to salinities: a study on growth, pigment and glycerol synthesis. *J Mar Biol Assoc India*. v. 55, n. 1, p. 65–70, 2013.
- BAHARI, S.; ZEIGHAMI, H.; MIRSHAHABI, H.; ROUDASHTI, S.; HAGHI, F. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by subinhibitory concentrations of curcumin with gentamicin and azithromycin. *J Global Antimicrob Resistance*. v. 10, n. 1, p. 21-28, 2017.
- BARAKAT, K.M.; MATTAR, M.Z.; SABAE, S.Z.; DARWESH, O.M.; HASSAN, S.H. Production and characterization of bioactive pyocyanin pigment by marine *Pseudomonas aeruginosa* Osh1. *Res J Pharm Biol Chem Sci*. v. 6, n. 5, p. 933-943, 2015.
- BARON, S.S.; ROWE, J.J. Antibiotic action of pyocyanin. *Antimicrob Agents Chemother*. v. 20, n. 6, p. 814–820, 1981.
- BECHTOLD, T.; MAHMUD-ALI, A.; MUSSAK, R. Anthocyanin dyes extracted from grape pomace for the purpose of textile dyeing. *J Sci Food Agric*. v. 87, n. 14, p. 2589–2595, 2007.
- BHARATHI, V.; LAKSHMINARAYANAN, R.; JAYALAKSHMI, S. Melanin production from marine *Streptomyces*. *Afr J Biotechnol*. v. 10, n. 54, p. 11224-11234, 2011.
- BLANKENFELDT, W.; PARSONS, J.F. The structural biology of phenazine biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol*. v. 29, n. 1, p. 26-33, 2014.
- BONIFACIO, T.T.C.; ARRUDA, R.R.A.; OLIVEIRA, B.T.M.; SILVA, J.E.G.; VASCONCELOS, U. Exposure to pyocyanin promotes cellular changes in *Candida* spp. *Res J Pharm Biol Chem Sci*. v. 11, n. 4, p. 111-119, 2020.
- BORGES, A.; SIMÕES, M.; TODOROVIĆ, T.R.; FILIPOVIĆ, N.R.; GARCÍA-SOSA, A.T. Cobalt complex with thiazole-based ligand as new *Pseudomonas aeruginosa* quorum quencher, biofilm inhibitor and virulence attenuator. *Molecules*. v. 23, p. 1-15, 2018. doi:10.3390/molecules23061385.
- BRECOULAKI, H. “Precious colours” in ancient Greek polychromy and painting: material aspects and symbolic values. *Rev Arqueol*. v. 1, n. 57, p. 3-35, 2014.
- BÜHLER, R.M.M.; DUTRA, A.C.; VENDRUSCOLO, F.; MORITZ, D.E.; NINOW, J.L. Monascus pigment in bioreactor using a co-product of biodiesel as substrate. *Ciênc Tecnol Aliment*. v. 33, supl. 1, p. 9-13, 2013.
- CABEEN, M.T. Stationary phase-specific virulence factor overproduction by a lasR mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS One*. v. 9, n. 2, p. 1-9, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0088743.

- CAVALCANTI, T.G.; SOUZA, A.F.; FERREIRA, G.F.; DIAS, D.S.B.; SEVERINO, L.S.; MORAIS, J.P.S.; SOUSA, K.A.; VASCONCELOS, U. Use of agro-industrial waste in the removal of phenanthrene and pyrene by microbial consortia in soil. *Waste Biomass Valor.* v. 2017, p. 1-10. doi: 10.1007/s12649-017-0041-8.
- CAWLEY, A.; GOLDING, S.; GOULSBRA, A.; HOPTROFF, M.; KUMARAN, S.; MARRIOTT, R. Microbiology insights into boosting salivary defenses through the use of enzymes and proteins. *J Dentistry.* v. 80, Sup. 1, p. S19–S25, 2019.
- CHADNI, Z.; RAHAMAN, M.H.; JERIN, I.; HOQUE, K.M.F.; REZA, M.A. Extraction and optimization of red pigment production as secondary metabolites from *Talaromyces verruculosus* and its potential use in textile industries. *Micology.* v. 8, n. 1, p. 48-57, 2017.
- CHANG, S.; CHAO, Y. Preparation of microemulsion based disperse dye inks for thermal bubble ink jet printing. *J Imaging Sci Technol.* v. 51, n. 5, p. 413-418, 2007.
- CHAO, Y.-C.; SU, S.-K.; LIN, Y.-W.; HSU, W.T.; HUANG, K.-S. Interfacial properties of polyethylene glycol/vinyltriethoxysilane (PEG/VTES) copolymers and their application to stain resistance. *J Surfact Deterg.* v. 15, n. 3, p. 299–305, 2012.
- CHARKOUDIAN, L.K.; FITZGERALD, J.T.; KHOSLA, C.; CHAMPLIN, A. In living color: bacterial pigments as an untapped resource in the classroom and beyond. *PLOS Biol.* v. 8, n. 10, p. 1-6, 2010, doi: 10.1371/journal.pbio.1000510.
- CHATTERJEE, S.; BHOWAL, J. Production of microbial color from soil microbes for food use. *Mater Today Proc.* v. 3, n. 10, p. 3388–3402, 2016.
- CORNELIS, P.; DINGEMANS, J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front Cell Infect Microbiol.* v. 7, p. 1-7, 2013. doi: 10.3389/fcimb.2013.00075.
- CUNNINGHAM, L.; WILLIAMS, H.D. Isolation and characterization of mutants defective in the cyanide-insensitive respiratory pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* v. 117, n. 2, p. 432-438, 1995.
- DANTAS, P.V.; PERES, S.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; LA ROTTA, C.E. Utilization of raw glycerol for pyocyanin production from *Pseudomonas aeruginosa* in half-microbial fuel cells: evaluation of two electrochemical approaches. *J Electrochem Soc.* v. 160, n. 10, p. 142-148, 2013.
- DAS, S.; DAS, P. Effects of cultivation media components on biosurfactant and pigment PAO1. *Braz J Chem Eng.* v. 32, n. 2, p. 317-324, 2015.
- DAS, P.; MA, L.Z. Pyocyanin pigment assisting biosurfactant-mediated hydrocarbon emulsification. *Int Biodegrad Biodeterior.* v. 85, n. 11, p. 278-283, 2013.
- DAS, T.; MANEFIELD, M. Pyocyanin promotes extracellular DNA release in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One.* v. 7, n. 10, p. e46718, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0046718.

DE BRITTO, S.; GAJBAR, T.D.; SATAPUTE, P.; SUNDARAM, L.; LAKSHMIKANTHA, R.Y.; JOGAIAH, S.; ITO, S-I. Isolation and characterization of nutrient dependent pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* and its dye and agrochemical properties. *Scientific Rep.* v. 10, n. 2542, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-58335-6.

DEVNATH, P.; UDDIN, M.K.; AHMED, F.; HOSSAIN, M.T.; MANCHUR, M.A. Extraction, purification and characterization of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* and evaluation for its antimicrobial activity. *Int Res J Biolol Sci.* v. 6, n. 5, p. 1-7, 2017.

DIETRICH, L.E.P.; PRICE-WHELAN, A.; PETERSEN, A.; WHITELEY, M.; NEWMAN, D.K. The phenazine pyocyanin is a terminal signaling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molec Microbiol.* v. 61, n. 5, p. 1308-1321, 2006.

DUFOSSÉ, L. Microbial production of food grade pigments. *Food Technol Biotechnol.* v. 44, n. 3, p. 313-321, 2006.

DURAN, M.; PONEZI, A.N.; FALJONI-ALARIO, A.; TEIXEIRA, M.F.; JUSTO, G.Z.; DURAN, N. Potential applications of violacein: a microbial pigment. *Med Chem Res.* v. 21, n. 7, p. 1524–1532, 2012.

EL-BANNA, A.A.E-R.; EL-RAZEK, A.M.A.; EL-MAHDY, A.R. Isolation, identification and screening of carotenoid-producing strains of *Rhodotorula glutinis*. *Food Nutr Sci.* v. 3, n. 5, p. 627-633, 2012.

EL FEGHALI, P.A.R.; NAWAS, T. Extraction and purification of pyocyanin: a simpler and more reliable method. *MOJ Toxicology.* v. 4, n. 6, p. 417-422, 2018.

EL-FOULY, M. Z.; SHARAF, A. M.; SAHIM, A. A. M.; EL-BIALY, H. A. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Rad Res Appl Sci.* v. 8, n. 1, p. 36-48, 2015.

EL-SHOUNY, W.A.; AL-BAIDANI, A.R.H.; HAMZA, W.T. Antimicrobial activity of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from surgical wound-infections. *Int J Pharm Med Sci.* v. 1, n. 1, p. 1-7, 2011.

FAGNANO, M.; AGRELLI, D.; PASCALE, A.; ADAMO, P.; FIORENTINO, N.; ROCCO, C.; PEPE, O.; VENTORINO, V. Copper accumulation in agricultural soils: Risks for the food chain and soil microbial populations. *Sci Total Environ.* v. 734, p. 1-11, 2020. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139434.

FERGUSON, D.; CAHILL, O. J.; QUILTY, B. Phenotypic, molecular and antibiotic resistance profiling of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from two Irish hospitals. *J Med Biolol Sci.* v. 1, p. 1-15, 2007.

FERREIRA, E.S.B.; HULME, A.N.; McNAB, H.; QUYUE, A. The natural constituents of historical textile dyes. *Chem Soc Rev.* v. 33, n. 6, p. 329-336, 2004.

- FUJIKAWA, H.; AKIMOTO, R. New blue pigment produced by *Pantoea agglomerans* and its production characteristics at various temperatures. *Appl Environ Microbiol.* v. 7, n. 1, p. 172–178, 2011.
- GAMAL, A.M.; BATOUTI, M.E.L.; AL HARBY, N.F. Kinetic and thermodynamic analysis study of the dyeing process of acrylic fabrics with basic dyes in presence of organic solvents. *Mat Sci Res India.* v. 7, n. 1, p. 25-36, 2010.
- GARAY-ARROYO, A; COVARRUBIAS, A.A.; CLARK, I.; NIÑO, I.; GOSSET, G.; MARTINEZ, A. Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* v. 63, n. 6, p. 734–741, 2004.
- GARCIA-MACIAS, P.; JOHN, P. Formation of natural indigo derived from woad (*Isatis tinctoria* L.) in relation to product purity. *J Agric Food Chem.* v. 52, n. 26, p. 7891–7896, 2004.
- GENHARTDT, P.; MURRAY, R.G.E.; WOOD, W.A.; KIEG, N.R. **Methods for general and molecular bacteriology.** 1st. ed. Washington: American Society for microbiology, 1994. 791p.
- GHARIEB, M.M.; EL-SHEEKH, M.M.; EL-SABBAGH, S.M.; HAMZA, W.T. Efficacy of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* as a topical treatment of infected skin of rabbits. *Biotechnol Ind J.* v. 7, n. 5, p. 184-193, 2013.
- GMOSER, R.; FERREIRA, J.A.; LUNDIN, M.; TAHERZADEH, M.J.; LENNARTSSON, P.R. Pigment production by the edible filamentous fungus *Neurospora Intermedia.* *Fermentation.* v. 4, n. 11, p. 1-15, 2018. doi:10.3390/fermentation4010011.
- GOKHALE, S.B.; TATIYA, A.U.; BAKLIWAL, S.R.; FURSULE, R.A. Natural dye yielding plants in India. *Nat Product Radiance.* v. 3, n. 4, p. 228-234, 2004.
- GUARATINI, C.C.I.; ZANONI, M.V.B. Corantes têxteis. *Quím Nova.* v. 23, n. 1, p. 71-78, 2000.
- GUYOMARC'H, F.; BINET, A.; DUFOSSÉ, L. Production of carotenoids by *Brevibacterium linens*: variation among strains, kinetic aspects and HPLC profiles. *J Ind Microbiol Biotechnol.* v. 24, n. 1, p. 64–70, 2000.
- HAJJAJ, H.; BLANC, P.J.; GOMA, G.; FRANÇOIS, J. Sampling techniques and comparative extraction procedures for quantitative determination of intra- and extracellular metabolites in filamentous fungi. *FEMS Microbiol Lett.* v. 164, n. 1, p. 195-200, 1998.
- HALL, S.; McDERMOTT, C.; ANOOPKUMAR-DUKIE, S.; McFARLAND, A.J.; FORBES, A.; PERKINS, A.V.; DAVEY, AK.; CHESS-WILLIAMS, R.; KIEFEL, M.J.; ARORA, D.; GRANT, G.D. Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins.* v. 8, p. 823. doi: 10.3390/toxins8080236, 2016.

HAN, J. Botanical provenance research of historical Chinese dye plants. *Economic Bot.* v. 69, n. 3, p. 230-239, 2015.

HASSANI, H. H.; HASAN, H. M.; AL-SAAD, A.; ALI, A. M.; MUHAMMAD, M. H. A comparative study on cytotoxicity and apoptotic activity of pyocyanin produced by wild type and mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Experiment Biol.* v. 2, n. 5, p. 1389-1394, 2012.

HASSETT, D.J., CHARNIGA, L., BEAN, K., OHMAN, D.E., COHEN, M.S. Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: Mechanisms of resistance, antioxidant defences, and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. *Infect Immun.* v. 60, n. 2, p. 328-336, 1992.

HEER, K.; SHARMA, S. Microbial pigments as a natural color: a review. *Int J Pharm Sci Res.* v. 8, n. 5, p. 1913-1922, 2017.

HERIYANTO, I.; PRINGGENIES, D.; LIMANTARA, L.; BRODOSUDARMO, T.H.P. Protonation and thermo-stability studies of pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*. In: ICICS – International Conference of Indonesia Chemical Society, 1, 2012. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Deliana_Pringgenies/publication/337729469_Protonation_and_Thermostability_Studies_of_Pyocyanin_from_Pseudomonas_aeruginosa/links/5e8466c8a6fdcca789e5a617/Protonation-and-Thermostability-Studies-of-Pyocyanin-from-Pseudomonas-aeruginosa.pdf>. Acesso em: 28 ago 2020.

HU, Z.; ZHANG, X.; WU, Z.; QI, H.; WANG, Z. Export of intracellular Monascus pigments by two-stage microbial fermentation in nonionic surfactant micelle aqueous solution. *J Biotechnol.* v. 162, n. 2-3, p. 202-209, 2012.

HUNTER, R.C.; Klepac-Ceraj, V.; Lorenzi, M.M.; Grotzinger, H.; Martin, T.R.; Newman, D.K. Phenazine content in the cystic fibrosis respiratory tract negatively correlates with lung function and microbial complexity. *Am J Respir Cell Mol Biol.* v. 47, n. 6, p. 738-745, 2012.

HURLBERT, A.C.; LING, Y. Understanding colour perception and preference. In: BEST, J. (Ed.). **Colour design: Theories and applications**. 2nd ed. Duxford: Woodhead Publishing, Elsevier, p. 169-192, 2017.

JAYASEELAN, S.; RAMASWAMY, D.; DHARMARAJ, S. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World J Microbiol Biotechnol.* v. 30, p. 1159-1168, 2014.

JOSHI, V.; ATTRI, D.; BHUSHAN, S. Microbial pigments. *Ind J Biotechnol.* v. 2, n. 3, p. 362-369, 2003.

KANG, J.S.; CHO, S.A.; HAN, S.B.; LEE, K.; KIM, H.M. Scytonemin inhibits lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide, tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β by blocking NF- κ B/Rel signaling in macrophages. *J Immunol.* v. 186, n. 1, p. 112-113, 2011.

KEMP, D.J.; HERBERSTEIN, M.E.; GREThER, G.F. Unraveling the true complexity of costly color signaling. *Behav Ecol.* v. 23, n. 2, p. 233–236, 2012.

KERR, K.G.; SNELLING, A.M. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infec.* v. 73, n. 4, p. 338–344, 2009.

KIM, D-J.; CHUNG, S-G.; LEE, S-L.; CHOI, J-W. Relation of microbial biomass to counting units for *Pseudomonas aeruginosa*. *Afr J Microbiol Res.* v. 6, n. 1, p. 4620–4622, 2012.

KIM, D.; LEE, J.; PARK, Y.; KIM, J.; JEONG, H.; OH, T.K.; KIM, B.; LEE, C. Biosynthesis of antibiotic prodiginines in the marine bacterium *Hahella chejuensis* KCTC 2396. *J Appl Microbiol.* v. 102, n. 4, p. 937–944, 2007.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med.* v. 44, n. 2, p. 301–307, 1954.

KRAMAR, A.; ILIC-TOMIC, T.; PETROVIC, M.; RADULOVIĆ, N.; KOSTIC, M.; JODIC, D.; NIKODINOVIC-RUNIC, J. Crude bacterial extracts of two new *Streptomyces* sp. isolates as bio-colorants for textile dyeing. *World J Microbiol Biotechnol.* v. 30, p. 2231–2240, doi: 10.1007/s11274-014-1644-x, 2014.

KUBITSCHKE, H.E. Constancy of the ratio of DNA to cell volume in steady-state cultures of *Escherichia coli* B-r. *Biophys J.* v. 14, n. 2, p. 119–123, 1974.

KURASHI, M. Studies on the biosynthesis of pyocyanine. (II): Isolation and determination of pyocyanine. v. 36, n. 6, p. 174–187, 1958.

KURBANOGU, E.B.; OZDAL, M.; OZDAL, O.G.; ALGUR, O.F. Enhanced production of prodigiosin by *Serratia marcescens* MO-1 using ram horn peptone. *Braz J. Microbiol.* v. 46, n. 2, p. 631–637, 2015.

LAWS, B. **50 plantas que mudaram o rumo da história.** Rio de Janeiro: Sextante, 2013, 224p.

LEGGETT, W.F. **Ancient and medieval dyes.** Dark County: Coachwhip Publications, 2009, 80p.

LEGRAND, C. **Indigo: the color that changed the world.** 1st ed. London: Thames & Hudson, 2013, 288p.

LEISINGER, T., MARGRAFF, R. Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol Rev.* v. 43, n. 3, p. 422–442, 1979.

LENNEY W., GILCHRIST F.J. *Pseudomonas aeruginosa* and cyanide production. *Eur Respir J.* v. 37, p. 482–483, 2011.

- LEV-YADUN S. Visual signaling by plants to animals via color. In: LEV-YADUN S. **Defensive (anti-herbivory) coloration in land plants: Anti-Herbivory Plant Coloration and Morphology**. Cham: Springer, doi: 10.1007/978-3-319-42096-7_11, 2016.
- LI, H.; LI, X.; SONG, C.; ZHANG, Y.; WANG, Z.; LIU, Z.; WEI, H.; YU, J. Autoinducer-2 facilitates *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 pathogenicity *in vitro* and *in vivo*. *Front Microbiol.* v. 8, n. 1944, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.01944.
- LIU, G.Y.; NIZET, V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends Microbiol.* v. 17, n. 9, p. 406-413, 2009.
- LOBO, R.N.; LIMEIRA, E.T.N.P.; MARQUES, R.N. **Fundamentos da tecnologia têxtil: da concepção da fibra ao processo de estamparia**. 1ª ed. São Paulo: Érica, 2014, 120p.
- LOWBURRY, E.J.L.; COLLINS, A.G. The use of a new cetrimide product in a selective medium for *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Pathol.* v. 8, n. 1, p. 47-48, 1955.
- LUNDGREN, B.R.; THORNTON, W.; DORNAN, M.H.; VILLEGAS-PENARANDA, L.R.; BODDY, C.N.; NOMURA, C.T. Gene PA2449 is essential for glycine metabolism and pyocyanin biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.* v. 195, n. 9, p. 2087-2100, 2013.
- LV, F.; ZHU, P.; WANG, C.; ZHENG, L. Preparation, characterization, and dyeing properties of calcium alginate fibers. *J Appl Polymer Sci.* v. 126, E382–E387, 2012.
- MACHADO, F.M.; BERGMANN, C.P.; LIMA, E.C.; ADEBAYO, M.A.; FAGAN, S.B. Adsorption of a textile dye from aqueous solutions by carbon nanotubes. *Mat Res.* v. 17, n. 1, p. 153-160, 2014.
- MALIK, K.; TOKKAS, J.; GOYAL, S. Microbial pigments: A review. *Int J Microb Res Technol.* v. 1, n. 4, p. 361-365, 2012.
- MAPARI, S.A.; NIELSEN, K.F.; LARSEN, T.O.; FRISVAD, J.C.; MEYER, A.S.; THRANE, U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Curr Opin Biotechnol.* v. 16, n. 2, p. 231–238, 2005.
- MARGALITH, P. Z. **Pigment microbiology**. 1st ed. London: Chapman & Hall, 1992, p. 102-110.
- MARTINS, V.V.; MACARENO, A.C.; GRADELLA, D.G.; STEHLING, E.G. Antagonism between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* against coliforms. *Wat Sci Technol: Wat Supply.* v. 14, n. 1, 99-106, 2014.
- MARISELVAM, R.; ATHINARAYANAN, G.; RANJITSINGH, A.J.A.; NANTHINI, A.U.R.; KRISHNAMOORTHY, R.; ALSHATWI, A.A. Extraction of dyes from *Petrocarpus santalinus* and dyeing of natural fibers using different mordants. *Fibers Text East Eur.* v. 5, n. 131, p. 20-23, 2018.

- MAVRODI, D. V.; BONSALE, R.; DELANEY, S. M.; SOULE, M. J.; PHILLIPS, G.; THOMASHOW, L. S. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *J Bacteriol.* v. 183, n. 21, p. 6454-6465, 2001.
- MCCLEAN, K.H.; WINSON, M.K.; FISH, L.; TAYLOR, A.; CHHABRA, S.R.; CAMARA, M.; DAYKIN, M.; LAMB, J.H.; SWIFT, S.; BYCROFT, B.W.; STEWART, G.S.; WILLIAMS, P. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones. *Microbiology.* v. 143, n.12, p. 3703–3711, 1997.
- McDERMOTT, C.; CHESS-WILLIAMS, R.; GRANT, G.D.; PERKINS, A.V.; McFARLAND, A.J.; DAVEY, A.K.; ANOOPKUMAR-DUKIE, S. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor pyocyanin on human urothelial cell function and viability. *J Urol.* v. 187, n. 3, p. 1087-1093, 2012.
- McGOVERN, P.E.; LAZAR, J.; MICHEL, R.H. The analysis of indigoid dyes by mass spectrometry. *J Soc Dyers Colourists.* v. 106, n. 1, p. 22–25, 1990.
- MELLOULI, L.; AMEUR-MEHDI, R.B.; SIOUD, S.; SALEM, M.; BEJAR, S. Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Res Microbiol.* v. 154, n. 5, p. 345–352, 2003.
- MELO, M. History of natural dyes in the ancient Mediterranean world. In: BECHTOLD, T.; MUSSAK, R. **Handbook of natural colorants**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2009, p. 1-20, doi: 10.1002/9780470744970.ch1.
- MOAYEDI, A., NOWROOZI, J., SEPAHY, A.A. Effect of fetal and adult bovine serum on pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical and soil samples. *Iran J Basic Med Sci.* v. 20, n. 1331-1338. doi: 10.22038/IJBMS.2017.9621, 2017.
- MOELLER, R.; HORNECK, G.; FACIUS, R.; STACKEBRANDT, E. Role of pigmentation in protecting *Bacillus* sp. endospores against environmental UV radiation. *FEMS Microbiol Ecol.* v. 51, n. 2, p. 231-236, 2005.
- MOORE, K.A.; ALTUS, S.; TAY, J.W.; MEEHL, J.B.; JOHNSON, E.B.; BORTZ, D.M.; CAMERON, J.C. Mechanical regulation of photosynthesis in cyanobacteria. *Nat Microbiol.* v. 5, p. 757–767. doi: 10.1038/s41564-020-0684-2, 2020.
- MORADALI, M.F.; GHODS, S.; REHM, B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers Cell Infect Microbiol.* v. 7:39, doi: 10.3389/fcimb.2017.0003, 2017.
- MORKUNAS, B. GALLOWAY, W.R.J.D.; WRIGHT, M.; IBBESON, B.M.; HODGKINSON, J.T.; O'CONNELL, K.M.G.; BARTOLUCCI, N.; DELLA VALLE, M.; WELCH, M.; SPRING, D.R. Inhibition of the production of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor pyocyanin in wild-type cells by quorum sensing autoinducer-mimics. *Org Biomol Chem.* v. 10, n. 42, p. 8452-8464, 2012.

- MULLER, M. Glutathione modulates the toxicity of, but is not a biologically relevant redactor for, the *Pseudomonas aeruginosa* redox toxin pyocyanin. *Free Rad Biol Med.* v. 50, n. 8, p. 971-977, 2011.
- NAGPAL, N.; MUNJAL, N.; CHATTERJEE, S. Microbial pigments with health benefits – A mini review. *Trends Biosci.* v. 4, n. 2, p. 157-160, 2011.
- NOWICKA, B.; KRUK, J. Powered by light: phototrophy and photosynthesis in prokaryotes and its evolution. *Microbiological Res.* v. 186-187, p. 99-118. doi: 10.1016/j.micres.2016.04.001, 2016.
- NUMAN, M.; BASHIR, S.; MUMTAZ, R.; TAYYAB, S.; REHMAN, N.U.; KHAN, A.L.; SHINWARI, Z.K.; AL-HARRASI, A. Therapeutic applications of bacterial pigments: a review of current status and future opportunities. *3Biotech.* v. 8, p. 207, 2018. doi: 10.1007/s13205-018-1227-x.
- OLIVEIRA, B.T.M.; BARBOSA, P.S.Z.; CAVALCANTI, T.G.; AMARAL, I.P.G.; VASCONCELOS, U. Craft beer waste as substrate for pyocyanin synthesis. *J Pharm Biol Sci.* v. 14, n. 1, 21-25, 2019.
- ÖZCAN, D.; KAHRAMAN, H. Pyocyanin production in the presence of calcium ion in *Pseudomonas aeruginosa* and recombinant bacteria. *Turk J Sci Technol.* v. 10, n. 1, p. 13-19, 2015.
- PARMAR, M.; PHUTELA, U.G. Biocolors: the new generation additives. *Int J Curr Microbiol App Sci.* v. 4, n. 7, p. 688–694, 2015.
- PARSONS, J.F., GREENHAGEN, B.T., SHI, K., CALABRESE, K., ROBINSON, H., LADNER, J.E. Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem.* v. 46, n. 7, p. 1821-1828, 2007.
- PATHMA, J.; RAHUL, G.R.; KAMARAJ KENNEDY, R.; SUBASHRI, R.; SAKTHIVEL, N. Secondary metabolite production by bacterial antagonists. *J Biol Control.* v. 25, n. 3, p. 165-181, 2011.
- PÉREZ-RODRÍGUEZ, L.; JOVANI, R.; STEVENS, M. Shape matters: animal colour patterns as signals of individual quality. *Proc R Soc B.* v. 284, n. 1849, p. 1-10. doi: 10.1098/rspb.2016.2446, 2017.
- PERKINS, W.S. Los principios básicos del teñido textil. *Textiles Panamericanos.* v. 55, n. 4, p. 190-193, 1995.
- PIERSON, L.S.; PIERSON, E.A. Metabolism and function of phenazines in bacteria: Impacts on the behaviour of bacteria in the environment and biotechnological process. *Appl Microbiol Biotechnol.* v. 86, p. 1659-1670. doi: 10.1007/s00253-010-2509-3, 2010.
- PINHAL, S.; ROPERS, D.; GEISELMANN, J.; DE JONG, H. Acetate metabolism and the inhibition of bacterial growth by acetate. *J Bacteriol.* v. 201, n. 13, p. 1-9, 2019. doi: 10.1128/JB.00147-19.

RAINA, S.; MURPHY, T.; VIZIO, D.; REFFATTI, P.; KESHAVARZ, T. Novel strategies for over-production of microbial products. *Chem Eng Trans.* v. 24, p. 847–852, 2011.

RÄISÄNEN, R. Fungal colorants in applications – focus on *Cortinarius* species. *Color Technol.* v. 135, n. 1, p. 22-31, 2018

REN, Y.; GONG, J.; FU, R.; LI, Z.; YU, Z.; LOU, J.; WANG, F.; ZHANG, J. Dyeing and functional properties of polyester fabric dyed with prodigiosins nanomicelles produced by microbial fermentation. *J Clean Prod.* v. 148, p. 375-385, 2017.

SAENGE, C.; CHEIRSILP, B.; SUKSAROG, T.T.; BURTOOM, T. Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. *Process Biochem.* v. 46, n. 1, p. 210–218, 2011.

SAHA, S.; THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S. Phenazine pigments from *Pseudomonas aeruginosa* and their application as antibacterial agent and food colourants. *Res J Microbiol.* v. 3, n. 3, p. 122-128, 2008.

SALES-NETO, J.M.; LIMA, E.A.; CAVALCANTI-SILVA, L.H.A.; VASCONCELOS, U.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S. Pyocyanin-induced reduction of pro-inflammatory mediators in peritoneal macrophages. *Exp Pathol Health Sci.* v. 8, n. 3, p. 69-70, 2016.

SARVAMANGALA, D.; APARNA, S.S.V. Microbial pigments – a minireview. *IOSR J Environ Sci Toxicol Food Technol.* v. 10, n. 8, p. 1-7, 2016.

SEZONOV, G.; JOSELEAU-PETIT, D.; D'ARI, R. *Escherichia coli* physiology in Lauria-Bertani broth. *J Bacteriol.* v. 189, n. 23, p. 8746-8749, 2007.

SCHAECHTER, M.; MAALØE, O.; KJELDGAARD, N.O. Dependence on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *Microbiology.* v. 19, n. 3, p. 592–602, 1958.

SCHOENTAL, R. The nature of the antibacterial agents present in *Pseudomonas pyocyanea* cultures. *Br J Exp Pathol.* v. 22, p. 137-147, 1941.

SHANG, S.M. Process control in dyeing of textiles. In: MAJUMDAR, A.; DAS, A.; ALAGIRUSAMY, R.; KOTHARI, V.K. (ed.) **Process Control in Textile Manufacturing**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2013, p. 300-338.

SHANMUGAIAH, V.; MATHIVANAN, N.; VARGHESE, N. Purification, crystal structure and antimicrobial activity of phenazine-1-carboxamide produced by a growth-promoting biocontrol bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MML2212. *J Appl Microbiol.* v. 108, p. 703-711, doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04466x, 2009.

SHARMA, D. Understanding biocolor – A review. *Int J Sci Technol Res.* v. 3, n. 1., p. 294-299, 2014.

- SHIBAYAMA, N.; WYPYSKI, M.; GAGLIARDI-MANGILLI, E. Analysis of natural dyes and metal threads used in 16th -18th Century Persian/Safavid and Indian/Mughal velvets by HPLC-PDA and SEM-EDS to investigate the system to differentiate velvets of these two cultures. *Heritage Sci.* v. 3, n. 12, p. 1-20, doi.: 10.1186/s40494-015-0037-2, 2015.
- SHIRATA, A.; TSUKAMOTO, T.; YASUI, H.; HATA, T.; HAYASAKA, S.; KOJIMA, A.; KATO, H. Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing. *JARQ.* v. 34, n. 2, p. 131-140, 2000.
- SINGH, H.B.; BHARARI, K.A. **Handbook of natural dyes and pigments.** New Delhi: Wood head publishing, 2015, 312p.
- SIUDA-KRZYWICKA, K.; BOROS, M.; BARTOLOMEO, P.; WITZEL, C. The biological bases of colour categorisation: From goldfish to the human brain. *Cortex.* v. 118, n. 1, p. 82-106, 2019.
- SURYAVANSHI, M.V.; WAGHMODE, S.R.; BHARTI, N.; CHOUDHARI, P.B.; HINGAMIRE, T.B.; SHOUCHE, Y.S. Isolation and virtual screening of antimicrobial prodigiosin pigment from oxalotrophic *Serratia marcescens* OXR strain. *J Appl Pharm Sci.* v. 6, n. 11, p. 52-58, 2016.
- TAMAGNINI, L.M.; GONZALES, R.D. Bacteriological stability and growth kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water. *J Appl Microbiol.* v. 83, n.1, p. 91-94, 1997.
- THOMSON, N.R.; CROW, M.A.; MCGOWAN, S.J.; COX, A.; SALMOND, G.P.C. Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Mol Microbiol.* v. 36, n. 3, p. 539–556, 2000.
- TULI, H.S.; CHAUDHARY, P.; BENIWAL, V.; SHARMA, A.K. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. *J Food Sci Technol.* v. 52, n. 8, p. 4669–4678, 2015.
- TURNER, J.M, MESSENGER, A.J. Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. *Adv Microbiol Physiol.* v. 27, p. 211-275, 1986.
- TYC, O.; SONG, C.; DICKSCHAT, J.S.; VOS, M.; GARBEVA, P. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends Microbiol.* v. 25, n. 4, p. 280-292, 2017.
- USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 351.2. Determination of total Kjeldahl nitrogen by semi-automatic colorimetric, revision 2.0. Washington: U. S. Government Printing Office, 1993.
- USMAN, H.M.; ABDULKADIR, N.; GANI, M.; MAITURARE, H.M. Bacterial pigments and its significance. *MOJ Bioequiv Availab.* v. 4, n. 3, p. 285–288, 2017.

VAN DER BERG, J.P.; VELEMA, W.A.; SZYMANSKI, W.; DRIESSEN, J.M.; FERINGA, B.L. Controlling the activity of quorum sensing autoinducers with light. *Chem Sci*. v. 6, n. 6, p. 3593-3598, 2015.

VASCONCELOS, U., LIMA, M.A.G.A., CALAZANS, G.M.T. *Pseudomonas aeruginosa* associated with negative interactions on coliform bacteria growth. *Can J Pure Appl Sci*. v. 4, n. 2, p. 1133-1139, 2010.

VENIL, C.K.; ZAKARIA, Z.A.; AHMAD, W.A. Bacterial pigments and their applications. *Process Biochem*. v. 48, n. 7, p. 1065–1079, 2013.

VIANA, A.A.G.; MARTINS, R.X.; FERREIRA, G.F.; ZENAIDE-NETO, H.; AMARAL, I.P.G.; VASCONCELOS, U. *Pseudomonas aeruginosa* and pyocyanin negatively act on the establishment of *Enterobacteriaceae* biofilm on a ceramic surface. *Int J Eng Res Applic*. v. 7, n. 8 (pt. 2), p. 23-30, 2017.

VIANA, A.A.G.; OLIVEIRA, B.T.M.; CAVALCANTI, T.G.; SOUSA, K.A.; MENDONÇA, E.A.M.; AMARAL, I.P.G.; VASCONCELOS, U. Correlation between pyocyanin production and hydrocarbonoclastic activity in nine strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Adv Eng Res Sci*. v. 5, n. 7, p. 212-223, 2018.

VIEIRA, A.P.; SANTANA, S.A.A.; BEZERRA, C.W.B.; SILVA, H.A.S.; CHAVES, J.A.P.; MELO, J.C.P.; DA SILVA FILHO, E.C.; AIROLDI, C. Kinetics and thermodynamics of textile dye adsorption from aqueous solutions using babassu coconut mesocarp. *J Hazard Mater*. v. 166, n. 2-3, p. 1272-1278, 2009.

VIPIN, C.; ASHWINI, P.; KAVYA, A.V.; REKHA, P.D. overproduction of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* by supplementation of pathway precursor shikimic acid and evaluation of its activity. *Res J Phar and Tech*. v. 10, n. 2, p. 533-536, 2017.

WATSON, J.T.; SPARKMAN, O.D. **Introduction to mass spectrometry: Instrumentation, applications, and strategies for data interpretation**. 4th ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2007, 862p.

WHOOLEY, M.A.; McLOUGHLIN, A.J. The regulation of pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*. v. 15, n. 1, p. 161-166, 1982.

WIN, K.H.; KHAING, K.; KHAING, T. Extraction of tannin from tamarind seed coat as a natural mordant for dyeing of wool yarn. *Int J Res Trends Innov*. v. 4, n. 7, p. 11-14, 2019.

WISNIAK, J. Dyes from antiquity to synthesis. *Ind J Hist Sci*. v. 39, n. 1, p. 75-100, 2004.

YADAV, S.; MANJUNATHA, K.; RAMACHANDRA, B.; SUCHITRA, N.; PRABHA, R. Characterization of pigment producing *Rhodotorula* from dairy environmental samples. *Asian J Dairying Foods Res*. v. 33, n. 1, p. 1–4, 2014.

YAQUB, A.; CHAUDHARY, N.; BHATTI, R.A.A.; IQBAL, Z.; HABIB-UL-HAQ, M. Green extraction and dyeing of silk from *Beta vulgaris* peel dye with ecofriendly acid mordants. *Int J Biosci.* v. 13, n. 4, p. 308-321, 2018.

YIN, Y.; PAPAVALIOU, G.; ZABORINA, O.Y.; ALVERDY, J.C.; TEYMOUR, F. *De novo* synthesis and functional analysis of polyphosphate-loaded poly(ethylene) glycol hydrogel nanoparticles targeting pyocyanin and pyoverdine production in *Pseudomonas aeruginosa* as a model intestinal pathogen. *Ann Biomed Eng.* v. 45, n. 4, p. 1058-1068, 2017.

YOSHIOKA, S. History of Japanese colour: Traditional natural dyeing methods. *Colour: Design Creativity.* v. 5, n. 4, p. 1-7, 2010.

YUSUF, M.; SHABBIR, M.; MOHAMMAD, F. Natural colorants: Historical, processing and sustainable prospects. *Nat Prod Bioprospect.* v. 7, p. 133-145, 2017. doi: 10.1007/s13659-017-0119-9.

ZUBAIRU, A.; MSHELIA, Y.M. Effects of selected mordants on the application of natural dye from onion skin (*Allium cepa*). *Sci Technol.* v. 5, n. 2, p. 26-32, 2015.

ZIDERMAN, I. Purple dyes made from shellfish in antiquity. *Color Technol.* v. 16, n. 1, p. 46-52, 1986.

ZLOSNIK, J.E.A.; TAVANKAR, G.R.; BUNDY, J.G.; MOSSIALOS, D.; O'TOOLE, R.; WILLIAMS, H.D. Investigation of the physiological relationship between the cyanide-insensitive oxidase and cyanide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* v. 125, n. 5, p. 1407-1415, 2006.

Review

Colour Me Blue: The History and the Biotechnological Potential of Pyocyanin

Thiago Gonçalves and Ulrich Vasconcelos * 

Centro de Biotecnologia, Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, R. Ipê Amarelo, s/n, Campus I, João Pessoa PB-CEP 58051-900, Brazil; thigoca@gmail.com

* Correspondence: u.vasconcelos@cbiotec.ufpb.br

Abstract: Pyocyanin was the first natural phenazine described. The molecule is synthesized by about 95% of the strains of *Pseudomonas aeruginosa*. From discovery up to now, pyocyanin has been characterised by a very rich and avant-garde history, which includes its use in antimicrobial therapy, even before the discovery of penicillin opened the era of antibiotic therapy, as well as its use in electric current generation. Exhibiting an exuberant blue colour and being easy to obtain, this pigment is the subject of the present review, aiming to narrate its history as well as to unveil its mechanisms and suggest new horizons for applications in different areas of engineering, biology and biotechnology.

Keywords: bacterial pigments; *Pseudomonas aeruginosa*; pyocyanase; bioprospecting



Citation: Gonçalves, T.; Vasconcelos, U. Colour Me Blue: The History and the Biotechnological Potential of Pyocyanin. *Molecules* **2021**, *26*, 927. <https://doi.org/10.3390/molecules26040927>

Academic Editors: Roberto Fabiani, Eliana Pereira, Isabel C. F. R. Ferreira and Nancy D. Turner

Received: 26 November 2020

Accepted: 21 December 2020

Published: 10 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Secondary metabolites are essential requirements for promoting the maintenance and persistence of producing organisms [1,2]. Bacterial pigments are secondary metabolites with varied colours, endowed with a heterogeneous molecular structure and low molecular weight [3]. A large number of bacteria produce pigments which are assigned different functions, such as photosynthesis [4], protection against ultraviolet radiation [5], iron uptake [6], ecological interactions with other organisms [7] and participation in the signalling that modulates gene expressions dependent on cell density [8].

Phenazines are molecules with heterocyclic rings containing nitrogen, which have different physical and chemical properties based on the type and position of the functional groups present [9]. In addition, phenazines are synthesized by a limited number of *Bacteria* and *Archaea*. At least 10 types of phenazine occur simultaneously in a single organism, however more than 50 naturally occurring phenazine have been described, with an emphasis on pyocyanin, considered the most important compound in the group [10].

Pyocyanin is an exuberant blue-coloured phenazine, produced exclusively by 90–95% of *Pseudomonas aeruginosa* strains [11]. Given the physical-chemical and biological properties of pyocyanin, the molecule has great potential to be applied to different areas of biology, engineering and biotechnology. The pigment exhibits several advantages, namely: (1) it is natural, biodegradable and environmentally-friendly; (2) the producing organism is easy to manipulate and selects the strains with the highest yield, using simple means of cultivation with low cost substrates; (3) it may be used to produce biomass and; (4) the collection and extraction processes are quick and simple compared to any other chemical synthesis process [12,13]. This work presents some considerations about the history, chemistry, collection and applications of pyocyanin.

2. History and Chronology of Studies with Pyocyanin

The pigment was first described in 1860 by Fordos, when observing a bluish purulent sample, from an infection caused by *P. aeruginosa*. The name of the pigment was proposed by the combination of Greek words, used to designate pus and the colour blue [14]. Dr. Fordos also described different properties of the pigment, such as its solubility and the

colours it exhibited at different pH levels. He proposed that the bacterium exhibits four different types of colours. This was later known as the chameleon effect [15].

The first isolation of the pigment from the “pyocyanic bacillus” occurred in 1882 when Gessard attempted to verify the parasitic origin of the phenomenon that gave the colour blue to pus and tissues close to an infection [16]. In addition, Jordan in 1899 identified pyocyanin spread throughout a common laboratory culture medium [17]. The pure compound was isolated only in 1924, becoming the first natural phenazine obtained and purified in a laboratory [18]. In 1929, Wrede and Straek proposed the chemical structure of pyocyanin, later corrected by Hillemann, in 1938 [19].

Waksman, in his last published manuscript, presented a retrospective on antibiotic therapy and reminded the reader that between late 1941 and early 1942, he coined the word “antibiotic”, in response to a request to create a word to designate compounds and preparations with a defined chemical structure, which produced a therapeutic effect against infectious diseases [20]. In this work, he cited pyocyanase as one of those compounds. Pyocyanase was the first formulation to use the potential of pyocyanin in therapy [21].

The term antibiosis was coined by Vuillemin in 1889 to designate the natural selection of one organism over another. Ten years later, Ward extended the term to define microbial antagonism. At the same time, it was understood that not only the presence of certain microbes prevented the growth of others, but that the phenomenon also occurred due to the action of substances produced by these organisms [22].

In the same year, Emmerich and Löw isolated pyocyanase from a macerate of *P. aeruginosa* cultures. The lysate was not initially identified as a molecule, being erroneously described as an enzyme mixture, reflected in the nomenclature used to designate the compound. Scientists also observed that the pyocyanase produced by the “pyocyanic bacillus” could be used to treat diphtheria and against meningococci. In addition, it served as a mouthwash and years later it was shown to be effective against anthrax. Pyocyanase in the form of eye drops, sprays and mouthwashes were the most common presentations because the systemic use proved to be very toxic. Thus, pyocyanase was probably the first antibiotic produced industrially and applied therapeutically in humans, decades before the discovery of penicillin and the era of antimicrobial chemotherapy [23,24].

In the early years of interest in this pigment, encouraged by the attraction for the colour, the most investigated function was its antimicrobial activity. In the early 20th century, pseudomonads were the largest group of non-differentiating microbes used to produce antibiotics. Three compounds reached the stage of clinical application: pyocyanin acids, pyrrolnitrin and pyocyanase [25]. With the advancement of research, pyocyanase demonstrated protection of experimental animals against rabies and the vaccinia viruses. From the beginning, however, the compound was identified as more effective against Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria and other organisms [26].

A hydroalcoholic solution containing 10,000 to 20,000 units/mg of pyocyanase was seen to provide antimicrobial activity when diluted 1:10 and 1:20. Antimicrobial activity was reported against staphylococci, streptococci, pneumococci, gonococci and *V. cholerae*, however, there was no consensus on the active principle of the lysate, given the fact that pyocyanase was not an enzyme. Between 1909 and 1928, much controversy was raised regarding the use of pyocyanase. The aqueous solution was unstable and lasted only a week [22]. On the other hand, the cell suspension or the lipid extract obtained from the cultures, containing a suspension of a crystalline material, appeared to be more effective, leading scientists to deduce that the active substance of pyocyanase was the lipids derived from *P. aeruginosa*. The clinical use of pyocyanase however became secondary due to significant side effects reported, including severe damage to tissues and mucosa [27]. In 1935 Kramer discovered that not all the strains of *P. aeruginosa* produced pyocyanase or lost it, for some unrevealed reason [28].

Over the passage of time, pyocyanin fell into disuse. The 1950s, however, marked a decade of studies interested in the development of culture media for obtaining the pigment. The production of pyocyanin by traditional means, as commonly used in the routine of a

microbiology laboratory, is based on the energetic state of the bacterium. This is reduced to a low concentration of nutrients, resulting in decreased growth rate and increased pigment concentration [29]. Nutritional scarcity, especially related to PO_4^{-3} and Ca^{+2} , forces the pyocyanin strains to develop the pigment that propagates through the medium [30]. This production generally starts at the beginning of the stationary phase, which is dependent on the generating time of the strain. The bacterium under these cultivation conditions tends to exhibit a generation time ranging between 3–6 h [31], resulting in the blue-green colour that appears between 48–72 h after the beginning of the incubation.

Chorismic acid as a precursor molecule of pyocyanin was discovered in the 1960s, a decade dedicated to understanding the biochemical pathways of *P. aeruginosa* in pigment synthesis. The following two decades explored the physiological role of pyocyanin for the bacterium. The mechanisms of action of pyocyanin began to be understood, opening up old questions and revealing the metabolic and ecological advantages of *P. aeruginosa*, compared to other organisms [32]. Competition is a natural process and occurs when one organism produces a substance with an inhibitory effect on the growth of another; this relationship ensures the balance of species in coexistence, as well as the entire ecosystem [33]. These substances may be of various natures, such as pigments, enzymes, organic acids and antibiotics. In addition, variations in temperature, pH, nutrient and oxygen levels, as well as population concentration are extrinsic factors that influence the pyocyanin synthesis. In this context, *P. aeruginosa* naturally has an advantage over other microbes [34–37].

Between the 1990s and 2010s, the focus of studies involving pyocyanin tried to elucidate the genetic, molecular and biochemical basis of the regulation of phenazine synthesis, including pyocyanin [37–39]. It was observed that the locus responsible for phenazine biosynthesis is highly conserved in *Pseudomonas* spp. The production varies according to the specie and is strongly influenced by nutritional factors or genes. The expression of their regulatory systems is dependent on temperature [40]. From this epoch on, pyocyanin gained new status and different applications were tested and proposed, as discussed below.

3. *Pseudomonas aeruginosa*: The Exclusive Natural Pyocyanin Producer

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous Gram-negative rod preferring a saprophyte terrestrial and aquatic environment. *P. aeruginosa* is the main representative of fluorescent pseudomonads, the most diverse group of *Pseudomonas* spp. fluorescent pseudomonads are composed of more than 140 species, which are constantly being reclassified, given the biodiversity of the genus *Pseudomonas* [41,42]. The bacterium has a polar flagellum and measures about 0.5–1.0 μm wide by 1.0–1.5 μm long [43]. Its remarkable metabolic versatility guarantees greater resistance and tolerance of *P. aeruginosa* to a myriad of compounds, confirming its reputation as resilient in environments with different degrees of selective pressures and oxidative stresses [44,45].

The *P. aeruginosa* genome measures a considerable 6.3 Mpb (6,264,403 bp). To it may be attributed, among other characteristics, phenotypic diversity and metabolic versatility, reflected in the ability to use more than 90 molecules as sources of carbon and energy [46,47]. In addition, the bacterium is not a fastidious microbe and can grow in simple culture media and low-cost substrates. When cultivated in a solid medium, the colonies have an average diameter between 0.8 and 2.2 μm and take on a greenish colour due to the synthesis of two main pigments produced, blue (pyocyanin) and yellow (fluorescein). Another characteristic of laboratory cultivation is its fruity aroma of grapes, derived from the synthesis of 2-aminoacetophenone [48,49].

The bacterium is not considered an obligate pathogen, but a primarily opportunistic pathogen. The species exhibits different phenotypes associated with virulence factors, such as alginate production, adhesins, neuraminidases, lipopolysaccharide, exotoxin A, enterotoxin, exoenzyme S, phospholipase C, elastase, leukocycline and pigments [50,51]. In addition, *P. aeruginosa* may synthesize at least six different pigments: fluorescein [52], pyoverdine [53], pyomelanin [54], aeruginosin A, aeruginosin B [55] and pyocyanin [7]. The last three listed pigments are phenazines.

The production of pigments, especially pyocyanin, enhances the expression of virulence factors and other phenotypes that converge on *P. aeruginosa*. In addition, antibiotic resistance does not appear to be associated with pyocyanin production. The differences in the resistance profile demonstrate that *P. aeruginosa* applies simultaneous multifactorial mechanisms. The strains that exhibit pyocyanin however, have a prevalence of higher multidrug-resistance, as well as more virulence factors, compared to non-producing strains [56].

Phenazine-producing organisms exhibit an increase in life-span in any environment in which they develop. This is extremely relevant for maintenance in the environment [57]. *P. aeruginosa* can grow in oligotrophic environments and produces less pyocyanin when exposed to water, compared to enriched media or soil [58]. The preferred lifestyle of the bacteria is in biofilm [59]. Biofilms are sessile microbial communities in which cells live in a complex closed association network, surrounded by an adhesive polymeric matrix (EPS) [60]. The carbon source and nutrient levels are the main factors that govern the establishment of a biofilm [61]. The reduction of nutrients to produce EPS obliges the bacteria to maintain a planktonic lifestyle [62].

The current model of architecture and organization of microbial biofilms is based on the *P. aeruginosa* lifestyle. The biofilm exhibits a complex three-dimensional dynamic structure composed of numerous microenvironments, characterized by different gradients [63]. This makes it possible to establish a variety of phenotypes in a single biofilm [64]. In addition, the architecture is dependent on the type of available carbon present in the medium, taking the form of a pillar in the presence of citrate, or a mushroom in the presence of glucose [65,66].

4. Pyocyanin: Fundamentals and General Properties of the Molecule

Pyocyanin is a compound soluble in chloroform and diffusible in water, produced at an optimum pH ranging from 7.4 to 8.4, but not less than 6.0 or greater than 9.0 [15]. The most striking property of this metabolite is its intense blue colour, however the absorption characteristics in the spectrum are pH dependent. In the oxidized form, the compound exhibits absorption bands with $\lambda_{\max}$ between 230 and 380 nm and one second, lower, around 700 nm, related to the protonated and deprotonated forms of the pigment [46,67].

Pyocyanin is a zwitterion with a molecular weight of 210.23 g/mol [68,69]. Since it is a phenazine, the core structure of the molecule is a pyrazine ring (1,4-diazabenzene). Pyocyanin is composed of two subunits of N-methyl-1-hydroxyphenazine and easily crosses biological membranes, serving as an electron carrier for *P. aeruginosa*. Preferably, the pigment donates an electron to molecular oxygen, resulting in a blue colour. In addition, the greatest role of pyocyanin in *P. aeruginosa* occurs under anaerobiosis or microaerophilia. In these cases, pyocyanin accepts electrons generated from NADH during the oxidation of assimilated carbon sources [26].

The phenol group attributes an acidic characteristic to pyocyanin, $pK_a = 4.9$ [68]. The molecule however has three states: ionized at physiological pH (blue colour), protonated in an acidic environment (red colour) and neutral (blue colour). Thus, pyocyanin can cross the membrane and penetrate cells, assuming a multifunctional role for *P. aeruginosa* [70]. In addition, the bacteria can also mediate a cycle of autooxidation of pyocyanin. In this case, two electrons are transferred to the oxidized form, generating the reduced form, which can be converted back to its oxidized form by molecular oxygen. During the autooxidation cycle, reactive oxygen species (ROS) may also be generated [71].

The precursor molecule of pyocyanin is chorismic acid (CA), the end product on the shikimate pathway [72]. The conversion of CA to phenazine-1-carboxylic acid (PCA) is controlled by seven genes, encoded by two operons (*phzA1B1C1D1E1F1G1* and *phzA2B2C2D2E2F2G2*). Then, the synthesis of pyocyanin appears two steps from the PCA (Figure 1). These steps are regulated by two main genes, *phzM* and *phzS* [26]. PCA is converted to 5-methylphenazine-1-carboxylic acid betaine (MPCBA), by means of a phenazine-specific methyltransferase (PhzM). In the second step, MPCBA is catalysed by flavin-dependent

monooxygenase (PhzS), involving the hydroxylation of the MPCBA betaine to 1-hydroxy-5-methyl phenazine, i.e., pyocyanin [11,73].

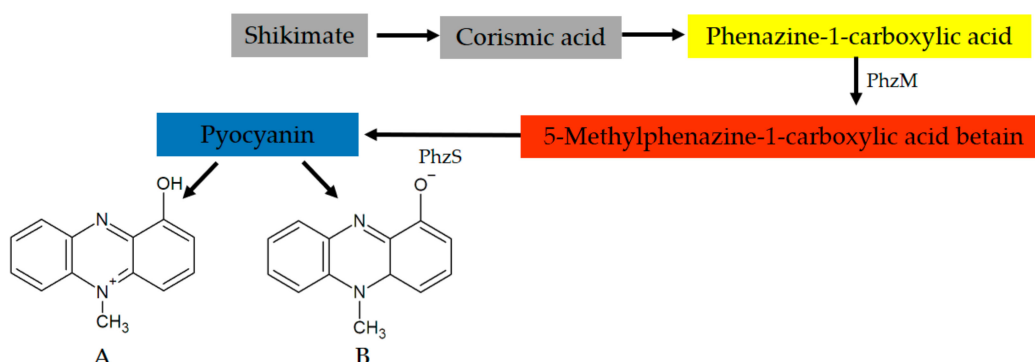


Figure 1. Steps of the biosynthesis of pyocyanin by *Pseudomonas aeruginosa* and its oxidated (A) and reduced (B) states.

It is noteworthy that PCA is an active phenazine in *P. aeruginosa* [34]. In addition, other intermediate phenazines produced by the bacterium also exhibit antimicrobial activity [74]. The result implies that these molecules can offer ecological benefits similar to those attributed to pyocyanin in non-producing strains of *P. aeruginosa* [75]. In addition, PhzM is only active in the presence of PhzS, suggesting that a protein-protein interaction is involved in the formation of pyocyanin. PhzS displays disorder near the binding site and this can be part of the substrate recognition process, which allows PhzM to form the PhzM-PhzS complex [76]. In addition, PhzM has no activity on PCA. Pyocyanin is only produced when PhzS and NADH are present because a transient physical interaction is required to activate pyocyanin production [77].

5. Modulation and Regulation of Pyocyanin Production

Pyocyanin is predominantly produced by edaphic strains of *P. aeruginosa*, more than in any other environment in which it develops. Interestingly, there are no geographical differences between the producing strains [78]. The phenazine-producing microbes are dominant, compared to the non-producing organisms. Phenazine production is virtually a requirement for ecological competence and persistence of soil microorganisms, including in the presence of allochthonous microbiota [79].

The synthesis of pyocyanin is modulated by a quorum-sensing (QS) mechanism that has been widely studied in *P. aeruginosa* [80]. The QS is a mechanism dependent on information from the bacterial population delivered by small diffusible molecules, called autoinducers, produced by each cell individually, regardless of the concentration of nutrients in the medium and secreted at basal level from a minimum of 500 cells [59,81].

The main autoinducers of *P. aeruginosa* are acyl-homoserine lactone (AHL) and Pseudomonas quinolone signal (PQS). Both are involved in the expression and modulation of pyocyanin [82]. The increase in AHL concentration results in an increase in the production of pyocyanin by the bacterium [83]. Additionally, *P. aeruginosa* has two main QS systems, extensively studied: LasR-LasI and RhlR-RhlI systems. They upregulate different bacterial expressions, such as alginate, rhamnolipid and pyocyanin synthesis. Negative control for the case of pyocyanin expression is exercised by the *PtsP* gene that interacts with the two QS systems, in addition to a repressor, QscR. This repressor encodes the *qscR* gene, responsible for the downregulation of QS systems in *P. aeruginosa* [84,85].

Pyocyanin also integrates the QS network indirectly by increasing the expression of the MvaT and MvaU proteins, related to the regulation of the PQS system. When the levels of these proteins are increased, pyocyanin production increases, because the PQS system is stimulated. These same proteins are involved in the QS responses to the formation of biofilm in *P. aeruginosa* [86], indirectly recognizing pyocyanin as a crucial element in the events associated with the establishment of biofilm by the bacterium [87].

Environmental conditions also influence the production of pyocyanin, particularly pH, temperature, oxygen tension and oxidative stress. The availability of nutrients however governs production more significantly. Deficiency of Mg and some important ions, such as Fe^{3+} , SO_4^{2-} , PO_4^{2-} and NH_4^+ , also plays a crucial role [88]. In addition, the presence of glycerol and TCA intermediates are required as a carbon source, as well as peptone and certain amino acids as nitrogen sources to build the phenazine ring. Additionally, a curious characteristic of *P. aeruginosa* is its expression of pyocyanin via AHL produced by coexisting microbes [89].

Suppression of pyocyanin synthesis may also occur in response to the availability of preferential carbon sources. *P. aeruginosa* prefers TCA intermediates, for example, succinate, because the compound interacts with PhzM mRNA, which encodes the key enzyme to produce pyocyanin. In addition, pyocyanin production appears to require excretion of pyruvate to reduce the intracellular NADH/NAD⁺ ratio, suggesting that the *P. aeruginosa* regulates primary metabolism during the exponential phase and the primary metabolism regulates pyocyanin production. In short, the NADH/NAD⁺ ratio is balanced by the inactivation of the pyruvate dehydrogenase complex by pyocyanin. The reduction of NAD⁺ can be avoided because pyruvate may be excreted without further oxidation [90].

The pigment is responsible for pyruvate secretion also in the stationary phase, influencing the intracellular redox state by reducing the flow of carbon through the central metabolism pathways. The reaction with NADH may represent an adaptation of the bacteria to modulate its intracellular redox state. Homeostasis is regulated after reducing pyocyanin when oxygen is available, resulting in increased aerobic respiration and NADH reoxidation. The reduction of pyocyanin also provides redox balance in the absence of electron acceptors. With a limited amount of electron acceptors, there are two types of NADH reoxidation, either with a reduction of pyocyanin directly or mediated by phenazine reductase [91].

In addition, protein degradation products under the action of alkaline protease are used to produce pyocyanin. *P. aeruginosa* also regulates the pigment concentration by means of an autoinducer secreted in accumulated basal concentrations; alkaline protease, however, is not mandatory for this [92]. In addition, nitrous oxide (NO) also exerts activity in the pyocyanin biosynthesis. Accumulation of NO induces a reduced pigment production. This is because NO strongly suppresses the *nor* gene, which encodes NO reductase, an enzyme that participates in the NO reduction reaction to N₂O [93].

6. Mechanism of Action of Pyocyanin

P. aeruginosa was the first microbe studied in terms of the ability to inhibit other organisms [94]. Pyocyanin acts by causing oxidative stress in susceptible prokaryotes and eukaryote cells, through the flow of electrons and the accumulation of ROS, especially O²⁻ and H₂O₂, after reaction with molecular oxygen [11,32]. The lethal concentration of pyocyanin against bacteria, filamentous fungi, yeasts, protozoa, algae and small animals varies significantly from study to study, depending on the model organism evaluated, and may occur from minute concentrations up to about 2000 µg/mL [95,96]. In Table 1, some organisms susceptible to the action of pyocyanin are summarized. The virulence mechanism used by *P. aeruginosa* is evolutionarily conserved and applied to different susceptible organisms [97].

As a planar molecule with hydrophobic and hydrophilic properties, pyocyanin interacts easily with the membrane of several organisms [98]. The formation of intracellular ROS in host cells after exposure to pyocyanin results in oxidative damage to the components of the cell cycle, depletion of NAD(P)H and enzymatic inhibition [68], in addition to specific damage to DNA [99]. The reduction of NAD(P)H and subsequent generation of ROS is irreversible possibly involving ring cleavage of the pyocyanin skeleton; however, pyocyanin can be oxidized by H₂O₂, formed in the oxidation of NAD(P)H by pyocyanin itself and catalysed by microperoxidases. This may be a relevant strategy for *P. aeruginosa* in in vivo conditions [100].

Initial investigations have already shown that oxygen is essential for the activity of pyocyanin against its competitors, and that the bactericidal effect depends on the concentration of the pigment. This may result in reductions ranging from one to 8 log unit cells/mL of the sensitive organism [101].

In eukaryotes, on the other hand, the interaction of pyocyanin can occur at the level of the cell wall or membrane, as well as in the respiratory chain of the mitochondria [102]. This interaction results in the release of mitochondrial ROS, accelerating the process of senescence and apoptosis [103]. In addition, concentrations less than 5 µg/mL of the pigment can disturb the vegetative state of certain filamentous fungi, promoting significant inhibition of the growth of the vegetative mycelium and the development of reproductive mycelia [10].

The formation of $O_2^{\cdot-}$ is the primary mechanism of the antimicrobial effect of pyocyanin. The ion interacts with the membrane, resulting in inhibition of respiration and active transport of solutes from the sensitive cell. There is no specific site in the respiratory chain where pyocyanin can interact; but the fact that the pigment also promotes cyanide inhibition suggests that the binding site occurs before the action of cytochrome oxidase [92].

Additionally, pyocyanin alters the redox state of the cell preferentially depleting NADPH, but it can also act on glutathione, a fact that is advantageous for *P. aeruginosa*. Concentrations from 130 µM of glutathione result in the formation of H_2O_2 , 30 times less when compared to the NADPH-Pyocyanin system [67]. In addition, glutathione inhibits the toxicity of pyocyanin in the host cell given that the molecule is an important antioxidant that can prevent the oxidative stress through the removal of ROS [104].

Table 1. Summary of some susceptible organisms to pyocyanin.

Organisms	References
Prokaryotes	
<i>Bacillus</i> sp.	[43,105–107]
<i>Bacillus cereus</i>	[108]
<i>Bacillus megaterium</i>	[108]
<i>Enterobacter aerogenes</i>	[35]
<i>Escherichia coli</i>	[7,34,35,43,95,105–109]
<i>Klebsiella oxytoca</i>	[95]
<i>Proteus mirabilis</i>	[95,105,106]
<i>Pseudomonas</i> sp.	[34]
<i>Salmonella typhi</i>	[108]
<i>Shigella</i> sp.	[110]
<i>Staphylococcus aureus</i>	[43,95,105,106,108]
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	[110]
<i>Xanthomonas oryzae</i>	[10]
<i>Vibrio</i> sp.	[111]
Eukaryotes	
<i>Alternaria</i> sp.	[110]
<i>Amoeba</i> sp.	[94]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	[112,113]
<i>Aspergillus niger</i>	[34,43,110,113]
<i>Candida</i> spp.	[34,43,102,107,110,114]
<i>Candida albicans</i>	[112]
<i>Candida neoformans</i>	[114]
<i>Caenorhabditis elegans</i>	[115]
<i>Fusarium</i> sp.	[34]
<i>Penicillium</i> sp.	[110,113]
<i>Rhizoctonia solani</i>	[10]
<i>Rhizopus</i> sp.	[110]
<i>Rhodotorula</i> sp.	[110]
<i>Trichophyton</i> sp.	[110]

Most microbes, however, can synthesize some metabolites with an inhibitory action that can affect *P. aeruginosa*. These compounds are secreted to inhibit, but not to kill potential competitors [102]. Negative ecological interactions between coexisting microbial species play a crucial role and thus maintain the balance between populations in a given microsystem. In this way, none of them is expected to become dominant, avoiding the collapse of the entire trophic chain involved [116]. In this context, the antimicrobial activity of pyocyanin can also be reduced by some organisms sensitive to it, for which they experience amensalism as the most obvious response strategy [117]. Amensalism is an ecological relationship in which the production and secretion of metabolites occurs to promote inhibition of a potential competitor, without favouring the antagonistic microbe, except to remain in that environment, coexisting with its competitor [118].

The relationship between *Escherichia coli* and *P. aeruginosa* is a good example of amensalism. *E. coli* can exhibit a diversity of metabolites to restrain the physiological advantages of *P. aeruginosa*. Some of them have been exploited as in the production of indole and acetate. Especially indole in concentrations between 0.5–2.0 mM can reduce the production of pyocyanin, as well as the formation of biofilm by *P. aeruginosa* [109]. In addition, the response to oxidative stress caused by pyocyanin may result from the expression of Mn-superoxide dismutase (Mn-SDO) and other SDO [32].

Enzyme expression is the preferred mechanism of many microbes against phenazine action, for example *S. aureus* which involves peroxidases in addition to persistence such as small colony variants (SCV) [119]. *Bacillus subtilis* produces NO, stimulating the synthesis of SDO [9]. On the other hand, given the need for oxygen to enhance the effect of pyocyanin, facultative microbes and strict anaerobes may naturally be more resistant to pyocyanin [50].

7. Benefits of Pyocyanin for *Pseudomonas aeruginosa*

As discussed earlier, pyocyanin is not merely a secondary metabolite related to the competitive advantages of *P. aeruginosa*. The pigment is important for cellular respiration because with the increase in the concentration of pyocyanin, the assimilation of oxygen by the cell is also increased [120]. Additionally, the pigment is a physiological signal for upregulation of the genes of the QS systems during the stationary phase. This function gives the pigment a primary importance in tuning cells to a particular physiological state, transcending the simple antibiotic effect in coordinating responses by microorganisms and communities to changes in the environment [37].

Pyocyanin also participates in the release of eDNA into the environment. The origin of eDNA has been assumed to be primarily from lysed cells [121]. The release occurs through lysis promoted by the accumulation of H₂O₂. The release of eDNA is mediated by the QS, AHL, and PQS systems, via flagella and pili type IV. The result of this is the greater cell-cell interaction, due to changes in the properties of the cell surface, as well as in the physical-chemical interactions, important for the establishment and stability of biofilms [122]. The pyocyanin-eDNA complex interferes with the hydrophobicity of the cell, creating conditions for the formation of robust biofilms. In addition, aromatic amino acids, especially proline, histidine, arginine, leucine, tyrosine and valine, promote an up-regulatory effect on biofilm [123]. Thus, the ecological role of pyocyanin is extremely important to *P. aeruginosa* [124]. In contrast, glutathione can reverse this effect. The molecule binds directly to pyocyanin, modifying its structure and inhibiting its activity [67].

Pyocyanin is involved in metals uptake and tolerance [125]. Iron uptake by *P. aeruginosa* is also associated with pyocyanin, even under low oxygen concentrations. For Fe³⁺ to be reduced, the bacterium uses NADH and siderophores [126]. On the other hand, pyocyanin acts as a physiological signal that regulates genes involved in efflux pumps [127], giving more resistance to metals, especially silver [128].

Acting as an opportunistic pathogen, pyocyanin is relevant to inflammatory responses [129,130]. A study with wild and clinical strains found the pigment is important for the *Pseudomonas* virulence: 95% of clinical strains and 100% of wild strains produced pyocyanin. Non-producers were more sensitive to the immune system. The fact that they

do not produce pyocyanin was identified with the non-expression of *phzM* and *phzS*, however, this did not prevent the bacterium from expressing other phenazines [131], as well as showing other phenotypes related to virulence [132].

Another important advantage of the expression of pyocyanin and other active phenazine, such as PCA, is the fact that oxidative stress provides a common strategy in the microbial world: overexpression of pyocyanin as a natural resource to avoid social cheating and select the most virulent strains. This event is known as social policing by co-workers, translating the concept of metabolic prudence, i.e., when the cell launches a public good preferably at no or low cost to itself. Under these conditions non-producing strains cheaters provide no benefits and are eliminated [133].

8. Mechanisms of Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Pyocyanin

Pyocyanin is toxic, but *P. aeruginosa* has a resistance to oxidative stress resulting from pigment activity. The activation of this mechanism is associated with the concentration of intracellular phosphate. Briefly, the expression of catalase, SDO and oxidoreductases occurs, which promotes a redox cycle mediated by NADPH, neutralizing the pyocyanin from its protonated state and thereby balancing the intracellular medium, keeping the cell stable in the environment and prolonging its stationary state [134]. There is also a mechanism to avoid the toxic effects of cyanide (CN^-). The bacterium appears to make use of active mechanisms of detoxification and synthesis of the respiratory chain, in which oxidases are insensitive to CN^- [135].

Secondary metabolites may also be associated with inhibition or reduction of the rate of cell growth [136]. Pyocyanin may also modulate the growth of *P. aeruginosa* in the final stages of the logarithmic phase and at the beginning of the stationary phase. This hypothesis is supported by results of previous studies [37,137,138]. It is suggested that the phenomenon is directly related to the formation of the ion transport system, as well as the generation of CN^- , a product of glycine metabolism [139]. The role of the cyanide ion for the bacterium is not yet clear. As a virulence factor, CN^- is extremely toxic and binds irreversibly to the terminal of the oxidases in the respiratory chain, inhibiting aerobic respiration [140,141].

In addition, pyocyanin also promotes increased expression of genes and operons that regulate redox transport and control, as well as decrease the expression of genes and operons involved in the acquisition of Fe^{3+} . In contrast, the reduction in the expression of pyocyanin also allows cells to not be physiologically disturbed [69].

9. Production of Pyocyanin on a Laboratory Scale

In the 1950s, many attempts were made to produce an ideal growth medium for *P. aeruginosa*, including adding glutamine to common enrichment media as a primary source of nitrogen for the synthesis of the phenazine ring. King et al. (1954) [142] proposed two semi-synthetic means to produce fluorescent pigments, verifying the inhibitory effect of phosphate. *Pseudomonas* A broth, known today as King A, was chosen as the standard culture medium for the detection and production of pyocyanin. King A serves as the basis for all other culture media described or modified later [143–146].

Under laboratory conditions, the amount of pyocyanin produced can vary both for the same strain or for isolated, subjected to the same incubation conditions, and on different occasions. This is possibly related to the stresses to which bacteria are exposed when kept in the laboratory [147]. Each *P. aeruginosa* strain alone has a maximum limit of pyocyanin concentration it can produce and the pigment production probably does not increase when the growth medium is modified [137]. The level of nutrients, and variation of pH, temperature and aeration are the limiting extrinsic factors for controlling the amount of pyocyanin produced [148].

The main approach in terms of the production of bacterial pigments is based on the QS strategy. Thus, commercially desired pigments can be overproduced through the induction of cellular communication when minimum nutrients required by the bacteria

and high levels of autoinducers are provided [149]. This can optimize the productivity and yield of the process, as has been observed for other pigments such as prodigiosin [150] and violacein [151]. It is suggested that the presence of pyocyanin can organize the population and synchronize the expression of genes that promote the synthesis of more pyocyanin [152]. The presence of pyocyanin in the medium used during the pre-inoculum may ensure that the pigment present at the time of inoculation may induce a gradual increase in the concentration of pyocyanin.

Phosphorus as PO_4^{3-} , is the crucial nutrient for the regulation of different secondary metabolites in microorganisms; *P. aeruginosa*, especially, is very sensitive to the variation in the concentration of the phosphate ion [30]. Limiting values of phosphate imply energy reduction and pyocyanin acts as a response against nutritional stress, regulating intracellular concentration of ATP [17]. This is one of the mechanisms proposed for explaining the most important characteristics exhibited by *P. aeruginosa*: versatility, resilience and persistence in environments with high selective pressures [153].

If glycerol is included in the medium, as a non-conventional and low-cost material, rich in chorismate [154] or nitrogen [108], it can be used to obtain pyocyanin. The reuse of waste as a substrate for pigment synthesis has already been demonstrated. Oliveira et al. (2019) [155] obtained between approximately 20 and 60 $\mu\text{g/mL}$ of pyocyanin, studying different concentrations of beer malt bagasse. Additionally, Cavalcanti et al. (2017) [156] observed production of pyocyanin in reactors containing peanut, cotton and sesame cakes during the removal of hydrocarbons by *P. aeruginosa* in the soil. This finding, attributed to pyocyanin, suggests a possible participation in the mechanisms used by the bacteria during the assimilation of recalcitrant compounds as sources of carbon and energy, possibly associated with the mechanisms of QS for the synthesis of biosurfactants and other tensioactive agents [147,157].

10. Pyocyanin Applications and Perspectives

The bioprospecting of microbes and their bioactive products is a topic of great interest and much explored, whose status has been improved since the beginning of the 21st century. Along with new compounds discovered, science has turned to the past, bringing to light some bioactive compounds discontinued for decades, yet gaining new applications [158]. Natural products and their structural analogues made up about 60% of the new small molecules that entered or returned to the market between the end of the 20th century and the beginning of this century [159]. In this context, the use of bioactive and biodegradable natural substances are more attractive strategies since they can be used to substitute synthetic compounds, related to numerous environmental impacts [160]. Table 2 lists some applications of pyocyanin in different areas of biotechnology.

Table 2. Summary of some biotechnological application for pyocyanin.

Application	Reference
Clinical diagnosis	[123]
Bioremediation	[147,161]
Microbial fuel cells (MFCs)	[9,57,138,162,163]
Antibiotic	[164,165]
Agrochemical	[73,166,167]
Biosensor	[168]
Use in Organic Light Emitting Devices (OLED)	[169]
Probiotics	[111]
Antitumour	[154]
Biocolourant	[166]

The two greatest potential perspectives for the use of pyocyanin are in industry or in pharmacology, given its antimicrobial nature. The bioprospecting of pyocyanin is based on the fact that the pigment is an active redox compound, i.e., an extracellular electron carrier agent, with NADH as the initial endogenous and molecular reducer [107,128]. Microbial

fuel cells (MFC) are devices that convert metabolic energy into electrical current using *Paeruginosa*, or other bacteria [170]. As a way of taking advantage of the metabolic potential of *P. aeruginosa*, the electric current can be generated using conventional substrates [171], and unconventional substrates, such as toluene, a toxic compound that is degraded by *P. aeruginosa* to produce electrical current [127]. Crude glycerol, a co-product of the process of obtaining biodiesel and the largest residue in this industrial sector, has also produced promising results [138].

Active redox compounds use the energy difference between a donor and electron acceptor, subsequently forming an ion gradient across the membrane. Electron transfer is catalysed by compounds present in the outer membrane or secreted by the cell. The addition of surfactant can increase the permeability of the membrane by up to four times. The gradient helps in the synthesis of ATP and transforms the difference in electrical potential into chemical energy. The bacterial electron flow is directed to an anode and then to an external circuit. At the cathode, electrons are used to convert oxygen into water. In addition, the pyocyanin used as an electron shuttle, increases not only the electron transfer with *P. aeruginosa*, but also with other species used in MFCs [172].

On the other hand, alterations in the respiratory chain of genetically modified *P. aeruginosa*, induced by 3,5-dichlorophenol present in water, can serve as a basis for the use of pyocyanin as a biosensor at pH = 7. The pigment can be used in its protonated state. When oxidized, the colour of the pyocyanin changed, signalling the presence of the toxin [168]. In addition, this principle can also be applied for the rapid diagnosis of *P. aeruginosa* infections [173]. Optimization of methodology could be expected to improve the biosensor's sensitivity.

The use of pyocyanin-producing *P. aeruginosa* strains also finds frontiers in bioremediation, especially in the removal of hydrocarbons from petroleum [156]. The expression of pyocyanin may have contributed evolutionarily by the genetic adaptation of the bacteria to the degradation of the oil [174]. It should be noted that the pigment does not exhibit surfactant or emulsifying properties [147], but its participation in the assimilation of the oil seems to be involved in cellular signalling for the synthesis of these compounds. Pyocyanin can serve as an autoinducer in the expression of biosurfactants, as well as increase tolerance to toxic compounds [137]. The mechanism still needs to be understood. What is known, however, is that hydrocarbonoclastic strains of pyocyanin-producing *P. aeruginosa* synthesize more biosurfactants than those that do not exhibit the pigment [157]. This is important because oil emulsification is one of the crucial points for the assimilation of hydrocarbons as a source of carbon and energy for the bacteria [175].

On the other hand, there are numerous examples of organisms displaying amensalism through antibiosis, inspiring new defence formulations against human, animal and plant pathogens [176]. In this context, the antimicrobial activity of pyocyanin, in terms of pharmacological properties, can be exploited from two new points of view.

The first, more classic, is as an antibiotic. Good results have been achieved with successful attempts in animal models. The production of an ointment containing 5 mg/mL applied to wounds contaminated by *S. aureus*, *K. pneumoniae* and *C. albicans* promoted the elimination of these pathogens on the skin of rabbits [164]. An even more successful and safer application of pyocyanin has been as an antibiotic in aquaculture in its use against vibriosis, a disease with a high mortality rate, especially in shrimp culture. A millimolar dose already causes damage to susceptible cells, however, pyocyanin can be a safe antibiotic and used in much higher doses. The toxicity of pyocyanin is dose-dependent and can be controlled with the use of antioxidants. The application of 5–10 mg/L of pyocyanin in the treatment of vibriosis has not demonstrated a pathological effect in eukaryotes and can be used as a probiotic against the disease. In addition, in place of being effective against *Vibrio* spp., pyocyanin also exhibited activity against certain aquatic fungi [177].

The second use of the pharmacological properties of pyocyanin gives it the status of agrochemical. One of the most promising results concerns the use of the pigment in the biocontrol of fungal and bacterial phytopathogens important in different crops [10,178].

Agrochemicals are natural bioactive molecules with potential use as a pesticide. Recently, pyocyanin demonstrated activity as potentially agrochemical against *Magnaporthe grisea* and *Xanthomonas oryzae* in concentrations of 150 and 200 mg/L, respectively [166].

In the same study, as a secondary way, a new property for the pigment has been demonstrated. Applying the biocolourant concept, the researchers treated samples of white cotton fabric with a pyocyanin solution and achieved solid and durable colours, varying from lilac to pink, suggesting use of pyocyanin is an alternative source as a natural textile colour agent, endowed with strong durability and an interesting spectrum of colours [166]. This opens up a new area of research, in the context of bioprospecting for environmentally friendly materials and their derivatives.

11. Conclusions

In this review, we have discussed some of the recent advances in our understanding of pyocyanin by making a comprehensive assessment of its history and examining the role of the pigment to *P. aeruginosa* in terms of the bacterium relationship with the environment and other organisms, including plants, animals and microbes. Bioprospecting may uncover new strategies to take advantage of the knowledge gained from studying *P. aeruginosa* pigments aiming environmentally-friendly applications.

Funding: This research was funded by CAPES—Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, for financial support (grant number 88882.440710/2019-01) and The APC was funded by Universidade Federal da Paraíba.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba. The English text of this paper has been revised by Sidney Pratt, Canadian, MAT (The Johns Hopkins University), RSAdip—TESL (Cambridge University).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Chadni, Z.; Rahaman, M.H.; Jerin, I.; Hoque, K.M.F.; Reza, M.A. Extraction and optimization of red pigment production as secondary metabolites from *Talaromyces verruculosus* and its potential use in textile industries. *Micology* **2017**, *8*, 48–57. [CrossRef]
2. Kurbanoglu, E.B.; Ozdal, M.; Ozdal, O.G.; Algur, O.F. Enhanced production of prodigiosin by *Serratia marcescens* MO-1 using ram horn peptone. *Braz. J. Microbiol.* **2015**, *46*, 631–637. [CrossRef] [PubMed]
3. Hajjaj, H.; Blanc, P.J.; Goma, G.; François, J. Sampling techniques and comparative extraction procedures for quantitative determination of intra- and extracellular metabolites in filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *164*, 195–200. [CrossRef]
4. Nowicka, B.; Kruk, J. Powered by light: Phototrophy and photosynthesis in prokaryotes and its evolution. *Microbiol. Res.* **2016**, *186–187*, 99–118. [CrossRef] [PubMed]
5. Moeller, R.; Horneck, G.; Facius, R.; Stackebrandt, E. Role of pigmentation in protecting *Bacillus* sp. endospores against environmental UV radiation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2005**, *51*, 231–236. [CrossRef] [PubMed]
6. Cornelis, P.; Dingemans, J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2013**, *7*. [CrossRef]
7. Viana, A.A.G.; Martins, R.X.; Ferreira, G.F.; Zenaide-Neto, H.; Amaral, I.P.G.; Vasconcelos, U. *Pseudomonas aeruginosa* and pyocyanin negatively act on the establishment of *Enterobacteriaceae* biofilm on a ceramic surface. *IJERA* **2017**, *7*, 23–30.
8. Liu, G.Y.; Nizet, V. Color me bad: Microbial pigments as virulence factors. *Trends Microbiol.* **2009**, *17*, 406–413. [CrossRef]
9. Pierson, L.S.; Pierson, E.A. Metabolism and function of phenazines in bacteria: Impacts on the behaviour of bacteria in the environment and biotechnological process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *86*, 1659–1670. [CrossRef]
10. Shanmugaiah, V.; Mathivanan, N.; Varghese, B. Purification, crystal structure and antimicrobial activity of phenazine-1-carboxamide produced by a growth-promoting biocontrol bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MML2212. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *108*, 703–711. [CrossRef]
11. Mavrodi, D.; Bonsall, R.F.; Delaney, S.M.; Soule, M.J.; Phillips, G.; Thomashow, L.S. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 6454–6465. [CrossRef] [PubMed]
12. Usman, H.M.; Abdulkadir, N.; Gani, M.; Maiturare, H.M. Bacterial pigments and its significance. *MOJ Bioequiv. Availab.* **2017**, *4*, 285–288.
13. Venil, C.K.; Zakaria, Z.A.; Ahmad, W.A. Bacterial pigments and their applications. *Process. Biochem.* **2013**, *48*, 1065–1079. [CrossRef]

14. Young, G. Pigment production and antibiotic activity in cultures of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **1947**, *54*, 109–117. [\[CrossRef\]](#)
15. Kurashi, M. Studies on the biosynthesis of pyocyanine (I): On the cultural condition for pyocyanine formation. *Bull. Inst. Chem. Res. Kyoto Univ.* **1958**, *36*, 163–173.
16. Stanley, M.M. *Bacillus pyocyaneus* infections: A review, report of cases and discussion of newer therapy including streptomycin (concluded). *Am. J. Med.* **1947**, *2*, 347–367. [\[CrossRef\]](#)
17. Turner, J.M.; Messenger, A.J. Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. *Adv. Microbiol. Physiol.* **1986**, *27*, 211–275.
18. Gaby, W.L. A study of the dissociative behavior of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **1946**, *51*, 217–234. [\[CrossRef\]](#)
19. Schoental, R. The nature of the antibacterial agents present in *Pseudomonas pyocyanea* cultures. *Br. J. Exp. Pathol.* **1941**, *22*, 137–147.
20. Waksman, S.A. History of the world “antibiotic”. *J. Hist. Med. Allied Sci.* **1973**, *23*, 284–286. [\[CrossRef\]](#)
21. Waksman, S.A.; Woodruff, H.B. Selective antibiotic action of various substances of microbial origin. *J. Bacteriol.* **1942**, *44*, 373–384. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Tavares, W. *Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico*, 3rd ed.; Atheneu: São Paulo, Brasil, 2014; pp. 1–10.
23. Burkholder, P.R. Cooperation and conflict among primitive organisms. *Am. Sci.* **1952**, *40*, 601–631.
24. Gould, K. Antibiotics: From prehistory to the present day. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71*, 572–575. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Leisinger, T.; Margraff, R. Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol. Rev.* **1979**, *43*, 422–442. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. El Feghali, P.A.R.; Nawas, T. Extraction and purification of pyocyanin: A simpler and more reliable method. *MOJ Toxicol.* **2018**, *4*, 417–422.
27. Bodey, G.P.; Bolivar, R.; Fainstein, V.; Jadeja, L. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* **1983**, *5*, 279–313. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Hays, E.E.; Wells, I.C.; Katzman, P.A.; Cain, C.K.; Jacobs, F.A.; Thayer, S.A.; Doisy, E.A.; Gaby, W.L.; Roberts, E.C.; Muir, R.D.; et al. Antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **1941**, *159*, 725–750.
29. Flood, M.E.; Herbert, R.B.; Holliman, F.G. Biosynthesis of pyocyanin, a phenazine microbial metabolite. *Chem. Commun.* **1970**, *22*, 1514–1515. [\[CrossRef\]](#)
30. Whooley, M.A.; McLoughlin, A.J. The regulation of pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1982**, *15*, 161–166. [\[CrossRef\]](#)
31. Tamagnini, L.M.; Gonzáles, R.D. Bacteriological stability and growth kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water. *J. Appl. Microbiol.* **1997**, *83*, 91–94. [\[CrossRef\]](#)
32. Hassan, H.; Fridovich, I. Mechanism of the antibiotic action of pyocyanine. *J. Bacteriol.* **1980**, *141*, 156–163. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Tyc, O.; Song, C.; Dickschat, J.S.; Vos, M.; Garbeva, P. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends Microbiol.* **2017**, *25*, 280–292. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Barakat, K.M.; Mattarm, M.Z.; Sabae, S.Z.; Darwesh, O.M.; Hassan, S.H. production and characterization of bioactive pyocyanin pigment by marine *Pseudomonas aeruginosa* OSh1. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* **2015**, *6*, 933–943.
35. Vasconcelos, U.; Lima, M.A.G.A.; Calazans, G.M.T. *Pseudomonas aeruginosa* associated with negative interactions on coliform bacteria growth. *Can. J. Pure Appl. Sci.* **2010**, *4*, 1133–1139.
36. Banning, N.; Toze, S.; Mee, B.J. Persistence of biofilm-associated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in groundwater and treated effluent in a laboratory model system. *Microbiology* **2003**, *149*, 47–55. [\[CrossRef\]](#)
37. Dietrich, L.E.P.; Price-Whelan, A.; Petersen, A.; Whiteley, M.; Nwman, D.K. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **2006**, *61*, 1308–1321. [\[CrossRef\]](#)
38. Denyer, S.P. Mechanisms of action of antibacterial biocides. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **1995**, *36*, 227–245. [\[CrossRef\]](#)
39. Kanthakumar, K.; Taylor, G.; Tang, K.H.T.; Cundell, D.R.; Rutman, A.; Smith, S.; Jeffery, P.K.; Cole, P.J.; Wilson, R. Mechanisms of action of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin in human ciliary beat in vitro. *Infect. Immun.* **1993**, *61*, 2848–2853. [\[CrossRef\]](#)
40. Huang, J.; Xu, Y.; Zhang, H.; Li, Y.; Huang, X.; Ren, B.; Zhang, X. Temperature-depenent expression of *phzM* and its regulatory genes *lasI* and *ptsP* in rhizosphere isolate *Pseudomonas* sp. strain M18. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 6568–6580. [\[CrossRef\]](#)
41. Lopes, L.C.; Davis II, E.W.; Silva, M.C.P.; Weisberg, A.J.; Bresciani, L.; Chang, J.H.; Loper, J.R.; Andreote, F.D. Tropical soils are reservoir for fluorescent *Pseudomonas* spp. biodiversity. *Environ. Microbiol.* **2018**, *20*, 62–74. [\[CrossRef\]](#)
42. Jabur, M.H. Study of some virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different clinical sources. *Mag. Al Kufa Univ. Biol.* **2014**, *6*, 227–233.
43. Abdull-Hussein, Z.R.; Atia, S.S. Antimicrobial effect of pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Exp. Biol.* **2016**, *6*, 1–4.
44. Maia, A.A.; Cantisani, M.L.; Esposto, E.M.; Silva, W.C.P.; Rodrigues, E.C.P.; Rodrigues, D.P.; Lázaro, N.S. Resistência antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de pescado e de cortes e de miúdos de frango. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2009**, *29*, 114–119. [\[CrossRef\]](#)
45. Pirnay, J.P.; Matthijs, S.; Colak, H.; Chablain, P.; Bilocq, F.; Van Eldere, J.; De Vos, D.; Zizi, M.; Triest, L.; Cornelis, P. Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. *Environ. Microbiol.* **2005**, *7*, 969–980. [\[CrossRef\]](#)
46. Moayed, A.; Nowroozi, J.; Sepahy, A.A. Effect of fetal and adult bovine serum on pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical and soil samples. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2017**, *20*, 1331–1338. [\[CrossRef\]](#)

47. Scott-Thomas, A.; Syhre, M.; Pattemorel, P.K.; Epton, M.; Laing, R.; Pearson, J.; Chambers, S.T. 2-Aminoacetophenone as a potential breath biomarker for *Pseudomonas aeruginosa* in the cystic fibrosis lung. *BMC Pulm. Med.* **2010**, *10*, 56. [\[CrossRef\]](#)
48. APHA; AWWA; WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22nd ed.; APHA; AWWA; WEF: Baltimore, MD, USA, 2012; pp. 9–49.
49. Al-Araji, M.K.; Ali, S. 2-Aminoacetophenone as a virulent factor for *Pseudomonas aeruginosa* causing sever burn and wound infections in Iraq. *Ibn Al Haitham J. Pure Appl. Sci.* **2012**, *25*, 88–97.
50. Winstanley, C.; O'Brien, S.; Brockhurst, M.A. *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. *Trends Microbiol.* **2016**, *24*, 327–337. [\[CrossRef\]](#)
51. Chieda, Y.; Iiyama, K.; Lee, J.M.; Kusakabe, T.; Yasunaga-Aoki, C.; Shimizu, S. Inactivation of pyocyanin synthesis genes has no effect on the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 toward the silkworm, *Bombyx mori*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2008**, *278*, 101–107. [\[CrossRef\]](#)
52. Allydice-Francis, K.; Brown, P.D. Diversity of antimicrobial resistance and virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* associated with fresh vegetables. *Int. J. Microbiol.* **2012**. [\[CrossRef\]](#)
53. Yin, Y.; Papavasiliou, G.; Zaborina, O.Y.; Alverdy, J.C.; Teymour, F. *De novo* synthesis and functional analysis of polyphosphate-loaded poly(ethylene) glycol hydrogel nanoparticles targeting pyocyanin and pyoverdine production in *Pseudomonas aeruginosa* as a model intestinal pathogen. *Ann. Biomed. Eng.* **2017**, *45*, 1058–1068. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Ferguson, D.; Cahill, O.J.; Quilty, B. Phenotypic, molecular and antibiotic resistance profiling of nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from two Irish hospitals. *J. Med. Biol. Sci.* **2017**, *1*, 1–15.
55. Abu, E.A.; Su, S.; Sallans, L.; Boissy, R.E.; Greatens, A.; Heineman, W.R.; Hassett, D.J. Cyclic voltammetric, fluorescence and biological analysis of purified aeruginosin A, a secreted red pigment of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* **2013**, *159*, 1736–1747. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
56. Finalayson, E.A.; Brown, P.D. Comparison of antibiotic resistance and virulence factors in pigmented and non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. *West Indian Med. J.* **2011**, *60*, 24–32.
57. Guttenberger, N.; Schlatzer, T.; Leypold, M.; Tassoti, S.; Breinbauer, R. Synthesis of novel ligands targeting phenazine biosynthesis proteins as a strategy for antibiotic intervention. *Mon. Chem.* **2018**, *149*, 847–856. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
58. Legani, P.; Leoni, E.; Rapuano, S.; Turin, D.; Valenti, C. Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: A 5-year study. *Int. J. Food Microbiol.* **1999**, *53*, 153–158. [\[CrossRef\]](#)
59. Emerenini, B.O.; Hense, B.A.; Kuttler, C.; Eberl, H.J. A mathematical model of quorum sensing induced biofilm detachment. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0132385. [\[CrossRef\]](#)
60. Santos, A.L.S.; Galdino, A.C.M.; Mello, T.P.; Ramos, L.S.; Branquinho, M.H.; Bolognese, A.M.; Columbano Neto, J.; Roudbary, M. What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective! *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2018**, *113*, 1–7. [\[CrossRef\]](#)
61. Vasconcelos, U.; Das, P.; Dias, D.S.B.; Bonifácio, T.T.C.; Arruda, R.R.A.; Oliveira, B.T.M.; Cavalcanti, T.G. *Microbial Biofilms Current Research and Practical Implications*; Caister Academic Press: Wymondham, UK, 2020; pp. 75–98. [\[CrossRef\]](#)
62. Mendis, N.; Lin, Y.R.; Faucher, S.P. Comparison of virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* expowd to water and grown rich broth. *Can. J. Microbiol.* **2014**, *60*, 777–781. [\[CrossRef\]](#)
63. Fux, C.A.; Costerton, W.J.; Stewart, P.S.; Stoeley, P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* **2015**, *13*, 34–40. [\[CrossRef\]](#)
64. Levipan, H.A.; Avendaño-Herrera, R. Different phenotypes of mature biofilm in *Flavobacterium psychrophilum* share a potential for virulence that differs from planktonic state. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2017**, *15*, 76. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
65. Toyofuko, M.; Inaba, T.; Kiyokawa, T.; Obana, N.; Yawata, Y.; Nomura, N. Environmental factors that shape biofilm formation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2015**, *80*, 7–12. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
66. Klausen, M.; Aaes-Jørgensen, A.; Molin, S.; Tolker-Nielsen, T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol. Microbiol.* **2003**, *50*, 61–68. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Muller, M. Glutathione modulates the toxicity of, but is not a biologically relevant reductant for, the *Pseudomonas aeruginosa* redox toxin pyocyanin. *Free Radic. Biol. Med.* **2011**, *50*, 971–977. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
68. Hall, S.; McDermott, C.; Anoopkumar-Dukie, S.; McFarland, A.J.; Forbes, A.; Perkins, A.V.; Davey, A.K.; Chess-Williams, R.; Kiefel, M.J.; Arora, D.; et al. Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins* **2016**, *8*, 823. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. El-Fouly, M.Z.; Sharaf, A.M.; Shain, A.A.M.; El-Bialy, H.A.; Omara, A.M.A. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Radic. Res. Appl. Sci.* **2015**, *8*, 36–48.
70. Özcan, D.; Kahraman, H. Pyocyanin production in the presence of calcium ion in *Pseudomonas aeruginosa* and recombinant bacteria. *Turk. J. Sci. Technol.* **2015**, *10*, 13–19.
71. Hunter, R.C.; Vanja, K.; Magen, M.L.; Hannah, G.; Thomas, R.M.; Dianne, K.N. Phenazine content in the cystic fibrosis respiratory tract negatively correlates with lung function and microbial complexity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2012**, *47*, 738–745. [\[CrossRef\]](#)
72. Sterritt, O.W.; Lang, E.J.M.; Kessans, S.A.; Ryan, T.M.; Demeler, B.; Jameson, G.B.; Parker, E.J. Structural and functional characterisation of the entry point to pyocyanin biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* defines a new 3-deoxy-d-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase subclass. *Biosci. Rep.* **2018**, *38*, BSR20181605. [\[CrossRef\]](#)

73. Jayaseelan, S.; Ramaswamy, D.; Dharmaraj, S. Pyocyanin: Production, applications, challenges and new insights. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *30*, 1159–1168. [\[CrossRef\]](#)
74. Machan, Z.A.; Pitt, T.L.; White, W.; Watson, D.; Taylor, G.W.; Cole, P.J.; Wilson, R. Interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: Description of an antistaphylococcal substance. *J. Med. Microbiol.* **1991**, *34*, 213–217. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Denning, G.M.; Iyer, S.S.; Reszka, K.J.; O'Malley, Y.; Rasmussen, G.T.; Britigan, B.E. Phenazine-1-carboxylic acid, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*, alters expression of immunomodulatory proteins by human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2003**, *285*, L584–L592. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Greenhagen, B.T.; Shi, K.; Robinson, H.; Gamage, S.; Bera, A.K.; Ladner, J.E.; Parsons, J.F. Crystal structure of the pyocyanin biosynthetic protein PhzS. *Biochemistry* **2008**, *47*, 5281–5289. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Parsons, J.F.; Greenhagen, B.T.; Shi, K.; Calabrese, K.; Robinson, H.; Ladner, J.E. Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **2007**, *46*, 1821–1828. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
78. Mavrodi, D.V.; Peever, T.L.; Mavrodi, O.V.; Parejko, J.A.; Raaijmakers, J.M.; Lemanceaus, P.; Mazurier, S.; Heide, L.; Blankenfeldt, W.; Weller, D.M.; et al. Diversity and evolution of the phenazine biosynthesis pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 866–879. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
79. Mazzola, M.; Cook, R.J.; Thomashow, L.S.; Weller, D.M.; Person III, L.S. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 2616–2624. [\[CrossRef\]](#)
80. Al-Shabib, N.A.; Husain, F.M.; Khan, R.A.; Khan, M.S.; Alam, M.Z.; Ansari, F.A.; Laeeq, S.; Zubair, M.; Shahzad, S.A.; Khan, J.M.; et al. Interference of phosphane copper (I) complexes of b-carboline with quorum sensing regulated virulence functions and biofilm in foodborne pathogenic bacteria: A first report. *Saudi J. Biol. Sci.* **2018**, *26*, 308–316. [\[CrossRef\]](#)
81. Brackman, G.; Coenye, T. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21*, 5–11. [\[CrossRef\]](#)
82. Hense, B.A.; Schuster, M. Core principles of bacterial autoinducer systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2015**, *79*, 153–169. [\[CrossRef\]](#)
83. Samrot, A.V.; Syed Azeemullah, A.; Suhail Azharudeen, M.; Sree Smarvitha, K.; Shaya Sneha, J. Characterization of acyl homoserine lactone of pigment producing *Pseudomonas aeruginosa* SU-3. *Pharma Chem.* **2016**, *8*, 74–79.
84. Miller, L.C.; O'Loughlin, C.T.; Zhang, Z.; Siryaporn, A.; Silpe, J.E.; Bassler, B.L.; Semmelhack, M.F. Development of potent inhibitors of pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 1298–1306. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Xu, H.; Lin, W.; Xia, H.; Xu, S.; Li, Y.; Yao, H.; Bai, F.; Zhang, X.; Bai, Y.; Saris, P.; et al. Influence of *ptsP* gene on pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *253*, 103–109. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
86. Li, C.; Wally, H.; Miller, S.J.; Lu, C.-D. The multifaceted proteins MvaT and MvaU, members of the H-NS family, control arginine metabolism, pyocyanin synthesis and prophage activation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 6211–6218. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
87. Das, T.; Kutty, S.K.; Kumar, N.; Manifold, M. Pyocyanin facilitates extracellular DNA binding to *Pseudomonas aeruginosa* influencing cell surface properties and aggregation. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e58299. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
88. Tjeerd van Rij, E.; Wesselink, M.; Chin-A-Woeng, T.F.C.; Bloembergen, G.V.; Lugtenberg, B.J.J. Influence of environmental conditions on the production of phenazine-1-carboxamide by *Pseudomonas aeruginosa* PCL 1391. *Mol. Plant Microbe Interact.* **2004**, *17*, 557–566.
89. Mavrodi, D.V.; Blankenfeldt, W.; Thomashow, L.S. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas* spp. biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2006**, *44*, 417–445. [\[CrossRef\]](#)
90. Huang, J.; Sonnleitner, E.; Ren, B.; Xu, Y.; Haas, D. Catabolite repression control of pyocyanin biosynthesis at an intersection of primary and secondary metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 5016–5020. [\[CrossRef\]](#)
91. Price-Whelan, A.; Dietrich, L.E.P.; Newman, D.K. Pyocyanin alters redox homeostasis and carbon flux through central metabolic pathways in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 6237–6381. [\[CrossRef\]](#)
92. Iiyama, K.; Takahashi, E.; Lee, J.M.; Mon, H.; Morishita, M.; Kusakabe, T.; Yasunaga-Aoki, C. Alkaline protease contributes to pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2017**, *364*. [\[CrossRef\]](#)
93. Gao, L.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Qiao, X.; Zi, J.; Chen, C.; Wan, Y. Reduction of PCN biosynthesis by NO in *Pseudomonas aeruginosa*. *Redox Biol.* **2016**, *8*, 252–258. [\[CrossRef\]](#)
94. Aonofriesei, F.; Crășmaru, M. Antibacterial activity of pyocyanin produced by some *Pseudomonas* strains isolated from seawater. In *Annals of the University of Craiova*, 2004, IX (XLV); University of Craiova: Craiova, Romania, 2004; pp. 121–126.
95. Salih, S.S.; Mohammed, L.M.A. Antibiotic action of pyocyanin on some pathogenic bacteria isolated from wound infection. *Int. J. Adv. Res.* **2017**, *5*, 1197–1201. [\[CrossRef\]](#)
96. Karpagam, S.; Sudhakar, T.; Lakshminpathy, M. Microbiocidal response of pyocyanin produced by *P. aeruginosa* toward clinical isolates of fungi. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2013**, *5*, 870–873.
97. Lau, G.W.; Hassett, D.J.; Ran, H.; Kong, F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *TRENDS Mol. Med.* **2004**, *10*, 599–606. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
98. Baron, S.S.; Rowe, J.J. Antibiotic action of pyocyanin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1981**, *20*, 814–820. [\[CrossRef\]](#)
99. Muller, M. Premature cellular senescence induced by pyocyanin, a redox-active *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Free Radic. Biol. Med.* **2006**, *41*, 1670–1677. [\[CrossRef\]](#)
100. Reszka, K.J.; O'Malley, Y.; McCormick, M.L.; Denning, G.M.; Britigan, B.E. Oxidation of pyocyanin, a cytotoxic product from *Pseudomonas aeruginosa*, by microperoxidase 11 and hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, *36*, 1148–1159. [\[CrossRef\]](#)

101. Baron, S.S.; Terranova, G.; Rowe, J.J. Molecular mechanism of the antimicrobial action of pyocyanin. *Curr. Microbiol.* **1989**, *18*, 223–230. [\[CrossRef\]](#)
102. Bonifácio, T.T.C.; Arruda, R.R.A.; Oliveira, B.T.M.; Silva, J.E.G.; Vasconcelos, U. Exposure to pyocyanin promotes cellular changes in *Candida* spp. *Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci.* **2020**, *11*, 111–119.
103. Managò, A.; Becker, K.A.; Carpinteiro, A.; Wilker, B.; Soddemann, M.; Seitz, A.P.; Edwards, M.J.; Grassmé, H.; Szabò, I.; Gulbins, E. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin induces eutrophil death via mitochondrial reactive oxygen species and mitochondrial acid sphingomyelinase. *Antioxidants Redox Signal.* **2015**, *22*, 1097–1110. [\[CrossRef\]](#)
104. Kwon, D.H.; Cha, H.-J.; Lee, H.; Homg, S.-H.; Park, C.; Park, S.-H.; Kim, G.-Y.; Kim, S.; Kim, H.-S.; Hwang, H.-J.; et al. Protective effect of glutathione against oxidative stress-induced cytotoxicity in raw 264.7 macrophages through activating the nuclear factor erythroid 2-related factor-2/heme oxygenase-1 pathway. *Antioxidants* **2019**, *8*, 82. [\[CrossRef\]](#)
105. Sudhakar, T.; Karpagam, S.; Jayavarthan, R. Pyocyanin and its bacteriostatic effect towards common clinical pathogens. *Int. J. Pharm. Tech. Res.* **2013**, *5*, 1487–1492.
106. Sudhakar, T.; Karpagam, S.; Premkumar, J. Biosynthesis, antibacterial activity of pyocyanin pigment produced by *Pseudomonas aeruginosa* SU1. *J. Chem. Pharm. Res.* **2015**, *7*, 921–924.
107. Özyürek, S.B.; Gür, S.D.; Bilkay, I.S. Investigation of antimicrobial activity of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different clinical specimens. *Hacet. J. Biol. Chem.* **2016**, *44*, 1–6.
108. Agrawal, A.H.; Chauhan, P.B. Effect of cultivation media components on pyocyanin production and its application in antimicrobial property. *Int. J. Curr. Adv. Res.* **2016**, *5*, 829–833.
109. Arruda, R.R.A.; Oliveira, B.T.M.; Bonifácio, T.T.C.; Morais, V.C.; Amaral, I.P.G.; Vasconcelos, U. Activity of two exometabolites produced by *Escherichia coli* on the synthesis of pyocyanin. *Int. J. Adv. Eng. Res. Sci.* **2019**, *6*, 267–271. [\[CrossRef\]](#)
110. Jameel, Z.J.; Hussain, A.F.; Al-Mahdawi, M.A.; Alkerim, N.F.A.; Alrahman, E.S.A. Bioactivity of pyocyanin of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates against a variety of human pathogenic bacteria and fungi species. *Int. Arab. J. Antimicrob. Agents* **2017**, *7*, 2. [\[CrossRef\]](#)
111. Priyaja, P.; Jayesh, P.; Correya, N.S.; Sreelakshmi, B.; Sudheer, N.S.; Phillip, R.; Singh, I.S.B. Antagonistic effect of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from various ecological niches in *Vibrio* species pathogenic to crustaceans. *J. Coast. Life Med.* **2014**, *2*, 76–84.
112. Kerr, J.R.; Taylor, G.W.; Rutman, A.; Høiby, N.; Cole, P.J.; Wilson, R. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *J. Clin. Pathol.* **1999**, *52*, 385–387. [\[CrossRef\]](#)
113. Silva, J.E.G.; Bonifácio, T.T.C.; Arruda, R.R.A.; Kretschmar, E.A.M.; Vasconcelos, U. Atividade bioestática da pociocianina sobre fungos filamentosos isolados de parede de concreto. *Int. J. Dev. Res.* **2020**, *10*, 35230–35264.
114. Hassani, H.H.; Hasan, H.M.; Al-Saadi, A.; Ali, A.M.; Muhammad, M.H. A comparative study on cytotoxicity and apoptotic activity of pyocyanin produced by wild type and mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Exp. Biol.* **2012**, *2*, 1389–1394.
115. Cezaitliyan, B.; Vinayavekhin, N.; Grefell-Lee, D.; Yuen, G.J.; Saghatelian, A.; Ausubel, F.M. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* phenazines that kill *Caenorhabditis elegans*. *PLOS Pathog.* **2013**, *9*, e1003101. [\[CrossRef\]](#)
116. Ghouli, M.; Mitri, S. The ecology and evolution of microbial competition. *Trends Microbiol.* **2016**, *24*, 833–845. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
117. Martins, V.V.; Macarenco, A.C.; Gradella, D.G.; Stehling, E.G. Antagonism between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* against coliforms. *Water Supply* **2014**, *14*, 99–106. [\[CrossRef\]](#)
118. Faust, K.; Raes, J. Microbial interactions: From networks to models. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*. [\[CrossRef\]](#)
119. Hotterbeekx, A.; Kumar-Singh, S.; Goossens, H.; Malhotra-Kumar, S. In vivo and in vitro interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2017**, *106*. [\[CrossRef\]](#)
120. Cox, C.D. Role of pyocyanin in the acquisition of iron from transferrin. *Infect. Immun.* **1986**, *52*, 263–270. [\[CrossRef\]](#)
121. Nagler, M.; Insam, G.; Pietramellara, G.; Ascher-Jenull, J. Extracellular DNA in natural environments: Features, relevance and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 6343–6356. [\[CrossRef\]](#)
122. Das, T.; Manefield, M. Pyocyanin promotes extracellular DNA release in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e0046718. [\[CrossRef\]](#)
123. Sismaet, H.J.; Webster, T.A.; Goluch, E.D. Up-regulating pyocyanin production by amino acid addition for early electrochemical identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *Analyst* **2014**, *139*, 4241–4246. [\[CrossRef\]](#)
124. Whitchurch, C.B.; Tolker-Nielsen, T.; Ragas, P.C.; Mattick, J.S. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **2002**, *295*, 1487. [\[CrossRef\]](#)
125. Hussein, K.A.; Joo, J.H. Heavy metal resistance of bacteria and its impact on the production of antioxidant enzymes. *Afr. J. Microbiol.* **2013**, *7*, 2288–2296.
126. Wang, Y.; Wilks, J.C.; Danhorn, T.; Ramos, I.; Croal, L.; Newman, D.K. Phenazine-1-carboxylic acid promotes bacterial biofilm development via ferrous iron acquisition. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 3606–3617. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
127. Wu, C.-H.; Yet-Pole, I.; Chiu, Y.-H.; Lin, C.-W. Enhancement of power generation by toluene biodegradation in a microbial fuel cell in the presence of pyocyanin. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **2014**, *45*, 2319–2324. [\[CrossRef\]](#)
128. Muller, M.; Merrett, N.D. Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* confers resistance to ionic silver. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 5492–5499. [\[CrossRef\]](#)
129. Sales-Neto, J.M.; Lima, E.A.; Cavalcante-Silva, L.H.A.; Vasconcelos, U.; Rodrigues-Mascarenhas, S. Anti-inflammatory potential of pyocyanin in LPS-stimulated murine macrophages. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2019**. [\[CrossRef\]](#)

130. Rada, B.; Leto, T.L. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: Relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. *Trends Microbiol.* **2013**, *21*, 73–81. [\[CrossRef\]](#)
131. Nowroozi, J.; Sepahi, A.A.; Rashnonejad, A. Pyocyanine biosynthetic genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and detection of pyocyanine's antimicrobial effects with and without colloidal silver nanoparticles. *Cell J.* **2012**, *14*, 7–18.
132. Kamal, M.A.; Pambuk, C.I.A.; Husein, A.S. The virulence of pigmented and non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa* in mice with antibiotics susceptibility. *Int. J. Vaccines Vaccin* **2016**, *3*. [\[CrossRef\]](#)
133. Castañeda-Tamez, P.; Ramirez-Peris, J.; Pérez-Velázquez, J.; Kuttler, C.; Jalalimanesh, A.; Saucedo-Mora, M.A.; Jiménez-Cortés, J.G.; Maeda, T.; Gonzáles, Y.; Tomás, M.; et al. Pyocyanin restricts social cheating in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1348. [\[CrossRef\]](#)
134. Hassett, D.J.; Charniga, L.; Bean, K.; Ohman, D.E.; Cohen, M.S. Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: Mechanisms of resistance, antioxidant defences, and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. *Infect. Immun.* **1992**, *60*, 328–336. [\[CrossRef\]](#)
135. Cunningham, L.; Williams, H.D. Isolation and characterization of mutants defective in the cyanide-insensitive respiratory pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **1995**, *117*, 432–438. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
136. Pinhal, S.; Ropers, D.; Geiselmann, J.; De Jong, H. Acetate metabolism and the inhibition of bacterial growth by acetate. *J. Bacteriol.* **2019**, *201*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
137. Das, S.; Das, P. Effects of cultivation media components on biosurfactant and pigment production from *Pseudomonas aeruginosa*. *Braz. J. Chem. Eng.* **2015**, *32*, 317–324. [\[CrossRef\]](#)
138. Dantas, P.V.; Peres, S.; Campos-Takashi, G.M.; La Rotta, C.E. Utilization of raw glycerol for pyocyanin production from *Pseudomonas aeruginosa* in half-microbial fuel cells: Evaluation of two electrochemical approaches. *J. Electrochem. Soc.* **2013**, *106*, G142–G148. [\[CrossRef\]](#)
139. Lundgren, B.R.; Thornton, W.; Dornan, M.H.; Villegas-Peñaranda, L.R.; Boddy, C.N.; Nomura, C.T. Gene PA2449 is essential for glycine metabolism and pyocyanin biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* **2013**, *195*, 2087–2100. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
140. Lenney, W.; Gilchrist, F.J. *Pseudomonas aeruginosa* and cyanide production. *Eur. Respir. J.* **2011**, *37*, 482–483. [\[CrossRef\]](#)
141. Zlosnik, J.E.A.; Tavankar, G.R.; Bundy, J.G.; Mossialos, D.; O'toole, R.; Williams, H.D. Investigation of the physiological relationship between the cyanide-insensitive oxidase and cyanide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **2006**, *125*, 1407–1415. [\[CrossRef\]](#)
142. King, E.O.; Ward, M.K.; Raney, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* **1954**, *44*, 301–307.
143. Devnath, P.; Uddin, M.K.; Ahmed, F.; Hossain, M.T.; Manchur, M.A. Extraction, purification and characterization of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* and evaluation for its antimicrobial activity. *Int. Res. J. Biol. Sci.* **2017**, *6*, 1–7.
144. Atzél, B.; Szoboszlai, S.; Mikuska, Z.; Kriszt, B. Comparison of phenotypic and genotypic methods for the detection of environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2008**, *21*, 143–155. [\[CrossRef\]](#)
145. Brodsky, M.H.; Nixon, M.C. Rapid method for detection of *Pseudomonas aeruginosa* on MacConkey agar under ultraviolet light. *Appl. Microbiol.* **1973**, *26*, 219–220. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
146. Mossel, D.A.A.; Indacochea, L. A new cetrimide medium for the detection of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Med. Microbiol.* **1971**, *4*, 380–382. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
147. Viana, A.A.G.; Oliveira, B.T.M.; Cavalcanti, T.G.; Sousa, K.A.; Mendonça, E.A.M.; Amaral, I.P.G.; Vasconcelos, U. Correlation between pyocyanin production and hydrocarbonoclastic activity in nine strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Adv. Eng. Res. Sci.* **2018**, *5*, 212–223. [\[CrossRef\]](#)
148. Elbargisy, R.M. Optimization of nutritional and environmental conditions for pyocyanin production by urine isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Saudi J. Biol. Sci.* **2020**. [\[CrossRef\]](#)
149. Raina, S.; Murphy, T.; Vizio, D.; Reffatti, P.; Keshavarz, T. Novel strategies for over-production of microbial products. *Chem. Eng. Trans.* **2011**, *24*, 847–852.
150. Thomson, N.R.; Crow, M.A.; McGowan, S.J.; Cox, A.; Salmond, G.P.C. Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Mol. Microbiol.* **2000**, *36*, 539–556. [\[CrossRef\]](#)
151. McClean, K.H.; Winson, M.K.; Fish, L.; Taylor, A.; Chhabra, S.R.; Camara, M.; Daykin, M.; Lamb, J.H.; Swift, S.; Bycroft, B.W.; et al. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: Exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones. *Microbiology* **1997**, *143*, 3703–3711. [\[CrossRef\]](#)
152. Van der Berg, J.P.; Velema, W.A.; Szymanski, W.; Driessen, J.M.; Feringa, B.L. Controlling the activity of quorum sensing autoinducers with light. *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 3593–3598. [\[CrossRef\]](#)
153. Moradali, M.F.; Ghods, S.; Rehm, B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2017**, *7*. [\[CrossRef\]](#)
154. Vipin, C.; Ashwini, P.; Kavya, A.V.; Rekha, P.D. Overproduction of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* by supplementation of pathway precursor shikimic acid and evaluation of its activity. *Res. J. Pharm. Technol.* **2017**, *10*, 533–536. [\[CrossRef\]](#)
155. Oliveira, B.T.M.; Barbosa, P.S.Z.; Cavalcanti, T.G.; Amaral, I.P.G.; Vasconcelos, U. Craft beer waste as substrate for pyocyanin synthesis. *J. Pharm. Biol. Sci.* **2019**, *14*, 21–25.

156. Cavalcanti, T.G.; Souza, A.F.; Ferreira, G.F.; Dias, D.S.B.; Severino, L.S.; Morais, J.P.S.; Sousa, K.A.; Vasconcelos, U. Use of agro-industrial waste in the removal of phenanthrene and pyrene by microbial consortia in soil. *Waste Biomass Valorization* **2017**. [\[CrossRef\]](#)
157. Das, P.; Ma, L.Z. Pyocyanin pigment assisting biosurfactant-mediated hydrocarbon emulsification. *Int. Biodegrad. Biodeterior.* **2013**, *85*, 278–283. [\[CrossRef\]](#)
158. Pragana, L.G.; Silva, E.S.; Vasconcelos, U. Exploração do potencial da cafeína como ativo antibiofilme em *Pseudomonas aeruginosa* na década de 2010. *Int. J. Dev. Res.* **2020**, *10*, 37869–37874.
159. Angell, S.; Bench, B.J.; Williams, H.; Wartanabe, C.M.H. Pyocyanin isolated from a marine microbial population: Synergic production between two distinct bacterial species and mode of action. *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 1349–1359. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
160. Méndez, D.A.C.; Gutierrez, E.; Lamarque, G.C.C.; Rizzato, V.L.; Buzalaf, M.A.R.; Machado, M.A.A.M.; Cruvinel, T. A eficácia da terapia fotodinâmica antimicrobiana mediada pela curcumina depende dos tempos de pré-irradiação e crescimento do biofilme. *Fotodiagn. Ter. Fotodin.* **2019**, *27*, 474–480.
161. Norman, R.S.; Moeller, P.; McDonald, T.J.; Morris, P.J. Effect of pyocyanin on a crude-oil-degrading microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 4004–4011. [\[CrossRef\]](#)
162. Rabaey, K.; Boon, N.; Höfte, M.; Verstrate, W. Microbial phenazine production enhances electron transfer in biofuels cells. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 3401–3408. [\[CrossRef\]](#)
163. Fuse, K.; Fujimura, S.; Kikuchi, T.; Gomi, K.; Iida, Y.; Nukiwa, T.; Watanabe, A. Reduction of virulence factor pyocyanin production in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* by cultivation media components on biosurfactant and pigment production from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Chemother.* **2013**, *19*, 82–88. [\[CrossRef\]](#)
164. Gharieb, M.M.; El-Sheekh, M.M.; El-Sabbagh, S.; Hamza, W.T. Efficacy of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* as a topical treatment of infected skin of rabbits. *Biotechnol. Indian J.* **2013**, *7*, 184–193.
165. Priyaja, P.; Jayesh, P.; Haseeb, M.; Jose, B.; Phillip, R.; Bright Singh, I.S. Evaluation of pyocyanin toxicity in various life stages of *Penaes monodon* and in nitrifying bacterial consortia for their safe application in recirculating aquaculture systems (RAS) to abrogate pathogenic vibrios. *Aquac. Int.* **2016**, *25*, 743–753. [\[CrossRef\]](#)
166. De Britto, S.; Gajbar, T.D.; Satapute, P.; Sundaram, L.; Lakshmikantha, R.Y.; Jogaiah, S.; Ito, S.-I. Isolation and characterization of nutrient dependent pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* and its dye and agrochemical properties. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1542. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
167. Khare, E.; Arora, N.K. Dual activity of pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*—Antibiotic against phytopathogen and signal molecule for biofilm development by rhizobia. *Can. J. Microbiol.* **2011**, *57*, 708–713. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
168. Yu, D.; Yong, Y.-C.; Liu, C.; Fang, Y.; Bai, L.; Dong, S. New applications of genetically modified *Pseudomonas aeruginosa* for toxicity detection in water. *Chemosphere* **2017**, *184*, 106–111. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
169. Chen, J.; Xiao-Chang, C. Organic Light-Emitting Device Having Phenanthroline-Fused Phenazine. U.S. Patent 6,713,781, 2004.
170. Rabaey, K.; Verstraete, W. Microbial fuel cells: Novel biotechnology for energy generation. *Trends Biotechnol.* **2005**, *23*, 291–298. [\[CrossRef\]](#)
171. Ali, N.; Anam, M.; Yousaf, S.; Maleeha, S.; Bangash, Z. Characterization of the electric current generation potential of the *Pseudomonas aeruginosa* using glucose, fructose, and sucrose in double chamber Microbial Fuel Cell. *Iran. J. Biotechnol.* **2017**, *15*, 216–223. [\[CrossRef\]](#)
172. Kumar, R.; Singh, L.; Zularisam, A.W. Exoelectrogens: Recent advances in molecular drivers involved in extracellular electron transfer and strategies used to improve it for microbial full cell applications. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **2016**, *56*, 1322–1336. [\[CrossRef\]](#)
173. Sismaet, H.J.; Pinto, A.J.; Goluch, E.D. Electrochemical sensors for identifying pyocyanin production in clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *97*, 65–69. [\[CrossRef\]](#)
174. Das, D.; Baruah, R.; Roy, A.S.; Singh, A.K.; Boruah, H.P.D.; Kalita, J.; Bora, T.C. Complete genome sequence analysis of *Pseudomonas aeruginosa* N002 reveals its genetic adaptation for crude oil degradation. *Genomics* **2014**, *105*, 182–190. [\[CrossRef\]](#)
175. Vasconcelos, U.; de França, F.P.; Oliveria, F.J.S. Removal of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. *Quim. Nova* **2011**, *34*, 218–221. [\[CrossRef\]](#)
176. Mortzfeld, F.B.; Pietruszka, J.; Baxendale, I.R. A simple and efficient flow preparation of pyocyanin a virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur. J. Org. Chem.* **2019**, *2019*, 5424–5433. [\[CrossRef\]](#)
177. Priyaja, P.; Jayesh, P.; Philip, R.; Singh, I.S.B. Pyocyanin induced in vitro oxidative damage and its toxicity level in human, fish and insect cell lines for its selective biological application. *Cytotechnology* **2016**, *68*, 143–155. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
178. Chin-A-Woeng, T.F.C.; Bloembergen, G.V.; Lugtenberg, B.J.J. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytol.* **2003**, *157*, 503–523. [\[CrossRef\]](#)



ISSN: 2230-9926

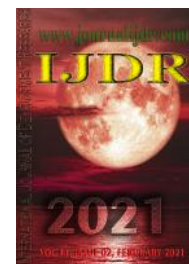
Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research

Vol. 11, Issue, 02, pp. 44127-44134, February, 2021

<https://doi.org/10.37118/ijdr.21064.02.2021>



RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

USO DE PIOCIANINA NO TINGIMENTO DE FIBRA DE ALGODÃO

Thiago Gonçalves, Bianca Teixeira Moraes de Oliveira and Ulrich Vasconcelos

Laboratório de Microbiologia Ambiental, CBIOTEC, Rua Ipê Amarelo, S/N, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, CEP – 58051-900, João Pessoa-PB, Brazil

ARTICLE INFO

Article History:

Received 07th November, 2020

Received in revised form

19th December, 2020

Accepted 25th January, 2021

Published online 24th February, 2021

Key Words:

Biocorantes, Pigmentos Bacterianos,

Pigmentos Azuis,

Pseudomonas aeruginosa.

ABSTRACT

Pigmentos bacterianos são bons substitutos de corantes sintéticos. Este trabalho produziu, extraiu e caracterizou piocianina de dois isolados selvagens de *Pseudomonas aeruginosa* cultivadas em King A suplementado com bagaço de malte de cevada 2% (m/v) e incubação sob agitação ($29 \pm 1^\circ\text{C}$ – 72h). A extração com clorofórmio produziu cerca de 30 ml de solução de piocianina ($585 \mu\text{g/mL}$) com pureza alta. A concentração celular aumentou até 9,5 vezes e a máxima concentração de piocianina foi cerca de $1 \mu\text{g/mL.h}^{-1}$ (coeficiente de produção $\approx 240 \mu\text{g/mL.UA}^{-1}$). A maior densidade celular ocorreu às 36h e o pigmento pareceu modular o crescimento. A fibra foi tingida com 50 ou $100 \mu\text{g/mL}$ de piocianina empregando o método da exaustão e NaHCO_3 como mordente. A piocianina foi funcional à fibra, produzindo dois tons de azul, resistentes à lavagem e secagem.

*Corresponding author: Thiago Gonçalves

Copyright © 2021, Thiago Gonçalves et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Thiago Gonçalves, Bianca Teixeira Moraes de Oliveira and Ulrich Vasconcelos. "Uso de piocianina no tingimento de fibra de algodão", International Journal of Development Research, 11, (02), 44127-44134.

INTRODUCTION

A cor é uma interação perceptual com origem na habilidade do olho humano discriminar entre diferentes comprimentos de onda de luz de dentro de uma estreita faixa de radiação eletromagnética (Siuda-Krzywicka *et al.*, 2019). O tingimento de materiais é uma das atividades humanas mais antigas, confundindo-se à própria história da civilização, cujos registros datam a Idade do Bronze (Wisniak, 2004). Os componentes que interagem num sistema de tingimento são: a fibra, a água, o agente de cor e os aditivos. A técnica se fundamenta na modificação física ou química de um substrato, de forma que a luz refletida sobre ele, provoque percepção de cor ao olho humano (Perkins, 1995). Os agentes sintéticos de cor revolucionaram a indústria química ao oferecerem materiais de baixo custo, altamente estáveis e bons substitutos dos pigmentos naturais (Gmoser *et al.*, 2008). No entanto, o fato de os corantes sintéticos estarem relacionados a impactos negativos à saúde e ao ambiente, a demanda por pigmentos extraídos de fontes naturais tem sido uma tendência mundial crescente (Malik *et al.*, 2012). Os biocorantes podem ser obtidos de plantas ou animais (Heer e Sharma, 2017), contudo a obtenção desses pigmentos, via bioprocessos microbianos, é um campo de estudo em franca expansão (Parmar e Phutela, 2015), com diversas vantagens, por exemplo, amplo espectro de cores, fácil obtenção e extração, ambientalmente corretas, em termos de disposição de resíduos e exposição ocupacional e os organismos produtores são de fácil seleção e manipulação (Usman *et al.*, 2017; Venil *et al.*, 2013). Certas características dos pigmentos naturais, tais como, biodegradabilidade, não carcinogenicidade e baixa toxicidade fazem deles uma fonte atraente para uso humano (Joshi *et al.*, 2003). Os carotenoides são os compostos mais investigados no contexto da produção de biocorantes para a indústria têxtil (Kramar *et al.*, 2014), numa tentativa de limitar a utilização de corantes sintéticos, encorajando interesse por demais pigmentos microbianos (Numan *et al.*, 2018). A piocianina é uma fenazina de exuberante coloração azul ($\text{MM} = 210,23 \text{ g/mol}$), composta por duas subunidades de N-metil-1-hidroxifenazina, produzida exclusivamente por 90-95% das linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* a partir do ácido corísmico (Jayaseelan *et al.*, 2014; Mavrodi *et al.*, 2001). A molécula se apresenta como um zwitterion (Blankenfeldt e Parson, 2014) e o grupo fenol atribui um caráter ácido ($\text{pKa} = 4,9$) (Hall *et al.*, 2016). A molécula apresenta três estados: ionizado em pH fisiológico (cor azul), protonado em ambiente ácido (cor vermelha) e neutro (azul) (Özcan e Kahraman, 2015). Na literatura consultada, não há praticamente referência direta à exploração da piocianina com fins de coloração de fibras, porém esta característica foi identificada num estudo de bioprospecção da piocianina como um agroquímico (de Britto *et al.*, 2020). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi produzir piocianina utilizando substrato alternativo ao meio de produção e aplicar o pigmento como agente de cor em fibras de algodão.

MATERIAIS E MÉTODOS

***Pseudomonas aeruginosa*:** Foram empregados dois isolados provenientes de solo de postos de gasolina de João Pessoa, TGC02 e TGC04, cadastradas no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o código AA1970F.

Fibra têxtil: Foi utilizado tecido 100% de algodão branco, com malha fio 30.1, fibra média, fição penteada e gramatura de 160 g/m² (FioSul 215 0101). Foram preparados dois tipos de amostras com as seguintes dimensões: 1 cm (comprimento) x 1 cm (largura) e amostras de 15 cm (comprimento) x 4 cm (largura), equivalente à massa de 1g de tecido para o ensaio de absorção do pigmento.

Síntese, extração e quantificação do pigmento: Inicialmente TGC02 e TGC04 foram testados quanto a produção do pigmento. O pré-inóculo foi cultivado em agar cetrimida (Acumedia, Lansing, USA), incubado por 48h à 29±1°C (El Feghali e Nawas, 2018). Após, as células do cultivo recente foram suspensas em NaCl 0,85%, com turbidez padronizada com o tubo nº 1 da escala de MacFarland. A seguir, alíquotas de 2 mL foram transferidas para frascos contendo 200 mL de caldo King A suplementado com 2% (m/v) de bagaço de malte de cevada (Oliveira *et al.*, 2019), cujo teor de nitrogênio total era 1.45 mg/kg. Os frascos foram incubados sob agitação de 150 rpm à 29±1°C por 72h (El Fouly *et al.*, 2015). A extração da piocianina foi realizada em triplicata a partir de alíquotas de 50 mL e misturadas a 10 mL de clorofórmio. Após agitação em vórtex (Warmnest VX-28) durante 1 minuto, a fase orgânica (azul) foi separada e em seguida, acidificada com 5 mL de HCl 0,2 mol/L, agitando-se novamente por 1 minuto. Após repouso, a fase acidificada, contendo a piocianina protonada (vermelha) foi neutralizada com gotas de solução-tampão Tris-Base concentrada (1,5 mol/L), retornando à coloração azul. Esta operação foi repetida por três vezes (Devnath *et al.*, 2017). A concentração de piocianina (PYO), em µg/mL, foi determinada após um repouso de 1h, uma alíquota de 10 µL da fase neutralizada foi diluída em 990 µL de água destilada e a absorbância da solução foi medida a 690 nm (Quimis U2M). O valor da absorbância (ABS) foi inserido numa equação (Eq. 1), obtida por meio da curva padrão ($r^2 = 0,9999$), preparada com piocianina com grau de pureza ≥98% (Sigma-Aldrich). Para a obtenção de piocianina empregada no tingimento, a extração foi conduzida exaustivamente com clorofórmio no meio de produção na razão 2:1 (Hassani *et al.*, 2012).

Caracterização da piocianina: Alíquotas do sobrenadante do meio de produção foram filtradas a vácuo e posteriormente adicionadas com Na₂SO₄ 10 mg/mL e filtradas novamente. O solvente foi eliminado em rotaevaporador (Buchi Rotavapor®, R-3), obtendo-se um pó de coloração azul intensa e brilhante. Foi então tomada cerca de 1 mg e diluído em água destilada-metanol grau HPLC (1:1). A caracterização química do pigmento foi realizada por espectrometria de massa de baixa resolução (Bruker, Ion Trap-amaZonX), com infusão direta da amostra por ionização por *electrospray* (ESI), com as seguintes especificações: capilar 7 kV, bloqueio de saída -200 V, saída 140 V, ESI no modo negativo e positivo, *offset* da placa final -500 V, nebulizador 8 psi, atmosfera de nitrogênio seco com fluxo de 5.0 L/min e temperatura de 220°C. Os espectros (*m/z* 50-1000) foram registrados a cada 2 segundos.

Determinação da concentração celular e da taxa de crescimento: Foram coletadas, em triplicata, alíquotas de 1000 µL em 12 intervalos dentro de 72 h. A concentração celular média foi determinada por densidade óptica (OD₆₀₀) (Cawley *et al.*, 2019) e a taxa de crescimento foi calculada por intervalo de tempo (Sezonov *et al.*, 2007). As relações da OD₆₀₀ entre a massa e concentração celular média foram calculadas seguindo a relação: 1 unidade de densidade óptica (600 nm) da suspensão de *P. aeruginosa* equivale a 2,4x10⁸ células/mL e 2,085 mg/mL, respectivamente (Kim *et al.*, 2012).

Parâmetros cinéticos: Foram determinados: produtividade máxima de células (Q_{p_{cel}}), produtividade máxima de piocianina (Q_{p_{pyo}}), e o coeficiente de rendimento (Y_{px}), empregando as Eq.1 a 3 (Bühler *et al.*, 2013).

$$Q_{p_{cel}} = [X_t - X_{t_0}] \div (t - t_0) \quad (\text{Eq. 1})$$

Em que: X_t – máxima formação de biomassa no tempo t, X_{t0} – biomassa no tempo 0, t – tempo para atingir valor máximo da biomassa e t₀ – tempo inicial do cultivo.

$$Q_{p_{pyo}} = [P_t - P_{t_0}] \div (t - t_0) \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que: P_t – máxima concentração de piocianina no tempo t, P_{t0} – concentração de piocianina no tempo 0, t – tempo para atingir valor máximo da concentração de piocianina e t₀ – tempo inicial do cultivo.

$$Y_{px} = [P_1 - P_0] \div (UA_1 - UA_0) \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que: P₁ e P₀ – concentração final e inicial de piocianina e UA₁ e UA₀ – unidade de absorbância no tempo final e inicial, respectivamente.

Tingimento da fibra: As fibras foram tingidas pelo método da exaustão. O tecido foi imerso em água destilada à 50°C por 30 min para remoção das impurezas. Posteriormente foi enxaguado e seco à temperatura ambiente e cortado em amostras medindo 1 cm de largura por 1 cm de comprimento (Lv *et al.*, 2012). As soluções de tingimento (100 e 50 µg/mL) foram preparadas diluindo as quantidades correspondentes ao tom desejado em solução etanol/água 1:1 v/v em pH=8, ajustado com solução de NaHCO₃ 1,5 mol/L, sob agitação contínua por 10 min à 40°C (Kramar *et al.*, 2014). Amostras de tecido, umedecidas com água destilada foram adicionados e agitadas à 40°C por 5 min. O processo continuou com o aumento gradual da temperatura para 85°C dentro de 15 min e depois mantido por mais 60 min. Ao final, resfriou-se à 40°C por 5 min e procedeu-se uma cuidadosa lavagem e enxágue com água destilada morna e deixadas para secar à temperatura ambiente.

Determinação do percentual de absorção do pigmento (%_{abs}): Amostras de 1g das fibras foram submetidas ao tingimento empregando NaHCO₃ (0,05g/g de tecido) como mordente. As amostras foram imersas em 50 mL da solução de piocianina, na tonalidade pré-definida e deixadas em repouso por uma noite à temperatura ambiente. Após, foram lavadas com água fria e deixadas para secar ao sol. O percentual de absorção do pigmento nas fibras foi medido a OD₆₉₀ da solução de tingimento, antes e após o procedimento, aplicando a Eq.4 (Chadni *et al.*, 2017).

$$\%_{abs} = \left(\frac{[OD_{690nm \text{ antes}} - OD_{690nm \text{ depois}}]}{[OD_{690nm \text{ antes}}]} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Determinação do potencial de exaustão do tingimento (%_{exaustão}): O percentual de exaustão foi calculado empregando a Eq. 5, em que são consideradas as medidas da OD₆₉₀ da solução de tingimento à quente, antes e após o procedimento (Lv *et al.*, 2012).

$$\%_{exaustão} = \left(\frac{[OD_{690nm \text{ antes}} - OD_{690nm \text{ depois}}]}{[OD_{690nm \text{ antes}}]} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção e caracterização da piocianina: A suplementação do bagaço de malte de cevada resultou num incremento significativo da produção de piocianina, de mais de três vezes, nos isolados TGC02 e TGC04 (Tabela 1). Assim, ambos isolados foram considerados para a obtenção do pigmento neste trabalho. Foi produzido um total de cerca de 30 mL de solução de piocianina com concentração de 585 µg/mL. Materiais não convencionais e de baixo custo, por exemplo resíduos de origem agroindustrial (Åruldass *et al.*, 2015; Bharathiet *et al.*, 2011), chifre de carneiro (Kurbanoglu *et al.*, 2015) e glicerol bruto, obtido da produção de biodiesel (Bühleret *et al.*, 2013), são reportados como potenciais substratos alternativos para a produção de diferentes pigmentos microbianos. Isto impacta significativamente quando aos resíduos são atribuídas destinações mais nobres e no contexto deste trabalho, ressignifica os resíduos gerados pela indústria cervejeira artesanal. A síntese de piocianina empregando resíduos da indústria de cerveja artesanal foi recentemente demonstrada (Oliveira *et al.*, 2019). Em complemento, tortas do processamento de amendoim, algodão e gergelim estimularam linhagens a produção de piocianina durante a remoção de hidrocarbonetos do petróleo por *P. aeruginosa* no solo, influenciando significativamente na redução do contaminante (Cavalcanti *et al.*, 2017). Este achado atribuiu à piocianina uma possível participação nos mecanismos utilizados pela bactéria durante a assimilação de compostos recalcitrantes como fontes de carbono e energia, possivelmente associado aos mecanismos de quorum sensing (QS) para síntese de biosurfatantes e outros agentes tensoativos (Viana *et al.*, 2018; Das e Ma, 2013). O QS é um mecanismo de modulação da expressão gênica em função da densidade celular, pelo qual organiza a população microbiana e sincroniza a expressão de genes que promovem diferentes respostas (Van der Berg *et al.*, 2015). As respostas são produzidas pelo acúmulo de moléculas produzidas em concentrações basais e assimiladas pelas células vizinhas, denominadas por autoindutores (Dietrich *et al.*, 2006). A principal abordagem em termos da produção de pigmentos bacterianos se baseia na estratégia do QS (Raina *et al.*, 2011). São fornecidos os nutrientes mínimos requeridos pela bactéria e certa quantidade de autoindutores, resultando na otimização da produtividade e rendimento do processo, como já observado na obtenção de prodigiosina (Thomson *et al.*, 2000) e violaceína (McClean *et al.*, 1997).

Tabela 1. Produção e parâmetros cinéticos da produção de piocianina pelos isolados selvagens de *Pseudomonas aeruginosa*

Ensaios	TGC02	TGC04
Produção de PYO (caldo King A)	17,8±0,1	16,9±0,1
Produção de PYO (caldo King A modificado)	58,2±0,1	58,3±0,1
Qp _{cel} (mg/L.h ⁻¹)	9,13±0,02 x10 ⁻³	9,74±0,01 x10 ⁻³
Qp _{pyo} (µg/mL.h ⁻¹)	0,931±0,005	0,994±0,003
Y _{px} (µg/mL.UA ⁻¹)	212,38±0,01	240,83±0,01
g ₂₄ (h)	3,76±0,04	3,59±0,02

PYO – piocianina; Qp_{cel} – produtividade máxima de células; Qp_{pyo} – produtividade máxima de piocianina;

Y_{px} – coeficiente de rendimento; g₂₄ – tempo de geração nas primeiras 24h

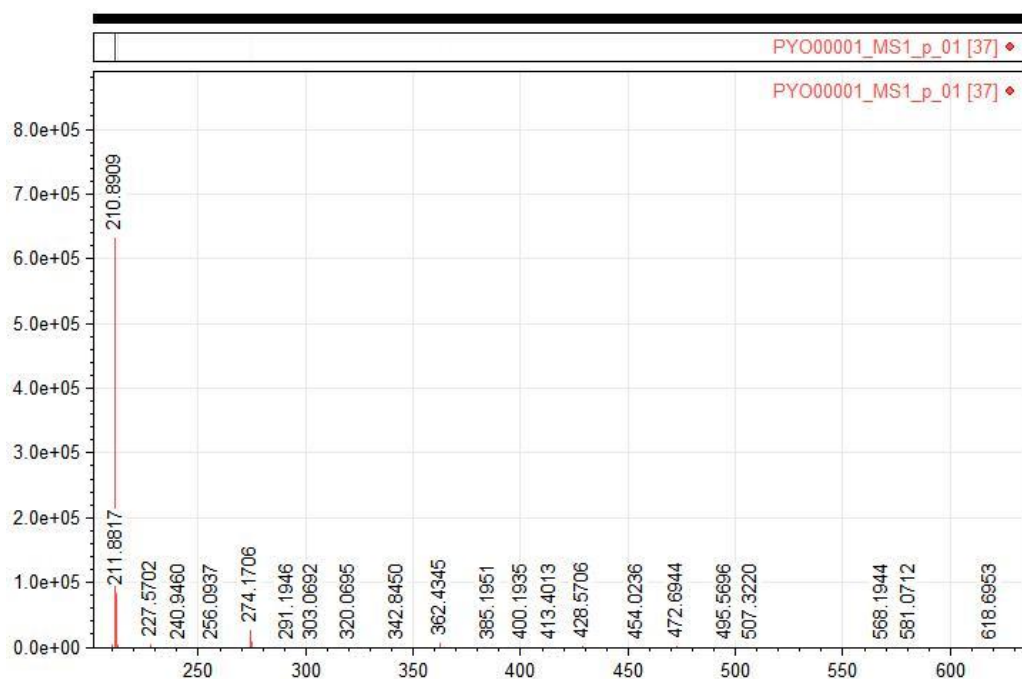


Fig. 1. Espectro fragmentado da amostra do pigmento

Sendo a piocianina um autoindutor da síntese de mais piocianina (Morkunas *et al.*, 2012), sua presença no meio utilizado no pré-inóculo, agar cetrimida, visou garantir a presença do pigmento no momento da inoculação, bem como permitir o aumento gradual da concentração de piocianina ao longo das 72h seguintes. O meio libera seletivamente PO_4^{3-} , nutriente crucial para regulação de diferentes metabólitos secundários na *P. aeruginosa*, sensível à variação da concentração do íon (Whooley e McLoughlin, 1982). Valores limitantes de PO_4^{3-} implicam redução de energia e a piocianina age como uma resposta contra o estresse nutricional, regulando a concentração intracelular de ATP (Moradali *et al.*, 2017). Na caracterização química do pigmento produzido por TGC02 e TGC04 (Fig. 1) foram observados pequenos ruídos e um pico maior medindo 210,8909 m/z , indicativo de piocianina, cuja massa molecular é um valor relativamente próximo, 210,23 g/mol, bem como foi possível identificar um precursor medindo 211,8817 m/z , valor aproximado do precursor da piocianina em análises espectrais (211,0870 m/z). Os ruídos observados são relativos à sensibilidade do equipamento na identificação de analitos complexos, tais como os extratos naturais. Contudo, os estudos que utilizam uma transição de m/z para caracterizar a identidade de um analito são considerados autoconfirmativos, uma vez que o analito pode ser identificado pela relação m/z , cujo padrão também analisado, permite conhecer o tempo de retenção característico do determinado composto (Watson e Sparkman, 2007).

Parâmetros cinéticos: Houve crescimento satisfatório de TGC02 e TGC04 e o tempo de duplicação durante o crescimento nas primeiras 24h foi cerca de 3,5h. os valores máximos de piocianina foram alcançados com 72h de bioprocesso, coincidindo também com os valores máximos de OD_{600} (Fig. 2). A produção de piocianina também é regulada por comunicações químicas dependentes de concentração celular usados para coordenar comportamentos em grupo (Borges *et al.*, 2018). Em razão disto, o tempo de duplicação é um fator importante para *P. aeruginosa*. Sob condições controladas de crescimento, a bactéria pode duplicar a população entre cerca de 3-6h (Tamagnini e Gonzales, 1997). O tempo de duplicação dos isolados selvagens deste estudo coincidiu com o intervalo teórico, alcançando entre 3,0-3,5h, valores próximos aos observados num estudo de obtenção do pigmento (Viana *et al.*, 2018) e menores aos obtidos num estudo de competição entre *P. aeruginosa* e bactérias coliformes (Vasconcelos *et al.*, 2010). Os parâmetros escolhidos para caracterizar fisiologicamente as células, número de células por mililitro e massa celular média, indicaram similaridade nas curvas de crescimento de TGC02 e TGC04: a população inicial a partir do inóculo foi de 10^5 células/mL, aumentando cem vezes até o fim do ensaio. Isto representou uma massa celular média de $0,082 \pm 0,001$ mg/mL, incrementada em 9 vezes para TGC02 ($0,739 \pm 0,012$ mg/mL) e 9,5 vezes para TGC04 ($0,773 \pm 0,015$ mg/mL). A máxima produção de células ocorreu por volta de 60h, num processo de estabilização da população iniciado por volta de 48h de incubação, enquanto a piocianina continuou sendo produzida. Além disso, a associação entre o crescimento celular com a produção de piocianina entre 8 e 72h sugere que TGC02 e TGC04 utilizaram o substrato tanto para a formação de biomassa, como para a produção de pigmento.

Esta observação também foi reportada num estudo prévio (Saha *et al.*, 2008). A máxima produção de biomassa foi alcançada em 66h de processo e permaneceu estável enquanto a piocianina continuou sendo produzida até 72h. Os autores atribuíram a manutenção da estabilidade da população à variação de fenazinas produzidas durante a fase de crescimento, em respostas aos sinais difundidos no meio.

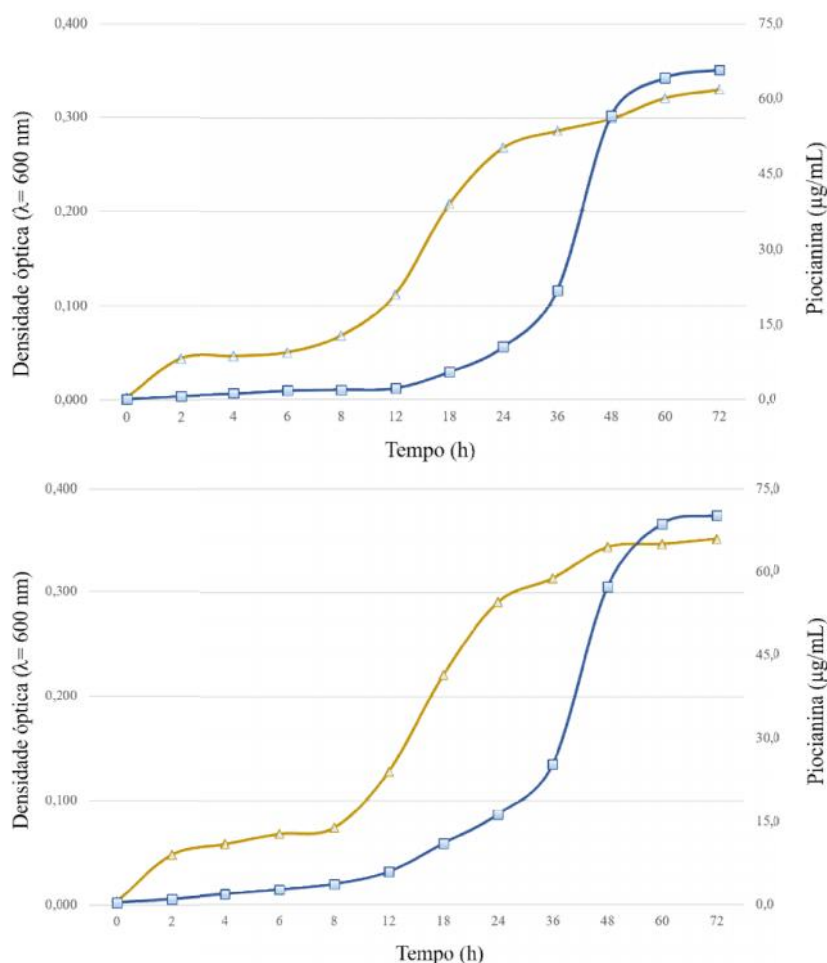


Fig. 2. Curva de crescimento (amarelo) e produção de piocianina (azul) por TGC02 (acima) e TGC04 (abaixo) ($\sigma = 0,01$)

A massa celular média é um parâmetro conhecido por variar bastante em função do meio de cultura empregado e essa variação é maior nos meios de enriquecimento. A diferença entre a massa celular média, de um meio rico para um meio pobre em nutrientes, pode exceder um fator 5 vezes durante a fase estacionária (Schaechter *et al.*, 1958). Contudo, a determinação da massa celular média é um indicador sensível do estado fisiológico das células (Kim *et al.*, 2012).

Quando a OD₆₀₀ se aproxima de 0,3 ($\approx 10^7$ células/mL), o crescimento se torna desequilibrado, marcado inicialmente por uma repentina inclinação da curva e geralmente indicando um estado estacionário, que continua até a saturação, quando ocorre redução da taxa de crescimento, culminando numa curva decrescente, marcando também o final da fase estacionária (Sezonov *et al.*, 2007). Todavia, a redução da concentração celular média nem sempre está relacionada apenas ao empobrecimento gradual de nutrientes no meio. O acúmulo de metabólitos é um segundo fator associado à inibição ou à desaceleração da taxa de crescimento (Pinhal *et al.*, 2019). Neste contexto, sugere-se que a piocianina também pode modular o crescimento de *P. aeruginosa* a partir dos estágios finais da fase logarítmica e início da fase estacionária. Neste estudo, isto parece ter ocorrido quando a concentração do pigmento se encontrava por volta de 60 µg/mL. A concentração máxima de piocianina produzida foi respectivamente, 65,8±0,1 e 70,2±0,1 µg/mL. Um aumento significativo na síntese do pigmento ocorreu a partir de 36h de incubação. Em condições ótimas de incubação, a produção de piocianina em meios sintéticos, especialmente King A, ocorre a partir de 48h após o início do crescimento, coincidindo com o final da fase logarítmica e o início da fase estacionária (Cabeen, 2014). Entretanto, diante escassez e estresse nutricional, é comum para que *P. aeruginosa* mantenha seu crescimento, a piocianina seja produzida em níveis basais (Das e Manifold, 2012). Isto permite a conservação da viabilidade, uma vez que o pigmento regula a concentração de ATP intracelular (McDermott *et al.*, 2012). A quantidade de piocianina pode ser variável numa mesma linhagem, submetida às mesmas condições de incubação, em diferentes ocasiões. Isso possivelmente relaciona-se aos possíveis estresses a que as bactérias são expostas quando mantidas em laboratório (Garay-Arroyo *et al.*, 2012). Em meio aquoso, ao qual incluem o caldo King A, com formulação original ou modificada, podem ser obtidos entre 0,31 até 80 µg/mL de piocianina (Hassani *et al.*, 2012; El-Shouny *et al.*, 2011). Contudo, diversos estudos relatam uma média de produção entre aproximadamente 10 e 65 µg/mL (Oliveira *et al.*, 2019; Viana *et al.*, 2018; Barakat *et al.*, 2015; Das e Das, 2015; El Fouly *et al.*, 2015). Ressalta-se que as obtenções de concentrações acima de 60 µg/mL de piocianina foram conseguidas aumentando o tempo de incubação para 96 ou até 120h, bem como incrementaram-se os meios com maiores concentrações de peptona (Agrawal *et al.*, 2016; Gharieb *et al.*, 2013). Esta estratégia é contrária ao aplicado no presente trabalho, uma vez que repetidas operações de extração e concentração permitiram a obtenção de uma quantidade significativa de pigmento.

Tingimento do tecido: A fibra de algodão adsorveu bem o pigmento após o tratamento, produzindo duas tonalidades de azul em função das concentrações utilizadas, sem sofrer alterações significativas após lavagem e secagem (Fig. 3). A afinidade e funcionalidade da piocianina à fibra de algodão foram identificadas pelo percentual de absorção, cuja maior concentração da solução de piocianina 100 µg/mL (65,0±0,2), comparada à solução de 50 µg/mL (47,2±0,1), foi mais significativa. Por outro lado, os percentuais de exaustão foram aproximados (77,5±0,1 e 75,3±0,3). Os tons variaram em função da concentração de piocianina aplicada. A maior retenção de pigmento foi representada pelos valores percentuais de absorção e do potencial de exaustão.

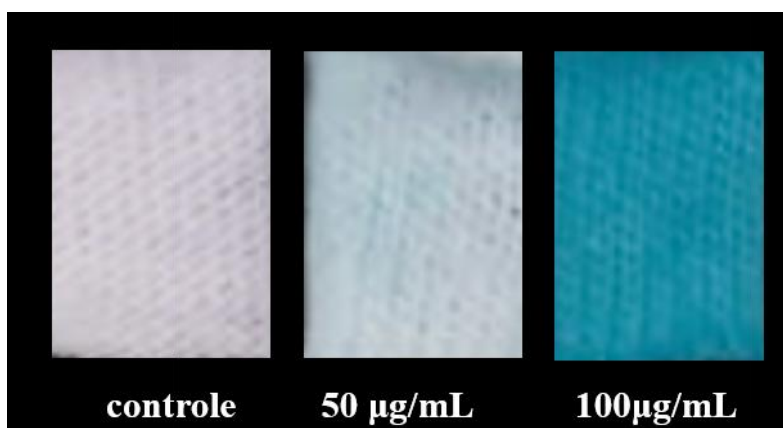


Fig. 3. Aspecto da fibra de algodão tingida com piocianina

As malhas são formadas pelo processo de urdume, quando há entrelaçamento dos fios, organizados longitudinalmente, com laçadas passadas sobre laçadas, sem ponto fixo de ligação entre eles, atribuindo flexibilidade, elasticidade, porosidade e estabilidade dimensional (Lobo *et al.*, 2014). Os corantes têxteis impregnam as fibras reagindo ou não com o material durante o processo de tingimento. Nas fibras naturais, especialmente o algodão, são empregados corantes de diferentes classes, contudo os melhores resultados são obtidos com corantes reativos, que se fundem à fibra, e corantes diretos, que por serem hidrossolúveis, se ligam à fibra por meio de forças iônicas, interações de Van der Waals e pontes de hidrogênio (Hu *et al.*, 2012). O processo de tingimento de uma fibra ocorre em duas fases. Na primeira, denominada por fase cinética, ocorrem a transferência do corante do banho para a fibra, a adsorção do composto à fibra e finalmente a difusão. A segunda fase, termodinâmica, está relacionada à expansão do corante por todo o espaço entre a fibra e o banho até que o equilíbrio seja atingido no sistema (Vieira *et al.*, 2009). Isto está também relacionado à saturação do pigmento à fibra e este fenômeno é governado pelas isotermas de adsorção, relações lineares da concentração do corante no banho e na fibra, em uma dada temperatura, finalizado no ponto de saturação da fibra (Machado *et al.*, 2014). Em complemento, a adsorção do pigmento numa fibra envolve dois processos que podem estar diretamente relacionados aos tons conseguidos. O primeiro ocorre pela precipitação do pigmento no interior da fibra. O segundo, por meio de reações químicas entre o pigmento com a fibra. Quanto maior a afinidade química entre os dois, mais fortes as tonalidades se apresentam (Shang *et al.*, 2013). Os biocorantes são aplicados às fibras em processos semelhantes aos corantes por meio de dois métodos: por banho à quente, do pigmento extraído de uma célula produtora ou por mergulho à quente, no extrato colorido. A intensidade da cor pode variar dependendo do tempo de duração do banho e do mergulho, pH e concentração do pigmento (Räisänen, 2018). Muitos pigmentos bacterianos, por exemplo prodigiosina e violaceína, podem ser aplicados com sucesso em diferentes fibras naturais e sintéticas (Alihosseini *et al.*, 2008). O desempenho do tingimento depende das propriedades da fibra, bem como do método aplicado. Além disso, o resultado do tingimento é diferente para cada espécie de fibra testada (Shirata *et al.*, 2000). Por conseguinte, ao não apresentarem afinidade química forte à diferentes fibras, o uso de biocorantes, especialmente de natureza hidrofílica, pode se tornar limitado. Esta característica faz mandatória a aplicação de mordentes, tais como sais metálicos, taninos ou ácidos orgânicos fracos que atuam incorporando os pigmentos ao formarem complexos com a fibra, consequentemente dificultando a remoção (Wisniak, 2004). Em complemento, o bicarbonato de sódio foi o mordente usado neste estudo. Ele é indicado para fins de tingimento de fibras naturais (Yaqub *et al.*, 2018).

O composto permite produzir resultados compraveis aos obtidos quando os ácidos tanínico e oxálico são empregados (Win *et al.*, 2019; Mariselvam *et al.*, 2018). As fenazinas são moléculas hidrofílicas produzidas por um grande número de gêneros bacterianos e juntos representam todas as cores do espectro visível (Turner e Messenger, 1986). São conhecidos mais de 100 tipos de fenazinas e outras mais de 6000 moléculas contendo fenazinas como composto central (Pierson e Pierson, 2010). A piocianina parece demonstrar um potencial para utilização na indústria têxtil porque não altera a cor aparente quando submetida às temperaturas altas. Esta propriedade foi verificada por meio de um método simples de difusão do pigmento em agar (Saha *et al.*, 2008). Entretanto, a variação da cor da piocianina tem mais relação às flutuações do pH (Baron e Rowe, 1981). Além disso, a piocianina é muito solúvel em água e exibe termoestabilidade à 90°C por até 72h, com um ponto de ebulição de 350°C (Heriyanto *et al.*, 2012). Por sua natureza hidrofílica, a piocianina tende a se adsorver melhor às superfícies hidrofílicas, como a fibra de algodão, com pouca interação às superfícies hidrofóbicas como as fibras sintéticas (Ren *et al.*, 2017). Os resultados deste estudo revelam que o composto se apresenta como fonte alternativa para uso como agente têxtil de cor, de origem natural e dotado de forte durabilidade. Embora o preço do biocorante ainda não seja comercialmente competitivo, por exemplo, 1 mg de piocianina custa entre US\$ 90-130. Contudo, o uso industrial de pigmentos bacterianos aumentou muitas vezes nas últimas décadas por conta das diversas vantagens sobre os compostos sintéticos, o que em médio prazo, reduzirá custos (Dufossé, 2006). Neste contexto, sendo reconhecidas mundialmente as questões ecológicas e éticas, o consenso do mundo de hoje é a garantia de um futuro mais sustentável, carecendo de esforços concretos por parte de cada cidadão. Por razões óbvias, esta mudança de atitude também alcança a indústria têxtil, que deve evoluir e convergir à tecnologia verde, ambientalmente correta.

Conclusão

O bagaço de malte de cevada serviu como uma boa alternativa de substrato para produção de piocianina. Os métodos de extração permitiram a obtenção de um pigmento com alto grau de pureza. Nas condições experimentais aplicadas, a piocianina produzida pelos isolados selvagens de *P. aeruginosa* TGC02 e TGC04 apresentou afinidade com a fibra de algodão, produzindo matizes azuis sólidas. Futuras investigações podem ser conduzidas para otimização e melhoramento da funcionalidade da aplicação da piocianina como agente de cor em diferentes outras fibras, incluindo sintéticas.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Mestrado (processo nº 88882.44710/2019-01), bem como ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPB.

REFERÊNCIAS

- Agrawal, A.H., and Chauhan, P.B. 2016. Effect of cultivation media components on pyocyanin productions and its application in antimicrobial property. *Int J Curr Adv Res.* v. 5, pp. 829-833.
- Alihosseini, F., Ju, K.S., Lango, J., Hammock, B.D., and Sun, G. 2008. Antibacterial colorants: characterization of prodiginines and their applications on textile materials. *Biotechnol Prog.* v. 24, pp. 742-747.
- Åruldass, C.A., Rubiyatno, Venil, C.K., and Ahmad, W.A. 2015. Violet pigment production from liquid pineapple waste by *Chromobacterium violaceum* UTM5 and evaluation of its bioactivity. *RSC Adv.* doi: 10.1039/C5RA05765E.
- Barakat, K.M., Mattar, M.Z., Sabae, S.Z., Darwesh, O.M., and Hassan, S.H. Production and characterization of bioactive pyocyanin pigment by marine *Pseudomonas aeruginosa* Osh1. *Res J Pharm Biol Chem Sci.* v. 6, pp. 933-943.
- Baron, S.S., and Rowe, J.J. 1981. Antibiotic action of pyocyanin. *Antimicrob Agents Chemother.* v. 20, p. 814-820.
- Bharathi, V., Lakshminarayanan, R., Jayalakshmi, S. 2011. Melanin production from marine *Streptomyces*. *Afr J Biotechnol.* v. 10, pp. 11224-11234.
- Blankenfeldt, W., and Parsons, J.F. 2014. The structural biology of phenazine biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol.* v. 29, pp. 26-33.
- Borges, A., Simões, M., Todorović, T.R., Filipović, N.R., and García-Sosa, A.T. 2018. Cobalt complex with thiazole-based ligand as new *Pseudomonas aeruginosa* quorum quencher, biofilm inhibitor and virulence attenuator. *Molecules.* v. 23, doi:10.3390/molecules23061385.
- Bühler, R.M.M., Dutra, A.C., Vendruscolo, F., Moritz, D.E., and Ninow, J.L. 2013. Monascus pigment in bioreactor using a co-product of biodiesel as substrate. *Ciênc Tecnol Aliment.* v. 33, pp. 9-13.
- Cabeen, M.T. 2014. Stationary phase-specific virulence factor overproduction by a lasR mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS One.* v. 9, doi:10.1371/journal.pone.0088743.
- Cavalcanti, T.G., Souza, A.F., Ferreira, G.F., Dias, D.S.B., Severino, L.S., Morais, J.P.S., Sousa, K.A., and Vasconcelos. 2017. Use of agro-industrial waste in the removal of phenanthrene and pyrene by microbial consortia in soil. *Waste Biomass Valor.* doi: 10.1007/s12649-017-0041-8.
- Cawley, A., Golding, S., Goulsbra, A., Hoptroff, M., Kumaran, S., and Marriott, R. 2019. Microbiology insights into boosting salivary defenses through the use of enzymes and proteins. *J Dentistry.* v. 80, pp. S19-S25.
- Chadni, Z., Rahaman, M.H., Jerin, I., Hoque, K.M.F., and Reza, M.A. 2017. Extraction and optimization of red pigment production as secondary metabolites from *Talaromyces verruculosus* and its potential use in textile industries. *Micology.* v. 8, pp. 48-57.
- Das, S., and Das, P. 2015. Effects of cultivation media components on biosurfactant and pigment PAO1. *Braz J Chem Eng.* v. 32, pp. 317-324.
- Das, P., and Ma, L.Z. 2013. Pyocyanin pigment assisting biosurfactant-mediated hydrocarbon emulsification. *Int Biodegrad Biodeterior.* v. 85, pp. 278-283.
- Das, T., and Manefield, M. 2012. Pyocyanin promotes extracellular DNA release in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One.* v. 7, doi: 10.1371/journal.pone.0046718.
- De Brito, S., Gajbar, T.D., Satapute, P., Sundaram, L., Lakshmikantha, R.Y., Jogaiah, S., and Ito, S-I. 2020. Isolation and characterization of nutrient dependent pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* and its dye and agrochemical properties. *Scientific Rep.* v. 10, doi: 10.1038/s41598-020-58335-6.
- Devnath, P., Uddin, M.K., Ahmed, F., Hossain, M.T., and Manchur, M.A. 2017. Extraction, purification and characterization of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* and evaluation for its antimicrobial activity. *Int Res J Biolol Sci.* v. 6, pp. 1-7.
- Dietrich, L.E.P., Price-Whelan, A., Petersen, A., Whiteley, M., and Newman, D.K. 2006. The phenazine pyocyanin is a terminal signaling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molec Microbiol.* v. 61, pp. 1308-1321.
- Dufossé, L. 2006. Microbial production of food grade pigments. *Food Technol Biotechnol.* v. 44, pp. 313-321.

- El Feghali, P.A.R., and Nawas, T. 2018. Extraction and purification of pyocyanin: a simpler and more reliable method. *MOJ Toxicology*. v. 4, pp. 417-422.
- El-Fouly, M.Z., Sharaf, A.M., Sahim, A.A.M., and El-Bialy, H.A. 2015. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Rad Res Appl Sci*. v. 8, pp. 36-48.
- El-Shouny, W.A., Al-Baidani, A.R.H., and Hamza, W.T. 2011. Antimicrobial activity of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from surgical wound-infections. *Int J Pharm Med Sci*. v. 1, pp. 1-7.
- Garay-Arroyo, A., Covarrubias, A.A., Clark, I., Niño, I., Gosset, G., and Martinez, A. 2004. Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*. v. 63, pp. 734–741.
- Gharieb, M.M., El-Sheekh, M.M., El-Sabbagh, S.M., and Hamza, W.T. 2013 Efficacy of pyocyanin produced by *Pseudomonas aeruginosa* as a topical treatment of infected skin of rabbits. *Biotechnol Ind J*. v. 7, pp. 184-193.
- Gmoser, R., Ferreira, J.A., Lundin, M., Taherzadeh, M.J., and Lennartsson, P.R. 2018. Pigment production by the edible filamentous fungus *Neurospora Intermedia*. *Fermentation*. v. 4, doi:10.3390/fermentation4010011.
- Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A.J., Forbes, A., Perkins, A.V., Davey, A.K., Chess-Williams, R., Kiefel, M.J., Arora, D., and Grant, G.D. 2016. Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*. v. 8, doi: 10.3390/toxins8080236.
- Hassani, H.H., Hasan, H.M., Al-Saadi, A., Ali, A.M., and Muhammad, M.H.A. 2012. comparative study on cytotoxicity and apoptotic activity of pyocyanin produced by wild type and mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Experiment Biol*. v. 2, pp. 1389-1394.
- Heer, K., and Sharma, S. 2017. Microbial pigments as a natural color: a review. *Int J Pharm Sci Res*. v. 8, pp. 1913-1922.
- Heriyanto, I., Pringgenies, D., Limantara, L., and Brotosudarmo, T.H.P. 2012. Protonation and thermo-stability studies of pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*. *I International Conference of Indonesia Chemical Society*. https://www.researchgate.net/profile/Delianis_Pringgenies/publication/337729469.
- Hu, Z., Zhang, X., Wu, Z., Qi, H., and Wang, Z. 2012. Export of intracellular Monascus pigments by two-stage microbial fermentation in nonionic surfactant micelle aqueous solution. *J Biotechnol*. v. 162, pp. 202-209.
- Jayaseelan, S., Ramaswamy, D., and Dharmaraj, S. 2014. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. *World J Microbiol Biotechnol*. v. 30, pp. 1159-1168.
- Joshi, V., Atri, D., and Bhushan, S. 2003. Microbial pigments. *Ind J Biotechnol*. v. 2, pp. 362-369.
- Kim, D-J., Chung, S-G., Lee, S-L., and Choi, J-W. 2012. Relation of microbial biomass to counting units for *Pseudomonas aeruginosa*. *Afr J Microbiol Res*. v. 6, pp. 4620-4622.
- Kramar, A., Ilic-Tomic, T., Petrovic, M., Radulović, N., Kostic, M., Jodic, D., and Nikodinovic-Runic, J. 2014. Crude bacterial extracts of two new *Streptomyces* sp. isolates as bio-colorants for textile dyeing. *World J Microbiol Biotechnol*. v. 30, p. 2231-2240.
- Kurbanoglu, E.B., Ozdal, M., Ozdal, O.G., and Algur, O.F. 2015. Enhanced production of prodigiosin by *Serratia marcescens* MO-1 using ram horn peptone. *Braz J Microbiol*. v. 46, pp. 631-637.
- Lobo, R.N., Limeira, E.T.N.P. and Marques, R.N. 2014. Fundamentos da tecnologia têxtil: da concepção da fibra ao processo de estamparia, São Paulo: Érica.
- Lv F., Zhu, P., Wang, C., and Zheng, L. 2012. Preparation, characterization, and dyeing properties of calcium alginate fibers. *J Appl Polymer Sci*. v. 126, pp. E382–E387.
- Machado, F.M., Bergmann, C.P., Lima, E.C., Adebayo, M.A., and Fagan, S.B. 2014. Adsorption of a textile dye from aqueous solutions by carbon nanotubes. *Mat Res*. v. 17, n. 1, pp. 153-160.
- Malik, K., Tokkas, J., and Goyal, S. 2012. Microbial pigments: A review. *Int J Microb Res Technol*. v. 1, pp. 361-365.
- Mariselvam, R., Athinarayanan, G., Ranjitsingh, A.J.A., Nanthini, A.U.R., Krishnamoorthy, R., and Alshatwi, A.A. 2018. Extraction of dyes from *Petrocarpus santalinus* and dyeing of natural fibres using different mordants. *Fibres Text East Eur*. v. 5, pp. 20-23.
- Mavrodi, D.V., Bonsall, R., Delaney, S.M., Soule, M.J., Phillips, G., and Thomashow, L.S. 2001. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *J Bacteriol*. v. 183, pp. 6454-6465.
- McClean, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J.H., Swift, S., Bycroft, B.W., Stewart, G.S., and Williams, P. 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acyl homoserine lactones. *Microbiology*. v. 143, pp. 3703–3711.
- McDERMOTT, C.; CHESS-WILLIAMS, R.; GRANT, G.D.; PERKINS, A.V.; MCFARLAND, A.J., Davey, A.K., and Anoopkumar-Dukie, S. 2012. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor pyocyanin on human urothelial cell function and viability. *J Urol*. v. 187, pp. 1087-1093.
- Moradali, M.F., Ghods, S., and Rehm, B.H.A. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers Cell Infec Microbiol*. v. 7:39, doi: 10.3389/fcimb.2017.0003, 2017.
- Morkunas, B., Galloway, W.R.J.D., Wright, M., Ibbeson, B.M., Hodgkinson, J.T., O'Connell, K.M.G., Bartolucci, N., Della Valle, M., Welch, M., and Spring, D.R. 2012. Inhibition of the production of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor pyocyanin in wild-type cells by quorum sensing autoinducer-mimics. *Org Biomol Chem*. v. 10, pp. 8452-8464.
- Numan, M., Bashir, S., Mumtaz, R., Tayyab, S., Rehman, N.U., Khan, A.L., Shinwari, Z.K., and Al-Harrasi, A. Therapeutic applications of bacterial pigments: a review of current status and future opportunities. *3Biotech*. v. 8, doi: 10.1007/s13205-018-1227-x.
- Oliveira, B.T.M., Barbosa, P.S.Z., Cavalcanti, T.G., Amaral I.P.G., and Vasconcelos, U. 2019. Craft beer waste as substrate for pyocyanin synthesis. *J Pharm Biol Sci*. v. 14, pp. 21-25.
- Özcan, D., and Kahraman, H. 2015. Pyocyanin production in the presence of calcium ion in *Pseudomonas aeruginosa* and recombinant bacteria. *Turk J Sci Technol*. v. 10, pp. 13-19.
- Parmar, M., and Phutela, U.G. 2015. Biocolors: the new generation additives. *Int J Curr Microbiol App Sci*. v. 4, pp. 688–694.
- Perkins, W.S. 1995. Los principios básicos del teñido textil. *Textiles Panamericanos*. v. 55, pp. 190-193.
- Pierson, L.S., and Pierson, E.A. 2010. Metabolism and function of phenazines in bacteria: Impacts on the behaviour of bacteria in the environment and biotechnological process. *Appl Microbiol Biotechnol*. v. 86, pp. 1659-1670.
- Pinhal, S., Ropers, D., Geiselmann, J., and de Jong, H. 2019. Acetate metabolism and the inhibition of bacterial growth by acetate. *J Bacteriol*. v. 201, doi: 10.1128/JB.00147-19.
- Raina, S., Murphy, T., Vizio, D., Reffatti, P., and Keshavarz, T. 2011. Novel strategies for over-production of microbial products. *Chem Eng Trans*. v. 24, pp. 847–852.
- Räisänen, R. 2018. Fungal colorants in applications – focus on *Cortinarius* species. *Color Technol*. v. 135, pp. 22-31.
- Ren, Y., Gong, J., Fu, R., Li, Z., Yu, Z., Lou, J., Wang, F., and Zhang, J. 2017. Dyeing and functional properties of polyester fabric dyed with prodigiosins nanomicelles produced by microbial fermentation. *J Clean Prod*. v. 148, pp.. 375-385.

- Saha, S., Thavasi, R., and Jayalakshmi, S. 2008. Phenazine pigments from *Pseudomonas aeruginosa* and their application as antibacterial agent and food colourants. *Res J Microbiol.* v. 3, pp. 122-128.
- Sezonov, G., Joseleau-Petit, D., and D'Ari, R. 2007. *Escherichia coli* physiology in Lauria-Bertani broth. *J Bacteriol.* v. 189, pp. 8746-8749.
- Schaechter, M., Maaløe, O., and Kjeldgaard, N.O. 1958. Dependence on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *Microbiology.* v. 19, pp. 592-602.
- Shang, S.M. Process control in dyeing of textiles. In: Majumdar, A., Das, A., Alagirusamy, R., and Kothari, V.K. (ed.) 2014. Process Control in Textile Manufacturing, Cambridge: Woodhead Publishing, pp. 300-338.
- Shirata, A., Tsukamoto, T., Yasui, H., Hata, T., Hayasaka, S., Kojima, A., and Kato, H. 2000. Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing. *JARQ.* v. 34, pp. 131-140.
- Siuda-krzywicka, K., Boros, M., Bartolomeo, P., and Witzel, C. 2019. The biological bases of colour categorisation: From goldfish to the human brain. *Cortex.* v. 118, pp. 82-106.
- Tamagnini, L.M., and Gonzales, R.D. 1997. Bacteriological stability and growth kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water. *J Appl Microbiol.* v. 83, pp. 91-94.
- Thomson, N.R., Crow, M.A., McGowan, S.J., Cox, A., and Salmond, G.P.C. 2000. Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control. *Mol Microbiol.* v. 36, pp. 539-556.
- Turner, J.M., and Messenger, A.J. 1986. Occurrence, biochemistry and physiology of phenazine pigment production. *Adv Microbiol Physiol.* v. 27, pp. 211-275.
- Usman, H.M., Abdulkadir, N., Gani, M., and Maiturare, H.M. 2017. Bacterial pigments and its significance. *MOJ Bioequiv Availab.* v. 4, pp. 285-288.
- Van der Berg, J.P., Velema, W.A., Szymanski, W., Driessen, J.M., and Feringa, B.L. 2015. Controlling the activity of quorum sensing autoinducers with light. *Chem Sci.* v. 6, pp. 3593-3598.
- Vasconcelos, U., Lima, M.A.G.A., and Calazans, G.M.T. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* associated with negative interactions on coliform bacteria growth. *Can J Pure Appl Sci.* v. 4, pp. 1133-1139.
- Venil, C.K., Zakaria, Z.A., and Ahmad, W.A. 2013. Bacterial pigments and their applications. *Process Biochem.* v. 48, pp. 1065-1079.
- Viana, A.A.G., Oliveira, B.T.M., Cavalcanti, T.G., Sousa, K.A., Mendonça, E.A.M., Amaral, I.P.G., and Vasconcelos, U. 2018. Correlation between pyocyanin production and hydrocarbonoclastic activity in nine strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Adv Eng Res Sci.* v. 5, pp. 212-223.
- Vieira, A.P., Santana, S.A.A., Bezerra, C.W.B., Silva, H.A.S., Chaves, J.A.P., Melo, J.C.P., da Silva Filho, E.C., and Airoidi, C. 2009. Kinetics and thermodynamics of textile dye adsorption from aqueous solutions using babassu coconut mesocarp. *J Hazard Mater.* v. 166, pp. 1272-1278.
- Watson, J.T., and Sparkman, O.D. 2007. Introduction to mass spectrometry: Instrumentation, applications, and strategies for data interpretation, Hoboken: Wiley-Blackwell.
- Whooley, M.A., and McLoughlin, A.J. 1982. The regulation of pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.* v. 15, pp. 161-166.
- Win, K.H., Khaing, K., and Khaing, T. 2019. Extraction of tannin from tamarind seed coat as a natural mordant for dyeing of wool yarn. *Int J Res Trends Innov.* v. 4, pp. 11-14.
- Wisniak, J. 2004. Dyes from antiquity to synthesis. *Ind J Hist Sci.* v. 39, pp. 75-100.
- Yaqub, A., Chaudhary, N., Hatti, R.A.A., Iqbal, Z., and Habib-Ul-Haq, M. 2018. Green extraction and dyeing of silk from *Beta vulgaris* peel dye with ecofriendly acid mordants. *Int J Biosci.* v. 13, pp. 308-321.
