



ISSN: 2230-9926

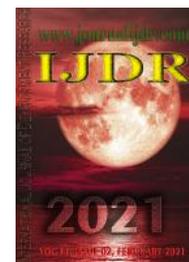
Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research

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

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



RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

USO DE PIOCIANINA NO TINGIMENTO DE FIBRA DE ALGODÃO

Thiago Gonçalves, Bianca Teixeira Morais de Oliveira and Ulrich Vasconcelos

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

ARTICLE INFO

Article History:

Received 07th November, 2020

Received in revised form

19th December, 2020

Accepted 25th January, 2021

Published online 24th February, 2021

Key Words:

Biocorantes, Pigmentos Bacterianos,

Pigmentos Azuis,

Pseudomonas aeruginosa.

ABSTRACT

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

*Corresponding author: Thiago Gonçalves

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

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

INTRODUCTION

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

MATERIAIS E MÉTODOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

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

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

PYO – piocianina; Q_{p_{cel}} – produtividade máxima de células; Q_{p_{pyo}} – produtividade máxima de piocianina; Y_{px} – coeficiente de rendimento; g₂₄ – tempo de geração nas primeiras 24h

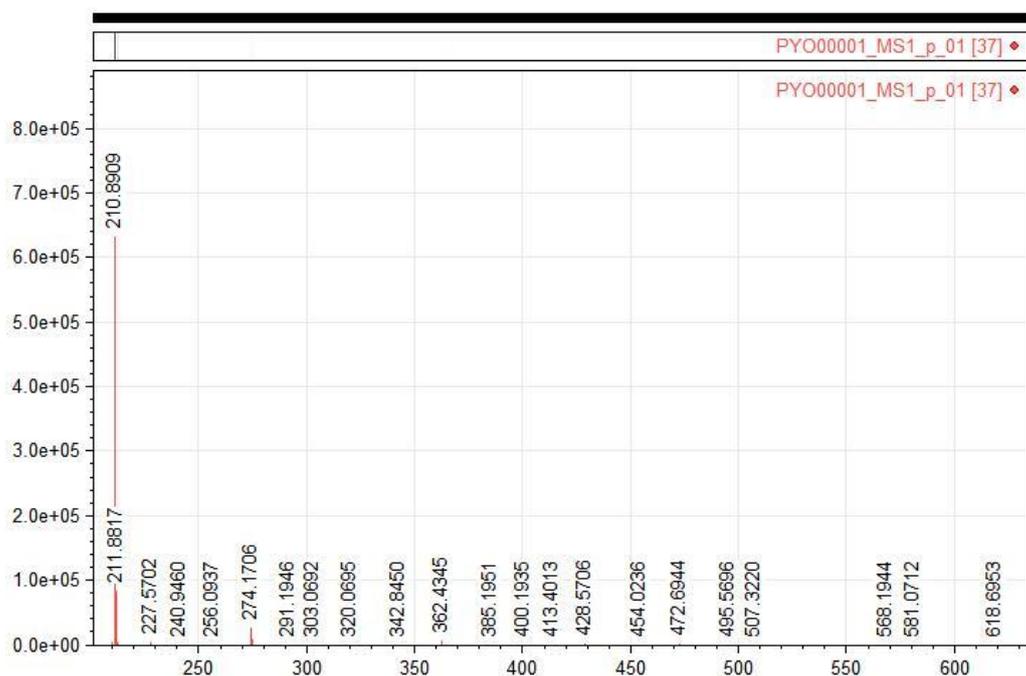


Fig. 1. Espectro fragmentado da amostra do pigmento

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

Parâmetros cinéticos: Houve crescimento satisfatório de TGC02 e TGC04 e o tempo de duplicação durante o crescimento nas primeiras 24h foi cerca de 3,5h. os valores máximos de piocianina foram alcançados com 72h de bioprocessamento, coincidindo também com os valores máximos de OD_{600} (Fig. 2). A produção de piocianina também é regulada por comunicações químicas dependentes de concentração celular usados para coordenar comportamentos em grupo (Borges *et al.*, 2018). Em razão disto, o tempo de duplicação é um fator importante para *P. aeruginosa*. Sob condições controladas de crescimento, a bactéria pode duplicar a população entre cerca de 3-6h (Tamagnini e Gonzales, 1997). O tempo de duplicação dos isolados selvagens deste estudo coincidiu com o intervalo teórico, alcançando entre 3,0-3,5h, valores próximos aos observados num estudo de obtenção do pigmento (Viana *et al.*, 2018) e menores aos obtidos num estudo de competição entre *P. aeruginosa* e bactérias coliformes (Vasconcelos *et al.*, 2010). Os parâmetros escolhidos para caracterizar fisiologicamente as células, número de células por mililitro e massa celular média, indicaram similaridade nas curvas de crescimento de TGC02 e TGC04: a população inicial a partir do inóculo foi de 10^5 células/mL, aumentando cem vezes até o fim do ensaio. Isto representou uma massa celular média de $0,082 \pm 0,001$ mg/mL, incrementada em 9 vezes para TGC02 ($0,739 \pm 0,012$ mg/mL) e 9,5 vezes para TGC04 ($0,773 \pm 0,015$ mg/mL). A máxima produção de células ocorreu por volta de 60h, num processo de estabilização da população iniciado por volta de 48h de incubação, enquanto a piocianina continuou sendo produzida. Além disso, a associação entre o crescimento celular com a produção de piocianina entre 8 e 72h sugere que TGC02 e TGC04 utilizaram o substrato tanto para a formação de biomassa, como para a produção de pigmento. Esta observação também foi reportada num estudo prévio (Saha *et al.*, 2008). A máxima produção de biomassa foi alcançada em 66h de processo e permaneceu estável enquanto a piocianina continuou sendo produzida até 72h. Os autores atribuíram a manutenção da estabilidade da população à variação de fenazinas produzidas durante a fase de crescimento, em respostas aos sinais difundidos no meio.

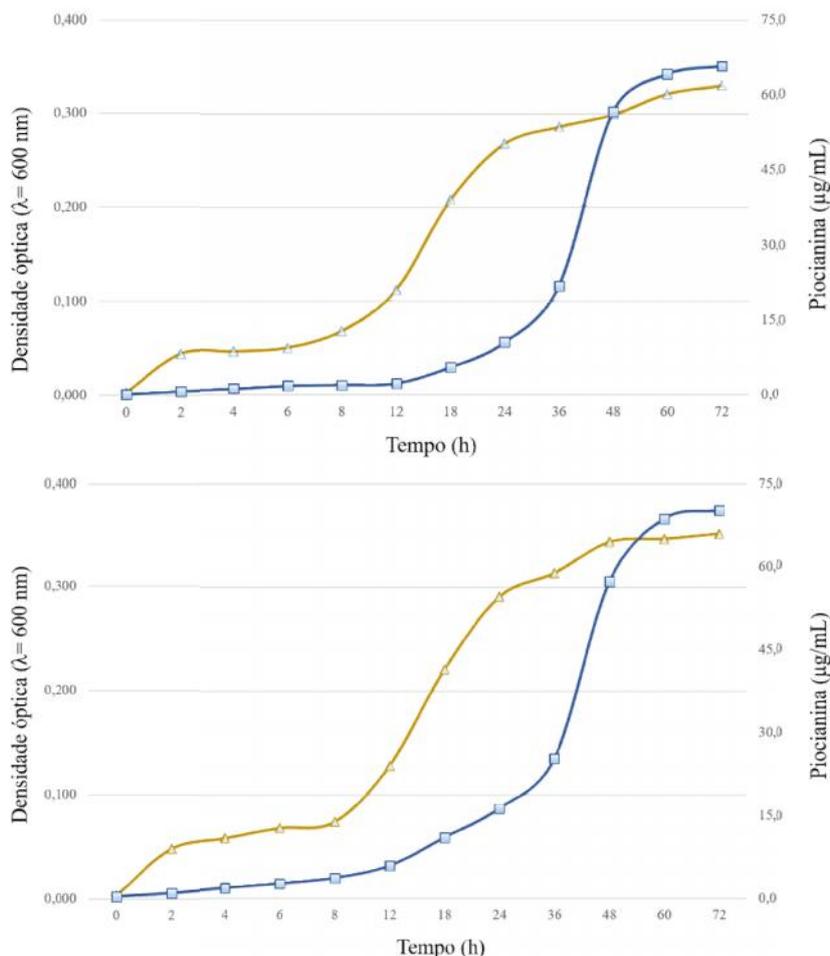


Fig. 2. Curva de crescimento (amarelo) e produção de piocianina (azul) por TGC02 (acima) e TGC04 (abaixo) ($\mu = 0,01$)

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

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

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

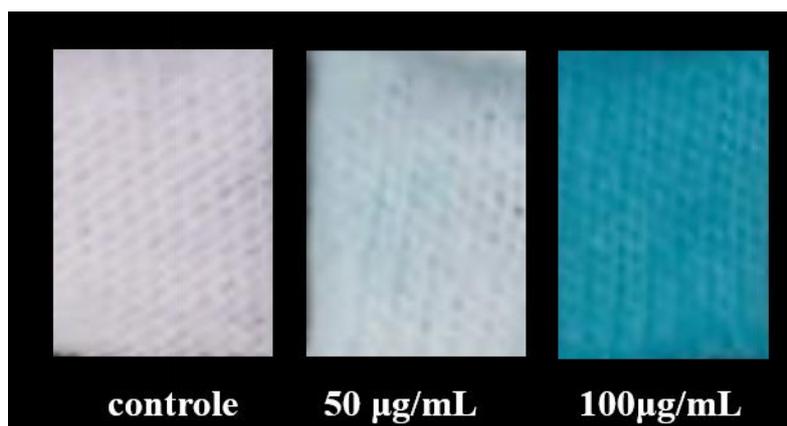


Fig. 3. Aspecto da fibra de algodão tingida com piocianina

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

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

Conclusão

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

Agradecimentos

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

REFERÊNCIAS

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

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

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