

**Universidade Estadual de Campinas**

**Instituto de Química**

**Departamento de Físico-Química**



1150060843

 IQ  
T/UNICAMP R354e

**Estudos enzimáticos utilizando a UDP-glucuronil  
transferase e a  $\beta$ -glicosidase voltados à síntese de  
derivados glicosídicos da violaceína**

**Autor**

Juliano Souza Ribeiro

**Orientador**

Prof. Dr. Nelson E. Durán Caballero

**Dissertação de Mestrado**

**IQ-13**

Campinas, 5 de Julho de 2004 às 10:00 h

UNIDADE	T10	
Nº CHAMADA	T10000	
	R354e	
V		EX
TOMBO BC/	60873	
PROC.	K-117-04	
	C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00	
DATA	18-04-04	
Nº CPD		

S.b Id 332029

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA  
UNICAMP**

R354e

Ribeiro, Juliano Souza.

Estudos enzimáticos utilizando a UDP-glucuronil transferase e a  $\beta$ -glicosidase voltados à síntese de derivados glicosídicos da violaceína / Juliano Souza Ribeiro. -- Campinas, SP: [s.n], 2004.

Orientador: Nelson E. Duran Caballero.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. *Chromobacterium violaceum*. 2. Biotatálise.  
3. Transglicosilação. I. Caballero, Nelson E. Duran.  
II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

*Aos meus pais José Alberto e Márcia*

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Nelson Durán, meu Chefe, pelas boas conversas, pela orientação, apoio, broncas, amizade, e principalmente pela liberdade oferecida em todos os momentos desde o início deste trabalho.

À Profa. Dra. Roseli de Conti, por todo aprendizado adquirido, pela amizade, senso profissional, pela força e paciência durante o mestrado.

À Profa. Dra. Mariângela Burgos por toda a amizade e aprendizado adquirido em 3 anos de iniciação científica.

Aos meus pais, José Alberto e Márcia por tudo o que eles fizeram à minha formação e a tudo o que eles representam em minha vida.

Ao meu irmão Guilherme por toda ajuda, amor, compreensão e orgulho que ele demonstra a cada dia que passa.

À Minha namorada Luciane pelo companheirismo, paciência, carinho, suporte, conselhos e principalmente pelo amor durante esses anos.

Aos pesquisadores Marta e Alexandre do CPQBA-Paulínia pela paciência e aprendizado.

À Pesquisadora Tereza do Instituto Agrônomo de Campinas, pelas amostras de mandioca fornecidas.

Ao prof. Marcos Eberlin e seu aluno Renato por me auxiliarem nas análises de espectrometria de Massas.

À todos os professores do Instituto de Química e de outras universidades que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

À todos os funcionários do IQ, da biblioteca, do xerox, das oficinas, da limpeza, da segurança, que auxiliaram e muito para o bom andamento deste trabalho.

Ao amigo Náder pelas madrugadas mantidas a base de café, pipoca, torradas e análises de RMN.

Ao grande amigo Virgu pela amizade e por todas as farras realizadas ao seu lado durante vários anos.

À grande amiga Bárbara por toda a amizade durante os longos anos de graduação e pós-graduação.

À todos os amigos que tenho no Instituto de Química e resto da UNICAMP que aqui não foram citados, mas que fazem e sempre farão parte da minha vida.

Aos amigos de Agudos Tiago, Flávia Zen, Juninho, Mariângela, Graziela, Thales e Mourinha.

Aos amigos do laboratório: Marcelo, Kelly, Edna, Márcia e Patrícia, pelas brincadeiras e as boas risadas nos intervalos de trabalho.

Por fim, a FAPESP pelo apoio financeiro.

*...Só posso levantar as mãos pro céu agradecer e ser fiel ao destino que Deus me deu,*

*Se não tenho tudo que preciso, com o que tenho vivo, de mansinho lá vou eu,*

*Se as coisas não saem do jeito que eu quero também não me desespero, o negócio é deixar rolar,*

*E aos trancos e barrancos, lá vou eu*

*Sou feliz e agradeço por tudo que Deus me deu*

*Deixa a vida me levar, vida leva eu !!!*

*Zeca Pagodinho, Sambista carioca!*

## CURRICULUM VITAE

### **Títulos acadêmicos**

- **Bacharelado em Química** - Instituto de Química - UNICAMP (Julho de 2002).
- **Mestrado em Química** - Instituto de Química - UNICAMP (em andamento) (*bolsa FAPESP*).

### **Experiência Acadêmica**

- **Iniciação científica** - Instituto de Química – UNICAMP (Abril de 1999 – Junho de 2001).
- **Iniciação científica** - Instituto Agrônomo de Campinas –IAC (Julho de 2001 – dezembro de 2001).
- **Iniciação científica** - Instituto de Química – UNICAMP (Janeiro de 2002 – Julho de 2002) (*bolsa CNPQ*).

### **Encontros, Simpósios e congressos (nacionais e internacionais)**

- Ribeiro, J. S., De Azevedo, M.B. M., “Preparação de N- indol glicosídeos a partir da reação de Mitsunobu” 23º Reunião Anual da Sociedade Brasileiro; Livro de resumos - volume 2; QO-098; (2000).
- Ribeiro, J. S., De Azevedo, M. B. M., “Synthesis of N – Glicocosyl derivatives from Violacein using Mitsunobu Reaction” 22<sup>nd</sup> IUPAC International Symposium on the Chemistry of Natural Products; psa –48 UFSCar - São Carlos – SP; (2000).
- Ribeiro, J. S., De Conti, R., Duran, N., Síntese enzimática de  $\beta$  - glucuronídeo do 5'-hidroxindol utilizando UDP-glucuronil transferase:

modelo para a Violaceína.- 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Livro de Resumos- QB-003 (2003).

- De Azevedo, M. M., Ribeiro, J. S., Durán, N., Produção em escala piloto e novo método de purificação de violaceína a partir da *Chromobacterium violaceum* CCT 3496 em fermentador de 30L – 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Livro de Resumos -QB-020 (2003).
- Ribeiro, J. S., Duran, N., Síntese de derivados N-Hidroximetílicos da Violaceína, pigmento natural da *Chromobacterium violaceum* com importantes atividades biológicas - XXVI Congresso latino Americano de Química e 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (2004).
- Assalin, M. R., Ribeiro, J. S., Duran, N., Tratamento do Efluente Papeleiro Kraft E<sub>1</sub> : Efeito da Carga de Ozônio - XXVI Congresso latino Americano de Química e 27ª R. Anual da Sociedade Brasileira de Química (2004).
- Ribeiro, J. S., Duran N., Síntese enzimática de β-glucuronídeo do 5'-hidroxindol utilizando UDP-glucuronil transferase analisadas por UV-Visível – VI Seminário Brasileiro de tecnologia Enzimática (2004) – Apresentação Oral.
- Ribeiro, J. S., Duran N., Atividade enzimática da UDP-glucuronil transferase frente a diferentes solventes orgânicos e surfactantes - VI Seminário Brasileiro de tecnologia Enzimática (2004) – Apres. Oral.



# **Estudos enzimáticos utilizando a UDP-glucuronil transferase e a $\beta$ -glicosidase voltados à síntese de derivados glicosídicos da violaceína**

Autor: Juliano Souza Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. Nelson E. Durán Caballero

*Palavras chave:* Violaceína, UDP-glucuronil transferase e  $\beta$ -glicosidase

## RESUMO

Neste trabalho foram estudados o crescimento da *Chromobacterium violaceum* em escala piloto e uma nova metodologia de extração e purificação da violaceína, um metabólito secundário produzido pela bactéria.

A violaceína é um pigmento natural extraído da *Chromobacterium violaceum* com importantes atividades biológicas, porém, com baixa solubilidade em sistemas aquosos.

Foram realizadas reações de biotransformação da violaceína, utilizando enzimas, na tentativa de obtenção de seus derivados glicosídicos.

Para isso, foram necessários estudos cinéticos de duas enzimas, a UDP-glucuronil transferase e a  $\beta$ -glicosidase. Estes estudos demonstraram a variação da constante de velocidade enzimática em função de diferentes agentes desnaturantes, tais como surfactantes e solventes.

Alguns testes foram realizados também com moléculas modelo, tais como p-nitrofenol, octanol e 5'-hidroxindol, para otimização do sistema.

# **Enzymatic studies using UDP-glucuronosyl transferase and $\beta$ -glucosidase directed to the synthesis of glycosidic derivatives of violacein**

Author: Juliano Souza Ribeiro

Advisor: Prof. Dr. Nelson E. Durán Caballero

*Key words:* Violacein, UDP-glucuronosyl transferase and  $\beta$ -glucosidase

## ABSTRACT

In this work the growth of the *Chromobacterium violaceum* in pilot scale and a new methodology of extraction and purification of violacein, a secondary metabolite produced by this bacteria, had been studied.

The violacein is a natural pigment extracted of the *Chromobacterium violaceum* with important biological activities, however, with low solubility in watery systems. Reactions of biotransformation of the violacein had been carried using enzymes, in the attempt of attainment of its glycosides derivatives.

For this, kinetic studies of two enzymes, the UDP-glucuronil transferase and  $\beta$ -glucosidase had been necessary. These studies had demonstrated the variation of the enzymatic rate constant in function of different denaturing agents, such as surfactants and solvent.

Some tests had been carried also with model molecules, such as p-nitrophenol, octanol and 5'-hydroxyindol, for otimization of the system.

# ÍNDICE

<b>Capítulo 1</b> .....	<b>1</b>
1. Introdução.....	1
1.1. Objetivos .....	3
<b>Capítulo 2</b> .....	<b>5</b>
2. Revisão bibliográfica.....	5
2.1. Violaceína.....	5
2.1.1. <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	5
2.1.2. Violaceína.....	6
2.1.3. Propriedades biológicas da violaceína.....	8
2.2. Hipótese.....	9
2.3. Enzimas e a biocatálise .....	11
2.3.1. Reações enzimáticas de transferência glicosídica.....	11
2.3.1.1. Uridina difosfo–glucuronil transferase (UDPGT) .....	12
2.3.1.2. $\beta$ -glicosidase.....	14
2.3.2. Biocatálise com a utilização de meios não convencionais .....	18
2.3.2.1. Utilização de solventes orgânicos .....	18
2.3.2.2. Utilização de surfactantes .....	19
2.4. Imobilização enzimática .....	20
2.4.1. Suporte sólido para imobilização enzimática .....	22
<b>Capítulo 3</b> .....	<b>25</b>
3. Matérias e métodos.....	25
3.1. Técnicas de caracterização.....	25
3.2. Violaceína.....	27

3.2.1. Microrganismo e manutenção .....	27
3.2.2. Produção de violaceína a partir da cultura de células de <i>Chromobacterium violaceum</i> CCT 3496 em fermentador com capacidade para 30 L .....	27
3.2.3. Processo de extração da violaceína .....	29
3.2.4. Processo de purificação da violaceína.....	30
3.2.5. Caracterização da violaceína e deoxiviolaceína.....	31
3.2.5.1. Por cromatografia líquida de alta eficiência .....	31
3.2.5.2. Por ressonância magnética nuclear de próton, espectroscopia de infravermelho e ultravioleta.....	31
3.2.6. Estabilidade da violaceína em meio básico .....	32
3.3. UDP-glucuronil transferase.....	32
3.3.1. Medidas de atividade enzimática da UDP-glucuronil transferase analisadas por UV-visível.....	33
3.3.1.1. Substrato p-nitrofenol .....	33
3.3.1.2. Substrato p-nitrofenol frente a diferentes solventes orgânicos.....	34
3.3.1.3. Substrato p-nitrofenol frente a diferentes surfactantes não iônicos.....	35
3.3.1.4. Substrato p-nitrofenol frente as padronizações com DMSO e Triton X-100 .....	36
3.3.1.5. Substrato 5'-hidroxindol .....	36
3.3.2. Síntese do derivado glucurônico do 5'-hidroxindol .....	37
3.3.3. Tentativa de síntese do derivado glucurônico da violaceína.....	38
3.4. Síntese de derivados N-hidroximetílicos da violaceína .....	40
3.5. $\beta$ -Glicosidase extraída da <i>Maniota Esculenta Crantz</i> .....	41
3.5.1. Extração da $\beta$ -glicosidase a partir da espécie de mandioca <i>B. Catarina</i> .....	41
3.5.2. Determinação protéica no extrato bruto de enzima .....	41

3.5.3. Imobilização da $\beta$ -glicosidase (covalentemente) em Eupergit <sup>®</sup> C .....	42
3.5.4. Medidas de atividade enzimática da $\beta$ -glicosidase extraída da mandioca imobilizada em Eupergit <sup>®</sup> C analisadas por UV-visível .....	43
3.5.4.1. Substrato p-nitrofenol glicopiranosídeo .....	43
3.5.4.2. Substrato p-nitrofenol glicopiranosídeo frente a diferentes concentrações de acetonitrila .....	44
3.5.5. Biotransformação do octanol utilizando $\beta$ -glicosidase imobilizada em Eupergit <sup>®</sup> C .....	45
3.5.5.1. Por hidrólise reversa .....	45
3.5.5.2. Por transglicosilação .....	46
3.5.6. Biotransformação da violaceína utilizando $\beta$ -glicosidase imobilizada em Eupergit <sup>®</sup> C .....	47
3.5.6.1. Por transglicosilação .....	47
3.5.7. Biotransformação dos derivados N-hidroximetílicos da violaceína utilizando $\beta$ -glicosidase imobilizada em Eupergit <sup>®</sup> C .....	47
3.5.7.1. Por transglicosilação .....	47
3.6. $\beta$ -glicosidase extraída do <i>Aspergillus niger</i> .....	48
3.6.1. Imobilização da $\beta$ -glicosidase extraída do <i>Aspergillus niger</i> (covalentemente) em Eupergit <sup>®</sup> C .....	48
3.6.2. Medidas de atividade enzimática da $\beta$ -glicosidase extraída do fungo <i>Aspergillus niger</i> imobilizada em Eupergit <sup>®</sup> C analisadas por UV-visível ..	49
3.6.2.1. Substrato p-nitrofenol glicopiranosídeo .....	49
3.6.2.2. Substrato p-nitrofenol glicopiranosídeo frente a diferentes concentrações de acetonitrila .....	50
3.6.3. Biotransformação do octanol utilizando $\beta$ -glicosidase imobilizada em Eupergit <sup>®</sup> C .....	51
3.6.3.1. Por hidrólise reversa .....	51

3.6.3.2. Por transglicosilação .....	52
3.6.4. Biotransformação da violaceína utilizando $\beta$ -glicosidase imobilizada em Eupergit <sup>®</sup> C .....	53
3.6.4.1. Por transglicosilação .....	53
3.6.5. Biotransformação dos derivados N-hidroximetílicos da violaceína utilizando $\beta$ -glicosidase imobilizada em Eupergit <sup>®</sup> C .....	53
3.6.5.1. Por transglicosilação .....	53
<b>Capítulo 4.....</b>	<b>55</b>
4. Resultados e discussões .....	55
4.1. Violaceína.....	55
4.1.1. Produção microbiana em escala piloto utilizando biorreator de 30 litros .....	55
4.1.2. Extração e purificação da violaceína.....	56
4.1.3. Caracterização da violaceína e deoxiviolaceína.....	56
4.1.4. Degradação da violaceína em meio básico .....	58
4.2. UDP-glucuronil transferase.....	59
4.2.1. Atividade enzimática da UDP-glucuronil transferase analisadas por UV-visível.....	61
4.2.1.1. Substrato p-nitrofenol frente diferentes solventes orgânicos.....	61
4.2.1.2. Substrato p-nitrofenol frente diferentes surfactantes não iônicos .....	62
4.2.1.3. Substrato p-nitrofenol frente as padronizações realizadas com triton X-100 e DMSO.....	63
4.2.1.4. Substrato 5'-hidroxindol .....	65
4.2.2. Síntese do derivado glucurônico do 5'-hidroxindol.....	67
4.2.3. Tentativa de síntese do derivado glucurônico da violaceína .....	67
4.3. Síntese de derivados N-hidroximetílicos da violaceína .....	68

4.4. $\beta$ -glicosidase.....	70
4.4.1. $\beta$ -glicosidase extraída da mandioca imobilizada em Eupergit <sup>®</sup> C.....	71
4.4.1.1. Medidas de atividade enzimática .....	71
4.4.1.2. Medidas de atividade enzimática frente a diferentes concentrações de acetonitrila.....	72
4.4.2. $\beta$ -glicosidase extraída do fungo <i>Aspergillus niger</i> imobilizada em Eupergit <sup>®</sup> C .....	74
4.4.2.1. Medidas de atividade enzimática da enzima.....	74
4.4.2.2. Medidas de atividade enzimática frente a diferentes concentrações de acetonitrila.....	75
4.5. Síntese enzimática de alquil glicosídeos utilizando as $\beta$ -glicosidasas imobilizadas .....	76
4.5.1. Substrato octanol .....	76
4.5.1.1. Hidrólise reversa.....	76
4.5.1.2. Transglicosilação .....	77
4.5.2. Substratos violaceína e seu derivados N-hidroximetílicos.....	78
4.2.2.1. Transglicosilação .....	78
<b>Capítulo 5.....</b>	<b>79</b>
5. Conclusões .....	79
<b>Capítulo 6.....</b>	<b>81</b>
6. Referências bibliográficas.....	81
<b>Capítulo 7.....</b>	<b>87</b>
7. Anexos .....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\lambda_{\text{max}}$  – Comprimento de onda de máxima intensidade

ABS – Absorbância

*C. violaceum* – *Chromobacterium violaceum*

CCD – Cromatografia em camada delgada

CCT – Coleção de cultura tropical

D<sub>2</sub>O – Água deuterada

DMSO – Dimetil sulfóxido

HCl – Ácido clorídrico

HL60 – Linhagem celular de leucemia promielocítica humana

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência

IV – Infravermelho

KOH – Hidróxido de potasio

m/z – Massa/carga

ms/ms – Fragmentação de um único pico do espectro

MSs – Metabólitos secundários

Pluronic - Co-polímero bloco de polietileno glicol-polipropileno glicol-polietileno glicol

PNPG – Para-nitrofenol glicopiranosídeo

RMN H<sup>1</sup> – Ressonância Magnética Nuclear de Próton

RPM – Rotações por minuto

TCA – Ácido tricloroacético

UDPGA – Uridina difosfo ácido glucurônico

UDPGT – Uridina difosfo glucuronil transferase

UV – Ultravioleta



## LISTA DE TABELA

<b>Capítulo 3</b> .....	<b>25</b>
3.2.1. Valore dos tempos de retenção (Tr) referentes a violaceína e a deoxiviolaceína.....	31
3.3.1. Reagentes adicionados nas medidas de atividade enzimática da UDP-glucuronil transferase .....	33
3.3.2. Reagentes adicionados nas medidas de atividade enzimática da UDPGT frente a diferentes solventes orgânicos.....	34
3.3.3. Reagentes adicionados na síntese em escala analítica .....	36
3.3.4. Reagentes adicionados na síntese do derivado glucurônico da violaceína em escala preparativa.....	39
3.5.1. Valores experimentais obtidos no processo de imobilização enzimática .....	43
3.5.2. Reagentes adicionados para a realização do ensaio enzimático .....	44
3.5.3. Quantidade dos reagentes para a medida da atividade enzimática em função de diferentes concentrações de acetonitrila.....	45
3.6.1. Valores experimentais obtidos no processo de imobilização enzimática .....	49
3.6.2. Reagentes adicionados para a realização do ensaio enzimático .....	50
3.6.3. Quantidade dos reagentes para a medida da atividade enzimática em função de diferentes concentrações de acetonitrila.....	51
<b>Capítulo 4</b> .....	<b>55</b>
4.2.1. Valores das constantes de velocidade nas medidas de atividade da UDPGT frente a diferentes aditivos.....	64

## LISTA DE FIGURAS

<b>Capítulo 2.....</b>	<b>5</b>
2.1.1. Microscopia eletrônica da <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	5
2.1.2. Estrutura da violaceína.....	6
2.1.3. Estrutura da deoxiviolaceína.....	7
2.2.1. Derivados glucurônicos de algumas moléculas biologicamente ativas .	10
2.3.1. Estrutura cristalina da UDP-glucuronil transferase.....	12
2.3.2. Representação da reação enzimática da UDPGT.....	13
2.3.3. Estrutura cristalina de uma glicosidase cianogênica extraída do algodão .....	14
2.3.4. Glicosilação via controles termodinâmico e cinético.....	15
2.3.5. Representação da reação de hidrólise reversa utilizando $\beta$ -glicosidase.	16
2.3.6. Representação da reação de transglicosilação utilizando $\beta$ -glicosidase	17
2.3.7. Representação da desnaturação protéica causada pelo contato com agentes desnaturantes tais como solventes e surfactantes iônicos.....	20
2.4.1. Diferentes tipos de processos de imobilização: (a) métodos químicos..	21
2.4.1 (b) métodos físicos .....	22
2.4.2. Estrutura química do Eupergit <sup>®</sup> C.....	23
<b>Capítulo 3.....</b>	<b>25</b>
3.2.1. Diagrama mostrando o procedimento utilizado para obtenção de <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	29
3.2.2. Diagrama mostrando o procedimento utilizado para a obtenção de violaceína.....	30
<b>Capítulo 4.....</b>	<b>55</b>
4.1. Ressonância do sistema de conjugação .....	58

4.2. Demonstração do ensaio enzimático com UDPGT utilizando 5'-hidroxindol como substrato .....	65
4.3. Estrutura dos derivados N-hidroximetílicos da violaceína.....	69
4.4. Representação esquemática da hidrolise do p-nitrofenol glicopiranosídeo .....	71
4.5. Estrutura do octanol glicopiranosídeo .....	76

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Capítulo 4</b> .....	<b>55</b>
4.1. Valores de pH em função do volume de KOH 0,3 M.....	59
4.2.1. Representação gráfica da atividade enzimática da UDPGT com diferentes concentrações de DMSO .....	61
4.2.2. Representação gráfica da atividade enzimática da UDPGT em função da presença de surfactantes (Pluronic 5,9 % e Triton X-100 0,2 %) .....	63
4.2.3. Representação gráfica da atividade enzimática da UDPGT em função da presença de aditivos.....	64
4.2.4. Representação gráfica da atividade enzimática da UDPGT com 5'-hidroxindol .....	66
4.2.5. Regressão linear para obtenção da constante de velocidade .....	66
4.4.1. Representação gráfica da atividade da $\beta$ -glicosidase imobilizada estocada em solução e na forma liofilizada .....	72
4.4.2. Representação gráfica da atividade enzimática da $\beta$ -glicosidase imobilizada estocada em solução frente a diferentes concentrações de acetonitrila.....	73
4.4.3. Representação gráfica da atividade da $\beta$ -glicosidase imobilizada estocada em solução e na forma liofilizada .....	74
4.4.4. Representação gráfica da atividade enzimática da $\beta$ -glicosidase imobilizada estocada em solução frente a diferentes concentrações de acetonitrila.....	75

## Capítulo 1

### **1. Introdução**

Microrganismos sintetizam compostos químicos de baixa massa molar. Denominados metabólitos secundários (MSs) estes compostos são biossintetizados na fase estacionária do crescimento celular. A função destes MSs na fisiologia dos microrganismos é, de acordo com a literatura, uma questão ainda de intenso debate (Yilmaz e col., 2004; Belofsky e col., 2004).

A violaceína é o principal pigmento produzido pela *Chromobacterium violaceum* (Duran e Menck, 2001). Além de suas propriedades antibióticas (Lichstein e Van de Sand, 1945) e tripanocida (Caldas e col., 1978; Durán e col., 1994) esse pigmento apresenta atividade citotóxica em células de mamíferos (Durán e col., 1989), propriedade antiviral (May e col., 1991), anti-micobacteriana, antioxidante (Rettori e Durán, 1998) e tumoricida (Durán e col., 1996; De Azevedo e col., 2000 a, b). Estudos recentes indicam ainda que o pigmento induz apoptose em culturas de células de HL60 (Melo e col., 2003).

Na tentativa de obtenção de um derivado mais hidrossolúvel da violaceína, foram propostas biotransformações deste pigmento utilizando para tanto tratamento direto com enzimas.

As considerações mais relevantes para a incorporação dessa técnica à síntese são a régio, estereo e quimioseletividade que podem ser alcançadas utilizando-se reações de catálise enzimática (Wendy, 2000). Também, algumas dificuldades em síntese decorrentes das condições experimentais requeridas pelos reagentes químicos que incitam a indesejáveis isomerizações,

racemizações ou rearranjos, podem ser contornadas utilizando reações enzimáticas, que empregam condições bem mais brandas. (Wendy, 2000; Riva, 2001).

A catálise enzimática promove, portanto, uma alternativa para a química sintética que é muitas vezes competitiva representando uma nova seção de ferramentas na química orgânica.

Alquil- $\beta$ -D-glicosídeos são um grupo de substâncias anfífilas não iônicas, das quais diferentes atividades biológicas e biodegradabilidade podem ser exibidas. Eles possuem aplicações úteis em indústrias alimentícias, de cosméticos e farmacêutica. A síntese enzimática dessa classe de compostos vem atraindo interesses consideráveis nos últimos anos (Lirdprapamongkol e Svasti, 2000; Ruiz e col., 2001; Goyal e col., 2001).

Na síntese enzimática de derivados glicosídicos da violaceína, foram utilizados como biocatalisadores as duas enzimas responsáveis por transferências de unidades glicosídicas, a  $\beta$ -glicosidase e UDP-glucoronil transferase. A utilização dessas duas enzimas tem sido amplamente documentada na modificação de uma variedade de compostos fenólicos e álcoois (Stevenson e Hulb, 1999; Svasti e col., 2003).

O substrato 5-hidroindol, em alguns casos, foi utilizado, como modelo, para a padronização e otimização das reações enzimáticas, devido a disponibilidade comercial deste composto e de suas características estruturais semelhantes a violaceína (grupos indólicos).

## 1.1. Objetivos

Este trabalho tem como objetivos:

- Otimizar produção e purificação de violaceína.
- Estudar a atividade enzimática da UDP-glucuronil transferase em solventes orgânicos e surfactantes.
- Síntese enzimática de derivado glucurônico do 5'-hidroxindol utilizando a UDP-glucuronil transferase (modelo).
- Síntese enzimática de derivado glucurônico da violaceína utilizando a UDP-glucuronil transferase.
- Estudar a atividade enzimática das  $\beta$ -glicosidases em diferentes solventes orgânicos.
- Síntese enzimática do derivado glicosídico do octanol utilizando as  $\beta$ -glicosidases (modelo).
- Síntese enzimática de derivado glicosídico da violaceína utilizando as  $\beta$ -glicosidases.
- Síntese enzimática de glicosídeos dos derivados N-hidroximetílicos da violaceína utilizando as  $\beta$ -glicosidases.

## Capítulo 2

### 2. Revisão bibliográfica

#### 2.1. Violaceína

##### 2.1.1. *Chromobacterium violaceum*

A *Chromobacterium violaceum* (figura 2.1.1.) é uma bactéria quimiorganotrófica, gram-negativa e anaeróbia facultativa. Esta, possui formato de bastonete com dimensões de aproximadamente 0,5-1 x 2-3  $\mu\text{m}$ , se locomove por meio de um flagelo polar e de quatro flagelos laterais. Ela é saprófita e se encontra em amostras de solo e água de regiões temperadas, mas principalmente de regiões tropicais e subtropicais do planeta (Silvendra e Lo, 1975).



**Figura 2.1.1. Microscopia eletrônica da *Chromobacterium violaceum***



A *C. violaceum* foi documentada pela primeira vez em 1881 (Bergonzini, 1881) e seu isolamento no Brasil se deu em abril de 1976 a partir de uma amostra de água proveniente da estação de tratamento de água de Manaus, sendo identificada por pesquisadores do Instituto de Microbiologia da UFRJ (Caldas e col. 1978).

Esta bactéria vem sendo considerada não-patogênica para os humanos, contudo, já existem registros clínicos de infecção causados pela bactéria até mesmo com casos fatais (Daguilh e Baig, 2004; Shao e col., 2002; Dromigny e col., 2002).

### 2.1.2. Violaceína

A *Chromobacterium violaceum* produz um pigmento intracelular chamado de violaceína (figura 2.1.2.). Reilly e Pyne foram os primeiros a estudar mais detalhadamente a estrutura química deste pigmento (Reilly e Pyne, 1927). Eles sugeriram um procedimento de extração e purificação, além de uma possível fórmula molecular ( $C_{50}H_{59}O_{15}N_5$ ).

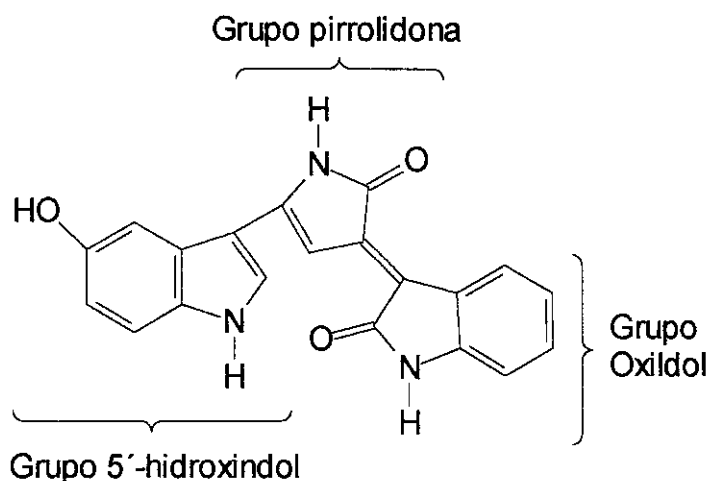
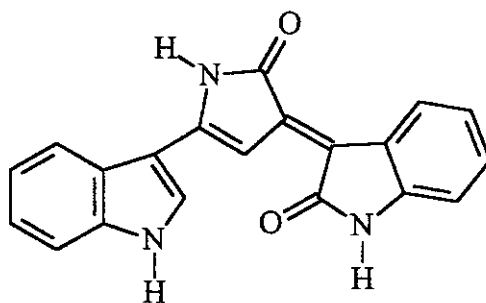


Figura 2.1.2. Estrutura da violaceína

A partir de então surgiram várias sugestões de diversos autores para a fórmula molecular e a estrutura química da violaceína, todas sem sucesso (Beer e col., 1949). Baliantine e colaboradores foram os que deduziram, em 1958, através de estudos de degradação e síntese, a estrutura correta da violaceína (Baliantine e col., 1958).

Estes pesquisadores também propuseram corretamente a estrutura do pigmento produzido em menor proporção pela *C. violaceum*: a deoxiviolaceína. A única diferença entre esse pigmento e a violaceína é que a deoxiviolaceína não possui o grupo hidroxila na posição 5 do anel aromático do grupamento indólico.



**Figura 2.1.3. Estrutura da deoxiviolaceína**

Além da violaceína e da deoxiviolaceína a *Chromobacterium violaceum* produz outros inúmeros compostos: oxiviolaceína (Hoshino e Ogasawara, 1990), HS-1 (Hoshino e col., 1994-patente), pseudodeoxiviolaceína e prodeoxiviolaceína (Hoshino e col., 1994), proviolaceína e pseudoviolaceína (Hoshino e col., 1995; Momen e col., 1998), alguns inclusive com propriedades antibióticas: aerocianidin (Parker e col., 1988), aerocavin (Singh e col., 1988), 3,6-dihidroindoxageno (Hamada e col., 1983) dentre outros.

A violaceína, teve várias propostas mecanísticas sobre seu caminho biossintético (Hoshino e col., 1987a, 1987b, 1990,1993 e 1995), sendo totalmente esclarecido por Momen e Hoshino onde um rearranjo intramolecular do anel indólico ocorria no sítio do 5'-hidroxindol (Momen e Hoshino, 2000).

O papel fisiológico deste pigmento, tão pouco deixou de ser um mistério apesar da existência de teorias para sua elucidação (De Moss e col., 1967; Durán e Fajoni, 1980; Durán e Menck, 2001).

A caracterização da violaceína realizou-se principalmente na década de 80 através de espectros de Ressonância magnética nuclear de próton (RMN  $^1\text{H}$ ) e carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ), espectroscopia de infravermelho (Laatsch e col., 1984), espectroscopia de ultravioleta, espectrometria de Massas (Riveros, 1986; Riveros e col., 1988; Rettori e Durán, 1998) e por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Rettori e Durán, 1998).

A síntese total da violaceína foi descrita por Wille e Steglich em 2001 (Wille e Steglich, 2001).

### **2.1.3. Propriedades biológicas da violaceína**

Os cientistas Lichstein e Van de Sand foram os primeiros a fazer um estudo abrangente das propriedades antibióticas da violaceína. Este estudo encontra-se relatado num artigo publicado em 1945 no *Journal of Infectious Diseases* (Lichstein e Van de Sand, 1945). Até aquela data haviam sido reportadas a morte por septicemia, devido à *C. violaceum*, de 3 pessoas nos E.U.A. O que chamou a atenção de Lichstein e Van de Sand nas lesões de pele das vítimas era a ausência de microrganismos contaminantes, levando-os a

suspeitar da possível atividade antibiótica da violaceína. Eles fizeram testes em 51 cepas de bactérias, totalizando um número de 21 espécies. Os resultados mostraram que a violaceína possuía marcante efeito inibitório no crescimento de bactérias Gram positivas, e pequeno efeito, nas Gram-negativas.

A partir de então, além da atividade bactericida, surgiram trabalhos atribuindo à violaceína propriedades tripanocidas (Caldas e col., 1978; Riveros e col., 1988; Durán e col., 1989), antiviral (May e col., 1991), tumoricida (Durán e col., 1996; De Azevedo e col., 2000a,b), antioxidante (Aski e col., 1997; Rettori e col., 1998), anti-micobacteriana (Souza e col., 1999) além de apresentar atividade citotóxica em células de mamíferos (Durán e col., 1989; Haun e col., 1992).

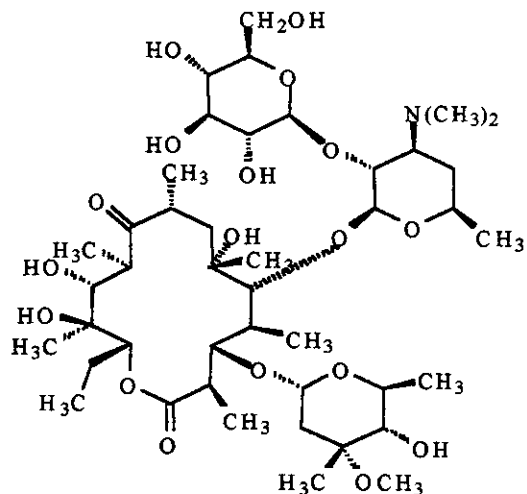
A propriedade fotobiológica da violaceína foi proposta por Caldas quando estudos sobre a natureza da peculiar coloração do Rio Negro (AM-BRA) foram realizados (Caldas, 1977; Caldas e col., 1978). A potencialidade fototerapêutica da violaceína foi sugerida ainda por Durán e Faljoni-Alario (1980) e Campos e col., (1982).

Estudos recentes indicam ainda que o pigmento induz apoptose em culturas de células de HL60 (Melo e col., 2003).

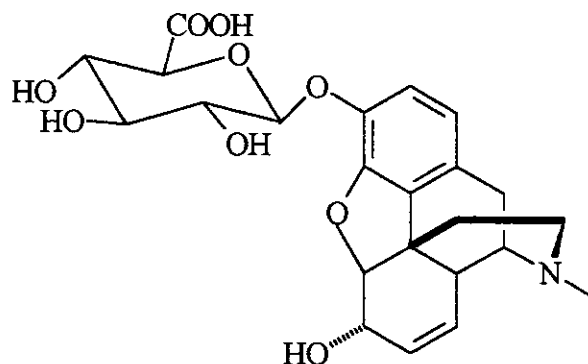
## **2.2. Hipótese**

Dados da literatura reportando alterações e melhorias na atividade biológica de alguns compostos quando transformados em alquil- $\beta$ -D-glicosídeos (figura 2.2.1.), nos levaram a crer que derivados glicosídicos da violaceína seriam solúveis em água e poderiam também apresentar atividades

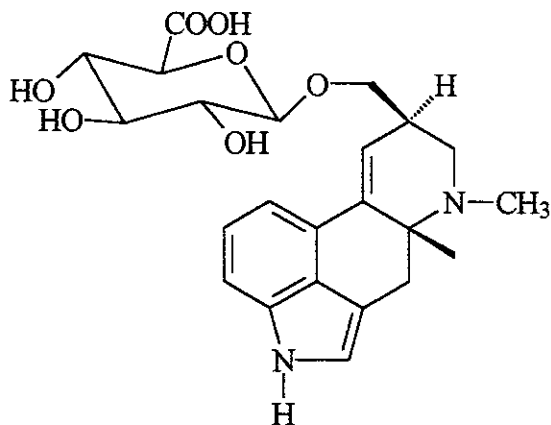
biológicas diferentes ou ainda maiores que desse pigmento (Sasaki e col., 1996; Jenkins e col., 2000; Day e col., 2000; Stevenson e col., 2000).



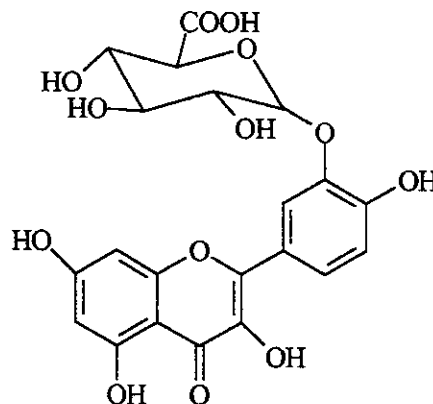
**Eritromicina  $\beta$ -D-glicopiranosídeo**



**Morfina glicopiranosídeo**



**Quercetina  $\beta$ -D-glicopiranosídeo**



**Lisergol  $\beta$ -D-glicopiranosídeo**

**Figura 2.2.1. Derivados glucurônicos de algumas moléculas biologicamente ativas**

## **2.3. Enzimas e a biocatálise**

Chamamos de enzimas as proteínas complexas que catalisam processos biológicos. Elas estão entre as biomoléculas mais notáveis devido a sua extraordinária especificidade e poder catalítico, que são muito superiores aos dos catalisadores produzidos pelo homem. Praticamente todas as reações que caracterizam o metabolismo celular são realizadas por enzimas. As enzimas são, portanto, consideradas as unidades funcionais do metabolismo celular.

A síntese e modificação de compostos utilizando enzimas vêm atraindo interesses consideráveis nos últimos anos devido a grande régio, estéreo e quimio seletividades apresentadas por esse processo.

Os termos biocatálise ou biotransformação abrangem os processos em que enzimas são utilizadas como catalisador na conversão de substratos.

### **2.3.1. Reações enzimáticas de transferência glicosídica**

Existem dois grupos de enzimas que podem ser utilizadas para a síntese de glicosídeos. A família das glicosil transferases e a família das glicosidases (enzimas hidrolíticas).

Dentro dos grupos existem determinadas abordagens, tais como, vantagens e limitações ligadas a cada uma das enzimas catalíticas.

As glicosidases, por exemplo, exibem um amplo espectro de especificidades com relação as agliconas (substratos) que serão glicosiladas.

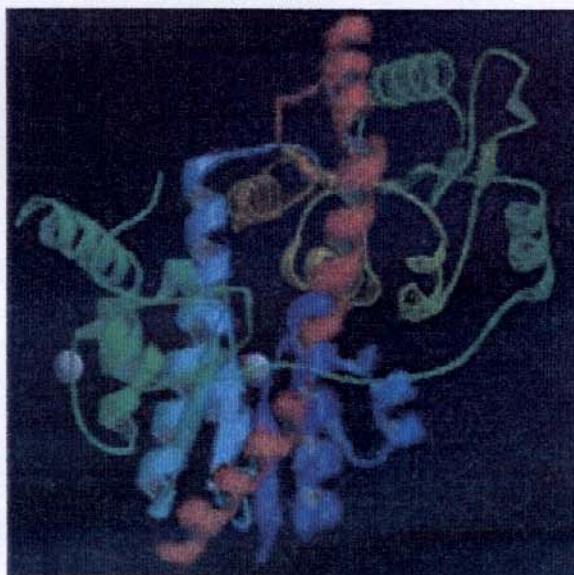
Por outro lado, a glicosilação de uma vasta classe de substratos fenólicos, nosso principal interesse, vem sendo catalisada por outra família de

enzimas, as glucuronil transferases, tais como UDP-glucuronil transferase. (Thiem e col. 1998).

Porém, a necessidade do uso de co-fatores pelas UDPGTs, põe em contraste as duas enzimas utilizadas, pois as glicosidases catalisam a formação de glicosídeos anomericamente puros sem a necessidade do uso desse co-fator.

### **2.3.1.1. Uridina difosfo-glucuronil transferase (UDPGT)**

As urudina-difosfo-glucuronil transferases (figura 2.3.1.) pertencem à uma família de enzimas ligadas a membrana encontradas em organismos vivos que glucuronizam ambos compostos endógenos e xenobióticos tais como bilirubina, esteróides, drogas e poluentes ambientais.



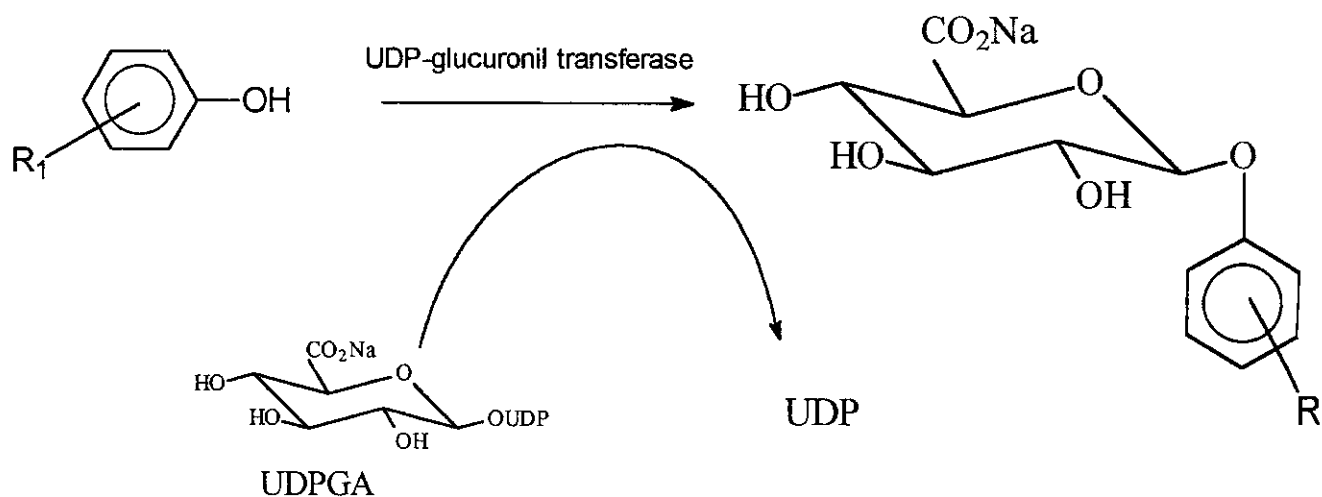
**Figura 2.3.1. Estrutura cristalina da UDP-glucuronil transferase**

A maior função da glucuronização é transformar compostos hidrofóbicos em derivados solúveis, facilitando assim sua desintoxicação e excreção (Radominska-Pandya e col., 1999).

Entretanto, UDPGTs podem também sintetizar glucuronídeos biologicamente ativos ou mais tóxicos que seus antecessores (Ritter, 2000; Mackenzie e col., 2003).

A aplicação *in vitro* desse importante processo metabólico é amplamente documentada em escala analítica. Entretanto, em relação a síntese orgânica clássica um processo biocatalisado elaborado com sucesso em escala micro, quando adaptado ao nível de gramas aparece como um processo não trivial (Thiem e col., 1998).

Apesar do desconhecimento do mecanismo molecular exato, na formação de glucuronídeos, a configuração do produto sugere um mecanismo de substituição nucleofílica  $SN_2$ , do grupo UDP resultante na inversão de configuração. Átomos com O, S, e C, sendo nucleofílicos, podem formar ligações glicosídicas (Figura 2.3.2.).



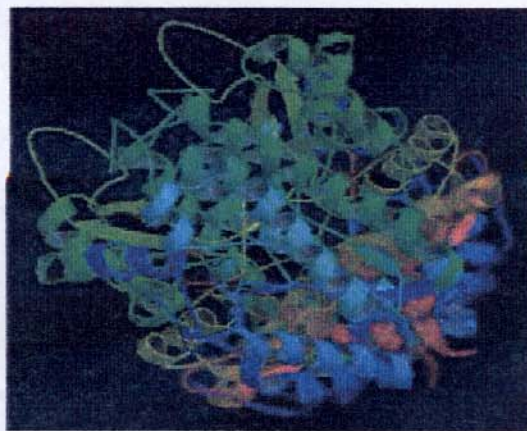
**Figura 2.3.2. Representação da reação enzimática da UDPGT**



A partir de dados encontrados na literatura, podemos observar uma diversidade estrutural de compostos glucuronídeos (Stevenson e col., 2000; Shimizu e col., 2003; Lu e col., 2003). Isto sugere que a transferase seja capaz de se ligar seletivamente a uma variedade de moléculas com diferentes formas geométricas e tamanhos, isto é, a enzima é polimórfica, ou seja existe mais do que uma transferase. Até o momento, mais de 35 produtos de genes diferentes de UGT foram descritos em um grande número de diferentes espécies, sendo separadas em 2 subfamílias, onde a segunda é responsável pelo processo catalítico (King e col., 2000; Nakajima e col., 2002; Leclerc e col., 2002).

### **2.3.1.2. $\beta$ -glicosidase**

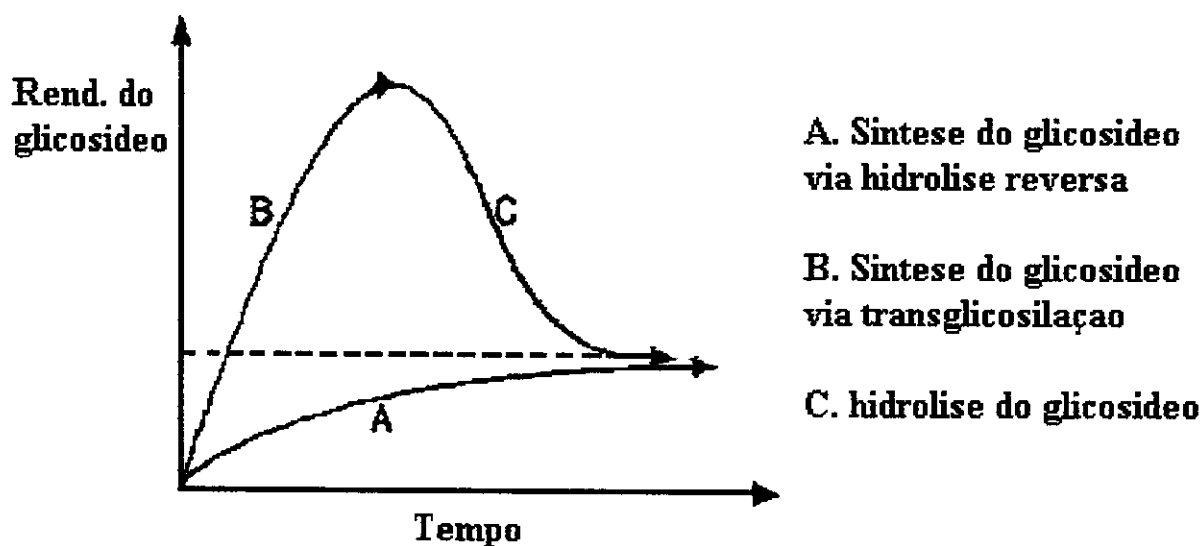
As  $\beta$ -glicosidases (figura 2.3.3.) pertencem a uma classe de enzimas hidrolíticas que em determinadas condições podem ser utilizadas na formação de ligações glicosídicas.



**Figura 2.3.3. Estrutura cristalina de uma glicosidase cianogênica extraída do algodão**

As  $\beta$ -glicosidases podem ser extraídas de diferentes fontes tais como *Thermotoga marítima* (Goyal e col., 2001), *Pyrococcus furiosus* (Roode e col., 2001), *Pinus avium L.* (Gerardi e col., 2001), *Dalbergia cochinchinensis* (Svasti e col., 1999), *Aspergillus niger* (Gunata e col., 1997) e *Thai rosewood* (Lirdprapamongkol e Svasti, 2000) entre outras, porém, algumas destas demonstram baixa reatividade na glicosilação de álcoois terciários e fenóis, pois, as representantes dessa classe de enzimas se diferem na especificidade aos substratos (Conn, 1993). Elas funcionam, por exemplo, em adição glicosídica a álcoois, hidroxiaminoácidos e nucleosídeos. Respondem ainda a aceptores não alcoólicos tais como oximas e tiois. (Van Rantwijk e col. 1999).

O mecanismo hidrolítico das  $\beta$ -glicosidases é considerado similar à uma catálise ácida (Sinnott, 1990).



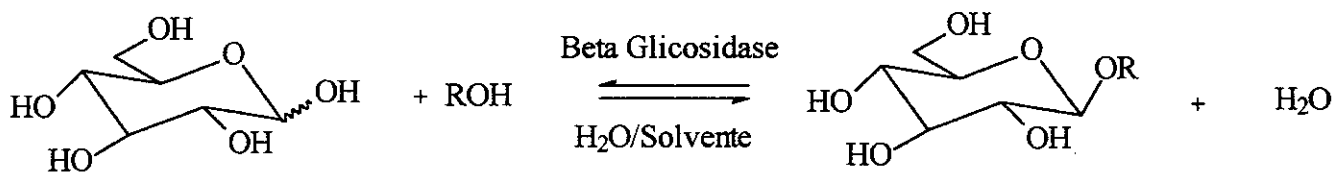
**Figura 2.3.4. Glicosilação via controles termodinâmico e cinético**

A classe das glicosidases podem ser utilizadas para a síntese de glicosídeos por dois modos: a transglicosilação, controlada cineticamente e a hidrólise reversa, controlada termodinamicamente (Van Rantwijk e col., 1999; Roode e col., 2001; Vic e col., 1996) (Figura 2.3.4).

### A. Hidrólise reversa

A hidrólise reversa está baseada no deslocamento termodinâmico do equilíbrio. Neste processo ocorre a hidrólise da ligação glicosídica que pode ser reversível. Este deslocamento é possível pelo aumento da concentração dos substratos (hexose e nucleófilo) e diminuição da atividade aquosa (Vic e col., 1997; Vulfson, 1990). Este processo utiliza um monossacarídeo como um dos substratos e vem sendo chamado de glicosilação direta ou “hidrolise reversa” (Likolov e col., 1989).

Relativamente, poucos resultados (Vulfson e col., 1990; Petit e col., 1991), foram descritos utilizando controle termodinâmico, mas acredita-se que este caminho possa se tornar uma eficiente rota sintética de alquil glicosídeos (Vic e col., 1996; Johansson e col., 1989).



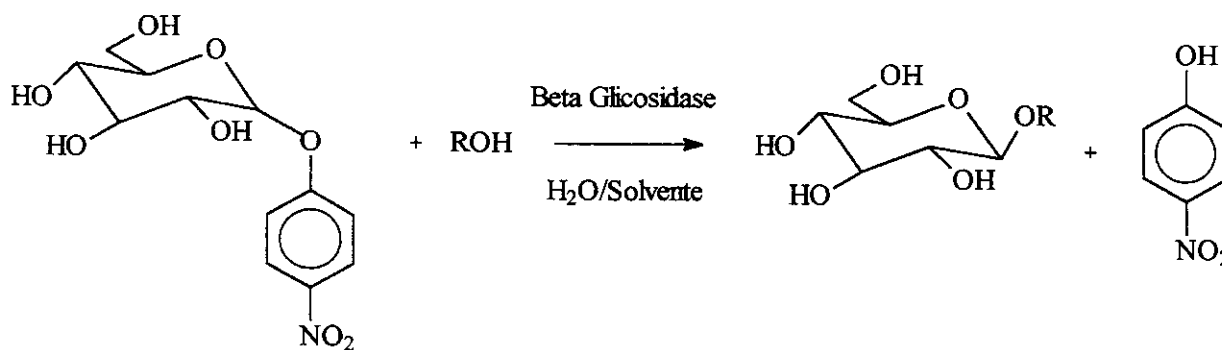
**Figura 2.3.5. Representação da reação de hidrólise reversa utilizando  $\beta$ -glicosidase**

## B. Transglicosilação

A transglicosilação é um processo onde um composto é utilizado como doador glicosídico para um nucleófilo (por exemplo, um álcool) presente no meio reacional gerando uma nova ligação glicosídica.

Desde que o glicosídeo formado durante a reação se torne também um substrato para a enzima, o sucesso do método depende de (i) transglicosilação muito mais rápido do que a hidrólise glicosídica e (ii) a razão de hidrólise do produto ser menor que a hidrólise do doador glicosídico. Na prática estas condições podem ser alcançadas facilmente. Uma situação análoga pode ser encontrada em síntese enzimática de peptídeos usando proteases (Nilsson, 1988; Nilsson, 1990).

Este processo é o mais comumente descrito pela literatura e vem sendo aplicada com sucesso na síntese de numerosos glicosídeos (Crout e col., 1991; Svasti e col., 2003).



**Figura 2.3.6. Representação da reação de transglicosilação utilizando  $\beta$ -glicosidase**

## **2.3.2. Biocatálise com a utilização de meios não convencionais**

### **2.3.2.1. Utilização de solventes orgânicos**

Atendendo que o conceito de biotransformação está associado ao uso de biocatalisadores, nas quais a água é o solvente preponderante, é fácil compreender que a mesma função tenha sido desempenhada por este solvente em inúmeros estudos de cinética enzimática. Observou-se, no entanto, que o uso exclusivo de água como solvente de meios de biotransformação restringia a gama de aplicações da biocatálise, bem como limitava a produtividade de diversos processos, por exemplo, os que envolviam substratos hidrófobos.

Por outro lado, a constatação de que muitas enzimas operam *in vivo* em ambientes ricos em líquidos hidrófobos, levou a conclusão de que estes meios predominantemente não-aquosos são adequados à expressão de atividade biocatalítica. A convergência destes dois aspectos conduziu à incorporação no meio reacional, de solventes orgânicos, fluidos supercríticos, fases gasosas ou fases sólidas, aos quais se convencionou atribuir a designação de meios não-convencionais.

As principais razões para a utilização de meios não-convencionais são essencialmente o fato destes permitirem: primeiro, a solubilização de substratos e/ou produtos hidrófobos, levando ao desenvolvimento de processos com produtividade volumétrica elevada. Segundo, a redução de possíveis efeitos inibitórios ou/e tóxicos por parte do substrato e/ou produto, em que o solvente orgânico pode ser selecionado de modo a funcionar como diluente, reduzindo a concentração interfacial na fase aquosa (por partição) de substratos e/ou produtos. E por último, o equilíbrio químico, no caso de

enzimas hidrolases, pode ser deslocado no sentido contrário, favorecendo reações de síntese (Vulfson e col., 1990; Vic, e col., 1997).

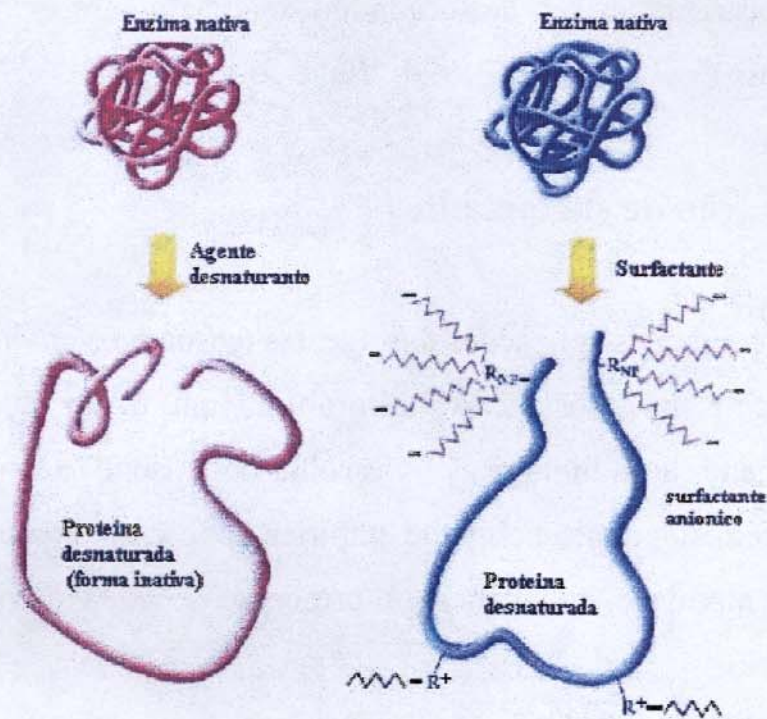
### **2.3.2.2. Utilização de surfactantes**

Uma das principais aplicações dos agentes tensoativos em biotecnologia é na solubilização de substâncias hidrofóbicas em meios aquosos e de proteínas das membranas biológicas. A escolha do tensoativo mais adequado para estes fins tem sido essencialmente empírica e, no caso da recuperação de proteínas com atividade enzimática, a preservação dessa atividade é um critério prioritário.

Não sendo possível fazer generalizações quanto à escolha de tensoativos é, no entanto, possível dizer que os não iônicos são, em geral, menos desnaturantes para proteínas solubilizadas do que os iônicos.

Os tensoativos não iônicos, normalmente não induzem alterações conformacionais nas proteínas que causam perdas das suas propriedades biológicas, ao contrário dos tensoativos aniônicos e catiônicos, com características desnaturantes.

A ação desnaturante dos tensoativos iônicos resulta da combinação de uma "cabeça" polar com carga e de uma "cauda" apolar flexível (figura 2.3.7.).



**Figura 2.3.7. Representação da desnaturação protéica causada pelo contato com agentes desnaturantes tais como solventes e surfactantes iônicos**

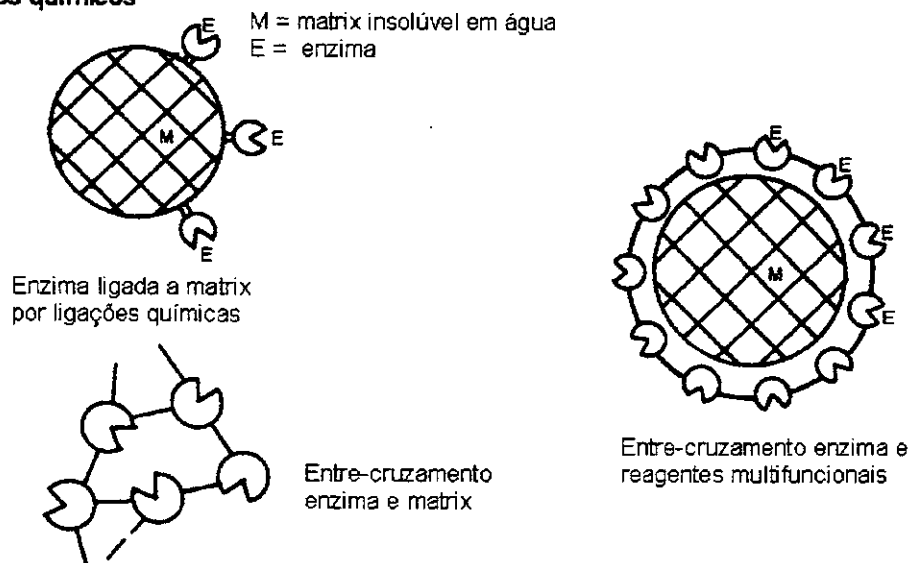
## 2.4. Imobilização enzimática

O uso efetivo das enzimas pode ser dificultado por algumas propriedades peculiares das proteínas enzimáticas, tais como alta sensibilidade a agentes desnaturantes, diminuição de atividade ou efeitos tóxicos. Alguns desses fatores podem ser removidos pelo uso de enzimas imobilizadas. Este caminho tem provado ser mais vantajoso para catálise enzimática do que seu uso com enzima livre (Durán e col., 2002).

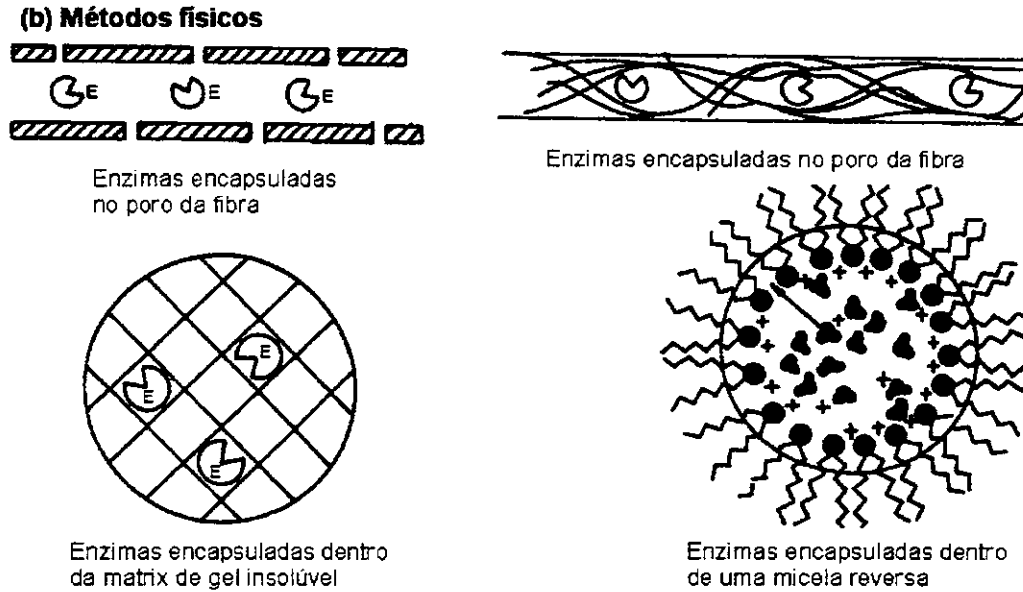
Desde que os métodos usados para procedimento de imobilização influenciam grandemente as propriedades dos resultados biocatalíticos, a seleção de estratégias de imobilização determinam os processos específicos para a catálise. Eles incluem vários parâmetros tais como, atividade catalítica, efetivação da utilização catalítica, desativação, regeneração cinética e custos. Toxicidade de reagentes de imobilização também devem ser considerados juntamente com o processo de imobilização, despejo de resíduos e aplicação.

Várias técnicas podem ser aplicadas para imobilizar enzimas sobre suportes sólidos. Eles são principalmente baseados sobre mecanismos químicos e físicos. Métodos de imobilização química incluem (i) ligação da enzima à matrix por ligações covalentes; (ii) entre-cruzamento (*cross-linking*) entre a enzima e a matriz e (iii) entre-cruzamento entre a enzima e reagentes bifuncionais. Métodos físicos, como adsorção, envolvem a captação (*entrapment*) das moléculas da enzima dentro dos poros da matrix (Figura 2.4.1.) (Zaborsky, 1974; Duran e col., 2002).

(a) Métodos químicos







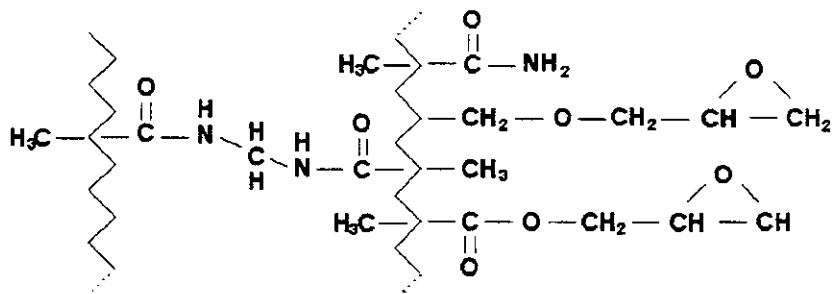
**Figura 2.4.1. Diferentes tipos de processos de imobilização: (a) métodos químicos; (b) métodos físicos**

### 2.4.1. Suporte sólido para imobilização enzimática

Eupergit<sup>®</sup>C é um suporte para imobilização de enzimas com potencial industrial para utilização em química fina e farmacêutica (Katchalski-Katzir e Kraemer, 2000). Foi desenvolvido entre 1974 e 1980 pela Röhm, Alemanha (Kraemer e col., 1975), sendo a primeira indústria a introduzir a tecnologia enzimática, aproximadamente há 100 anos. Otto Röhm também descobriu em 1930 a polimerização de metil meta acrilato, o qual é conhecido hoje como vidro acrílico e como consequência natural, desenvolveu o carregador para enzimas sobre a base de polimerização de metil acrilato.

Eupergit<sup>®</sup>C consiste de macroporos de esferas “macroporous beads” com diâmetros entre 100 e 250  $\mu\text{m}$ , produzidos por copolimerização de  $N,N'$ -

metileno-bis-(metacrilamida), glicidil metacrilato, alilglicidil éter e metacrilamida (Figura 2.4.2.).



**Figura 2.4.2. Estrutura química do Eupergit® C.**

Sua estrutura é estável química e mecanicamente, inclusive sobre pHs entre 0-14, não apresentando expansão ou redução mesmo em mudanças bruscas de pH. O Eupergit® C liga-se às enzimas via grupos oxiranos que reagem em pH neutro ou alcalino, essas ligações ocorrem covalentemente com grupos amino dessas proteínas. Este processo torna esses catalisadores mais estáveis, conseqüentemente, diminuindo a perda da atividade biocatalítica (Katchalski-Katzir e Kraemer, 2000).

Devido à alta densidade dos grupos oxiranos na superfície das esferas ( $600 \mu\text{mol g}^{-1}$  de Eupergit® C seco), a capacidade ligante de uma enzima é de aproximadamente  $100 \text{ mg proteína g}^{-1}$  Eupergit® C (peso seco). É comercialmente disponível mundialmente, sendo empregada várias toneladas por ano para utilização em biocatálise. Com relação a produtividade, na maioria dos casos apresenta-se maior que  $1000 \text{ Kg produto/Kg de Eupergit® C seco}$ . O custo do Eupergit® C na produção de Eupergit® C-enzimas, na maioria dos casos, é menos do que  $\text{US\$ } 0.42/\text{Kg}$  de produto, que é por exemplo, menos de 1% do custo avaliado em  $\text{US\$ } 42/\text{Kg}$  de produto (Katchalski-Katzir e Kraemer, 2000).

## Capítulo 3

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1. Técnicas de caracterização**

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram realizadas utilizando um equipamento Shimadzu LC-10AD, com coluna analítica Shim-Pak C18 e detector de UV-visível.

Os espectros de RMN  $H^1$  foram obtidos nos equipamentos disponíveis no IQ, que operam na faixa de 300 e 500 MHz, em DMSO,  $D_2O$  e  $CD_3CN$  a temperatura ambiente.

Os espectros de infravermelho em pastilhas de KBr foram obtidos em equipamentos disponíveis no IQ (Bomen/MB Séries), operando na faixa de 4000 a  $400\text{ cm}^{-1}$ .

Os espectros de ultravioleta, na faixa de 700 a 200 nm, foram obtidos no Hitachi U-2000-Spectrophotometer, disponível no laboratório de pesquisa.

As análises de espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório THOMSON no Instituto de Química da UNICAMP.

## **3.2. Violaceína**

### **3.2.1. Microrganismo e manutenção**

Partindo de uma cultura de *Chromobacterium violaceum* CCT 3496 da coleção da Fundação André Tosello, Campinas, SP, isolou-se uma colônia, após cultivo por esgotamento em placas de ágar. Esta colônia pura de *C. Violaceum* foi utilizada em todas as fermentações descritas neste trabalho.

A manutenção da cultura foi feita em caldo nutriente ( $\alpha$ -D-glicose anidra 0,5%, peptona bacteriológica 0,5%, extrato de levedura 0,2%, em água destilada) mantida em shaker à temperatura de 30° C e agitação de 150 rpm.

### **3.2.2. Produção de violaceína a partir da cultura de células de *Chromobacterium violaceum* CCT 3496 em fermentador com capacidade para 30 L**

Em frasco Erlenmeyer de 50 mL contendo 20 mL de caldo nutriente esterilizado ( $\alpha$ -D-glicose anidra 0,5%, peptona bacteriológica 0,5%, extrato de levedura 0,2%, em água destilada) acrescido de triptofano 0,03% foi inoculada a bactéria (pré-inóculo). Incubou-se o frasco por 18 horas em shaker rotatório (a 30°C e 200 rpm). Deste primeiro pré-inóculo, preparou-se outro nas mesmas condições do primeiro utilizando 50  $\mu$ L de volume do mesmo. A partir do segundo pré-inóculo preparou-se o inóculo em Erlenmeyer de capacidade 500 mL contendo 300 mL do caldo nutriente acrescido de triptofano 0,03 % e incubou-se por 20 h, a 30°C e 200 rpm.

Em um béquer de 5 L pesou-se os outros componentes do meio de

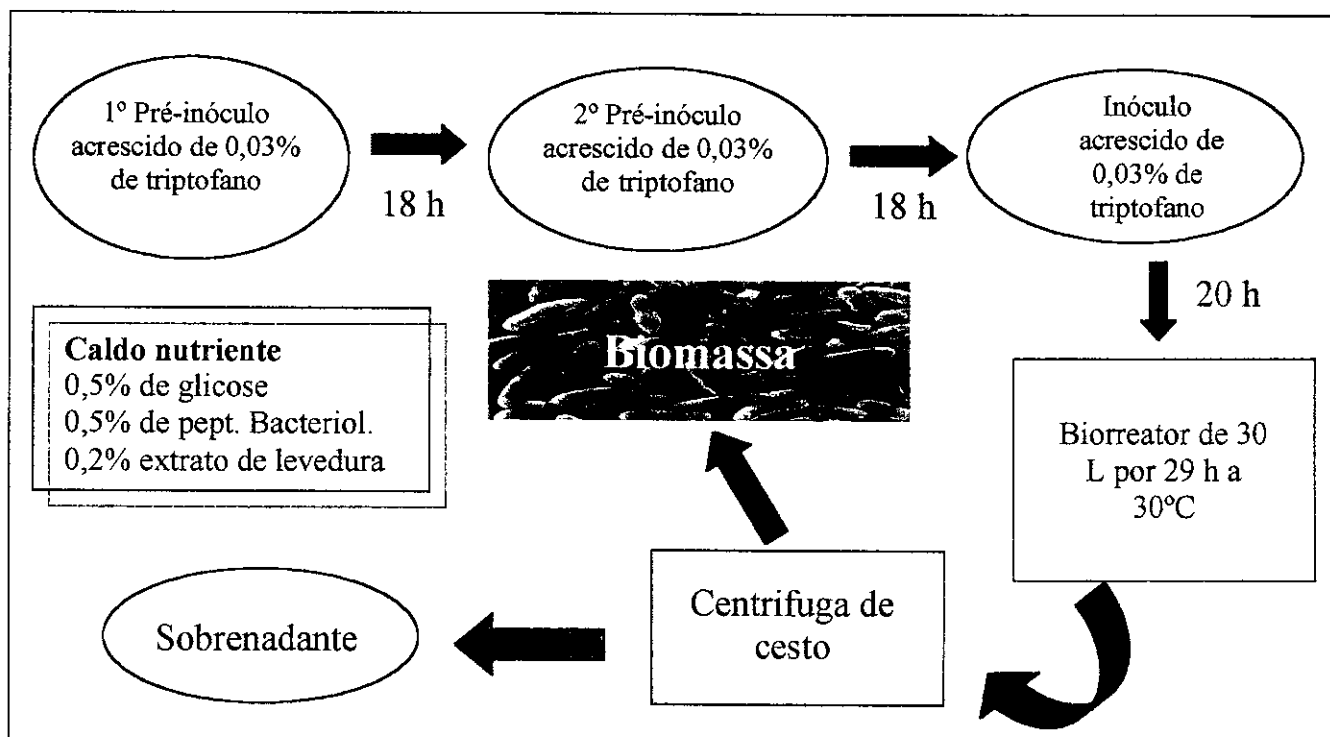
cultura (20 g de peptona, 336 g de extrato de levedura e 268 g triptofano em um volume de 4 L de água. Transferiu-se o conteúdo do béquer a um biorreator ML-4100 (fermentador de aço inoxidável New Brunswick Scientific, capacidade 30 L). Completou-se o volume do biorreator para 19,2 L. Esterilizou-se este meio de cultura no biorreator (120°C, por 20 minutos, sem ainda adicionar a glicose e o inóculo). Após o biorreator esfriar à temperatura ambiente, adicionou-se os 500 mL de solução de  $\alpha$ -D-glicose (168 g) e 300 mL de inóculo totalizando aproximadamente 20 L.

A esterilização da  $\alpha$ -D-glicose foi feita separadamente em autoclave à 110 °C por 30 minutos sendo esta depois introduzida no biorreator sob condições assépticas. O inóculo foi adicionado ao biorreator contendo meio de cultura estéril para dar início à fermentação. Esta fermentação foi realizada nas seguintes condições:

1. Tempo total de fermentação: 29 h;
2. Agitação: 120 rpm (durante 12 h iniciais) e 250 rpm (todo restante da fermentação);
3. Temperatura de 33° C e pressão de 5 PSI;
4. pH entre 6,5 e 7,0 (foi monitorado em pH-metro digital);
5. Fluxo de ar: 15 L.min<sup>-1</sup> (12 h iniciais) e 50 L.min<sup>-1</sup> (todo restante da fermentação).

A adição de antiespumante concentrado a base de silicone (grau biológico) foi utilizada quando necessário, até se observar uma diminuição no volume de espuma. Após 10 horas de fermentação foi adicionada mais glicose ao meio, no mesmo volume e concentração da glicose inicial.

Decorridas 29 horas de fermentação, o meio de cultura estava com uma coloração violeta bastante intensa. Este foi então recolhido para centrifugação.



**Figura 3.2.1. Diagrama mostrando o procedimento utilizado para obtenção de *Chromobacterium violaceum***

### 3.2.3. Processo de extração da violaceína

Após a fermentação, a extração do pigmento (violaceína) foi realizada utilizando-se uma centrífuga de cesto (4.500 rpm. à 25°C). Durante o processo, observou-se a separação de um precipitado gelatinoso. O sobrenadante foi desprezado permanecendo apenas a biomassa de bactérias de cor violeta escuro.

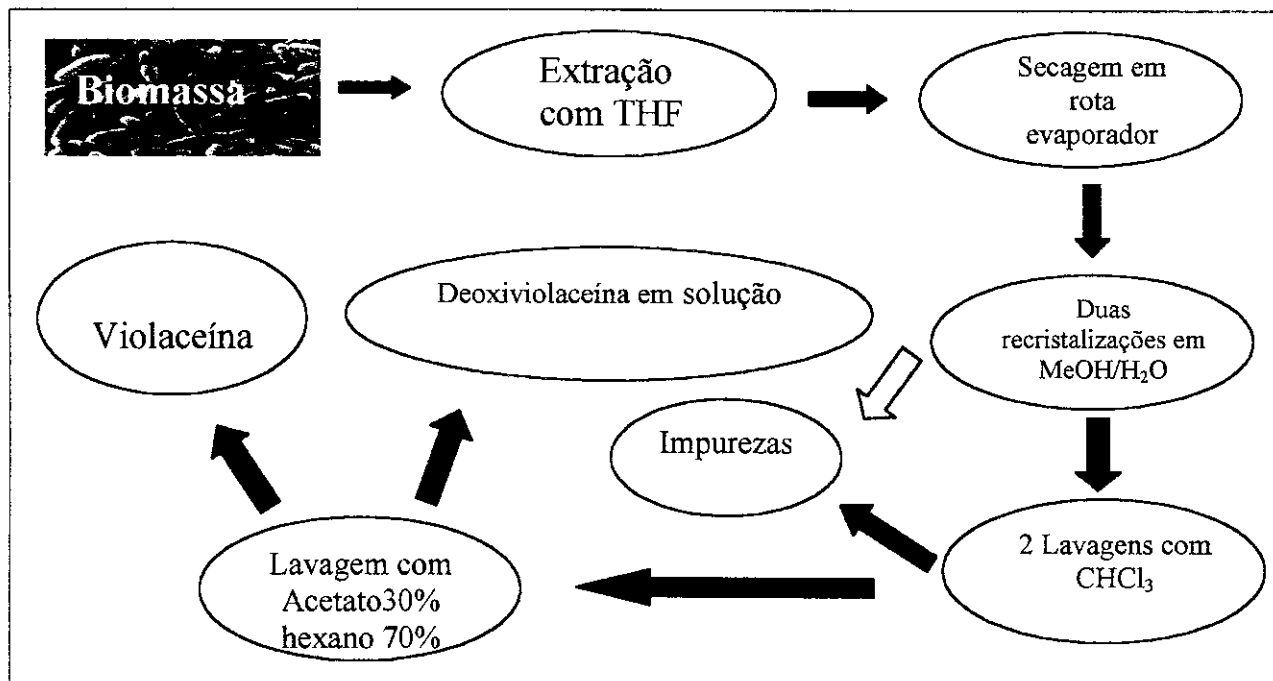
A seguir a biomassa foi lavada manualmente por três vezes com água destilada para a retirada de restos de meio de cultura.

Depois de seca em estufa a 50°C, a biomassa final foi extraída com THF e os extratos foram secos em rota evaporador.

### 3.2.4. Processo de purificação da violaceína

O sólido obtido foi então re-cristalizado duas vezes em metanol/água e depois de filtrado, lavado com duas porções de clorofórmio para retirada de outros metabólitos (Momen e col., 1998) provenientes da *Chromobacterium violaceum*. Nessa parte do processo a violaceína e a deoxiviolaceína fazem parte do sólido. A purificação, tanto em coluna flash quanto em placa preparativa dos dois compostos foi realizada utilizando-se acetato/hexano 30/70% como eluente.

A lavagem da mistura de violaceína e deoxiviolaceína com um eluente (30% de acetato de etila e 70% Hexano), também pode ser realizada. Nesse processo, apenas a deoxiviolaceína é extraída.



**Figura 3.2.2. Diagrama mostrando o procedimento utilizado para a obtenção de violaceína**

### 3.2.5. Caracterização da violaceína e deoxiviolaceína

#### 3.2.5.1. Por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A violaceína foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando as seguintes condições: vazão = 0,4 mL/min; fase estacionária = coluna analítica Shim-Pak C18; temperatura da coluna = temperatura ambiente (25° C); fase móvel = metanol 85% : água 15%; comprimento de onda do detector = 370 e 575 nm (Anexos 1 e 2).

**Tabela 3.2.1. Valores dos tempos de retenção (TR) referentes a violaceína e a deoxiviolaceína.**

	TR a 370 nm	TR a 575 nm
Deoxiviolaceína	10,94	11,09
Violaceína	8,35	8,49

#### 3.2.5.2. Por ressonância magnética nuclear de próton, espectroscopia de infravermelho e ultravioleta

➤ Violaceína. RMN  $H^1$  (DMSO, 500 MHz)  $\delta$  6,769 (d, 1H); 6,815 (d, 1H, J=14 Hz); 6,943 (t, 1H, J=12,5 Hz) 7,195 (t, 1H, J=12,5 Hz); 7,236 (s, 1H); 7,341 (d, 1H, 14 Hz); 7,644 (s, 1H); 8,174 (s, 1H); 8,923 (d, 1H, J=12,5 Hz); 9,332 (s, 1H); 10,729 (s, 1H); 10,807 (s, 1H) e 11,887 (s, 1H) ppm (Anexo 3).

IV.  $\nu_{max}/ cm^{-1}$  1659,53 (str.C=C); 1681 (vCO); 3421,47 (str.O-H) (KBr)(Anexo 4).



UV . (Etanol,  $\lambda_{\max}$ ) - 265, 370 e 575 nm (**Anexo 5**).

► Deoxiviolaceína. RMN  $H^1$  (DMSO, 500 MHz)  $\delta$  6,827 (d, 1H, J=8 Hz); 6,974 – 6,959 (t, 1H, 7,25 Hz); 7,233 – 7,202 (t, 1H, J=7,75 Hz); 7,301-7,316 (m, 2 H), 7,571 – 7,554 (m, 1H); 7,652 (s, 1H ), 7,849–7,839 (m, 1H); 8,175 (d, 1H); 8,94 (d, 1H, J=8 Hz); 10,640 (s, 1H); 10,808 (s, 1H) e 12,097 (s, 1H) ppm (**Anexo 3**).

IV .  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$  1655,21 (str. C=C); 1719 ( $\nu\text{CO}$ ) (KBr)(**Anexo 4**).

UV (Etanol,  $\lambda_{\max}$ ) - 265, 370 e 575 nm (**Anexo 5**).

### **3.2.6. Estabilidade da violaceína em meio básico**

Em 30 mL de uma solução HCl 0,2 M foram adicionados 20 mg de violaceína. A titulação dessa solução foi realizada com KOH 0,3 M.

Após 1 hora em pH alcalino (pH>10) a solução foi filtrada e acidificada com ácido clorídrico 10 %.

### **3.3. UDP-glucuronil transferase**

A UDP-glucuronil transferase foi obtida comercialmente da Sigma sendo estocada em temperatura abaixo de 0°C na forma liofilizada (Sigma - 4 U/mg - uma unidade transfere 1.0 mmol de ácido glucurônico da uridina 5'-difosfo ácido glucurônico (UDPGA) para a fenolftaleína por minuto em pH = 8 a 37° C).

### 3.3.1. Medidas de atividade enzimática da UDP-glucuronil transferase analisadas por UV-visível

#### 3.3.1.1. Substrato p-nitrofenol (Zakim e Vessey, 1973)

O p-nitrofenol em pH alcalino tem um máximo de absorção a 400 nm, o qual é perdido na formação de glucuronídeos. O ensaio com a UDPGT baseia-se no desaparecimento do p-nitrofenolato medindo-se o decréscimo na absorbância a 400 nm. Em um volume final de 0,6 mL adicionou-se substrato e enzima, respectivamente (Tabela 3.3.1.).

**Tabela 3.3.1. Reagentes adicionados nas medidas de atividade enzimática da UDP-glucuronil transferase**

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração estoque (molL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Volume adicionado (µL)</b>	<b>Concentração final (mM)</b>
UDPGA	0,0131	180	4
p-nitrofenol	0,01	18	0,3
Tampão Tris	0,25	120	50
Água	-	282	-

A mistura foi incubada a 37° C e a reação iniciada pela adição de 12 mg da UDPGT. Após rápida homogeneização, uma alíquota de 0,1 mL da mistura de reação foi removida e desproteínada com 0,9 mL de ácido tricloroacético 5% (TCA). Esta constituiu o branco que foi obtido a cada determinação. Alíquotas de 0,1 mL foram removidas a cada 4, 8 e 12 minutos após a adição da enzima e, similarmente desproteínadas pela adição de 0,9 mL de TCA.

Após breve centrifugação para remover a proteína desnaturada, o sobrenadante foi alcalinizado com KOH 0,2 M (0,4 mL), e a absorbância foi medida a 400 nm em uma cela de quartzo de 1 cm de caminho ótico. A absorvidade molar para o p-nitrofenol a pH maior que 10 é de  $18000 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ .

### 3.3.1.2. Substrato p-nitrofenol frente a diferentes solventes orgânicos

Neste procedimento diferentes concentrações de acetona, dimetilformamida, álcool terc-butílico, acetonitrila e DMSO foram testadas nas condições descritas na tabela 3.3.2. Essas variações foram realizadas a fim de encontrarmos o volume máximo de cada um a ser utilizado sem que a atividade enzimática fosse prejudicada.

Em um volume final de 0,6 mL adicionou-se diferentes solventes, substrato e enzima, respectivamente.

**Tabela 3.3.2. Reagentes adicionados nas medidas de atividade enzimática da UDPGT frente a diferentes solventes orgânicos**

Reagentes	Concentração estoque ( $\text{molL}^{-1}$ )	Volume adicionado ( $\mu\text{L}$ )	Concentração final (mM)
UDPGA	0,0131	0,18	4
p-nitrofenol	0,01	0,018	0,3
Tampão Tris	0,25	0,12	50
Água	-	variável	95 a 85%

O procedimento experimental realizado para a obtenção dos valores de absorvância do processo segue o mesmo tratamento do item 3.3.1.1., utilizando as mesmas condições descritas.

### **3.3.1.3. Substrato p-nitrofenol frente a diferentes surfactantes não iônicos**

Neste experimento, além dos testes com diferentes concentrações de Triton X-100 (de 0,01% a 0,3%) foram testados também diferentes concentrações de pluronic (0,125 a 5,975%).

Em um volume final de 0,6 mL adicionou-se surfactante, substrato e enzima, respectivamente. A quantidade de UDPGT (12 mg) e as concentrações de p-nitrofenol, tampão tris e UDPGA foram mantida em todas as análises segundo a tabela 3.3.2.

O procedimento utilizado para a obtenção das medidas de absorvância foi mantido nas condições do item 3.3.1.1.

O Triton X-100 apresenta um valor de HLB de 13,5, uma concentração micelar crítica (CMC) de 0,240 mM, um número de agregação de 140 (número médio de moléculas por micela) e um peso micelar de 90000 (Helenius e Simons, 1975).

O outro tensoativo utilizado, o Pluronic (F68), possui um HLB de 29, uma CMC de  $4,8 \cdot 10^{-4}$  M e peso molecular de 8400 g.mol<sup>-1</sup> (Kabanov e col., 2002).

### 3.3.1.4. Substrato p-nitrofenol frente as padronizações com DMSO e Triton X-100

- Utilizando-se as concentrações dos reagentes indicados na tabela 3.3.2. juntamente com 15% de DMSO e 0,2% de Triton X-100.
- Utilizando-se as concentrações dos reagentes indicados na tabela 3.3.2. juntamente com 10% de DMSO e 0,2% de Triton X-100.

O procedimento utilizado para a obtenção das medidas de absorbância foi mantido nas condições do item 3.3.1.1.

### 3.3.1.5. Substrato 5'-hidroxindol

O 5'-hidroxindol em pH alcalino apresenta um máximo de absorção a 317 nm (**Anexo 7**), o qual é perdido na formação de glucuronídeos. O ensaio com a UDPGT foi realizado feito com base no método anteriormente utilizado (Zakim e Vessey, 1973).

Em um volume final de 0,515 mL adicionou-se substrato e enzima. As modificações cabíveis ao procedimento foram realizadas.

**Tabela 3.3.3. Reagentes adicionados na síntese em escala analítica**

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração (estoque) (mol.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Volume adicionado (µL)</b>	<b>Concentração final (mM)</b>
<b>UDPGA</b>	0,02	100	3,88
<b>5'- hidroxindol</b>	0,01	30	0,58
<b>Tampão Tris</b>	0,25	100	50
<b>Água</b>	-	285	-

A reação foi iniciada pela adição de 10 mg de UDPGT, após a mistura reacional ter sido incubada à 37° C. O procedimento utilizado para o tratamento reacional encontra-se descrito no item 3.3.1.1. A absorbância foi medida a 317 nm em uma cela de quartzo de 1 cm de caminho ótico. A absorvidade molar obtida para o 5'-hidroxindol em pH alcalino foi de  $3238 \pm 161 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ .

A absorvidade molar do 5'-hidroxindol foi determinada experimentalmente a partir de uma solução estoque de 5'-hidroxindol ( $9,14 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ ), onde alíquotas de 5, 7, 10, 13 e 15  $\mu\text{L}$  foram adicionados a KOH 0,5 M (100  $\mu\text{L}$ ) e o volume completado com água destilada para 900  $\mu\text{L}$ . As absorbâncias dessas amostras foram medidas em comprimento de onda de 317 nm.

### **3.3.2. Síntese do derivado glucurônico do 5'-hidroxindol (Stevenson e Hulb 1999; Johnson e col., 1979)**

Os resultados obtidos no item 3.3.1.5 nos levaram a um aumento de escala reacional (10 vezes) para obtenção e isolamento do derivado glucurônico do 5'-hidroxindol.

A reação foi iniciada com a adição da UDP-glucuronil transferase (100 mg) em um volume final de 5 mL contendo tampão Tris (50 mM), Uridina difosfo ácido glucurônico (8mM) e 5'-hidroxindol (1mM) em pH=8,0 a 30° C por 4 horas de acordo com a metodologia descrita por Zakim e Vessey (1973).

A reação foi seguida por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando acetato de etila (67%), metanol (30%) e ácido acético (3%) como eluente.

Após quatro horas, a mistura reacional foi centrifugada, o sobrenadante recolhido e o precipitado lavado 2 vezes com água e novamente centrifugado.

A mistura dos sobrenadantes recolhidos das centrifugações foi lavada com acetato de etila, e a fração orgânica recolhida. A fração aquosa foi então acidificada com HCl 10%, saturada com NaCl e então novamente lavada com acetato de etila. A segunda fração orgânica foi seca sob sulfato de sódio, filtrada á vácuo e o solvente evaporado sob pressão reduzida. O produto sólido obtido (5 mg) foi analisado por RMN  $H^1$  e espectroscopia de infravermelho.

- Derivado glucurônico do 5'-hidroxindol. RMN  $H^1$  ( $D_2O$ , 500 MHz)  $\delta$  3,57 - 3,36 (m, 8H); 6,182 (1H, d,  $J=3\text{Hz}$ ); 6,655 (1H, dd,  $J'=2,5\text{ Hz}$  e  $J''=8,5\text{ Hz}$ ); 6,912 (1H, d,  $J=2,5\text{Hz}$ ); 7,055 (1H, d,  $J=3\text{Hz}$ ) e 7,197 (1H, d,  $J=8,5\text{Hz}$ ) ppm.
- IV.  $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$  3479,57 (str. O-H; str. N-H); 2925,21 (str. C-H); 1625 ( $\nu\text{CO}$ ) e 1264,28 (str. R-O-Ar) (KBr) (**Anexo 8**).

### **3.3.3. Tentativa de síntese do derivado glucurônico da violaceína**

Várias tentativas de síntese do derivado glucurônico foram feitas utilizando-se as padronizações realizadas e as modificações cabíveis (Stevenson e Hulb 1999; Johnson e col., 1979)

Seguindo a mesma escala reacional do item 3.3.2., em um volume final de 5 mL adicionou-se os reagentes e 100 mg de enzima.

**Tabela 3.3.4. Reagentes adicionados na síntese do derivado glucurônico da violaceína em escala preparativa**

<b>Reagentes</b>	<b>solução estoque (molL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Volume adicionado (mL)</b>	<b>Concentração final (mM)</b>
<b>Tampão Tris</b>	0,25	0,8	50
<b>UDPGA</b>	0,02	2	8
<b>Viol. em DMSO</b>	0,013	0,75	2 / 15 %
<b>Água</b>	-	1,45	85 %

Modificações realizadas sobre as condições mencionadas na tabela 3.3.4.:

- ✓ **Experimento 1:** Segundo a tabela 3.3.4.;
- ✓ **Experimento 2:** Utilizando-se 150 mg de albumina;
- ✓ **Experimento 3:** Utilizando-se Triton X-100 (0,01 %) solução final e 150 mg de albumina (Johnson e col., 1979);
- ✓ **Experimento 4:** Utilizando-se Triton X-100 0,2 % (solução final) e DMSO 10% (solução final);
- ✓ **Experimento 5:** Utilizando-se Pluronic (Co-polímero bloco de polietileno glicol - polipropileno glicol - polietileno glicol) solução final (5,9%) sem a presença de DMSO;

Em todas as tentativas acima, após 4 horas de reação, os meios reacionais foram acidificados com solução de ácido clorídrico 10% e extraídos com acetato de etila. O solvente foi retirado por rotaevaporação e o sólido bruto obtido analisado por espectrometria de massas. O produto desejado não foi detectado em nenhuma das condições utilizadas.



### 3.4. Síntese de derivados N-hidroximetílicos da violaceína

A reação foi preparada segundo indicado por Ferlin e col., (2002), onde em refluxo de THF (8 mL) foram dissolvidos violaceína (80 mg; 0,23 mM) e formaldeído 37% (1 mL) por 8 horas. A reação foi seguida por CCD (acetato de etila 90% hexano 10%) e após este período não foi detectada mais a presença de violaceína.

Em seguida a mistura foi extraída com acetato de etila e lavada várias vezes com água. A solução de acetato de etila foi seca sob sulfato de sódio anidro e concentrada em rotaevaporador. O excesso de formaldeído foi retirado utilizando-se metanol, re-dissolvendo e secando a amostra por três vezes. O produto sólido obtido (63 mg) foi analisado por espectrometria de massas.

No processo de caracterização dos compostos a amostra foi diluída em metanol/H<sub>2</sub>O e ácido fórmico 0,1% (volume final) e foi injetada com auxílio de uma bomba de seringa com fluxo contínuo de 10 µL/min. no equipamento modelo Q-Tof (Micromass).

A partir do espectro de massas foram detectados três grupos de compostos de massa molecular 373, 403 e 433 respectivamente. Esses compostos apresentaram respectivamente erros de 5, 49 e 16 % em ppm de resolução (**Anexo 9**).

### **3.5. $\beta$ -Glicosidase extraída da *Maniota Esculenta Crantz* (mandioca)**

#### **3.5.1. Extração da $\beta$ -glicosidase a partir da espécie de mandioca *B. Catarina* (Eksittikul e Chulavatnatol, 1988)**

A casca (pecíolo) da mandioca foi retirada e cortada em pequenos pedaços que foram homogeneizados em tampão acetato 0,1 M resfriado (pH=5.5) contendo fluoreto de fenilmetilsulfonila (0,1 mM) por dois minutos e triturada com a ajuda de um liquidificador. Depois de filtrado para a remoção do material insolúvel, o fluido sobrenadante foi saturado a 65% de sulfato de amônio. Após 12 horas em descanso a baixa temperatura o precipitado foi recolhido por centrifugação (3000 rpm por 10 minutos). Após isso o sólido foi re-dissolvido em tampão fosfato 10 mM pH=5.5 e dializado. O produto final pode ser utilizado em solução ou pode também ser liofilizado. Todos as etapas de purificação foram realizados á 4 °C.

#### **3.5.2. Determinação protéica no extrato bruto de enzima**

A proteína extraída no procedimento 3.5.1. foi quantificada pelo método de Lowry, como descrito por Hartree (1972), utilizando a albumina de soro bovino como padrão. A reação foi iniciada pela adição do reagente C (2 mL) à amostra (0,05 mL) dissolvidos em água (0,15 mL). Após 10 minutos, adicionou-se o reagente de Folin–Ciocalteu (0,2 mL) diluído 1:1 em H<sub>2</sub>O. Passados 30 minutos da última adição a leitura da absorbância foi realizada em 660 nm à temperatura ambiente.

O reagente C consiste na mistura do reagente A (1 mL de solução 2% de  $\text{NaCO}_3 + \text{NaOH}$  0,1 M) com o reagente B (49 mL de solução  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,5% + tartarato de sódio 1%).

Através da curva de calibração padrão realizada com albumina bovina pôde-se determinar a quantidade de proteína da amostra de enzima. Esta calibração está de 10 a 100  $\text{mg.L}^{-1}$  de proteína. De acordo com a equação  $Y=A+B.X$ , onde  $A = 0,0454$ ,  $B = 0,00473$  e  $Y =$  absorvância em 660 nm, a concentração da amostra foi determinada.

A concentração da solução enzimática encontrada a partir de uma absorvância de 0,220 foi de 1771,2  $\text{mg.L}^{-1}$ .

### **3.5.3. Imobilização da $\beta$ -glicosidase (covalentemente) em Eupergit<sup>®</sup>C**

$\beta$ -glicosidase (4 mL) a partir de uma solução estoque 1771,2  $\text{mg.L}^{-1}$  da espécie *B. Catarina* foi imobilizada em Eupergit<sup>®</sup>C, por reação de suporte seco (1 g) em tampão fosfato (10 mL; 1,5 mol  $\text{L}^{-1}$ ; pH 5,5) a 30°C. A mistura foi agitada a 200 rpm por 24 horas (D'Annibale e col., 2000). A enzima imobilizada foi lavada com várias porções de tampão fosfato 0,2 M (pH=5,5) até que não fosse mais detectada atividade na solução de lavagem, sendo estocado em suspensão no refrigerador ou na forma liofilizada.

A determinação de proteína imobilizada (Hartree, 1972) foi realizada com o sobrenadante retirado do processo de imobilização antes e depois de 24 horas.

A reação foi iniciada pela adição de reagente C (2 mL) aos sobrenadantes (2 mL). Após 10 minutos, adicionou-se reagente de Folin-

Ciocalteau (0,2 mL) diluído 1:1 em H<sub>2</sub>O. Passados 30 minutos da última adição a leitura da absorbância foi realizada em 660 nm à temperatura ambiente.

**Tabela 3.5.1. Valores experimentais obtidos no processo de imobilização enzimática**

<b>Enzima</b>	<b>Concentração (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Absorbância (nm)</b>
<b>Início</b>	648	0,301
<b>Final</b>	80	0,077

Neste processo 6,25 mg de enzima foram imobilizados em 1 grama de Eupergit<sup>®</sup>C (92,23 % de imobilização). Em solução a concentração protéica é de 594 mg.L<sup>-1</sup>.

### **3.5.4. Medidas de atividade enzimática da $\beta$ -glicosidase extraída da mandioca imobilizada em Eupergit<sup>®</sup>C analisadas por UV-visível**

#### **3.5.4.1. Substrato p-nitrofenol glicopiranosídeo (Svasti e col., 2003)**

O ensaio com a  $\beta$ -glicosidase imobilizada baseou-se no aparecimento do p-nitrofenol a partir da degradação do p-nitrofenol glicopiranosídeo (PNPG). Essa degradação foi acompanhada medindo-se o aumento gradativo na absorbância a 400 nm. Em um volume final de 1 mL adicionou-se enzima e substrato, respectivamente.

**Tabela 3.5.2. Reagentes adicionados para a realização do ensaio enzimático**

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração estoque</b>	<b>Volume adicionado (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Concentração final</b>
<b>Água</b>	-	885	-
<b>PNPG</b>	$0,021 \text{ mol.L}^{-1}$	15	$1,062 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$
<b>Enzima</b>	$594 \text{ mg.L}^{-1}$	100	$59,4 \text{ mg.L}^{-1}$

A mistura foi incubada a  $30^{\circ} \text{C}$  e a reação iniciada pela adição do PNPG. Após rápida homogeneização, uma alíquota da mistura de reação foi removida (0,1 mL). Alíquotas de 0,1 mL foram removidas a cada 1, 3, 5 e 7 minutos após a adição do reagente. A cada volume retirado (0,1 mL) foram adicionados KOH 0,2 M (0,7 mL) e água destilada (0,5 mL). A absorbância foi medida a 400 nm em uma cela de quartzo de 1 cm de caminho ótico. A absorvidade molar para o p-nitrofenol a pH maior que 10 é  $18000 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$ .

#### **3.5.4.2. Substrato p-nitrofenol glicopiranosídeo frente a diferentes concentrações de acetonitrila**

Utilizando-se o mesmo volume enzimático e o mesmo tratamento reacional do item 3.5.4.1. foram realizados ensaios com a  $\beta$ -glicosidase variando-se a concentração de acetonitrila.

**Tabela 3.5.3. Quantidade dos reagentes para a medida da atividade enzimática em função de diferentes concentrações de acetonitrila**

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração estoque</b>	<b>Volume adicionado (μL)</b>	<b>Concentração final</b>
<b>Água</b>	-	500 a 900	70, 50 a 20%
<b>Co-solvente</b>	-	900 a 500	30, 50 a 80 %
<b>PNPG</b>	0,021 mol.L <sup>-1</sup>	20	1,062.10 <sup>-4</sup> mol.L <sup>-1</sup>
<b>Enzima</b>	594 mg.L <sup>-1</sup>	100	59,4 mg.L <sup>-1</sup>

Alíquotas de 0,1 mL foram removidas a cada 5, 10, 15, 20 e 30 minutos após a adição do PNPG.

### **3.5.5. Biotransformação do octanol utilizando β-glicosidase imobilizada em Eupergit<sup>®</sup>C (modelo)**

#### **3.5.5.1. Por hidrólise reversa (Vic e col.,1995)**

α-D-glicose (0,2 M) e octanol (0,8 M) foram adicionados em água (1 mL) e acetonitrila (9 mL). A reação foi iniciada com a adição de uma solução estoque 594 mg.L<sup>-1</sup> de enzima imobilizada (400 μL). A mistura foi agitada por 5 dias a 40°C, após isso a reação foi filtrada e seca em rotaevaporador. O resíduo foi dissolvido em água e extraído em acetato de etila. A solução orgânica resultante foi analisada por espectrometria de massas e nenhum derivado glicosídico do octanol foi detectado.

### 3.5.5.2. Por transglicosilação (Svasti e col., 2003)

Foram adicionados em 3 mL de água, octanol (7  $\mu\text{L}$  ;  $4,44 \cdot 10^{-5}$  mol), PNPG (20 mg;  $6,75 \cdot 10^{-5}$  mol) e solução estoque de  $\beta$ -glicosidase imobilizada (0,1 mL;  $594 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  por 12 h sob agitação. A fase orgânica da solução foi extraída com acetato de etila e este foi retirado por rotaevaporação. A reação foi acompanhada por CCD utilizando acetato de etila (70%) e metanol (30%) como eluente.

O sólido obtido foi purificado em coluna flash utilizando-se acetato de etila como fase móvel. O produto obtido (7 mg) foi analisado por espectrometria de massas e RMN  $^1\text{H}$ .

➤ Octanol glicopiranosídeo. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz)  $\delta$  0,805-0,875 (m, 3H,  $J=7$  Hz), 1,204-1,275 (m, 12 H), 3,031 (t, 3 H,  $J = 9,25$  Hz), 3,101 (dd, 2 H,  $J=3,5$  Hz e  $J'=9,25$  Hz), 3,277 (d, 1 H,  $J= 4$  Hz), 3,395-3,455 (m, 4 H) e 3,536-3,602 (m, 3 H) ppm (**Anexo 11**).

No processo de caracterização do composto por espectrometria de massas a amostra foi diluída em metanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1) e ácido fórmico 0,1% (volume final) e foi injetada com auxílio de uma bomba de seringa com fluxo contínuo de 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . no equipamento modelo Q-Tof (Micromass). A energia de colisão utilizada na fragmentação do pico do glicosídeo encontrado foi de 15-40 eV tendo o argônio como gás de colisão.

O espectro de massas obtido apresenta o pico de  $m/z = 293$  referente à molécula do octanol glicopiranosídeo (**Anexo 10**).

### **3.5.6. Biotransformação da violaceína utilizando $\beta$ -glicosidase imobilizada em Eupergit<sup>®</sup>C**

#### **3.5.6.1. Por transglicosilação (Svasti e col., 2003)**

Em um volume total de 3 mL foram adicionados, violaceína (7,7 mg;  $2,25 \cdot 10^{-5}$  mol), PNPG (20 mg;  $6,75 \cdot 10^{-5}$  mol), água destilada (2,1 mL), acetonitrila (0,9 mL) e solução de enzima (0,2 mL;  $594 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  por 12 h sob agitação. A fase orgânica da solução foi extraída com acetato de etila e este foi retirado por rotaevaporação. Por espectrometria de massas realizada sobre o sólido resultante nenhum produto foi encontrado.

### **3.5.7. Biotransformação dos derivados N-hidroximetílicos da violaceína utilizando $\beta$ -glicosidase imobilizada em Eupergit<sup>®</sup>C**

#### **3.5.7.1. Por transglicosilação (Svasti e col., 2003)**

Em um volume final de 3 mL, foram adicionados derivados N-hidroximetílicos (9 mg;  $2,25 \cdot 10^{-5}$  mol), PNPG (20 mg;  $6,75 \cdot 10^{-5}$  mol), água destilada, acetonitrila (0,9 mL; 30% v/v) e solução de enzima (0,2 mL;  $594 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  por 12 h sob agitação. A fase orgânica da solução foi extraída com acetato de etila e este foi retirado por rotaevaporação. Por espectrometria de massas realizada sobre o sólido resultante nenhum produto foi encontrado.



### **3.6. $\beta$ -glicosidase extraída do fungo *Aspergillus niger***

A  $\beta$ -glicosidase extraída do fungo *Aspergillus niger* foi obtido comercialmente da Sigma sendo estocada em temperatura abaixo de 0°C na forma liofilizada (0,5 U/mg - uma unidade libera 1  $\mu$ mol de glicose da celobiose em uma hora a pH=5,5 e 37°C)

#### **3.6.1. Imobilização da $\beta$ -glicosidase extraída do fungo *Aspergillus niger* (covalentemente) em Eupergit®C**

$\beta$ -glicosidase extraída do fungo *Aspergillus niger* (125 mg), na forma liofilizada, foi imobilizada em Eupergit®C, por reação de 1,0 g de suporte seco, em 10,0 mL de tampão fosfato 1,5 mol L<sup>-1</sup> pH 5,5 a 30°C. A mistura foi agitada a 200 rpm por 24 horas (D'Annibale e col., 2000). A enzima imobilizada foi lavada com várias porções de tampão fosfato 0,2 M pH=5,5, até que não fosse mais detectada atividade na solução de lavagem, sendo estocado em suspensão no refrigerador ou em forma liofilizada.

A determinação de proteína imobilizada (Hartree, 1972) foi realizada com o sobrenadante retirado do processo de imobilização antes e depois de 24 horas.

A reação foi iniciada pela adição do reagente C (2 mL) aos sobrenadantes (0,2 mL). Após 10 minutos, adicionou-se o reagente de Folin-Ciocalteu (0,2 mL) diluído 1:1 em H<sub>2</sub>O. Passados 30 minutos da última adição a leitura da absorbância foi realizada em 660 nm à temperatura ambiente. A composição do reagente C está indicada no item 3.5.2.

**Tabela 3.6.1. Valores experimentais obtidos no processo de imobilização enzimática**

<b>Enzima</b>	<b>Concentração (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Absorbância (nm)</b>
<b>Início</b>	1141,8	0,495
<b>Final</b>	501,7	0,243

Neste processo 7,04 mg de enzima foram imobilizados em 1 grama de Eupergit<sup>®</sup>C (64,10 % de imobilização). A concentração em solução é de 732 mg.L<sup>-1</sup>.

### **3.6.2. Medida da atividade enzimática da $\beta$ -glicosidase extraída do fungo *Aspergillus niger* imobilizada em Eupergit<sup>®</sup> C analisadas por UV-visível**

#### **3.6.2.1. Substrato p-nitrofenol glicopiranosídeo (Svasti e col., 2003)**

O ensaio com a  $\beta$ -glicosidase imobilizada baseou-se no aparecimento do p-nitrofenol a partir da degradação do p-nitrofenol glicopiranosídeo (PNPG). Essa degradação foi acompanhada medindo-se o aumento gradativo na absorbância a 400 nm. Em um volume final de 1 mL adicionou-se enzima e substrato, respectivamente.

**Tabela 3.6.2. Reagentes adicionados para a realização do ensaio enzimático**

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração estoque</b>	<b>Volume adicionado (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Concentração final</b>
<b>Água</b>	-	885	-
<b>PNPG</b>	$0,021 \text{ mol.L}^{-1}$	15	$1,062 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$
<b>Enzima</b>	$732 \text{ mg.L}^{-1}$	100	$73,2 \text{ mg.L}^{-1}$

A mistura foi incubada a  $30^\circ \text{C}$  e a reação iniciada pela adição do PNPG. Após rápida homogeneização, uma alíquota da mistura de reação foi removida (0,1 mL). Outras alíquotas de 0,1 mL foram removidas a cada 1, 3, 5 e 7 minutos após a adição do reagente. A cada volume retirado foram adicionados KOH 0,2 M (0,7 mL) e água destilada (0,5 mL). A absorbância foi medida a 400 nm em uma cela de quartzo de 1 cm de caminho ótico.

### **3.6.2.2. Substrato p-nitrofenol glicopiranosídeo frente a diferentes concentrações de acetonitrila**

Utilizando-se o mesmo volume enzimático e o mesmo tratamento reacional do item 3.6.2.1. foram realizados ensaios com a  $\beta$ -glicosidase variando-se a concentração de acetonitrila.

**Tabela 3.6.3. Quantidade dos reagentes para a medida da atividade enzimática em função de diferentes concentrações de acetonitrila**

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração estoque</b>	<b>Volume adicionado (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>Concentração final</b>
<b>Água</b>	-	500 a 900	50 a 90%
<b>Co-solvente</b>	-	900 a 500	90 a 50 %
<b>PNPG</b>	$0,021 \text{ mol.L}^{-1}$	20	$1,062 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$
<b>Enzima</b>	$732 \text{ mg.L}^{-1}$	100	$73,2 \text{ mg.L}^{-1}$

Alíquotas de 0,1 mL foram removidas a cada 5, 10, 15, 20 e 30 minutos após a adição do PNPG.

### **3.6.3. Biotransformação do octanol utilizando $\beta$ -glicosidase imobilizada em Eupergit<sup>®</sup>C (modelo)**

#### **3.6.3.1. Por hidrólise reversa (Vic e col.,1997)**

$\alpha$ -D-glicose (0,2 M) e O octanol (0,8 M) foram adicionados em água destilada (1 mL) e acetonitrila (9 mL). A reação foi iniciada pela adição de uma solução estoque  $732 \text{ mg.L}^{-1}$  de enzima imobilizada (0,4 mL). A mistura foi agitada por 5 dias a  $40^{\circ}\text{C}$ , após isso a reação foi filtrada e seca em rotaevaporador. O resíduo foi dissolvido em água e extraído em acetato de etila. A solução orgânica foi analisada por espectrometria de massas e nenhum derivado glicosídico do octanol foi detectado.

### 3.6.3.2. Por transglicosilação (Svasti e col., 2003)

Em um volume total de água destilada de 3 mL, foram adicionados octanol (7  $\mu\text{L}$ ;  $4,44 \cdot 10^{-5}$  mol), PNPG (20 mg;  $6,75 \cdot 10^{-5}$  mol) e solução estoque de  $\beta$ -glicosidase imobilizada (0,1 mL;  $732 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  por 6 h sob agitação. O decorrer da reação foi acompanhado por CCD utilizando acetato de etila (70%) e metanol (30%) como eluente. Em seguida, a fase orgânica da solução foi extraída com acetato de etila e este foi retirado por rotaevaporação.

O sólido bruto foi purificado em coluna de flash utilizando-se acetato de etila como fase móvel. O produto obtido (10 mg) foi analisado por espectrometria de massas e RMN  $^1\text{H}$ .

- Octanol glicopiranosídeo. RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , 500 MHz)  $\delta$  0,805-0,875 (m, 3H,  $J=7$  Hz), 1,204-1,275 (m, 12 H), 3,031 (t, 3 H,  $J = 9,25$  Hz), 3,101 (dd, 2 H,  $J=3,5$  Hz e  $J'=9,25$  Hz), 3,277 (d, 1 H,  $J= 4$  Hz), 3,395-3,455 (m, 4 H) e 3,536-3,602 (m, 3 H) ppm (**Anexo 11**).

No processo de caracterização dos compostos por espectrometria de massas as amostras foram diluídas em metanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (1:1) e ácido fórmico 0,1% (volume final) e foram injetadas com auxílio de uma bomba de seringa com fluxo contínuo de 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . no equipamento Q-Tof (Micromass).

O espectro de massas obtido apresenta o pico de  $m/z = 293$  referente à molécula do octanol glicopiranosídeo (**Anexo 10**).

### **3.6.4. Biotransformação da violaceína utilizando $\beta$ -glicosidase imobilizada em Eupergit<sup>®</sup>C**

#### **3.6.4.1. Por transglicosilação (Svasti e col., 2003)**

Em um volume final de 3 mL, foram adicionados violaceína (7,7 mg;  $2,25 \cdot 10^{-5}$  mol), PNPG (20 mg;  $6,75 \cdot 10^{-5}$  mol), água destilada (2,1 mL), acetonitrila (0,9 mL) e solução de enzima imobilizada (0,1 mL;  $732 \text{ mg.L}^{-1}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  por 12 h sob agitação. A fase orgânica da solução foi extraída com acetato de etila e este foi retirado por rotaevaporação. Por espectrometria de massas realizada sobre o sólido resultante nenhum produto foi encontrado.

### **3.6.5. Biotransformação dos derivados N-hidroximetílicos da violaceína utilizando $\beta$ -glicosidase imobilizada em Eupergit<sup>®</sup>C**

#### **3.6.5.1. Por transglicosilação (Svasti e col., 2003)**

Em um volume final de 3 mL, foram adicionados os derivados N-hidroximetílicos (9 mg;  $2,25 \cdot 10^{-5}$  mol), PNPG (20 mg;  $6,75 \cdot 10^{-5}$  mol), água destilada (2,1 mL), acetonitrila (0,9 mL) e solução de enzima imobilizada (0,1 mL;  $732 \text{ mg.L}^{-1}$ ) a  $37^\circ\text{C}$  por 12 h sob agitação. A fase orgânica da solução foi extraída com acetato de etila e este foi retirado por rotaevaporação. Por espectrometria de massas realizada sobre o sólido resultante o produto esperado não foi encontrado.

## Capítulo 4

### **4. Resultados e discussões**

#### **4.1. Violaceína**

##### **4.1.1. Produção microbiana em escala piloto utilizando biorreator de 30 litros**

O método anteriormente utilizado para produção de violaceína em pequena escala envolvia um grande número de etapas e a metodologia aplicada para sua purificação resultava em perdas sucessivas de violaceína durante as extrações (Rettori e Durán, 1998). Brevemente, a suspensão de *Chromobacterium violaceum* era inoculada em tapetes de algodão, colocada em garrafas de Roux e incubada a 30<sup>o</sup> C em biorreator de prateleiras com aeração. A coloração violeta intensa indicava a presença de violaceína. Os tapetes de algodão eram lavados com água destilada para eliminar o excesso de meio de cultura e o pigmento era extraído com etanol comercial e filtrado.

A produção de violaceína em escala piloto desenvolvida neste trabalho, demonstrou-se viável e de fácil separação do sedimento ao qual continha a massa celular para extração da violaceína. Essa produção levou a rendimentos significativos do pigmento.

#### **4.1.2. Extração e purificação da violaceína**

O processo anteriormente descrito sobre a purificação da violaceína (Rettori e Durán, 1998) contava com um sistema Soxhlet utilizando-se primeiro, clorofórmio para retirada de impurezas lipídicas de restos de membranas, em seguida, era utilizado o éter etílico e por fim, o etanol, seguido de sucessivas recristalizações em metanol/H<sub>2</sub>O.

Neste novo processo, a extração da violaceína passou a ser realizada utilizando-se THF no lugar de álcool etílico. Esta modificação levou a um aumento no rendimento obtido, uma vez que a violaceína apresenta maior solubilidade em THF do que em álcool etílico.

O novo método de purificação empregado para a biomassa obtida apresentou alterações sensíveis em relação ao anteriormente utilizado. Isso porque, esse método não requer a etapa de purificação utilizando soxhlet, possui um menor número de etapas e a retirada do solvente éter etílico do processo levou a uma diminuição nas perdas de violaceína, pois foi detectado que uma grande porcentagem deste pigmento era perdida devido a uma relativa solubilidade apresenta diante deste solvente.

#### **4.1.3. Caracterização da violaceína e deoxiviolaceína**

As análises de HPLC realizadas, demonstraram que a metodologia de extração e purificação da violaceína aplicada neste trabalho apresentou reprodutibilidade em relação a estudos anteriores (Rettori e Durán, 1998). As condições de análise estabelecidas levaram uma boa separação entre a



violaceína e a deoxiviolaceína, o maior problema encontrado na purificação desse pigmento. Também foram observados reprodutibilidade nos tempos de retenção e no formato dos picos dos cromatogramas apresentados (**Anexos 1 e 2**).

Portanto, as análises por HPLC indicaram que o novo processo de extração da violaceína é eficiente e purifica o extrato bruto.

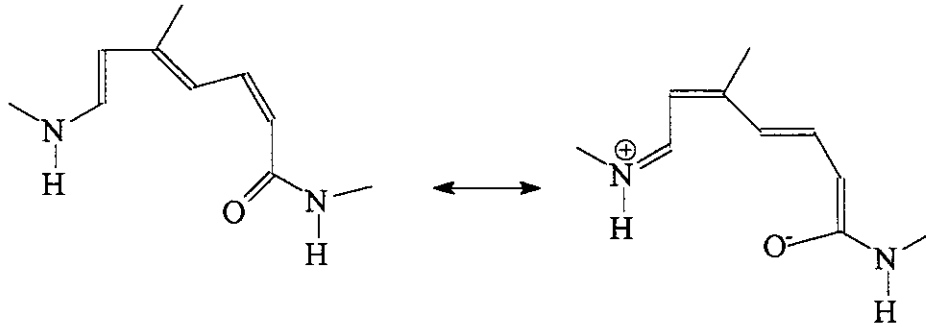
As análises por espectroscopia de infravermelho, ultravioleta e RMN  $H^1$  dos dois compostos condizem com os valores encontrados na literatura (Laatsch e Thomson, 1984).

Os espectros de RMN  $H^1$  dos dois compostos apresentam sinais entre ( $\delta$ ppm) 7,233 – 7,202 e 8,174 – 8,175 referentes aos prótons do grupo indólico, também observamos sinais entre ( $\delta$ ) 7,644 – 7,652 ppm dos prótons olefinicos do anel pirrólico e sinais entre ( $\delta$ ) 8,923 – 8,94 ppm referentes ao núcleo isatina (**Anexo 3**).

A principal diferença entre estes compostos é facilmente notada nos espectros, pois a violaceína apresenta em ( $\delta$ ) 9,332 ppm um sinal do hidrogênio fenólico, sinal este, que a deoxiviolaceína não possui.

Os espectros de infravermelho exibem bandas de absorção na região de  $1610\text{ cm}^{-1}$  finas que podem ser atribuída a str. (-C=C-) e as bandas largas de absorção em  $1655$  e  $1680\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas a str. (C=O). Absorções na região de  $3100\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas a str. (-NH). No caso da violaceína, a absorção na região de  $3400\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao str. (-OH) (**Anexo 4**).

Os espectros de ultravioleta visível da violaceína e da deoxiviolaceína são similares devido ao mesmo sistema de conjugação encontrada em suas estruturas (Figura 4.1.) (**Anexo 5**).

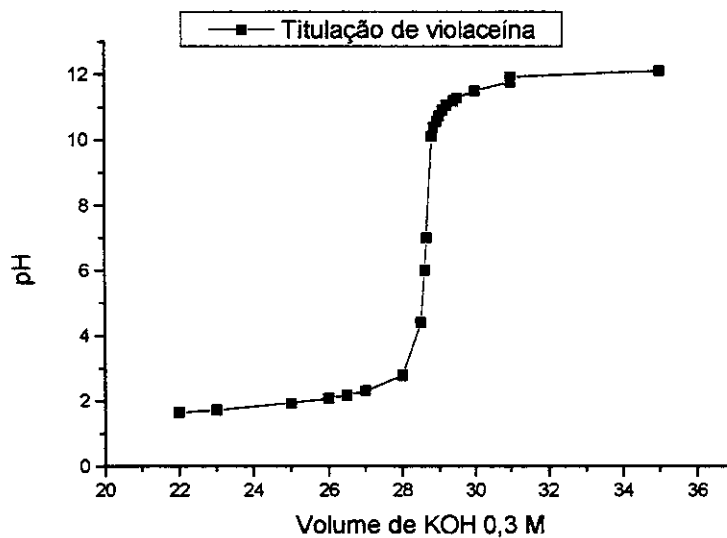


**Figura 4.1. Ressonância do sistema de conjugação**

#### 4.1.4. Degradação da violaceína em meio básico

A violaceína, em meio básico e na presença de  $O_2$  tem sua molécula degradada.

A partir da titulação de uma solução ácida contendo violaceína pudemos medir experimentalmente seus valores de  $pK_a$  e com isso determinar em qual pH a violaceína começa seu processo de degradação.



**Gráfico 4.1. Valores de pH em função do volume de KOH 0,3 M**

- $\text{PKa1} = 1,8$  ( $\text{R}_2\text{NH}_2^+$ );
- $\text{PKa2} = 10,5$  (fenolato).

Após a passagem pelo segundo  $\text{pKa}$  (10,5) a violaceína, já na forma do seu fenolato, passa a se degradar ao longo do tempo. Provavelmente, essa degradação ocorra devido a ataques nucleofílicos de moléculas de oxigênio dissolvido no meio ou rearranjo intramolecular. Depois de algumas horas retornando a solução para um pH ácido, não notamos mais a presença do pigmento (**Anexo 6**). A deoxiviolaceína não sofre essa degradação

## 4.2. UDP-Glucuronil transferase

Inicialmente, as condições reacionais empregadas neste trabalho foram baseadas em ensaio de atividade enzimática da Sigma (Sigma, 1994). Porém, a consideração prática de maior relevância nessa síntese era o fato do substrato de interesse, a violaceína, não ser solúvel em sistemas aquosos. Deste modo, a seleção de parâmetros que poderiam ser variados à partir desses ensaios foi previamente estudada, devido a pequena quantidade de co-fator enzimático disponível.

Alguns estudos (Johnson e col., 1979) indicam que a UDPGA é consumida quase que totalmente no processo de síntese, porém, a formação do glucuronídeo não acontece na mesma proporção.

Uma possível explicação para esse fato seria a utilização de etanol como co-solvente, visto que essa enzima também é específica para álcoois primários. Portanto, o etanol poderia estar competindo com o substrato de

interesse. Para evitar isso, utilizamos quando possível, o álcool terc-butílico, e na maioria das vezes DMSO como co-solventes.

Estudos realizados por Stevenson e Hulb (1999) indicam que uma alta concentração protéica (albumina) pode estabilizar a enzima, isto ocorre, pois esta proteína (sendo relativamente hidrofóbica) pode se ligar ao substrato ou produto e afetar o equilíbrio. Com enzimas solúveis, albumina pode ser capaz de agir como um carregador de substrato e transferi-lo diretamente para a enzima ou simplesmente aumentar sua solubilidade (Fenselau e col., 1976).

Johnson e col. (1979) em estudos realizados revelaram que uma concentração de 3,75 mM da UDPGA para 1 mM de aglicona levava a uma reação completa. A diminuição de 50% de rendimento ocorria quando a proporção era de 2:1UDPGA para aglicona.

A concentração adequada de UDPGT é de 20 mg/ mL (Stevenson e Hulb, 1999).

Uma rota alternativa na síntese com a UDPGT poderia ser a utilização desta enzima imobilizada em diferentes suportes sólidos, pois estes processos foram anteriormente descritos para outras enzimas (Kubik e col., 2004; Shukla e Kumar, 2004).

A imobilização física em partículas de quitosana e a imobilização covalente em Eupergit® C foram realizadas, porém, em nenhum dos processos a enzima manteve-se ativa (Zihnioglu e Telefoncu, 1995).

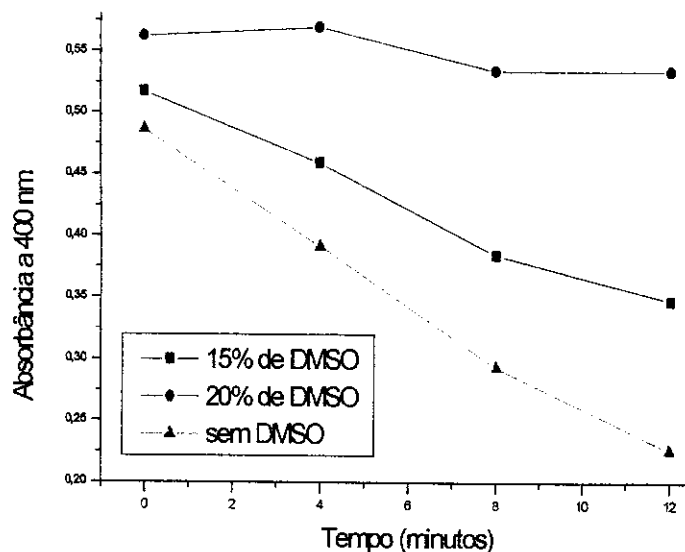
Em função disto, as modificações feitas nos ensaios enzimáticos descritos a seguir foram realizadas com embasamento nas discussões e conclusões acima citadas.

## 4.2.1. Atividade enzimática da UDP-glucuronil transferase analisadas por UV-visível

### 4.2.1.1. Substrato p-nitrofenol frente diferentes solventes orgânicos

Possuindo a violaceína baixa solubilidade em sistemas aquosos, tornou-se necessário, nesses estudos iniciais, a determinação da quantidade máxima de co-solvente que poderíamos utilizar sem uma perda parcial ou até total da atividade enzimática. A determinação dessa concentração máxima foi realizada até a ocorrência de uma perda parcial aceitável ou até total da atividade enzimática da UDPGT.

Nenhum dos solventes testados, após 10% (v/v), manteve a atividade enzimática, exceto o DMSO que chegou a uma concentração de até 15% (gráfico 4.2.1.).



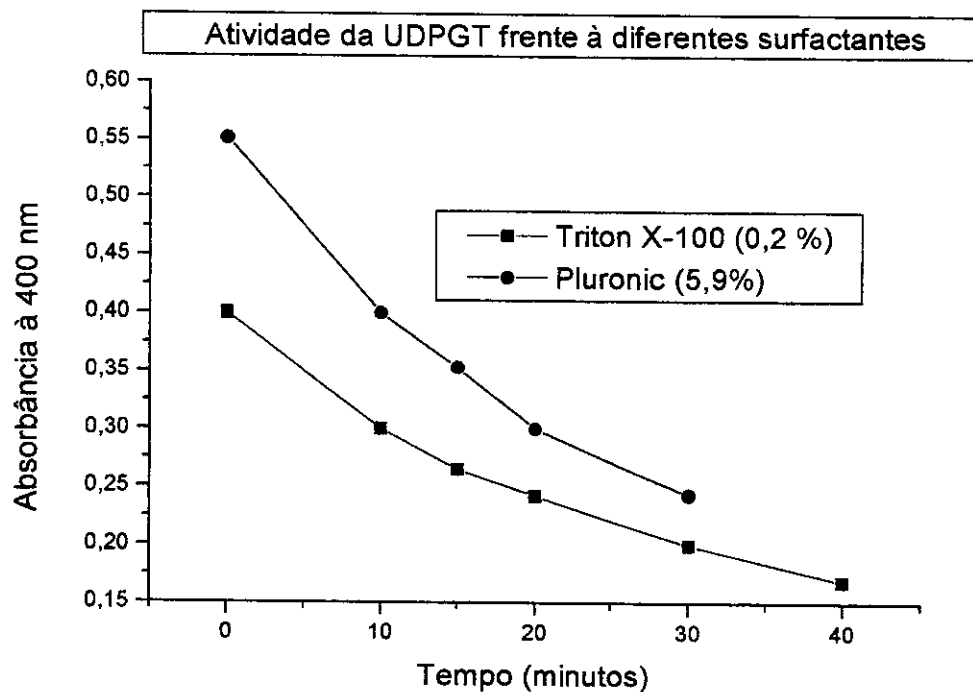
**Gráfico 4.2.1. Representação gráfica da atividade enzimática da UDPGT com diferentes concentrações de DMSO**

A concentração de 15% de DMSO, nos ensaios com p-nitrofenol, apresentou uma diminuição de 48% na constante de velocidade em relação ao sistema sem a presença de solvente orgânico. Este resultado condiz com os resultados apresentados por Fenselau e col. (1976), onde estes afirmam que uma porcentagem máxima de aproximadamente 13% de DMSO pode ser adicionada sem inibir por completo a atividade da transferase.

#### **4.2.1.2. Substrato p-nitrofenol frente diferentes surfactantes não iônicos**

Nos experimentos realizados com Triton X-100 foram testados diferentes valores de concentração em meio reacional. Com uma concentração máxima de 0,2% deste surfactante a diminuição dos valores de absorbância à 400 nm em função do tempo demonstraram uma boa atividade enzimática da UDPGT.

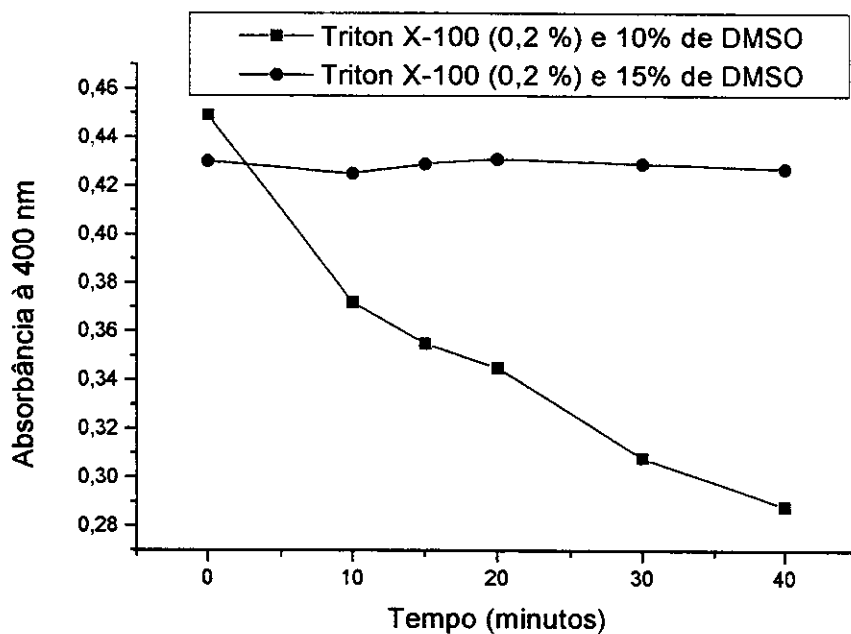
Testes de atividade enzimática utilizando-se outro surfactante, o Pluronic, foram realizados e valores acima de 5,9% desse surfactante demonstraram atividades aceitáveis (Gráfico 4.2.2.).



**Gráfico 4.2.2. Representação gráfica da atividade da UDPGT em função da presença de surfactantes (Pluronic 5,9% e Triton 0,2 %).**

#### **4.2.1.3. Substrato p-nitrofenol frente as padronizações realizadas com triton X-100 e DMSO**

A aplicação desse surfactante em conjunto ao co-solvente (DMSO) demonstrou uma atividade enzimática muito baixa. Deste modo, diminuimos a concentração de DMSO até o ponto onde voltamos a obter uma atividade enzimática aceitável. Chegamos então a 10% de DMSO e 0,2% de Triton x-100.



**Gráfico 4.2.3. Representação gráfica da atividade da UDPGT em função da presença de aditivos**

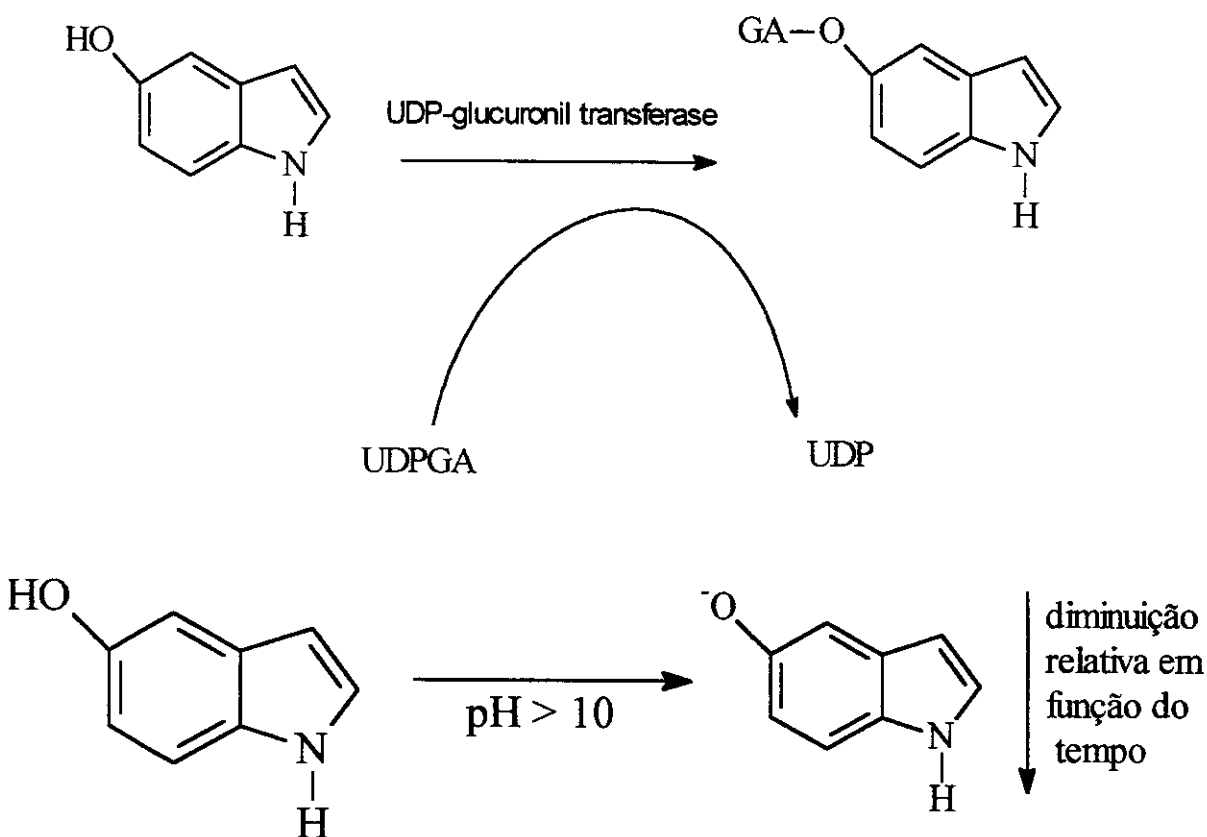
**Tabela 4.2.1. Valores das constantes de velocidade nas medidas de atividade da UDPGT frente a diferentes aditivos**

<b>Concentração dos aditivos</b>	<b>Constante de velocidade (<math>\text{min}^{-1}</math>)</b>
Sem aditivos	$0,0649 \pm 0,00233$
15% de DMSO	$0,03402 \pm 0,00206$
0,2% de Triton X-100	$0,02742 \pm 0,00146$
0,2% de Triton / 15% de DMSO	-
0,2% de Triton / 10% de DMSO	$0,01064 \pm 0,00113$
5,9% de Pluronic	$0,02113 \pm 0,00132$

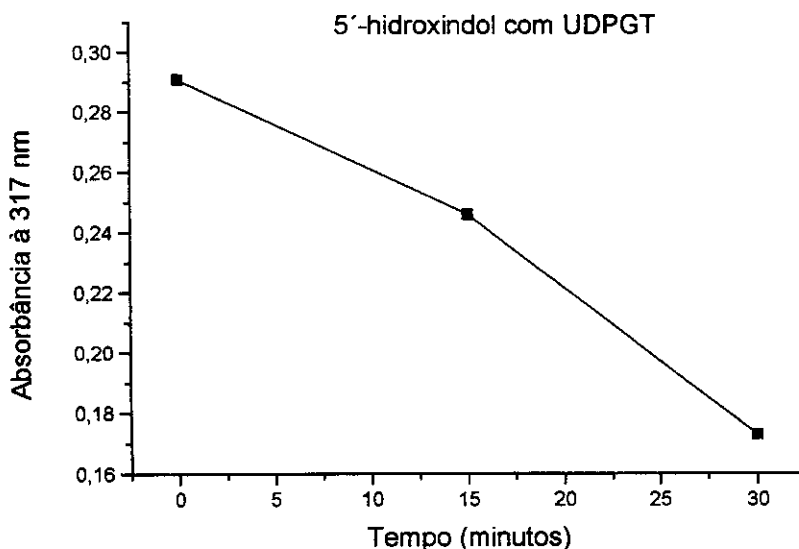


#### 4.2.1.4. Substrato 5'-hidroxindol

O estudo cinético descrito por Zakim e Vessey (1973) quando aplicado ao modelo reacional utilizando o 5'-hidroxindol como aglicona foi de grande importância no início dos estudos, pois nele a diminuição nos valores de absorvância do fenolato em função do tempo demonstrou a formação do glucuronídeo esperado da nossa molécula modelo.

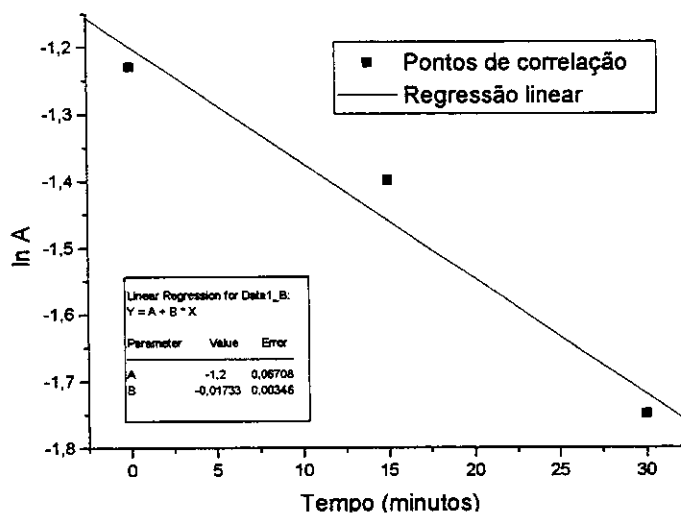


**Figura 4.2. Demonstração do ensaio enzimático com UDPGT utilizando 5'-hidroxindol como substrato**



**Gráfico 4.2.4. Representação gráfica da atividade da UDPGT com o 5'-hidroxindol**

O valor experimental da absorvidade molar do 5'-hidroxindol obtido em pH acima de 10 foi de  $3238 \pm 161 \text{ cm}^2\text{mol}^{-1}$ . A constante de velocidade calculada a partir dos mesmos dados experimentais foi de  $0,01733 \pm 0,00327 \text{ min}^{-1}$ .



**Gráfico 4.2.5. Regressão linear realizada em duplicata para obtenção da constante de velocidade**

#### **4.2.2. Síntese do derivado glucurônico do 5'-hidroxindol**

A partir do resultado obtido no estudo cinético previamente realizado foi possível aumentar a escala reacional utilizada para que pudéssemos obter as quantidades necessárias para o isolamento do produto e subsequente análise por RMN  $^1\text{H}$  e IV.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  referente à molécula em questão demonstrou sinais característicos de grupamentos indólicos (região entre 6 e 8 ppm) juntamente com um multiplete na região de deslocamento químico referente a hidrogênios do ácido glucurônico (região entre 3 e 4 ppm).

O espectro de infravermelho demonstrou uma banda larga de absorções características de grupamentos O-H e N-H entre 3200 e 3500  $\text{cm}^{-1}$ , sinal referente a carbonila do ácido em 1624  $\text{cm}^{-1}$  (ligações de H intermolecular deslocam o sinal para região de menor frequência) e uma banda em 1264,28  $\text{cm}^{-1}$  referente ao estiramento R-O-Ar (**Anexo 8**).

#### **4.2.3. Tentativa síntese do derivado glucurônico da violaceína**

Estudos cinéticos com a violaceína, seguindo os mesmos princípios utilizados nos estudos com o 5'-hidroxindol não puderam ser realizados, pois como já descrito no item 4.1.4 a violaceína é facilmente degradada em meio básico.

Nas diferentes condições e modificações aplicadas (escala preparativa), várias tentativas foram feitas para a obtenção do derivado glucurônico da violaceína utilizando a UDP-glucuronil transferase, porém, nenhum produto

foi encontrado. Isto foi detectado pelo monitoramento do produto final por RMN  $H^1$ , cromatografia em camada delgada e espectrometria de massas.

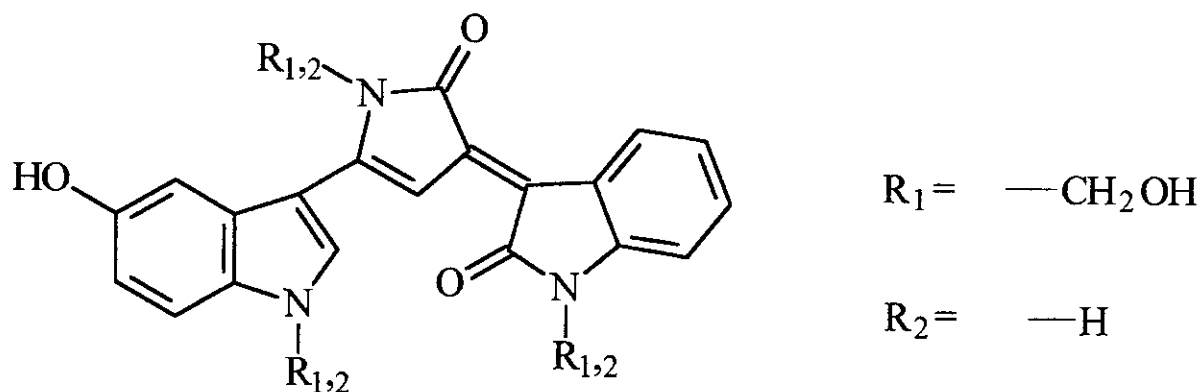
A solubilidade do substrato em meio aquoso, o alto poder desnaturante da enzima frente a solventes orgânicos ou a possível falta de compatibilidade entre o composto de interesse e o sítio ativo da enzima, foram as dificuldades encontradas no decorrer desta tentativa de síntese.

### **4.3. Síntese de derivados N-hidroximetilados da violaceína**

A literatura existente envolvendo glicosilação de compostos, utilizando as  $\beta$ -glicosidases, cita modificações em álcoois primários e secundários. As tentativas de utilização desta enzima na glicosilação do grupamento fenólico da violaceína não foram bem sucedidas demonstrando o poder de seletividade dessa classe de enzimas (Conn, 1993).

Decidimos então tentar a síntese de derivados da violaceína.

Dentre as possibilidades pesquisadas e encontradas, a síntese de derivados N-hidroximetílicos do nosso protótipo de interesse, tornou-se o caminho mais viável. Essa síntese consiste em um ataque nucleofílico dos nitrogênios da violaceína à carbonila do formaldeído liberando assim grupamentos alcoólicos primários (Figura 4.3.).



**Figura 4.3. Estrutura dos derivados N-hidroximetilados da violaceína**

Vários métodos de síntese conhecidos foram testados (Wierenga e col., 1984; Verardo e col., 1995), porém, em algumas casos a degradação de reagentes e produtos era rápida, em outros não ocorria nenhuma modificação da violaceína pois esta não era solúvel no solvente orgânico indicado. Deste modo o método que melhor se adaptou, sem que houvessem perdas drásticas de produtos, foi o método indicado por (Ferlin e col., 2002) com formaldeído 37% e THF em refluxo por algumas horas.

Essa síntese nos levou a uma mistura de compostos derivados da violaceína. Esses derivados, por sua vez, podem estar mono, di ou tri substituídos.

Compostos de peso molecular 373, 403 e 433, com erros de 5, 49 e 16 % em ppm de resolução puderam ser detectados por espectrometria de massas (**Anexo 9**).

Estes derivados possuem uma grande velocidade de degradação quando secos, deste modo, não foi possível purificá-los e separá-los em quantidades preparativas para que pudéssemos testá-los separadamente com a enzima, por

isso passamos a utilizar a mistura nas reações enzimáticas, visto que todos passaram a possuir grupamentos álcool.

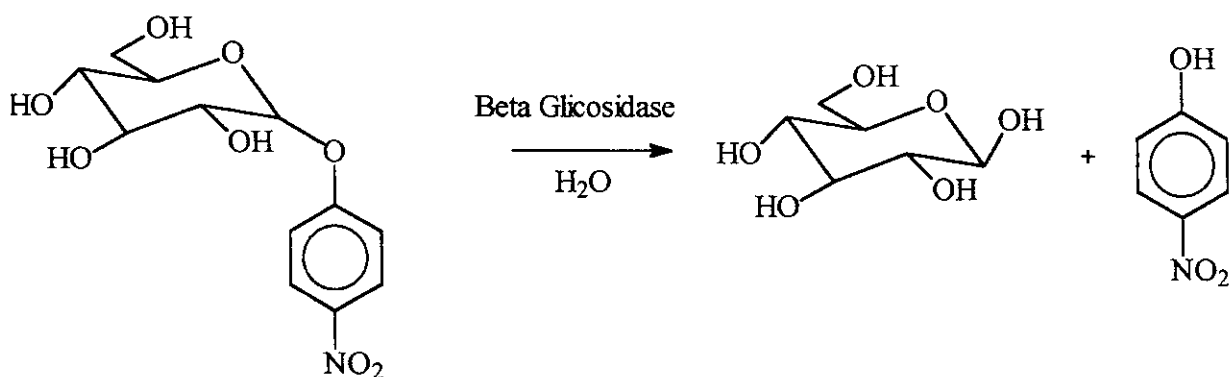
#### 4.4. $\beta$ -Glicosidases

A segunda classe de enzimas utilizada neste trabalho foi a da  $\beta$ -glicosidase (enzimas hidrolíticas). Esta enzima tem sido amplamente empregada na glicosilação de álcoois, porém, sendo pouco abordada em relação a outros grupamentos funcionais (Vic e col., 1997; Ruiz e col., 2001; Panintrarux e col., 1995; Vic e Crout, 1994).

Deste modo, as discussões sobre o poder catalítico das representantes dessa classe de enzima, nos direcionaram a trabalhar com as  $\beta$ -glicosidases que mais se encaixavam no perfil da síntese proposta.

Portanto, dentre as opções existentes, a linamarase, extraída da *Manihot esculenta crantz* e a extraída do fungo *Aspergillus niger* tornaram-se objetos de nossos estudos devido a alta reatividade apresentada frente a álcoois terciários (Svasti e col., 2003).

O ensaio de atividade enzimática aplicado para essa classe de enzimas baseia-se no aparecimento do p-nitrofenol a partir da hidrólise do para-nitrofenol glicopiranosídeo (Figura 4.4.).

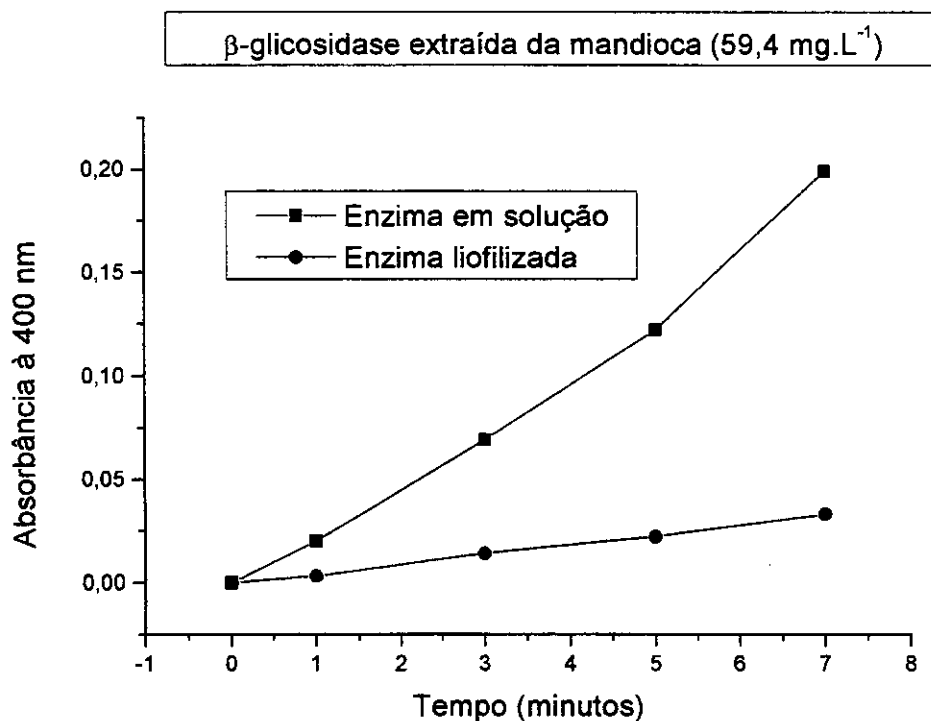


**Figura 4.4. Representação esquemática da hidrólise do p-nitrofenol glicopiranosídeo**

#### **4.4.1. $\beta$ -Glicosidase extraída da mandioca imobilizada em Eupergit<sup>®</sup>C**

##### **4.4.1.1. Medidas de atividade enzimática**

É de conhecimento geral que algumas enzimas em contato com solventes orgânicos ou meios não convencionais sofrem desnaturação. O processo de imobilização enzimática visa sanar este problema, pois este processo aumenta e estabiliza a atividade destas proteínas.



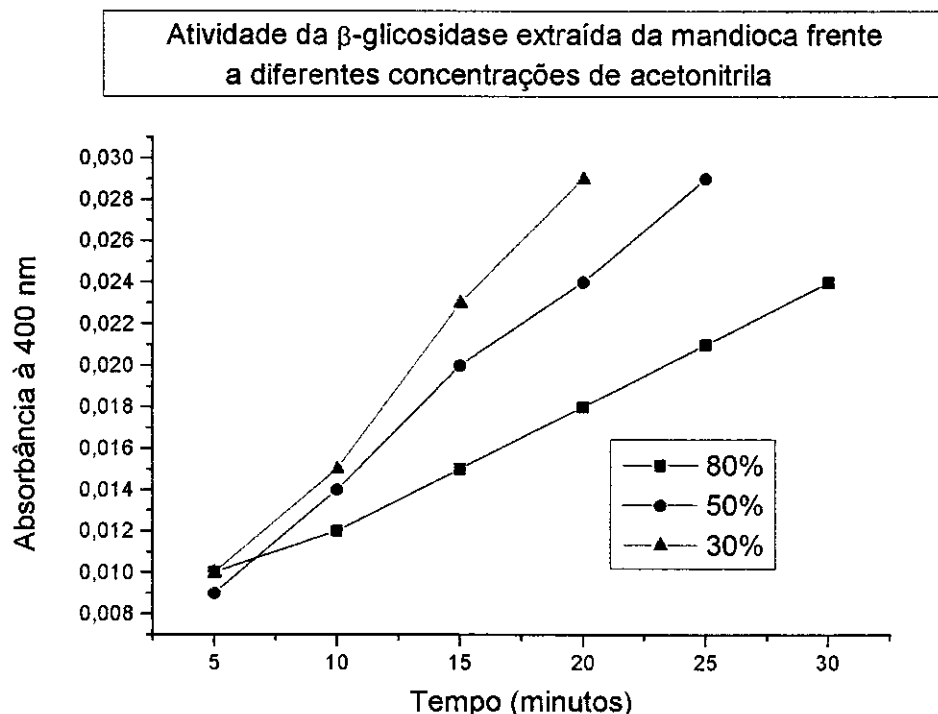
**Gráfico 4.4.1. Representação gráfica da atividade enzimática da  $\beta$ -glicosidase imobilizada estocada em solução e na forma liofilizada**

O gráfico 4.4.1. demonstra que a enzima imobilizada em Eupergit<sup>®</sup>C manteve sua atividade catalítica quando mantida em solução tampão pH=5,5, porém, quando liofilizada essa atividade demonstrou uma queda.

#### **4.4.1.2. Medida da atividade enzimática frente a diferentes concentrações de acetonitrila**

A escolha do solvente acetonitrila para os testes ocorreu, primeiro em função de sua maior citação em resultados publicados (Gunata e col., 1994), segundo, por ser um solvente miscível em água e por último, por solubilizar a violaceína.





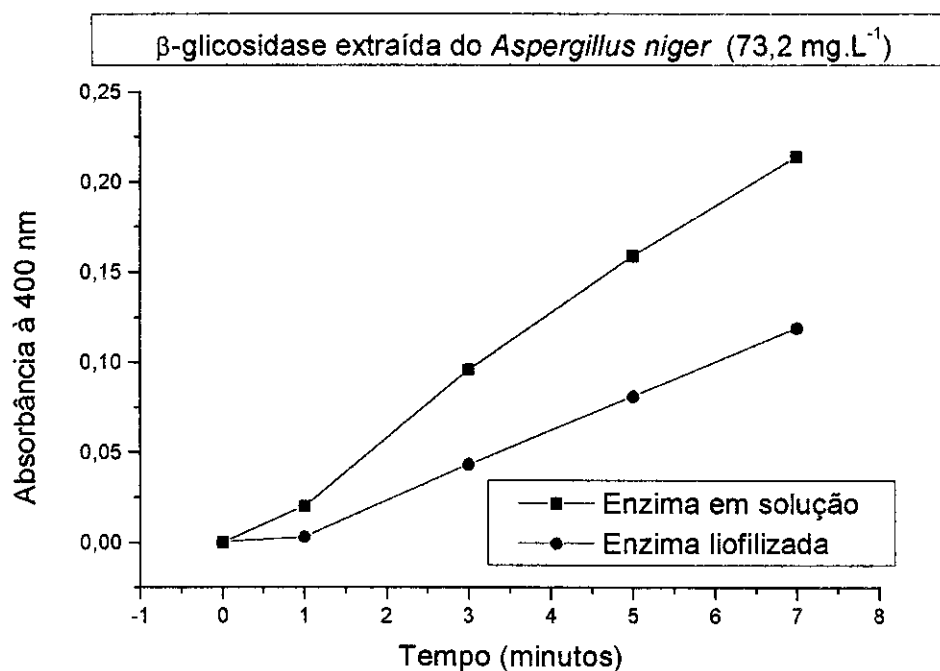
**Gráfico 4.4.2. Representação gráfica da atividade enzimática da  $\beta$ -glicosidase imobilizada estocada em solução frente diferentes concentrações de acetonitrila**

A concentração de 80 % de acetonitrila foi testada, pois no processo de hidrólise reversa torna-se necessário pequenas concentrações aquosas. As outras duas concentrações (30 e 50%) foram testadas para o processo de transglicosilação onde é necessária a solubilidade do substrato hidrofóbico no meio.

Os experimentos descritos no capítulo 3, utilizando a enzima em questão, foram realizados com 30 % de acetonitrila, pois esta concentração foi suficiente para dissolução parcial dos substratos.

## 4.4.2. $\beta$ -Glicosidase extraído do fungo *Aspergillus niger* imobilizada em Eupergit<sup>®</sup>C

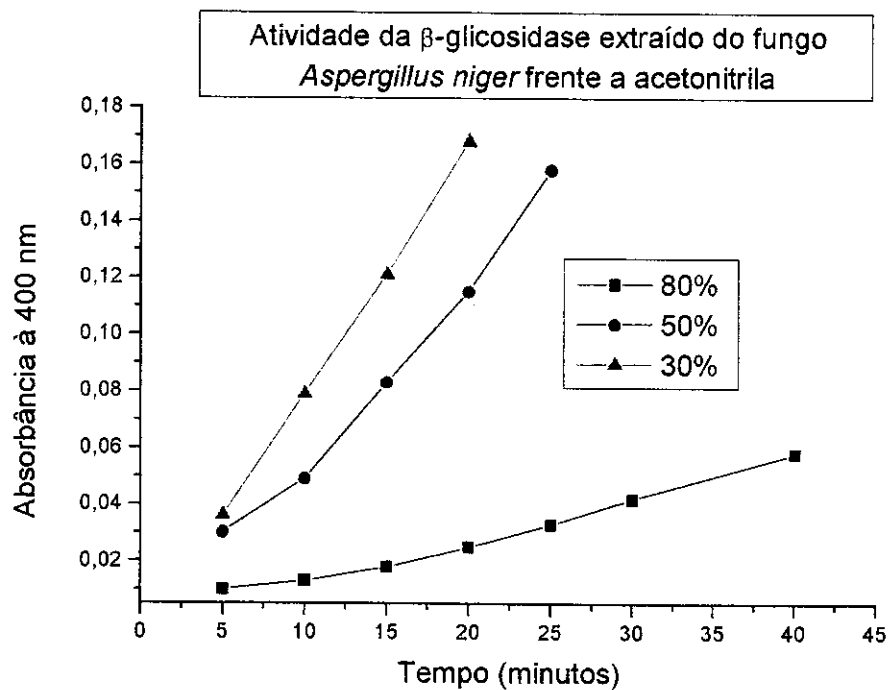
### 4.4.2.1. Medidas de atividade enzimática da enzima



**Gráfico 4.4.3. Representação gráfica da atividade enzimática da  $\beta$ -glicosidase imobilizada estocada em solução e na forma liofilizada**

Neste experimento, o gráfico 4.4.3. demonstra a que a enzima imobilizada em Eupergit<sup>®</sup> C manteve sua atividade catalítica quando mantida em solução tampão, porém, quando liofilizada essa atividade apresenta uma queda.

#### 4.4.2.2. Medidas de atividade enzimática frente a diferentes concentrações de acetonitrila



**Gráfico 4.4.4. Representação gráfica da atividade enzimática da  $\beta$ -glicosidase imobilizada estocada em solução frente diferentes concentrações de acetonitrila**

Do mesmo modo como testado com a linamarase, as concentrações de 80, 50 e 30% de acetonitrila foram testadas com a enzima extraída do fungo.

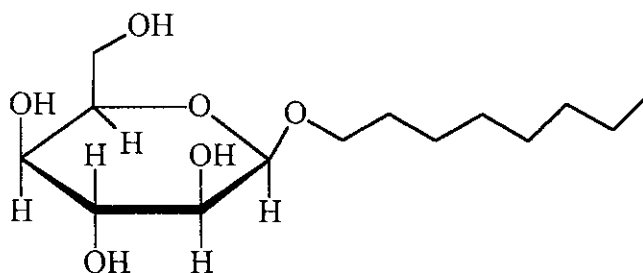
Os experimentos de transglicosilação descritos no capítulo 3, utilizando a enzima em questão, foram realizados com 30 % de acetonitrila, pois esta concentração foi suficiente para dissolução parcial dos substratos.

## 4.5. Síntese enzimática de alquil glicosídeos utilizando as $\beta$ -glicosidases imobilizadas

### 4.5.1. Substrato octanol

O octanol foi utilizado nos experimentos como modelo reacional devido ao grande quantidade de resultados encontrados na literatura utilizando este álcool como substrato.

A utilização deste solvente, nestes estudos, foi necessária para que pudéssemos padronizar a síntese do glicosídeo, e posteriormente utilizar esta padronização com a violaceína, tendo assim resultados conclusivos sobre o poder catalítico destas enzimas. A molécula esperada nesta padronização encontra-se indicada na figura 4.5.



**Figura 4.5. Estrutura do octanol glicopiranosídeo**

#### 4.5.1.1. Hidrólise reversa

Dados da literatura mostram que o processo de hidrólise reversa apresenta baixo rendimentos (Vic e col., 1996). A utilização de grandes

quantidades de solvente orgânico necessário para deslocar o equilíbrio reacional a favor da síntese diminuí significativamente a atividade enzimática.

Neste processo, portanto, não conseguimos detectar a formação do glicosídeo derivado de octanol desejado.

#### **4.5.1.2. Transglicosilação**

O processo de transglicosilação, como esperado, demonstrou o poder catalítico da classe das  $\beta$ -glicosidases. Depois de padronizado o sistema, os resultados foram altamente reprodutíveis.

As duas  $\beta$ -glicosidases utilizadas apresentaram este poder catalítico, tendo como única diferença o tempo reacional.

Os espectros de RMN  $H^1$  do glicosídeo formado em ambos os processos apresentam sinais característicos de açúcares entre ( $\delta$ ) 3,031 – 3,7 ppm além de sinais referentes aos hidrogênios característicos de hidrocarbonetos insaturados entre ( $\delta$ ) 0,8 – 0,9 e 1,2 – 1,3 ppm (**Anexo 11**).

A partir do espectro de massas obtido foram detectados dois compostos de massa molecular 293 e 315 m/z. A fragmentação (ms/ms) do composto 293 m/z nos levou a formação de um fragmento característico de glicosídeos, o 163 m/z (açúcar desidratado). O composto 315 m/z não demonstrou fragmentação. Essa característica é típica de “clusters” formados entre a molécula em questão e alguns íons provenientes de sais encontrados no meio (neste caso o sódio). O 315 m/z é provavelmente, o 293 m/z + 22.

Os cálculos das massas teóricas destes dois compostos apresentaram respectivamente erros de 2 e 9 % em ppm de resolução (**Anexo 10**).

## **4.5.2. Substrato violaceína e seus derivados N-hidroximetílicos**

### **4.5.2.1. Transglicosilação**

Na tentativa de glicosilação da violaceína e seus derivados N-hidroximetílicos sintetizados com a enzima  $\beta$ -glicosidase foram empregados as mesmas condições experimentais previamente padronizadas com o octanol. Nestas condições, apesar da degradação do p-nitrofenol glicopiranosídeo à p-nitrofenol e glicose, não foi detectado no meio reacional a formação dos glicosídeos esperados.

## Capítulo 5

### **5.1. Conclusões**

Foi possível a produção de *Chromobacterium violaceum* em escala piloto tendo como principal resultado a obtenção de uma grande quantidade de violaceína, composto de interesse largamente estudado por nosso grupo de trabalho.

As modificações realizadas no processo de purificação já existente levaram a diminuição significativa nas perdas de violaceína durante o processo. A caracterização da violaceína e da deoxiviolaceína demonstrou este resultado.

A síntese enzimática utilizando a UDP-glucuronil transferase do glucuronídeo do 5'-hidroxindol foi bem sucedida levando a obtenção do produto esperado, entretanto, a grande diferença de solubilidade entre esta molécula modelo e a violaceína não nos deu possibilidades de aplicar as mesmas condições utilizadas.

Deste modo, estudos cinéticos com a modificação de vários parâmetros foram realizados. Estes estudos apresentaram resultados novos e satisfatórios sobre estabilidade enzimática e outros fatores relevantes à síntese.

Mesmo com todos estes estudos e alterações, várias tentativas foram feitas para a obtenção do derivado glucurônico da violaceína utilizando a UDP-glucuronil transferase, porém, nenhum produto foi encontrado.

A solubilidade do substrato em meio aquoso, a desnaturação enzimática em meios não convencionais ou a possível falta de compatibilidade entre o

composto de interesse e o sítio ativo da enzima foram os problemas encontrados.

Uma rota alternativa na síntese utilizando UDPGT, seria a imobilização desta enzima em diferentes suportes, porém, a tentativa de imobilização física em quitosana e covalente em Eupergit<sup>®</sup> C demonstraram total perda de atividade protéica.

Já no caso das duas  $\beta$ -glicosidases testadas, o processo de imobilização em Eupergit<sup>®</sup> C apresentou ótimos resultados. Ambas as enzimas demonstraram atividade imobilizadas no suporte. A estabilidade térmica e frente a solventes orgânicos aumentaram, como esperado.

Uma colocação relevante neste processo é o fato das enzimas imobilizadas em Eupergit<sup>®</sup> C demonstraram uma maior atividade catalítica quando mantidas em solução tampão pH=5,5, porém, quando liofilizada essa atividade demonstrou uma ligeira queda.

Dentre os processos existentes para a aplicação desses biocatalisadores, a transglicosilação demonstrou bons resultado com a molécula modelo, o octanol, porém, com a violaceína e seus derivados N-hidroximetílicos não obtivemos os mesmos resultados.

## **5.2. Sugestões para trabalhos futuros**

Síntese química de derivados glicosídicos da violaceína.

Colocação de grupamentos mais hidrofílicos no fenol ou nos nitrogênios encontrados na molécula.

Maior aprofundamento nos estudos dos derivados N-hidroximetilados da violaceína. Testes *in vitro* destes derivados.



## Cápítulo 6

### **6. Referências bibliográficas**

- Aski, S.; Nomura, Y.; Mizutani, H.; Hashimoto, O. e Matsuoka, M.; Sen'i Gakkaishi, 53, 453-460 (1997);
- Ballantine, J.A.; Beer, R.J.S. e Crutchey, D.J., Proc. Chem. Soc., 232-233, (1958);
- Beer, R.J.S.; Kenneth, C.H.; Khorana, H.G. e Robertson, A.; J. Chem. Soc., 186, 885-889 (1949);
- Belofsky, G., Percivill, D., Lewis, K., Tegos, G. P., Ekart, J., Journal of Natural Products, 67, 481-484 (2004);
- Bergonzini, C.; Annuario della Società dei Naturalisti in Modena, 14, 149-158 (1881);
- Caldas, L. R., Leitão, A. A. C., Santos, S. M., Tyrrell, R. M., Inter. Symp. Curr. Topics Radiol. Photobiol., Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, novembro, 121 (1978);
- Caldas, L.R.; Photochem. Photobiol., 26, 1-2 (1977);
- Campos, V.; Erazo, S. e Durán, N.; Arq. Biol. Tecnol., 25, 147-151 (1982);
- Conn, E. E., American Chem. Soc., 15-26 (1993);
- Crout, D. H. G., MacManus, D. A., Critchley, P., J. Chem. Soc., Chem. Commun., 376-378 (1991);
- D'Annibale A., Stazi S.R., Vinciguerra V., Sermanni G.G., J. Biotechnol., 77, 265-273 (2000);
- Daguilh, F., Baig, K., Infect. Med., 21, 16-17 (2004);
- Day, A., Bao, Y., Morgan, M. R. A., Williamson, G., Free Radical Biol. Med., 29, 1234-1243 (2000);
- De Azevedo, M. B. M., Alderete, J. B., Lino, A. C. S., J. Incl. Phenom. Macro., 37, 67-74 (2000 a);
- De Azevedo, M. B. M., Alderete, J., Rodriguez, J. A., J. Incl. Phenom. Macro., 37, 93-101 (2000 b);
- De Moss, R. D., Gottleb, D., Shaw, P., Mech. Action Biosynth. Antibiotics, 2, 77-81 (1967);
- Dromigny, J. A., Fall, A. L., Diouf, S., Perrier-Gros-Claude, J. D., Ped. Infect. Dis. J., 21, 573-574 (2002);
- Durán N., Rosa M.A., D'Annibale A., Gianfreda L., Enzyme Microb. Technol.; 31: 907-931 (2002).

Durán, N. and Faljoni, A., Anais da Academia Brasileira de Ciências , 52, 297-302 (1980);

Durán, N., Antônio, R. V., Haun, M. Pilli, R. A., World J. Microbial. Biotechnol. 10 686-689 (1994);

Durán, N., Campos, V., Riveros, R., Joyas, A., Pereira, M. F., Haun, M., Anais da Academia . Brasileira de . Ciências, 61 (1), 31-36 (1989);

Duran, N., Melo P., Haun, M., XXV Annual Meetings of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 150 (1996);

Durán, N., Menck, C. F. M., Critical Rev. in Microb., 27 , 201 – 222 (2001);

Eksittikul, T., Chulavatnatol, M., Arch. Biochem. Biophys., 266, 263-269 (1988);

Fenselau, C., Pallante, S., Parikh, I., J. Med. Chem., 19, 679 – 683 (1976);

Ferlin, M. G., Castagliuolo, I., Chiarelto, G., J. Heterocyclic Chem., 39, 631-638 (2002);

Gerardi, C., Blando, F., Santino, A., Zacheo, G., Plant Sc., 160, 795-805 (2001);

Goyal, K., Selvakumar, P., Hayashi, K., J. Mol. Catal., 15, 45-53 (2001);

Gunata, Z., Dugelay, I., Vallier, M. J., Sapis, J. C., Bayonove, C., Enzyme Microb. Technol., 21, 39-44 (1997);

Gunata, Z., Vallier, M. J., Sapis, J. C., Baumes, R., Bayonove, C., Enzyme Microb. Technol., 16, 1055-1058 (1994);

Hamada, M.; Kondo, S.; Nakamura, H.; Ikeda, T.; Ykeda, D.; Inuma, K.; Gome, S.; Ikeda, Y.; Takeuchi, T.; Umezawa, H. e Iitaka, Y.; J. Antibiot., 36, 445-447 (1983);

Hartree, E.F.; Anal. Biochem., 48, 422 (1972);

Haun, M.; Pereira, M.F.; Hoffman, M.E.; Joyas, A.; Campos, V.; Filardi, L.D.S.; De Castro, S.L. e Durán, N.; Biol. Res., 25, 21-25 (1992);

Helenius, A., Simons, K., Biochim. Biophys. Acta, 415 (1), 29-79 (1975);

Hoshino, T., Hayashi, T., Odajima, T., J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1, 1565 – 1571 (1995);

Hoshino, T., Kojima, Y., Hayashi, T., Uchiwama, T., Kaneko, K., Biosci. Biotechnol. Biochem., 57, 775 – 781 (1993);

Hoshino, T., Kondo, T., Uchiyama, T., Ogasawara, N., Agric. Biol. Chem., 51, 965 – 968 (1987a);

Hoshino, T., Ogasawara, N., Agric. Biol. Chem., 54, 2339 – 2346 (1990);

Hoshino, T., Takano, T., Hori, S., Ogasawara, N., Agric. Biol. Chem., 51, 2733 – 2741(1987b);

Hoshino, T.; Hayashi, T. e Uchiyama, T.; Biosc. Biotech. Biochem., 58, 279-282 (1994);

Hoshino, T.; Kimura, K.; Takahashi, H.; Uchiyama, T. e Yoshihama, M.; Eur. Pat. Appl. EP 612,742 (Cl. CO7D403114), 31 Ago 1994, JP Appl. 93/56,510,22 Feb 1993; 12p, (1994);

Jenkins, G. N., Stachulski, A. V., Scheinmann, F., Turner, N. J., Tetrahedron: Asymmetry, 11, 413-416 (2000).

Johansson, E., Hedbys, L., Mosbach, K., Larsoon P. O., Gunnarson, A., Svensson, S., Enzyme Microb. Technol., 11, 347 (1989);

Johnson, D. B., Swanson, M.J., Barker, C. W., Fanska, C. B., Murrill, E. E., Prep. Biochem., 9 (4), 391 – 406 (1979);

Kabanov, A. V., Batrakova, E. V., Alakhov, V. Y., Journal Controlled Release, 82, 189-212 (2002);

Katchalski-Katzir E., Kraemer D.M., J. Mol. Catal. B: Enzym.; 10:157-176 (2000).

King, C. D., Rios, G. R., Green, M. D., Tephly, T. R., Curr. Drug metab., 1 (2), 143-161 (2000);

Kraemer D.M., Lehmann K., Pennewiss M., Plainer H., In: Peeters,H. Ed., Protides of Biological Fluids, 23rd Colloquium, Pergamon, Oxford, 501–511 (1975);

Kubik, C., Sikora, B., Bielecki, S., Enzyme Microb. Tech. 34 (6), 555-560 (2004);

Laatsch, H., Thomson, R. H., J. Chem. Soc. Perkin II, 1331 – 1339 (1984);

Leclerc, S., Heydel, J. M., Amosse, V., Gradinaru, D., Cattarelli, M., Artur, Y., Goudonnet, H., Magdalou, J., Netter, P., Pelczar, H., A Molec. Brain Res. 107 (2), 201-213 (2002);

Lichstein, H. C., Van de Sand, V. F., J. of Infect. Dis., 76, 47-51 (1945);

Likolov, Z. L., Meagher, M. M., Reilly, P. J., Biotechnol. Bioeng. 34, 694 (1989);

Lirdprapamongkol, K., Svasti, J., Biotechnol. Lett., 22, 1889-1894 (2000);

Lu, H., Meng, X. F., Li, C., Drug Metab. Dispos., 31 (4), 452-461(2003);

Mackenzie, P., Little, J. M., Radomisnska-Pandya, A., Bioch. Pharmacol., 65, 417 – 421 (2003);

May, G., Brümmer, B., Ott, H., Patentamt Offenlegungsschrift DE 3,935.066 (CL.C12P17/16), 5pp (1991);

Melo, P. S., Justo, G. Z., De Azevedo, M. B. M., Duran, N., Haun, M., Toxicology, 186, 217 – 225 (2003);

Momen, A. Z. M. R., Hoshino, T., Biosci. Biotechnol. Biochem., 64, 539 – 549 (2000);

Momen, A. Z. M. R., Mizuoka, T., Hoshino, T., J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1, 3087 – 3092 (1998);

Nakajima, M., Sakata, N., Ohashi, N., Kume, T., Yokoi, T., Drug Metab. Dispo., 30 (11), 1250-1256 (2002);

Nilsson, K. G. I., Carbohidr. Res., 180, 53 (1988);

Nilsson, K. G. I., Carbohidr. Res., 204, 79 (1990);

Panintrarux, C., Adachi, S., Araki, Y., Enzyme Microb. Tech 17 (1), 32-40 (1995);

Parker, W.L.; Rathnum, M.L.; Johnson, J.H.; Wells, J.S.; Principe, P.A. e Sykes, R.B.; J. Antibiot., 41, 454-460 (1988);

Petit, J. M., Paquet, F., Beau, J. M., Tetrahedron Lett., 33, 4567-4570 (1991);

Radominska-Pandya, A., Czernik, P., Little, J. M., Battaglia, E., Mackenzie, P. I., Drug Metab. Rev., 31, 817 – 900 (1999);

Reilly, J. e Pyne, G.; Biochem J., 21, 1059-1064 (1927);

Rettori, D., Durán, N., World. J. Microbiol. Biotechnol., 14, 685-688 (1998);

Ritter J. K., Chem. Biol. Interact., 129, 93 – 171 (2000);

Riva, S., Curr. Opin. Chem. Biol., 5 (2), 106-111 (2001);

Riveros, R.; Haun, M.; Campos, V. and Durán, N.; Arq. Biol. Tecnol., 31, 475 – 487 (1988);

Riveros, R.; Química e atividade biológica de derivados de 1,3-diidro-2, H-indol-3-ona; Tese de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); Campinas, S.P., (1986);

Roode, B. M., van der Meer, T. D., Kaper, T., Franssen, C. R., van der Padt, A., van der Oost, J., Boom, R. M., Enzyme Microb. Technol., 29, 621-624 (2001);

Ruiz, J. M. J., Obwald, G., Petersen, M., Fessner, W., J. mol. Catal. B: Enzymatic, 11, 189-197 (2001);

Sasaki, J., Mizoue, K., Morimoto, S., Omura, S., The Journal of Antibiotics, 49, 1110-1118 (1996);

Shao, P. L., Hsueh, P. R., Chang, Y. C., Lu, C. Y., Lee, P. Y., Lee, C. Y., Huang, L. M., Pediatric Infectious Disease Journal 21 (7), 707-709 (2002);

Shimizu, M., Matsumoto, Y., Tatsuno, M., Fukuoka, M., Biol. Pharm. Bulletin, 26 (2), 216-219 (2003);

Shukla, A., Kumar, A., Ind Eng Chem Res, 43 (9), 2017-2029 (2004);

Sigma Quality Control Test Procedure, Enzymatic Assay of Uridine-5'-diphosphoglucuronyl Transferase (EC 2.4.1.17), 1-4 (1994);

Silvendra, R., Lo, H. S., J. Gen. Microbiol., 90, 21 (1975);

Singh, P.D.; Liu, W.C; Gougoutas, J.Z.; Malley, M.F.; Porubcan, M.A.; Trejo, W.H.; Wells, J.S. e Sykes, R.B.; J. Antibiot., 41, 446-453 (1988);

Stevenson, D. E., Hubl, U., Enzyme Microb. Technol., 24, 389 – 396 (1999);

Stevenson, D. E., Kren, V., Halada, P., Sedmera, P., Collect. Czech. Chem. Commun., 65, 117-121 (2000).

Svasti, J., Phongsak, T., Sarnthima, R., Biochem. Biophys. Res. Commun., 305, 470-475 (2003);

Svasti, J., Srisomsap, C., Techasakul, S., Surarit, R., Phytochem., 50, 739-743 (1999);

Thiem J., Werschkun, B., Wendt, A., J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 3021 – 3023 (1998);

Van Rantwijk, F., Oosterom, M. W., Sheldon, R. A., J. Mol. Catal. B: Enzymatic, 6, 511-532 (1999);

Verardo, G., Gorassini F., Giumanini, A. G., Tetrahedron 51, 30, 8311-8322 (1995);

Vic, G., Crout, D. H. G., Tetrahedron-Asymmetry 5, 12, 2513-2516 (1994);

Vic, G., Biton, J., Le Beller, D., Michel, J., Biotechnol. Bioeng., 46, 109-116 (1995);

Vic, G., Hastings, J. J., Crout, H. G., Tetrahedron: Asym., 7, 1973-1984 (1996);

Vic, G., Thomas, D., Crout, D. H. G., Enzyme Microb. Technol., 20, 597-603 (1997);

Vulfson, E. N., Patel, R., Beacher, J. E., Andrews, A. T., Low, B. A., Enzyme Microb. Technol., 12, 950-954 (1990);

Wendy, A., Bioresource Technol., 74, 49 – 62 (2000);

Wierenga, W., Harrison, A. W., Evans, B. R., Chidester, C. G., Journal of Organic Chemistry, 49, 438-442 (1984);

Wille, G, Steglich W, Synth.Suttgard, 5, 759-762 (2001);

Yilmaz, M., Turk, A. O., Tay, T., Kivanc, M., Zeitschrift Fur Naturforschung C-A Journal of Biociences, 59, 249-254 (2004);

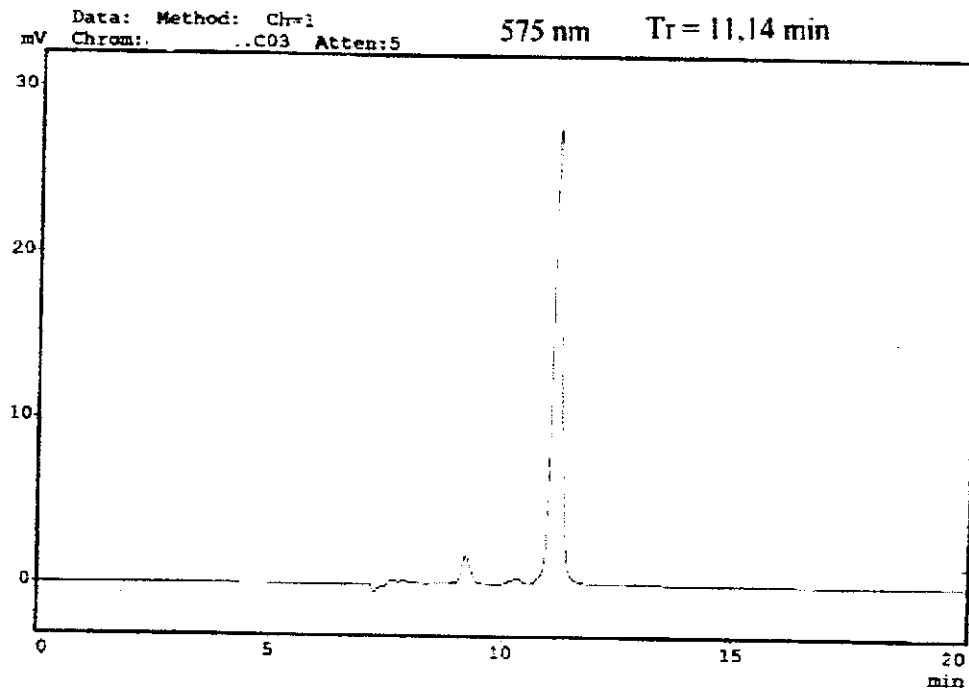
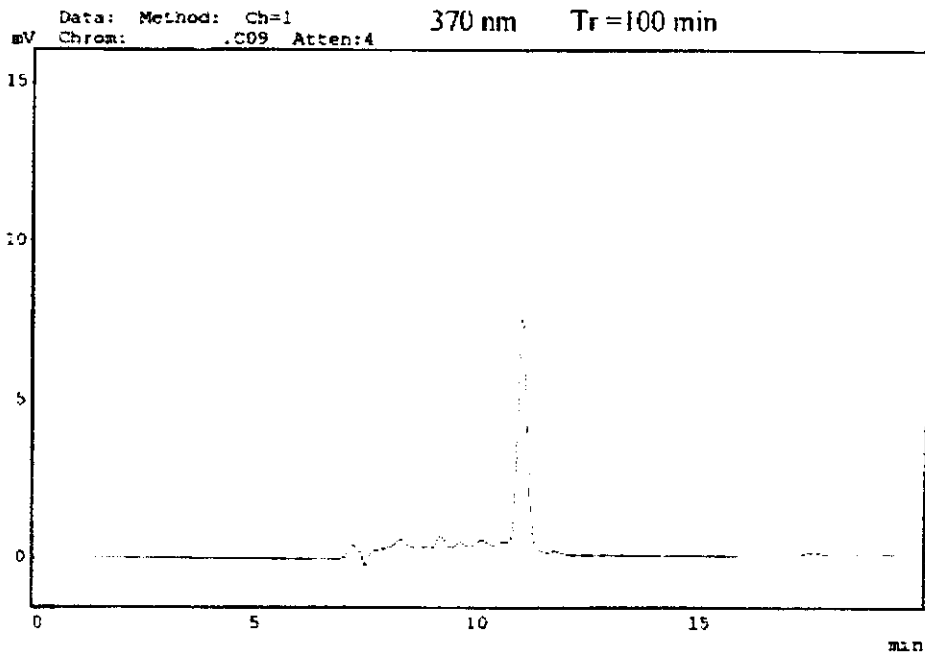
Zaborsky O.R., Immobilized Enzymes; CRC Press, Ohio, USA, p.175 (1974).

Zihnioglulu, F., Telefoncu, A., Biochimica et Biophysica Acta, 1244, 291-294 (1995);

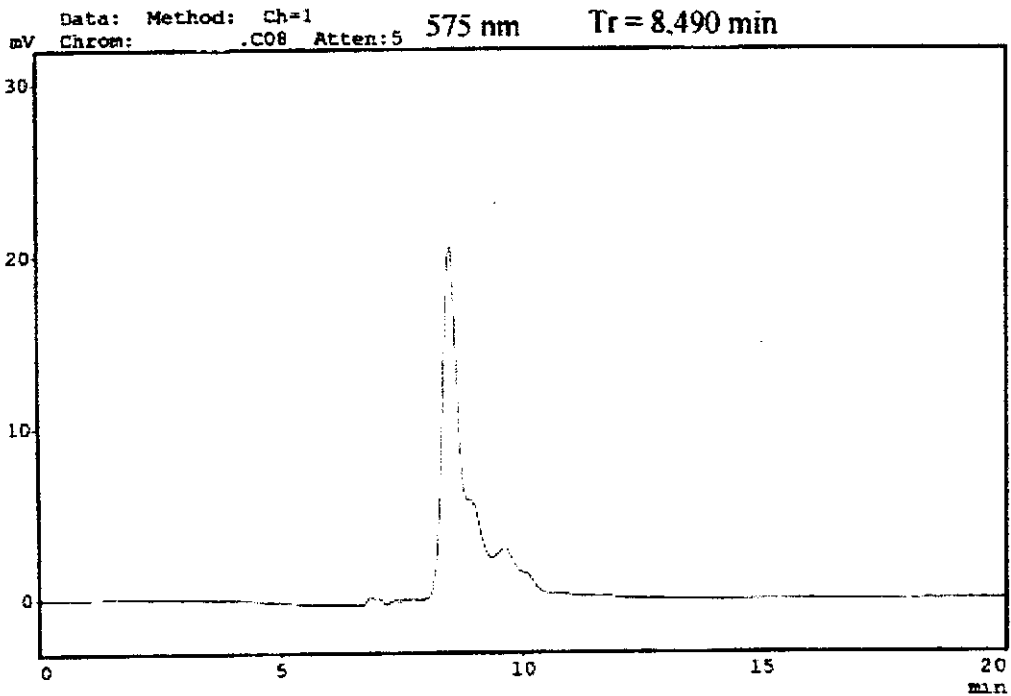
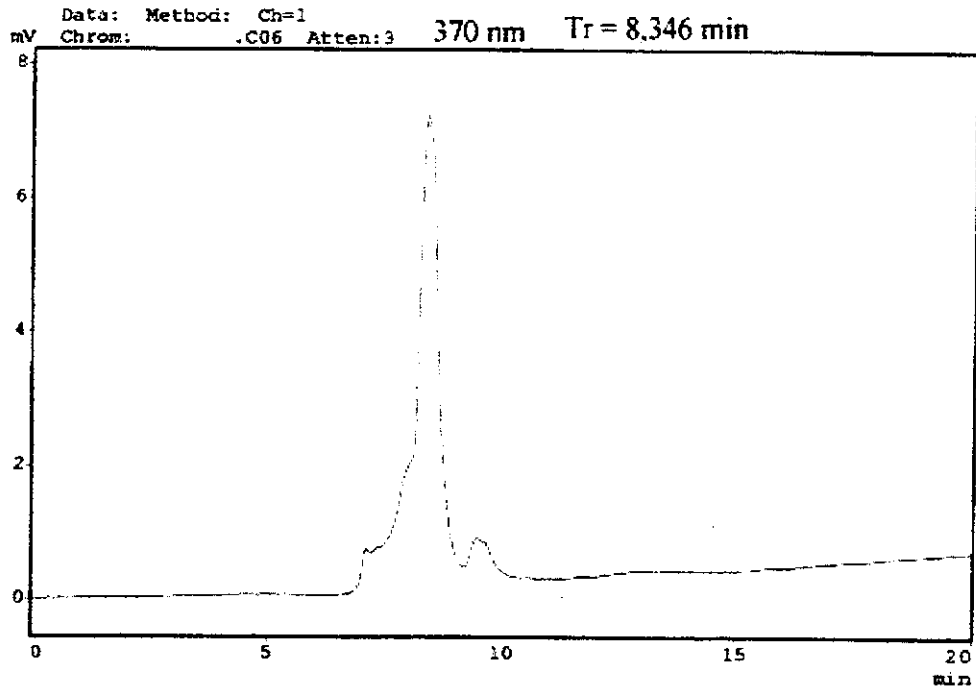
Zakim, D., Vessey, A. D., Meth. Bioch. Ana., 21, 2 – 37 (1973);

## Capítulo 7 - Anexos

### **ANEXO 1 – Deoxiviolaceína analizada por HPLC**

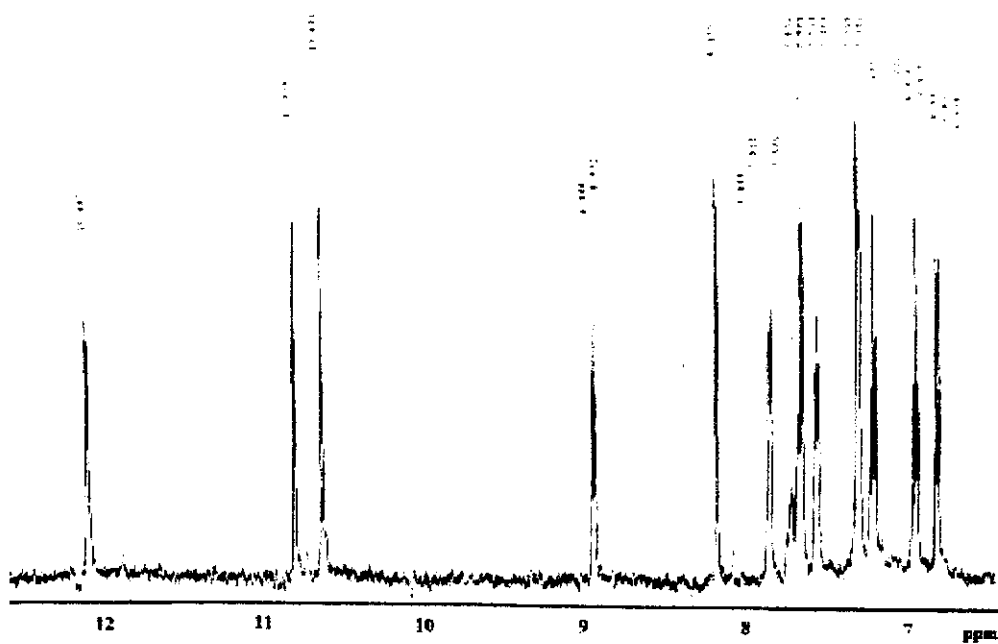


## Anexo 2 – Violaceína analisada por HPLC

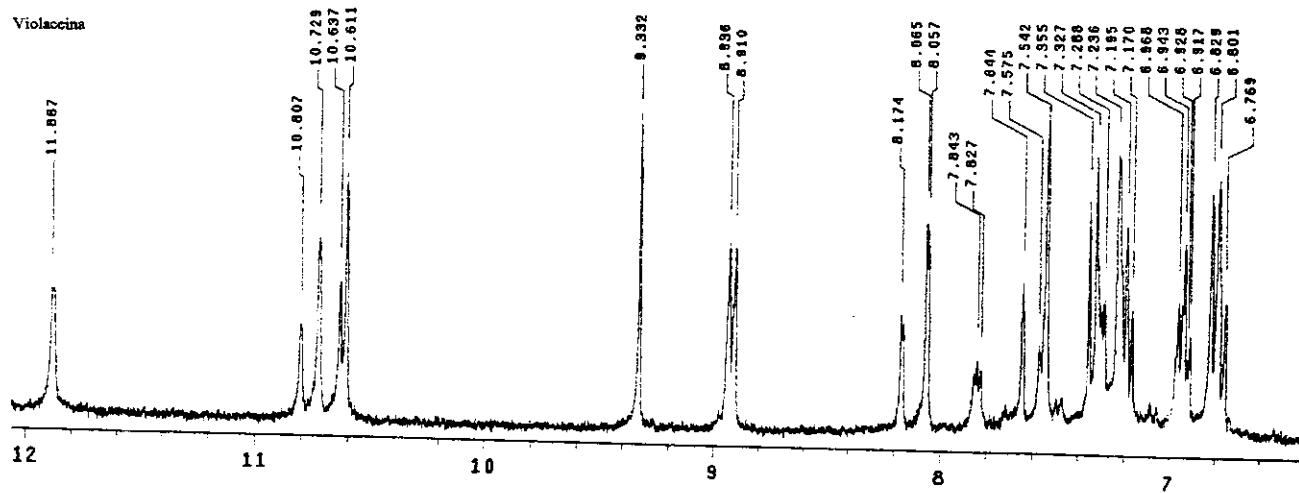


# ANEXO 3 – Análises de RMN H<sup>1</sup>

## Deoxiviolaína



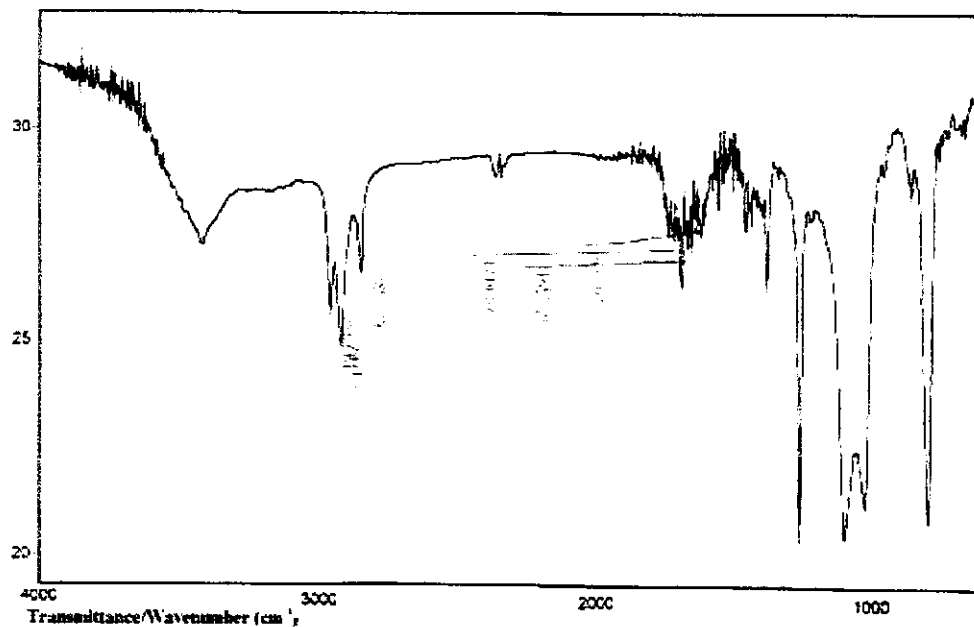
## Violaína



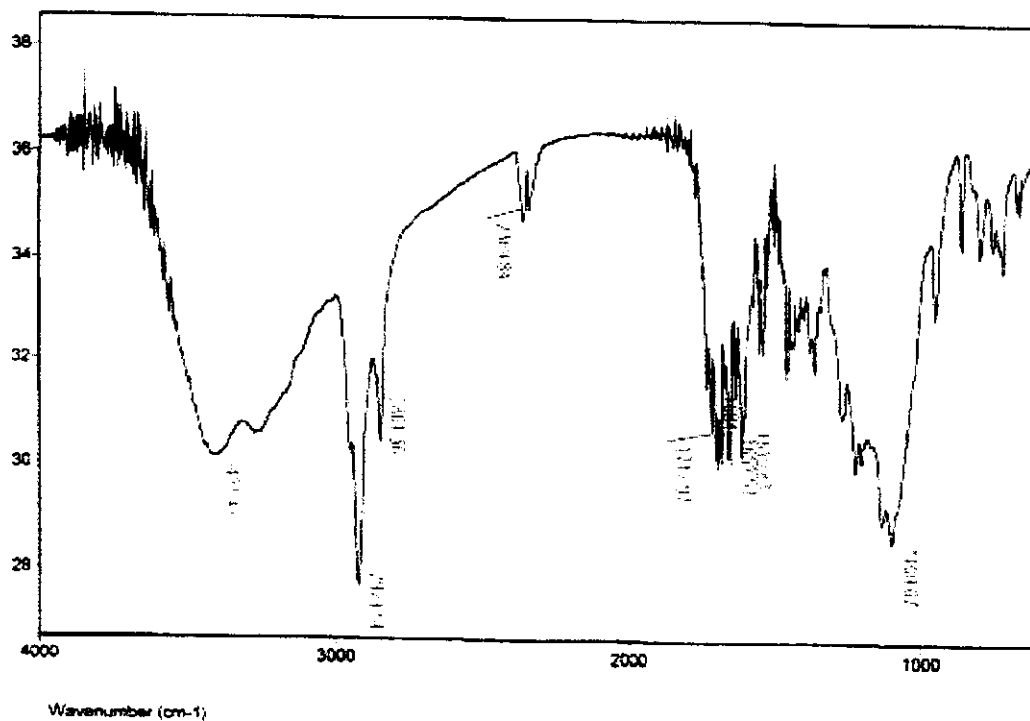


## ANEXO 4 – Análises de espectroscopia de Infravermelho

### Deoxiviolaceína

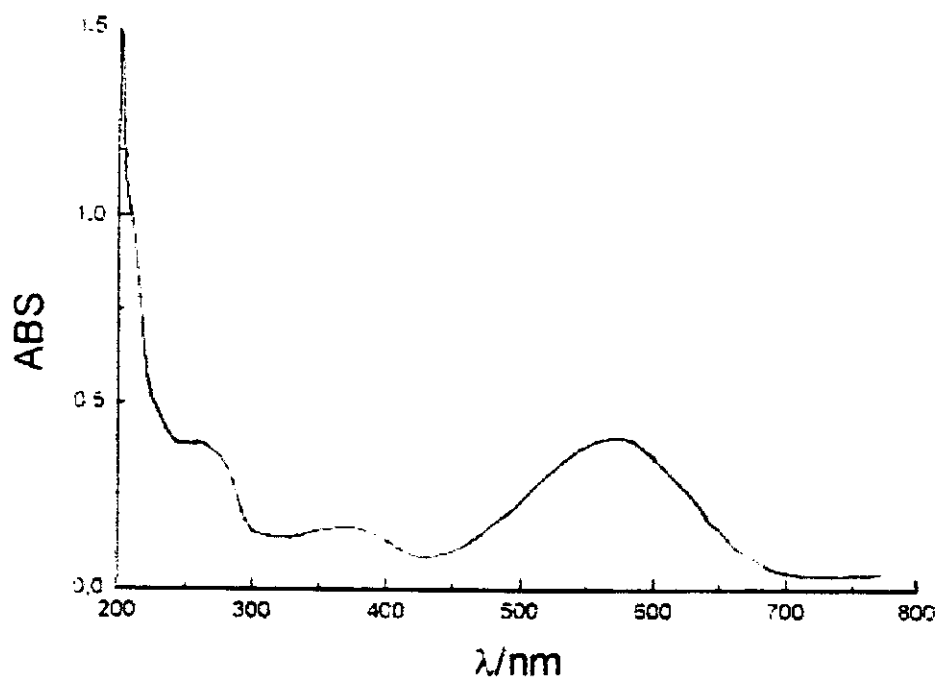


### Violaceína

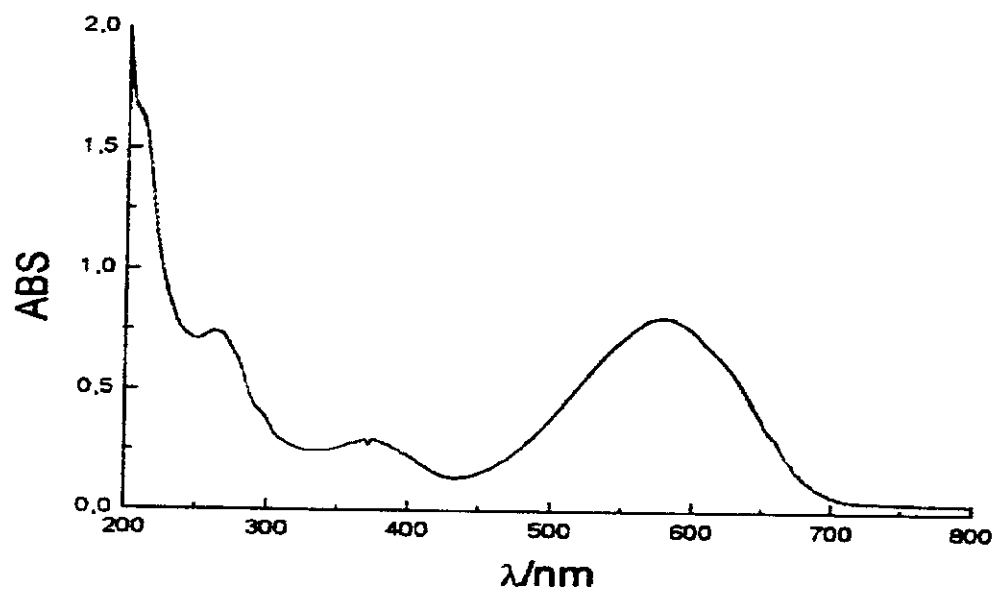


## ANEXO 5 – Análises de espectroscopia de Ultravioleta

### Deoxiviolaceína

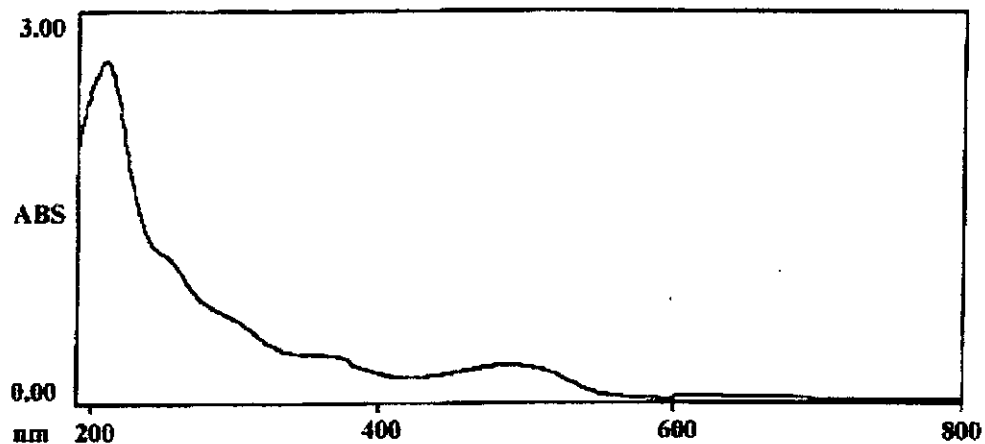


### Violaceína

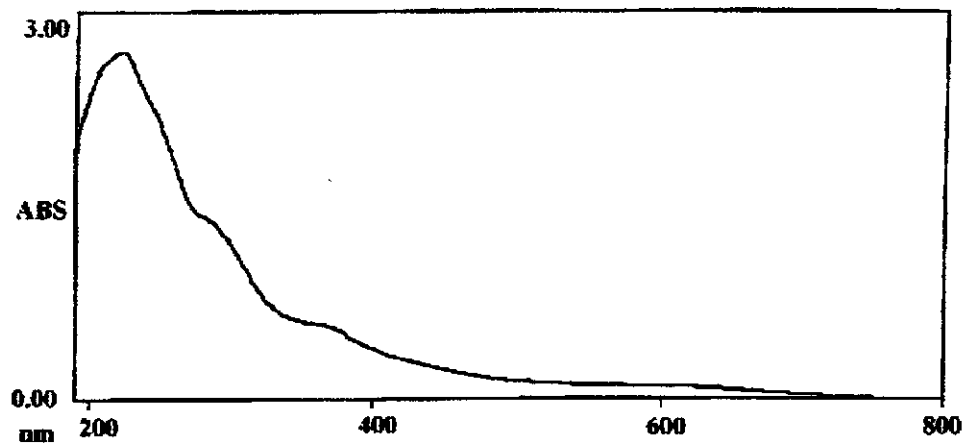


## ANEXO 6 – Ultravioleta da violaceína em diferentes pHs

### Violaceína em pH alcalino

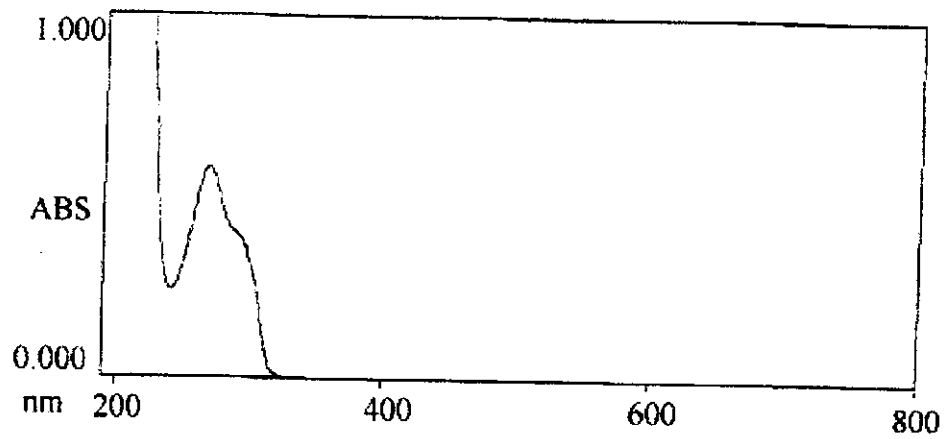


### pH ácido

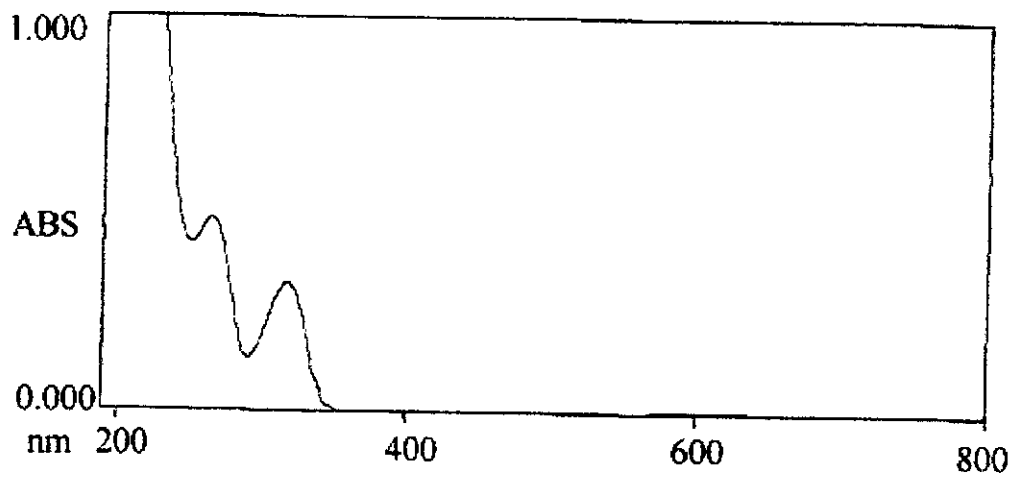


## ANEXO 7– Análises de espectroscopia de Ultravioleta

### 5'-hidroxindol em água

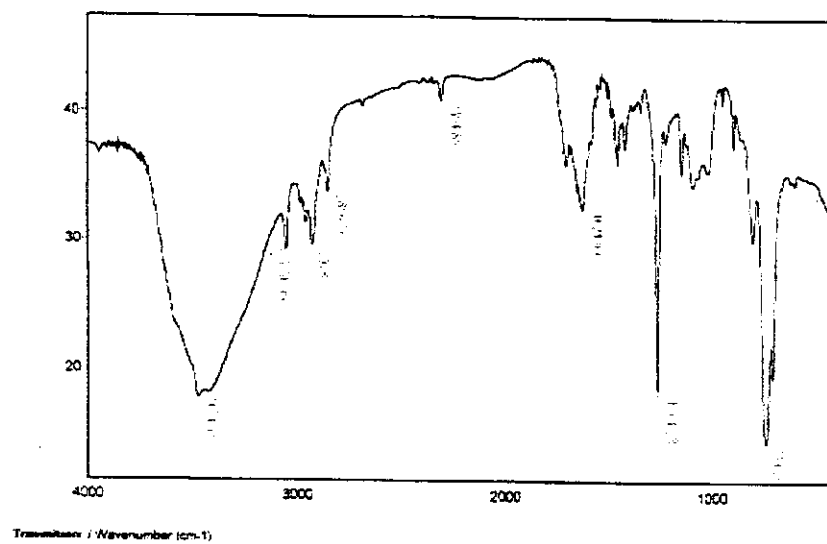
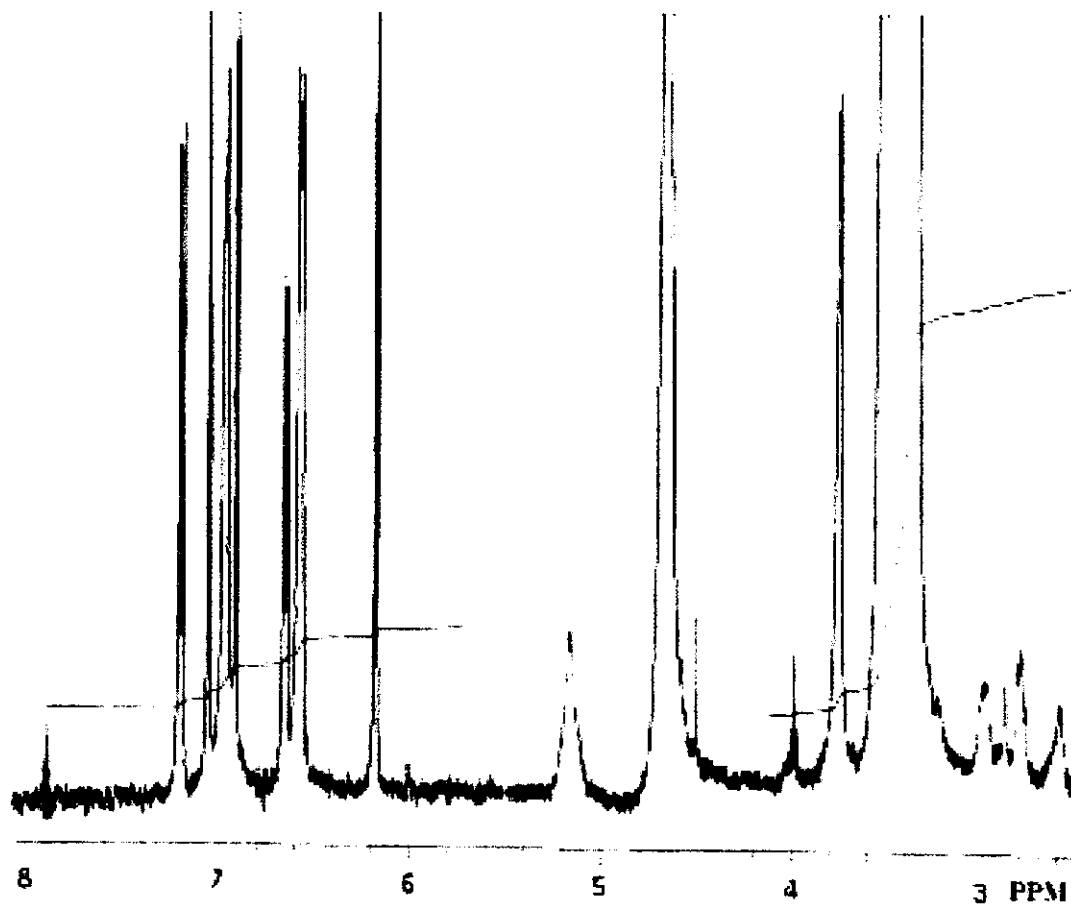


### 5'-hidroxindol em água (pH > 10)



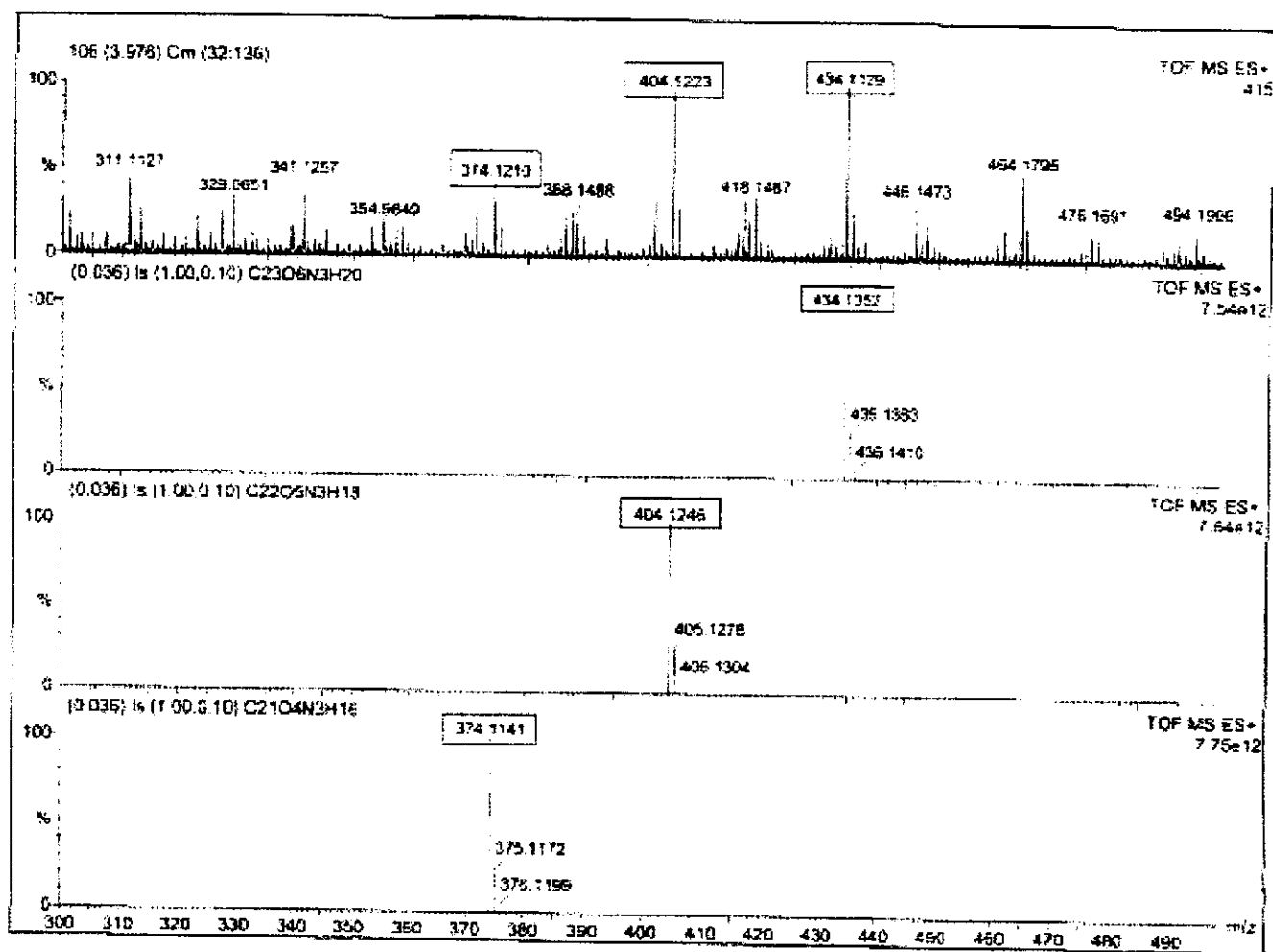
## ANEXO 8 – Espectro de RMN $H^1$ e infravermelho

### 5'-hidroxindol glicopiranosídeo em $D_2O$



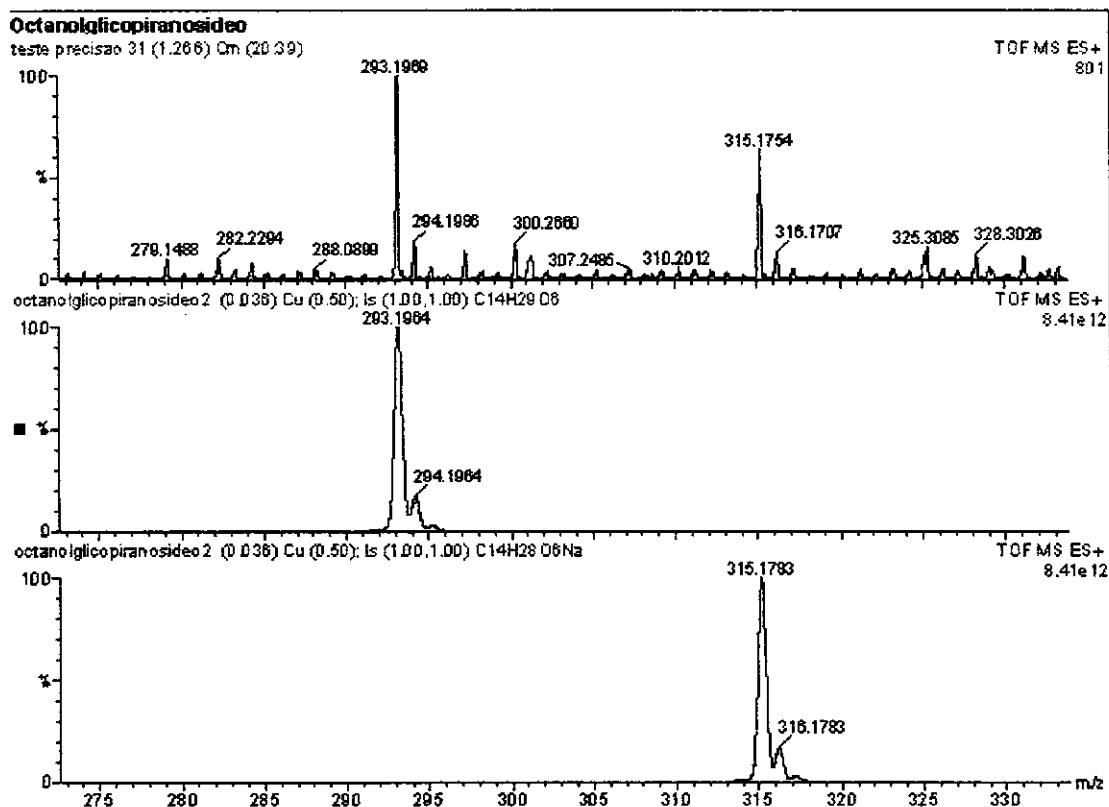
## ANEXO 9 – Análise de Espectrometria de massas

### Compostos N-Hidroximetílicos da violaceína (MH<sup>+</sup>)

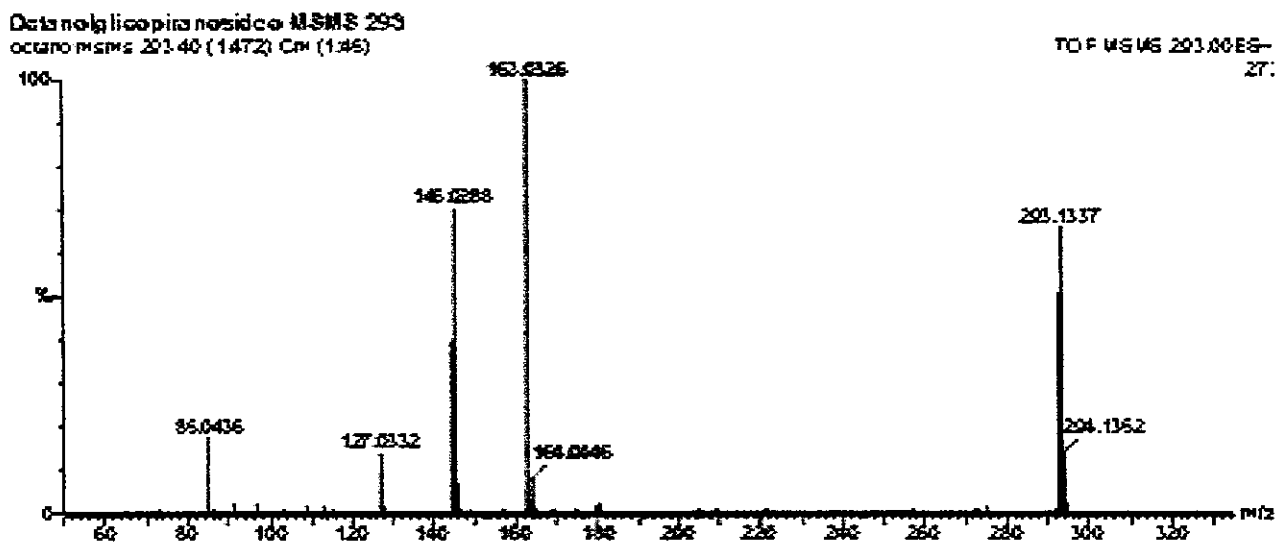


# ANEXO 10 – Análises de Espectrometria de massa

## Octanol glicopiranosídeo (MH<sup>+</sup>)



## Fragmentação do m/z 293



# ANEXO 11 – Espectro de RMN $H^1$ do octanol glicopiranosídeo

