



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE BIOTECNOLOGIA**  
**BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

**Bianca Teixeira Morais de Oliveira**

**Atividade biológica da piocianina produzida com resíduo de fabricação  
artesanal de cerveja**

JOÃO PESSOA

2019

Bianca Teixeira Morais de Oliveira

**Atividade biológica da piocianina produzida com resíduo de fabricação  
artesanal de cerveja**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado à Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do Curso Superior em Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, como requisito para obtenção do Título de Biotecnologista.

**Orientadores:**

**Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes**

**Mes. Ray Ravilly Alves Arruda**

JOÃO PESSOA

2019

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

O48a Oliveira, Bianca Teixeira Morais de.  
Atividade biológica da piocianina produzida com resíduo  
de fabricação artesanal de cerveja / Bianca Teixeira  
Morais de Oliveira. - João Pessoa, 2019.  
59 f. : il.

Orientação: Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes  
Vasconcelos.

Coorientação: Ray Ravilly Alves Arruda.  
Monografia (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Fenazinas naturais. 2. Matéria-prima alternativa. 3.  
Biofilme. I. Vasconcelos, Ulrich Vasconcelos da Rocha  
Gomes. II. Arruda, Ray Ravilly Alves. III. Título.

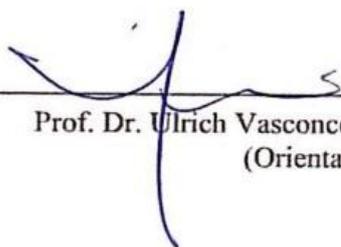
UFPB/BC

BIANCA TEIXEIRA MORAIS DE OLIVEIRA

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DA PIOCIANINA PRODUZIDA COM RESÍDUO DE  
FABRICAÇÃO ARTESANAL DE CERVEJA**

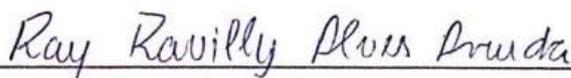
Monografia defendida em: 20 de setembro de 2019

**COMISSÃO EXAMINADORA**



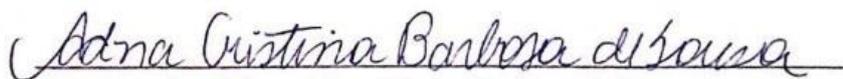
---

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes  
(Orientador)



---

Me. Ray Ravilly Alves Arruda  
(Co-orientador)



---

Prof. Dra. Adna Cristina Barbosa de Sousa  
(Examinadora)



---

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral  
(Examinador)

“Quando tudo parecer dar errado em sua vida, lembre-se que o avião decola contra o vento, e não a favor dele” (Henry Ford).

Dedico esse trabalho a minha família, Edvaldo, Linaura e Nicholas, pois eles são minha base, essência e merecem todo meu amor e dedicação.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente a Deus, por ter me guiado e dado a paciência, perseverança e determinação necessária para iniciar e concluir a graduação.

Agradeço aos meus pais, Linaura Morais e Edvaldo Teixeira por acreditarem em mim, confiarem no meu potencial e sempre me impulsionarem e estimularem ao crescimento pessoal e profissional, por sempre estarem ao meu lado, dando-me o suporte que eu preciso e por me amar incondicionalmente, pois não seria quem sou se não pela base que me deram.

Agradeço ao meu irmão, Nicholas Bruno que sempre teve paciência e entendeu minha ausência em muitos momentos importantes em sua vida e que gentilmente esteve ao meu lado com toda sua sabedoria, inocência e amor.

Agradeço a Thales de Mileto Henrique Dourado pela compaixão, amor e companheirismo na vida pessoal e por todo apoio na academia, desde o suporte nos experimentos ao apoio de sempre acreditar em mim, por ser parte importante da minha história.

Agradeço ao meu orientador prof. Ulrich Vasconcelos por sempre estar presente como um grande amigo e por possibilitar meu crescimento profissional com todas as oportunidades de trabalhos e projetos, além de ensinar-me cotidianamente a lidar com os amargos da vida, ajudou-me a construir um alicerce forte no conhecimento científico.

Agradeço aos meus melhores amigos Mickael Luz, Matheus Fabião, Lucas Lima, Renata Lira, Brena Araújo, Julyana Paula, Klivia Cardoso e Sofia Almeida, que se fizeram sempre presentes durante a graduação e que tornaram os dias na universidade e na minha vida mais doces e leves, por tantas trocas de conhecimento, afeto e compaixão, as quais me deram suporte de seguir sempre em frente.

Agradeço aos meus grandes amigos de carreira acadêmica e científica, Ray Ravilly e Tarcísio Bonifácio, que puderam participar dos experimentos, das análises e das tantas situações divertidas dessa jornada, que sempre me ensinaram, enalteceram e acreditaram em meu potencial.

Agradeço ao LAMA e ao prof. Ulrich por ter me acolhido com tanta doçura e aos principais integrantes Andrwey Viana, Thiago Cavalcanti, Vinicius Morais que me auxiliaram em alguns experimentos desse trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos que se fizeram presentes, que apesar de não citados, saibam que estão em meus pensamentos e em meu coração. A todos, meu afeto e grande gratidão, que seja o encerramento de um ciclo, mas nunca das parcerias aqui lembradas.

OLIVEIRA, Bianca Teixeira Morais de. Atividade biológica da piocianina produzida com resíduo de fabricação artesanal de cerveja, 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 2019.

## RESUMO

A piocianina é uma fenazina natural de caráter fluorescente e cor azul brilhante ou azul-esverdeada, sintetizada exclusivamente por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*. Dentre das principais funções, a atividade antimicrobiana é conhecida contra diferentes outros organismos. Substância com elevado grau de pureza possui alto custo, o que encoraja a utilização de substratos não convencionais, em especial, aqueles com alto teor de nitrogênio, como resíduos gerados na indústria de cerveja artesanal. O objetivo deste trabalho foi produzir, extrair, quantificar e caracterizar a piocianina, empregando resíduo de malte de cevada e testar a atividade dessa substância frente às linhagens clínicas *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Escherichia coli* UFPEDA224 e *Candida tropicalis* 13803, determinando a concentração inibitória mínima (CIM) e a ação sobre adesão e formação do biofilme sobre vidro e dolomita. A produção de piocianina foi aumentada em média de 70% nos dois isolados testados, TGC02 e TGC04 quando a suplementação do resíduo de malte de cevada foi de 2% m/v, comparado ao controle. A caracterização molecular permitiu confirmar no espectro fragmentado a presença majoritária do pigmento devido ao pico em 210,89 m/z. A CIM determinada foi de 37,5 e 18,75 µg/mL frente *E. coli* UFPEDA 224 e *S. aureus* UFPEDA02. Contudo, o pigmento não impediu a adesão e desenvolvimento do biofilme para ambas as linhagens. O percentual de hidrofobicidade foi alto, resultando uma maior adesão ao corpo de prova de dolomita. Estudos posteriores devem elucidar os mecanismos moleculares envolvidos entre a piocianina e sua influência na formação de biofilmes bacterianos.

Palavras-chave: Fenazinas naturais; Matéria-prima alternativa; Biofilme.

OLIVEIRA, Bianca Teixeira Morais de. Biological activity of pyocyanin produced with craft beer waste, 2019. Course Completion Work (Biotechnology) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 2019.

## ABSTRACT

Pyocyanin is a naturally occurring fluorescent bright blue or blue-greenish phenazine, synthesized exclusively by *Pseudomonas aeruginosa* strains. Within main functions as antimicrobial activity against different organisms. The high purity substance has a high cost, which encourages the use of unconventional substrates, especially those with high nitrogen content, as wastes generated in the craft beer industry. The aim of this work was to produce, to extract, to quantify and to characterize pyocyanin using malt bagasse and to test its activity against clinical strains *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02, *Escherichia coli* UFPEDA224 and *Candida tropicalis* 13803 in order to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the action on adhesion and formation of the biofilm. When the residue supplementation was 2% w/v, pyocyanin production was increased by an average of 70% among the two isolates, TGCO2 and TGCO4. The molecular characterization allowed to confirm in the fragmented spectrum the majority presence of the pigment due to the 210.89 m/z peak. The MIC determined was 37.5 and 18.75 µg/mL against *E. coli* UFPEDA 224 and *S. aureus* UFPEDA 02. However, the pigment did not prevent biofilm adhesion and development for both strains. The hydrophobicity percentage was high, resulting in greater adhesion to the dolomite coupon. Further studies should elucidate the molecular mechanisms involved between pyocyanin and its influence on bacterial biofilm formation.

Keywords: Natural phenazines; Alternative raw material; Biofilm.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Rota sintética de produção de piocianina	15
Figura 2	Etapas de formação de biofilme em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
Figura 3	Sistemas de incubação acrescidos de resíduo de malte de cevada (m/v)	25
Figura 4	Etapas de extração da piocianina	26
Figura 5	Biorreatores	30
Figura 6	Coloração dos sistemas de incubação após produção de PYO	32
Figura 7	Piocianina concentrada	33
Figura 8	Espectro fragmentado da piocianina	34
Figura 9	Percentagem de adesão para as linhagens controle/teste	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentração de piocianina ( $\mu\text{g/mL}$ ) por percentual de resíduo suplementado	32
Tabela 2	Concentração Inibitória Mínima da piocianina ( $\mu\text{g/ml}$ ) nas linhagens-teste	35
Tabela 3	Percentual e classificação da hidrofobicidade das linhagens-teste	36
Tabela 4	Quantificação das linhagens aderidas aos corpos de prova ( $10^3$ NMP/ $\text{cm}^2$ )	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PYO	Pyocyanin - Piocianina
PYO <sup>+</sup>	Linhagens produtoras de piocianina
PYO <sup>-</sup>	Linhagens não produtoras de piocianina
UFC	Unidades formadoras de colônia
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
NMP/cm <sup>3</sup>	Número Mais Provável por Centímetro cúbico

Observação: as abreviaturas, siglas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
2.1 PIOCIANINA .....	15
2.2 <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> .....	16
2.3 MICRO-ORGANISMOS E INTERAÇÕES .....	17
2.4 BIOFILMES BACTERIANOS .....	19
2.5 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PIGMENTOS .....	21
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
4.1 LOCAL DE PESQUISA .....	24
4.2 MICRO-ORGANISMOS .....	24
4.3 PRODUÇÃO DE PIOCIANINA .....	24
4.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PIOCIANINA .....	25
4.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO PIGMENTO .....	27
4.7 ANÁLISE DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM CRISTAL VIOLETA .....	28
4.8 ENSAIO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME EM CUPOM .....	29
4.9 TESTE DE HIDROFOBICIDADE .....	30
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	31
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
5.1 PRODUÇÃO DE PIOCIANINA .....	32
5.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) ...	35
5.5 AVALIAÇÃO DA HIDROFOBICIDADE .....	35
5.6 ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM CRISTAL VIOLETA .....	36
5.7 ENSAIO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME NOS CUPONS .....	37
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	<b>43</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>44</b>
<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>57</b>
<b>APÊNDICE B</b> .....	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A piocianina é uma fenazina natural de cor azul brilhante, sintetizada exclusivamente por 90-95% das espécies de *Pseudomonas aeruginosa*. É um pigmento caracterizado como metabólito eletroquimicamente ativo e possui funções essenciais para a bactéria, dentre outras, nos mecanismos de sinalização celular, assim como no metabolismo do ferro e virulência da bactéria. O pigmento também tem um papel já identificado nas interações ecológicas da *P. aeruginosa* com demais organismos, especialmente as que envolvem competição, sendo de fundamental importância compreender as bases destas relações.

O custo atual do pigmento com alto grau de pureza é muito alto, em valores aproximados, 1 mg de piocianina corresponde a aproximadamente R\$ 125,00, encorajando a produção laboratorial, visando a redução dos custos, ao passo que, se obtém um produto com características similares.

A indústria artesanal de cerveja se expandiu nos últimos anos e atrelado a isso, infere-se um aumento de resíduos resultantes do sistema produtivo. Há uma recorrência na busca pelo direcionamento adequado de tais resíduos, com o objetivo de aproveitar o potencial destes coprodutos, por exemplo, servir de substrato não convencional para geração de bioprodutos.

A partir disso, o presente trabalho demonstra a utilização de um resíduo de cervejaria artesanal como suplemento ao meio de produção de piocianina, posteriormente investigada no contexto da interferência do pigmento em linhagens de patógenos clínicos.

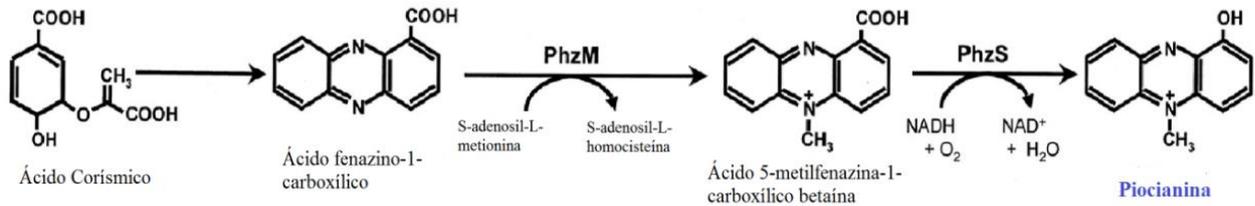
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 PIOCIANINA

A piocianina é uma substância estruturalmente composta por duas subunidades de N-metil-1-hidroxifenazina (MAVODRI et al., 2001; DIETRICH et al., 2013). Foi a primeira fenazina natural descrita na literatura, é definida como um pigmento de cor azul exuberante associado à participação nas reações de óxido-redução que culmina na produção e acúmulo de peróxido e superóxido de hidrogênio (O'MALLEY et al., 2003; BAHARI et al., 2017).

A síntese de piocianina é mediada pelo fenômeno de *Quórum-sensing*, processo dependente da densidade celular, regulado pela secreção e assimilação de moléculas denominadas de autoindutores. Cerca de 90-95% das linhagens de *P. aeruginosa* sintetizam a piocianina (MAVRODI et al., 2001). A constituição da molécula é derivada da via do ácido chiquímico, o precursor, como observado na Figura 1.

**Figura 1** – Rota sintética de produção de piocianina



Adaptado de Mavrodi et al. (2001)

Dois operons codificam sete genes no controle da conversão do ácido corísmico em ácido fenazino-1-carboxílico. A partir disso, ocorre a regulação dos genes *phzM* e *phzS* para as duas reações que culminam na síntese de piocianina. A princípio, existe a formação do ácido 5-metilfenazina-1-carboxílico betaína, o qual sofrerá catalisação pela metiltransferase fenazina-específica (*PhzM*), enzima classificada como S-adenosilmetionina transferase metil-dependente. Em seguida, esse produto inicial sofre catalisação pela mono-oxigenase flavina dependente (*PhzS*), o que envolve a hidroxilação da betaína do ácido 5-metilfenazina-1-

carboxílico betaína em 1-hidróxi-5-metil fenazina, denominada piocianina, uma fenazina natural (MAVRODI et al., 2001; JAYASEELAN; RAMASWAMY; DHARMARAJ, 2014).

As pesquisas que envolvem a piocianina tratam um enfoque no âmbito das ciências médicas, por exemplo, como uma estratégia de resposta da *P. aeruginosa* às pressões ambientais (BAHARI et al., 2017), nos mecanismos de multirresistência (KERR; SNELLING, 2009), atividade antimicrobiana (MARTINS et al., 2014), sinalização celular (DIETRICH et al., 2006) e alterações imunológicas ou respostas inflamatórias (SALES-NETO, 2019).

Entretanto, a abrangência da aplicação do pigmento pode ser investigada também no contexto da produção de moléculas tensoativas (DAS; MA, 2013), biorremediação (VIANA, 2018), nas interações ecológicas de *Pseudomonas aeruginosa* com outros organismos (KEER, 1999) e na geração de bioeletricidade (BOSIRE; ROSENBAUM, 2017).

Baseado na capacidade metabólica da *P. aeruginosa*, além da fácil manipulação e cultivo em laboratório, a produção laboratorial de piocianina pode ser aumentada quando se utiliza resíduos de processamento como fontes suplementares de carbono e nitrogênio ao meio convencional de produção, havendo, dessa forma, benefícios como a minimização de custos e aumento da produtividade.

Cabe ressaltar que o Brasil nos últimos anos vem desempenhando um papel importante dentre os maiores produtores mundiais de cerveja (MARCUSO e MILLER, 2018). A geração de resíduo nas cervejarias é alta, representando cerca de 200 g de bagaço de malte por litro de cerveja produzido (MUSSATTO e ROBERTO, 2006). Este bagaço pode ser empregado na produção de biomoléculas de valor agregado (SOCCOL e VANDENBERGHE, 2003), dessa forma, poderia ser empregado na produção de piocianina.

## 2.2 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

*P. aeruginosa* é um bacilo Gram-negativo aeróbio, monotríquio e não fermentador, medindo 0,5 x 1,5 µm, considerado ubíquo pode ser encontrado em diversos ambientes, preferencialmente água doce e solo (VIANA et al., 2017). Quando em cultivo em laboratório, as colônias são pequenas, mucosas, com pigmento difusível e aroma frutal de uva característico, o qual é derivado da produção de 2-aminoacetofenona, também encontrado na uva (SCOTT-THOMAZ, 2010).

A bactéria é membro do grupo das *Pseudomonas* fluorescentes, isto é, espécies produtoras de pigmentos com esta propriedade. Além disso, a bactéria exibe grande

versatilidade metabólica, atribuindo a ela qualidades de resistência às pressões ambientais, além de superioridade frente outros organismos, estando ou não em competição por espaço vital e nutriente (PIRNAY et al., 2005; MAIA et al., 2009; VASCONCELOS; DE FRANÇA; OLIVEIRA, 2011; HAIDAR et al, 2017).

Durante sua adaptação aos ambientes desfavoráveis, a bactéria utiliza mais de 90 moléculas como fonte de carbono e energia, o que confere vantagens seletivas à *P. aeruginosa* confirmando sua reputação de resiliente (SCOTT-THOMAZ, 2010). Neste contexto, a *P. aeruginosa* pode ser utilizada para diferentes fins biotecnológicos, a exemplo, produção de metabólitos atóxicos ou menos tóxicos ao ambiente, possibilitando sua utilização na descontaminação de áreas impactada por diferentes xenobióticos, tais como petroderivados (AISLABIE, 2006), herbicidas (LEONEL, 2018), assim como na produção industrial de biosurfactantes, neste caso, da classe dos ramnolipídios (CORRÊA et al, 2015).

*P. aeruginosa* sintetiza pelo menos cinco diferentes pigmentos: pioverdina e a fluoresceína, pigmentos fluorescentes e com função de sideróforos (DAS; MA, 2013; LEISINGER; MARGRAFF, 1979); Piorrubina A e B, sintetizadas contra estresses oxidativos (ABU et al., 2013); Piomelanina, ainda com função desconhecida, porém acredita-se que desempenhe o mesmo papel da piorrubina (FERGUSON et al., 2007); E piocianina, de cor azul ou azul-esverdeada, fluorescente, cujo mecanismo parece envolver participação na redução do íon  $Fe^{3+}$ , visto que o metal é um fator de crescimento crucial para a bactéria (JAYASEELAN; RAMASWAMY; DHARMARAJ, 2014).

### 2.3 MICRO-ORGANISMOS E INTERAÇÕES

Populações bacterianas interagem entre si, através de oito tipos de relações ecológicas, as quais podem ser positivas (comensalismo, protocooperação e mutualismo), negativas (inibição mútua por competição, competição pela utilização de recursos, amensalismo e parasitismo) ou neutras (não há influência entre as populações) (ODUM, 2004).

Os micro-organismos formam comunidades complexas multicelulares, que respondem sistematicamente a sinais advindos do ambiente em que estão inseridas, essas comunidades podem ser formadas por bactérias da mesma espécie ou espécies distintas. Quando espécies distintas coexistem no mesmo ambiente, estão sob competição em comunidades mistas na forma de biofilmes. Geralmente, a relação de antagonismo é representada pela antibiose, originada pela competição por nutrientes, interações diretas entre

competidores ou indução à resistência (BENNING et al., 2003; LOPES et al., 2011; MOLINA-SANTIAGO et al., 2017).

A competição microbiana é determinada pela obtenção de vantagem frente ao adversário e no repasse genético para as próximas gerações, as quais são influenciadas pela seleção natural para diversificação e inovação entre os organismos concorrentes. As relações ecológicas são bem delineadas nesse microambiente, cada célula alcança a manutenção no meio através de dois pontos focais de concorrência: espaço vital e nutrientes (HIBBING et al., 2010).

A teoria da competição por recursos (RCT) foi testada em culturas de laboratório sobre comunidades microbianas, identificando-se que sob certas concentrações de nutrientes, é instalada uma estabilidade da concentração celular entre as espécies coexistentes. Por outro lado, sob condições de limitação nutricional, ocorre o comprometimento de uma das populações (MURRAY; BAIRD, 2008).

A coexistência de espécies bacterianas conduz a formação de estruturas multicelulares estabilizadas, as quais coletivamente respondem a estímulos do ambiente em que habitam dentro das condições específicas de pH, temperatura, concentração-limitante nutricional (DOHI; MOUGI, 2018).

Após uma longa fase estacionária a competição pelo espaço e por nutrientes é reestruturada nas populações mistas. Em seguida, um determinado micro-organismo exibe substâncias de diferentes naturezas, a fim de inibir o crescimento de um segundo. Essas substâncias podem ser por exemplo, enzimas, ácidos orgânicos ou pigmentos, tais como a piocianina (VASCONCELOS et al., 2010; ARRUDA et al., 2019).

*P. aeruginosa* é conhecida por sua versatilidade metabólica (COSTERTON; WILSON, 2004; DE ARAUJO KRONEMBERGER, 2007; PEREIRA, 2012; EL-FOULY et al., 2015), o que atribui vantagem quando interage com outras bactérias patogênicas, por exemplo, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (SALLES; GOULART, 1997; MOURA et al., 2007). Dessa forma, o conhecimento das interações ecológicas e da individualidade desses micro-organismos, permite investigar mecanismos de inibição, coexistência, competição e levar ao entendimento das relações desses com questões ambientais e de saúde.

*E. coli* é um bacilo Gram-negativo, não esporulado, anaeróbio facultativo capaz de fermentar glicose e a lactose com produção de ácidos e gases, possui medições entre 1,1-1,5 µm por 2,0-6,0 µm, apresenta motilidade pela presença de flagelos peritríquios. Pertencente ao grupo dos coliformes é considerada o único coliforme fecal verdadeiro por ser recorrente

no trato intestinal de animais de sangue quente (THAKUR, 2007; BARBOSA et al., 2009; APHA, 2012; SHARMA et al., 2016).

*S. aureus* é uma bactéria Gram-positiva facultativa, com um diâmetro de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$ , e arranjada em formato de cocos agrupados como cachos de uvas. Além disso, são imóveis e não esporulam. A maioria dos estafilococos produzem catalase, enzima relacionada com a conversão de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio livre (KLOSS; SCHLEIR; GOIRTZ, 1992; KURODA et al., 2001). Em complemento, componentes de sua parede, isto é, a parte hidrofóbica do ácido lipoproteico e o peptidoglicano, participam da aderência da bactéria a diferentes superfícies (PATTI et al., 1994; ROCHE; MASSEY; PEACOCK, 2003).

## 2.4 BIOFILMES BACTERIANOS

Considerado a forma de vida preferencial microbiana, os biofilmes são comunidades biológicas com elevado grau de organização morfofuncional (DAVEY; O'TOOLE, 2000). Os biofilmes são compostos por grupos de micro-organismos associados às superfícies bióticas e abióticas (SATPATHY, 2016). Nesse arranjo é possibilitada a sobrevivência em ambientes tanto com baixos teores de matéria orgânica dissolvida, quanto sob alta concentração de nutrientes, revelando-se uma estratégia de resistência microbiana (HUYNH et al., 2012; ARRUDA, 2013).

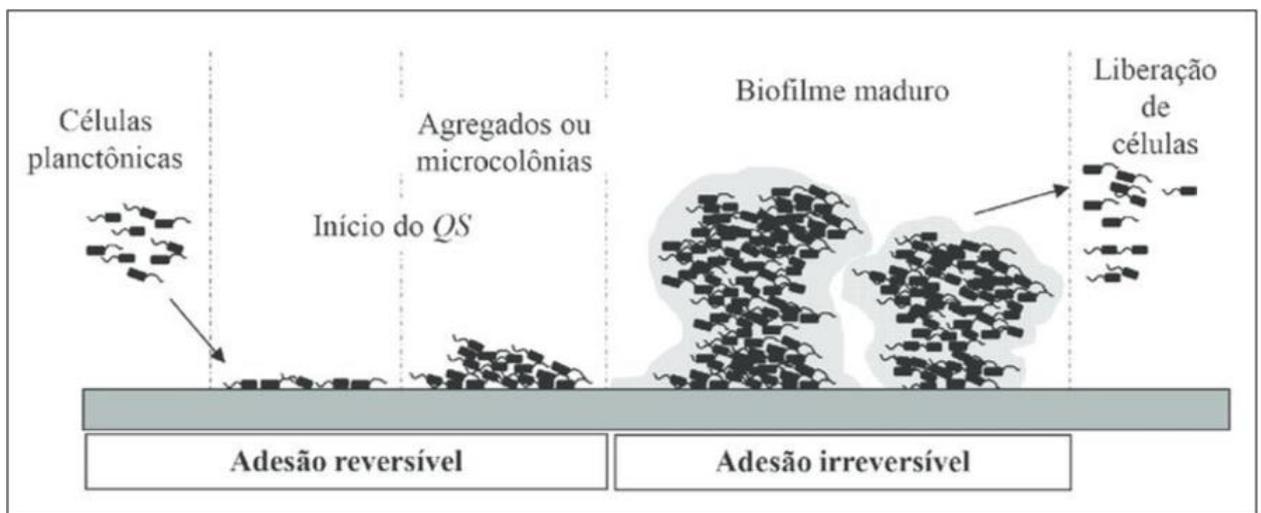
A formação e desenvolvimento em biofilme garante também um aumento da resistência a agentes antimicrobianos, tais como, medicamentos, metais pesados e degermantes, quando comparada com bactérias de crescimento planctônico (NICKEL et al., 1985; COSTA et al., 2014; HOIBY, 2017).

A sistematização dinâmica do biofilme funciona com diferentes mecanismos envolvidos na sua estruturação. O tamanho de um biofilme está limitado ao ambiente que é estabelecido e a sua distribuição espacial é constituída sob forma de pilares de morfologia semelhante a um cogumelo, unidos por canais. Essa condução garante a estabilidade por meio da troca de nutrientes, metabólitos e oxigênio, por meio de um sistema sofisticado de sinalização celular (COSTERTON; GEESEY; CHENG, 1978; MONDS; O'TOLLE, 2009; HUYNH et al., 2012).

O ciclo de um biofilme é composto por quatro etapas, a saber: 1 – adesão, quando as células pioneiras se aderem à superfície, podendo ser reversível ou irreversível, em função da disponibilidade de nutrientes; 2 – colonização, em que há o aumento populacional em função

da densidade de espaço vital e nutriente, com produção de exopolissacarídeos (EPS); 3 – maturação, mediada por um complexo sistema de comunicação celular com expressão de EPS e supressão da flagelina; e 4 – desprendimento, quando a densidade populacional compromete a viabilidade e estabilidade do sistema, ocorre o rompimento da camada de EPS por ação de liases, com liberação de indivíduos flagelados para nova colonização (DONLAN; COSTERTON, 2002; STOODLEY et al., 2002; COSTERTON; WILSON, 2004; TRENTIN et al, 2014), como ilustrado na Figura 2

**Figura 2** – Etapas da formação de biofilme em *Pseudomonas aeruginosa*



QS – *Quorum sensing*

Fonte: Trentin et al. (2014)

A adesão na superfície deve ser significativa para o sucesso de crescimento do biofilme, por isso, é mediada pela produção e secreção de diferentes polímeros na superfície ou substrato condicionante, ocorrendo inicialmente pela ação das forças de Van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas em superfícies abióticas, enquanto a interação por meio de moléculas específicas, lectina, ligantes ou adesinas, como mecanismos de receptor-ligante nas superfícies bióticas (GIBBONS, 1989; QUIRYNEN; BOLLEN, 1995; DUNNE, 2002; HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004).

Na primeira etapa há uma força repulsiva, a qual pode apresentar origem eletrostática, mediante a carga negativa do envelope celular e sua interação com a superfície, ou de origem hidrodinâmica presente quando a bactéria está no limiar de contato entre o líquido próximo à superfície (KAPLAN; KOLTER, 2000; VAN OSS, 2003; TOOLE; BERNE et al., 2015).

Quando a adesão é do tipo irreversível, há esforços para aumentar a adesão inicial com a expressão de adesinas na membrana celular, as quais se ligarão a sítios complementares específicos sobre a superfície. Algumas bactérias podem sintetizar glicanos, os quais possibilitam adesão mais forte, favorecendo a colonização de outros micro-organismos que não têm habilidade de ligação direta às superfícies (CURTISS, 1986; NASSAR et al., 1995; BUSSCHER; VAN DER MEI, 1997; TRENTIN et al., 2014).

## 2.5 PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PIGMENTOS

Os pigmentos naturais são metabólitos secundários de baixa massa molecular, sintetizados por eucariotos e procariotos. Estas moléculas são de várias naturezas químicas, produzidas para garantir o crescimento do organismo específico que as produz (BERDY, 2005; CHADNI, 2017; DOHI, 2018), bem como atribuem ao organismo produtor, funções diversificadas, tais como antibiose, fotossíntese, proteção da célula contra radiação ultravioleta e a absorção de ferro, dentre outros (MOELLER et al., 2005; NOWICKA, KRUK, 2016; MORADALI; GHODS; REHM, 2017; VIANA et al., 2017).

Algumas espécies produtoras de pigmento, seja fungos, a exemplo de *Monascus* sp. e *Penicillium* sp., seja bactérias, tais como *S. aureus* e *P. aeruginosa* são de fácil cultivo laboratorial, basta que durante o sistema de formação do pigmento, além de fornecer as condições ótimas para induzir a via metabólica ideal de produção, outras estratégias podem ser utilizadas para aumentar a produtividade do micro-organismo (MAVRODI, 2001; MAPARI et al., 2005).

Durante o processo produtivo visando à obtenção do pigmento com certo grau de pureza, sua caracterização é essencial. Para isto, diversas operações podem ser conduzidas empregando diferentes métodos, tais como cromatografia e espectrofotometria, Ressonância Magnética Nuclear (RMN), dentre outras (SCHWEDER; LINDEQUIST; LALK, 2005; TEIXEIRA et al., 2011).

O protocolo deliberado pela espectrometria de massas na identificação de compostos naturais de origem microbiana é uma estratégia inteligente na seleção de moléculas promissoras, as quais são identificadas e comparadas com padrões já relatados na literatura, a fim de empregá-las em estudos de amplo espectro (ELOY et al., 2012).

A primeira etapa durante a identificação é a separação/extração do composto do meio o qual está difundido, posteriormente, a análise das propriedades físico-químicas pelos métodos químicos já citados, permitem a caracterização específica de uma substância dentro

de uma mistura complexa, ainda que com a presença de outros metabólitos e/ou sujidades (SCHWEDER et al., 2005).

Há uma crescente utilização de técnicas analíticas no estabelecimento de perfil de metabólitos, e a espectrometria de massas é conhecida pela sua agilidade e efetividade no esboço do aspecto molecular do metabólito de interesse, proveniente de micro-organismos (MAPARI et al., 2005).

O resultado do espectro de massas representa um perfil de compostos na amostra, que estão separados pela massa molecular protonada, podendo ser tratado como um perfil de massas contido no extrato utilizado. Entretanto, esses resultados são apenas indicativos na avaliação da produção do metabólito de interesse. A identificação completa requer outros conhecimentos associados e outras técnicas analíticas empregadas, além da comparação com banco de dados no auxílio da caracterização de estruturas conhecidas (SMEDSGAARD e FRISVAD, 1996; SMEDSGAARD; FRISVAD, 1997; SCHWEDER et al., 2005; SUMNER et al., 2007).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Produzir piocianina, empregando resíduo de malte de cevada e testar a atividade biológica dessa substância frente a linhagens clínicas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e quantificar a piocianina produzida;
- Caracterizar molecularmente a piocianina produzida;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima do pigmento sobre linhagens padrão: *Escherichia coli* UFPEDA224, *Staphylococcus aureus* UFPEDA02 e *Candida Tropicalis* 13803;
- Avaliar a adesão e formação de biofilme das linhagens padrão na presença de piocianina;
- Realizar o teste de hidrofobicidade sobre linhagens padrão.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL DE PESQUISA

As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMA) do Centro de Biotecnologia da UFPB.

### 4.2 MICRO-ORGANISMOS

Foram avaliados quatro isolados selvagens de *P. aeruginosa*, denominados produtores de piocianina (PYO<sup>+</sup>): TGC02 e TGC04 e não produtoras do pigmento (PYO<sup>-</sup>): TGC03 e RX10. Os isolados são cadastrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob número A6D0C2F. Estes isolados foram obtidos de solos de postos de gasolina na cidade de João Pessoa, Paraíba (CAVALCANTI et al., 2019).

As linhagens padrão empregadas no estudo foram *Escherichia coli* UFPEDA 224, *Staphylococcus aureus* UFPEDA 02 e *Candida tropicalis* 13803. Todos os micro-organismos utilizados foram submetidos a repiques bimestrais e mantidos sob refrigeração a 4°C e fazem parte da coleção de culturas do LAMA.

### 4.3 PRODUÇÃO DE PIOCIANINA

A produção de piocianina foi estimulada pela inoculação dos isolados PYO<sup>+</sup> em caldo King A (KING; WARD e RANEY, 1954), modificado, cuja composição, corresponde em g/L: peptona de carne (20,0), MgCl<sub>2</sub> (1,64), K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10,0), 10 mL/L de glicerol. Na potencialização desse sistema, houve a suplementação com concentrações de 0,125; 0,25; 0,5; 1 e 2% (m/v) de resíduo de malte de cevada, obtido após a etapa de mosturação da produção de cerveja, cuja determinação do nitrogênio total, 1,45 mg/Kg, foi realizada pela Empresa Júnior Engaja, pelo método Kjeldahl (USEPA, 1993). (Sistemas observados na **Figura 3**).

**Figura 3** – Sistemas de incubação acrescidos de resíduo de malte de cevada (m/v)



Fonte: autoria própria

As linhagens  $PYO^+$  e  $PYO^-$  foram inicialmente cultivadas por 48 horas a  $30^\circ\text{C}$  em ágar nutriente em tubo inclinado. Em seguida, suspensões bacterianas foram preparadas em solução de NaCl 0,9% e padronizadas com a turbidez n $^\circ$ 1 pela escala de MacFarland. Posteriormente, o volume de 5 mL foi transferido para frascos Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, contendo 100 mL do caldo King A suplementado com as diferentes concentrações do resíduo (0,125 – 2%). Os frascos foram incubados sob agitação de 150 rpm à  $29\pm 1^\circ\text{C}$  por 96 horas (Nova Instruments NI 1713), garantindo que os isolados já estivessem na fase estacionária e maior quantidade de pigmento estivesse dissolvida no meio (HASSANI et al., 2012; EL-FOULY et al., 2015).

#### 4.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PIOCIANINA

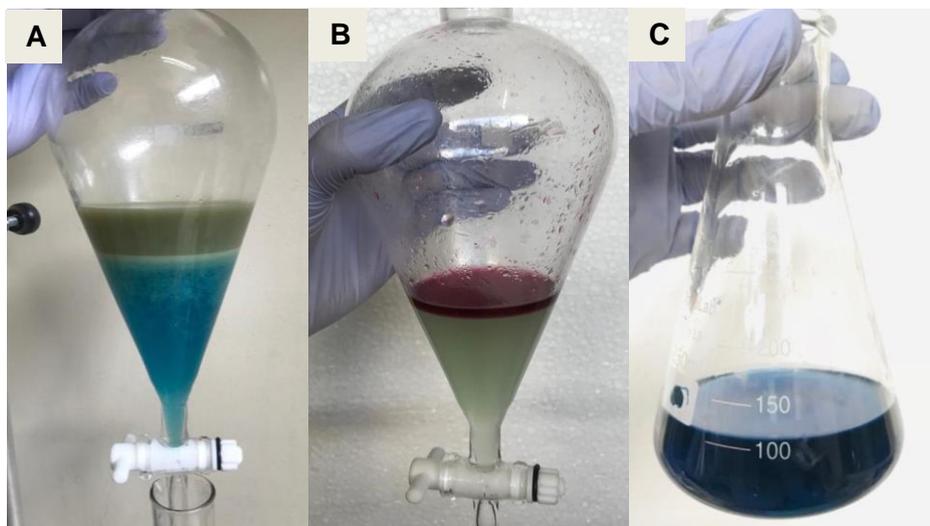
O método descrito por Hassani et al. (2012) com modificações, foi utilizado para estimar a concentração do pigmento. Inicialmente, após a incubação dos sistemas nas condições descritas no item 4.3, adicionou-se 10 mL de clorofórmio a 50 mL de uma alíquota do mosto formado. Logo após, o tubo foi agitado em vórtex (Warmnest VX-28) durante 1 minuto. Posteriormente, separou-se a fase referente ao clorofórmio + piocianina (de coloração azul) e adicionou-se à mistura 5 mL de HCl [0,2 mol/L], agitando-se novamente por 1 minuto em vórtex. Após repouso, a fase acidificada (coloração rosa) foi neutralizada com solução-tampão Tris-Base [0,1 mol/L] até a coloração retornar à cor azul. Novamente, adicionou-se 5 mL de clorofórmio e agitou-se em vórtex para remoção da fase azul e a essa fase, foram

adicionados 3 mL de HCl [0,1 mol/L] e após nova agitação em vórtex, recuperou-se a fase rosa, repetindo a neutralização com tampão Tris-Base [0,1 mol/L] por mais 3 vezes, a fim de alcançar a purificação da substância e garantir que não houvesse biomassa envolvida (**Figura 4**).

Para determinação da concentração de piocianina ([PYO]), em  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{L}$  da fase azul (neutralizada) foram diluídas em 990  $\mu\text{L}$  de água destilada, totalizando 1 mL e a absorbância da solução obtida, determinada a 690 nm (Quimis U2M), cujo resultado (ABS), foi inserido numa equação, obtida por meio da preparação de uma curva padrão, **Equação 1**.

$$[\text{PYO}] = \frac{|\text{ABS}| - 5,888 \times 10^{-4}}{14,03} \quad \text{Eq.1}$$

**Figura 4** – Etapas de extração da piocianina: extração em clorofórmio (a), adição de HCl à fase orgânica (b) e adição de Tris-Base à fase ácida (c).



Fonte: autoria própria

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO PIGMENTO

Aproximadamente 1 mg de piocianina solubilizada em clorofórmio foi concentrada em rotaevaporador (Buchi Rotavapor<sup>®</sup>, R-3) para depuração do solvente e em seguida solubilizada novamente numa solução água destilada-metanol grau HPLC (1:1) cuja concentração final foi de 250 ng/ml. Em seguida, a amostra foi encaminhada ao Laboratório Multiusuário de caracterização e análises (LMCA-UFPB) para caracterização química da amostra por espectrometria de massas.

A caracterização foi realizada com o equipamento de espectrometria de massas de baixa resolução (Bruker, Ion Trap-amaZonX), por meio de infusão direta da amostra e uso da técnica de Ionização por Eletrospray (ESI). Os parâmetros de análise do Ion-Trap foram: 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, gás seco (N<sub>2</sub>) com fluxo de 5.0 L/min e temperatura de 220°C. A fragmentação de CID foi alcançada no modo auto MS/MS utilizando o modo de resolução avançada para o modo MS e MS/MS. Os espectros (m/z 50-1000) foram registrados a cada 2 segundos.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

O meio de produção da piocianina foi filtrado, obtendo-se 600 µg/mL de piocianina, concentração conhecida e utilizada como a solução-padrão. A CIM da piocianina sobre as linhagens microbianas foi determinada pela técnica da microdiluição (HADACEK; GREGER, 2000). Todos os poços foram preenchidos com 150 µL de caldo nutriente (linhagens bacterianas) e 150 µL de caldo Sabourand (linhagem fúngica), duplamente concentrado. Em seguida, ao primeiro poço foram adicionados 150 µL da solução com a maior concentração de piocianina (300 µg/mL), prosseguindo aos demais poços por meio de diluições seriadas (1:2). Por fim, foram adicionados 20 µL da suspensão de cada linhagem teste, de cultivo recente, com turbidez padronizada pelo tubo nº 1 da escala de MacFarland ( $3 \times 10^8$  UFC/mL). Poços controles foram preenchidos para verificação da esterilidade e da viabilidade das linhagens ao meio, indicada pela alteração da turbidez. Os sistemas foram incubados por 24h-48h a 30°C. Foram testadas as concentrações na faixa entre 300 e 18,75 µg/mL de piocianina.

A CIM foi definida como a menor concentração de piocianina que inibiu o crescimento microbiano, verificado pela inspeção visual de turbidez, comparado ao controle. No poço em que foi observada a CIM, uma alíquota de 40 µL foi utilizada para quantificação

celular pela técnica dos tubos múltiplos, expresso pelo Número-Mais-Provável (NMP). O volume foi diluído em 360  $\mu\text{L}$  de solução de NaCl 0,85% e alíquotas foram transferidas para uma série de 9 poços contendo 100  $\mu\text{L}$  de caldo nutriente em concentração dupla (para as alíquotas de 100  $\mu\text{L}$ ) e simples (para as alíquotas de 10 e 1  $\mu\text{L}$ ). A formação de turbidez foi considerada o resultado positivo do teste. O número de poços positivos por série de alíquotas adicionadas foi contado e comparado à tabela de Hoskings (APHA; AWWA; WEF, 2012).

A atividade da piocianina sobre as linhagens testadas foi interpretada como alta ( $50 > \text{CIM} < 500$ ), moderada ( $500 > \text{CIM} < 1500$ ) ou fraca ( $\text{CIM} > 1500 \mu\text{g/mL}$ ) (SARTORATTO et al., 2004). O teste foi realizado em duplicata.

#### 4.7 ANÁLISE DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM CRISTAL VIOLETA

Com adaptações à metodologia descrita por Balasubramanian et al. (2012) e Khare e Arora (2011), o ensaio foi realizado pela técnica do cristal violeta. Em tubos de microdiluição, contendo 1000  $\mu\text{L}$  de caldo nutriente (linhagens bacterianas) ou caldo Sabouraud-dextrose 2% (linhagem fúngica). Foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  da suspensão das culturas-teste, preparadas como descrito no item 4.3, e 5  $\mu\text{L}$  da solução de piocianina, na concentração de 37,5  $\mu\text{g/mL}$ . O sistema foi estaticamente incubado por 48h a 30°C.

Foram retiradas alíquotas do sobrenadante do controle e do teste, em seguida, realizou-se a leitura ( $\lambda=590 \text{ nm}$ ) e seus valores descontados da absorbância do caldo estéril contendo o pigmento, que objetivou remover qualquer interferência de meio líquido/meio líquido suplementado com piocianina. A cada intervalo de 24h, o volume dos tubos foi descartado e as paredes lavadas de 3-5 vezes com água de torneira, com intuito de remover qualquer crescimento planctônico depositado, reservando-se posteriormente os tubos para secagem por 1h.

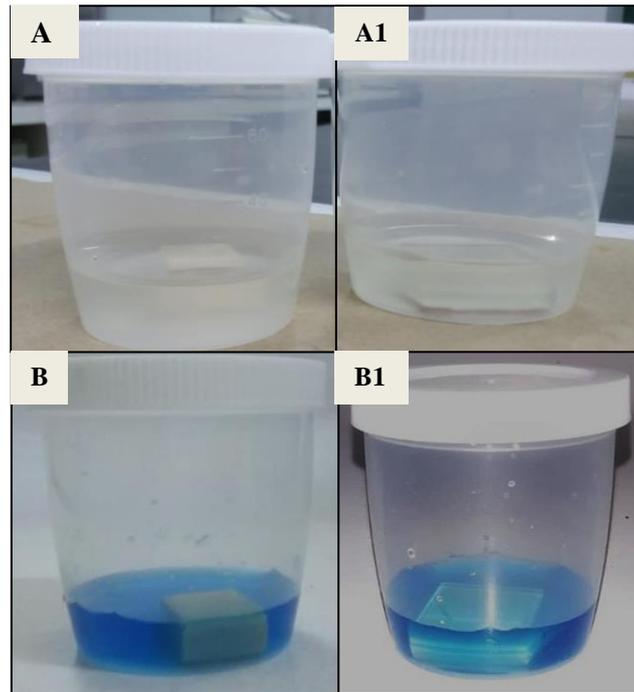
Posteriormente, foram transferidos cerca de 1500  $\mu\text{L}$  de solução de cristal violeta 1% e após 20 min, o corante foi descartado e seu excesso nas paredes, removido com água de torneira. Uma vez seco, os tubos receberam 1500  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto e após um repouso por 30 minutos, a solução de cristal violeta-etanol foi lida em espectrofotômetro a 590 nm. O controle do teste foi realizado com as linhagens desenvolvidas em meio sem adição da piocianina. O ensaio foi realizado em duplicata.

#### 4.8 ENSAIO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME EM CUPOM

Empregando a técnica construída por Almshawit, Macreadie e Grando (2014), com intuito de verificar a perturbação da piocianina sobre a adesão e formação de biofilme das linhagens padrão *E. coli* UFPEDA 224 e *S. aureus* UFPEDA 02 em dois cupons com área mínima de 1 cm<sup>2</sup>: o primeiro, de dolomita (Legato, Rio de Janeiro, Brasil) e o segundo de vidro (Sincenet, Joiville, Santa Catarina). As peças foram deixadas em repouso, no fundo de um recipiente de polipropileno transparente com capacidade de 70 mL, contendo 10 mL de água de torneira filtrada em cerâmica, esterilizada (Stéfani, Jaboticabal, São Paulo), acrescido de 0,5 g/L de extrato de levedura, denominada por MWY). Em seguida, 1 mL de suspensão de cada micro-organismo teste, com turbidez padronizada com tubo n°1 da escala de MacFarland, foi transferida para seu respectivo reator, de modo que a população inicial ficou estabelecida em aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL. Em seguida, o reator foi incubado de forma estática a 30°C por 48h (Incubadora B.O.D SL – 200). O controle do teste foi realizado na mesma condição em ausência da piocianina. (Biorreatores observados na figura 5).

Os sistemas foram incubados por 48h com quantificações a cada 24h. Os cupons foram removidos com auxílio de uma pinça, em fluxo laminar vertical, sob condições assépticas e a biomassa, desenvolvida nas superfícies voltadas para o meio aquoso, foi transferida por meio de raspagem para um recipiente contendo 10 mL de solução salina de NaCl 0,85%. Após homogeneização, uma alíquota de 1 mL foi transferida para um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina de NaCl 0,85%. Em seguida, alíquotas de 100, 10 e 1 µL foram transferidas para série de 9 poços, como descrito no item 4.6. Os resultados foram expressos em NMP/cm<sup>2</sup> (APHA;AWWA; WEF, 2012).

**Figura 5** – Biorreatores. Controle dolomita (A) e teste dolomita (A1), controle vidro (B) e teste vidro (B1).



Fonte: autoria própria

#### 4.9 TESTE DE HIDROFOBICIDADE

A avaliação da hidrofobicidade foi realizada pela técnica do MATH (*Microbial Adhesion To Hydrocarbon*), com modificações às metodologias de Tyfa et al. (2015) e Azevedo e Cerca (2012). O teste é fundamentado no fato de que as células se aderem ao hidrocarboneto, reduzindo a densidade óptica na fase aquosa, reflete o potencial de adesão a uma superfície.

Inicialmente, preparou-se 5 mL de uma suspensão de cultivos recentes em tampão PBS (pH 7.2) para ambas as linhagens-teste, cuja absorvância em 600 nm se encontrava entre 0,4 e 0,6 (Absorvância inicial -  $A_i$ ). Em seguida, foram transferidos 2,5 mL da suspensão para outro tubo e acrescentado 0,5 mL do Xileno (Vetec, Rio de Janeiro). Esse sistema sofreu agitação durante 1 minuto em vórtex (Warmnest VX-28). Em dois intervalos de repouso à 25°C, 10 minutos e 1 hora, quando a absorvância a 600 nm foi lida (Absorvância final -  $A_f$ ). O teste foi realizado em triplicata. O cálculo do percentual de hidrofobicidade foi determinado pela seguinte Equação 2:

$$\% = \frac{[1-A_i]}{A_f} \times 100 \quad \text{Eq.2}$$

Os resultados classificaram a hidrofobicidade em forte > 50%, moderada 20-50% e fraca, se < 20%.

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da hidrofobicidade, ensaio de formação do biofilme foram expressos pelo valor da média e seu desvio padrão.

A correlação entre a concentração do resíduo de malte e a quantidade de piocianina produzida, comparado aos grupos controle, foi verificada, onde a significância foi estabelecida em  $p < 0,05$ , utilizando o programa IBM®SPSS® Statistics, versão 21.

Os resultados da análise formação de biofilme com percentagem de adesão foram expressos pelo valor da média e seu desvio padrão seguido pela análise no Teste T Não Pareado, do software Graph Prism versão 8. Sendo os valores de p: \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PRODUÇÃO DE PIOCIANINA

As linhagens PYO<sup>+</sup> (TGC02 e TGC04) exibiram a produção do pigmento sob todas as condições testadas (Figura 6). Na ausência do resíduo de malte de cevada, a concentração média obtida foi de 17 µg/mL. A piocianina foi aumentada proporcionalmente à porcentagem de resíduo de malte de cevada adicionado ao meio, sendo a melhor condição de produção equivalente a maior concentração do substrato adicionada, 2% (p/v), conforme sumarizado na **Tabela 1**.

**Figura 6** – Coloração dos sistemas de incubação após produção de PYO



Fonte: autoria própria

**Tabela 1** – Concentração de piocianina (µg/mL) por percentual de resíduo suplementado

LINHAGENS	Porcentagem de resíduo de malte de cevada adicionado ao caldo King A				
	0,0	0,25	0,50	1,0	2,0
TGC02	17,8±0,1	23,0±0,5	35,3±0,3	32,6±0,2	58,2±0,1
TGC04	16,9±0,1	21,5±0,3	22,2±0,5	27,1±0,9	58,3±0,1
TGC03	0,2±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
RX10	0,2±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0

Uma alta correlação foi observada entre a produção de piocianina e a concentração do resíduo adicionado ao meio de cultura, em ambos isolados, TGC02 e TGC04, respectivamente, 87,6 e 81,8%. Por outro lado, não houve estímulo nos isolados  $PYO^-$ : TGC03 e RX10.

O isolado TGC02 produziu aproximadamente entre 18 e 58  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de piocianina, representando um aumento de 22,6 para 69,4% em relação ao controle em caldo King A, ou seja, sem suplementação com o resíduo. Nas concentrações 0,5 e 1% do resíduo, não houve diferença estatística nos valores obtidos do pigmento.

Resultados semelhantes foram observados com TGC04, cujas concentrações entre 0,25 e 1% de malte de cevada foram utilizadas. O isolado  $PYO^+$  produziu entre 17 e 58  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de piocianina, representando um aumento entre 21,4 e 71%, quando comparado ao grupo controle.

## 5.2 CONCENTRAÇÃO DE PIOCIANINA

Após produção em condições controladas, a leitura da absorbância e o emprego na equação apresentada no tópico 4.4, foi possível alcançar a concentração de 600  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de piocianina, a qual se tornou a solução-padrão para as etapas seguintes dos testes de atividade (Figura 7).

**Figura 7** – Piocianina concentrada



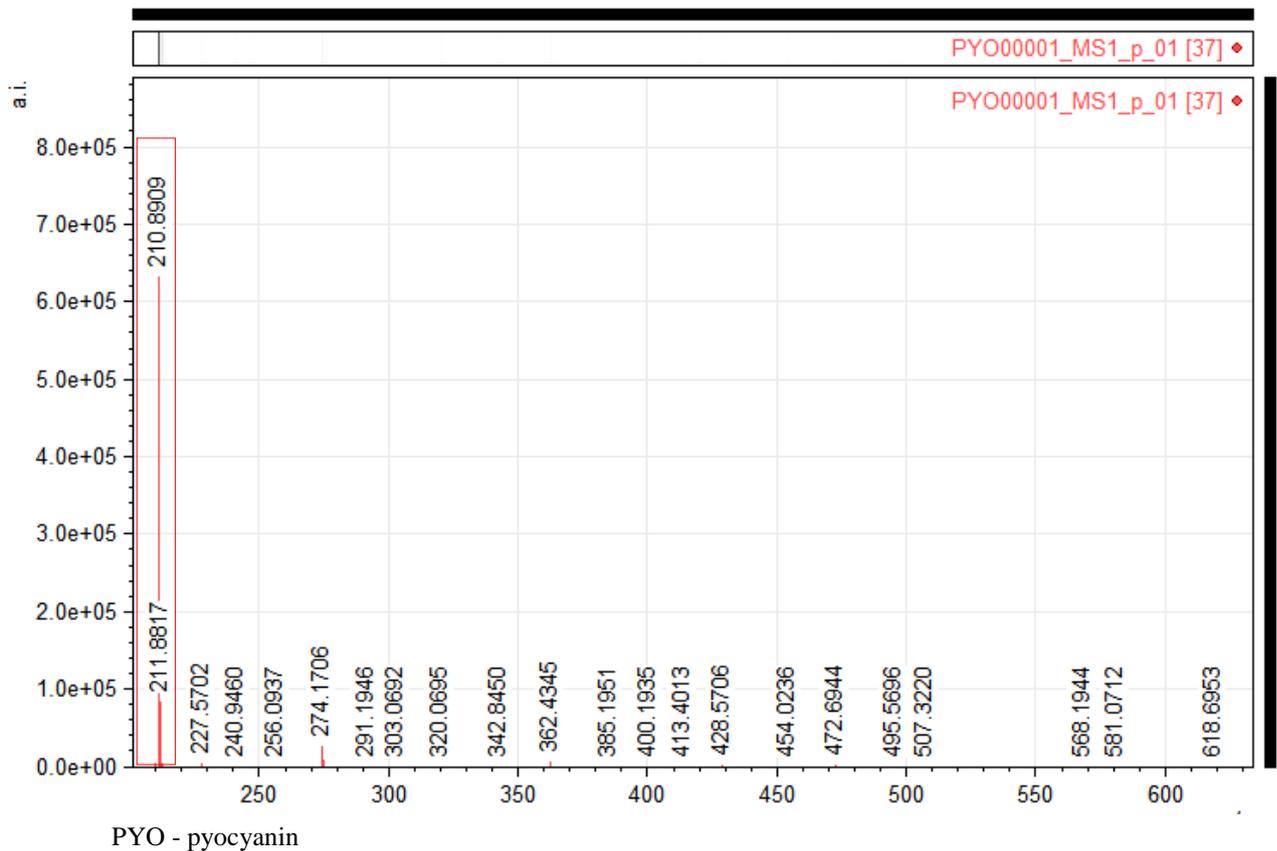
Fonte: autoria própria

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO PIGMENTO

Na determinação da característica molecular da piocianina, o resultado do espectro foi influenciado pela presença de ruídos tanto pela sensibilidade do equipamento na identificação da matriz complexa de um extrato natural, quanto às desconformidades na preparação da amostra (utilização de água destilada ao invés de Mili-q) para leitura no espectro de massas, a presença do pico maior em 210,89 m/z sugere a maior predominância de piocianina na amostra analisada.

É possível identificar no espectro fragmentado obtido por ionização negativa, a presença da fenazina em fase ionizada (211,8817 m/z), quanto na fase normal (210,8909 m/z), conforme apresentado na Figura 8.

**Figura 8** – Espectro fragmentado da piocianina



#### 5.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

O estabelecimento da CIM, no período de 48 horas, permite inferir que a piocianina apresentou atividade contra as linhagens *E. coli* UFPEDA 224, quanto para *S. aureus* UFPEDA 02, mas não apresentou atividade contra *C. tropicalis* 13803, como observado na **Tabela 2**.

**Tabela 2** – Concentração Inibitória Mínima das piocianina ( $\mu\text{g/ml}$ ) nas linhagens-teste

CONCENTRAÇÃO ( $\mu\text{g/ml}$ )	UFPEDA 02 / UFPEDA 224 / 13803	
	24 horas	48 horas
300 $\mu\text{g/ml}$	- / - / +	- / - / +
150 $\mu\text{g/ml}$	- / - / +	- / - / +
75 $\mu\text{g/ml}$	- / - / +	- / - / +
37,5 $\mu\text{g/ml}$	- / - / +	- / - / +
18,75 $\mu\text{g/ml}$	- / + / +	- / + / +

A CIM encontrada frente às linhagens bacterianas foi de 18,75  $\mu\text{g/mL}$  para *S. aureus* UFPEDA 02, a menor concentração testada, enquanto para *E. coli* UFPEDA 224 foi de 37,5  $\mu\text{g/mL}$ . Resultados corroborados pelo NMP igual a zero nos poços da CIM para ambas as linhagens. Essas concentrações permitiram classificar a atividade do pigmento como alta.

Para a linhagem *C. tropicalis* 13803, não foi observada CIM, de tal forma que se observou turvação em todas as concentrações testadas. Sendo assim, a linhagem foi descartada para a etapa seguinte da pesquisa.

#### 5.5 AVALIAÇÃO DA HIDROFOBICIDADE

As linhagens bacterianas apresentaram-se com percentual pronunciado de hidrofobicidade conforme a classificação da metodologia descrita em 4.9. Os percentuais de hidrofobicidade e sua classificação estão apresentados na **Tabela 3**.

**Tabela 3** – Percentual e classificação da hidrofobicidade das linhagens-teste

Linhagem	Hidrofobicidade	
	% de Hidrofobicidade	Classificação
<i>Escherichia coli</i> UFPEDA224	61,9%	Fortemente hidrofóbica
<i>Staphylococcus aureus</i> UFPEDA02	27,29%	Moderadamente hidrofóbica

Classificação da hidrofobicidade de acordo com Tyfa et al. (2015)

### 5.6 ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE BIOFILMES EM CRISTAL VIOLETA

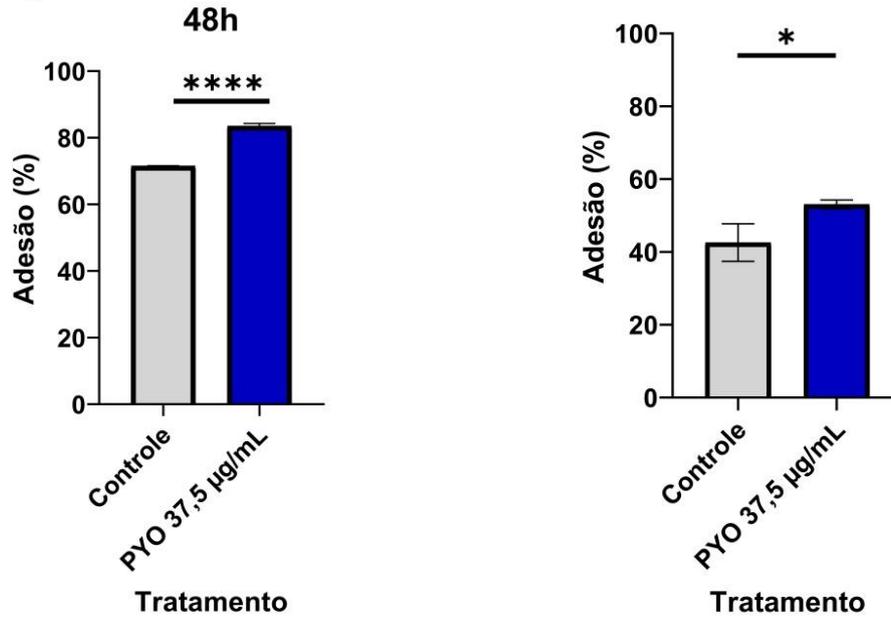
Baseado no teste da determinação da CIM em 48h, a adesão de *S. aureus* UFPEDA 02 foi avaliada na presença da concentração 2xCIM (37,5µg/mL) de piocianina. Observou-se uma densidade óptica de 0,379, comparada ao controle (0,222). Isto representou um aumento cerca de 43% da adesão, considerada moderada, uma vez que havia células aderentes após 48h de teste. Isto é sabido em razão da determinação de um teto mínimo, calculado pela densidade óptica do meio de cultura empregado no teste. Se o valor for superior a 3 vezes este teto (*cutoff*), considera-se a presença de células aderentes. Neste ensaio o *cutoff* do teste foi 0,189.

Por outro lado, para *E. coli* UFPEDA224 a concentração testada correspondia a concentração inibitória mínima (37,5µg/mL) de piocianina. O teste registrou uma densidade óptica média de 0,111, representando um aumento de aproximadamente 20% da adesão comparadas ao controle, 0,134. No entanto, esta adesão foi considerada fraca, assim como não havia células com propriedades aderentes em 48h de teste.

Nessa metodologia, sugere-se que a piocianina influenciou no aumento da adesão das células às paredes dos tubos de microdiluição, o resultado está apresentado na Figura 9.

**Figura 9** – Percentagem de adesão para as linhagens controle/teste

***Staphylococcus aureus* UFPEDA02      *Escherichia coli* UFPEDA224 48h**



\*\*\*\* p<0,0001 e \*p<0,05

### 5.7 ENSAIO DE FORMAÇÃO DO BIOFILME NOS CUPONS

Ambas as linhagens *E. coli* UFPEDA 224 e *S. aureus* UFPEDA 02 se aderiram às superfícies testadas, especialmente na dolomita. As concentrações ficaram estabelecidas em aproximadamente  $10^3$  NMP/cm<sup>2</sup>, não se diferenciando do que foi obtido no controle (**Tabela 4**).

**Tabela 4** – Quantificação das linhagens aderidas aos cupons ( $10^3$  NMP/cm<sup>2</sup>)

LINHAGENS SUPERFÍCIE	<i>S. aureus</i> UFPEDA02		<i>E. coli</i> UFPEDA224	
	Controle	PYO (37,5 µg/mL)	Controle	PYO (37,5 µg/ml)
VIDRO	23,0	17,9	58,5	20,3
DOLOMITA	60,5	3,4	92,9	50,1

PYO - piocianina

## 6 DISCUSSÃO

A produção de piocianina em meios tradicionais empregados na rotina de um laboratório de microbiologia fundamenta-se no estado energético da *P. aeruginosa*, que é reduzido em condições de baixa concentração de nutrientes, resultando em uma diminuição na taxa de crescimento populacional e no aumento da concentração de pigmentos. A pressão ambiental encontrada na escassez nutricional aos íons  $\text{PO}_4^{3-}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  força à linhagem  $\text{PYO}^+$  a exibir o pigmento, que se difunde ao meio (WHOOLEY; MCLOUGHLIN, 1982).

Há quase quatro décadas esta hipótese foi levantada, fundamentando-se nas observações do desenvolvimento de linhagens de *P. aeruginosa* submetidas a diferentes pressões ambientais seletivas. Estudos posteriores corroboraram esta hipótese ao analisarem, por exemplo, o comportamento de *P. aeruginosa* isoladas de lagoas de estabilização (VASCONCELOS; LIMA; CALAZANS, 2010), hospitais (KERR; SNELLING, 2009) e solos contaminados por hidrocarbonetos (MITTAL; SINGH, 2009). Ainda que exista disponibilidade de matéria orgânica nesses locais, a pressão seletiva exercida sobre a bactéria, força a exibir estratégias que possam garantir sua persistência (DENG, 2012), sendo a piocianina um elemento importante na regulação dessas respostas (SAMROT et al. 2016).

A produção *in vitro* de piocianina ocorre a partir de 48h após o início do crescimento, quando condições ótimas de temperatura e agitação são alcançadas, cerca de 29°C e 150 rpm (AGRAWAL; CHAUHAN, 2016). Além disso, o meio de cultura também influencia nesse resultado. Ao ser testada em caldo e ágar nutriente suplementado com glicose (GSNB), observou-se a difusão do pigmento após 96 h de incubação a 37°C (EL-FOULY, 2015). Geralmente, essa produção começa no início da fase estacionária, um evento dependente do tempo de geração das colônias, sob condições controladas, tendem a ter um período de formação que varia de 3 a 6 horas (TAMAGNINI; GONZALES, 1997), o que justifica a aparência da cor azul entre 48 e 72 horas após o início da incubação.

Dados sobre a produção e quantificação de piocianina obtidos de *P. aeruginosa* são raros. A maioria deles estima a concentração de pigmento no contexto de determinado bioprocessos com resultados variando entre 9 e 42  $\mu\text{g/mL}$  (BARAKAT et al., 2014; EL-FOULY, 2015). A literatura relata que em um ambiente aquoso sob condições específicas de incubação, que incluem o uso do meio King A original ou com formulação modificada, a piocianina é sintetizada durante o final da fase logarítmica e o início da fase estacionária, podendo atingir até 80  $\mu\text{g/mL}$ . Vale ressaltar que a fonte primária de carbono e nitrogênio são

fatores fundamentais (EL-SHOUNY; AL-BAIDANI; HAMZA, 2011; HASSANI et al., 2014), embora a presença de glicerol seja uma condição essencial (HAYS et al., 1945).

Agrawal e Chauhan (2016) obtiveram aproximadamente 26 µg/mL de piocianina, após 72 h de incubação. Essa concentração foi alcançada quando a principal fonte de nitrogênio era a peptona (13 g/L), em pH neutro a 30°C. Outras fontes do elemento, como ureia, nitrato de potássio e nitrato de sódio, promoveram rendimentos mais baixos de piocianina, respectivamente, de 17, 15 e 11 µg/mL, nas mesmas condições de incubação. Por outro lado, Gharieb et al. (2013) relataram a produção de aproximadamente 65 µg/mL de piocianina em 120 horas em um meio contendo 1% de peptona. A maior produção, representando um aumento de 55% na concentração do pigmento, ocorreu entre 72 e 120 horas de incubação. Neste contexto, pode-se inferir que as linhagens TGC02 e TGC04 poderiam produzir mais piocianina se o tempo de incubação for aumentado.

Comparado com os valores de piocianina alcançados por outras linhagens de *P. aeruginosa* cultivadas em meio contendo peptona a 1% (DAS; DAS, 2015; AGRAWAL; CHAUHAN, 2016), os resultados obtidos com TGC02 e TGC04 foram mais promissores, pois na presença do malte de cevada, 0,5 e 1%, respectivamente, ambas as linhagens exibiram maiores concentrações de pigmento.

A diferença foi ainda mais significativa quando o dobro da concentração de substrato não convencional foi aplicado. Comparado ao estudo de Devenath et al. (2017), descobriu-se que mesmo usando a menor concentração do malte de cevada, alcançou-se mais que o dobro da quantidade de piocianina obtida pelos autores que foi de 9,45 µg/mL. Contudo, o substrato não favoreceu ou estimulou a síntese de piocianina pelos isolados TGC03 e RX10, podendo servir como indicativo de que estes isolados não apresentam os genes responsáveis pela a conversão das fenazinas intermediárias em piocianina (DIETRICH et al., 2006; HUANG et al., 2009).

Em contrapartida, os isolados TGC02 e TGC04 em um estudo anterior produziram, respectivamente, 38 e 17% mais piocianina no caldo King A (VIANA et al., 2018). Vale esclarecer que 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.

A suplementação do meio com resíduo de cervejaria artesanal serviu como incremento da produção de piocianina, revelando que resíduos geralmente destinados ao descarte ou queima podem ser reaproveitados, trazendo impactos positivos, como a redução de custos,

bem como na ressignificação de resíduos da indústria cervejeira artesanal. O processamento de alguns grãos e cereais nestes estabelecimentos gera certa quantidade de resíduo, podendo gerar impactos ambientais em função do seu descarte. Este trabalho permite dar uma aplicabilidade a este coproduto no papel de fonte de carbono, como já foi descrito em outros trabalhos, visado à obtenção de pigmentos microbianos (BRAND, 2000; DIAS, 2016).

Na caracterização molecular da piocianina produzida neste estudo, há um intenso íon molecular em 210 m/z . Ainda que o espectro tenha sofrido influência de ruídos provenientes de impurezas, refletiu um valor de Massa Molecular (MM) de 210,89 m/z, semelhante ao da piocianina, 210,23 m/z (KARPAGAM et al., 2013), indicativo de obtenção do pigmento com um grau de pureza importante, nas condições aplicadas neste estudo.

A piocianina é classificada como ácido fraco de  $pK_a = 4,6$  e o fato da ionização negativa decorrente da metodologia confirmar sua presença apenas nessa faixa de ionização, conforme observado por Hall et al. (2016). Essas análises permitiram certificar a prevalência do pigmento como o composto majoritário após os processos de extração, purificação e quantificação.

Nos ensaios *in vitro*, a piocianina apresentou atividade alta frente *S. aureus* UFPEDA 02 e *E. coli* UFPEDA 224, corroborando com o que a literatura indica desde os primeiros estudos de ação antibiótica de compostos microbianos (WAKSMAN; WOODRUFF, 1940). A piocianina é um metabólito eletroquimicamente ativo, envolvido em uma variedade de atividades biológicas, tais como sinalização celular, expressão gênica, adaptação e respiração de células bacterianas, formação de biofilme, no seu notável reconhecimento como agente antibacteriano e antifúngico (JAYASEELAN; RAMASWAMY; DHARMARAJ, 2013; BAHARI et al., 2017; ABISADO et al., 2019).

A atividade sobre *S. aureus* UFPEDA 02, pode ser explicada pelos achados de Voggu et al. (2006). Os autores relataram que a inibição do crescimento de *S. aureus* por *P. aeruginosa*, ocorreu pelo bloqueio da cadeia respiratória da primeira. Entretanto, durante a inibição, outras substâncias além de fenazinas podem estar envolvidas no evento (MACHAN et al., 1991).

A ação da piocianina foi mais bem observada frente *E. coli* UFPEDA 224. A ação sobre a bactéria exposta à piocianina ocorre por conta da depleção do suprimento de oxigênio para às células, seguida da geração de peróxidos e o desvio do fluxo de elétrons, resultando um efeito citotóxico significativo (HASSAN; FRIDORICH, 1980; ANDRADE et al., 2016).

Ressalta-se que a linhagem leveduriforme não apresentou susceptibilidade. Embora a literatura reporte a propriedade biocida da piocianina contra *Candida* spp, relacionada também com alterações na cadeia transportadora de elétrons em condições *in vitro* e *in vivo* (SUDHAKAR et al., 2013), entretanto os resultados nos testes de atividade da piocianina poderiam ser explicados pela multirresistência da linhagem testada *C. tropicalis* 13803.

Em complemento, a premissa de que a ação biocida/bioestática da piocianina é concentração-dependente foi cunhada no início dos anos 1980 (BARON et al., 1981). Dessa forma supõe-se que sob concentrações superiores às utilizadas neste estudo, o resultado poderia ter sido diferente. Vale salientar que Pal e Revathi (1998), descobriram que a ação do pigmento é variável de acordo com a espécie e algumas, dentre elas *C. tropicalis* foram resistentes a diferentes metabólitos produzidos por *Pseudomonas* sp.

Nos testes de adesão celular, houve desenvolvimento do biofilme por ambas as bactérias testadas. Sabe-se que a adesão das células a uma superfície é perturbada na presença de piocianina (BANNING et al., 2003; LIN et al., 2010). Contudo, para *S. aureus* UFPEDA 02, a adesão ocorrida na presença do pigmento pode ser justificada pelo fato da piocianina representar um importante fator estressante. Nestes casos, alguns fenótipos de *S. aureus* são selecionados, especialmente células que exibem defeitos na cadeia transportadora de elétrons. Sendo assim, *S. aureus* pode coexistir com *P. aeruginosa*, na presença do pigmento (HOFFMAN et al., 2006; NOTO et al., 2017; SAGAR e KAISTHA, 2019).

Além disso, a construção do biofilme mostra-se essencial para a persistência uma vez que a concentração 2xCIM de piocianina por si só, já representa uma significativa pressão seletiva (COSTA et al., 2014). Segundo Millezi et al. (2012), o processo de adesão de *S. aureus* é rápido, ocorrendo em menos de três horas especialmente em condições favoráveis de temperatura, pH, espaço vital e disponibilidade nutricional. Os resultados obtidos neste estudo revelam um aumento de 43% na adesão, observado também, porém não nessa magnitude nos estudos de Balasubramanian et al. (2010) e Khare e Arora (2011). Em relação à linhagem *E. coli* UFPEDA 224, este aumento foi de aproximadamente 20%.

Na etapa inicial da formação do biofilme fatores como a concentração de eletrólitos como KCl e NaCl, assim como o pH do meio são importantes. A força iônica e o pH interferem tanto nas características da superfície bacteriana quanto do material (hidrofobicidade – carga), o que modifica as interações da primeira etapa (BUNT et al., 1995; MCWHIRTER; MCQUILLAN; BREMER, 2002).

No teste de avaliação da hidrofobicidade, ambas as linhagens-teste apresentaram esta propriedade bastante pronunciada, como descrita na literatura para as espécies

(KATSIKOIANNI; MISSIRLIS, 2004). Micro-organismos com características hidrofóbicas da membrana aderem-se melhor a substratos com propriedades hidrofóbicas e o mesmo ocorre para aqueles com propriedades hidrofílicas. Além disso, superfícies hidrofóbicas parecem ser mais susceptíveis à colonização, o que permite inferir o maior grau de hidrofobicidade nos cupons dolomita do que no de vidro. Na superfície bacteriana, a carga elétrica apresenta variações quanto à espécie estudada, as condições do meio e com a composição da membrana. Geralmente, células planctônicas tendem a ter sua superfície carregada negativamente em meio aquoso. O perfil de carga influencia na adesão reversível, embora a ação das correntes elétricas seja gradualmente reduzida durante a formação do biofilme (POORTINGA et al., 2001).

Boari et al. (2009) afirmam que no processo de adesão bacteriana, quanto mais hidrofóbica for a célula, maior será a habilidade de aderência ao substrato condicionante. Alguns fatores de virulência podem garantir os diferentes níveis de hidrofobicidade entre as espécies, tais como flagelos, *pili*, fímbrias, membrana externa e a presença de alguns grupos funcionais polares: hidroxilas, fosfatos, carboxilas e ácido teicóico.

A composição química e característica da superfície são as duas propriedades dos substratos condicionantes que mais influenciam na capacidade de interação do micro-organismo (GOTTENBOS; VAN DER MEI; BUSSCHER, 2000; SPERANZA et al., 2004). Dos dois cupons testados, a dolomita foi a superfície com maior adesão celular para *S. aureus* UFPEDA 02 e *E. coli* UFPEDA 224. No mundo microbiano ocorre uma maior propensão de adesão às superfícies porosas, quando comparadas a superfícies polidas (CHANG; MERRITT, 1994; SCHEUERMAN; CAMPER; HAMILTON, 1998; BOS et al., 2000). Essa preferência deve-se a melhor adaptação da bactéria ao microambiente com dimensões semelhantes ao seu tamanho, bem como pelo aumento da área de contato presente neste tipo de superfície (SCHIERHOLZ; BEUTH; PULVERER, 2000).

Este trabalho ressaltou a versatilidade metabólica da *P. aeruginosa*, assim como do fato da piocianina assegurar vantagens quando organismos possivelmente competidores estão presentes. Pesquisas posteriores tentarão elucidar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos, de forma a mensurar o limite que garanta o equilíbrio das populações destas bactérias, quando em coexistência em meio aquoso.

## 7 CONCLUSÕES

A suplementação com resíduo de malte de cevada ao meio tradicional de obtenção de *P. aeruginosa* promoveu um aumento significativo da concentração de pigmento nos isolados PYO<sup>+</sup> testados.

A caracterização molecular exibiu a prevalência da piocianina na amostra produzida.

O efeito inibitório da piocianina sobre as duas linhagens clínicas bacterianas foi observado e classificado como alto, com exceção da levedura. Contudo, na formação de biofilme em cristal violeta a piocianina não interferiu na adesão das células, que foi aumentada, além de ocorrer preferência de adesão ao cupom de dolomita. Em complemento, as linhagens testadas apresentaram um elevado grau de hidrofobicidade.

Estudos posteriores são necessários a fim de elucidar os mecanismos moleculares envolvidos entre a piocianina e a influência na formação de biofilmes bacterianos.

## REFERÊNCIAS

- ABDUL-HUSSEIN, Z.R., ATIA, S.S. Antimicrobial effect of pyocyanin extracted from *Pseudomonas aeruginosa*. **European Journal of Experimental Biology**, v. 6, n.1, p. 1-4, 2016.
- ABISADO, R.G.; BENOMAR, S.; KLAUS, J.R.; DANDEKAR, A.A.; CHANDLER, J.R.; Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. **mBio**, v.9, n.3, 2018. e02331-17. DOI: 10.1128/mBio.02331-17
- AGRAWAL, A.H.; CHAUHAN, P.B. Effect of cultivation media components on pyocyanin production and its application in antimicrobial property. **International Journal of Current Advances Research**, v.5, n. 4, p. 829-833. 2016.
- AISLABIE, J.; SAUL, D.J.; FOGHT, J.M.; Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. **Extremophiles**, v. 10, n. 3, p. 171-179, 2006.
- ALMSHAWIT, H.; MACREADIE, I.; FRANDO, D. A simple and inexpensive device for biofilm analysis. **J Microbiol Methods**. v. 98, n. 1, p. 59-63, 2014
- ANDRADE, J.P.; DE MACEDO FARIAS, L.; FERREIRA, J.F.; BRUNA-ROMERO, O.; DA GLÓRIA DE SOUZA, D.; DE CAVALHO, M.A.; DOS SANTOS, KV. Subinhibitory concentration of piperacillin-tazobactam may be related to virulence properties of filamentous *Escherichia coli*. **Curr Microbiol**. v. 72, n. 1, p. 19-28, 2016.
- APHA, AWWA, WEF – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, WATER ENVIRONMENT FEDERATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd. ed. Baltimore: APHA, AWWA, WEF, 2012.
- AZEVEDO, N.F.; CERCA, N.M. Biofilmes - Na saúde, no ambiente, na indústria. 2012. Disponível em: < <https://hdl.handle.net/10216/104886>>
- BAHARI, S.; ZEIGHAMI, H.; MIRSHAHABI, H.; ROUDASHTI, S.; HAGHI, F. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quórum sensing by subinhibitory concentrations of curcumin with gentamicin and azithromycin. **J Global Antimicrob Resist**. v. 10, n. 1, p. 21-28, 2017.
- BALASUBRAMANIAN, D.; SCHNEPER, L.; MERIGHI, M.; SMITH, R.; NARASIMHAN, G.; LORY, S.; MATHEE, K. The regulatory repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC  $\beta$ -lactamase regulator AmpR includes virulence genes. **PLoS ONE**. v. 7, n. 3, doi:10.1371/journal.pone.0034067, 2012.

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**. v. 149, n. 1, p. 47-55, 2003.

BARAKAT, R.; GOUBET, I.; MANON, S.; BERGES, T.; ROSENFELD, R. Unsuspected pyocyanin effect in yeast under anaerobiosis. **Microbiology Open**, v.3, n.1, p.1-4, 2014.

BARBOSA, D.B.; LAGE, M.M.; BADARÓ, A.C.L. Qualidade microbiológica da água dos bebedouros de um *Campus* universitário de Ipatinga, Minas Gerais. **NUTRIR GERAIS – Ver. Dig. Nutri.**, Ipatinga, v. 3. n. 5. p. 505-517, 2009.

BARON S.S.; TERRANOVA G.; ROWE J.J.; Molecular mechanism of the antimicrobial action of pyocyanin. **Curr Microbiol**. v. 18, p. 223–230, 1989.

BELLIN, D.L.; SAKHTAH, H.; ROSENSTEIN, J.K.; LEVINE, P.M.; THIMOT, J.; EMMETS, K.; Integrated circuit-based electrochemical sensor for spatially resolved detection of redox-active metabolites in biofilms. **Nature Communications**, DOI: 10.1038/ncomms4256. 2014.

BENNING, 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. **Microbiol**. v. 149, n. 1, p. 47-55, 2003.

BERDY, J. Bioactive microbial metabolites. **The Journal of antibiotics**, v. 58, n. 1, p. 1, 2005.

BERNE, C.; DUCRET, A.; HARDY, G.G.; BRUN, V.Y. Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by gram-negative bacteria. **Mechanisms**, v.81, p. 340–53. 2015.doi:10.1111/j.1365- 2958.2011.07616.x..

BOARI, C. A.; ALVES, M. P.; TEBALDI, V. M. R.; SAVIAN, T. V.; PICCOLI, R.H. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 29, n. 4, p. 886-895, 2009.

BOS, R.; VAN DER MEI, H. C.; GOLD, J.; BUSSCHER, H. J. Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. **FEMS microbiology letters**, v. 189, n. 2, p. 311-315, 2000.

BOSIRE E.M.; ROSENBAUM, M.; Electrochemical potential influences phenazine production, electron transfer and consequently electric current generation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiol**, v. 8: p.1-11. 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00892

- BRAND, D.; PANDEY, A.; ROUSSOS, S.; SOCCOL, C. R.; Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. **Enzyme and microbial technology**, v. 27, n. 1-2, p. 127-133, 2000.
- BUNT, C.R.; JONES, D.S.; TUCKER, I.G.; The effects of pH, ionic strength and polyvalent ions on the cell surface hydrophobicity of *Escherichia coli* evaluated by the BATH and HIC methods. **Intern J Pharm.**; v.113, p. 257-61,1995
- BUSSCHER, H.J.; VAN DER MEI, H.C.; Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. **Adv Dent Res**, v.11, n.1, p.24-32, 1997.
- 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, C. C.; MERRITT, K. Infection at the site of implanted materials with and without preadhered bacteria. **Journal of orthopaedic research**, v. 12, n. 4, p. 526-531, 1994.
- CORRÊA, P.; BRITO, J.; AMORIM, H.; FREITAS, B.; RUFINO, R.; LUNA, J.; SARUBBO, L. Utilização de um delineamento composto central rotacional (dccb) para a produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa*. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 2847-2854, 2015.
- COSTA, J. C. M.; ESPESCHIT, I. D. F.; PIERI, F. A.; BENJAMIN, L. A.; MOREIRA, M. A.S.; Increase in biofilm formation by *Escherichia coli* under conditions that mimic the mastitic mammary gland. **Ciência Rural**, v. 44, n. 4, p. 666-671, 2014.
- COSTERTON, W. J.; WILSON, M. Introducing biofilms. **Biofilms**. v. 1, n. 1, p. 1-4, 2004
- COSTERTON, J. W.; GEESEY, G.G.; CHENG, K. J.; How bacteria stick. **Sci Am**, v. 238, n. 1, p. 86-95, 1978.
- CURTISS, R. 1984 Kreshover lecture. Genetic analysis of *Streptococcus mutans* virulence and prospects for an anticaries vaccine. **J Dent Res**, v.65, n.8, p. 1034-45, 1986.
- DAS, P.; MA, L.Z.; Pyocyanin pigment assisting biosurfactant-mediated hydrocarbon emulsification. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.85, p. 278-283. 2013.
- DAS, S.; DAS, P.; Effects of cultivation media components on biosurfactant and pigment production from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.32, n.2, p.317-324, 2015.
- DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G.A.; Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.64, p.847-867, 2000.

DE ARAUJO KRONEMBERGER, F. Produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas. 2007. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **J Antibiot.** (Tokyo), v. 62, n. 1, p. 5-16, Jan 2009

DENG, H. A review of diversity-stability relationship of soil microbial community: What do we not know? **Journal of Environmental Science**, v. 24, n.6, p. 1027-1035, 2012.

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. **International Research Journal of Biological Sciences**, v.6, n.5, p.1-7, 2017.

DIAS, M. Aproveitamento de resíduos do processamento de café para produção de carotenoides por leveduras e bactérias. 2015. Disponível em: <<http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/8444>>. Acesso em 11 de agosto de 2019.

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*. **Molecular Microbiology**, v.61, n.5, p. 1308-1321, 2006.

DIETRICH, L.E.P.; OKEGBE, C.; PRICE-WHELAN, A.; SAKHTAH, H.; HUNTER, R.C.; NEWMAN, D.K. Bacterial community morphogenesis is intimately linked to the intracellular redox state. **J Bacteriol**, v.195, p. 1371-1380, 2013.

DOHI, M.; MOUGI, A. A coexistence theory in microbial communities. **Royal Society open science**, v. 5, n. 9, p. 180476, 2018.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev.** V.15, n.2, p. 167-193, 2002.

DUNNE, W.M.; Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? **Royal Society open science**, v. 15, p.155–66. 2002. Doi:10.1128/CMR.15.2.155.

EL-FOULY, M.Z.; SHARAF, A.M.; SAHIM, A.A.M.; AND EL-BIALY, H. A. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Radiation Research and Applied Science**, 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. **International Journal of Pharmacy and Medical Science**, v.1, n.1, p.1-7, 2011.

- ELOY, J.O.; OLIVEIRA, E.C.V.; MOROTTA-OLIVEIRA, S.S.; SARAIVA, J.; MARCHETTI, J.M. Desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE para quantificação de ácido ursólico em dispersões sólidas. **Química Nova**, v.35, n.5, 2012.
- 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. **Indian Journal of Biotechnology**, v.7, n.5, p.184-193, 2013.
- GIBBONS, R.J. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious disease. **J Dent Res**. v.68, n.5, p.750-60, 1989
- GRISTINA, A.G. Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. **Science**, v. 237, n. 4822, p. 1588-1595, 1987.
- GOTTENBOS, B.; VAN DER MEI, H.C.; BUSSCHER, H.J. Initial adhesion and surface growth of *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* on biomedical polymers. **Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 50, n. 2, p. 208-214, 2000.
- HADACEK, F.; GREGER, H.; Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis: An Int J Plant Chem and Biochem Tech**, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000.
- Haidar, G., PHILIPS, N. J., SHIELDS, R. K., SNYDER, D., CHENG, S., POTOSKI, B. A., ... NGUYEN, M. H. Ceftolozane-tazobactam for the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: clinical effectiveness and evolution of resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 1, p. 110-120, 2017.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature reviews microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95, 2004.
- HALL, S.; MCDERMOTT, C.; ANOOPKUMAR-DUKIE, S.; MCFARLAND, A.; FORBES, A.; PERKINS, A.; ... GRANT, G. Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. **Toxins**, v. 8, n. 8, p. 236, 2016.
- HASSANI, H. H.; HASAN, H. M.; AL-SAADY, 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
- 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.; CARROLL, C.J.; JONES, L.R.;

WADE, N.J. Antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.159,n.3, p. 725-750, 1945.

HIBBING, M.E.; FUQUA, C., PARSEK, M. R., PETERSON, S. B. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. **Nature reviews microbiology**, v. 8, n. 1, p. 15, 2010.

HOFFMAN, L.R.E.; DEZIEL, D.A.; D'ARGENIO, F.; LEPINE, J.; EMERSON, S.; MCNAMARA, R.L.; GIBSON, B.W.; RAMSEY; AND MILLER, S.I.; Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** .v. 103, n. 52, p. 19890-19895, 2006.

HOIBY, N. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. **Apmis**, v. 125, n. 4, p. 272-275, 2017.

HUYNH, T.T.; MCDOUGALD, D.; KLEBENSBERGER, J.; AL QARNI, B.; BARRAUD, N., RICE, S.A.; ... SCHLEHECK, D. Glucose starvation-induced dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is cAMP and energy dependent. **PLoS One Journal Information**, v. 7, n. 8, p. 1-14, 2012.

JAYASEELAN, S.; RAMASWAMY, D.; DHARMARAJ, S. Pyocyanin: production, applications, challenges and new insights. **World J Microbiol Biotechnol.** v. 30, p. 11591168, 2014.

KARPAGAM, S., SUDHAKAR, T.H.U.K.K.A.R.A.M., LAKSHMIPATHY, M.U.T.H.U.K.R.I.S.H.N.A.N. Microbicidal response of pyocyanin produced by *P. aeruginosa* toward clinical isolates of fungi. **Int J Pharm Pharm Sci**, v. 5, n. 3, p. 870-873, 2013.

KATSIKOIANNI, M., MISSIRLIS, Y. F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. **Eur Cell Mater**, v. 8, n. 3, p. 37-57, 2004.

KERR, K.G.; SNELLING, A.M.; *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. **Journal of Hospital Infection**, v.73, n.4. p. 338-344, 2009.

KERR, J.R.; TAYLOR, G.W.; RUTMAN, A.; HOIBY, N.; COLE, P.J.; WILSON, R.; *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. **Journal of Clinical Pathology**, v.52, n.5. p 385–387, 1999.

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**, v.57, n.9, p. 708-713, 2011.

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. 30-307, 1954.

KIPNIS, E.; SAWA T.; WIENER- KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Medical Malpractice Infection Journal**, v.36. p.78-91, 2006.

KLOSS, W.E.; SCHLEIR, K.H.; GOIRTZ, F.; BALOWS, A.; TRUPER H.G.; DWOEKIN, M. Eds The genus *Staphylococcus*. IN: **The Prokaryotes**, 2nd Ed. New York, Springer-Verlag; 1992.

KURODA, M.; OHTA, T.; UCHIYAMA, I.; BABA, T.; Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **LANCET.**; v. 357, p. 1225-1240, 2001.

LEONEL, L.V.; DO NASCIMENTO, E.G.; BERTOZZI, J.; BÔAS, L.A.V.; BÔAS, G.T.V. Biorremediação do solo. **Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa**, v. 26, n. 51, p. 37-52, 2018.

LIN, D.; ZHOU, Q.; XIE, X.; LIU, Y. Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan and emerging pollutant on earthworms (*Eisenia foetida*). **Chemosphere.** v. 81, n. 10, p. 1328-1333, 2010.

LOPES, S. P.; MACHADO, I. M.; PEREIRA, M. O. Role of planktonic and sessile extracellular metabolic by production *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* intra and interspecies relationships. **J. Ind. Microbiology. Biotechnol.** v.38, n.10, p.133-140, 2011. Doi:10.1007/s10295-010-0838-y. PMID:20811926.

LOPES, F.C; TICHOTA, D.M; PEREIRA, J.Q; SEGALIN, J.; RIOS, A.O; BRANDELLI, A. Pigment Production by Filamentous Fungi on Agro-Industrial Byproducts: an Eco-Friendly Alternative. **Appl Biochem Biotechnol.**, v.171, p. 616–625, 2013.

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**, v.34, n.4, p 213-217, 1991.

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. **Ciência Tec Alim.**, v. 29, p. 114-119, 2009.

MAPARI, S. A. S.; NIELSEN, K. F.; LARSSSEN, T. O.; FRISVAD, J. C.; MEYER, A. S.; THRANE, U. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potencial natural food colorants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, p. 231-238, 2005.

MARCUSSO, E. F.; MULLER, C. V.; A CERVEJA NO BRASIL: O ministério da agricultura informando e esclarecendo. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pastapublicacoes-DIPOV/a-cerveja-no-brasil-28-08.pdf>>. Acesso em: 02 de agosto de 2018.

MARTINS, V.V.; MACARENO, A.C.; GRADELLA, D.G.; STEHLING, E.G. Antagonism between clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* against coliforms. **Water Science and Technology: Water Supply**, v.14, n.1. p: 99-106, 2014.

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, p. 6454-6465, 2001.

MCWHIRTER, M.J.; MCQUILLAN, A.J.; BREMER, P.J. Influence of ionic strength and pH on the first 60 min of *Pseudomonas aeruginosa* attachment to ZeSe and to TiO<sub>2</sub> monitored by ATR-IR spectroscopy. **Col Surf B: Biointerf.**; v.84, p.17-25, 2002

MEYER, V. Genetic engineering of filamentous fungi – Progress, obstacles and future trends. **Biotechnology Advances**, v. 26, p.177-85, 2008.

MILLEZI, F.M.; PEREIRA, M.O.; BATISTA N.N.; CAMARGOS, N.; AUAD, I.; CARDOSO, M.D.G.; PICCOLI, R.H.; Susceptibility of monospecies and dual species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to essential oils. **J. Food Safety**, v.32, p. 351-359, 2012.

MITTAL, A.; SINGH, P.; Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from contaminated with crude oil spills. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.47, n. 9, p. 760-765, 2009.

MOELLER, R.; HORNECK, G.; FACIUS, R.; STACKEBRANDT, E.; Role of pigmentation in protecting *Bacillus* sp. endospores against environmental UV radiation. **FEMS Microbiology and Ecology**, v. 51,n. 2, p.231-236, 2005

MOLINA-SANTIAGO, C.; UDAONDO, Z.; CORDERO, B. F.; RAMOS, J. L. Interspecies cross-talk between co-cultured *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. **Env Microbiol Rep.** v.9, n.4, p. 441–448, 2017.

MONDS, R.D.; O'TOOLE, G.A.; The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. **Trends Microbiol.**, v.17, p.73–87, 2009.  
Doi:10.1016/j.tim.2008.11.001.

MORADALI, M.F.; GHODS, S.; REHM, B.H.A.; *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.7, p.1-29. 2017. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00039.

MOURA, M.E.B.; CAMPELO, S.M.A.; DE BRITO, F.C.P.; BATISTA, O.M.A.; DE ARAÚJO, T.M.E.; DA SILVA OLIVEIRA, A.D.; Infecção hospitalar: estudo de prevalência em um hospital público de ensino. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 60, n. 4, p. 416-421, 2007.

MURRAY, M. G.; BAIRD, D. R. Resource-ratio theory applied to large herbivores. **Ecology**, v. 89, n. 5, p. 1445-1456, 2008.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.81, p. 268-274, 2006.

NASSAR, U.; MEYER, A.E.; OGLE, R.E.; BAIER, R.E. The effect of restorative and prosthetic materials on dental plaque. **Periodontolo 2000**, v.8, p.14-24, 1995.

NICKEL, J.C.; RUSESKA, I.; WRIGHT, J.B.; COSTERTON, J.W. Tobramycin resistance of cells of *Pseudomonas aeruginosa* growing as a biofilm on urinary catheter material. **Antimicrob Agents Chemother**; v. 27,p.619–24. 1985

NOTO, M.J.; BURNS, W.J.; BEAVERS, W.N.; SKAAR, E.P.; Mechanisms of pyocyanin toxicity and genetic determinants of resistance in *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol.** v. 199, n. 17, p. e00221-17, 2017

NOWICKA, B.; KRUK, J. Powered by light: phototrophy and photosynthesis in prokariotes and its evolution. **Microbiological Research**, 186-187: 99-118. DOI: 10.1016/j.micres.2016.04.001. 2016.

ODUM, E. P. **Fundamentos de Ecologia. 6ª ed. São Paulo:** Fundação Calouste Gulbenkian. n. 820, p. 338-342. 2004.

O'MALLEY, Y.Q.; ABDALLA, M.Y.; McCORMICK, M.L.; RESZKA, K.J.; DENNING, G. M.; BRITIGAN, B.E. Subcellular localization of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin cytotoxicity in human lung epithelial cells. **Am J Physiol Lung Cell Molec Physiol.** v. 284, n. 2, p. L-420-L430, 2003.

PAL, R.B.; REVATHI, R. Susceptibility of yeasts to *Pseudomonas aeruginosa*. **Indian J Med Microbiol**, v.16, n.2, p. 72, 1998.

PAZ-ZARZA, V.M.; MANGWANI-MORDANI, S.; MARTÍNEZ-MALDONADO, A.; ÁLVAREZ-HERNÁNDEZ, D.; SOLANO-GÁLVEZ, S.G.; VÁZQUEZ-LÓPEZ, R.

*Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. **Revista chilena de infectología**, v. 36, n. 2, p. 180-189, 2019.

PATTI, J.M.; ALLEN, B.L.; MCGAVIN, M.J.; MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. **Annu Rev Microbiol.**, v.48, p. 585-617, 1994.

PEREIRA, A. R. B.; DE FREITAS, D. A. F.; Uso de micro-organismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 6, n. 6, p. 995-1006, 2012.

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.** v. 7, p. 969980, 2005.

QUIRYNEN, M.; BOLLEN, C.M. The influence of surface roughness and surface-free energy on supra- and subgingival plaque formation in man. **J Clin Periodontol**, v.22, n.1, p.1-14. 1995.

ROCHE, F.M.; MASSEY, R.; PEACOCK, S.J. Characterization of novel LPXTG-containing proteins of *Staphylococcus aureus* identified from genome sequences. **Microbiology**, v. 149, p. 643-654, 2003.

RONDON, M. R., AUGUST, P. R., BETTERMANN, A. D., BRADY, S. F., GROSSMAN, T. H., LILES, M. R., ... TIONG, C. L. Cloning the Soil Metagenome: a Strategy for Accessing the Genetic and Functional Diversity of Uncultured Microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2541-2547, 2000.

SAGAR, S.; KAISTHA, S. D. Small Colony Variant Selection, Biofilm Induction, and Interspecies Interactions of Ocular Clinical *Pseudomonas aeruginosa*. **Advances in Plant & Microbial Biotechnology**. Springer, Singapore, p. 101-113, 2019.

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.. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v.9, p. 1-7. 2019. DOI:10.1080/08923973.2018.15558452019.

SALLES, R.K.D.; GOULART, R. Diagnóstico das condições higiênico-sanitárias e microbiológicas de lactários hospitalares. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, p. 131-139, 1997.

SAMROT, A.V.; AZEEMULLAH, A.; SUJHITA, R.; AZHARUDEEN, S.; SAMANVITHA, S.; SNEHA, S. Characterization of Acyl Homoserine Lactone of pigment producing *Pseudomonas aeruginosa* SU-3. **Der Pharma Chemical**, v. 8, n. 9, p.74-79, 2016.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v.35, n.4, p. 275-280, 2004.

SATPATHY, S.; SEN, S.K.; PATTANAIK, S.; RAUT, S. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 7, p. 56-66, 2016.

SHARMA, G.; SHARMA, S.; SHARMA, P.; CHANDOLA, D.; DANG, S.; GUPTA, S.; GABRANI, R. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. **J Applied Microbiol.** ISSN 1364-5072., 2016.

SCHEUERMAN, T.R.; CAMPER, A.K.; HAMILTON, M.A.; Effects of substratum topography on bacterial adhesion. **Journal of colloid and interface science**, v. 208, n. 1, p. 23-33, 1998.

SCHIERHOLZ, J.M.; BEUTH, J.; PULVERER, G. Evidence for a self-fulfilling hypothesis: chlorhexidine dressing for reduction of microbial colonization of the skin with central venous catheters. **J Hosp Infect.** 2000; 44: 241-2.

SCHWEDER, T.; LINDEQUIST, U.; LALK, M. Screening for new metabolites from marine microorganism, **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 96, p. 1-48, 2005.

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 Pulmonary Med.** v. 10, p. 1-10, 2010.

SMEDSGAARD, J.; FRISVAD, J.C. *Terverticillate penicillia* studied by direct electrospray mass spectrometric profiling of crude extracts: I. Chemosystematics. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, p. 5-17, 1996.

SMEDSGAARD, J.; FRISVAD, J.C.; Using electrospray mass spectrometry in taxonomic and secondary metabolite profiling of crude fungal extracts, **Journal of Microbiological Methods**, v. 25, p. 5-17, 1997.

SPERANZA, G.; GOTTARDI, G.; PEDERZOLLI, C.; LUNELLI, L.; CANTERI, R.; PASQUARDINI, L.; CARLI, E.; LIU, A.; MANIGLIO, D.; BRUGNARA, M.; ANDERLE, M. Role of chemical interaction in bacterial adhesion to polymer surfaces. **Biomaterials**, v.25, n.11, p. 2029-37, 2004.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205-218, 2003.

STANIER, R.Y.; PALLERONI, N.J.; DOUDOROFF, M. The aerobic *pseudomonads* a taxonomic study. **J. Gen. Microbiol.** , v.43, n.2, p. 159-271,1966. DOI: 10.1099 / 00221287-43-2-159.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilm as complex differentiated communities. **Annu Rev Microbiol.** V.56, p.187-209, 2002.

SUMNER, L.W.; HUHMAN, D.V.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; LEI,Z. Methods, applications and concepts of metabolite profiling: Secondary metabolismo, **Plant Systems Biology**, p. 195-212, 2007.

SUDHAKAR, T.; KARPAGAM, S.; SHIYAMA, S. Antifungal efficacy of pyocyanin produced from bioindicators of nosocomial hazards. **Int J Chem Tech.** v. 5, p. 1101–1106, 2013.

TAMAGNINI, L.M.; GONZALES, R.D. Bacteriological stability and growth kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water. **Journal of Applied Microbiology**,v. 83,n. 1, p.91-94,1997.

THAKUR, S. *Escherichia coli*. College Park (MD): **University of Maryland Department of Nutrition and Food Science.** 12 p., 2007.

TEIXEIRA, M; MARTINS, M; SILVA, J; KIRSCH, L; FERNANDES, O; CARNEIRO, A; CONTI, R; DURÁN, N. Amazonian biodiversity: pigments from *Aspergillus* and *Penicillium* characterizations, antibacterial activities and their toxicities. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 6, n. 3, p. 300-311, 2011.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Rev. Liberato**, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, jul./dez. 2014.

TOOLE, G.O.; KAPLAN, H.B.; KOLTER, R. Biofilm Formation as Microbial Development. **Annu Rev Microbiol**, v.54, p.49–79, 2000.

TYFA, A.; KUNICKA-STYCZYŃSKA, A.; ZABIELSKA, J.; Evaluation of hydrophobicity and quantitative analysis of biofilm formation by *Alicyclobacillus sp.* **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, n. 4, 2015.

VAN OSS, C.J.; Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions. **J Mol Recognit**, v.16, p.177–90. 2003. doi:10.1002/jmr.618.

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.

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. **International Journal of Engineering Research and Applications.** v. 7, n. 8, p. 23-30, 2017.

VIANA, A.; OLIVEIRA, B.; CAVALCANTI, T.; SOUSA, K.; MENDONÇA, E., AMARAL, I.; VASCONCELOS, U.; Correlation between pyocyanin production and hydrocarbonoclastic activity in nine strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Advance Engineering Research and Science**, v.5, n.7, p.212-223, 2018.

VOGGU, L. S.; SCHLAG, R.; BISWAS, R.; ROSENSTEIN, C.; RAUSCH, AND F. GO"TZ. Microevolution of cytochrome bd oxidase in staphylococci and its implication in resistance to respiratory toxins released by *Pseudomonas*. **J. Bacteriol.**, v. 188, n. 23, p. 8079-8086, 2006.

WAKSMAN, S.A.; WOODRUFF, H.B.; The soil as a source of microorganisms antagonistic to disease producing bacteria. **J Bacteriol** v. 40, p. 581–600, 1940

WHOOLEY, M.A.; MCLOUGHLIN, A.J.; The regulation of pyocyanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.15, n.1, p.161-166, 1988.

## APÊNDICE A – Cadastro dos isolados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen)



**Ministério do Meio Ambiente**  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO  
**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
**Cadastro nº AA1979F**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Numero do cadastro: AA1979F  
 Usuário: Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes  
 CPF/CNPJ: 445.546.802-15  
 Objeto do Acesso: Patrimônio Genético  
 Finalidade do Acesso: Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

#### Espécie

*Pseudomonas aeruginosa*

Título da Atividade: O microorganismo azul derivando de interações de *Pseudomonas aeruginosa* com o melo

#### Equipe

Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes	Universidade Federal da Paraíba
Tarciso Tarciso Corrêa Bastião	UFPB
Isabela Teixeira Moraes de Oliveira	UFPB
Vinícius Cavalcante Moraes	UFPB
Ray Kavilly Alves Arruda	UFPB
Marta Eduardo de Souza Maia	UFPB
Thiago Gonçalves Cavalcanti	UFPB

Data do Cadastro: 27/09/2018 11:40:36  
 Situação do Cadastro: Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em: 12:24 de 27/09/2018.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - SISGEN

## APÊNDICE B - PRODUÇÃO GERADA POR ESTA PESQUISA

- **Artigo publicado em periódico**

*IOSR Journal Of Pharmacy And Biological Sciences (IOSR-JPBS)*  
 e-ISSN:2278-3008, p-ISSN:2319-7676. Volume 14, Issue 1 Ser. IV (Jan – Feb 2019), PP 21-25  
[www.iosrjournals.Org](http://www.iosrjournals.Org)

### **Craft beer waste as substrate for pyocyanin synthesis**

Bianca Teixeira Morais de Oliveira<sup>1</sup>, Patrik Saul Zarpellon Barbosa<sup>1</sup>, Thiago Gonçalves Cavalcanti<sup>1</sup>, Ian Porto Gurgel do Amaral<sup>2</sup>, Ulrich Vasconcelos<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>(Laboratório de Microbiologia Ambiental/ Universidade Federal da Paraíba – Campus I, João Pessoa, Brazil  
<sup>2</sup>(Laboratório de Biotecnologia de Organismos Aquáticos/ UFPB, João Pessoa, Brazil  
 Corresponding author: Ulrich Vasconcelos

**Abstract:** Pyocyanin is a fluorescent phenazine pigment of a bright blue color, synthesized exclusively by about 95% of *Pseudomonas aeruginosa* strains. Laboratory acquisition of the pigment is achieved by employing simple protocols. The aim of this work was to increase the production of pyocyanin by adding different concentrations of craft beer waste (w/v) to King A broth, incubated by shaking at 150 rpm, at 29±1°C for 96 hours. Compared to the control group, a positive correlation was observed between the production of pyocyanin and the percentage of malt bagasse added. This contributed to the increase of pigment concentration up to approximately 70% over the control, with values ranging from 21 to 58 µg/ml. The craft beer waste proved to be an environmentally friendly option as an adjuvant in the process of pyocyanin production in a synthetic medium.

- **Trabalhos aprovados para apresentação (pôster)**

**OLIVEIRA, B.T.M.; DOURADO, T.M.H.; SILVA, A.C.L.; TRAVASSOS, R.A.; VASCONCELOS, U.;** Comparison Between The Action Of Pyocyanin On The Adhesion Of *Escherichia Coli* UFPEDA 224 And *Staphylococcus Aureus* UFPEDA 02" foi aceito para apresentação em pôster no 51º Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics.

**Abstract:** [SBFTE\\_0009\\_36917.docx](#)

**Title:** Comparison Between The Action Of Pyocyanin On The Adhesion Of *Escherichia Coli* UFPEDA 224 And *Staphylococcus Aureus* UFPEDA 02

**Activity:** SBFTE - Abstract Session

**Result:** **Approved**