



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PIGMENTOS PRODUZIDOS POR  
*Chryseobacterium* KR6 E *Lysobacter* A03**

MARIA ELISA PAILLIÈ JIMÉNEZ

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

Porto Alegre  
Julho/2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PIGMENTOS PRODUZIDOS POR  
*Chryseobacterium* KR6 E *Lysobacter* A03**

Maria Elisa Pailliè Jiménez  
Microbiologista Industrial  
Pontifícia Universidade Javeriana

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do título de Mestre em  
Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia  
Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul - Brasil  
Julho/2017

### CIP - Catalogação na Publicação

Pailliè Jiménez, Maria Elisa  
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PIGMENTOS PRODUZIDOS  
POR *Chryseobacterium* KR6 E *Lysobacter* A03 / Maria  
Elisa Pailliè Jiménez. -- 2017.  
76 f.  
Orientador: Adriano Brandelli.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. *Chryseobacterium* sp. 2. *Lysobacter* sp. 3.  
Pigmentos Bacterianos. 4. HPLC-MS. I. Brandelli,  
Adriano, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## **AGRADECIMENTOS**

A meu orientador o Professor Adriano Brandelli por brindar-me a oportunidade de trabalhar no seu laboratório.

A o Professor Eliseu Rodriguez pela sua constante ajuda na análise dos dados e seus estudantes pela ajuda na realização das análises nos equipamentos de HPLC-DAD-MS.

A meus colegas de laboratório que se tornaram meus amigos e incondicionalmente me apoiaram e ajudaram durante o processo (É NOIS!).

A todos que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

# PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PIGMENTOS PRODUZIDOS POR *Chryseobacterium* KR6 E *Lysobacter* A03

Autora: Maria Elisa Paillie Jiemenez<sup>1</sup>.

Orientador: Adriano Brandelli.

## RESUMO

O uso de pigmentos bacterianos com potencial biotecnológico avança cada vez mais e a partir dessa fonte natural são desenvolvidos diversos produtos com diferentes aplicações em indústrias farmacêuticas, de alimentos, cosmética entre outras, apresentando vantagens em questões econômicas e ambientais, cumprindo com a demanda e trazendo benefícios para a saúde dos consumidores e reduzindo o uso de produtos de síntese química. O objetivo desse trabalho foi a produção, ao nível de laboratório, e caracterização de pigmentos sintetizados pelas bactérias *Chryseobacterium* KR6 e *Lysobacter* A03 isoladas de penas de frango e penas de pinguim, respectivamente. Os pigmentos estudados neste trabalho, extraídos das duas linhagens, resultaram ser pigmentos do tipo Flexirubina (DAR) o que foi revelado pelo teste positivo de KOH 20% e os espectros de UV-vis, e provavelmente Xanthomonadina (APE-DAR híbrido), respectivamente. Os dois pigmentos apresentaram atividade antioxidante avaliado pela captura do radical ABTS. Não foi possível propor uma estrutura química para os dois pigmentos, processos de purificação são requeridos para a identificação molecular desses pigmentos biotecnologicamente viáveis.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (74 p.) Julho, 2017.

# PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF PIGMENTS PRODUCED BY CRHYSEOBACTERIUM KR6 E LYSOBACTER A03.

Author Maria Elisa Paillie Jimenez<sup>1</sup>

Supervisor Adriano Brandelli.

## ABSTRACT

The use of bacterial pigments with biotechnological potential advances are growing and more and from this natural source are developed several products with different applications in the pharmaceutical, food, cosmetics and other industries, presenting advantages in economic and environmental issues, fulfilling a demand and bringing benefits For consumer health and reducing the use of chemical synthesized products. The aim of this study was the production, working volume and characterization of pigments synthesized by *Chryseobacterium* KR6 and *Lysobacter* A03 bacteria isolated from chicken and penguin feathers, respectively. The pigments were characterized by KOH 20% test, UV-visible, colors system CIELAB, HPLC-DAD-MS, FTIR and was evaluated the antioxidant capacity. The pigments from KR6 and A03 presents some characteristics from flexirubin and xanthomonadin non- brominated type pigments respectively. Pigment from KR6 shows a positive bathochromic shift when colonies or the extracted pigment are in presence of alkaline solution (KOH20%) and also have a  $\lambda_{max}$  at 450nm in acetone when analyzed by UV-Vis. The FTIR analysis shows some principal functional groups that might be from a flexirubin molecule. Pigment from A03 didn't present any shift when flooded with KOH and the  $\lambda_{max}$  was 419 nm and 427 nm in acetone and chloroform respectively. The two pigments presented antioxidant activity evaluated by the capture of the free radical ABTS. It was not possible to propose a chemical structure for the two pigments; purification processes are necessary for a molecular identification of the biotechnologically viable pigments.

<sup>1</sup>Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (74 p.) July, 2017.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2.1	Objetivo geral .....	15
2.2	Objetivos específicos .....	15
<b>3.</b>	<b>REVISÃO DA IITERATURA.....</b>	<b>16</b>
3.1	Pigmentos. ....	16
3.2	Pigmentos Bacterianos.....	16
3.2.1	<i>Por que as Bactérias produzem pigmentos.</i> .....	17
3.3	Métodos para extração e identificação de pigmentos.....	19
3.4	Classes de pigmentos bacterianos.....	20
3.4.1	Pigmentos do tipo Carotenoide .....	20
3.4.2	Pigmentos do tipo Flexirubina .....	22
3.4.3	Pigmentos do tipo Xantomonadina.....	25
3.5	Gênero de bactérias pigmentadas .....	26
3.5.1	Gênero <i>Chryseobacterium</i> sp.....	26
3.5.2	Gênero <i>Lysobacter</i> sp. ....	27
3.6	Linhagens de estudo .....	30
3.6.1	<i>Chryseobacterium</i> sp., KR6.....	30
3.6.2	<i>Lysobacter</i> sp., A03.....	30
3.7	Resíduos Agroindustriais.....	31
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
4.1	Bactérias .....	33
4.2	Condições do cultivo .....	33
4.2.1	Produção de biomassa de KR6 em diferentes meios (tratamentos) sólidos e líquidos.....	34
4.3	Obtenção de biomassa.....	34
4.4	Extração dos pigmentos .....	34
4.5	Teste de KOH 20%.....	35
4.6	Análise Espectrofotométrica UV-Visível .....	35
4.7	Análise de cor (CIELAB).....	35
4.8	Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Arranjo de Diodos	

acoplado a um Espectro de Massas (HPLC-DAD-MS) .....	36
4.9 Análise de espectroscopia por Infravermelho (IR) transformada de Fourier.	37
4.10 Atividade Antioxidante .....	37
4.11 Análise estatística .....	38
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
5.1 Rendimento de biomassa e pigmento .....	39
5.2 Produção de biomassa de KR6 em diferentes meios sólidos e meios líquidos. .....	39
5.2.1 Comparação meios Sólido e Líquido com BHI .....	39
5.2.2 Comparação meios Líquidos com Farinha de Pena.....	40
5.2.3 Comparação meios Sólidos com BHI, BHI1%-PENA e PENA. ....	41
5.3 Espectrofotometria UV- vis do extrato de KR6 produzido em cada tratamento. .....	42
5.4 Biomassas obtidas para extração. ....	43
5.5 Pigmentos extraídos das duas linhagens. ....	44
5.6 Teste de KOH 20% .....	44
5.6 Análise Espectrofotométrica UV-Visível .....	46
5.6.1 Pigmento de <i>Chryseobacterium</i> sp., KR6.....	46
5.6.2 Pigmento de <i>Lysobacter</i> sp., A03.....	47
5.7 Análise de cor (CIELAB).....	49
5.8 Análise por HPLC-DAD-MS.....	50
5.8.1 Pigmento de <i>Chryseobacterium</i> sp., KR6.....	50
5.8.2 Pigmento de <i>Lysobacter</i> sp., A03.....	52
5.9 Análise de espectroscopia por Infravermelho.....	53
5.10 Atividade antioxidante.....	55
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores Colorimétricos dos pigmentos extraídos em acetona de KR6 e A03 e de pigmentos do tipo Flexirubina extraídos de linhagens de <i>Chryseobacterium</i> sp., publicados em outros trabalhos.....	49
Tabela 2. Dados de tempo de retenção (TR), comprimento de onda (nm) área e % de área de cada um dos picos que apresentaram os pigmentos extraídos em cada tratamento de KR6. ....	52
Tabela 3. Dados de tempo de retenção(TR), comprimento de onda (nm) área e % de área de cada um dos picos que apresentou o pigmento extraído de A03 em meio BHI.....	53

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas e utilidade comercial de carotenoides de importância, produzidos por microrganismos (modificado de Bhosale, 2004).....	21
Figura 2. Representação molecular das variações estruturais da Flexirubina.....	23
Figura 3. Estrutura química da flexirubina isolada de <i>Flavobacterium johnsoniae</i> (a) e <i>Flexibacter elegans</i> (b) (Oren, 2011., Fautz e Reichenbach, H. 1979). .....	24
Figura 4. Estrutura química dos aril polienos achados na família Xanthomonadaceae: xantomadina.....	26
Figura 5. Crescimento de <i>Chryseobacterium</i> sp., KR6 (mg/ml) em função do tempo (h) em meio BHI sólido e líquido.....	40
Figura 6. Crescimento de <i>Chryseobacterium</i> sp., KR6 (mg/ml) em função do tempo (h) em meio líquido de BHI1%-PENA e PENA. ....	41
Figura 7. Crescimento de <i>Chryseobacterium</i> sp., KR6 (mg/ml) em função do tempo (h) em meio BHI sólido e líquido.....	42
Figura 8. Isolados das linhagens de A03 e KR6 em agar BHI respectivamente, B: biomassa liofilizada de KR6 em meio líquido BHI e C: biomassa liofilizada de A03 em meio líquido BHI. ....	43
Figura 9. A: Pigmentos de Kr6 extraídos com acetona. B: Pigmentos de A03 extraídos com acetona. ....	44
Figura 10. A: Biomassa tomada de BHI de KR6 (esquerda) e A03 (direita) nas suas condições originais. B: Biomassa de KR6 com mudança rápida de cor e biomassa de A03 sem mudança nenhuma com adição de KOH 20%. ....	45
Figura 11. Pigmentos extraídos com acetona A. Pigmento de KR6 antes e depois de adicionar a solução alcalina (KOH 20%). B. Pigmento de A03 depois de adicionar a solução alcalina (KOH 20%). ....	45
Figura 12. Espectros de Uv- visível do pigmento extraído de KR6 e mudança batocromica pela adição de KOH 20%. ....	47
Figura 13. Varredura espectrofotométrica dos pigmentos totais extraídos de KR6 em 3 meios de cultura. — : Pigmento gerado em meio BHI, — : Pigmento	

gerado em meio BHI1% - Pena e  : Pigmento gerado em meio Pena.....	43
Figura 14. Espectro uv- visível do pigmento de <i>Lysobacter</i> sp., A03 em acetona e clorofórmio.....	48
Figura 15. Cromatogramas (processados a 450nm) obtidos por HPLC-DAD do pigmento da KR6. A: tratamento com BHI, B: tratamento com BHI 1%- PENA, C: PENA. ....	51
Figura 16. Cromatograma (processado a 419nm) obtido por HPLC-DAD-MS do pigmento de A03 crescido em BHI.....	53
Figura 17. Espectro infravermelho de (A) Biomassa liofilizada de <i>Chryseobacterium</i> sp., (B) pigmento parcialmente purificado. ....	54

## 1. INTRODUÇÃO

Pigmentos provenientes de fontes naturais como plantas, insetos e outros materiais orgânicos são utilizados pelo ser humano desde a pré-história. Os pigmentos vêm sendo amplamente utilizados em diferentes tipos de indústrias, como alimentícia, farmacêutica, cosmética e têxtil, oferecendo características que tornam os produtos mais atraentes e de aparência agradável, e que ao mesmo tempo podem trazer benefícios para a saúde.

Os corantes sintéticos começaram a ser produzidos a nível industrial a mediados do século 19, tomando o lugar dos corantes ou pigmentos de fontes naturais. Os insumos, produtos e dejetos produzidos no processo dos corantes sintéticos podem gerar efeitos carcinogênicos, causar desordem no sistema nervoso, imune e digestivo nos trabalhadores e consumidores. Além disso, apresentam lenta ou nenhuma degradação no meio ambiente e se acumulam nos seres vivos, causando danos nos ecossistemas. Apesar de serem tóxicos e perigosos, seguem sendo produzidos e comercializados a grande escala (Halsall CJ 2004, Mitrou PI *et al.*, 2001, Venil *et al.*, 2013).

Com a globalização e o rápido desenvolvimento de novas pesquisas, conhecimentos e tecnologias torna-se uma alternativa promissora para diminuir ou evitar o uso e produção de pigmentos sintéticos. Os pigmentos naturais como carotenoides ou do tipo Flexirubina, ajudam na prevenção de várias enfermidades como câncer, degeneração macular relacionada à idade, cataratas, doenças cardiovasculares e outras relacionadas com a baixa função imunológica, tratamento de doenças crônicas da pele, eczema, úlceras gástricas entre outras (Perera e Yen, 2007; Jomova e Valko 2013; Kim, 2013; Venil *et al.*, 2013).

As maiores fontes de pigmentos naturais são os micro-organismos (bactérias, microalgas, fungos etc.) e as plantas. Apesar das plantas serem ricas em pigmentos como carotenoides, podem não estar disponíveis o ano todo para sua produção, pois dependem de fatores sazonais e geográficos a diferença dos microrganismos. As bactérias por estarem amplamente distribuídas no solo, ar ou água, são consideradas de fácil cultivo e obtenção, também existe a possibilidade de aplicar técnicas genéticas para melhorar o rendimento dos metabolitos de interesse e

até o momento e sabido que os pigmentos bacterianos são compatíveis e biodegradáveis no meio ambiente por serem quimicamente naturais e não apresentar toxicidade alguma (Chandi e Gill, 2011; Tuli *et al.*, 2014; Venil *et al.*, 2013; Venil *et al.*, 2017).

A crescente demanda por produtos naturais que realmente sejam seguros para a saúde humana e a conscientização das indústrias por conservar o meio ambiente acarretou o aumento nas pesquisas de pigmentos produzidos por bactérias. (Venil *et al.*, 2013, Kim *et al.*, 2012, Aruldass *et al.*, 2016, Exposito *et al.*, 2015).

Meios de cultura sintéticos são utilizados para o crescimento das bactérias mas devido a seu alto custo, podem ser substituídos por substratos disponíveis nos resíduos agroindustriais os quais podem ser de fácil assimilação para as bactérias que contem sistemas enzimáticos complexos para obter as fontes de carbono e nitrogênio que demanda seu metabolismo, diminuindo assim a quantidade de resíduos produzidos pelas indústrias, gerando produtos de alto valor agregado e diminuindo custos de produção. (Venil *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2012; Aruldrass *et al.*, 2016; Exposito *et al.*, 2015).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo produzir e caracterizar os pigmentos produzidos por duas bactérias Gram negativas com grande potencial biotecnológico, *Chryseobacterium* sp KR6 e *Lysobacter* sp A03 isoladas de penas de frango e penas de pinguim respectivamente, empregando meio nutritivo sintético e meio mineral com farinha de pena como subproduto da indústria avícola.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Produzir e caracterizar os pigmentos de duas bactérias queratinolíticas Gram negativas, *Chryseobacterium* KR6 e *Lysobacter* A03.

### 2.2 Objetivos específicos

- Produzir suficiente pigmento em meio líquido das duas linhagens para as análises.
- Extrair os pigmentos produzidos pelas bactérias.
- Identificar possíveis pigmentos do tipo Flexirubina empregando testes químicos.
- Caracterizar e identificar a estrutura química dos pigmentos obtidos mediante espectrofotometria UV-vis, análise de cor, HPLC-DAD-MS, e espectroscopia de infravermelho.
- Avaliar a atividade antioxidante dos pigmentos extraídos.
- Avaliar meios de cultura em matriz líquida e sólida para produção de pigmento pela linhagem KR6.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Pigmentos.

Os pigmentos são materiais inorgânicos e orgânicos insolúveis em água aplicados em muitas áreas como medicina, alimentos, tintas, papeis, têxteis, aquicultura, ração animal entre outros. Em geral os pigmentos podem fornecer a cor desejada em muitos alimentos ou outros produtos de interesse e possuem atividades biológicas importantes (El-Banna *et al.*, 2012a, Zoz *et al.*, 2015). Um exemplo de fonte natural que tem sido usada por muitos anos são os carotenoides extraídos de plantas que embora sejam fontes ricas destes pigmentos podem apresentar problemas em sua disponibilidade, devido à diversidade sazonal e geográfica (Parajó *et al.*, 1998; Wissgott *et al.*, 1996).

Os corantes são obtidos sinteticamente ou de fontes naturais por vários métodos de extração físicos e químicos, alguns mais dispendiosos que outros. Na produção de pigmentos bacterianos esse custo pode ser minimizado através da otimização dos processos biotecnológicos, descobrindo bactérias altamente pigmentadas e fazendo uso de substratos que são considerados resíduos industriais (Aguilar *et al.*, 2014; Aruldas *et al.*, 2016). Os micro-organismos que produzem pigmentos são bastante comuns na natureza e ricos em cor, sua heterogeneidade de composição química e a presença de cromóforos específicos são a razão da diversidade de pigmentos (Bridle *et al.*, 1997). Além disso, as bactérias apresentam também maior variabilidade de tipos de pigmentos com outras características físico-químicas junto com outros compostos bioativos funcionais trazendo novas aplicações e usos de importância industrial (Kim *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011).

#### 3.2 Pigmentos Bacterianos

O interesse nos pigmentos bacterianos aumentou consideravelmente, em parte devido à crescente evidência de benefícios para a saúde humana e também para o crescimento de certas áreas do agronegócio, especialmente da aquicultura e da avicultura (El-Banna *et al.*, 2012b; Méndez-Vilas A (Ed.) 2015). Na literatura são

encontradas pesquisas que avaliaram e demonstraram as propriedades antioxidantes e antimicrobianas desses pigmentos naturais que têm potencial para serem usados como corantes alimentares ou possíveis formulações farmacológicas. Foi demonstrado que os pigmentos microbianos têm efeito antimicrobiano contra alguns micro-organismos patogênicos de origem alimentar, ou envolvidos na deterioração dos mesmos (Türkkan *et al.*, 2007).

Com relação à indústria farmacêutica, estudos indicam que os carotenoides e outros pigmentos de origem bacteriana como a flexirubina podem ser utilizados como agentes terapêuticos contra vários tipos de câncer e outras doenças devido às suas propriedades antioxidantes, anticancerígena, tratamento de doenças degenerativas, efeitos cicatrizantes e/ou provitaminas A entre outras (Deorukhkar *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010; Ungureanu *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011; Venil *et al.*, 2016). Venil e colaboradores (2017) realizaram um estudo onde foi avaliado a segurança da flexirubina a partir de *Chryseobacterium artocarp* CECT 8497, foram feitos estudos de toxicidade agudos, subagudos (doses repetidas durante 28 dias) e mutagenicidade, esse pigmento tem ampla gama de efeitos farmacológicos, tais como antimicrobianos e anticancerígenos. Os resultados não demonstraram mortalidade nem sinais de toxicidade e não foram observadas diferenças no peso corporal, consumo alimentar, sinais clínicos, peso dos órgãos, hematologia e parâmetros bioquímicos séricos em grupos tratados com flexirubina (1250, 2500 e 5000 mg/kg do peso corporal dos ratos). Não foram encontradas evidências de mutagenicidade *in vitro* ou *in vivo*, resultados que apoiam a segurança do uso desse extrato de flexirubina (Venil *et al.*, 2017).

### 3.2.1 Por que as Bactérias produzem pigmentos.

São encontradas diferentes hipóteses e trabalhos ao nível de laboratório que procuram explicar a síntese de pigmentos por vários gêneros de bactérias. Uma delas são os processos de fotossínteses, sendo esta uma das maiores razões da produção dos pigmentos bacterianos. Stom *et al.* (2007) afirmam que os pigmentos fotossintéticos de micro-organismos fototróficos cobrem diferentes regiões do espectro da luz solar e a utilização desses espectros oferece oportunidades para a

diferenciação dos nichos ecológicos e permite a coexistência de espécies absorvendo diferentes cores de luz. Foi desenvolvida a hipótese de que as diferentes vibrações das moléculas de água absorvem luz em comprimentos de ondas específicos, o que disponibiliza diferentes nichos espectrais para os micro-organismos fototróficos que ali se encontram. O espectro da luz subaquática é efetivamente utilizado por esse tipo de micro-organismos, sendo um fator seletivo importante para a ecologia e evolução dos mesmos. Cada um desses nichos pode estar ocupado por vários tipos de pigmentos com picos de absorção muito parecidos (Stomp *et al.*, 2007) o que poderia explicar a grande variedade que apresentam os pigmentos do tipo carotenoides que absorvem e apresentam picos numa faixa entre 380 a 500 nm, gerando cores do amarelo ao vermelho. Por outro lado, a divergência dos picos de absorção desses micro-organismos possivelmente deve-se aos processos evolutivos de radiação adaptativa. Essa evolução é mais uma das razões pelas quais as bactérias têm a genética necessária para sua sobrevivência (Rueffler *et al.*, 2006; Stomp *et al.*, 2007).

Na mesosfera (48-77 km acima nível do solo), onde os danos intensos das radiações solares são esperados, existe uma porcentagem alta de bactérias pigmentadas. No trabalho realizado por Tong e Lighthar (1997), uma população de bactérias do ambiente foram estudadas no laboratório para avaliar o efeito de radiação solar e luz germicida sobre sua sobrevivência. Ao incrementar a exposição da luz nas bactérias, mais bactérias não pigmentadas morreram e a porcentagem de bactérias pigmentadas foi aumentando gradualmente, demonstrando a resistência das bactérias que sintetizam pigmentos e também uma relação inversa de colonização. Foi encontrado que em uma população de bactérias na camada limite atmosférica (CLA), 65% eram bactérias pigmentadas (Tong e Lighthar, 1997). Pigmentos do tipo carotenoides são os mais conhecidos por proteger os micro-organismos de danos causados pela luz UV e luz visível, através da extinção dos fotossensibilizadores no seu estado triplete e espécies reativas de oxigênio (Margalith, 1992).

Outras razões da produção bacteriana de pigmentos variam desde a síntese de pigmentos como fatores de virulência ou agentes anticongelantes os quais facilitam a sobrevivência a condições extremas de frio, até o desenvolvimento de atividades antibióticas e anticancerígena (Liu e Nizet 2009; Nakamura *et al.*, 2003; Suresh *et al.*, 2015). Venil *et al.* (2015) investigaram a atividade anticancerígena do

pigmento tipo flexirubina isolado de *Chryseobacterium artocarp* CECT 8497 e o mesmo pigmento contido em nanopartículas de prata. As linhas de células humanas com câncer de mama foram tratadas com flexirubina (100 µm), nanopartículas de prata (100 µm) e nanopartículas de prata mediadas por flexirubina, apresentando incremento no número de células apoptóticas tratadas com nanopartículas de prata mediada por flexirubina do que em células tratadas com flexirubina ou nanopartículas de prata sozinhas. Segundo os autores, a natureza biocompatível da flexirubina facilita a entrada das nanopartículas de prata nas células, mascarando as nanopartículas durante a entrada, o que aumentaria a absorção de prata levando a maior morte celular. Além disso, foi concluído que a combinação de prata e o pigmento flexirubina podem exercer um efeito citotóxico sinérgico nas células cancerígenas (Venil *et al.*, 2015).

### 3.3 Métodos para extração e identificação de pigmentos

Para a obtenção e caracterização de pigmentos bacterianos de interesse é necessário utilizar um ou mais tipos de solventes e outras etapas para a extração total e separação do pigmento celular. Dependendo da natureza química e complexidade do pigmento, a extração pode ser muito rápida e eficiente ou difícil e às vezes demorada. Um pigmento pode ser uma mistura de cores, podendo ser composto por várias moléculas diferentes que formam uma cor característica o que pode demandar mais tempo, experimentos e tentativas para determinar a metodologia de extração que melhor se adapta.

Os carotenoides são produzidos no citoplasma e os do tipo flexirubina na membrana externa das bactérias (Irschik H, Reichenbach H, 1978, Dworkin *et al.*, 2006) e apesar de serem sintetizados em diferentes locais da célula, os pigmentos do tipo flexirubina e carotenoide tem algumas similaridades físico-químicas quanto a sua estrutura e o comprimento de onda onde apresentam maior absorbância, o que pode ocasionar dificuldade na escolha do método de extração e separação. Muitos artigos relatam diverso protocolos físico-químicos para a extração parcial ou total dos pigmentos bacterianos.

Como metodologias físicas para a ruptura das células bacterianas são

utilizados processos de ultrasonicação , banho sonicador, centrifugação, maceração, tritura com perolas de vidro, extrações a baixas ou altas temperaturas entre outras Os solventes mais utilizados são acetona, DMSO, acetato de etila, éter de petróleo, metanol, etanol entre outros), os quais podem ser concentrados ou diluídos ou usar uma mistura dos mesmos por tempos determinados ou variáveis (Roland e Weber *et al.*, 2007; Venil *et al.*, 2016; Zaghdoudi *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2013<sup>a</sup>).

Tecnologias como espectroscopia Raman, espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR), espectrometria MALDI-ToF, infravermelho e cromatografia líquida acoplado a massas (HPLC-DAD-MS) são amplamente utilizadas para a identificação, confirmação e estudo das estruturas químicas de diversos tipos de pigmentos (Jehlicka *et al.*, 2013).

### 3.4 Classes de pigmentos bacterianos.

#### 3.4.1 Pigmentos do tipo Carotenoide

Carotenoides são pigmentos amplamente distribuídos na natureza, que abrangem a faixa de cores amarelo e vermelho, e pertencem a uma das classes mais importantes de pigmentos utilizados em diferentes indústrias (Figura 1). Sua abundância na natureza faz com que tenham uma variedade de funções biológicas. São solúveis em lipídeos e a maioria são terpenoides C<sub>40</sub>, que atuam em membranas como uma proteção antioxidante que elimina oxigênio e radicais peróxido. Suas habilidades antioxidantes aparentemente estão atribuídas a sua estrutura (Mata-Gomez *et al.*, 2014). Podem ser diferenciados em carotenos que são hidrocarbonetos como o licopeno ou β-caroteno e seus derivados oxigenados, chamados xantofilas como, por exemplo, a luteína, zeaxantina e astaxantina (Das *et al.*, 2007).

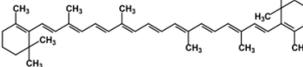
Carotenoides	Estrutura	Utilidade comercial	Referencia
<b>Licopeno</b> ( $\psi$ , $\psi$ -caroteno)		Contra doenças cardiovasculares, câncer de próstata e preparação de cosméticos.	Rissanen et al., 2002; Giovannucci e Clinton 1998; Etienne et al., 2000.
<b><math>\beta</math> - Caroteno</b> ( $\beta$ , $\beta$ -caroteno)		Agente anticancerígeno, fonte de provitamina A, corantes em alimentos, fotoprotectores e preparações cosméticas.	Peto et al., 1981; Sang-Pill et al., 1998; Etienne et al., 2000.
<b>Astaxantina</b> (3,3' dihidroxi- $\beta$ , $\beta$ -4,4' diona)		Aditivo em alimentos, aquicultura e corante de alimentos.	Nelis e Leenheer 1991.
<b>Luteína</b> (3R,3'R,6'R- $\beta$ , $\beta$ , $\epsilon$ -caroteno-3,3 -diol)		Prevenção de degeneração macular relacionada à idade e preparação de cosméticos.	Seddon et al., 1994.

Figura 1. Estruturas e utilidade comercial de carotenoides de importância, produzidos por microrganismos (modificado de Bhosale, 2004).

A síntese de pigmentos carotenoides ocorre universalmente em sistemas fotossintéticos de plantas superiores, algas e bactérias fototróficas. Em organismos não fotossintéticos, os carotenoides são importantes na proteção contra o dano foto-oxidativo. Assim, bactérias não fototróficas e fungos dependem destes pigmentos para proteção durante o crescimento, quando as condições de luz e ar são abundantes. Microrganismos acumulam grande quantidade de tipos de carotenoides como parte de sua resposta a várias situações de estresse dependendo do ambiente onde se encontram. Além das condições de cultura, a biossíntese de carotenoides é governada pelo nível e atividade enzimática da rota biosintética dos carotenoides e pelo fluxo total de carbono através do sistema de síntese. Assim a hiperprodução pode ser alcançada alterando o nível e a atividade destas enzimas, ou a via biosintética usando uma abordagem molecular (Sandmann 2001, Schmidt-Dannert 2000).

Em humanos, evidências epidemiológicas e resultados experimentais sugerem que o consumo de carotenoides tem efeitos benéficos, protegendo o sistema imune e inibindo a aparição e desenvolvimento de muitas doenças degenerativas tais como arteriosclerose, cataratas, degeneração macular associada à idade, esclerose múltiplas, câncer, doenças cardíacas. Muitas destas propriedades são associadas ao caráter antioxidante, controlando o nível dos radicais livres os quais são pensados como os responsáveis de desempenhar um papel importante na iniciação destas doenças (Rivera, Canela-Garayoa, 2012, Fraser, Bramley). Por outro lado, são precursores de vitamina A, sendo uma das suas funções fisiológicas mais importantes (Vílchez *et al.*, 2011).

Em animais os carotenoides são precursores de diferentes hormônios (Vershinin, 1999), vitamina A e ácido retinóico as quais são substâncias importantes para sua nutrição, visão e diferenciação celular respectivamente (Olson, 1993). Ainda ajudam a estimular o sistema imunológico e promover a saúde em geral, determinação no comportamento sexual e processos de reprodução, e também ajudam a prevenir a predação e parasitismo (Cazzonelli, 2011). Os animais não são capazes de sintetizar carotenoides e requerem sua absorção através da dieta com suplementos nutracêuticos. Em plantas os carotenoides servem como precursores de fitohormônios de ácido abscísico (ABA) e estrigolactona (Zhu *et al.*, 2010). Também atuam como substâncias atraentes para alguns animais como os insetos polinizadores e herbívoros distribuidores de sementes (Zhu *et al.*, 2009). São principalmente usados como corantes em alimentos e bebidas, suplementação nutricional, propósitos farmacêuticos e cosméticos, produção de fragrâncias e aplicações medicinais (Rivera, Canela-Garayoa, 2012; Gassel *et al.*, 2013; Umeno *et al.*, 2005).

Em alguns casos foi descrita a síntese química de carotenoides a partir de precursores petroquímicos. Por exemplo, os enantiômeros puros 3S- e 3'S-astaxantina, produzidos por uma rota eco eficiente a partir de  $\alpha$ -isoforona e vinylbutinol, foram comercializados (Jackson *et al.*, 2008). Mas mesmo assim a preferência dos consumidores continua sendo por ingredientes naturais, e com o crescimento da demanda da indústria alimentícia, a demanda por carotenoides como corantes seguros e adequados está em ascensão (Gu *et al.*, 2008).

#### 3.4.2 Pigmentos do tipo Flexirubina

Os pigmentos tipo flexirubina são basicamente arilpolienos (APE) esterificados com um resorcinol (DAR) híbridos e podem apresentar derivados que diferem no grau de metilações e clorações, comprimentos das cadeias de polieno e nas cadeias do DAR. Únicos pigmentos bacterianos com uma substituição no terminal alquilo que consiste em um cromóforo de ácido  $\omega$ -fenil octaénico esterificado (Achenbach *et al.*, 1983; Schöner *et al.*, 2014b). Achenbach e colaboradores (1983) mostraram que dos dois grupos metilo, só o grupo metil no anel de benzeno é derivado a partir da ligação C (CH, da metionina), enquanto que a tirosina é o precursor do anel

A bem como dos três átomos de carbono vizinhos da cadeia polieno. Além disso, eles verificaram que o acetato era o precursor para a maior parte do polieno e o anel B com os seus substituintes alquilo (ver Figura 2). Pigmentos tipo Flexirubina (FTP) são pigmentos específicos de polieno produzidos por vários gêneros de Bacteroidetes como *Flexibacter*, *Cytophaga*, *Sporocytophaga*, *Chryseobacterium* (Jehlicka *et al.*, 2013) e são utilizados no tratamento de doenças crônicas da pele, eczema, úlceras gástricas, entre outras (Kim, 2013).

O comprimento da cadeia de polieno pode variar entre seis e oito duplas ligações e ocorrem outras variações na presença ou na ausência de um substituinte de metilo ou de cloro na metaposição dos grupos fenilo conjugados e nos substituintes alquilo do resorcinol esterificado. Na Figura 1 se explicam as variações da molécula de flexirubina onde o anel A representa a estrutura molecular das possíveis variações para flexirubina.  $n$  refere-se ao número de carbonos conjugados que pode ser de 6 até 8.  $R^1$  pode variar entre átomos de metil, hidrogênio ou cloro.  $R^2$  pode ser um próton ou átomo de cloro.  $R^3$  e  $R^4$  no dialkilresorcionol (Anel B) tem diferentes comprimentos e ramificações nos substituintes de carbono (Zophel *et al.*, 1991 Achenbach 1987, Achenbach *et al.*, 1983). Em alguns Bacteroidetes das famílias *Flavobacteriaceae*, *Cytophagaceae* e *Chitinophagaceae*, as flexirubinas podem estar presentes juntamente com pigmentos do tipo carotenoides (Achenbach *et al.*, 1983, Achenbach *et al.*, 1978b; Bernardet e Bowman, 2010; Reichenbach *et al.*, 1974; Reichenbach *et al.*, 1981; Reichenbach 1992).

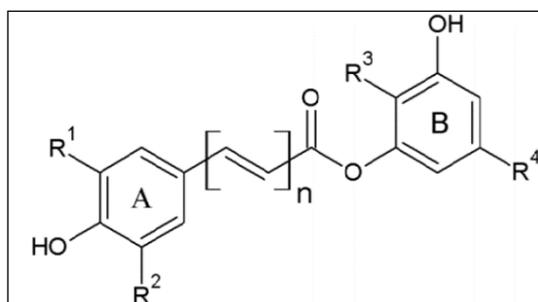


Figura 2. Representação molecular das variações estruturais da Flexirubina.

Reichenbach e Kleining foram os primeiros a isolar o pigmento tipo flexirubina de *Flexibacter elegans* em 1974, que resultou ser um membro de uma nova classe de pigmentos. Cada gênero produz variantes especificamente modificadas de flexirubina que servem como excelentes marcadores quimiosistemáticos. De acordo com pesquisas sobre a ocorrência de novos compostos, a distribuição da flexirubina é bastante limitada (Figura 3).

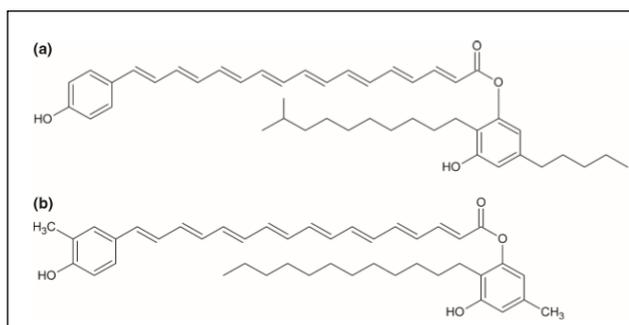


Figura 3. Estrutura química da flexirubina isolada de *Flavobacterium johnsoniae* (a) e *Flexibacter elegans* (b) (Oren, 2011., Fautz e Reichenbach, H. 1979).

Fautz e Reichebach (1980) propuseram um teste simples para pigmentos do tipo flexirubina para aproveitar a oportunidade de funcionar como marcadores quimiosistemáticos, pois a caracterização e determinação estrutural completa do pigmento requer processos laboriosos e demorados, além de equipamentos mais sofisticados. Inicialmente para realizar uma varredura, os autores aplicaram testes preliminares:

(1) Teste baseado na mudança de cor com álcali. As colônias produtoras do pigmento exibem uma mudança de cor imediata de amarelo para laranja, vermelho, roxo ou marrom quando entram em contato com solução de KOH (20%) e voltam a sua cor original quando são lavadas com uma solução ácida. Essa alteração não é absolutamente específica para esse tipo de pigmentos, mas continua sendo útil quando combinada com outras análises.

(2) Extração dos pigmentos com acetona e cromatografias em sílica gel e de camada delgada, combinada com o teste alcalino mencionado anteriormente.

(3) Absorção do espectro de luz quando está purificado antes e depois da

adição da solução alcalina (Bernardet *et al.*, 2002, Fautz, Reichenbach 1980). Esses testes refletem principalmente o cromóforo polieno e o grupo hidroxilo fenólico no anel A, sem ser realmente específicos.

Embora os testes apresentem resultados razoáveis, modificações relativamente pequenas das moléculas de flexirubina, por exemplo uma metilação do grupo hidroxilo, tornaria os testes inúteis. Por outro lado, outros tipos de pigmentos podem ter similaridade estrutural e dar assim uma reação positiva enganosa. De fato, tais pigmentos já são conhecidos, como por exemplo os pigmentos do tipo Xantomonadina, ou carotenoides fenólicos (Andrewes *et al.*, 1973-1976; Arcamone *et al.*, 1970; Chaudhari *et al.*, 2009; Fautz e Reichenbach 1979).

Outro teste para avaliar pigmentos do tipo carotenoide ou flexirubina é baseado na incorporação de precursores biosintéticos marcados, seguido por cromatografia em camada delgada e análise auto-radiográfica dos cromatogramas. A tirosina não entra em carotenoides e o ácido mevalônico não se incorpora na flexirubina. O controle com metionina marcada é um aditivo que deve ser incorporado em ambos tipos de pigmento (Fautz and Reichenbach 1980, Schöner *et al.*, 2014).

### 3.4.3 Pigmentos do tipo Xantomonadina

Pigmentos do tipo xantomonadina são pigmentos bacterianos pouco estudados, com uma estrutura similar a dos carotenoides com respeito a seu sistema de polienos. O agrupamento de genes biosintéticos é generalizado em bactérias taxonomicamente distantes e 4 classes desse tipo de pigmentos já foram achados. Comumente esse pigmento é produzido por bactérias que pertencem ao gênero de *Xanthomonas* sp. e consiste em uma mistura de aril polienos (APE) que diferem em níveis de metilações e radicais bromo, principalmente (Figura 4).

Há outro tipo de pigmento Xantomonadina, chamado arcuflavina extraído de *Azoarcus* sp. e estruturalmente são APE que se encontram esterificados com um dialkilresorcionol (DAR) (Schöner *et al.*, 2016).

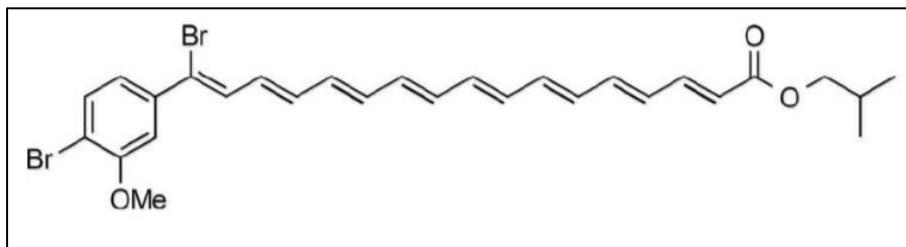


Figura 4. Estrutura química dos aril polienos achados na família *Xanthomonadaceae*: xantomonadina.

O pigmento amarelo recentemente foi achado em outro gênero de bactérias, *Lysobacter* sp, também da família das *Xanthomonadaceae*. Estudos sugerem que o pigmento amarelo corresponde à compostos análogos de xantomonadina sem bromo. A produção do pigmento nesse gênero parece estar ligada com presença de genes policeto sintase (PKS) os quais estão aparentemente relacionados com a localização do pigmento na membrana externa de *Lysobacter* sp. Estudos indicam que essa localização específica tem como objetivo promover fotoproteção e evitar assim danos por foto-oxidação, o que ajuda a manter a sobrevivência das bactérias no seu habitat e exercer funções efetivas de biocontrole (Andrewes *et al.*, 1976; Goel *et al.*, 2002; Schöner *et al.*, 2016; Starr e Stephens *et al.*, 1964; Wang *et al.*, 2013).

### 3.5 Gênero de bactérias pigmentadas

#### 3.5.1 Gênero *Chryseobacterium* sp.

Durante a reclassificação dos membros do gênero *Flavobacterium* com base nos estudos de similaridade de cistron de rRNA, o gênero *Chryseobacterium* sp., foi introduzido e descrito pela primeira vez por Vandamme e colaboradores (1994). Subsequentemente, o gênero se expandiu rapidamente e abrange mais de 85 espécies, isoladas dos mais diversos ambientes desde amostras de alimentos como leite, manteiga (Jooste *et al.*, 1985), peixes (de Beer *et al.*, 2006, Zamora *et al.*, 2012), bebidas lácticas (Kengo *et al.*, 2005), frango cru e em plantas de processamento de frango e penas (de Beer *et al.*, 2005, Riffel *et al.*, 2003) até em solos de cultivos de

arroz (Yamaguchi S, Yokoe M. 2000), endófitos de raízes de pepino (Jeong *et al.*, 2017), folhas de milho (Lin *et al.*, 2017), solo rizosférico de cultivos de berinjela (Du *et al.*, 2015), ambientes marinhos, amostras clínicas, água fresca, água de esgoto e águas residuais (Kirk *et al.*, 2013, Kämpfer *et al.*, 2003).

As características típicas desse gênero inclui metabolismo aeróbio, produção de pigmentos e compostos bioativos, à presença de ácidos graxos de cadeia ramificada (iso-C<sub>15:0</sub> e iso-C<sub>17:0</sub> 3-OH) como os principais, fosfatidiletanolamina como o principal lipídeo polar, e menaquinona-6 (MK-6) como a quinona característica nos processos de respiração (Bernardet *et al.*, 2006, Vandamme *et al.*, 1994, Wu *et al.*, 2013). Alguns exemplos de espécies de *Chryseobacterium* sp., produtoras do que se acredita sejam pigmentos do tipo flexirubina são *C. angstadtii* KM<sup>T</sup>, *C. aquaticum* KCTC 123483<sup>T</sup>, *C. greenlandense* UMB 34<sup>T</sup>, *C. jejuense* DSM 19399, *C. joosteeii* DSM 18212<sup>T</sup>, *C. luteum* DSM 24030<sup>T</sup>, *C. piperi* CTM<sup>T</sup>, *C. shigense* DSM 17126<sup>T</sup>, *C. ureilyticum* sp. nov., *C. gambrini* sp. nov., *C. pallidum* sp. nov., *C. molle* sp. nov., *C. balustinum*, *C. formosense*, *C. taichungense* (Collins *et al.*, 2011; Herzog *et al.*, 2008; Kim *et al.* 2005, Young *et al.* 2005, Shen *et al.*, 2005).

Estudos recentes do gênero *Chryseobacterium* sp., têm documentado a significância dos seus compostos bioativos como agentes de biocontrole, prebióticos, produtores de sulfobacina A, B e proteases (Kamiyama *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2012; Scheuplein *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2011), e relatam atividade antioxidante e antimicrobiana do pigmento característico que o gênero produz (Martinko e Madigan, 2006, Prabhu *et al.*, 2013; Venil *et al.*, 2016<sup>a</sup>-2016<sup>b</sup>, Venil *et al.*, 2017).

### 3.5.2 Gênero *Lysobacter* sp.

A descrição inicial para o gênero *Lysobacter* reportado nos anos 1970 baseou-se em características fenotípicas, onde recentemente o gênero foi reconhecido no filo Proteobacteria com ajuda da taxonomia polifásica (Lee *et al.*, 2006; Weon *et al.*, 2006; Yassin *et al.*, 2007). O gênero *Lysobacter* pertence à família *Xanthomonadaceae* e foi descrita pela primeira vez em 1978 por Christensen e Cook (Christensen and Cook 1978). Espécies de *Lysobacter* são bacilos Gram negativos que comumente se encontram em diversos ecossistemas incluindo solo, rizosfera e

habitats com água fresca (Christensen, Cook, 1978, Hayward *et al.*, 2010). As células de *Lysobacter* sp. são finas, tem alto conteúdo de C+G e capacidade de se deslocar em meio ágar. Inicialmente incluía 4 espécies que foram isoladas de amostras de solo em um lago no Canadá: *L. antibioticus*, *L. brunescens*, *L. enzymogenes*, e *L. gummosus*. Antes da descrição de *Lysobacter* como um gênero separado, os isolados eram confundidos com a myxobacteria *Polyangium* e *Sorangium* (Reichenbach 1992) ou erroneamente identificada como *Xanthomonas* e *Stenotrophomonas* (Christensen e Cook, 1978).

O nome de *Lysobacter* se deve a seus efeitos líticos causados sobre muitos (micro)organismos incluindo fungos, oomycetes, nematóides, algas unicelulares, bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras (Christensen e Cook, 1978, Ryazanova *et al.*, 2005). Seu amplo espectro de atividade lítica é atribuído à produção extracelular de enzimas como proteases e endopeptidases (Ahmed *et al.*, 2003, Bone *et al.*, 1989), glucanases (Palumbo JD *et al.*, 2005), lipases (Ko *et al.*, 2009, Folman *et al.*, 2003) quitinases (Zhang and Yuen 2000; Zhang *et al.*, 2001; Qian *et al.*, 2012), como também elastases, queratinases (Pereira *et al.*, 2014), fosfatases, endonucleases, endoamilases e estereases (Reichenbach, 2006) metabólitos secundários e outros compostos bioativos ainda não conhecidos. Apenas alguns metabólitos correspondentes a seus genes biosintéticos são conhecidos e muitos outros ainda não foram descobertos. Assim, as espécies *Lysobacter* são consideradas como um recurso negligenciado para a descoberta de novos compostos bioativos (Pidot SJ *et al.*, 2014).

De acordo com o manual de Bergey de sistemática de Archaea e Bactérias (Whitman WB, 2015) as espécies de *Lysobacter* sp (*Xanthomonadaceae* fam. Nov.) têm as seguintes características:

- \* Apresentam morfologia de bastonetes finos, 0.2-0.5 × 1.0-15 (às vezes até 70) µm, Gram negativo, não flagelado, deslizante e aeróbio;
- \* As colônias são altamente mucóides, cor creme, rosa ou amarelo;
- \* A maioria das cepas são resistentes a actinomicina D;
- \* Degradam a quitina e outros polissacarídeos, e raramente degradam ágar;
- \* Não degradam a celulose de papel de filtro;

- \* Sintetizam enzimas proteolíticas que ajudam na lisis de uma variedade de micro-organismos (bactérias Gram negativas e Gram positivas, actinomicetos, algas azul-esverdeadas, leveduras, fungos filamentosos e nematóides).

Muitos estudos revelam a importância e aplicação da variedade de compostos antimicrobianos que o gênero *Lysobacter* sp. tem a capacidade de sintetizar como tripopeptin, xanthobaccin, maltophilin, dihydromaltophilin, phenazine, lactivicin (Xie *et al.*, 2012), HSAF (Li *et al.*, 2008) e WAP-8294A2 (fases I/II ensaios clínicos para o controle de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) (Zhang *et al.*, 2011). Ryzaova *et al.* (2005) descreve uma linhagem de *Lysobacter*, *Lysobacter* sp., XL1 que produz lysoamidase, da qual derivou uma droga que tem sido usada para o tratamento de infecções externas causadas por bactérias Gram negativas patogênicas e também acharam como muitos outros trabalhos que é efetivo contra diversos grupos de leveduras e fungos conhecidos.

Por outro lado, vários trabalhos isolaram diferentes espécies de *Lysobacter* sp. como agentes potenciais de biocontrole para fungos patogênicos de plantas (Folman *et al.*, 2004; Kilic-Ekici e Yuen 2003, Islam *et al.*, 2005). A aplicação de *Lysobacter* sp. reduz doenças causadas por vários patógenos em plantas de pepino, feijão, arroz, pimenta, espinafre, tomate entre outros vegetais e alimentos importantes (Puopolo *et al.*, 2014, Postma *et al.*, 2009). Exposito *et al.* (2015) realizaram diversos estudos para elucidar a diversidade e atividade de espécies de *Lysobacter* em solos supressivos de doenças, pois segundo eles até o momento existem poucos dados disponíveis sobre a frequência e diversidade de espécies de *Lysobacter* em habitats naturais e pouco se sabe sobre a ecologia ou o papel determinante desse gênero na promoção do crescimento das plantas e nesses tipos de solos. Aproximadamente 25 espécies de *Lysobacter* estão descritas (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, IJSEM), e algumas poucas sequências incompletas do genoma estão publicamente disponíveis (Puopolo 2014, Zhou 2014).

Estudos futuros devem continuar a pesquisa sobre esse importante gênero de bactérias pigmentadas, devido a seu alto potencial biotecnológico e sua versatilidade em sintetizar vários compostos bioativos de utilidade em indústrias, conservando o meio ambiente (Pidot *et al.*, 2014).

### 3.6 Linhagens de estudo

#### 3.6.1 *Chryseobacterium* sp., KR6

A *Chryseobacterium* sp KR6, isolada de penas de frango é uma bactéria em forma de bastonetes, Gram negativa sem produção de esporos. Suas colônias são de cor amarelo-laranja, circulares, suaves, convexas e brilhantes. Por trabalhos anteriormente realizados se evidenciou a produção de enzimas queratinolíticas com alta atividade o que faz que seja muito efetiva na degradação das penas, sugerindo assim seu potencial em processos biotecnológico envolvendo hidrólises queratinolíticas. Além disso, as queratinases produzidas pela cepa KR6 têm ação sobre uma faixa ampla de valores de pH e temperaturas, o que faz que sejam interessantes para aplicações industriais da enzima. Essa cepa também é produtora de um pigmento cor laranja o qual tem atividade antioxidante. (Riffel *et al.*, 2003, Riffel e Brandelli, 2006; Silveira *et al.*, 2012; Maciel *et al.*, 2017; Riffel *et al.*, 2011)

#### 3.6.2 *Lysobacter* sp., A03

A *Lysobacter* sp A03 e uma bactéria psicrotolerante isolada de penas de pinguim em decomposição coletadas na ilha Elefante na antártica (coordenadas UTM 588094, 3210090, zona 21), em dezembro de 2009 e identificadas com base no sequenciamento de 16S rDNA. De acordo com os trabalhos realizados anteriormente, sabe-se que essa bactéria se adaptada ao frio, possuindo a capacidade de crescer em meio sólido ou líquido de farinha de pena como única fonte de carbono e nitrogênio, nas temperaturas de 9 °C, 20 °C e 30 °C, isto sendo possível devido a produção de proteases queratinolíticas e peptidases de serina.

*Lysobacter* sp, A03 é uma bactéria Gram negativa, com formato de bastonetes finos, não flagelada, mas com a capacidade de se deslizar, altamente mucóide. Suas colônias são pequenas, redondas, elevadas e apresenta uma cor amarelada e brilhante. Quando o pigmento é extraído mostra um amarelo translúcido muito brilhante. (Pereira *et al.*, 2014; Silveira *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2017).

### 3.7 Resíduos Agroindustriais

A maioria dos resíduos agroindustriais tem várias funções e aplicações nos processos biotecnológicos e basicamente servem como fontes alternativas de carbono e nitrogênio de baixo custo. Essas fontes são assimiladas pelo micro-organismos que têm todo o mecanismo genético necessário para sintetizar variedades de enzimas capazes de degradar compostos complexos. Assim elas conseguem se desenvolver, multiplicar e gerar novos metabólicos de interesse biotecnológico. Esta alternativa faz parte das tecnologias limpas, que tem como objetivo minimizar o despejo de resíduos recalcitrantes e poluentes no meio ambiente.

Pelo desconhecimento do potencial que tem vários tipos de resíduos para gerar produtos com valor agregado e baixo custo de produção, no Brasil existe o problema na gestão desses resíduos agroindustriais que dificultam o aproveitamento e muitas vezes são considerados como dejetos inservíveis e jogados no meio ambiente gerando alto impacto ambiental.

Esses recursos são abundantes e altamente renováveis que podem ser processados como matérias-primas e destinados para a produção de novos produtos para diversas indústrias. Apresentam vantagem econômica porque podem ser inseridos em bioprocessos como insumos alternativos e porque estão disponíveis o ano todo em grandes quantidades (Woiciechowski *et al.*, 2013).

Segundo indicadores do IBGE na estatística da produção pecuária publicada em setembro de 2016, no 2º trimestre de 2016 foram abatidas 1,49 bilhão de cabeças de frangos e o peso acumulado das carcaças foi de 3,41 milhões de toneladas no 2º trimestre de 2016. A Região Sul respondeu por 60,7% do abate nacional de frangos no 2º trimestre de 2016, seguida pelas Regiões Sudeste (19,9%), Centro-Oeste (14,0%), Nordeste (3,7%) e Norte (1,6%). São muitas as toneladas de penas que são geradas pelas atividades das indústrias avícolas e consideradas como resíduos, tendo em conta que as penas representam 5-10% do peso corpóreo das aves (IBGE, 2016).

As penas são resíduos altamente recalcitrantes e a elevada produção de frango no país faz com que o acúmulo localizado tenha um incremento rápido ocasionando problemas ambientais por isto a necessidade de criar estratégias

alternativas ao manejo e aproveitamento de resíduos agroindústrias e evitar assim atividades como incineração ou disposição no ambiente o que gera altos custos energéticos e liberação de substâncias tóxicas como liberação e acumulação de amoníaco e ácido sulfúrico no meio ambiente (Daroit e Brandelli, 2014).

As queratinas referem-se a um grupo de proteínas insolúveis e formadoras de filamentos produzidas em certas células epiteliais de vertebrados, e pertencem à superfamília das proteínas intermediárias filamentosas e formam a maior parte da camada córnea da epiderme e os apêndices epidérmicos, como cabelo, unhas, chifres e penas. A cadeia de queratina é fortemente empacotada na  $\alpha$ -hélice ( $\alpha$ -queratina) ou  $\beta$ -folha ( $\beta$ -queratina) numa cadeia polipeptídica superenrolada (Parry e North 1998), o que lhe dá a maior estabilidade mecânica e resistência a enzimas proteolíticas comuns tais como pepsina, tripsina e papaína (Xie *et al.*, 2010).

Estes materiais queratinosos, possuindo um elevado teor de cisteína que os distingue de outras proteínas, são tipicamente duráveis, resistentes e não reativos ao ambiente natural e se assume que fornecem suporte mecânico e diversas funções protetoras na adaptação de vertebrados ao ambiente externo (Fraser *et al.*, 1972; Schweizer *et al.*, 2006).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Bactérias

*Chryseobacterium* sp linhagem KR6 e *Lysobacter* sp. linhagem A03 foram isoladas respectivamente, a partir de penas de frango (Riffel *et al.*, 2003) e de pinguim (Pereira *et al.*, 2014). As linhagens estão armazenadas no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do ICTA - UFRGS e são conservadas em glicerol 20% (v/v) à temperatura de -20°C. As duas bactérias são bacilos Gram negativos sem motilidade, mas com capacidade de se deslizar, apresentam colônias elevadas, altamente mucosas e brilhantes, com borda redonda. Especificamente, as colônias de KR6 são de cor laranja e as colônias de A03 apresentam cor amarela em meio BHI.

### 4.2 Condições do cultivo

Os meios de cultura líquidos utilizados para a produção de biomassa e pigmento de KR6 foram BHI (infusão de cérebro, coração) (37 g/L), meio mineral de farinha de pena com BHI 1% (BHI1%-PENA) e meio mineral de farinha de pena (PENA). Para o pigmento de A03 só foi usado o meio líquido BHI (37 g/L). Das biomassas geradas em 48 h pelas duas linhagens em meio líquido BHI (triplicata) se fizeram os cálculos para conhecer o rendimento do pigmento gerado. O meio mineral de farinha de pena contém farinha de pena (10 g/L) NaCl (0,5 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,4 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,3 g/L).

Para a obtenção dos pigmentos os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min. O inóculo (1 ml), ajustado previamente a uma densidade óptica de 1.0 a 600 nm, foi transferido a 70 ml de meio de cultura num Erlenmeyer de 250 ml e incubados em agitadora orbital a 250 rpm por 48 h. Para KR6 a temperatura de cultivo foi de 30 °C e o pH do meio foi ajustado para 8 e no caso de *Lysobacter* A03 a temperatura foi de 25 °C com pH 7.

#### 4.2.1 Produção de biomassa de KR6 em diferentes meios (tratamentos) sólidos e líquidos.

Se avaliou por triplicata a quantidade de biomassa gerada em 20 ml dos 3 meios mencionados anteriormente em matriz sólida (15 g/L agar) e líquida pela linhagem KR6. Cada 20ml de meio foi inoculado com 1 ml do inóculo e a absorbância dos inóculos foi em média de 0,161 abs a 600 nm. As placas inoculadas foram incubadas a 30 °C e os meios líquidos foram incubados nas mesmas condições anteriormente mencionadas por 24, 48 e 72 h. Também se fez uma varredura espectrofotométrica dos extratos gerados em cada um dos tratamentos.

#### 4.3 Obtenção de biomassa

Após o tempo de incubação, o cultivo foi centrifugado a 16000 g por 10 min a 10 °C e o sobrenadante foi descartado. Os pellets foram lavados 3 vezes com água destilada seguido de centrifugação nas mesmas condições anteriores. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets foram liofilizados durante 2 dias e conservados em dessecador até o momento da extração dos pigmentos sempre cobertos da luz.

#### 4.4 Extração dos pigmentos

O total das biomassas liofilizadas inicialmente foram maceradas manualmente com 3 ml de acetona até virar um pó seco e colocados em banho de ultrassom (Ultrasonic Cleaner USC 700, UNIQUE) suspenso novamente em 2 ml de acetona (volume depende da quantidade de biomassa que se tem) por 10 min a temperatura ambiente ( $23 \pm 2$  °C). A extração foi repetida várias vezes até a biomassa ficar isenta de cor. Para confirmar que o pigmento foi totalmente extraído, na última extração se usaram 2 ml de acetato de etila e 2 ml de metanol caso fosse necessário. As amostras foram centrifugadas 5 min, 16000 g a 10 °C. O sobrenadante que contém o pigmento foi coletado com uma pipeta de vidro em tubo de ensaio, seco com nitrogênio e armazenado a -10 °C. As biomassas e o pigmento seco foram

previamente pesados para calcular o rendimento de produção do pigmento pelas bactérias.

#### 4.5 Teste de KOH 20%

O teste foi realizado sobre o pigmento extraído, coletado em tubo de vidro, e diretamente nas colônias das duas bactérias de interesse colocadas numa lâmina de vidro. Adicionaram-se 3-4 gotas de KOH 20% nas amostras. A mudança reversível de laranja brilhante a uma cor rosa avermelhado, roxo ou marrom indica que se trata de um pigmento tipo flexirubina. Quando não houver mudança de cor pode sugerir que o pigmento é do tipo carotenoide.

#### 4.6 Análise Espectrofotométrica UV-Visível

Foi realizada a varredura espectrofotométrica UV-Vis na faixa de 200-800 nm para assim determinar o comprimento de onda máxima de absorção do pigmento. O espectro eletrônico foi obtido no equipamento da marca Shimadzu-UV-mini 1240, com intervalos de 5 nm, tendo o solvente puro como branco, metanol grau HPLC. Os pigmentos secos foram diluídos em 5 mL de metanol para sua leitura.

#### 4.7 Análise de cor (CIELAB)

Os valores de  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  foram medidos usando o colorímetro da marca Konica Minolta Sensing, Inc. com o sistema de cor CIELAB (Hunter Associates Laboratory Inc., Virginia, EUA).  $L^*$  indica a luminosidade específica que apresenta o pigmento desde 0 (preto) até 100 (branco). Valores de  $b^*$  maiores de 0 representam cor amarela e valores menores de 0 cor azul, para valores de  $a^*$  maiores de 0 representam cor verde e valores menores de 0 cor vermelho ou púrpura. Valores iguais a 0 ( $a^*=b^*=0$ ) representam cor acromática, quer dizer cor cinza. Com esses valores obtidos foram calculados os valores do ângulo de tonalidade ( $Hue^\circ$ ) e Chroma ou saturação do pigmento.

O valor de Chroma denota a saturação ou pureza da cor do pigmento e foi

calculado com a fórmula:

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

O valor do ângulo de tonalidade (Hue<sup>0</sup>) denota 0 para tons vermelhos, 90 para amarelos, 180 para verdes e 270 para azuis e foi calculado com a fórmula:

$$H^0 = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right)$$

Os pigmentos foram acertados a uma absorbância de 1,5 nos comprimentos de ondas 450 nm e 419 nm para os pigmentos extraídos em acetona de KR6 e A03 respectivamente.

#### 4.8 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Arranjo de Diodos acoplado a um Espectro de Massas (HPLC-DAD-MS)

A identificação dos compostos pigmentados foi realizada no HPLC da Shimadzu (Quioto, Japão) equipado com bomba quaternária (LC-20AD), unidade degaseificadora (DGU-20A5), injetor automático e detector de arranjo de diodos (DAD) (SPD-M20A) conectado em série a um espectrômetro de massa (MS) da Bruker Daltonics (modelo Esquire 6000, Bremen, Alemanha), utilizando como fonte de ionização a APCI (*atmospheric pressure chemical ionization*).

Antes da análise, o pigmento seco foi dissolvido em metanol e injetado no HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>. Os compostos foram separados em uma coluna Merck C<sub>18</sub> (5 µm, 250 x 4,6 mm,) com fluxo de 0,9 ml/min a 29 °C, com fase móvel consistindo em água: ácido fórmico (99,9:0,1, v/v) (solvente A) e metanol: ácido fórmico (99,9:0,1, v/v) (solvente B) em gradiente linear de A:B 40:60 (v/v) a 0:100 (v/v) em 20 min; esta composição (0:100, v/v) foi mantida por 10 min, a condição inicial A:B 40:60 (v/v) foi restabelecida em 32 min e mantida por 8 min para condicionamento. Os espectros foram obtidos entre 200 e 600 nm e os cromatogramas processados a 450 nm. Os espectros de massas foram adquiridos com um *scan range* de *m/z* 100 a 1000; e os parâmetros do MS foram os seguintes: fonte APCI no modo de ionização positivo; voltagem do capilar: 4000 V, *end plate offset*: -500 V, temperatura do gás de secagem

(N<sub>2</sub>): 310° C, fluxo: 8 L/min, nebulizador: 30 psi; energia de fragmentação MS/MS: 1,4 V (Rodrigues *et al.*, 2012). Os compostos foram identificados com base nas seguintes informações: ordem de eluição e tempo de retenção dos picos em coluna de fase reversa em relação aos padrões, espectros UV-visível e de massas de dados disponíveis na literatura.

#### 4.9 Análise de espectroscopia por Infravermelho (IR) transformada de Fourier.

O espectro IR da biomassa liofilizada de *Chryseobacterium* sp., e do pigmento parcialmente purificado, foi obtido usando um espectrofotômetro Shimadzu 8300 FTIR (Shimadzu, Kyoto, Japan). As amostras foram colocadas em suportes de KBr para sua análise na faixa de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>, com 132 scans e a resolução foi ajustada em 4 cm<sup>-1</sup>.

#### 4.10 Atividade Antioxidante

Químicos: Trolox (6-hydroxy- 2,5,7,8-tetramethylchroman-2- ácido carboxílico; Sigma Aldrich) foi usado como antioxidante padrão. Trolox (2 mM) foi preparado em etanol para uso de solução padrão. ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-ácido sulfônico) e persulfato de potássio foram da marca Sigma Aldrich.

A análise foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Nenadis *et al.*, 2004 com algumas modificações. ABTS e o persulfato de potássio foram dissolvidos em água destilada para obter uma concentração final de 7 mM e 140 mM, respectivamente. As duas soluções foram misturadas e deixadas a temperatura ambiente no escuro durante 16 h antes da sua utilização para produzir o radical ABTS (ABTS•+). Para o estudo da atividade antioxidante dos pigmentos a solução do radical ABTS foi diluída com água destilada até uma absorbância de 0,70 nm +/- 0,05 nm a 750 nm.

O padrão de trolox (concentração final 100-2000 µM) foi adicionado à solução diluída de ABTS•+ e as leituras das absorbâncias foram realizadas após 6

min depois da reação usando espectrofotômetro.

#### 4.11 Análise estatística

Para o análise da produção de biomassa de KR6 em matriz solida e liquida feita em triplicata os valores de média e desvio padrão foram analisados empregando ANOVA de um e vários fatores. Os analises foram desenvolvidos no software SPSS e as diferenças foram consideradas significativas com uma significância de  $P < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Rendimento de biomassa e pigmento

Após 48 h de cultivo, em média se obtiveram 0,251 g de biomassa de *Chryseobacterium* sp. KR6 que geraram 0,0778 g de pigmento total em meio BHI líquido. Para *Lysobacter* sp. A03 em média se obtiveram 0,200 g o que gerou 0,0525 g de pigmento.

Por outro lado, se obteve um total de 230 mg de pigmento/ L da biomassa gerada por KR6 em 70 ml de meio líquido BHI passadas 48 h. Aruldass e colaboradores usaram *Chryseobacterium artocarp* CECT 8497 para a produção do pigmento tipo flexirubina e obtiveram 1580 mg de pigmento/L em biorreator de 5 litros usando caldo nutritivo. Embora os resultados deste trabalho sejam inferiores existe grande variabilidade na produção de pigmentos bacterianos.

Fatores como condições de cultivo, composição do meio e metabolismo bacteriano influenciam na quantidade de biomassa e pigmentos acumulados durante o cultivo do micro-organismo. Alguns trabalhos afirmam que o conteúdo específico de Flexirubina pode ser altas concentrações de fosfato ou baixo pH. Reichenbach e colaboradores afirmam que esse pigmento se comporta de forma constante na fase logarítmica, mas quando é atingida a fase estacionária tardia o pigmento se vê afetado e sua quantidade decresce (Boze H, Moulin G, Galzy, P. (Eds) 1995. Reichenbach *et al.*, 1974).

### 5.2 Produção de biomassa de KR6 em diferentes meios sólidos e meios líquidos.

#### 5.2.1 Comparação meios Sólido e Líquido com BHI

A análise de variância indicou diferenças significativas entre as médias dos tratamentos avaliados e também diferenças em função do tempo. No meio sólido se obtiveram valores superiores de biomassa (mg/ml), aproximadamente 5 vezes mais biomassa comparado com a quantidade de biomassa gerada em meio líquido (Figura

5).

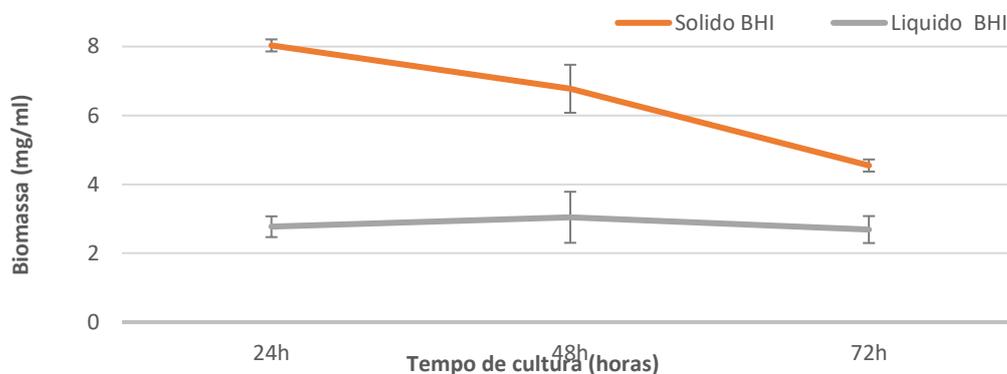


Figura 5. Crescimento de *Chryseobacterium* sp., KR6 (mg/ml) em função do tempo (h) em meio BHI sólido e líquido.

Durante o cultivo no meio líquido, não se observaram diferenças significativas nos valores de biomassa obtida em função do tempo.

No meio sólido se evidenciou uma diminuição na quantidade de biomassa em função do tempo, isto possivelmente pelo pouco espaço disponível depois das 24 h de crescimento. Além disso as condições no meio sólido podem-se tornar desfavoráveis para o crescimento da bactéria. A taxa de crescimento específico decresce do máximo e o cultivo entra numa fase de desaceleração. A acumulação de compostos sólidos, a limitação de oxigênio ou redução de pH são umas das condições que afetam o desenvolvimento exponencial esperado do micro-organismo (Gow e Gadd 1995).

### 5.2.2 Comparação meios Líquidos com Farinha de Pena

Nesse experimento não é possível comparar diretamente a quantidade de biomassa gerada em função do tempo porque o peso da farinha de pena adicionada aos dois meios interfere nessa medição. Ao analisar os dados observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos testados enquanto a produção de biomassa porque os dois tratamentos se comportaram da mesma forma em função do tempo (Figura 6) o que indica que adicionar 1% de BHI ao meio não melhora

significativamente o crescimento da bactéria.

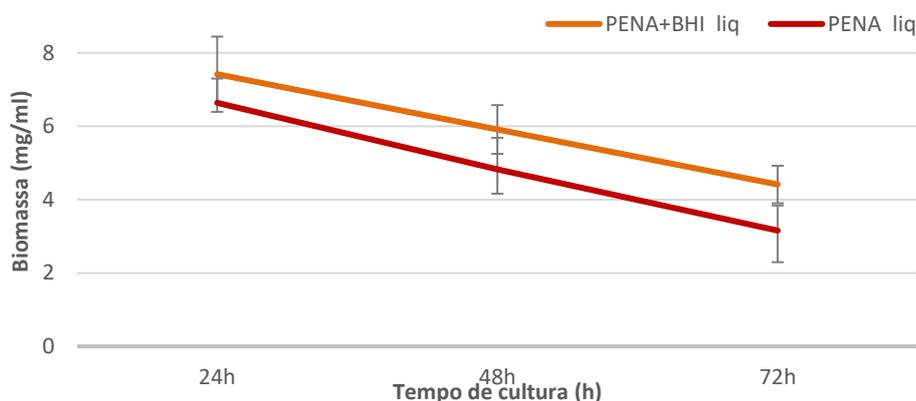


Figura 6. Crescimento de *Chryseobacterium* sp., KR6 (mg/ml) em função do tempo (h) em meio líquido de BHI1%-PENA e PENA.

A diminuição do peso em função do tempo pode também ser explicada pelas condições adversas no meio depois de 24h resultando em uma desaceleração da taxa de crescimento. Possivelmente nas primeiras 24h o micro-organismo utilizou os nutrientes 20ml de meio que tinha disponíveis e esgotou os nutrientes necessários para as próximas h de cultivo.

### 5.2.3 Comparação meios Sólidos com BHI, BHI1%-PENA e PENA.

Teve diferencia significativa na quantidade de biomassa gerada em cada um dos tratamentos com uma significância de 0.05%. O meio solido BHI apresentou maior quantidade de biomassa, gerando de 4 a 7 vezes mais biomassa que os outros tratamentos, seguido por o tratamento de BHI1%-pena e por último o que teve menor quantidade de biomassa gerada foi o meio mineral farinha de pena (PENA) (Figura 7).

Se propus comprar e analisar a quantidade de biomassa gerada nos 3 meios já mencionados em estado líquido e solido, já que nos meios líquidos que contem farinha de pena não é possível saber a quantidade de biomassa gerada o que dificulta a obtenção de resultados sobre o rendimento do pigmento em função da biomassa. Kr6 por ser uma bactéria queratinolíticas consegue se desenvolver nos meios com pena, mas ainda assim a formulação do meio não é a ótima para o crescimento dela e produção de biomassa.

A utilização do meio solido pode ser uma alternativa para gerar grandes

quantidades de biomassa nas primeiras 24 h evitando assim a espera de 48h em meio líquido sim afetar a quantidade de pigmento gerado pois há estudos que afirmam que na fase logarítmica o conteúdo do pigmento não muda significativamente. É necessário otimizar os meios com farinha de pena para aumentar a quantidade de biomassa aproveitando assim a atividade queratinolítica da bactéria e diminuir custos do uso de meios sintéticos (Hantsis-Zacharovl E, Halpern M. 2007; Fautz e Reichenbach 1980; Krieg NR (EDs) 2011).

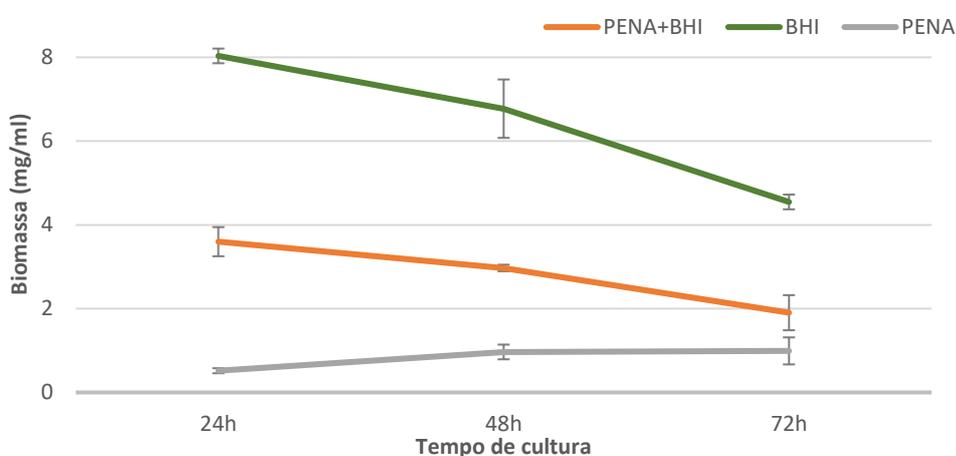


Figura 7. Crescimento de *Chryseobacterium* sp., KR6 (mg/ml) em função do tempo (h) em meio BHI sólido e líquido.

### 5.3 Espectrofotometria UV- vis do extrato de KR6 produzido em cada tratamento.

Para os 3 tratamentos analisados o comprimento de onda que apresentou maior absorbância foi de 450 nm. A intensidade da absorbância (mAU) varia dependendo do tipo do tratamento e neste caso isso pode indicar que a presença do pigmento depende da quantidade de biomassa gerada em cada um deles. Em condições de cultivo rico em nutrientes (BHI) a linhagem KR6 consegue gerar mais biomassa após 48 h em comparação com os cultivos que tem BHI1%-PENA ou em meio PENA (Figura 7).

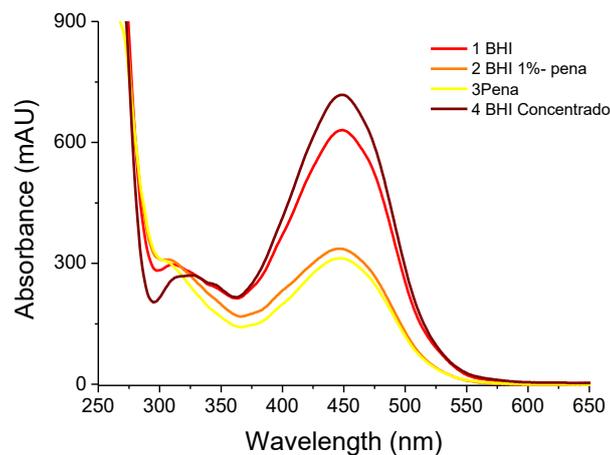


Figura 8. Varredura espectrofotométrica dos pigmentos totais extraídos de KR6 em 3 meios de cultura. — : Pigmento gerado em meio BHI, — : Pigmento gerado em meio BHI1% - Pena e — : Pigmento gerado em meio Pena.

#### 5.4 Biomassas obtidas para extração.

As linhagens foram semeadas em ágar BHI. Na figura 8 se evidenciam as diferenças na cor das colônias das duas linhagens de estudo. Nas figuras 8A as primeiras duas placas *Lysobacter* sp., A03 apresentando colônias de cor amarelo em meio BHI e Luria Bertani respectivamente. Na última placa *Chryseobacterium* sp., KR6 com colônias alaranjadas. As figuras 8B e 8C são as biomassas liofilizadas da KR6 e A03 respectivamente, apresentando suas colorações características.

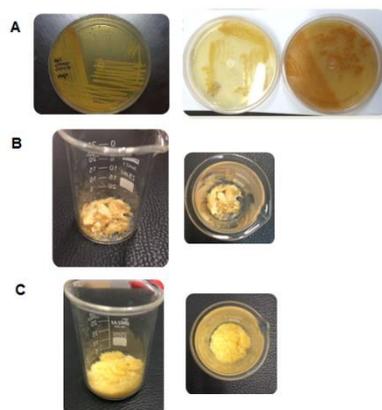


Figura 9. Isolados das linhagens de A03 e KR6 em ágar BHI respectivamente, B: biomassa liofilizada de KR6 em meio líquido BHI e C: biomassa liofilizada de A03 em meio líquido BHI.

## 5.5 Pigmentos extraídos das duas linhagens.

O método de extração aplicado extraiu o pigmento das biomassas liofilizadas com facilidade. A acetona é o solvente mais comum para a extração desse tipo de pigmentos, seguido por solvente como metanol e acetato de etila (Wang *et al.*, 2013; Venil *et al.*, 2016; Fautz e Reichenbach, 1980; Schöner *et al.*, 2014). Neste trabalho se evidenciou que o processo de maceração inicial facilita a ruptura das células obtendo um pó mais homogêneo o que resulta em maior superfície de contato da biomassa com o solvente e uma rápida extração (Figura 9).

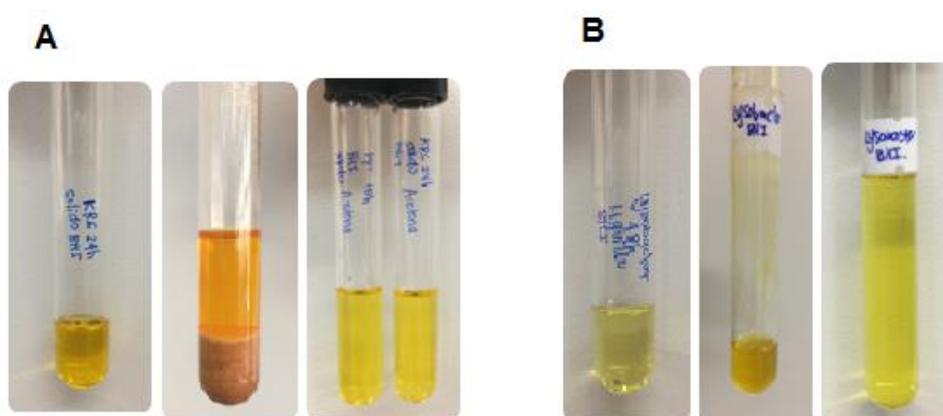


Figura 10. A: Pigmentos de Kr6 extraídos com acetona. B: Pigmentos de A03 extraídos com acetona.

## 5.6 Teste de KOH 20%

O pigmento extraído da linhagem KR6 apresentou resultado positivo no teste de KOH. Observou-se uma mudança rápida de amarelo para uma cor vermelha quando adicionadas as gotas da solução alcalina (ver figura 10). Quando testado diretamente nas colônias de KR6 também teve uma mudança de cor, de laranja (cor original da colônia) para vermelho (ver figura 10).

Vários autores relatam a mesma mudança, o que indica que o tipo de pigmento deve ser do tipo flexirubina. Esse teste pode detectar características diferenciais a nível filogenético de *Chryseobacterium* sp., já que a maioria das espécies de *Chryseobacterium* (previamente chamado *Flavobacterium*, família

*Flavobacteriaceae*) e gêneros membros da família *Flavobacteriaceae* se caracterizam pela presença do pigmento do tipo flexirubina (Hantsis-Zacharovl E, Halpern M. 2007; Fautz e Reichenbach 1980; Krieg NR (EDs) 2011).

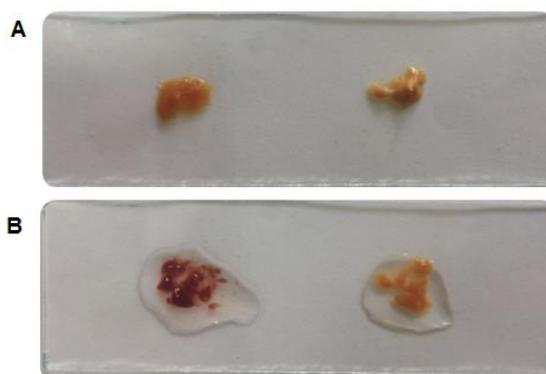


Figura 11. A: Biomassa tomada de BHI de KR6 (esquerda) e A03 (direita) nas suas condições originais. B: Biomassa de KR6 com mudança rápida de cor e biomassa de A03 sem mudança nenhuma com adição de KOH 20%.

A mudança reversível da coloração (alteração batocrômica) acontece pela desprotonação dos grupos hidroxila presentes nos anéis aromáticos. Embora o resultado do teste de KOH tenha sido positivo, é necessário considerar que alguns tipos de sulfonolipídeos como os de *Xanthomonas* spp., ou carotenóides fenólicos podem apresentar elementos estruturais similares e dar uma reação positiva enganosa (Fautz e Reichenbach 1980, Bernardet *et al.*, 2005, Chaudhari *et al* 2009).

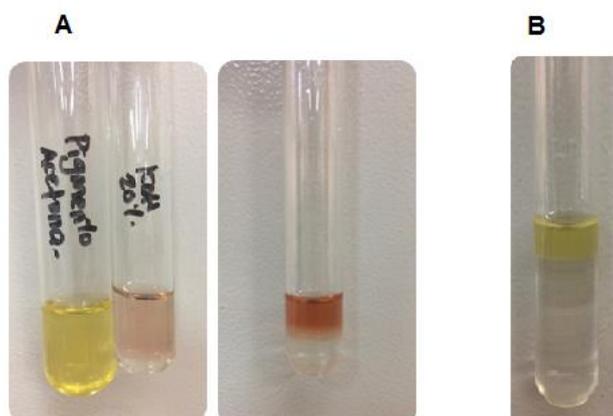


Figura 12. Pigmentos extraídos com acetona A. Pigmento de KR6 antes e depois de adicionar a solução alcalina (KOH 20%). B. Pigmento de A03 depois de adicionar a solução alcalina (KOH 20%).

No caso das colônias de A03 e o pigmento extraído da mesma, não foi observada nenhuma mudança de cor o que pode indicar que esse pigmento não é do tipo flexirubina pois em pH alcalino não há mudança de cor. Num processo de saponificação realizado previamente neste trabalho indicou que não se trata de carotenoides, já que no processo de saponificação o pigmento se degrada e perde sua cor característica quando lavado com água destilada para neutralizar o pH.

Espécies de *Lysobacter* sp são conhecidas por produzir pigmentos de cor marrom escura solúveis em água conhecidos como melanina, que brindam fotoproteção sob condições de exposição à luz ultravioleta (Fukuda *et al.*, 2013, Qian *et al.*, 2014).

Por outro lado, há autores que descrevem um pigmento de cor amarela extraído de espécies de *Lysobacter* sp., que foi identificado como pigmento do tipo xantomonadina. Wang *et al* (2013) apresenta resultados sobre o pigmento isolado de *Lysobacter enzymogenes* e confirma que são metabólitos de aril polieno semelhantes a xantomonadina. *Lysobacter* sp., compartilha uma elevada similaridade fenotípica com *Xanthomonas* spp., e apresenta produção de um pigmento amarelo unido na sua membrana externa, mas há poucos estudos que confirmem o tipo de pigmento e sua verdadeira estrutura química a qual não foi determinada até agora (Qian *et al.*, 2013). Não há estudos que indiquem que espécies de *Lysobacter* sp., produzem pigmentos carotenoides ou do tipo flexirubina.

## 5.6 Análise Espectrofotométrica UV-Visível

### 5.6.1 Pigmento de *Chryseobacterium* sp., KR6

O pigmento analisado não apresentou a estrutura fina no espectrofotômetro típico de carotenoides. Apresentou um comprimento de onda máximo de 450nm em acetona, resultado que se repete em vários outros trabalhos onde analisam pigmentos alaranjados extraídos de espécies de *Chryseobacterium* sp. Por exemplo o pigmento da linhagem *Chryseobacterium* sp. UTM-3T estudada por Venil e colaboradores (2014) também exibiu absorvância máxima a 450 nm quando extraído com acetona. (Venil *et al.*, 2014; Andrewes *et al.*, 1976; Wang *et al.*, 2013; Schöner *et al.*, 2014; Schöner *et al.*, 2016).

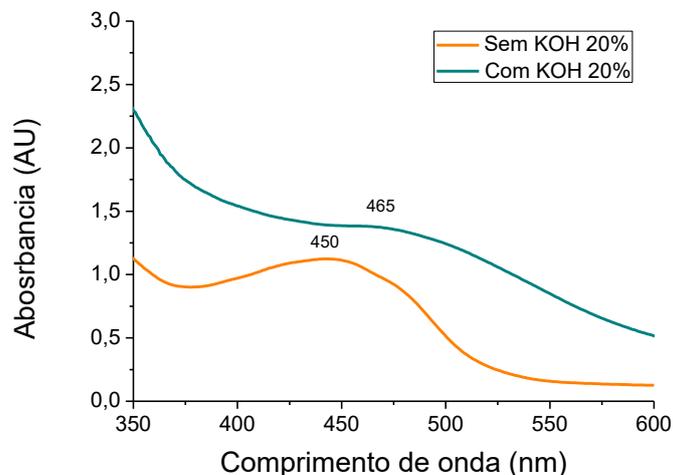


Figura 13. Espectros de UV- visível do pigmento extraído de KR6 e mudança batocrômica pela adição de KOH 20%.

Adicionalmente, analisou-se a mudança de cor por espectrofotometria de UV-visível para monitorar alterações no comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{max}$ ). O valor de  $\lambda_{max}$  para o pigmento antes da adição de KOH foi de 450 nm, como observado anteriormente, e após à adição da base o valor de  $\lambda_{max}$  deslocou-se para 465 nm, com um aumento de 15 nm (Figura 12). A alteração do valor de  $\lambda_{max}$  após adição de uma base forte pode ser um indicativo para estimar o tamanho da cadeia do polieno associado a estrutura do pigmento. Há pigmentos de tipo flexirtubina que apresentaram um aumento de um aumento de 25 nm o que indicaria que a molécula tem de 6 a 8 carbonos conjugados na sua estrutura (Herz et al., 1987).

### 5.6.2 Pigmento de *Lysobacter* sp., A03

O pigmento extraído da biomassa gerada após 48 h em meio BHI líquido apresentou maior absorvância nos comprimentos de onda de 419 nm e 427 nm nos solventes acetona e clorofórmio, respectivamente. O espectro de UV-visível gerado apresentou banda largas, em contraste com a estrutura fina que os pigmentos do tipo

carotenoide geralmente apresentam (Figura 14).

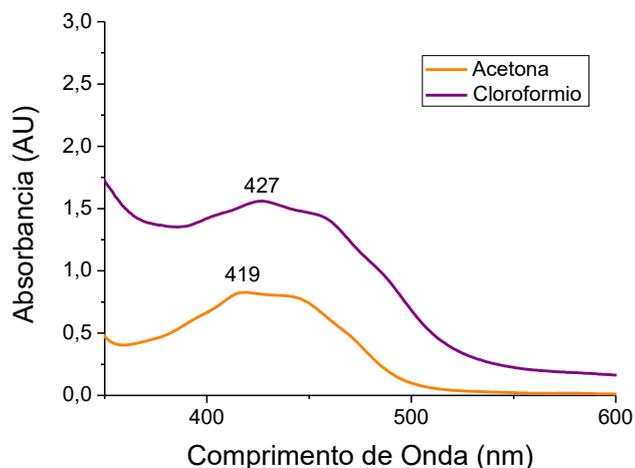


Figura 14. Espectro uv- visível do pigmento de *Lysobacter* sp., A03 em acetona e clorofórmio.

Alguns autores relatam comprimentos de onda no intervalo de 415 a 460 nm em diferentes tipos de solventes para pigmentos extraídos de *Xanthomonas* sp. Especificamente, os comprimentos de onda de absorção máxima foram 430 nm e 450 nm para pigmentos amarelos de *Lysobacter* sp. extraídos com clorofórmio, muito parecidos com os comprimentos de onda apresentados por pigmentos do tipo xantomonadina (Andrewes *et al.*, 1976). Wang e colaboradores (2013) obtiveram comprimentos de onda entre 430 nm e 460 nm para pigmentos extraídos de várias linhagens de *Lysobacter* sp.

Outros estudos analisaram pigmentos de cor amarela extraídos de bactérias do filo *Proteobacteria* pelo método de HPLC-UV-MS e obtiveram comprimentos de onda de 430 nm (solvente metanol) e 420 nm. Os autores reportaram a estrutura química elucidada como um pigmento do tipo xantomonadina e propõem que é um pigmento aril-polieno híbrido /dialquil-resorcinol (Schöner *et al.*, 2014; Schöner *et al.*, 2016).

Não há estudos que confirmem que os pigmentos produzidos pelas bactérias do gênero *Lysobacter* sp., sejam do tipo xantomonadina poucos estudos sobre esse pigmento amarelo produzido por espécies de *Lysobacter* sp.

## 5.7 Análise de cor (CIELAB)

No comprimento de onda de 450nm com 1.5 de absorvância previamente estabelecidos, os dois pigmentos extraídos foram analisados por colorimetria. Os valores obtidos para os parâmetros colorimétricos do sistema CIELAB são apresentados na Tabela 1.

Os valores de  $L^*$  para os dois pigmentos foram altos o que indica uma luminosidade alta, perto do branco. Os valores de  $a^*$  foram negativos ou menores de 0 indicando cores próximas ao amarelo e verde e não para cores vermelhas. Os valores de  $b^*$  deram positivos o que também confirma que os dois pigmentos estão próximos à cor amarela. O Chroma ou saturação dos pigmentos foi 43,14 e 33,64 para KR6 e A03 respectivamente e o ângulo Hue foi de 78,59 e 73 respectivamente, o que também representa cores nas regiões amarelas.

Nos trabalhos feitos por Venil e Aruldass e colaboradores (2014-2015) avaliaram a cor de pigmentos tipo flexirubina extraídos de *Chryseobacterium* sp. Os autores utilizaram para análise uma faixa de absorvância entre 1.0 e 2.0 a 450 nm. Os valores de  $L^*$ ,  $b^*$  e chroma foram baixos, mas o valor de  $a^*$  também obtiveram um valor negativo (Tabela 2). Para o ângulo Hue obtiveram um valor de 77,39 e 84,37 assim, o pigmento encontrasse nas regiões dos tons amarelos resultado que se repete neste trabalho. O valor de  $L^*$  indica a luminosidade do pigmento e isso pode variar pela absorvância estabelecida previamente da análise de cor assim como a saturação ou pureza (Chroma).

Tabela 1. Valores Colorimétricos dos pigmentos extraídos em acetona de KR6 e A03 e de pigmentos do tipo Flexirubina extraídos de linhagens de *Chryseobacterium* sp., publicados em outros trabalhos.

Pigmentos	CIELAB sistema de cor.				
	$L^*$	$a^*$	$b^*$	Chroma	Hue°
<i>Chryseobacterium</i> sp., KR6	76,57	-8,53	42,29	43,14	78,59
<i>Lysobacter</i> sp., A03	77,43	-9,77	32,19	33,64	73
Venil <i>et al.</i> , 2014	<b>3,58</b>	<b>-1,21</b>	<b>4,41</b>	<b>5,543</b>	<b>77,39</b>
Aruldass <i>et al.</i> , 2016	2,6	0,34	3,45	3,47	84,37

## 5.8 Análise por HPLC-DAD-MS

### 5.8.1 Pigmento de *Chryseobacterium* sp., KR6

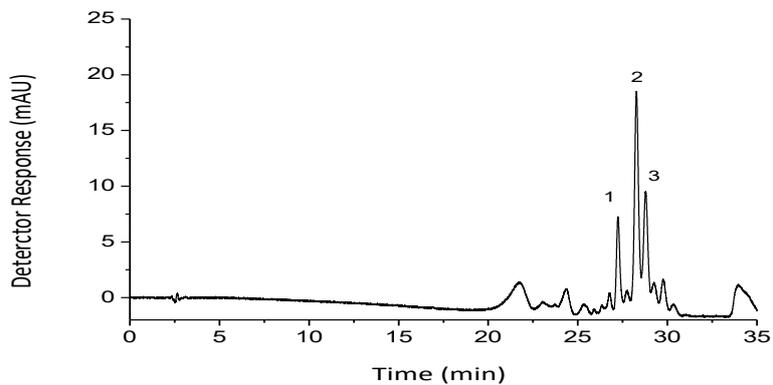
Os pigmentos extraídos com acetona foram analisados por HPLC-DAD. Com a metodologia utilizada se logrou uma separação dos compostos do extrato. Os pigmentos gerados em cada tratamento apresentaram 3 picos majoritários com tempos de retenção iguais o que indica que nos 3 tratamentos ou meios avaliados se gera o mesmo tipo de composto pigmentado. A figura 11 apresenta os cromatogramas do pigmento extraído com acetona das biomassas de KR6 produzidas após 48 h nas condições já mencionadas (Figura 15, Tabela 3).

A diminuição da área e da porcentagem da área dos 3 picos apresentados em cada tratamento indica uma menor quantidade do pigmento extraído. Os tratamentos com poucos nutrientes geraram menos biomassa o que resultou em menos quantidade de pigmento. As áreas do pico 3 em meio líquido PENA não foram detectadas. A amostra não tinha a concentração adequada de pigmento para gerar um sinal mais definido, isto provavelmente pelo fato de ter pouco crescimento da bactéria passadas 48 h o que gerou pouco pigmento total.

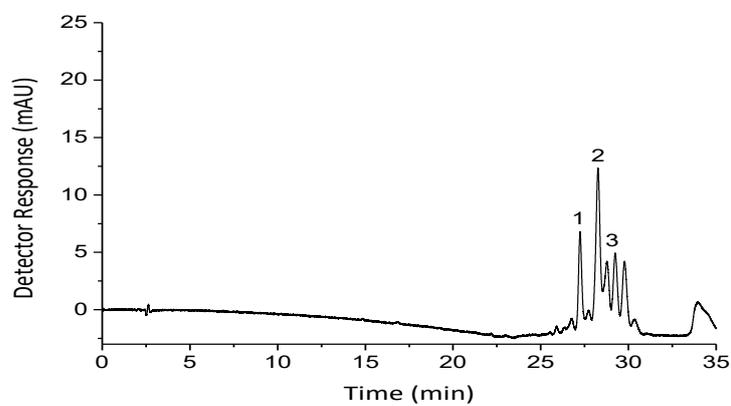
As massas obtidas foram  $m/z$  557  $[M+H]^+$  seguido por uma massa de  $m/z$  608  $[M+H]^+$  e  $m/z$  569  $[M+H]^+$ . Mesmo com esses dados não foi possível propor a estrutura molecular dos componentes pelo que é necessário realizar um processo que ajude na purificação do pigmento.

Cada um dos picos encontrados nos tratamentos, apresentaram espectros de UV-visível perto do comprimento de onda esperado (450 nm). A pequena variação no comprimento de onda depende no número de carbonos conjugados na cadeia principal da estrutura química.

**A**



**B**



**C**

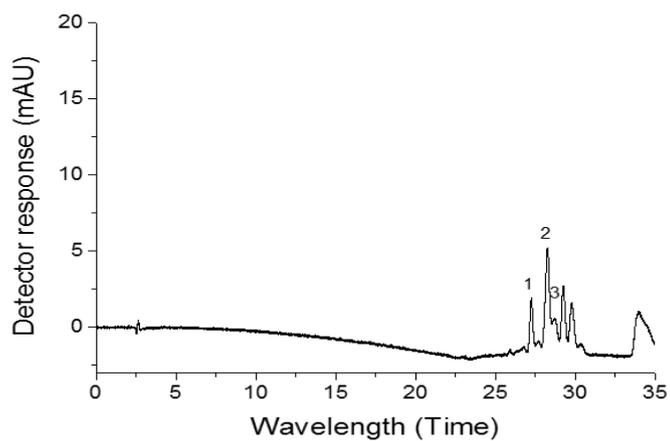


Figura 15. Cromatogramas (450nm) obtidos por HPLC-DAD do pigmento da KR6. A: tratamento BHI, B: tratamento BHI 1%- PENA, C: tratamento PENA.

Tabela 2. Dados de tempo de retenção (TR), comprimento de onda (nm) área e % de área de cada um dos picos que apresentaram os pigmentos extraídos em cada tratamento de KR6.

Tratamento	TR(min)	nm	Pico	Área	% Área
<b>1 Caldo BHI</b>	27.231	442	1	123223	10.66
	28.262	450	2	331125	28.65
	28.780	448	3	195519	16.92
<b>2 Caldo BHI1%- MFP</b>	27.241	447	1	122855	11.77
	28.263	450	2	263859	25.29
	28.759	447	3	128614	12.33
<b>3 Caldo MFP</b>	27.244	445	1	41057	14.79
	28.248	447	2	89221	32.14
	28.784	450	3	ND	ND

### 5.8.2 Pigmento de *Lysobacter* sp., A03

O pigmento extraído com acetona foi analisado por HPLC-DAD-MS. A metodologia para a separação dos compostos do pigmento de A03 não foi a adequada o que dificultou a obtenção de picos definidos (Figura 16). Se lograram detectar 4 picos maioritários (Tabela 4) e só foi possível obter um dado sobre a massa do pico maioritário que apresentou massa de  $m/z$  728  $[M+H]^+$ . Não foi possível calcular a massa da molécula do pigmento e é preciso realizar processos de purificação. A detecção de mais de um pico com comprimentos de onda diferentes e o sinal detectado pode ser devido a que o composto extraído de A03 tem mais de um pigmento e algum deles apresenta características do pigmento tipo xantomonadina. Wang e colaboradores descrevem um pigmento amarelo extraído de *Lysobacter enzymogenes* e o dado obtido na espectrometria sugere que o pigmento pertence a estrutura dos aril- polienos tipo xantomonadina (Wang *et al.*, 2013).

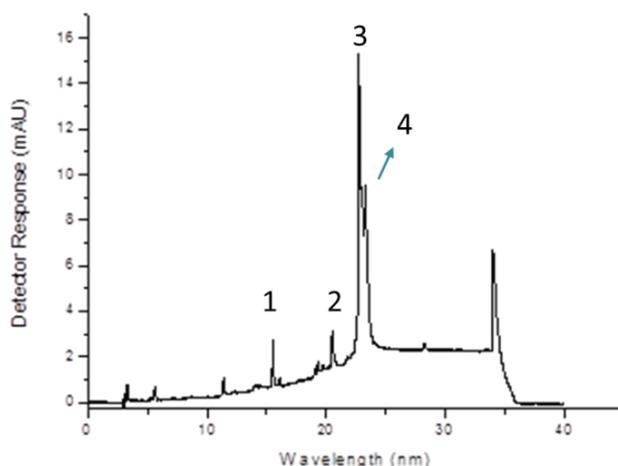


Figura 16. Cromatograma (processado a 419 nm) obtido por HPLC-MS do pigmento de A03 crescido em BHI.

Tabela 3. Dados de tempo de retenção (TR), comprimento de onda (nm) área e % de área de cada um dos picos que apresentou o pigmento extraído de A03 em meio BHI.

Pico	TR(min)	nm	Area	% Area
1	11.377	424	7448	1.753
2	15.521	424	15037	3.539
3	20.503	414	13625	3.207
4	22.726	425	388815	91.502

### 5.9 Análise de espectroscopia por Infravermelho

Esta análise foi realizada com a biomassa liofilizada e o pigmento bruto (sem purificação) extraído de *Chryseobacterium* sp. KR6. Os espectros obtidos da biomassa (A) não apresentaram os picos específicos de flexirubina devido à grande quantidade de compostos presentes na amostra e a sua característica pastosa, o que dificultou a sua distribuição no suporte de KBr e a sua medição. Não entanto, no espectro do pigmento parcialmente purificado (B) foi possível identificar os picos dos principais grupos funcionais da flexirubina (Figura 17).

Os picos de 2921 e 2848  $\text{cm}^{-1}$  são característicos da ligação C-H encontrada na cadeia poli-insaturada e no anel aromático. O pico obtido em 1733  $\text{cm}^{-1}$  corresponde ao estiramento da ligação C=O do éster que liga o fenol com a cadeia de carbonos conjugados e o pico a 1466  $\text{cm}^{-1}$  é característico do anel aromático do fenol. Adicionalmente a estes picos encontrados no espectro do pigmento parcialmente purificado, observou-se um pico em 718  $\text{cm}^{-1}$ , que poderia corresponder a ligação C-Cl, o que indicaria uma flexirubina do radical Cl no anel de resorcinol. Venil e colaboradores (2014) purificaram um pigmento tipo flexirubina de *Chryseobacterium* sp. UTM-3T, e identificaram no espectro infravermelho do pigmento picos intensos a 1737 e 1217  $\text{cm}^{-1}$ , característicos das ligações C-O. Além disso, encontraram uma banda de absorção entre 893 e 526  $\text{cm}^{-1}$ , que de acordo com os autores, é característico dos pigmentos tipo flexirubina.

A estrutura química básica desse pigmento pode ter modificações pela variação no comprimento e ramificações das cadeias de hidrocarbonetos no resorcinol e pela introdução de substituintes adicionais de fenil e cloro especificamente no anel dialquil-resocinol (Zophel *et al.*, 1991 Achenbach 1987b, Achenbach *et al.*, 1983). Diferente cloração nos anéis alifáticos são encontradas em cada micro-organismo produtor de flexirubina. Assim, pode surgir uma grande variedade de pigmentos tipo flexirubina, segundo Stafsnes e Bruheim (2013).

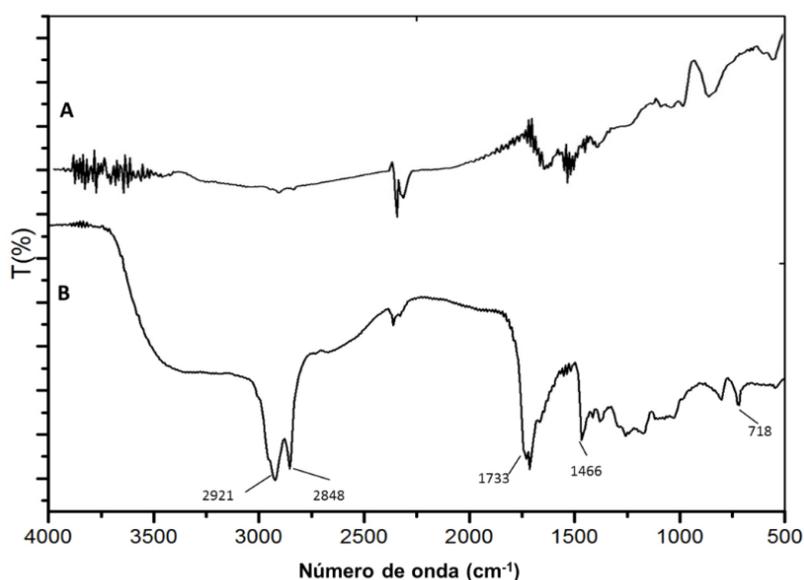


Figura 17. Espectro infravermelho de (A) Biomassa liofilizada de *Chryseobacterium* sp., (B) pigmento parcialmente purificado.

Devido a limitada literatura existente de espectros infravermelhos deste tipo de pigmentos, é difícil realizar uma comparação mais precisa. Além disso, o grau de purificação obtido até o momento afeta a identificação de bandas específicas por sobreposição de bandas de lipídeos presentes na amostra do pigmento parcialmente purificado.

#### 5.10 Atividade antioxidante

Os pigmentos extraídos das duas linhagens apresentaram atividade antioxidante. Obteve-se uma redução do radical ABTS de 85% e 62% dos pigmentos parcialmente purificados de KR6 e A03, respectivamente. Os valores calculados como equivalentes de Trolox (mM) foram semelhantes aos obtidos por Miller e colaboradores (1996). Os autores avaliaram a atividade antioxidante por eliminação do cátion radical ABTS por carotenoides e xantofilas (Tabela 4).

Tabela 4. Capacidade antioxidante equivalente Trolox (CAET mM) de carotenoides (adaptado de Miller et al., 1996) e dos pigmentos em estudo.

<b>Carotenoides</b>	<b>CAET mM</b>
Caroteno	1.3
Astaxantina	0.03
Beta Caroteno	1.9
Cantaxantina	0.02
Cryptoxantin	2
Echinenona	0.7
Licopeno	2.9
Luteína	1.5
Zeaxantina	1.4
<b>Pigmentos de estudo</b>	<b>CAET mM</b>
Pigmento A03	1.07
Pigmento KR6	1.4

Venil e colaboradores (2016) confirmaram a atividade antioxidante por DPPH de um pigmento tipo flexirubina de uma linhagem de *Cryseobacterium* sp. Além disso, notaram que o pigmento microencapsulado apresentou maior proteção contra

a oxidação e atribuem essa atividade às propriedades anfífilas dos constituintes fenólicos. Se assume que um incremento no número de grupos hidroxilo no fenol realça a capacidade do doador de hidrogênio e a inibição da oxidação. Portanto, o pigmento encapsulado teve maior atividade antioxidante comparado com o não encapsulado.

Outro estudo realizado também confirma a atividade antioxidante do pigmento isolado de *Fontibacter flavus* YUAB-SR-25 que pertence à família das *Cyclobacteriaceae* (filo Bacteroidetes) e membro do gênero *Cytophaga*. Eles classificaram o pigmento como carotenoide do tipo flexirubina. O pigmento mostrou atividade antioxidante significativa em caso da eliminação de DPPH e do radical hidroxil, inibição da peroxidação lipídica e redução de óxido nítrico. Essa forte inibição dos radicais poderia inibir ou evitar eventos patofisiológicos incluindo inflamações, distúrbios celulares e sistêmicos (Prabhu *et al.*, 2013).

Prabhu e colaboradores (2013) sugerem que pigmentos do tipo flexirubina provavelmente pode ser uma fonte de antioxidante natural e pode ser promissor para a utilização em suplementos alimentícios e na indústria da saúde.

A atividade antioxidante dos pigmentos em estudo, que estão sendo considerados como APE-DAR, são atribuídos pelos grupos fenólicos OH presentes nas suas estruturas e também pela cadeia de carbonos com ligações duplas conjugadas. Pelo menos *in vitro*, todos os APE e híbridos APE-DAR devem apresentar proteção contra o dano foto oxidativo e peroxidação lipídica porque cada um contém um sistema de ligação dupla conjugado que é o principal responsável por sua função protetora.

## 6. CONCLUSÃO

As análises realizadas neste trabalho revelaram que no composto pigmentado produzido por *Chryseobacterium* sp. KR6 e do tipo flexirubina. Considerando que a linhagem é do gênero *Chryseobacterium* sp., e o pigmento apresenta mudança de cor em pH básico, um valor de  $\lambda_{max}$  de 450 nm e fácil extração com acetona, acredita-se que no composto extraído há um pigmento que cumpre com as características do pigmento laranja-amarelado tipo flexirubina descrito por vários autores. É necessário realizar a purificação do composto pigmentado e avaliar outros protocolos de HPLC-DAD-MS para ter uma melhor separação dos compostos, eliminar ou evitar interferências na leitura e elucidar as estruturas moleculares dos pigmentos nele.

As análises de rendimento de biomassa só foram feitas com a bactéria *Chryseobacterium* sp., KR6 já que teve melhor desenvolvimento durante o tempo do trabalho. Não foram feitos para *Lysobacter* A03 por problemas de crescimento durante o trabalho. Pelos resultados obtidos da comparação da utilização de meios líquidos ou sólidos se consideram importantes e possivelmente aplicáveis já que apresentaram quantidades significativamente altas quando os cultivos foram feitos em meio sólido. É preciso realizar a otimização com meio mineral farinha de pena aplicando alguns componentes que indução a produção específica do pigmento.

As análises realizadas demonstraram que o pigmento produzido por *Lysobacter* sp. A03 não é do tipo carotenoide nem do tipo flexirubina. O teste em solução alcalina não apresentou mudança nenhuma, degradação em processos de saponificação e máximo comprimento de onda de 419 e 427nm. O pigmento pode ser do tipo xantomonadina, mas é necessário realizar a purificação e testar outros protocolos de HPLC para elucidar sua estrutura química e ter certeza que se trata de um pigmento só. O pigmento também apresentou atividade antioxidante o que também é característico desse pigmento.

É necessário continuar com a caracterização dos compostos pigmentados extraídos das duas bactérias já que além de apresentar atividade antioxidante possivelmente também tenha atividade antimicrobiana como já foi descrito na literatura. Também se devem realizar testes de estabilidade frente a fatores como

temperatura e luz. Segundo autores a flexirubina se caracteriza por ser mais estável frente a esses fatores comparado com outros pigmentos do tipo carotenoide.

Pigmentos como flexirubina e xantomonadina estão começando a ser mais estudados, há muita informação e trabalhos que propõem algumas estruturas químicas de vários tipos de pigmentos com características químicas de aril polienos e as variações que pode ter a molécula. Há muitos protocolos sobre como extrair e identificar, mas nenhum desses processos foi padronizado para realmente poder realizar e comparar resultados. Há estudos que descrevem os pigmentos do tipo flexirubina como uma classe única de carotenoides que contem na sua estrutura cadeias ramificadas como substituição no alquilo terminal (Achenbach *et al.*, 1978a; Prabhu *et al.*, 2013).

Outros estudos afirmam que os tipos flexirubina não fazem parte na classificação dos carotenoides e sim são um outro grupo de pigmentos com algumas similaridades estruturais. Muitos estudos ainda estão tentando dilucidar e confirmar as estruturas químicas que podem apresentar esse tipo de pigmentos e conhecer as possíveis aplicações além de ter atividade antioxidante e antimicrobiana.

## 7. REFERÊNCIAS

- ACHENBACH H, BÖTTGER-VETTER A, HUNKER D, FAUTZ E, REICHENBACH. Investigations on the biosynthesis of flexirubin the origin of benzene ring b and its substituents. **Tetrahedron** Vol 39. No 1. Pp 175-185, 1983.
- ACHENBACH H, KOHL W, REICHENBACH H. The flexirubin-type pigments-a novel class of natural pigments from gliding bacteria. **Revista Latinoamerica de Quimica**, 9, 111-124, 1978a.
- ACHENBACH H, KOHL W, WACHTER W, REICHENBACH H. New flexirubin-type pigments. **Archives of Microbiology**, 117: 253–257, 1978b.
- ACHENBACH, H. The Pigments of the Flexirubin-Type. A Novel Class of Natural Products. **Fortschr Chem Org Naturst**, 52: 73-111, 1987
- AGUILAR CN, RODRIGUEZ-HERRERA R, MARTINEZ-AVILA C, MONTANEZ-SAENZ J,HERNANDEZ-ALMANZA A. Carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* YB-252 in solid-state fermentation. **Food Bioscience**, Volume 7, September 31-36, 2014.
- AHMED K, CHOHNAN S, OHASHI H, HIRATA T, MASAKI T, SAKIYAMA F. Purification, bacteriolytic activity, and specificity of beta-lytic protease from *Lysobacter* sp., IB-9374. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 95(1):27–34, 2003.
- ANDREWES A.G, HERTZBERG S, LIAAENDEMEN S, STARR MP. *Xanthomonas* Pigments. 2. The Xanthomonas "Carotenoids" --- Non-Carotenoid Brominated Aryl-polyene Esters. **Acta Chemica Scandinavica**, 27, 2383-2395, 1973.
- ANDREWES A.G, JENKINS CL, STARR M.P, SHEPHERD J, HOPE H. Structure of xanthomonadin I, A novel dibrominated aryl-polyene pigment produced by the bacterium *Xanthomonas juglandis*. **Tetrahedron Letters**. No. 45, 4023- 4024, 1976.
- ARCAMONE F, CAMERINO B, FRANCESCHI G, PENCO S. **Gazzetta chimica Italiana**, 100, 581-590, 1970.
- ARULDASS CA, AZIZ A, VENIL CK, KHASIM AR, AHMAD WA. Utilization of argo-industrial waste fot production of yellowish-orange pigment from *Chryseobacterium*

- artocapi* CECT 8497. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 113., 342-349, 2016.
- BENDORF H. Personal Communication. Concerning bathochromatic shift reaction induced by KOH. 2012.
- BERNARDET JF, BOWMAN J. 2010. Genus I. *Flavobacterium* Bergey, Harrison, Breed, Hammer and Hurtoon 1923, 97<sup>AL</sup> emend. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes (Krieg NR, Ludwig W, Whitman WB, Hedlund BP, Paster BJ, Staley JT, Ward N, Brown D & Parte A, eds), pp. 112–154. Springer, New York.
- BERNARDET JF, BRUUN B, HUGO CJ. The genera *Chryseobacterium* and *Elizabethkingia*. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York: Springer. In *The Prokaryotes, a Handbook on the Biology of Bacteria*, 3rd edn, vol. 7, pp. 638–676. 2006.
- BERNARDET JF, NAKAGAWA Y, HOLMES B. Proposed minimal standards for describing new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 52: 1049–1070, 2002.
- BERNARDET JF, VANCANNEYT M, MATTE-TAILLIEZ L, GRISEZ P, TAILLIEZ C, BIZET M, NOWAKOWSKIE B, KEROUAVULTA J. **Systematic and Applied Microbiology**, 28, 640–660, 2005.
- BHOSALE P. Environmental and cultural stimulants in the production of carotenoids from microorganisms MINI REVIEW. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 63:351-361, 2004.
- BONE R, FRANK D, KETTNER CA, AGARD DA. Structural analysis of specificity: alpha-lytic protease complexes with analogues of reaction intermediates. **Biochemistry**, 28(19):7600–9, 1989.
- BOZE H, MOULIN G, GALZY, P. 1995. Production of Microbial Biomass. **Biotechnology: Enzymes, Biomass, Food and Feed**, Volume 9, Second Edition (eds H.-J. Rehm and G. Reed), Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.

- BRIDLE P, TIMBERLAKE CF. Anthocyanins as natural food colour selected aspects. **Food Chemistry**. 58: 103-109, 1997
- CAZZONELLI CI. Carotenoids in nature: Insights from plants and beyond. **Functional Plant Biology**. 38:833–847, 2011.
- CHANDI GK, GILL BS. Production and characterization of microbial carotenoids as an alternative to synthetic colors: A Review. **International Journal of Food Properties**, 14:503–513, 2011.
- CHAUDHARI PN, WANI KS, CHAUDHARI BL, CHINCHOLKAR SB. Characteristics of sulfobacin A from a soil isolate *Chryseobacterium gleum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 158, 231-241, 2009.
- CHRISTENSEN P, COOK FD. *Lysobacter*, a new genus of nonfruiting, gliding bacteria with a high base ratio. **International Journal of systematic Bacteriology**, 28(3):367–93, 1978.
- COLLINS K, KREBS J, KIRK K, SMITH K, DUNCAN T, FAILOR KC AND NEWMAN J. 2011. Characterization of Novel bacterial Species Identified by Undergraduate Students in a General Microbiology Course. Poster presented at the 2011 American Society for Microbiology (ASM) Annual Meeting, New Orleans, LA.
- DAROIT DJ, BRANDELLI A. A current assessment on the production of bacterial keratinases. **Critical Reviews in Biotechnology**, 34, 372-384, 2014.
- DAS A, YOON SH, LEE SH, KIM JY, OH DK KIM SW. An update on microbial carotenoid production: application of recent metabolic engineering tools. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 77(3):505–512, 2007
- DE BEER H, HUGO C, JOOSTE P, WILLEMS A, VANCANNEYT M, COONEY T, VANDAMME P. *Chryseobacterium vrystaatense* sp. nov., isolated from raw chicken in a chicken-processing plant. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 55, 2149-2153, 2005.
- DE BEER H, HUGO CJ, JOOSTE PJ, VANCANNEYT M, COENYE T, VANDAMME P. *Chryseobacterium piscium* sp. nov., isolated from fish of the South Atlantic Ocean off South Africa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 56, 1317–1322, 2006.

- DEORUKHKAR AA, CHANDER R, GHOSH SB, AND SAINIS KB. editado por Albert Balows, Hans G. Trüper, Martin Dworkin, Wim Harder, Karl-Heinz Schleifer volume IV. **Research in Microbiology**. 158: 399-404, 2007.
- DU J, NGO HT, WON K, KIM KY, JIN FX, YI TH. *Chryseobacterium solani* sp. nov., isolated from field-grown eggplant rhizosphere soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 65 (8): 2372-2377, 2015.
- DWORKIN M, FALKOW S, ROSENBERG E, SCHLEIFER KH, STACKEBRANDT E (Eds). The Prokaryotes. A hand book on the Biology of Bacteria. 3° Edição. Volume 7: Proteobacteria: Delta and Epsilon Subclasses. Deeply Rooting Bacteria. 2006.
- EL-BANNA AA, EL-RAZEK AMA, EL-MAHDY AR. Isolation, identification and screening of carotenoid-producing strains of *Rhodotorula glutinis*. **Food and Nutrition Sciences**, 3, 627-633, 2012b.
- EL-BANNA AA, EL-RAZEK AMA, EL-MAHDY AR. Some Factors Affecting the Production of Carotenoids by *Rhodotorula glutinis* var. *Glutinis*. **Food and Nutrition Sciences**. 3, 64-71, 2012a.
- EXPÓSITO R, POSTMA J, RAAIJMAKERS JM, IDE BRUJIN I. Diversity and activity of *Lysobacter* species from disease suppressive soils. **Journal Frontiers in Microbiology, Plant Biotic Interactions**. Volume 6, 2015.
- FAUTZ E, REICHENBACH H. A simple test for flexirubin-type pigments. Federation of European Microbiological Societies Biomedical Press. **Microbiology Letters**, 8, 87-91, 1979.
- FAUTZ E, REICHENBACH H. Biosynthesis of flexirubin: incorporation of precursors by the bacterium *Flexibacter elegans*. **Phytochemistry**, 18, 957-959. 1980.
- FOLMAN LB, DE KLEIN MJEM, POSTMA, J, VAN VEEN JA. Production of antifungal compounds by *Lysobacter enzymogenes* isolate 3.1T8 under different conditions in relation to its efficacy as a biocontrol agent of *Pythium aphanidermatum* in cucumber. **Biological Control Journal**. 31, 145–154, 2004.
- FOLMAN LB, POSTMA J, VAN VEEN JA. Characterization of *Lysobacter enzymogenes* (Christensen and Cook 1978) strain 3.1T8, a powerful antagonist of fungal diseases of cucumber. **Microbiological Research**, 158(2):107–115, 2003.
- FRASER PD, BRAMLEY PM. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Journal Progress in Lipid Research**. 43:228–265, 2004.

- FRASER RDB, MACRAE TP, ROGERS GE. Keratins: Their composition, structure and biosynthesis. Charles C Thomas, 1972.
- FUKUDA W, KIMURA T, SHIGEO ARAKI S, MIYOSHI Y, ATOMI H, IMANAKA T. *Lysobacter oligotrophicus* sp. nov., isolated from an Antarctic freshwater lake in Antarctica. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 63, 3313–3318, 2013.
- GASSEL S, SCHEWE H, SCHMIDT I, SCHRADER J, SANDMANN G. Multiple improvement of astaxanthin biosynthesis in *Xanthophyllomyces dendrorhous* by a combination of conventional mutagenesis and metabolic pathway engineering. **Biotechnology Letters**. 35(4):565–569, 2013.
- GOEL AK, RAJAGOPAL L, NAGESH N, SONTI RV. Genetic locus encoding functions involved in biosynthesis and outer membrane localization of xanthomonadin in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Journal of Bacteriology**, 184: 3539–3548, 2002.
- GOW NAR, GADD GM. The growing fungus. Chapman and Hall. Pagina 312, 1995.
- GU Z, CHEN D, HAN Y, CHEN Z, GU F. Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. **LWT - Food Science and Technology**, 41, 1082–1088, 2008.
- HALSALL, C. J. “Investigating the occurrence of persistent organic pollutants in the Arctic: their atmospheric behaviour and interaction with the seasonal snow pack.” **Environmental Pollution**, Vol. 128(1-2): 163-175, 2004.
- HANTSIS-ZACHAROV E, HALPERN M. *Chryseobacterium haifense* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from raw milk. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 57, 2344–2348, 2007.
- HAYWARD AC, FEGAN N, FEGAN M, STIRLING GR. *Stenotrophomonas* and *Lysobacter*: ubiquitous plant-associated gamma-proteobacteria of developing significance in applied microbiology. **Journal of Applied Microbiology**, 108(3):756–70, 2010.
- HERZ W, GRISEBACH H, KIRBY GW, TAMM C (Eds). 1987. Progress in the chemistry of organic natural products. 52. Pagina 90.
- HERZOG R, WINKLER I, WOLKING D, KÄMPFER P, LIPSKI A. *Chryseobacterium ureilyticum* sp. nov., *Chryseobacterium gambrini* sp. nov., *Chryseobacterium pallidum* sp. nov. and *Chryseobacterium molle* sp. nov., isolated from beer-bottling

- plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 58, 26–33, 2008.
- IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estadística de produção pecuarária, Setembro de 2016. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuararia/Fasciculo\\_Indicadores\\_IBGE/abate-leite-couro-ovos\\_201602caderno.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuararia/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_201602caderno.pdf). Acesso em 14 maio. 2017.
- IRSCHIK H, REICHENBACH H. Intracellular location of flexirubins in *Flexibacter elegans* (Cytophagales). **Biochim Biophys Acta**. 16; 510 (1): 1-10, 1978.
- ISLAM MT, HASHIDOKO Y, DEORA A, ITO T, TAHARA S. Suppression of damping-off disease in host plants by the rhizoplane bacterium *Lysobacter* sp. strain SB-K88 is linked to plant colonization and antibiosis against soilborne *Peronosporomycetes*. **Applied Environmental Microbiology** 71, 3786–3796, 2005.
- JACKSON H, BRAUN CL, ERNST H. The chemistry of novel xanthophyll carotenoids. **American Journal of Cardiology**, 101(10A):50D–57D, 2008.
- JEHLICKA J, OSTERROTHOVA K, OREN A, EDWARDS HGM. Raman spectrometric discrimination of flexirubin pigments from two genera of bacteroidetes. **FEMS microbial. Let** 348, 97-102, 2013.
- JEONG JJ, LEE DW, PARK B, SANG MK, CHOI I-G, KIM KD. *Chryseobacterium cucumeris* sp. nov., an endophyte isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.) root, and emended description of *Chryseobacterium arthrophaerae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 67: 610-616, 2017.
- JOMOVA K, VALKO M. Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants. **European Journal of medicinal Chemistry**, 70,102-110, 2013.
- JOOSTE P, BRITZ T, DE HAAS J. A numerical taxonomic study of Flavobacterium-Cytophaga strains from dairy sources. **The journal of applied bacteriology**, 59, 311-323, 1985.
- KAMIYAMA T, UMINO T, SATOH T, SAWAIRI S, SHIRANE M, OSHIMA S, YOKOSE K. Sulfobacin A and B, novel von Willebrand factor receptor antagonist. Production, isolation characterization and biological activities. **Antibiotics**, 48, 924-928, 1995.
- KÄMPFER P, DREYER U, NEEF A, DOTT W, BUSSE HJ. *Chryseobacterium defluvii* sp. nov., isolated from wastewater. **Int J Syst Evol Microbiol** 53, 93–97, 2003.

- KENGO S, SHIGEO K, AKIRA H. *Chryseobacterium shigense* sp. nov., a yellow-pigmented, aerobic bacterium isolated from a lactic acid beverage. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 55, 1903-1906, 2005.
- KILIC-EKICI O, YUEN GY. Induced resistance as a mechanism of biological control by *Lysobacter enzymogenes* strain C3. **Biological Control** 9, 3, 1103–1110, 2003.
- KIM HS, SANG MK, JUNG HW, JEUN YC, MYUNG IS, KIM KD. Identification and characterization of *Chryseobacterium wanjuense* strain KJ9C8 as a biocontrol agent of phytophthora blight of pepper. **Crop project** ,32, 129-137, 2012.
- KIM KK, BAE H-S, SCHUMANN P, LEE S-T. *Chryseobacterium daecheongense* sp. nov., isolated from freshwater lake sediment. **Int J Syst Evol Microbiol**, 55, 133–138, 2005.
- KIM SK.(Eds) Marine Biomaterials: Characterization, isolation and applications. CRC Press, Taylor & Francis, 2013.
- KIRK KE, HOFFMAN JA, SMITH KA, STRAHAN BL, FAILOR KC, KREBS JE, GALE AN, DO TD, SONTAG TC, BATTIES AM, MISTISZYN K, NEWMAN JD. *Chryseobacterium angstadtii* sp. nov., isolated from a newt tank. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**, 63, 4777-4783, 2013.
- KO HS, JIN RD, KRISHNAN HB, LEE SB, KIM KY. Biocontrol ability of *Lysobacter antibioticus* hs124 against phytophthora blight is mediated by the production of 4-hydroxyphenylacetic acid and several lytic enzymes. **Current Microbiology**, 59, 608–615, 2009.
- KRIEG NR, STALEY JT, BROWN DR, HEDLUND BP, PASTER BJ, WARD NL LUDWIG W, WHITMAN WB. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria: Family I. Flavobacteriaceae. Volume 4, P 208, 2010.
- LEE JW, IM WT, KIM MK, YANG DC. *Lysobacter koreensis* sp. nov., isolated from a ginseng field. **Int J Syst Evol Microbiol**, 56, 231–235, 2006.
- LI S, JOCHUM CC, YU F, ZALETA-RIVERA K, DU L, HARRIS SD, *et al.* An antibiotic complex from *Lysobacter enzymogenes* strain c3: antimicrobial activity and role in plant disease control. **Phytopathology**, 98, 695–701, 2008.
- LIN S-Y, HAMEED A, LIU Y-C, HSU Y-H, HSIEH Y-T, LAI WA, YOUNG C-C. *Chryseobacterium endophyticum* sp. nov., isolated from a maize leaf. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 67: 570-575, 2017.

- LIU GY, NIZET V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. **Trends in Microbiology**. 17:406–413, 2009.
- MACIEL JL, WERLANG PO, DAROIT DJ, BRANDELLI A. Characterization of Protein-Rich Hydrolysates Produced Through Microbial Conversion of Waste Feathers. **Waste and Biomass Valorization**, v. 8, p. 1177-1186, 2017.
- MARGALITH PZ. "The carotenoids, in: Pigment microbiology." First ed., Chapman and Hall, London, 32-76, 1992.
- MARTINKO JM, MADIGAN MT. 2006. Brock: biology of microorganism, 11th edn. Pearson Education International, USA
- MATA-GOMEZ LS, MONTAÑES JC, MENDEZ-SAVALA A, AGUILAR CN. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. **Microbial Cell Factories**,13:12, 2014.
- MÉNDEZ-VILAS A (Ed.). Antimicrobial and antioxidant properties of pigments synthesized from microorganisms. Konuray G, Zerrin Erginkaya Z. Department of Food Engineering. The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs. 27-33, 2015.
- MILLER NJ, SAMPSON J, CANDEIAS LP, BRAMLEY PM, RICE-EVANS CA. Antioxidant activities of carotenoids and xanthophylls. **FEBS Letters**, 384:240-242, 1996.
- MITROU PI, DIMITRIADIS G, RAPTIS SA. Toxic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. **European Journal of Internal Medicine**. Vol. 12(5): 406–411, 2001.
- NAKAMURA Y, ASADA C, SAWADA T. Production of Antibacterial Violet Pigment by Psychrotropic Bacterium RT102 Strain. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 8, 37-40, 2003.
- NENADIS N, WANG LF, TSIMIDOU M, ZHANG HY. Estimation of scavenging activity of phenolic compounds using ABTS assay. **Journal of Agricultural and food chemistry**, V. 52, p 4669-4674, 2004.
- OLSON JA. Molecular actions of carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 691:156–166, 1993.

- OREN A. 2011. Characterization of pigments of prokaryotes and their use in taxonomy and classification. *Taxonomy of Prokaryotes – Methods in Microbiology*, Vol. 38 (Rainey FA & Oren A, eds), pp. 262–283. Elsevier/Academic Press, Amsterdam.
- PALUMBO JD, YUEN GY, JOCHUM CC, TATUM K, KOBAYASHI DY. Mutagenesis of  $\beta$ -1,3-glucanase genes in *Lysobacter enzymogenes* strain C3 results in reduced biological control activity toward Bipolaris leaf spot of tall fescue and Pythium damping-off of sugar beet. **Phytopathology**, 95(6):701–7, 2005.
- PARAJÓ JC, SANTOS V, VÁZQUEZ M. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose, **Process Biochemistry** Vol. 33, No. 2, pp. 181-187, 1998.
- PARRY DAD, North ACT. Hard  $\alpha$ -keratin intermediate filament chains: substructure of the N-and C-terminal domains and the predicted structure and function of the C-terminal domains of type I and type II chains. **Journal of Structural Biology**, 122:67–75, 1998.
- PEREIRA JQ, AMBROSINI A, PASSAGLIA LMP, BRANDELLI A. A new cold-adapted serine peptidase from Antarctic *Lysobacter* sp. A03: Insights about enzyme activity at low temperatures. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 854-862, 2017
- PEREIRA JQ, AMBROSINI A, SANT'ANNA FH, TADRA-SFEIR MZ, FAORO H, PEDROSA FO, SOUZA EM, BRANDELLI A, PASSAGLIA LMP. Whole-Genome Shotgun Sequence of the Keratinolytic Bacterium *Lysobacter* sp. A03, Isolated from the Antarctic Environment. **Genome Announcements**, v. 3, p. e00246-15, 2015.
- PEREIRA JQ, LOPES FC, PETRY MV, DA COSTA MEDINA LF, BRANDELLI A. Isolation of three Antarctic psychrotolerant feather-degrading bacterial and partial purification of keratinolytic enzyme from *Lysobacter* sp, A03. **International Biodeterioration and Biodegradation** 88. 1-7, 2014.
- PERERA CO, YEN GM. Functional properties of carotenoids in human health. **International journal of food properties**. 10, 201-230, 2007.
- PIDOT SJ, COYNE S, KLOSS F, HERTWECK C. Antibiotics from neglected bacterial sources. **International Journal of Medical Microbiology**. 304, 14–22, 2014.
- POSTMA J, STEVENS LH, WIEGERS GL, DAVELAAR E, NIJHUIS EH. Biological control of *Pythium aphanidermatum* in cucumber with a combined application of

- Lysobacter enzymogenes* strain 3.1T8 and chitosan. **Biol. Control** 48, 301–309, 2009.
- PRABHU S, REKHA PD, ARUN AB. Evaluation of antioxidant activity of carotenoid isolated from *Fontibacter flavus* YUAB-SR-25. **International Journal of Natural Products Research**. 3(3): 62-67, 2013.
- PUOPOLO G, SONEGO P, ENGELEN K, PERTOT I. Draft genome sequence of *Lysobacter capsici* AZ78, a bacterium antagonistic to plant-pathogenic oomycetes. **Genome Announcements**. 2(2):e00325–00314, 2014.
- QIAN G, WANG Y, LIU Y, XU F, HE YW, DU L, VENTURI V, FAN J, HU B, LIU F.. *Lysobacter enzymogenes* uses Two Distinct Cell-Cell Signaling Systems for Differential Regulation of Secondary-Metabolite Biosynthesis and Colony Morphology. **Applied and Environmental Microbiology**. 79 (21), p 6604 – 6616, 2013.
- QIAN G, WANG Y, QIAN D, FAN J, HU B, LIU F. Selection of available suicide vectors for gene mutagenesis using *chiA* (a chitinase encoding gene) as a new reporter and primary functional analysis of *chiA* in *Lysobacter enzymogenes* strain OH11. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 28(2):549–57, 2012.
- QIAN G, XU F, VENTURI V, CHEN L, LIU F. Roles of solo LuxR in the Biological Control Agent *Lysobacter enzymogenes* Strain OH11. Faculty Publications - Chemistry Department. Paper 82, 2014.
- Reichenbach H, Kleinig H. The pigments of *Flexibacter elegans*: novel and chemosystematically useful compounds. **Arch microbial**. 101, 134-144, 1974.
- REICHENBACH H, KOHL W & ACHENBACH H. 1981. The flexirubin-type pigments, chemosystematically useful compounds. The Flavobacterium–Cytophaga Group (Reichenbach H & Weeks OB, eds), pp. 101–108. Verlag Chemie, Weinheim.
- REICHENBACH H. “The Genus *Lysobacter*,” in *The Prokaryotes*, eds M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer and E. Stackebrandt (New York, NY: Springer), 939–957, 2006.
- REICHENBACH H. The genus *Lysobacter*. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer K-H, editors. *The Prokaryotes*, second edition A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications, vol. IV. New York: Springer. p. 3256–75, 1992.

- RIFFEL A, BRANDELLI A. Keratinolytic bacteria isolated from feather waste. **Brazilian Journal of Microbiology** vol.37 no.3, 2006.
- RIFFEL A, DAROIT J, BRANDELLI A. Nutritional regulation of protease production by the feather-degrading bacterium *Chryseobacterium* sp. kr6. **New Biotechnology**, v. 28, p. 153-157, 2011.
- RIFFEL A, LUCAS F, HEEB P, BRANDELLI A. Characterization of new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. **Archives of Microbiology**, 179 :258–265, 2003.
- RIVERA SM, CANELA-GARAYOA R. Analytical tools for the analysis of carotenoids in diverse materials. **Journal of Chromatography A**. 1224:1–10, 2012.
- RODRIGUES E, MARIUTTI LR, MERCADANTE A. Carotenoids and Phenolic Compounds from *Solanum sessiliflorum*, an Unexploited amazon fruit, and their scavenging capacities against reactive oxygen and nitrogen species. **Agricultural and food chemistry**, 61, 3022–3029, 2013.
- RUEFFLER C, VAN DOOREN TJM, LEIMAR O, ABRAMS PA. Disruptive selection and then what? **Trends Ecol Evol**, 21: 238–245, 2006.
- RYAZANOVA LP, STEPNEYA OA, SUZINA NE, KULAEV IS. Antifungal action of the lytic enzyme complex from *Lysobacter* sp. XL1. **Process Biochemistry**, 40, 557–564, 2005.
- SANDMANN G. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies, problems and achievements. **Trends in Plant Sciences**, 6:14–17, 2001.
- SCHEUPLEIN RJ, MIZUTANI A, YAMAGUCHI S. Studies on the non-pathogenicity of *Chryseobacterium proteolyticum* and on the safety of the enzyme: protein-glutaminase. **Regul Toxicol Pharmacol** 49, 79–89, 2007.
- SCHMIDT-DANNERT C. Engineering novel carotenoids in microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**. 11:255–261, 2000.
- SCHÖNER TA, FUCHS SB, REINHOLD-HUREK B, BODE HB. Identification and Biosynthesis of a Novel Xanthomonadin-Dialkylresorcinol-Hybrid from *Azoarcus* sp. BH72. *Plos one*. 11;9(3):e90922, 2014a.
- SCHÖNER TA, GASSEL S, OSAWA A, TOBIAS NJ, OKUNO Y, SAKAKIBARA Y, SHINDO K, SANDMANN G, BODE HB. Aryl Polyenes, a Highly Abundant Class of

- Bacterial Natural Products, Are Functionally Related to Antioxidative Carotenoids. **ChemBioChem**. 17,247–253, 2016.
- SCHÖNER TA, FUCHS SW, SCHÖNAU C, BODE HB. Initiation of the flexirubin biosynthesis in *Chitinophaga pinensis*. **Microbial Biotechnology**, 7(3):232-241, 2014b.
- SCHWEIZER J, BOWDEN PE, COULOMBE PA, LANGBEIN L, LANE EB, MAGIN TM, *et al.* New consensus nomenclature for mammalian keratins. **Journal of Cell Biology**, 174(2):169–74, 2006.
- SHEN F-T, KÄMPFER P, YOUNG C-C, LAI W-A, ARUN AB. *Chryseobacterium taichungense* sp. nov., isolated from contaminated soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 55, 1301–1304, 2005.
- SILVEIRA AP, VALIATI, V. H, BRANDELLI A, PETRY MV, MEDINA LF. Atividade proteolítica de *Lysobacter* sp. isolada de fragmentos de penas da Ilha Rei George. In: XVIII Simpósio Brasileiro sobre Pesquisa Antártica, 2011, São Paulo. Anais do XVIII SBPA, v. 1. 2011.
- SILVEIRA ST, GEMELLI S, SEGALIN J, BRANDELLI A.. Immobilization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. strain kr6 on glutaraldehyde-activated chitosan. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 818-825, 2012.
- STAFSNES MH, BRUHEIM P. Marine biomaterials: characterization, isolation and applications. Book Chapter: Pigmented Marine Heterotrophic Bacteria: Occurrence, Diversity, and Characterization of Pigmentation. 117–148, 2013.
- STOMP M, HUISMAN J, STAL LJ, MATTHIJS HCP. Colorful niches of phototrophic microorganisms shaped by vibrations of the water molecule. Winogradsky Review. **The International Society for Microbial Ecology**, 1, 271–282, 2007.
- SUN J, KIM J, KIM G, RHEE K, JUNG H, JEUN J *et al.*, Inhibition of hepatitis C virus replication by *Monascus* pigment derivatives that interfere with viral RNA polymerase activity and the mevalonate biosynthesis pathway. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 10:1093, 2011.
- SURESH M, RENUGADEVI B, BRAMMAVIDHYA S, IYAPPARAJ P, ANANTHARAMAN P. Antibacterial Activity of Red Pigment Produced by

- Halolactibacillus alkaliphilus* MSRD1--an Isolate from Seaweed. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 176(1):185-95, 2015.
- TONG' Y, LIGHTHAR B. Solar Radiation Is Shown to Select for Pigmented Bacteria in the Ambient Outdoor Atmosphere. **Photochemistry and Photobiology**, 65(1): 103-106, 1997.
- TULI HS, CHAUDHARY P, BENIWAL V, SHARMA AK. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. **Journal of Food Science and Technology**, 52(8):4669–4678, 2014.
- TÜRKKAN E. 2007. Antibacterial effects against some pathogen food-borne bacteria of carotenoids extracted from *Rhodotorula glutinis*. MSc Thesis, Department of Food Engineering Institute of Natural and Applied Science University of Çukurova, Adana, Turkey.
- UMENO D, TOBIAS AV, ARNOLD FH. Diversifying carotenoid biosynthetic pathways by directed evolution. **Microbiology and Molecular Biology**, Rev 69(1):51–78, 2005.
- UNGUREANU C, FERDES M, CHIRVASE AA, MOCANU E. 2011. Method for Torularhodin Separation and Analysis in the Yeast *Rhodotorula rubra* Aerobically Cultivated in Lab Bioreactor, Icheap-10: 10th Int. Conf. on Chemical and Process Engineering, Pts.
- VANDAMME P, BERNARDET JF, SEGERS P, KERSTERS K, HOLMES B. New perspectives in the classification of the flavobacteria: description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. **International journal of systematic bacteriology**, 44, 827–831, 1994.
- VENIL CK, KHASIM AR, ARULDASS CA, AHMAD WA. Microencapsulation of flexirubin-type pigment by spray drying. Characterization and antioxidant activity. **International Biodeterioration and biodegradation**. 113;350-356, 2016a.
- VENIL CK, KHASIM AR, ARULDASS CA, AHMAD WA. Safety evaluation of flexirubin from *Chryseobacterium artocarp* CECT 8497: Acute, sub-acute toxicity and mutagenicity studies. **Process Safety and Environmental Protection**. 2017.
- VENIL CK, SATHISHKUMAR P, MALATHI M, USAH R, JAYAKUMAR R, YUSOFF AR, AHMAD WA. Synthesis of flexirubin-mediated silver nanoparticles using

- Chryseobacterium artocarp* CECT 8497 and investigation of its anticancer activity. **Materials Science and Engineering C** 59, 228–234, 2016b.
- VENIL CK, ZAKARIA ZA, AHMADA WA. Review Bacterial Pigments and their applications. **Process Biochemistry**. 48;1065–1079, 2013.
- VENIL CK, ZAKIRA ZA, USHA R, AHMAD WA. Isolation and characterization of flexirubin type pigment from *Chryseobacterium* sp., UTM-3<sup>T</sup>. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 3. 103–107, 2014.
- VERSHININ A. A Biological function of carotenoids—diversity and evolution. **Biofactors**. 10:99–104, 1999.
- VÍLCHEZ C, FORJAÍN E, CUARESMA M, BE´DMAR F, GARBAYO I, VEGA JM. Marine carotenoids: Biological functions and commercial applications. **Journal Marine Drugs**. 9:319–333, 2011.
- WANG SL, LIAN YC, LIANG TW. Purification and characterization of a novel alkali-stable alfa amilase from *Chryseobacterium taeanense* TKU001, and application in antioxidant and prebiotic. **Process Biochemistry**. 46(3), 745-750. 10, 2011.
- WANG Y, QIAN G, LI Y, WANG Y, WANG Y, *et al.*. Biosynthetic Mechanism for Sunscreens of the Biocontrol Agent *Lysobacter enzymogenes*. **PLoS ONE** 8(6): e66633, 2013<sup>a</sup>.
- WANG Y, QIAN G, LIU F, LI YZ, SHEN Y, DU L. Facile method for site-specific gene integration in *Lysobacter enzymogenes* for yield improvement of the anti-MRSA antibiotics WAP-8294A and the antifungal antibiotic HSAF. **ACS Synthetic Biology**. 2, 670–678, 2013<sup>b</sup>.
- WEBER RWS, ANKE H, DAVOLI P. Simple method for the extraction and reverse-phase high performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigment from red yeast (Basidiomycota, Fungi). **Journal of Chromatography A**, 1145, 118-122, 2007.
- WEON HY, KIM BY, BAEK YK, YOO SH, KWON SW, STACKEBRANDT E, GO SJ. Two novel species, *Lysobacter daejeonensis* sp. nov. and *Lysobacter yangpyeongensis* sp. nov., isolated from Korean greenhouse soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 56, 947–951, 2006.
- WHITMAN WB (Eds). 2015 Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria: *Lysobacter*. Christensen P, P 1–11.

- WISSGOTT U, BORTLIK K. Prospects for new natural food colorants, **Trends Food Science and Technology**. 7:298–302, 1996.
- WOICIECHOWSKI AL, DE CARVALHO JC, SPIER MR, HABY S, YAMAGUISHI CT, GHIGGI V, SOCCOL CR. Biotecnologia de alimentos, Capitulo 6: Emprego de Resíduos Agroindustriais em Bioprocessos Alimentares, 2013.
- WU YF, WU QL, LIU SJ. *Chryseobacterium taihuense* sp. nov., isolated from a eutrophic lake, and emended descriptions of the genus *Chryseobacterium*, *Chryseobacterium taiwanense*, *Chryseobacterium jejuense* and *Chryseobacterium indoltheticum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 63, 913–919, 2013.
- XIE F, CHAO Y, YANG X, YANG J, XUE Z, LUO Y, QIAN S. Purification and characterization of four keratinases produced by *Streptomyces* sp. strain 16 in native human foot skin medium. **Bioresour. Technol.** 101, 344-350, 2010.
- XIE Y, WRIGHT S, SHEN Y, DU L. Bioactive natural products from *Lysobacter*. **Natural Product Reports**, 29(11):1277–87, 2012.
- YAMAGUCHI S, YOKOE M. A Novel Protein-Deamidating Enzyme from *Chryseobacterium proteolyticum* sp. nov., a Newly Isolated Bacterium from Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, 66, 3337-3343, 2000.
- YASSIN AF, CHEN WM, HUPFER H, SIERING C, KROPPESTEDT RM, ARUN AB, LAI WA, SHEN FT, REKHA PD, YOUNG CC. *Lysobacter defluvii* sp. nov., isolated from municipal solid waste. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 57(Pt 5):1131-6, 2007.
- YOUNG CC, KÄMPFER P, SHEN FT, LAI WA, ARUN AB. *Chryseobacterium formosense* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Lactuca sativa* L. (garden lettuce). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 55, 423–426, 2005.
- ZAGHDOUDI K, PONTVIANNE S, FRAMBOISIER X, ACHARD M, KUDAIBERGENOVA R, AYADI-TRABELSI, KALTHOUM-CHERIF J, VANDERESSE R, FROCHOT C, GUIAVARC'H Y. Accelerated solvent extraction of carotenoids from Tunisian Kaki (*Diospyros kaki* L.), peach (*Prunus persica* L.) and apricot (*Prunus armeniaca* L.) **Food Chemistry** 184; 131- 139, 2015.

- ZAMORA L, VELA AI, PALACIOS MA, SÁNCHEZ-PORRO C, SVENSSON-STADLER LA, DOMÍNGUEZ L, MOORE ER, VENTOSA A, FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL JF. *Chryseobacterium viscerum* sp. nov., isolated from diseased fish. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 62(Pt 12):2934-40, 2012.
- ZHANG W, LIY, QIANG, WANG, Y, CHEN H, LIYZ, *et al.* Identification and characterization of the anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* WAP-8294A2 biosynthetic gene cluster from *Lysobacter enzymogenes* OH11. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 55, 5581–5589, 2011.
- ZHANG Z, YUEN GY, SARATH G, PENHEITER AR. Chitinases from the plant disease biocontrol agent, *Stenotrophomonas maltophilia* C3. **Phytopathology** 91, 204–211, 2001.
- ZHANG Z, YUEN GY. The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain c3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana*. **Phytopathology** 90, 384–389, 2000.
- ZHOU L, LI M, YANG J, WEI L, JI G. Draft genome sequence of antagonistic agent *Lysobacter antibioticus* 13–6. **Genome Announc.** September/October Volume 2 Issue 5, 2014.
- ZHU C, BAI C, SANAHUJA G, YUAN D, FARRE´ G, NAQVI S, SHI L, CAPELL T, CHRISTOU P. The regulation of carotenoid pigmentation in flowers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 504:132–141, 2010.
- ZHU C, NAQVI S, CAPELL T, CHRISTOU P. Metabolic engineering of ketocarotenoid biosynthesis in higher plants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 483:182–190, 2009.
- ZOPHEL A, KENNEDY M, BEINERT H, KRONECK P. Investigations on microbial sulfur respiration: Isolation, purification, and characterization of cellular components from *Spirillum* 5175. **European Journal of Biochemistry**. 195: 849-856, 1991.
- ZOZ L, CARVALHO JC, SOCCOL VT, CASAGRANDE TC, CARDOSO L. Torularhodin and Torulene: Bioproduction, Properties and Prospective Applications in Food and Cosmetics - a Review, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Vol.58, n.2: pp. 278-288, 2015.