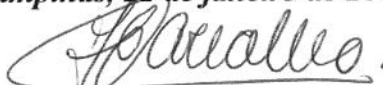


**“OTIMIZAÇÃO, ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E
ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA VIOLACEÍNA OBTIDA
POR PROCESSO FERMENTATIVO”**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia do Farmacêutico Armando Semedo Mendes.

Campinas, 22 de janeiro de 2002.



Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho
- Orientador -

CAMPINAS

2002

ARMANDO SEMEDO MENDES

**“OTIMIZAÇÃO, ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E
ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA VIOLACEÍNA OBTIDA
POR PROCESSO FERMENTATIVO”**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção
do título de Mestre em Farmacologia.*

ORIENTADOR: PROF. DR. JOÃO ERNESTO DE CARVALHO

CAMPINAS

2002

20224702

UNIDADE FE
Nº CHAMADA T/UNICAMP
M5220
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 49388
PROC 16-837102
C _____ D X
PREÇO R\$ 14,00
DATA 05/06/02
Nº CPD _____

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM00168297-9

BIB ID 242714

M5220j

Mendes, Armando Smedo

“Otimização, isolamento, identificação e atividade antiproliferativa da violaceína obtida por processo fermentativo” / Armando Smedo Mendes. Campinas, SP : [s.n.], 2002.

Orientador : João Ernesto de Carvalho

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Biodiversidade. 2. Medicamentos. 3. Microrganismos. 4. Produtos naturais. 5. Indústria farmacêutica. 6. Fermentação. 7. Análise multivariada. 8. Planejamento experimental. 9. *Chromobacterium violaceum*. I. João Ernesto de Carvalho. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho

Membros:

1. Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho _____
2. Prof. Dra. Mary Ann Foglio _____
3. Prof. Dra. Teresa Césare Vidaurre _____

**Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Faculdade de
Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.**

Data: 22/01/2002

À minha esposa, Glenys Mabel, que me deu todo o incentivo psicológico para que voltasse a estudar, pelo seu apoio financeiro e pela sua visão sempre objetiva e peculiar de ver o mundo foram de grande ajuda para a realização deste trabalho.

Aos meus dois filhos Alan e Alex para que se lembrem no futuro que a realização de um sonho não é algo impossível, mas apenas trabalhoso.

Aos meus pais, Leonel e Vivina, que sempre procuraram fazer o melhor por seus filhos.

Ao meu irmão João Carlos, que sempre me apoiou nos estudos.

Ao orientador e amigo Prof. João Ernesto de Carvalho que acreditou em minha pessoa e sempre me deu o maior apoio, e ao longo dessa tese sempre procurou abrir portas para que o trabalho chegasse ao seu final.

Ao Prof. Nelson Duran, do Instituto de Química, que permitiu que eu trabalhasse com a bactéria *Chromobacterium violaceum*. Isto permitiu que eu entendesse a lógica do ciclo tecnológico da produção de novos medicamentos a partir de microrganismos. O seu espírito crítico e científico me ensinou a encarar desafios para os quais não temos as respostas.

Ao Prof. Roy E. Bruns, do Instituto de Química, pela sua paciência e oportunidade de compartilhar sua experiência de vida profissional, a qual me ajudou a entender como utilizar métodos científicos para resolver problemas na vida real.

Ao Prof. Pedro Volpe, do Instituto de Química, por sua amizade, confiança e o apoio principalmente no primeiro ano de tese, que foi importante para que eu me reencontrasse. Agradeço por ter colocado o seu laboratório sempre a disposição. Aos colegas Alexandre, Ricardo Belchior e Denise pelo coleguismo e apoio.

Ao meu amigo Prof. Ricardo de Sousa Pereira pelo apoio acadêmico inicial e sua incansável persistência, qualidade forte de sua pessoa, que eu admiro muito. Quero agradecer-lhe por ter me apresentado ao Prof. Pedro Volpe e ao Prof. Nelson Duran.

Ao colega Daniel Rettori por nossas longas discussões científicas que foram de muita ajuda para o desenvolvimento técnico deste trabalho. A sua observação detalhista e sua empolgação pela ciência me ajudaram a ver como resolver problemas técnicos na prática.

A coordenadora Marta Cristina da divisão de microbiologia do CPQBA, pela oportunidade de permitir que o processo de otimização fosse desenvolvido em seu laboratório. Quero agradecer também ao Alexandre Nunes e Edilberto Portugal por todo o apoio e companheirismo.

Ao colega Adilson Sartoratto da divisão de química orgânica e farmacêutica do CPQBA, por permitir que as análises de espectroscopia fossem realizadas em seu laboratório.

A coordenadora Mary Ann da divisão de fitoquímica do CPQBA, por permitir que o processo de purificação fosse realizado em seu laboratório. Quero agradecer também a Carmen Lucia e Rodney Rodrigues por todo o apoio.

A colega Luciana Kohn da divisão de farmacologia e toxicologia do CPQBA, pela ajuda na realização dos ensaios de atividade antiproliferativa. Agradecimentos também a Ana Possenti e Márcia Aparecida por todo o apoio.

A Nádia Regina coordenadora da divisão de resíduos do CPQBA, por permitir o uso da centrífuga, utilizada inicialmente no processo de extração.

Ao Prof. Carlos Grosso da Faculdade de Engenharia de Alimentos por permitir que parte do processo de extração fosse realizado nesta unidade.

Ao meu amigo Marcelo Montovani por nossas discussões noturnas no IQ, sendo que nesta época ele nem sonhava em trabalhar com a *Chromobacterium violaceum*. Quero agradecer por sua ajuda e colaboração na parte de caracterização e análise.

A Profa. Teresa Cesare e Profa. Niurca Almeida pela amizade e ajuda na parte de compreensão do funcionamento de planejamentos experimentais.

A Maria Helena da Silva ("Marlene"), por cuidar dos meus filhos Alan e Alex sempre com muito amor e carinho, permitindo que eu dedicasse mais tempo a tese.

Esta tese não teria sido possível se todas essas pessoas e outras que por esquecimento, não foram listadas, não tivessem participado direta ou indiretamente.

ÍNDICE

	Pag.
Lista de figuras.....	xv
Lista de tabelas	xix
Lista de abreviaturas.....	xxi
Resumo.....	xxiii
Summary.....	xxv
1 Introdução.....	27
2 Revisão Bibliográfica.....	31
2.1 Evolução da descoberta de drogas.....	33
2.2 Biodiversidade e a moderna indústria farmacêutica.....	37
2.3 Microrganismos: Produção industrial e potencial econômico.....	41
2.4 Triagem de produtos bioativos (metabólitos secundários).....	45
2.5 Produtos farmacêuticos produzidos por cultivo de células de alta densidade e celular.....	48
2.6 <i>Chromobacterium violaceum</i>	51
2.7 Produção de violaceína.....	53
2.8 Planejamento experimental.....	57
2.8.1 Planejamento fatorial.....	57
2.8.2 Metodologia de superfície de resposta.....	60
2.9 Visão geral da categoria dos ensaios biológicos de triagem.....	61
2.10. Atividade antiproliferativa.....	62
3 Objetivos	65

4 Material e Métodos.....	69
4.1 Produção de violaceína em frascos agitados.....	71
4.1.1 Microrganismo e manutenção.....	71
4.1.2 Preparação do pré-inóculo e inóculo.....	71
4.1.3 Curva de crescimento do microrganismo (cinética de crescimento).....	72
4.1.4 Dosagem da produção de massa celular e de violaceína bruta.....	72
4.1.5 Análise da produção de violaceína e deoxiviolaceína por HPLC.....	75
4.1.6 Otimização da produção de violaceína.....	76
4.1.6.1 Dosagem da produção celular (MC) e de violaceína bruta (V) nos ensaios de otimização.....	76
4.1.6.2 Ensaio preliminares.....	79
4.1.6.3 Planejamento fatorial fracionário (triagem de variáveis).....	79
4.1.6.4 Análise de superfície de resposta com 5 fatores.....	81
4.1.6.5 Análise de superfície de resposta com 3 fatores.....	82
4.2 Produção, extração, purificação e caracterização da violaceína	82
4.2.1 Produção de violaceína em biorreator	82
4.2.2 Processo de extração da violaceína.....	84
4.2.3 Processo de purificação da violaceína.....	86
4.2.4 Caracterização e análise do extrato semi-purificado de violaceína.....	88
4.3 Testes farmacológicos.....	88
4.3.1 Atividade antiproliferativa.....	88
4.3.1.1 Linhagens de células tumorais.....	88
4.3.1.2 Cultura celular.....	89
4.3.1.3 Curva de crescimento para determinação da densidade de inóculo.....	90

4.3.1.4	Determinação das curvas concentração-resposta de drogas-padrões.....	90
4.3.1.5	Determinação das curvas concentração-resposta da droga-teste.....	90
4.3.1.6	Diluição da amostra (ESPVC).....	91
4.3.1.7	Ensaio da sulforrodamina-B (SRB).....	91
4.3.1.8	Análise dos resultados.....	91
5	Resultados.....	93
5.1	Otimização do processo de produção da violaceína.....	95
5.1.1	Curva de crescimento do microrganismo (cinética de crescimento).....	95
5.1.2	Análise por HPLC da produção de violaceína e deoxiviolaceína.....	97
5.1.3	Planejamento experimental.....	97
5.1.3.1	Ensaio Preliminares.....	97
5.1.3.2	Planejamento fatorial fracionário (triagem de variáveis).....	103
5.1.3.3	Análise de superfície de resposta com 5 fatores.....	113
5.1.3.3.1	Produção de massa celular g/L (MC).....	115
5.1.3.3.2	Produção de violaceína bruta g/L (V).....	116
5.1.3.4	Análise de superfície de resposta com 3 fatores.....	127
5.1.3.4.1	Produção de massa celular g/L (MC).....	128
5.1.3.4.2	Produção de violaceína bruta g/L (V).....	129
5.2	Produção, extração, purificação e caracterização da violaceína.....	133
5.2.1	Produção de violaceína em biorreator.....	133
5.2.2	Processo de extração da violaceína.....	137
5.2.3	Processo de purificação da violaceína.....	137
5.2.4	Caracterização e análise do ESPCV por EM e HPLC.....	137

5.3	Testes farmacológicos.....	141
5.3.1	Curvas concentração-resposta da droga teste (ESPVC).....	141
6	Discussão.....	143
6.1	Otimização do processo de produção da violaceína.....	145
6.1.1	Curva de crescimento do microrganismo (cinética de crescimento).....	145
6.1.2	Análise por HPLC da produção de violaceína e deoxiviolaceína por HPLC.....	145
6.1.3	Planejamento experimental.....	145
6.1.3.1	Ensaio Preliminares.....	147
6.1.3.2	Planejamento fatorial fracionário (triagem de variáveis).....	148
6.1.3.3	Análise de superfície de resposta com 5 fatores.....	149
6.1.3.4	Análise de superfície de resposta com 3 fatores.....	151
6.2	Produção, extração, purificação e caracterização da violaceína bruta.....	153
6.2.1	Produção de violaceína em biorreator.....	153
6.2.2	Processo de extração da violaceína.....	154
6.2.3	Processo de purificação da violaceína.....	154
6.2.4	Caracterização e análise do ESPVC por EM e HPLC.....	155
6.3	Testes farmacológicos.....	155
6.3.1	Atividade Antiproliferativa.....	155
7	Conclusões.....	157
8	Referências bibliográficas.....	161
9	Sugestões e Perspectivas.....	173
10	Anexos.....	177

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Esquema simplificado do processo de produção de moléculas de origem biológica utilizando células de alta densidade celular.....	50
Figura 2.2: Estrutura molecular da violaceína (R=OH) e deoxiviolaceína (R=H).....	53
Figura 4.1: Fluxograma da determinação de massa celular seca na curva de crescimento celular.....	73
Figura 4.2: Fluxograma da determinação da violaceína bruta na curva de crescimento celular.....	74
Figura 4.3: Fluxograma da determinação da violaceína e deoxiviolaceína por HPLC.....	75
Figura 4.4: Fluxograma da determinação da massa celular nos planejamentos experimentais.....	77
Figura 4.5: Fluxograma da determinação da violaceína bruta nos planejamentos experimentais.....	78
Figura 4.6: Fluxograma da fermentação realizada em biorreator para produção de violaceína.....	83
Figura 4.7: Fluxograma da extração da violaceína a partir do caldo fermentado em biorreator.....	85
Figura 4.8: Fluxograma da etapa de purificação, a partir do extrato alcoólico bruto de violaceína (EABV) até a obtenção do extrato semipurificado de violaceína por cristalização (ESPVC).....	87
Figura 5.1: Cinética de crescimento do <i>C. violaceum</i> em frascos agitados utilizando meio de cultura inicial, com as respectivas curvas de produção de massa celular (MC) e violaceína (V).....	95

Figura 5.2: Efeito do íon Zn^{+2} , DL-metionina e vitamina B ₁₂ sobre a produção de massa celular e violaceína bruta pelo <i>C. violaceum</i> , após 36 h de fermentação	99
Figura 5.3: Efeito da molaridade do tampão fosfato (pH=6,8) sobre a produção de massa celular e violaceína bruta pelo <i>C. violaceum</i> , após 36 h de fermentação; (C = controle).....	101
Figura 5.4: Efeitos das fontes de nitrogênio (sulfato de amônio e uréia) sobre a produção de massa celular e violaceína bruta pelo <i>C. violaceum</i> , após 36 h de fermentação	103
Figura 5.5: Superfície de resposta para produção de MC (g/L), mostra que aumentos nos níveis de extrato de levedura (%) e diminuição nos níveis de peptona (%) levam a aumentos da produção de MC (g/L).....	119
Figura 5.6: Superfície de resposta para produção de V (g/L), mostra que aumentos nos níveis de extrato de levedura (%) levam a aumentos da produção de V (g/L). A peptona não foi estatisticamente significativa nos níveis investigados	119
Figura 5.7: Superfície de resposta para produção de MC (g/L), mostra que o zinco (%) não foi estatisticamente significativo para a produção de MC (g/L). Observar as linhas de contorno paralelas ao eixo do zinco.....	121
Figura 5.8: Superfície de resposta para produção de V (g/L), mostra que aumentos nos níveis de zinco (%) e glicose (%) levam a um aumentos da produção de V (g/L).....	121
Figura 5.9: Superfície de resposta para produção de MC (g/L), mostra que aumentos nos níveis de extrato de levedura (%) e glicose (%) levam a aumentos da produção de MC (g/L).....	123
Figura 5.10: Superfície de resposta para produção de V (g/L), mostra que aumentos nos níveis de extrato de levedura (%) e glicose (%) levam a aumentos da produção de V (g/L).....	123

Figura 5.11: Superfície de resposta para produção de MC (g/L), mostra que o triptofano não foi estatisticamente significativo para a produção de MC (g/L). Observar as linhas de contorno quase paralelas ao eixo do triptofano.....	125
Figura 5.12: Superfície de resposta para produção de V (g/L), mostra que o triptofano (%) apresentou um efeito significativo e positivo para a produção de V (g/L).....	125
Figura 5.13: Superfície de resposta para produção de MC (g/L), mostra que apenas o extrato de levedura foi significativo para a produção de MC (g/L). Observar as linhas de contorno quase paralelas ao eixo da glicose.....	131
Figura 5.14: Superfície de resposta para produção de V (g/L), mostra que aumentos nos níveis de extrato de levedura (%) e diminuição nos níveis de glicose (%) levam a aumentos na produção de V (g/L).....	131
Figura 5.15: Fermentação em biorreator do <i>C. violaceum</i> utilizando o meio de cultura otimizado em Shaker, com suas respectivas curvas de produção de MC e V obtidas por dosagem off-line.....	135
Figura 5.16: Espectro de massas (ME) do ESPVC obtidas no espectrômetro Massa VG Autospec MICROMAR 70 eV. Os picos 327 e 343 correspondem a deoxiviolaceína e violaceína, respectivamente.....	139
Figura 5.17: Cromatograma do ESPVC obtida por HPLC. O maior pico, com tempo de retenção de 3.54, corresponde ao da violaceína. Embora existam impurezas, estas estão em quantidades muito pequenas.....	139
Figura 5.18: Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do ESPVC sobre as linhagens tumorais humanas após 48 h de exposição.....	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Produção de violaceína em meio de cultura líquido.....	56
Tabela 2.2: Produção de violaceína em meio de cultura sólido.....	56
Tabela 4.1: Linhagens celulares utilizada nos ensaios de atividade antiproliferativa.....	89
Tabela 5.1: Análise por HPLC da produção de violaceína e deoxiviolaceína ao longo da curva de cinética de crescimento do <i>C. violaceum</i>	97
Tabela 5.2: Resultado dos ensaios preliminares em relação a massa celular, violaceína bruta e pH, após 36 h de fermentação pelo <i>C. violaceum</i>	98
Tabela 5.3: Planejamento fatorial fracionário de resolução III (2^{15-11}) e a matriz de planejamento utilizado na triagem de variáveis.....	105
Tabela 5.4: Contrastes calculados na fração 2^{15-11} , para a resposta produção MC (g/L)....	106
Tabela 5.5: Dados da produção de MC (g/L) realizados em duplicata no processo de triagem e suas respectivas médias, variância (S^2) e graus de liberdade (ν_i) ...	107
Tabela 5.6: Contrastes calculados na fração 2^{15-11} , para a resposta produção V (g/L).....	109
Tabela 5.7: Dados da produção de V (g/L) realizados em duplicata no processo de triagem e suas respectivas médias, variância (S^2) e graus de liberdade (ν_i).....	110
Tabela 5.8: Contrastes significativos estatisticamente ao nível de confiança de 95% para produção de MC (g/L) e V (g/L), obtidos a partir dos dados da Tabela 5.3.....	112
Tabela 5.9: Matriz do planejamento experimental com cinco fatores, 2^5 , e os resultados para produção de MC e V, após 36 h de fermentação.....	114

Tabela 5.10: Análise de variância (ANOVA) para o ajuste do modelo linear da produção de MC (g/L) em relação aos dados da Tabela 5.9.....	115
Tabela 5.11: Análise de variância (ANOVA) para o ajuste do modelo linear da produção V (g/L) referente aos dados da tabela 5.9.....	117
Tabela 5.12: Matriz do planejamento experimental com três fatores, 2^3 , e os resultados para produção de MC e V, após 36 h de fermentação.....	127
Tabela 5.13: Análise de variância (ANOVA) para o ajuste do modelo linear da produção de MC (g/L) referente aos dados da tabela 5.12.....	128
Tabela 5.14: Análise de variância (ANOVA) para o ajuste do modelo linear da produção V (g/L), referente aos dados da Tabela 5.12.....	130
Tabela 5.15: Produção de MC e V pelo <i>C. violaceum</i> em biorreator. Os dados desta tabela referem-se as variáveis que foram monitoradas durante o tempo de fermentação.....	133
Tabela 5.16: Comparação da produção de MC (g/L) e V (g/L), realizada por fermentação em shaker (meio inicial e otimizado) e em biorreator.....	135
Tabela 5.17: Rendimento percentual do extrato bruto seco obtido nos três lotes de extração.....	137

LISTA DE ABREVIATURAS

t = tonelada

MQ_R = Média quadrática de regressão.

MQ_r = Média quadrática dos resíduos.

SQ_R = Soma quadrática de regressão.

SQ_r = Soma quadrática dos resíduos.

SQ_{faj} = Soma quadrática devido à falta de ajuste.

SQ_{ep} = Soma quadrática devido ao erro puro.

ν_i = número de graus de liberdade.

S^2 = variância

S_p^2 = variância agregada

S = desvio padrão

ef = efeitos que correspondem aos fatores reais (colunas de 1 a 11, Tabela 6.3).

efv = efeitos que correspondem aos fatores virtuais (colunas de 12 a 15, Tabela 6.3).

EBV = extrato bruto de violaceína.

EABV = extrato alcoólico bruto de violaceína.

EASPV = extrato alcoólico semipurificado de violaceína.

ESPV = extrato semipurificado de violaceína.

ESPVC = extrato semipurificado de violaceína por cristalização.

MC = massa celular seca (g/L)

V = violaceína bruta (g/L)

Viol. = violaceína.

Deox. = deoxiviolaceína.

CE = eletroforese capilar

GC = cromatografia gasosa

LC = cromatografia líquida

MS = espectro de massas

NMR = ressonância magnética nuclear

UV = ultravioleta

HTS = high-throughput screening

RPMI = meio de cultura RPMI 1640

HPLC = high pressure liquid chromatography

Resumo

A violaceína é um pigmento produzido pela bactéria *Chromobacterium violaceum* e estudada por vários grupos de pesquisadores mundialmente, sendo já relatada as seguintes atividades biológicas para este pigmento: bactericida (Durán 1990), tripanocida (Caldas *et al.* 1978; Durán *et al.* 1989; Durán & Haun, 1991), anti-viral (May *et al.* 1991), tumoricida (Durán *et al.* 1996), atividade citotóxica em células de mamíferos (Durán *et al.* 1989; Haun *et al.* 1992), antioxidante (De Azevedo *et al.* 2000), indução de apoptose (Melo *et al.* 2000) e antifúngica (Shirata *et al.* 2000). No entanto, no atual estágio de desenvolvimento, ela ainda não entrou na fase clínica.

O requerimento nutricional da *C. violaceum* necessário para aumentar a produção de violaceína tem sido estudado desde 1913 utilizando técnicas clássicas univariadas. Ao longo das décadas um número de fatores nutricionais foram relatados como sendo importantes para a produção de violaceína, tais como glicose (Kimmel & Maier 1969, Duran *et al.* 1994), extrato de levedura, DL-metionina, vitamina B12, peptona (DeMoss & Happel 1959), Zn^{+2} (Hoshino & Yamamoto 1997), L-triptofano (DeMoss & Evans 1959, Kimmel & Maier 1969), temperatura, agitação, pH (DeMoss & Evans 1959, Riveros *et al.* 1989) entre outros. Além dos fatores físicos e nutricionais, a produção de violaceína pelo *C. violaceum*, depende da cepa utilizada e existem poucos trabalhos que relatam a produção volumétrica ($nmol\ mL^{-1}\ h^{-1}$) deste pigmento. A cepa ATCC 553 utilizada por DeMoss & Happel (1959) tinha uma taxa de produção de violaceína de $0,47\ nmol\ mL^{-1}\ h^{-1}$. Riveros *et al.* (1989) utilizou a cepa BB-78 e obteve uma taxa de produção de $4.0\ nmol\ mL^{-1}\ h^{-1}$. A cepa CCT 3496 utilizada neste trabalho tinha uma produção de $13.75\ nmol\ mL^{-1}\ h^{-1}$ antes da otimização. Esses valores podem ser aumentados, contudo a determinação dos níveis dos fatores otimizados por técnicas padrões univariadas nem sempre são possíveis para tais sistemas complexos.

Um dos objetivos deste trabalho foi determinar os valores dos fatores otimizados para aumentar a produção de violaceína e massa celular pela aplicação de grupos de planejamentos planejados estatisticamente. Esses experimentos multivariados são desenhados para reduzir o número de experimentos necessários no processo de otimização e produzir resultados mais

precisos que aqueles obtidos por estratégias univariadas (Barros Neto *et al.* 1996, Box *et al.* 1978). Com utilização de planejamentos estatísticos é possível a otimização de um sistema mesmo quando os mecanismos fundamentais envolvidos no processo de investigação não são conhecidos.

A primeira fase deste trabalho, envolveu um planejamento fracionário ideal para triagem simultânea de fatores, onde foram estudados 11 fatores (glicose, extrato de levedura, peptona, DL-metionina, vitamina B12, L-triptofano, agitação, temperatura, inóculo, Zn^{+2} e pH). Destes 11 fatores, 5 fatores (glicose, extrato de levedura, peptona, L-triptofano e Zn^{+2}) foram considerados como os mais importantes para aumentar a produção simultânea de violaceína e massa celular. Assim, um planejamento composto central de cinco fatores foi utilizado para este propósito. Neste estágio, conseguiu-se aumentar os valores médios de produção de 5,19 g/L (biomassa) e 0,11 g/L (violaceína bruta) no planejamento fracionário para 7,47 g/L (biomassa) e 0,23 g/L (violaceína bruta) utilizando um planejamento composto central com 5 fatores. Com base neste último planejamento, utilizou-se os fatores mais importantes (glicose, L-triptofano e extrato de levedura) e realizou-se um planejamento composto central com três fatores. Como resultado obteve-se 16,59 g/L (biomassa) e 0,36 g/L (violaceína bruta), o que representa um aumento de mais 100% e 50%, respectivamente em relação ao planejamento fracionário.

Este trabalho mostra que aumentos de metabólitos secundários, por qualquer microrganismo, podem ser conseguidos utilizando estas técnicas multivariadas.

A última fase deste trabalho envolveu testes de triagem farmacológica, que foram realizados com oito linhagens de células de tumores sólidos. Estes demonstraram que o extrato semi-purificado de violaceína por cristalização (ESPVC), apresentou efeitos de autocitoproteção celular concentração-dependente, em concentrações acima de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ sobre algumas linhagens celulares, principalmente com relação as células de tumores de mama (NCI-ADR) e de melanoma (UACC62).

Summary

The violacein is a pigment produced by the bacterium *Chromobacterium violaceum* and studied by several groups researcher worldwide, the following pharmacological activities have been described for this pigment: bactericidal (Durán 1990), tripanocidal (Caldas *et al.* 1978; Durán *et al.* 1989; Durán & Haun, 1991), anti-viral (May *et al.* 1991), tumoricidal (Durán *et al.* 1996), activity cytotoxic in cells of mammals (Durán *et al.* 1989; Haun *et al.* 1992), antioxidant (De Azevedo *et al.* 2000), apoptosis induction (Melo *et al.* 2000) and anti-fungal (Shirata *et al.* 2000). However, the drug development stage has yet to enter clinical studies.

The nutritional requirements of *C. violaceum* necessary to increase violacein production has been studied since 1913 using classical univariate techniques. Along these decades a large number of nutritional factors and physical parameters have been reported as being important for the violacein production, such as glucose (Kimmel & Maier 1969, Duran *et al.* 1994), yeast extract, DL-methionine, vitamin B₁₂, peptone (DeMoss & Happel 1959), Zn⁺² (Hoshino & Yamamoto 1997), L-tryptophan (DeMoss & Evans 1959, Kimmel & Maier 1969), temperature, agitation, pH (DeMoss & Evans 1959, Riveros *et al.* 1989) among others. Besides physical and nutritional factors, the violacein production by *C. violaceum*, depends on the strain used and few studies relate the volumetric production (nmol mL⁻¹ h⁻¹) of this pigment. The ATCC 553 strain used by DeMoss & Happel (1959) has a 0,47 nmol mL⁻¹ h⁻¹ rate of violacein production. Riveros *et al.* (1989) used a BB-78 strain and obtained a 4.0 nmol mL⁻¹ h⁻¹ production rate. The CCT 3496 strain used in this work had a 13.75 nmol mL⁻¹ h⁻¹ production rate before optimization. These values can be increased, however the determination optimized factor levels by standard univariate techniques is not always feasible for such complex system.

One of the aims of this work was to determine optimized values in order to increase violacein yield employing statistically planned experiments groups. These multivariate experiments are designed to reduce the number of experiments necessary in the optimization process and to produce more precise results than those obtained by univariate strategies

(Barros Neto *et al.* 1996, Box *et al.* 1978). Statistical designs result in successful optimizations even if a fundamental understanding of the mechanisms involved in the process under investigation is lacking.

The first stage of this work, involved a fractional design ideal for simultaneous factor screening. In this work eleven factors were studied (glucose, yeast extract, peptone, DL-methionine, vitamin B₁₂, L-tryptophan, agitation, temperature, inoculum, Zn⁺² and pH). Of these, 5 factors (glucose, yeast extract, peptone, L-tryptophan and Zn⁺²) were considered as the most important to increase the simultaneous production of violacein and cellular mass. For this purpose a central composition design of five factors was used. In this stage, an increase of production medium values of 5,19 g/L (biomass) and 0,11 g/L (crude violacein) in the fractional design for 7,47 g/L (biomass) and 0,23 g/L (crude violacein) using a central composite design with 5 factors was used. Based on the most promising factor levels (glucose, L-tryptophan and yeast extract) found for this factors, a final central composition design considering only three factors were used. As result an 100% yield of biomass was obtained (16,59 g/L) and 50% of crude violacein (0,36 g/L) employing fractional planning.

This work showed that these multivariant techniques increases secondary metabolites production with any microorganism employed.

The last stage of this work involved pharmacological screening with eight lineages solid tumors strains. These demonstrated that the semi-purified violacein extracts (ESPVC), revealed concentration-dependent cellular autocytoprotective effect, for concentrations above 0,25 mg/mL on some cellular strains, mainly on mamma tumors (NCI-ADR) and of melanoma strains(UACC62).

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O processo de desenvolvimento de um fármaco é um processo complexo e muito dinâmico que envolve várias áreas do conhecimento, sendo este desenvolvido de forma multidisciplinar.

O ciclo tecnológico da produção de um medicamento compreende a parte de pesquisa, industrialização e dispensação. O setor de pesquisa e industrialização absorve 2/3 de toda a mão de obra. Para dar uma idéia deste potencial podemos citar o Parque Industrial Höchst, na Alemanha, onde existem dezenas de microempresas (empresas filhas), que produzem matérias primas e vendem para as empresas maiores (empresas mães), a qual realiza seu controle de qualidade (http://www.infraserv.com/en/home_infraserv.htm). Algo similar ao que existe nos EUA, em relação à indústria microeletrônica, no vale do silício.

No Brasil, até início da década de 90, o parque industrial farmacêutico era composto de aproximadamente umas 600 empresas, onde 80% correspondiam à indústria nacional. No entanto, as empresas nacionais (80%) ficavam apenas com 20% da fatia correspondente ao faturamento anual das vendas de medicamentos em todo território nacional. Devemos lembrar que mais de 90% das empresas nacionais apenas importam a matéria prima, manipulam o produto, embalam e vendem. Portanto, não trabalham com pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos.

Este contexto ajuda a explicar, em parte, por que 80% dos profissionais de pós-graduação estão no Brasil dentro das universidades e apenas 20% trabalham fora delas. Nos países de primeiro mundo essa proporção é inversa.

No entanto, a situação tecnológica do país neste início de século permite que algo seja feito para mudar um pouco este quadro. Por exemplo, o Brasil está entre os poucos países que realiza sequenciamento genético de microrganismos e gemonia humano, através de uma rede articulada de laboratórios (rede ONSA e a rede Federal) (Época 2001). Uma outra rede de 16 laboratórios está se formando, Rede de Biologia Estrutural – SMOLBnet, para o estudo tridimensional das proteínas (Pesquisa FAPESP 2001). Estas duas etapas têm por objetivo a determinação de alvos moleculares. A etapa final é a busca de moléculas (sintéticas ou

oriundas da natureza) para interagir com estes alvos. As moléculas bem sucedidas tornar-se-ão fármacos.

Dentro deste contexto, a revisão bibliográfica desta tese teve como objetivo mostrar que os microrganismos têm um grande potencial para gerar biodiversidade molecular e um grande potencial econômico. Alguns artigos de autores estrangeiros chegam a afirmar que a indústria farmacêutica, de primeiro mundo, não necessita mais da biodiversidade no paradigma da descoberta de drogas (Cordell 2000). No entanto, devemos lembrar que os países de primeiro mundo possuem pouca biodiversidade, e este fato os força a buscar fontes alternativas de biodiversidade molecular, como por exemplo utilizando química combinatória. O Brasil embora não tenha toda a tecnologia dos países desenvolvidos na criação de biodiversidade molecular artificial, tem a maior biodiversidade natural do planeta. Sendo assim, devemos olhar para o nosso estágio de desenvolvimento e aproveitar este legado da natureza (biodiversidade), para realizar uma sábia exploração molecular (biodiversidade molecular) que poderá gerar uma grande quantidade de fármacos. Isto é perfeitamente possível se os diversos grupos de pesquisa existentes no país, conseguirem trabalhar de forma articulada (idem projeto genoma brasileiro – rede ONSA) procurando encontrar soluções de acordo com a nossa realidade.

Este trabalho limitou-se a otimização da violaceína, um metabólito secundário produzido pela bactéria *Chromobacterium violaceum*, sua extração, purificação, caracterização e atividade antiproliferativa (ensaio de citotoxicidade).

A metodologia utilizada neste trabalho permite, em um curto período de tempo (2-3 meses), aumentar a produção de um determinado metabólito secundário produzido por qualquer microrganismo. Isso é de extrema importância, pois permite a obtenção destes metabólitos secundários em quantidades suficientes para que os estudos multidisciplinares possam utiliza-los em ensaios biológicos variados e futuramente, as drogas com potencial farmacológico, poderam tornar-se fármacos.

Revisão Bibliográfica

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Evolução da descoberta de drogas

Um esforço interdisciplinar entre as indústrias de base e a pesquisa de drogas não tem mais do que um século. A pesquisa de drogas, como nós conhecemos hoje, iniciou quando a química tinha alcançado um grau de maturidade que permitiu aplicar princípios e métodos para resolver problemas fora da área química e quando a farmacologia se tornou uma disciplina bem definida (Drews 2000).

A teoria do benzeno deu um importante impulso à pesquisa de derivados de “coaltar”, particularmente de tintas. Por sua vez, a evolução das tintas-químicas teve uma profunda influência sobre a medicina. A afinidade seletiva das tintas por tecidos biológicos levou Paul Ehrlich, um estudante de medicina (1872 a 1874), a postular a existência de quimiorreceptores. Ele descobriu que certo tipo de corante era capaz de destruir certas bactérias patogênicas. Depois de 605 tentativas fracassadas, sua 606^a experiência foi bem sucedida: conseguiu sintetizar uma substância capaz de destruir o *Treponema pallidum*. Ehrlich afirmou mais tarde que certos quimiorreceptores de parasitas e microrganismos poderiam ser diferentes, a partir de estruturas análogas, nos tecidos de cada ser vivo e que essas diferenças poderiam ser exploradas terapêuticamente. Isto constituiu o nascimento da quimioterapia (Drews 2000).

O desenvolvimento da química analítica, em particular isolamento e purificação de ingredientes ativos de plantas medicinais no século 19, permitiu às farmácias a padronização de preparações, embora fossem ainda impuras.

A farmacologia teve sua origem em experimentos fisiológicos de François Magendie e Claude Bernard, os quais reivindicaram um lugar desta área dentro das ciências médicas. Sobre a liderança de Oswald Schmiedeberg, o Instituto de Farmacologia da Universidade de Strasbourg projetou muitos dos intelectuais e a base experimental da farmacologia no período de 1871 e 1918 (Kochweser & Schechter 1978). Contudo, nenhuma das instituições

(farmácias, laboratórios universitários ou companhias químicas de produtos de tintas) apoiaram este esforço embrionário, embora representassem apropriadamente a base para a pesquisa de novas drogas emergentes que era conduzida pela química, mas progressivamente controlada pela farmacologia e pelas ciências médicas. Novas instituições tiveram que ser criadas para apoiar a pesquisa e desenvolvimento interdisciplinar de drogas. Foram criadas divisões farmacêuticas dentro de companhias químicas e/ou de tintas. Um novo caminho de descobrimentos, caracterização e desenvolvimento de medicamentos levou a formação de uma nova indústria, conhecida hoje como indústria farmacêutica (Drews 2000, <http://www.archive.hoechst.com>).

Em 1928, Alexander Fleming descobre a penicilina. Uma década mais tarde, a penicilina tornou-se um agente terapêutico sistêmico graças às brilhantes pesquisas de um grupo de pesquisadores da Universidade de Oxford, dirigidas por Florey, Chain e Abraham. Apesar dos grandes obstáculos para sua produção laboratorial, acumulou-se uma quantidade suficiente para realizar, em 1941, várias provas terapêuticas em pacientes enfermos com infecções estafilocócicas e estreptocócicas refratárias a qualquer outra terapia. Nessa fase, apenas cerca de 10% da penicilina era pura, sendo necessários quase 100 litros de caldo fermentado, em que crescia o fungo, para obter-se quantidade suficiente do antibiótico para tratar um paciente durante 24 h. (Gilman *et al.* 1987). Em 1944, Moyer e Coghill pesquisadores da Regional Research Laboratories descobriram, que a cultura submersa em extrato de milho aumentava a produção de penicilina em mais de 1000% (Korolkovas & Burckhalter 1982). Entre 1877 e 1939, além da penicilina, um grande número de substâncias foram descritas na literatura científica. Devido a sua eficácia e baixa toxicidade, a penicilina tornou-se um dos antibióticos mais utilizados, abrindo assim as portas para uma nova era na terapêutica de infecções bacterianas. Depois da descoberta da penicilina e consequentemente de outros antibióticos, muitas indústrias de medicamentos estabeleceram departamentos de microbiologia e unidades de fermentação, as quais adicionaram sua competência tecnológica. Poucas foram as companhias que não participaram da pesquisa por novos antibióticos. Algumas indústrias, como por exemplo, Merck, Sandoz e Takeda, direcionaram sua capacidade microbiológica para o descobrimento de drogas com outras propriedades farmacológicas ou quimioterápicas (Drews 2000)

A bioquímica influenciou a pesquisa de drogas em muitos caminhos. O importante conceito introduzido pela bioquímica foi que enzimas e receptores, achados empiricamente, são bons alvos para drogas. A idéia do receptor como local de ligação seletivo para agentes quimioterápicos, foi inicialmente proposto por Paul Ehrlich (1872 e 1874). O conceito atual de que o receptor serve como uma "tomada" que recebe e gera sinais específicos e pode ser bloqueado por antagonistas, e estimulado por agonistas, foi introduzido na farmacologia por J. N. Langley em 1905. Um importante passo nessa direção foi dado por R. P. Ahlquist em seu artigo sobre receptores adrenotrópicos no qual propôs a existência de dois tipos de receptores adrenérgicos. A caracterização farmacológica dos receptores em quase todos os órgãos, incluindo o cérebro, forneceu a base para a diversidade do grande número de drogas: β -bloqueadores, β -agonistas, benzodiazepínicos e anticorpos monoclonais. Durante a primeira metade do século XX a pesquisa de drogas foi formada e enriquecida por muitas novas tecnologias, e isso foi fundamental para o desenvolvimento de drogas e da terapêutica (Drews 2000).

A exploração organizada de microrganismos como fonte de diversidade química teve início nos anos 40 e 50. Durante este período, programas de triagem para identificar substâncias ativas microbianas foram bem sucedidas na identificação de muitos antibióticos tais como cefalosporina, tetraciclina e aminoglicosídeos. A pesquisa de metabólitos microbianos com outras atividades biológicas iniciou no final dos anos 60 com o desenvolvimento de ensaios para o descobrimento de inibidores de enzima de origem microbiana. Isso levou a descoberta de muitos compostos incluindo o ácido clavulônico (antibiótico) e mevinolina (anti-hipercolesterolêmico) que são amplamente utilizados na terapêutica atual. Outros produtos farmacologicamente importantes são o imunossupressor ciclosporina A e FK506. O número de metabólitos microbianos não-antibióticos, tais como agentes imunomoduladores, agonistas e antagonistas de receptores, promotores de crescimento de animais, inibidores de enzima, imunossupresores, antiparkinsonianos, antihistamínicos, hipotensivos, antihiperlipêmicos, hipoglicemiantes, hipocolesterolêmico, vasodilatador, entre outros, têm aumentado constantemente desde o início dos anos 70 e nos anos 90 ultrapassou o número de antibióticos descritos (Hill *et al.* 1998; Demain 1999).

Existe atualmente uma tendência da indústria farmacêutica internacional em direcionar sua linha de pesquisa para tecnologias como genoma humano (proteoma) (Burley *et al.* 1999; Service 2000; Garcia 1998; Holmes 1999), química combinatória e triagem de alto desempenho. Essas tecnologias têm um custo muito alto e nem sempre acessíveis para países em desenvolvimento. No entanto os avanços na biotecnologia e o rápido progresso do projeto genoma humano estão fornecendo o acesso a um grande número de novos alvos moleculares para as diversas doenças humanas (Santos 1999). Assim, alvos biológicos e ensaios de alta velocidade estão deixando de ser um problema para a indústria farmacêutica no paradigma da descoberta de novas drogas (Malakoff 2000; Vogel 2000; Drews 2000). O gargalo atual, está em encontrar diversidade química para ser utilizada nesses ensaios. Essa diversidade química pode ser produzida sinteticamente (p.e., via química combinatória (Borman 2000; Dixit *et al.* 1998; Leitão *et al.* 2000; DeWitt *et al.* 1993), planejamento racional de drogas (Polikarpov & Hwa 1999; Burley *et al.* 1999; Agnew 2000) ou procurada na natureza pela triagem de produtos naturais. Até o presente, as bibliotecas de compostos gerados pela química combinatória são as maiores fontes para os programas de triagem de alto desempenho (*do inglês*, high-throughput screening - HTS) nos programas de descoberta de drogas. No entanto, a natureza tem provado ser uma excelente fonte de novas e inovadoras drogas. Os metabólitos secundários a partir de microrganismos mostraram uma fantástica diversidade estrutural que complementa os compostos sintetizados quimicamente, ou as bibliotecas nos programas de descoberta de drogas (Schmid *et al.* 1999; Shu 1998). Apesar de todo o desenvolvimento na área química, a indústria não esqueceu os produtos naturais, por causa de sua imensa diversidade molecular e consequentemente seu potencial econômico (Terlau *et al.* 2000).

Uma pesquisa realizada entre 150 representantes de companhias e institutos de pesquisa, teve como objetivo saber quais os principais fatores que poderão influenciar a indústria na demanda por fontes genéticas. Os dois principais fatores que aparecem para determinar se a demanda comercial para acesso irá aumentar ou diminuir no futuro são o desenvolvimentos em ciência e tecnologia e as tendências na legislação e na política de cada país fornecedor de fontes genéticas. Ao mesmo tempo, muitas companhias acreditam que a legislação e a política poderá resultar em uma diminuição de demanda (Kate & Laird 2000).

No entanto, a diversidade biológica mundial está distribuída em proporção inversa da capacidade tecnológica e científica dos países, sendo o Brasil o país detentor da maior diversidade biológica. É por isso que há uma preocupação tão grande dos países de primeiro mundo com a preservação da Amazônia e outros santuários brasileiros e de outras partes do planeta. A necessidade para acessar essas fontes genéticas para as indústrias do primeiro mundo e a necessidade de conservação dessas fontes (biodiversidade) fez a comunidade internacional realizar em 1992 uma convenção sobre diversidade biológica, denominada "Convention on Biological Diversity" (CBD), tendo como objetivo facilitar o acesso da indústria às fontes genéticas e sua conservação (Kate & Laird 2000) e em 1993 uma outra reunião intitulada, "Trade-Related Intellectual Property Rights" (TRIPs) foi realizada para discutir sobre o direito de patente dessas fontes (Bhat 1999; Albagli 1998).

Neste contexto, o legado das fontes naturais (genéticas) poderão gerar um desenvolvimento sustentado, no Brasil, se houver uma preocupação na exploração e racionalização da pesquisa direcionada aos produtos naturais. Os microrganismos apresentam hoje um papel chave na área de biotecnologia e representam uma grande fonte de diversidade molecular (metabólitos secundários) e consequentemente de grande valor econômico.

2.2 Biodiversidade e a moderna indústria farmacêutica

"As fontes genéticas" - material biológico de valor potencial que contém as unidades funcionais de hereditariedade - formam a base de uma significativa fatia da atividade econômica do mundo. Uma estimativa grosseira do mercado global anual em relação aos produtos produzidos a partir de fontes genéticas encontram-se entre US\$ 500 e US\$ 800 bilhões, sendo o setor farmacêutico estimado entre US\$ 75 a US\$ 150 bilhões. O faturamento bruto total das indústrias farmacêuticas em 1997 foi estimado em US\$ 300 bilhões, sendo que desse total US\$ 75 bilhões são representados pelos produtos de origem natural. Tem-se demonstrado que a contribuição dos produtos naturais para as vendas das companhias farmacêuticas líderes mundiais variam de 10% a mais de 50%. (Kate & Laird 2000).

A falta de valorização dos produtos naturais como fonte importante de drogas aprovadas nos E.U.A. foi ressaltada pela publicação de vários trabalhos nos últimos anos. Por exemplo, mais de 25% das prescrições médicas dos E.U.A. em 1973 continham ingredientes ativos derivados de plantas, enquanto 13,3% e 2,7% eram derivadas de fontes microbianas e animais, respectivamente. Essas proporções foram constantes por um período de 15 anos, de 1959 a 1973 (Farnsworth & Morris 1976). Um outro estudo analisou as 150 drogas mais prescritas no sistema de saúde dos E.U.A. (US National Prescription Audit) no período de janeiro a setembro de 1993. O estudo revelou que 57% das receitas prescritas continham pelo menos um composto ativo principal ou um composto derivado a partir da diversidade biológica (Kate & Laird 2000). Cragg e colaboradores analisaram as novas drogas aprovadas pela FDA nos E.U.A. ou entidades comparáveis em outros países entre 1985 e 1995, objetivando as áreas de câncer e doenças infecciosas. Das 87 drogas para câncer aprovadas até 1994, 62% são de origem natural ou modelada a partir de produtos naturais, sendo que 13,8% eram de origem microbiológica; para 299 drogas anti-câncer em estágio de desenvolvimento pré-clínico ou clínico no período de 1989 a 1995, o número foi de 61%, sendo 11,4% de origem microbiológica. (Cragg *et al.* 1997).

Nos anos recentes, a pesquisa de produtos naturais pela indústria farmacêutica tende a priorizar compostos derivados de bactérias e fungos em razão da grande diversidade de espécies, fácil cultivo e também por que se um composto apresenta atividade, geralmente é possível manipular o microrganismo para permitir a produção do composto desejado. As plantas, comparadas com a maioria das drogas produzidas pelos microrganismos na indústria, são freqüentemente difíceis e caras para se produzir em larga escala. Todas as maiores companhias de medicamentos fazem triagem de bactérias, fungos e também compostos sintéticos (Strobel & Long 1998; Young 1999).

A Merck tem desenvolvido muitos medicamentos oriundos de produtos naturais ao longo dos anos incluindo Zocor[®] (sinvastatina, anti-lipêmico), Mevacor[®] (Lovastatina, anti-colesterolêmico), Mefoxin[®] (cefotaxima sódica, antibiótico), Primaxin[®] e Ivermectin[®] (Ivermectina, acaricida). Todos esses fármacos têm sido derivados de microrganismos. A diversidade microbiológica é enorme e somente a ponta do “iceberg” tem sido arranhada.

Tem sido estimado que somente 5000 bactérias tenham sido identificadas de um total aproximadamente de mais de 40.000 e cerca de 72.000 fungos são conhecidos de um total de aproximadamente 1.500.000 (Cordell 2000). A Merck trabalha em colaborações dentro e fora dos E.U.A. com o objetivo de coletar produtos naturais de microrganismos. A empresa mantém departamentos de produtos naturais em Rahway, New Jersey e Madri onde triagens de alto desempenho pesquisam milhares de extratos por ano (Young 1999).

A Glaxo, outra gigante no mercado, também mantém vários laboratórios espalhados pelo mundo, sendo que o seu departamento de P&D consciente da crescente preocupação sobre a conservação da biodiversidade, implementou em 1992 uma política para plantas e ampliou em 1993, para incluir todos os produtos de fontes naturais (Turner 1996).

No início da década de 90 foi criado o “International Cooperative Biodiversity Groups” (ICBG) que reúne institutos de pesquisa, universidades e indústrias farmacêuticas norte americanas, com o objetivo de realizar bioprospecção de produtos naturais em países tais como, Suriname, Peru, Costa Rica, Panamá, Camarões, Nigéria, Chile, Argentina e México. O ICBG utiliza as universidades, institutos de pesquisa e até a indústria farmacêutica desses países para coleta de amostras ou preparação de extratos da biodiversidade local, de forma randômica ou orientada a alvo, sendo a pesquisa de triagem realizada pelas universidades e indústrias farmacêuticas norte americanas, como por exemplo Virginia Tech, Bristol-Myers Squibb, Searle & Research & Development (setor farmacêutico da Monsanto), Universidade de Washington (D.C.), entre outros (Seidl 1999; Kursar *et al.* 1999). A segunda fase do programa do ICBG foi iniciada em 1998, adicionando o estudo de microrganismos entofitos (*do inglês*, “endophytes”) em alguns países (Argentina, Chile e México) como fonte potencial de novas drogas. (Timmermann *et al.* 1999).

A multinacional farmacêutica Novartis atua no Brasil, especificamente na Amazônia, em busca da diversidade molecular dos produtos naturais, através do projeto BioAmazonas. No entanto, o acesso aos recursos genéticos da Amazônia têm sido tema debatido em diversos fóruns do país, e a comunidade científica entende que a prospecção de microrganismos na Amazônia por uma multinacional é lesivo aos interesses do Brasil (Ferreira 2000).

Para dar uma idéia do potencial da biodiversidade, podemos citar o estudo realizado em 1992 sobre a diversidade de microfungos nas florestas tropicais da Costa Rica. De quatro amostras coletadas (5 g cada amostra), de locais diferentes, foram isolados 1709 microfungos sendo que a média por amostra de microfungos encontrada foi igual a 424. Notar que não estão incluídos as bactérias e outros microrganismos. Um representante de cada microrganismo foi enviado para a coleção de culturas do laboratório farmacêutico Merck (Merck Microbial Resources Culture Collection) e para o U.S. National Fungus Collections (BPI) (Bills & Polishook 1994).

Está claro que muitos microrganismos ainda não foram estudados e podem servir como uma grande fonte potencial de estruturas importantes. Na última década, muitas companhias prepararam-se para explorar produtos naturais, como a PharmuMar, Aquaculture Technology e a ChromaXome concentrou-se sobre produtos naturais a partir de organismos marinhos. Muitas outras companhias, tais como Ecopia Biosciences, Diversa, Microgenomics, Ambergene e Terragem Diversity estão aplicando técnicas de clonagem no esforço de conseguir os assim chamados microrganismos "não-cultiváveis" (os quais são estimados por serem 95 a 99% da existência de microrganismos.) (Rouhi 1999; Young 1999; Relman 1999).

Nos últimos 40 anos, o interesse em acessar a biodiversidade para desenvolvimento farmacêutico têm sido cíclico. Aumentou nos anos 60 com o sucesso dos antibióticos e dos agentes anti-tumorais que foram descobertos na natureza, depois declinou nos anos 70 com o advento da tecnologia do DNA recombinante e farmacologia molecular, e aumentou novamente nos anos 80, com as tecnologias robóticas de triagem de alto desempenho que podem explorar milhares de amostras por ano (Kate & Laird 2000; Cragg 1997).

A pesquisa de microrganismos é liderada pelos países desenvolvidos. Um trabalho realizado no período de 1991-1997, com 550 espécies de eucariotos em 142 países mostra que mais de 87% das publicações são realizadas pelo oeste da europa (39,7%), América do norte (34,72%) e Ásia (13,35%), sendo a porcentagem da América Latina restrita a 2,3%. A porcentagem da pesquisa microbiológica, em relação à América Latina, vem aumentando de modo significativo nas ultimas décadas. A produtividade científica dobrou entre 1991 e 1997, mostrando um grande aumento na região. Cerca de 80% das publicações são realizadas pelo

Brasil, Argentina, Chile e México. O estudo mostra também que apesar da ampla diversidade microbiana a maioria das pesquisas são direcionadas a um número limitado de microrganismos, principalmente patógenos humanos. (Gávez *et al.* 1998).

O investimento das grandes indústrias, como exemplo a Rhodia (Beydon *et al.* 2000), Merck (Dufresne 2000), Eli Lilly (Higgs *et al.* 2001) e outras companhias líderes do mercado farmacêutico mundial, no aprimoramento de técnicas e integração de conhecimento microbiológico (Larsen *et al.* 1997) na virada do século, vem confirmar a preocupação da indústria com a diversidade molecular a partir de produtos naturais como importante fonte de modelos de moléculas para o desenvolvimento de novas drogas. Os produtos naturais irão permanecer como importantes fontes de novas drogas e estruturas e a indústria sabe disso. O desafio da indústria agora é tornar a triagem de produtos naturais (diversidade molecular) tão eficiente quanto a química combinatória (Schmid *et al.* 1999; Shu 1998).

2.3 Microrganismos: Produção industrial e potencial econômico

O primeiro objetivo do pesquisador é encontrar um organismo cuja produção do metabólito desejado não seja bem regulada. Tais organismos são achados por seleção em bancos de culturas ou isolados a partir da natureza. Uma vez escolhido o microrganismo, determinam-se parâmetros físicos e nutricionais para otimizar o seu crescimento e produção. Os mecanismos regulatórios incluem indução, regulação por retroalimentação e regulação de catabólitos. Estes devem ser explorados e otimizados através da manipulação que envolvem nutrição e engenharia genética, isto é, a cepa escolhida deve ser desregulada pelo meio ambiente, geneticamente, ou por ambos. Depois dessa desregulação, o produto tradicional da fermentação industrial pode ser produzido de uma maneira econômica. Produtos semelhantes incluem metabólitos primários, metabólitos secundários, enzimas, e a própria biomassa celular (Demain 1981).

Fermentação de Metabólitos Primários: Metabólitos primários podem ser definidos como compostos de baixo peso molecular (< 1500 daltons) necessários para o crescimento e substratos para síntese de macromoléculas essenciais ou para sua conversão em

coenzimas. Os intermediários na via de biossíntese desses produtos finais são também metabólitos primários. Aminoácidos, os nucleotídeos purinas e pirimidinas, vitaminas, solventes, e ácidos orgânicos estão entre os mais importantes para a indústria. Uma superprodução de metabólitos primários é normalmente evitada, por ser um processo esbanjador que diminui a habilidade de sobrevivência. De qualquer forma, alguns organismos conseguem sobreviver na natureza com aberrações em seus mecanismos regulatórios, e essas são as cepas selecionadas no programa de triagem. As cepas isoladas constituem o ponto de partida para o melhoramento do microrganismo (Demain 1981).

Aminoácidos e nucleotídeos são produzidos por processos fermentativos, sendo a produção de aminoácidos de aproximadamente 1 milhão de t/ano, representando um mercado de \$3 bilhões de dólares. O principal aminoácido comercial é o L-glutamato monossódico, um flavorizante com produção de 800.000 t/ano. A L-Lisina, usada para fins nutricionais, é produzida por fermentação a 30.000 t/ano. Cerca de 3.000 t flavorizante nucleotídeo 5'-purina (ácidos inosínico e guanilínico) são produzidos a cada ano (Hols *et al.* 1999).

Algumas fermentações de metabólitos primários são bloqueadas na presença de metais (Fe^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} ...). Por exemplo, ácido cítrico produzido pelo *Aspergillus niger* (175.000 t/ano) depende da ausência de ferro (II) e manganês (II) e possivelmente zinco (II). O fator chave na produção de ácido fumárico pelo *Rhizopus nigricans*, é a ausência de zinco (II). Por isso é importante incluir os micronutrientes nos ensaios de otimização (Demain 1981; Lee *et al.* 2000)

A combinação da manipulação nutricional e genética têm levado a incríveis níveis de superprodução de metabólitos primários. A riboflavina (vitamina B2) foi produzida comercialmente por muitos anos pelos métodos de síntese química e fermentação, mas atualmente é produzida principalmente por fermentação. A superprodução de riboflavina (20 g / L) pelo *Ashbya gossypii* é 40.000 vezes maior do que o microrganismo necessita para seu crescimento; no caso da vitamina B₁₂ produzida pela *Pseudomonas denitrificans*, o fator é 50.000 (Demain 1981; Demain 2000a).

Fermentação de Metabólitos Secundários: metabólitos secundários podem ser definidos como moléculas de baixo peso molecular não requeridas para o crescimento em uma

cultura pura. Os metabólitos microbiológicos secundários apresentam estrutura muito variada. As vias secundárias do metabolismo, nas diferentes formas de vida, levam a centenas de biomoléculas altamente especializadas como pigmentos, como é o caso da violaceína, nucleotídeos, toxinas, antibióticos, alcalóides e fatores de crescimento de plantas, os quais têm uma enorme importância econômica. Os metabólitos são produzidos por grupos taxonômicos restritos e são muitas vezes encontrados como uma mistura de compostos químicos de estrutura química relacionada, pertencentes a uma mesma família química. A habilidade de produção é determinada por mutação espontânea (ou perda de plasmídeo) assim a maioria dos mutantes apresentam uma habilidade inferior de produção (Demain 1981, Lehninger 1984)

Entre o grupo dos metabólitos secundários, os antibióticos são os mais bem conhecidos formando um grupo heterogêneo de moléculas biologicamente ativas com estrutura e modos de ação variados. Essas moléculas atuam através de interações com um grande número de alvos microbianos, tais como DNA, RNA, síntese protéica, funções de membrana, transporte de elétrons, esporulação, germinação e muitos outros. Entre 1990 e 1994, mais de 1.000 novos metabólitos secundários foram caracterizados somente a partir de actinomicetos (Sanglier *et al.* 1996). Em relação aos antibióticos, cerca de 6.000 foram já descritos, 4.000 somente a partir dos actinomicetos, e continuam ainda sendo descobertos à uma taxa de cerca de 500 por ano. Algumas cepas, tais como *Streptomyces griseus* e *B. subtilis* são extremamente produtivas, cada uma produzindo mais de 40 e 60 antibióticos diferentes, respectivamente. No mundo dos antibióticos bem sucedidos, o gênero *Streptomyces* é o principal, produzindo mais de 200 antibióticos, como por exemplo, o ác. clavulônico (Demain 2000a). Por volta de 1974 haviam mais de 20.000 penicilinas semissintéticas, 4000 cefalosporinas, 2.500 tetraciclina, 1.000 rifamicinas, 500 kanamicinas e 500 cloranfenicóis preparados. O mercado de antibióticos inclui cerca de 160 antibióticos e derivados, com um faturamento superior a U\$ 28 bilhões de dólares (Bentley 1999). Os antibióticos, penicilina-G natural e a penicilina-V biossintética, têm um mercado de U\$ 4,4 bilhões de dólares, enquanto várias penicilinas e cefalosporinas semissintéticas representam um mercado de U\$ 11 bilhões de dólares (Demain 2000a). O precursor semissintético das penicilinas, o ácido 6-aminopenicillânico (6-APA), tem uma produção anual de 9.000 t (Lalonde 1997). De 7.350 t de 6-APA 48% foram usados para produção de ampicilina e 27% para produção de

amoxicilina. Uma única cefalosporina semissintética, ceftriaxona (rocefin) tem um mercado de US\$ 1 bilhão de dólares. O mercado das tetraciclina é de US\$ 1,4 bilhões e o das eritromicinas de US\$ 3,5 bilhões (McDaniel *et al.* 1999).

Por muitos anos, a maioria dos medicamentos usados para tratar doenças não infecciosas foram estritamente sintéticos. Do mesmo modo, os medicamentos para a maioria das doenças parasitárias não-microbianas em animais (p.e. anti-helmíntico) foram obtidos por triagem de compostos sintéticos, seguidos de modificação molecular. Apesar dos testes de milhares de compostos, somente poucos foram descobertos. Deste modo, os compostos sintéticos com potencial farmacológico tornaram-se cada vez mais difíceis de serem obtidos, tendo os caldos de origem microbiana preenchido esse vazio, aumentando sua importância na terapia de doenças não-infecciosas (Demain 2000a). Podem ser citados alguns compostos de sucesso, tais como o lovastatin e derivados que apresentam atividade anticolesterolêmica produzidos por fungos (Endo 1985).

A matéria-prima dos metabólitos secundários são os metabólitos primários, o qual muitas vezes exercem efeito negativo ou positivo sobre o metabolismo secundário. As ramificações das vias do metabolismo central levam à produção dos metabólitos primários e secundários, sendo que os metabólitos primários muitas vezes interferem na formação dos metabólitos secundários por inibir um passo inicial comum as duas vias, evitando assim, o acúmulo de precursores de metabólitos secundários. Como exemplo temos o *Penicillium chrysogenum*, cuja lisina interfere com a biossíntese da penicilina através da inibição da enzima homocitrato sintetase (Demain 1981).

Mecanismos específicos regulam o início da síntese de antibióticos, o qual é influenciado pelas fontes de carbono, nitrogênio e outros fatores, assim como por mecanismos de indução. Isto foi observado no início do desenvolvimento da penicilina. A rápida utilização da glicose, embora satisfatória para o crescimento, foi um substrato ruim para a produção da mesma. Por outro lado, a lactose causou um baixo crescimento, mas uma excelente produção de penicilina. Ions amônio e aminoácidos de fácil metabolização muitas vezes exercem um efeito negativo na formação dos metabólitos secundários (Aharonowitz 1980). Assim, fontes de nitrogênio de metabolização mais lenta, como por exemplo farinha de

soja, são utilizadas na indústria das fermentações. Fosfatos inorgânicos também exercem um forte efeito negativo nas fermentações de metabólitos secundários (Martin *et al.* 1977). A indução é vista frequentemente em processos de metabolismo secundário, embora na maioria dos casos o mecanismo não tenha sido elucidado.

Além dos tipos específicos de regulação, antes mencionados, o início do metabolismo secundário também é controlado pela taxa de crescimento. Geralmente, metabólitos secundários não são produzidos até próximos à taxa máxima de crescimento; baixas taxas de crescimento são necessárias para induzir o metabolismo secundário. Na verdade, as curvas da produção do metabólitos secundário (idiofase) e de crescimento celular (tropofase) podem ser alteradas quando baixas taxas de crescimento são usadas (Aharonowitz & Demain 1980).

A pesquisa por novos antibióticos continua visando combater a evolução de patógenos resistentes; melhorar as propriedades farmacológicas; combater tumores, viroses e parasitas; descobrir compostos mais seguros, mais potentes e de amplo espectro. Muitos produtos recentes foram obtidos por modificações moleculares de antibióticos naturais pela via semissintética.

A genética tem contribuído, ao longo da história, para a produção de metabólitos secundários microbianos. O enorme aumento na produtividade das fermentações e redução nos custos têm sido conseguidos principalmente pela utilização de mutagenesis e triagem por cepas microbianas de alta produtividade (Demain 2000a).

2.4 Triagem de produtos bioativos (metabólitos secundários)

Com o objetivo de otimizar a busca por princípios ativos de maneira racional, a indústria farmacêutica redirecionou, nos anos 80, todo o processo de seleção de produtos bioativos, no que se denominou de “busca racional de drogas” pelo uso de fracionamento guiado por bioensaios específicos para enzimas, receptores, DNA, etc. Dentro deste modelo, uma indústria farmacêutica de grande porte selecionava em média, cerca de 5.000 substâncias por ano. Nos anos 90, com o advento da química combinatória e bioensaios em larga escala

(do inglês, high-throughput screening – HTS), os programas de descoberta de novos fármacos mudaram radicalmente. Hoje, um programa de HTS pode testar o mesmo número de substâncias (cerca de 1 milhão por ano) em apenas um dia (Montanari *et al.* 2001). Novos sistemas, chamados de “Ultra High-Throughput Screening” (UHTS), estão em desenvolvimento e terão a capacidade de processar 100.000 amostras por dia (cerca de 35 milhões por ano). Devido ao crescente interesse pelas tecnologias HTS, foi criada a Society for Biomolecular Screening (Burres 1997).

A dificuldade técnica relacionada ao isolamento e elucidação da estrutura dos produtos naturais bioativos, estão sendo solucionados através da contribuição dada pelas pesquisas de produtos naturais. Por exemplo, o extrato pode ser processado antes de ser usado em bioensaios para remover muitos dos compostos reativos que são provavelmente a causa de resultados falso-positivos (p.e. processos de filtração). O fracionamento dos extratos que são ativos na triagem pode ser realizado por vários métodos, tais como cromatografia de coluna, por separação de fases ou mais rapidamente usando-se cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), ou utilizando o interfaciamento dos equipamentos, tais como GC-MS, LC-MS, CE-MS, LC-NMR e LC-UV-MS-NMR, que permitem a rápida caracterização de componentes do extrato bruto (Hostettmann *et al.* 1997). A completa elucidação da estrutura de moléculas complexas em miligramas de amostras é agora uma realidade (Hadden & Martin 1998). A comparação dos espectros dos compostos isolados em bibliotecas espectrais de compostos, permite a identificação de novos compostos, eliminando os já conhecidos, que podem então ser ensaiados em bioensaios automatizados (HTS). O procedimento completo partindo-se de um extrato ativo em relação a uma determinada molécula pode levar alguns dias ao invés de muitos meses (Harvey 1999). Recentemente, pesquisadores do laboratório Eli Lilly publicaram um método para triagem de metabólitos secundários a partir de extratos microbianos, que são mais rápidos que os utilizados por HPLC. Esse novo método leva apenas 1 min para analisar uma amostra de extrato (Higgs *et al.* 2001).

No entanto, o fato de ser encontrada uma molécula-protótipo (molécula com potencial farmacológico) não significa que ela irá virar um fármaco. Rotineiramente, 40% das supostas drogas candidatas são rejeitadas por possuírem uma farmacocinética pobre. Há compostos que não têm bom desempenho em relação à absorção, distribuição, metabolização,

ou excreção. Outros 11% são eliminados a partir de um pool de candidatos quando mostram efeitos tóxicos em animais. Há um esforço da indústria atual para eliminar os compostos indesejáveis antes que eles terminem a triagem clínica, ou aqueles que irão dar muita mão-de-obra nos estágios iniciais de triagem. Isso irá significar redução de gastos sem aumento do tempo de desenvolvimento e avaliação. Além do mais, a maioria dos compostos não passa para triagem na fase II, estágio onde a droga é avaliada por sua eficácia e segurança em humanos. Muitas dessas taxas de interrupção são ocasionadas por problemas ADME/Tox (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade). Segundo a “Pharmaceutical Research and Manufactures of Americam” (PhRMA), das 5.000 a 10.000 drogas candidatas, apenas uma passa para a fase de testes pré-clínicos e clínicos e é submetida a aprovação da FDA para comercialização (<http://www.phrma.gov/>). A droga ideal é aquela administrada por via oral, com absorção através das células especializadas do intestino, alcançando e atuando no seu alvo. A absorção é dependente da solubilidade e peso molecular assim como da permeabilidade, a qual requer que a droga seja hidrossolúvel o suficiente para passar através da membrana celular. Muitas drogas são subsequenteiramente metabolizadas no fígado antes de serem excretadas (Brennan 2000)

As regras desenvolvidas pelos pesquisadores do centro de pesquisas da indústria farmacêutica Pfizer, Lipinski e colaboradores (1997), têm sido amplamente adotados pelas indústrias farmacêuticas como padrão de comparação para triagem, retirando os compostos que provavelmente apresentem baixa solubilidade. Compostos que quebram essas regras normalmente têm propriedades hidrofóbicas e solubilidade inaceitáveis. Existem algumas exceções, como por exemplo pequena porcentagem de drogas que são transportadas através da parede intestinal através de proteínas transportadoras. Mas a maioria das drogas (é estimado 90%) são absorvidas no intestino delgado via gradiente de concentração (transporte passivo). As pesquisas atuais sobre absorção estão dando uma grande importância a compostos que apresentam transporte passivo.

Outra razão é relatada pelo experimento baseado em estrutura. Quando os químicos conhecem muito sobre a estrutura molecular do alvo, os compostos que eles desenham normalmente apresentam pobre permeabilidade, segundo Lipinski. O mesmo reconhece que um número de “outlier” pode ser convertido em bons candidatos de drogas pelo trabalho de

reduzir seus tamanhos ou manipular outras propriedades. Mas provavelmente ter-se-á que trabalhar muito duro para fazer isso. A regra geral é que, quanto mais longe das variações das propriedades aceitáveis, mais duro será o trabalho a ser realizado (Lipinski 2000).

Os produtos naturais são de grande interesse por que parecem que fornecem, por triagem randômica, uma diversidade estrutural maior que a fornecida pela maioria do enfoque combinatório disponível baseado em compostos heterocíclicos. Além disso, muitos produtos naturais são relativamente pequenos (> 1000 Da), e eles podem ser absorvidos e metabolizados (*do inglês*, drug-like). Naturalmente, compostos com potencial encontrados em triagens de produtos naturais podem ser otimizados por química tradicional ou pela aplicação do enfoque combinatório (Harvey 1999).

Os microrganismos associados às plantas, chamados de endofitos (*do inglês*, “endophytes”) tipicamente bactérias e fungos (Lu *et al.* 2000; Ragot *et al.* 1998), podem representar um nicho microbiológico para triagem de microrganismos com potencial farmacológico. A diversidade da flora no Brasil associada à riqueza bioquímica dos endofitos, que são de fácil acesso e cultivo (fermentabilidade), podem significar grande fonte de diversidade molecular com potencial farmacológico. (Strobel & Long 1998; Kursar 1999; Metz 2000).

2.5 Produtos farmacêuticos produzidos por cultivo de células de alta densidade celular

Produtos farmacêuticos biotecnológicos, como por exemplo genes recombinantes de origem humana, expressados em microrganismos ou células de fermentação, representam uma das áreas de maior crescimento em biotecnologia. A pesquisa das fermentações tem como meta o desenvolvimento de métodos para melhorar a expressão de produtos farmacêuticos com atividade biológica, e para produzi-los a um custo mais competitivo, por exemplo com alta produtividade (Kleman & Strohl 1994). O principal objetivo da fermentação, à nível de pesquisa acadêmica e na indústria, é maximizar a produtividade volumétrica ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$), isto é,

obter a maior quantidade de produto em um dado volume dentro de um certo tempo. Células de alta densidade são um pré-requisito para a alta produtividade (Riesenbergs & Guthke 1999).

Inúmeros fatores devem ser considerados na otimização da produtividade de proteínas recombinantes utilizando fermentações, tais como: o organismo hospedeiro; o local de acumulação do produto recombinante (intracelular, extracelular); a estratégia molecular para maximizar a expressão do gene; as condições de fermentação.

A abordagem tradicional para aumentar ambos, densidade celular e produtividade, tem sido otimizar o crescimento natural em relação a composição do meio de crescimento, parâmetros físicos (pH, temperatura, e agitação), e condições de indução. Uma meta diferente de otimização pode ser o aumento de nutrientes importantes para o crescimento, para evitar a degradação do produto, ou para diminuir a formação de produtos tóxicos. Balanços adequados de nutrientes tais como fontes de carbono/energia, nitrogênio e, especialmente, micronutrientes tais como vitaminas e elementos traços, são importantes para o sucesso das fermentações de alta densidade celular (FADCs), especialmente naqueles onde a proteína recombinante é expressada (Kleman & Strohl 1994).

Os principais organismos utilizados normalmente na indústria para produção de produtos terapêuticos recombinantes são células de *E. coli*, *S. cerevisiae*, e células de ovário de hamster Chinês. Estas células são as mais utilizadas, pelo menos nos E.U.A., devido a grande quantidade de conhecimento de dados já avaliados, desses organismos hospedeiros, pela FDA (Food and Drug Administration). Outras leveduras como *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris*, estão sendo mais comumente utilizadas como células hospedeira para produção de proteínas heterólogas. A alta densidade celular e a alta produtividade dessas leveduras, indica que estes organismos têm um excelente potencial como organismos hospedeiros recombinantes (Kleman & Strol 1994).

O número total de drogas protéicas, em grande parte proteínas recombinantes e anticorpos monoclonais que são chamadas de drogas "biotecnológicas", são atualmente mais de 76. Os produtos biotecnológicos foram responsáveis por 15 entre as 57 drogas introduzidas no mercado mundial (26,3%), em 1998 (Drews 2000).

Planejamentos experimentais (multivariados) têm demonstrado ser ferramentas de grande utilidade na otimização de metabólitos secundários (Gouveia *et al.* 200; Kempf *et al.* 1999) e podem ser aplicados em relação às células hospedeiras para expressar genes recombinantes humanos ou genes de outros organismos, como ilustrado na Figura 2.1.

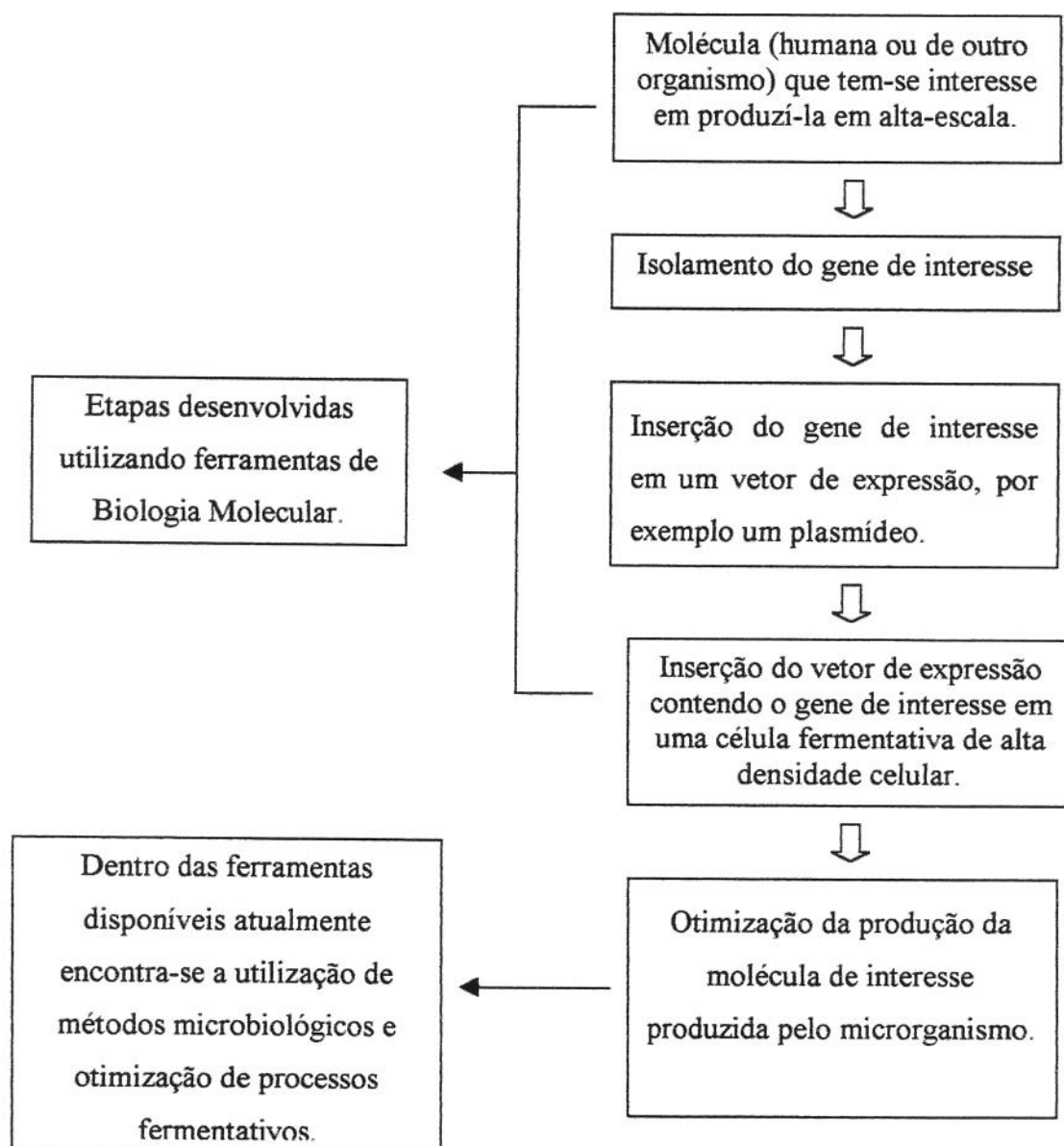


Figura 2.1 Esquema simplificado do processo de produção de moléculas de origem biológicas utilizando células de alta densidade celular.

Algumas companhias tais como Ariad, Diversa and Oceanix têm relatado a aplicação de técnicas de clonagem para essa finalidade. Essas companhias têm desenvolvido vetores que permitem a incorporação de grandes fragmentos de DNA a partir de bactérias do solo não-cultiváveis, que podem ser expressos em células hospedeiras, tais como *E. coli*. É esperado que esses grandes fragmentos de DNA (até 300 kb) incluam os códigos dos genes necessários para a biossíntese de pequenas moléculas e uma vez cultivados em bactérias hospedeiras, poderão produzir interessantes produtos naturais, os quais poderão ser extraídos e testados (Young 1999).

2.6 *Chromobacterium violaceum*

Bergonzini publicou a descoberta de uma nova bactéria colorida em 1881. No mesmo ano, Zimmerman corrige a grafia da palavra *Cromobacterium* dada por Bergonzini, para *Chromobacterium*. Hoje, a descrição do gênero *Chromobacterium*, feita por Sneath, é a que se encontra no "Manual de Bacteriologia Sistemática Bergey' S" (Rettori 1996).

A *Chromobacterium violaceum* é considerada uma bactéria saprófita não patogênica, que se encontra em amostras de solo e água de regiões tropicais e subtropicais. A *Chromobacterium* caracteriza-se pela forma de bastonetes Gram negativos, oxidase positiva, catalase positiva, aeróbia facultativa e móveis por flagelos (Melo 1996). O potencial patogênico deste microrganismo foi descrito pela primeira vez por Wooley em 1905, ao identificar a *C. violaceum* como a responsável pela morte de "búfalos d'água" por septicemia, nas Filipinas (Rettori 1996).

O primeiro caso reportado de infecção em humanos ocorreu na Malásia em 1927 e, desde então, houve aproximadamente 30 casos reportados em todo o mundo (Hassan *et al.* 1993). Alguns casos ocorreram em Cuba, Taiwan, Estados Unidos, Vietnã, Nigéria, Brasil, Argentina e Austrália. Na maioria dos casos, os indivíduos morrem de forma rápida e de septicemia (Ballows *et al.* 1992).

Petrillo chama a atenção para o fato da *C. violaceum* ser encontrada com tanta frequência na natureza, mas causando poucas infecções graves em humanos. Após uma análise de indivíduos infectados e diagnosticados nos E.U.A., concluiu-se que a *C. violaceum* é um agente patogênico de baixo grau, capaz de causar infecções severas em pacientes imunodeprimidos (Petrillo *et al.* 1984). No entanto, estas observações são questionáveis, uma vez que foi descrita uma infecção severa com *C. violaceum* em uma criança de 12 anos, que não apresentava imunodepressão (Durán *et al.* 2001).

Os cientistas Kidder e Stuart em 1939, e Burbank em 1942, reportaram suas observações sobre protozoários ciliados, que eram rapidamente mortos quando expostos à culturas de *C. violaceum*. À princípio, a suspeita foi de que a violaceína era responsável, mas depois passou-se a suspeitar do cianeto, que é um metabólito normalmente formado pela *C. violaceum* em meio de cultura simples (De Moss 1967).

Segundo Lichstein & Vandesand (1945), o cientista Singh reportou em 1942 que ao adicionar extrato bruto de violaceína à suspensões de bactérias, estas não mais eram ingeridas por amebas terrestres.

Mas foram os cientistas Lichstein e Van de Sand, em 1945, que fizeram o primeiro estudo abrangente das propriedades antibióticas da violaceína. Até aquela data haviam sido reportadas mortes por septicemia devido à *C. violaceum*, de três 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, 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 mostram que a violaceína possuía marcante efeito inibitório no crescimento de bactérias Gram-positivas, e pequeno efeito nas Gram-negativas (Lichstein & Van de Sand 1945; De Moss 1967). Estudos posteriores da atividade antibacteriana com violaceína purificada mostraram que esse composto é igualmente eficiente contra os dois grupos (Durán 1990).

No Brasil, a *C. violaceum* só foi descoberta quase um século depois. Em abril de 1976, na estação de água da cidade de Manaus (Amazonas) foi recolhido uma amostra de água proveniente de uma profundidade de 30 metros. O objetivo era realizar uma análise bacteriológica dessa amostra, e os resultados indicaram a presença de apenas dois tipos

diferentes de colônias bacterianas: colônias brancas e violetas. As violetas foram identificadas pelo Prof. Wilson Chagas de Araujo (UFRJ) como sendo a *C. violaceum*. Foi a primeira vez que se isolou e estudou esse microrganismo no Brasil (Durán *et al.* 2001).

Hoje, a violaceína é estudada por vários grupos de pesquisadores a nível mundial, sendo já relatada as seguintes atividades biológicas para este pigmento: bactericida (Durán 1990), tripanocida (Caldas *et al.* 1978; Durán *et al.* 1989; Durán & Haun, 1991), anti-viral (May *et al.* 1991), tumoricida (Durán *et al.* 1996), atividade citotóxica em células de mamíferos (Durán *et al.* 1989; Haun *et al.* 1992), antioxidante (De Azevedo *et al.* 2000), indução de apoptose (Melo *et al.* 2000) e antifúngica (Shirata *et al.* 2000).

2.2 Produção de violaceína

O isolamento e purificação do pigmento produzido pela bactéria tem sido objeto de estudo desde 1913. Investigadores como Hartley (1913), Reilly & Pyne (1927), Tobie (1934), Wrede & Rothaas (1934), Sartory *et al.* (1938), Strong (1944), Riveros (1989) e Rettori & Durán (1998) dentre outros, foram progressivamente aumentando o grau de pureza do pigmento isolado até sua cristalização. Enquanto a violaceína (Fig. 2.2) apresentava-se de cor

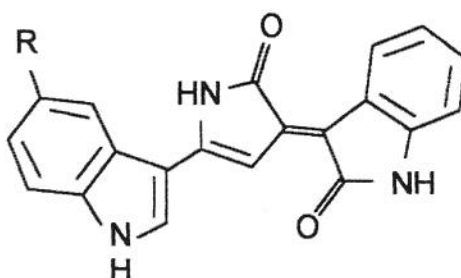


Figura 2.2 Estrutura molecular da violaceína (R = OH) e deoxiviolaceína (R = H)

violeta, o pigmento minoritário era púrpura. À partir dos dados de caracterização apresentados por Ballantine *et al.* (1958b), foi deduzido que o produto majoritário era violaceína e o minoritário deoxi violaceína.

A elucidação da estrutura da violaceína iniciou-se com os estudos de Ballantine *et al.* (1958a), sendo deduzida a partir de degradação e posterior síntese do composto. Estes estudos foram confirmados por dados espectroscópicos apresentados por Laatsch & Thonson (1984).

Através de experimentos de incorporação de triptofano radioativamente marcado, De Moss e Evans (1960) concluíram que, com exceção do grupo carboxílico do L-triptofano, todo o restante da molécula era incorporado intacto à estrutura da violaceína.

Os estudos sobre a biossíntese da violaceína foram reiniciados na década de 80 (Hoshino & Takano 1987; Hoshino & Kondo 1987; Riveros 1989) e se estendem até a atualidade. Ao longo desses anos foi demonstrado que todos os átomos de hidrogênio, nitrogênio e carbono que compõem a violaceína são derivados exclusivamente do L-triptofano e, dos átomos de oxigênio provenientes do oxigênio molecular (Hoshino e Ogasawara 1990; Rouhi & Hoshino 1999; Ruhul Momen & Hoshino 2000)

O efeito do L-triptofano sobre a biossíntese da violaceína em diferentes cepas de *C. violaceum* foi estudado por Kimmel & Maier (1969). Estes observaram que para as nove cepas estudadas, a adição de L-triptofano e de glicose ao meio de cultura aumentava consideravelmente a produção do pigmento. Além disso, a violaceína podia ser sintetizada em um hidrolisado de caseína, deficiente em triptofano, indicando que outros aminoácidos podem substituir o requerimento de L-triptofano para a produção do pigmento. Constataram ainda que todas as cepas eram anaeróbias facultativas para o crescimento celular e aeróbias estritas para a produção de violaceína.

Hoshino & Kondo (1987), constataram que a adição de 25 mg (0,0025%) de L-triptofano em 1000 mL de meio de cultura aumentou a produção do pigmento em cerca de 1,5 vezes.

No início da década de noventa Pemberton *et al.* (1991) conseguiram isolar e clonar um "cluster" de cromossomos da *C. violaceum*, responsável pela biossíntese da violaceína. Este "cluster" foi clonado em *Escherichia coli*, que adquiriu a propriedade de biossintetizar a

violaceína. Foi concluído que assim como na *C. violaceum*, a bactéria clonada não produzia o pigmento na ausência de oxigênio. O estudo da clonagem e sequenciamento do genoma da *C. violaceum* foi iniciado em 1989 e será o próximo microrganismo a ser sequenciado no Brasil, por um consórcio nacional de 35 laboratórios. Estima-se que a bactéria tenha cerca de 2,7 mil genes (Durán *et al.* 2001; Mansur & Segatto 2001).

DeMoss & Evans (1959) verificaram que a substituição do tampão veronal ou tris-(hydroxymethyl)aminometano por tampão fosfato à pH 8, resultou numa ligeira diferença na taxa de biossíntese de violaceína, enquanto o borato inibiu em 80% a produção do referido metabólito.

O fato da adição de Vitamina B₁₂ não ser requerida para o rápido crescimento do *C. violaceum* na presença de metionina, sugere sua essencialidade na biossíntese deste aminoácido. As mesmas observações implicam que a B₁₂ é sintetizada pela bactéria, porém numa taxa muito baixa. O microrganismo irá de fato crescer em meio CV (meio de cultura sintético) na ausência ou de metionina ou vit-B₁₂, mas o crescimento é iniciado somente após 7 a 10 dias (DeMoss & Happel 1959).

O estudo do requerimento nutricional do *C. violaceum* demonstrou que as formas D e L-metionina ou a vitamina B₁₂ são requeridas para o crescimento. Sob certas condições, a formação de ambos os pigmentos e o crescimento são lineares em função da concentração da vitamina B₁₂ (DeMoss & Happel 1959). Os autores concluíram também que o extrato de levedura apresenta uma atividade de crescimento de 2,64 vezes em relação ao controle.

As oxigenases normalmente requerem cofatores tais como NADH, NADPH, FMN ou FAD. Desses cofatores, NADPH foi o mais efetivo para produção de violaceína, em sistema livre de células. Em baixas concentrações de NADH (2 mM), a taxa de conversão foi cerca de trinta vezes mais baixa quando comparada com NADPH, enquanto que em altas concentrações (10 mM), a taxa aumentou acima de 6% para uso do NADPH e 3% para o uso do NADH, indicando que o cofator nicotinamida é requerido e a eficácia do NADPH é muito mais alta que o NADH. Além disso, foi observado que o Zn⁺² apresenta uma atividade 3,10 vezes em

relação ao controle na síntese de violaceína, utilizando células lisadas com ultra-som (sistema livre de células) (Hoshino & Yamamoto 1997).

Corpe (1951) descreveu a técnica para isolamento de *C. violaceum* usando meio seletivo, onde amostras de solo em água destilada eram colocadas em placas de Petri. Grãos de arroz pré-cozido eram espalhados sobre a superfície da amostra em teste e as placas incubadas à 23°C - 25°C durante 5 dias. Ao final do período de incubação, alguns dos grãos de arroz estavam parcialmente recobertos com pontuações violetas, indicando a presença de *Chromobacterium sp.* O princípio da seletividade do meio de enriquecimento não é conhecido,

Tabela 2.1 Produção de violaceína em meio de cultura líquido.

<i>Meio de cultura</i>	<i>Violaceína (μmol/L)</i>
Caldo Nutriente (glicose)	10,87 ± 1,06
Caldo Tioglicolato	8,73 ± 1,23
Caldo Manitol	6,12 ± 1,16
Caldo de Batata	2,66 ± 1,02

Fonte: Antônio (1994)

Tabela 2.2 Produção de violaceína em meio de cultura sólido.

<i>Meio de cultura</i>	<i>violaceína (μmol/L)</i>
Ágar nutriente (glicose)	87,50 ± 1,64
Ágar Batata	96,21 ± 1,83
Ágar tioglicolato	189,00 ± 2,02
Ágar manitol	203,37 ± 2,02
Grãos de arroz	435,00 ± 2,45

Fonte: Antônio (1994)

contudo o uso de polissacarídeos como principal fonte de energia pode ser significativo mas foram infrutíferas as tentativas preliminares para identificar um fator específico que aumentasse a produção do pigmento no arroz (DeMoss 1967).

Vários estudos têm sido realizados sobre o efeito da fonte de carbono no crescimento celular e na biossíntese do pigmento, entre eles glicose, glicerol, frutose, manitol, lactose, tioglicolato, amido e sacarose (Strong 1944; DeMoss 1967; Sivendra & Lo 1975; Antônio, 1994). Antônio (1994) constatou um aumento do rendimento na produção de violaceína, em meio sólido (Tabela 2.2), quando comparado ao correspondente meio líquido (Tabela 2.1). Entre os meios líquidos avaliados, o que continha glicose apresentou melhor rendimento, e entre os meios sólidos o grão de arroz pré-cozido foi o melhor.

A produção de violaceína pelo *C. violaceum* depende além dos fatores físicos e nutricionais, da cepa utilizada e existem poucos trabalhos que relatam a produção volumétrica ($\text{nmol mL}^{-1} \text{h}^{-1}$) deste pigmento. A cepa ATCC 553 utilizada por DeMoss & Happel (1959) tinha uma taxa de produção de violaceína de $0,47 \text{ nmol mL}^{-1} \text{h}^{-1}$. Riveros *et al.* (1989) utilizando a cepa BB-78 conseguiram uma taxa de produção de $4,0 \text{ nmol mL}^{-1} \text{h}^{-1}$. A cepa CCT 3496, utilizada neste trabalho, tinha uma taxa de produção de $13,75 \text{ nmol mL}^{-1} \text{h}^{-1}$ ($=0,17 \text{ g L}^{-1}$) antes da otimização. Estes valores podem ser aumentados, mas a determinação dos níveis dos fatores otimizados por técnicas convencionais (univariadas) nem sempre é possível para tais sistemas complexos, principalmente quando estão envolvidos interações entre os fatores.

2.8 Planejamento experimental

2.8.1 Planejamento fatorial

Planejamentos fatoriais podem ser aplicados a qualquer problema independente de sua natureza. Eles servem para estudar processos mecânicos, reações químicas, sistemas biológicos, como por exemplo otimização de fermentações (Zangirolami 1992; Gong & Chen

1998; Gouveia *et al.* 2001), otimização de formulações farmacêuticas (Campisi *et al.* 1998), etc., e também podem varrer todas as possíveis escalas de interesse, desde uma única reação em bancada de laboratório até um processo industrial em larga escala (Barros Neto *et al.* 1996).

Usando planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos, os pesquisadores podem extrair do sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo um número mínimo de experimentos. Além do mais, estes experimentos multivariados apresentam resultados mais precisos que aqueles obtidos por estratégia univariada. A essência de um bom planejamento consiste em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que procuramos. No caso de sistemas biológicos (otimização de metabólitos secundários) podemos partir de um estágio inicial de pouca informação sobre quais são os fatores importantes para a produção do metabólito de interesse. O conhecimento talvez se limite a uma pequena experiência prática ou a alguma informação bibliográfica. Neste caso, a primeira coisa a fazer é realizar uma triagem e descartar as variáveis não-significativas, para não perder mais tempo e dinheiro com elas no laboratório. O uso de planejamentos fatoriais fracionários é utilizado para fazer isso. Estes planejamentos experimentais são extremamente econômicos e podem ser usados para estudar vinte ou mais fatores ao mesmo tempo (Barros Neto *et al.* 1996).

Para realizar um planejamento fatorial deve-se fixar um número de níveis (n) para cada um dos fatores ou variáveis (k). Realizado os experimentos em todas as condições possíveis, tem-se um plano fatorial completo (n^k). Na maioria dos casos, para os estágios iniciais de experimentação, são utilizados dois níveis para cada variável. Desta forma, um fatorial completo envolvendo 7 variáveis em dois níveis requer 128 ensaios. Este mesmo conjunto de ensaios pode ser realizado de forma a construir planejamentos fracionados realizando-se a metade, um quarto, um oitavo ou um dezesseisavos dos experimentos, perfazendo planos fatoriais fracionados 2^{7-1} , 2^{7-2} , 2^{7-3} e 2^{7-4} onde são realizados 64, 32, 16 e 8 experimentos, respectivamente. Evidentemente que à medida em que o fatorial vai sendo fracionado, diminui-se gradualmente a quantidade de informações obtidas.

Os efeitos principais e os efeitos de interação (antagonismo ou sinergismo entre os fatores) são a diferença entre a resposta média no nível superior e a resposta média no nível inferior. Usando o símbolo (Ef) para representar este efeito, e sendo R_i a resposta média observada no i -ésimo ensaio podemos escrever (Box *et al.* 1978; Barros Neto *et al.* 1996):

$$Ef = \bar{R}_+ - \bar{R}_-$$

A execução de um planejamento fatorial completo 2^{11} , consumiria a realização de 2048 experimentos. Pode-se ter um planejamento fatorial fracionário 2^{15-11} , que corresponde a um planejamento fatorial fracionário 2^4 , que consistirá de apenas 16 experimentos. O ponto forte desses planejamentos fatoriais fracionários é que normalmente obtém-se a informação sobre quais fatores são importantes, realizando-se os 2048 experimentos ou apenas uma fração dos experimentos, como por exemplo 16.

Tendo-se selecionado as variáveis importantes, o próximo passo é avaliar quantitativamente sua influência sobre a(s) resposta(s) de interesse, bem como suas possíveis interações. Para fazer isso com o mínimo de experimentos, pode-se empregar planejamentos fatoriais completos. A obtenção de informação mais detalhada, isto é, obtenção de modelos mais sofisticados, é conseguida pelo emprego da modelagem por mínimos quadrados, como por exemplo na utilização de metodologia de superfície de resposta (Barros Neto *et al.* 1996).

Na vida real, a maioria dos fenômenos podem ser representados utilizando a construção de modelos lineares, quadráticos ou cúbicos. Após a construção do modelo, é feita sua validação. A validação tem por objetivo determinar se o modelo construído representa realmente a situação que se pretende descrever. Só após a validação é que podemos extrair conclusões desses modelos. Esta validação é realizada utilizando-se recursos estatísticos, tais como análise de variância (ANOVA), distribuição normal, distribuição de student (teste-t), teste-F (Barros Neto *et al.*, 1996).

2.8.2 Metodologia de superfície de resposta

A metodologia de superfície de resposta (*do inglês*, Response Surface Methodology – RSM) é uma técnica baseada no emprego de planejamentos fatoriais, introduzida por Box na década de 1950, e desde então tem sido utilizada com muito sucesso na modelagem de diversos processos industriais. A metodologia é constituída de duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. Essas etapas são repetidas tantas vezes quantas forem necessárias, com o objetivo de atingir uma região ótima. O deslocamento se dá sempre ao longo do caminho de máxima inclinação (Barros Neto et al., 1996).

No ponto de rendimento máximo é realizado um novo planejamento fatorial com um ponto central. Para determinar se esta é uma região de interesse, faz-se um teste estatístico ajustando-se as respostas a um modelo linear. A falta de ajuste de um modelo linear determina, como passo seguinte, a tentativa de ajustar um modelo quadrático. O ajuste deste modelo indica que estamos em uma região de interesse. Os ajustes são realizados pelo método dos quadrados mínimos.

Na região de interesse, o planejamento deve ser ampliado para obter-se modelos mais complexos, como por exemplo o modelo quadrático. Esta ampliação pode ser feita de várias formas. A mais comum é conhecida como planejamento estrela. Para fazer um planejamento estrela adiciona-se ao planejamento existente um planejamento idêntico, porém girando de 45 graus em relação à orientação de partida. Acrescenta-se também um ponto central com pelo menos uma repetição para estimativa do erro. Nesta configuração, cada uma das variáveis possui cinco níveis. Os novos pontos experimentais estão a uma distância $\alpha(n_i)^{1/4}$, $n_i = n^\circ$ variáveis, do ponto central. O nível de confiança dos modelos ajustados é determinado pela razão entre as médias quadráticas MQ_R ($SQ_R/\sqrt{i}$) e MQ_T ($SQ_T/\sqrt{i}$), obtido da tabela de análise de variância (ANOVA). Esta relação (MQ_R / MQ_T), segue uma distribuição F:

$$MQ_R / MQ_T \approx F_{a, b}$$

onde a e b são os números de graus de liberdade da média quadrática devido à regressão e da média quadrática residual, respectivamente (Box *et al.* 1978; Barros Neto *et al.* 1996).

2.9 Visão geral da categoria de ensaios biológicos de triagem

Muitos tipos de ensaios foram desenvolvidos nos programas de triagem de produtos naturais. De um modo resumido pode-se classificar os ensaios de triagem em três categorias: ensaios baseados em células, ensaios com ligação de receptor e ensaios com enzimas.

Uma grande variação de triagem baseado em células foi desenvolvido para detectar novos metabólitos secundários. Muitas vezes pesquisa-se por moléculas que inibam uma função celular, sem no entanto o alvo molecular estar bem definido. Isso significa que compostos ativos podem interagir com a célula em uma variedade de alvos, como por exemplo através da ligação com receptores para produzir a síntese de proteínas. Os compostos identificados na triagem baseada em células necessitam ser submetidos a uma série de ensaios secundários e seletivos para determinar seus mecanismos de ação. Ensaios de citotoxicidade são muitas vezes essenciais e podem fornecer dados valiosos que ajudam a eliminar atividades não-específicas. Quando a violaceína foi utilizada em testes de citotoxicidade para o *T. cruzi* (Caldas *et al.* 1978), foi verificado que ocorria inibição do crescimento do flagelo deste microrganismo. A partir daí vários trabalhos foram realizados para determinar o potencial da violaceína e seus derivados como agentes anti-chagássicos (Pereira 1991).

Ensaios com ligação de receptor têm fornecido uma maior ênfase para o programa de descoberta de drogas. Preparações de tecidos animais foram usadas como fonte de receptores de membranas em uma ampla variedade de alvos. Além disso, o uso de linhagens de células expressando receptores alvos tem proporcionado a triagem contra todas as células e receptores de membrana que podem ser expressados *in vitro* (Munder & Hinnen 1999). Os ensaios de ligação medem normalmente a ligação do ligante radioativo com o receptor na presença de uma amostra teste. O ligante ligado é então separado do ligante livre, por centrifugação ou filtração, e a porcentagem de inibição calculada em comparação com o controle.

O uso de enzimas para descobrir inibidores enzimáticos farmacologicamente ativos pela triagem *in vitro* foi explorada por Umezawa em 1966. Muitos produtos microbianos com atividade farmacológica importantes foram descobertos por triagem de inibidores usando ensaios enzimáticos simples. O Avanço da Biologia Molecular tem resultado na produção de uma enorme quantidade de enzimas como alvos para citotoxicidade seletiva ou alterações farmacológicas. Contudo, a triagem contra enzimas isoladas podem resultar em muitas inibições falso-positivas que são ativas *in vitro* e não *in vivo*. Enquanto os compostos podem ser muito ativos contra alvos enzimáticos, eles podem não ser capazes de alcançar seus alvos em uma célula ou *in vivo*. Apesar dessas limitações, as enzimas permanecem como escolha popular na seleção de alvos no início de programas de triagem primária, e continuam a ser ricas fontes de novos inibidores a partir de fontes naturais (Hill *et al.* 1998).

2.10 Atividade antiproliferativa

É importante a determinação da toxicidade seletiva de agentes anticâncer contra células cancerígenas. Tashiro, (1992) tem avaliado o efeito de drogas anticâncer usando modelos de tumor em ratos vivos por muitas décadas. Aproximadamente 50 agentes anticâncer são normalmente utilizados na terapia clínica, mas existem poucas drogas para alguns tipos específicos de câncer. O avanço das técnicas de cultura de células possibilitaram o uso de várias linhagens de células de tumores humanos. Sabe-se que, tanto os testes com linhagens de tumores humanos quanto os ensaios com ratos são métodos capazes de determinar a sensibilidade de uma droga. Muitos métodos de ensaios têm sido desenvolvidos para avaliar a atividade anticâncer. No começo, a atividade inibitória era avaliada através da contagem do número de células expostas à droga. Então, os ensaios de tumores humanos clonogênicos (HTCA) foram utilizados para medir somente células de rápida multiplicação. No início da década de noventa foi desenvolvido o ensaio sulforodamina B (SRB) que utiliza microplacas com 96 poços, o qual foi adotado no sistema de triagem pelo "National Cancer Institute" (NCI), baseado numa nova idéia, que é "disease-oriented screening" (DOS), utilizando aproximadamente 60 linhagens de células de tumor humano (Tashiro 1992). O

objetivo final do DOS é facilitar a descoberta de novos compostos com potencial específico para linhagens de células e/ou subtipos de linhagens. No caso do NCI, que utiliza triagem em escala-piloto, é possível alcançar uma taxa de triagem de 400 compostos por semana (Monks *et al.* 1991).

O SRB é um método rápido, sensível (150 células/poço) e barato para medida do conteúdo de proteína fixada em placas de microtítulo com 96 poços, a partir de uma suspensão de células. Esse método é adequado à rotina de laboratórios normais e também à rotina de laboratórios com grande número de análises, como é caso do NCI, que faz milhões de ensaios por ano, utilizando triagem *in vitro* para descoberta de drogas anticâncer. A sensibilidade do ensaio SRB comparada a muitos ensaios fluorescentes foi superior. O ensaio SRB é uma técnica colorimétrica não destrutiva, estável indefinidamente e visível a olho nu. Essa técnica permite quantificar a citotoxicidade induzida por uma droga (Skehan *et al.* 1990; Haselsberger 1996).

Objetivos

3 OBJETIVOS

1. Realizar triagem dos parâmetros importantes para o crescimento e a produção de violaceína pela *Chromobacterium violaceum* CCT 3496.
2. Otimização do meio de cultura com objetivo de aumentar a produção do metabólito secundário (violaceína) e da biomassa (massa celular) em escala de laboratório.
3. Produção da violaceína em escala semi-piloto, bem como a extração, purificação e caracterização da violaceína.
4. Estudar a atividade antiproliferativa do extrato semipurificado por cristalização rico em violaceína (ESPVC).

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção de violaceína em frascos agitados

4.1.1 Microrganismo e manutenção

Partindo de uma cultura de *C. violaceum* CCT 3496 da coleção da Fundação André Tosello, Campinas, SP (cedida pelo prof. Nelson Duran do Lab. de Química Biológica - Instituto de Química – Unicamp) - isolou-se uma colônia, após cultivo por esgotamento em placas de agar. Esta colônia pura de *C. violaceum* foi utilizada em todas as fermentações descrita neste trabalho.

A manutenção da cultura foi feita em caldo nutriente (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 .

4.1.2 Preparação do pré-inóculo e inóculo

O pré-inóculo de *C. violaceum* CCT 3496 foi preparado em frascos de Erlenmeyer com capacidade para 50 mL, contendo 20 mL de caldo nutriente acrescido de 0,03% de L-triptofano em água destilada. O frasco foi incubado por 18 h em shaker rotatório à 30 °C e 150 rpm.

A partir do pré-inóculo foi preparado o inóculo nas mesmas condições anteriores. Teve-se a preocupação de utilizar o inóculo sempre com o mesmo valor de absorbância, normalmente após 10 h de crescimento ($\lambda = 720$ nm; diluição: 1 mL de células + 2 mL de água destilada). O procedimento foi adotado de modo a padronizar o inóculo nos diferentes experimentos, garantindo que o inóculo contenha sempre um número médio de microrganismos.

Quando utiliza-se inóculos com mesma absorbância tem-se uma melhor precisão em relação ao número de células que será inoculado no experimento. Preparar inóculos apenas considerando o tempo de inoculação pode levar a resultados enganosos quando utiliza-se o volume de inóculo como fator a ser otimizado.

4.1.3 Curva de crescimento do microrganismo (cinética de crescimento)

Para o estudo da cinética de crescimento do microrganismo foram utilizados um total de 18 frascos de Erlenmeyer com capacidade para 50 mL contendo, 20 mL do caldo nutriente acrescido de 0,03% de L-triptofano. Uma alíquota de 0,2 mL (1%) do inóculo, preparado como descrito acima, foi adicionada em cada um dos frascos. Após intervalos de tempo de no mínimo 4 h, retirou-se alíquotas aleatórias, de dois frascos (duplicatas), para dosagem da biomassa e produção de violaceína. O processo fermentativo foi realizado em shaker rotatório com agitação de 150 rpm à 30°C, por um período máximo de 147 h.

4.1.4 Dosagem da produção de massa celular e de violaceína bruta

A partir do caldo de fermentação foram coletadas amostras da suspensão de bactérias, que foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min (centrifuga marca Incibrás, Modelo Spin VI). Os tempos de coleta foram realizados após 4, 8, 11, 18, 26, 32, 42, 74 e 147 h de fermentação. O sobrenadante foi desprezado, e a biomassa foi adicionada solução fisiológica à 0,9%, após homogeneização, o material foi filtrado em filtro Millipore de peso conhecido, secado em estufa à 80 °C por 12 h e em dessecador com sílica gel por 24 h como mostrado na Figura 4.1.

A determinação da violaceína foi realizada pela coleta de uma alíquota de 1 mL do caldo de fermentação, seguida de centrifugação à 10.000 rpm por 10 min (centrifuga marca Incibrás, Modelo Spin VI). O sobrenadante foi desprezado e a biomassa foi adicionado 5 mL de etanol absoluto, para extrair o pigmento intracelular. Posteriormente, procedeu-se a

centrifugação à 10.000 rpm por 10 min para remoção das células. O sobrenadante foi diluído, 1mL de extrato alcóolico bruto de violaceína + 2,0 mL de etanol absoluto, e a quantidade de violaceína foi determinada pela medida da absorbância à 575 nm (coeficiente de extinção molar da violaceína pura = $0,05601 \text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ em etanol à 575 nm), como mostrado na Figura 4.2.

A violaceína, de cor violeta, é quase insolúvel em água e muito solúvel em etanol.

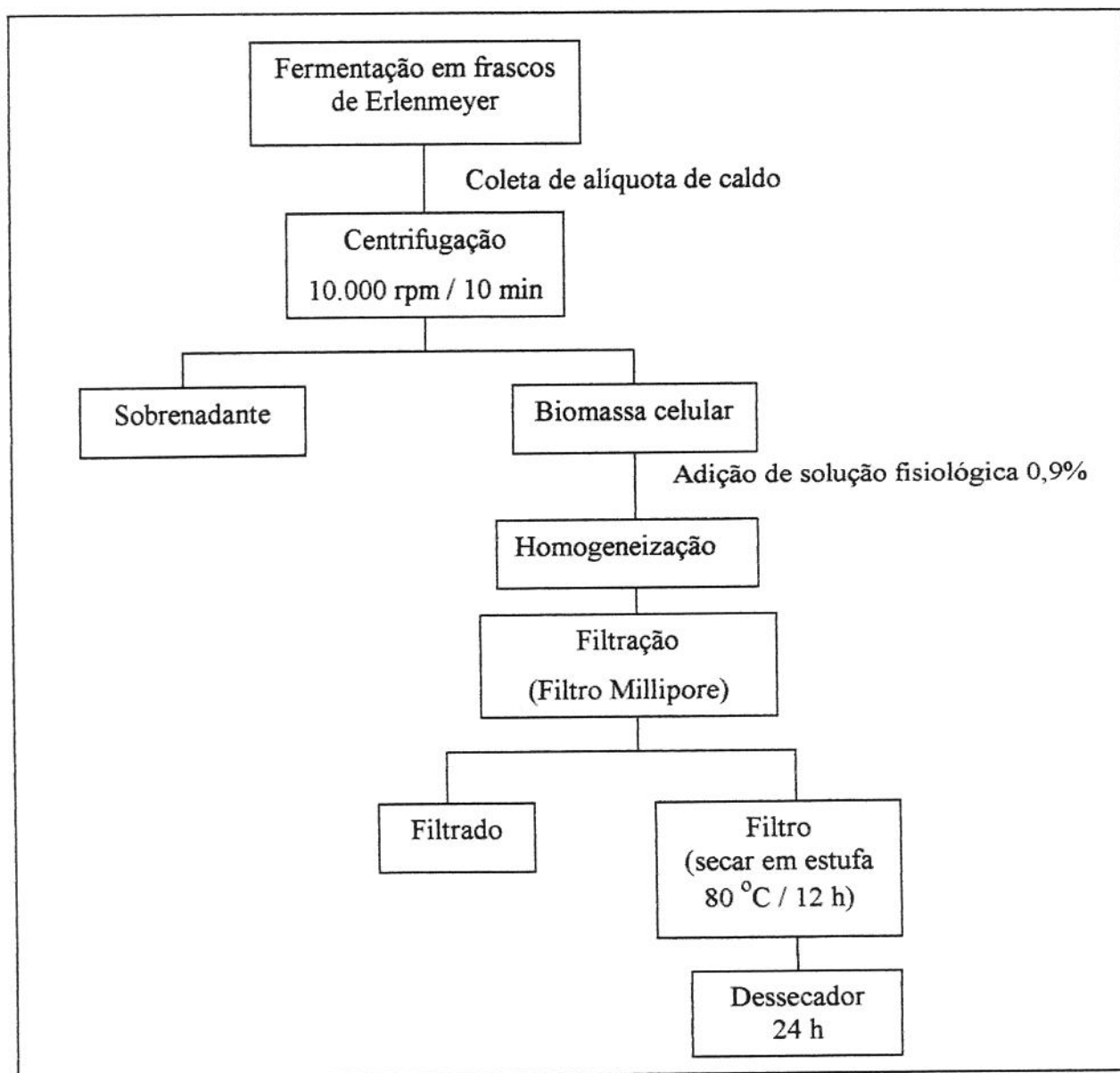


Figura 4.1 Fluxograma da determinação de massa celular seca na curva de crescimento celular.

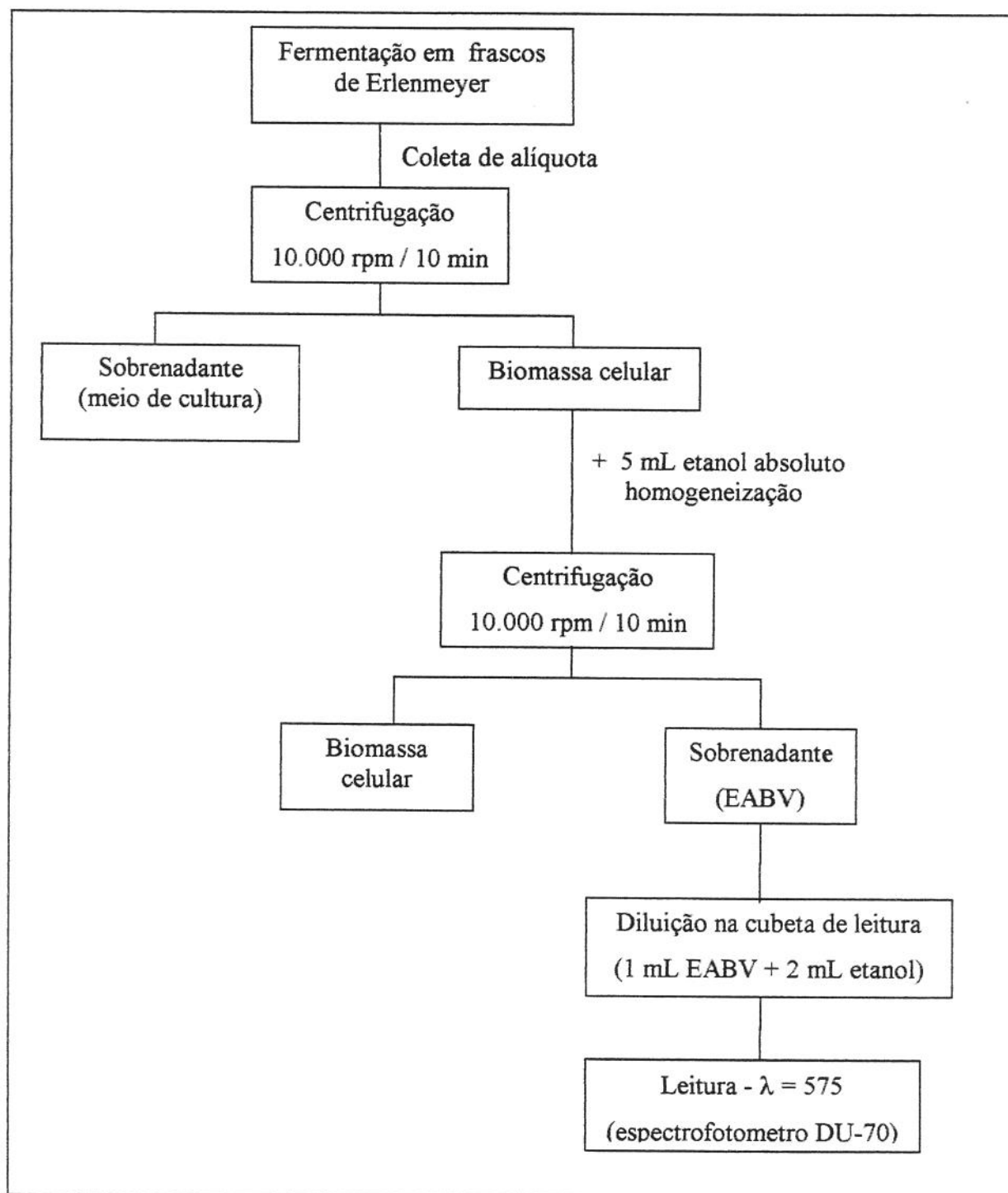


Figura 4.2 Fluxograma da determinação da violaceína bruta na curva de crescimento celular.

4.1.5 Análise da produção de violaceína e deoxiviolaceína por HPLC (“High Pressure Liquid Chromatography”)

A fermentação foi realizada como já descrito no cinética de crescimento. A produção de violaceína e deoxiviolaceína foi monitorada, ao longo da fermentação, por análise de HPLC (Figura 4.3). Após intervalos de 8, 25, 79 e 147 h foram colhidas alíquotas de 1 mL do caldo fermentado, e estes foram centrifugados à 10.000 rpm e 4 °C por 10 min (centrifuga marca Incibrás, Modelo Spin VI). Em seguida, o sobrenadante foi desprezado, e a biomassa foi adicionada 2 mL de etanol absoluto. Após homogeneização, foi centrifugada.

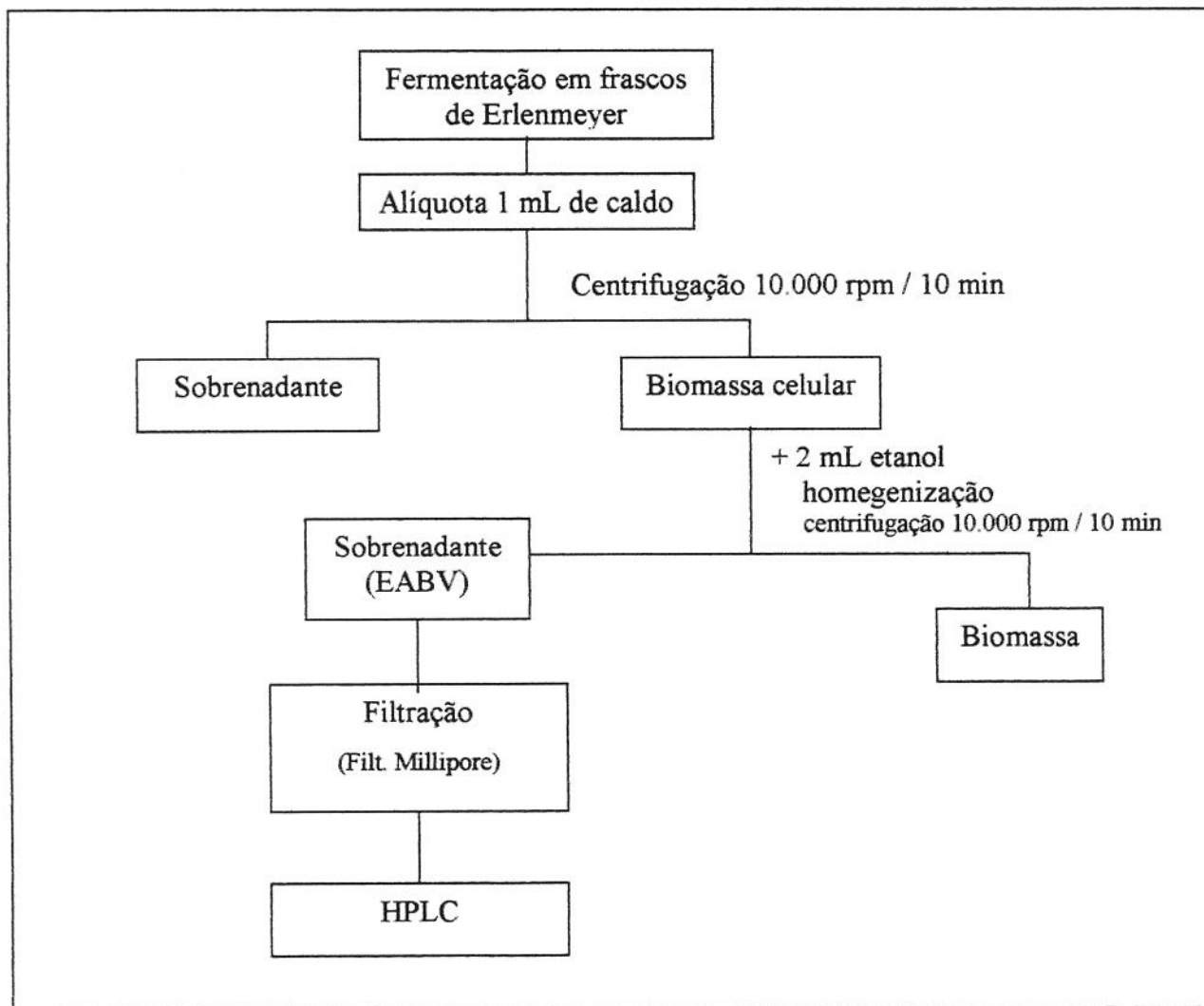


Figura 4.3 Fluxograma de determinação da violaceína e deoxiviolaceína por HPLC.

O sobrenadante, extrato alcoólico bruto de violaceína (EABV), foi coletado e submetido à análise por HPLC (aparelho modelo Waters PREP. LC 4000 System) usando as seguintes condições: pressão 450 PSI; vazão 7 mL/min; fase estacionária = coluna preparativa DELTA PAK C18 (30 mm x 30 cm) com poros de 100 Å e partículas de 15 µm de diâmetro; temperatura da coluna = temperatura ambiente (=23 °C); fase móvel = 60% de etanol: 40% de água (% em volume); detector ultravioleta – comprimento de onda (λ = 230 nm); velocidade do papel = 0,5 cm/min. Foi injetado um volume de 1,5 mL no cromatógrafo, após este ser filtrado utilizando filtro Millipore de 0,22 µm de porosidade.

4.1.6 Otimização da produção de violaceína

4.1.6.1 Dosagem da produção de massa celular (MC) e de violaceína bruta (V) nos ensaios de otimização.

Durante os ensaios de otimização por análise de superfície de resposta, a determinação do crescimento celular foi realizada após 36 h de fermentação, através da retirada de uma alíquota da suspensão de bactérias (diluição: 250 µL susp. células + 2,750 mL água destilada), seguida da leitura da absorbância à 720 nm (espectrofotômetro Beckman, modelo DU-70), Figura 4.4.

A determinação da violaceína (Figura 4.5) foi realizada pela coleta de uma alíquota de 1 mL do caldo fermentado após 36 h de fermentação, seguida de centrifugação à 10.000 rpm por 10 min (centrifuga marca Incibrás, Modelo Spin VI). O sobrenadante foi desprezado e 5 mL de etanol absoluto foi adicionado à biomassa, para extração do pigmento intracelular. Posteriormente, o material foi homogeneizado e centrifugado à 10.000 rpm por 10 min para remoção das células. O sobrenadante foi diluído (diluição: 500 µL extrato alcoólico bruto de violaceína + 2,50 mL etanol absoluto) e a quantidade de violaceína foi determinada pela medida da absorbância à 575 nm (coeficiente de extinção molar da violaceína pura = 0,05601 mL.µg⁻¹.cm⁻¹ em etanol a 575 nm).

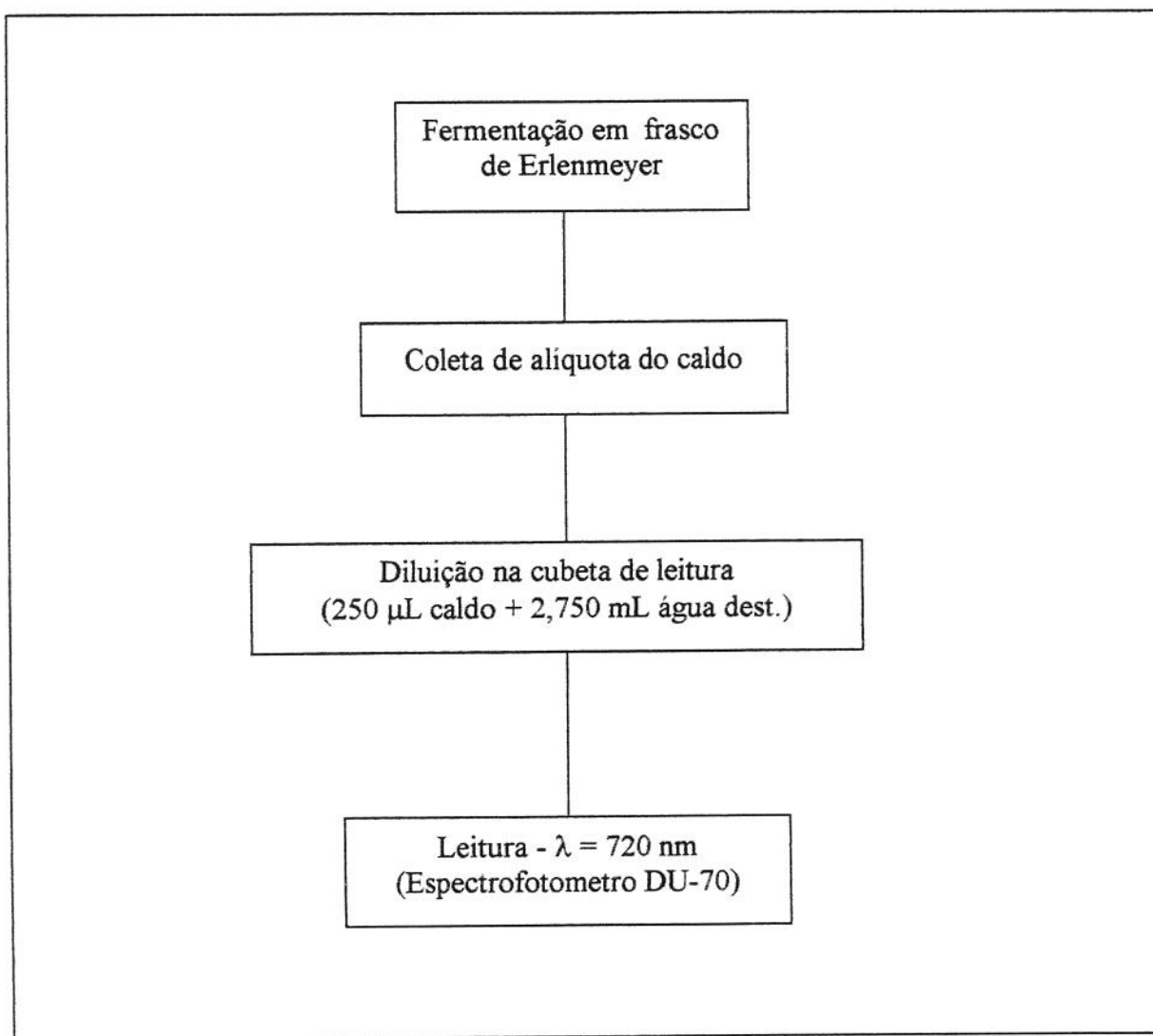


Figura 4.4 Fluxograma de determinação da massa celular nos planejamentos experimentais.

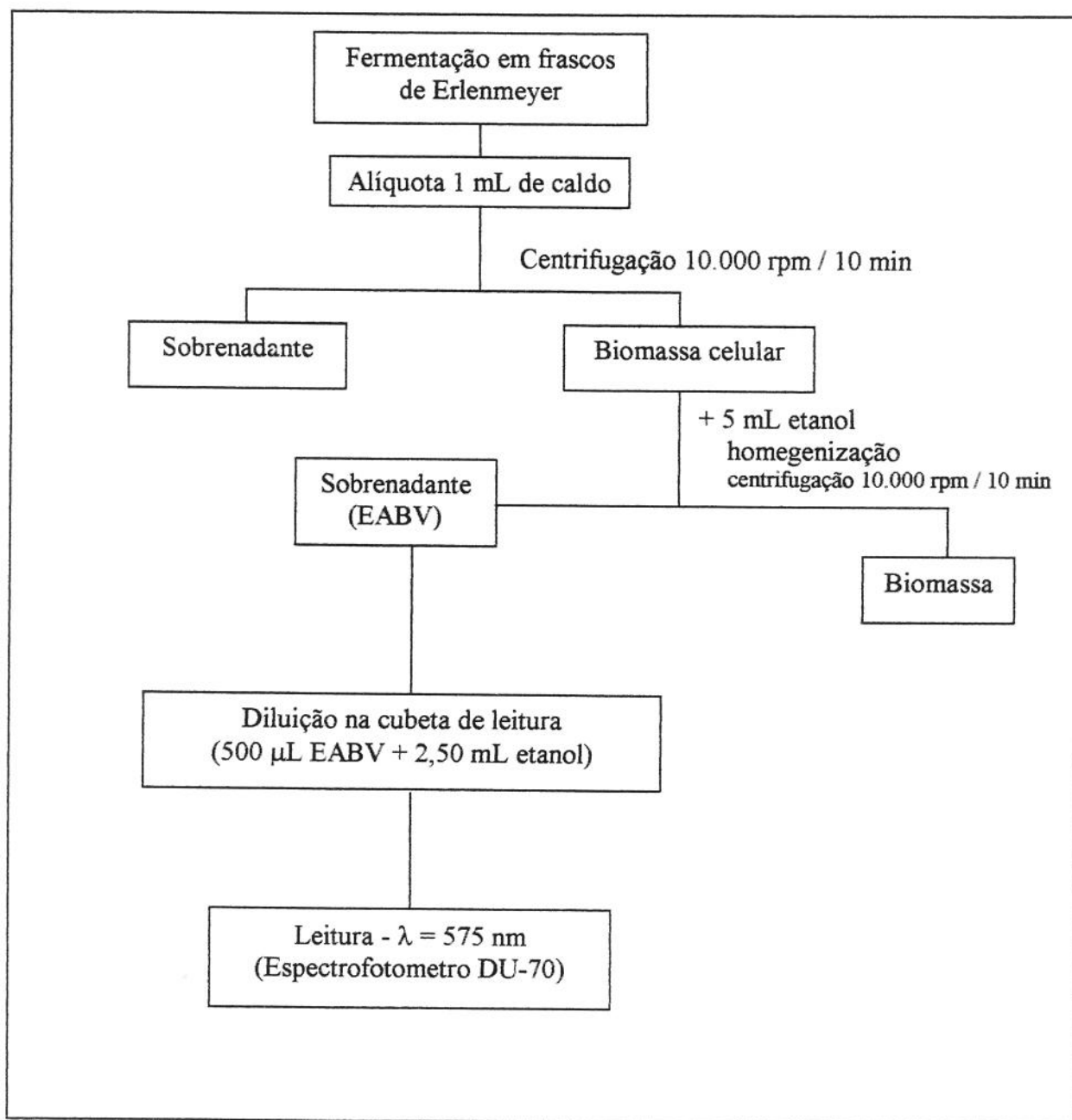


Figura 4.5 Fluxograma de determinação da violaceína bruta nos planejamentos experimentais.

4.1.6.2 Ensaios Preliminares

As concentrações ensaiadas para os seguintes constituintes foram: micronutrientes (ZnSO_4 0,1 mM e 1,0 mM), aminoácidos (DL-metionina 0,005 g/L; 0,030 g/L e 0,060 g/L), vitaminas (Vit-B₁₂ 0,0006 µg/mL; 0,0060 µg/mL; 0,0120 µg/mL; 0,0250 µg/mL; 0,0500 µg/mL e 0,1000 µg/mL), tampão fosfato pH=6,8 (0,01 M; 0,05 M; 0,10 M; 0,20M; 0,30 M; 0,40 M; 0,50 M), fontes de nitrogênio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,1%; 0,3%; 0,5%; 0,8%; 1,0%) e uréia (0,1%; 0,3%; 0,5%; 0,8%; 1,0%).

A fermentação foi realizada em frascos de Erlenmeyer com capacidade para 50 mL, contendo 20 mL de meio de cultura, em shaker rotatório à 200 rpm e 30 °C, por um período de 36 h. A produção de massa celular e de violaceína bruta foram determinadas conforme descrito no item 4.1.6.1.

4.1.6.3 Planejamento fatorial fracionário (triagem de variáveis)

Em um estágio inicial, foram estudados 11 fatores ou variáveis: fonte de carbono (D-glicose), fontes de nitrogênio (extrato de levedura e peptona bacteriológica), DL-metionina, vitamina B12, sulfato de zinco, L-triptofano, agitação (em shaker rotatório), temperatura, pH (tampão fosfato), inóculo. O nível dos fatores nesse estágio foram escolhidos baseados nos ensaios preliminares e nas informações da literatura. Um planejamento fatorial tradicional, 2^{15-11} foi realizado, como mostrado na Tabela 5.3. Este planejamento prevê a realização de 16 experimentos. Embora até 15 fatores possam ser estudados utilizando este planejamento fatorial, somente foram variados sistematicamente 11 fatores (fatores reais), sendo que os quatro fatores restantes do planejamento (fatores não reais ou virtuais) foram utilizados para calcular a estimativa do erro. Esse erro foi comparado com o erro calculado a partir da medida das replicatas dos experimentos realizados em duplicata. Esse tipo de planejamento fatorial fracionário é apropriado para realizar triagem de fatores permitindo a identificação daqueles fatores que são mais importantes na otimização da produção de massa celular e violaceína.

A fermentação dos 16 experimentos, feitos em duplicata, foi realizada em frascos de Erlenmeyer com capacidade para 50 mL, contendo 20 mL de meio nutriente. A formulação do meio nutriente, a temperatura e agitação do shaker utilizadas neste planejamento fatorial são mostradas na Tabela 5.3. A esterilização do meio nutriente foi realizada em autoclava à 110 °C por meia hora. Estas condições de temperatura e pressão evitam a degradação da glicose e vitaminas (Bier 1985). Em todos os experimentos foram utilizados três frascos com caldo nutriente acrescido de 0,03% de L-triptofano como controle.

O cálculo do efeito de cada fator, assim como o seu intervalo de confiança, podem ser calculados pelas fórmulas abaixo, ou utilizando softwares apropriados, como por exemplo o software Fatorial desenvolvido na Unicamp (Barros Neto *et al.* 1996) ou o software Statistica versão 5.0:

- Cálculo do efeito (Ef)

$$Ef = \sum R_+ - \sum R_-$$

onde,

$$Ef = \text{Valor do efeito} ; \quad R = \text{Resposta}$$

- Cálculo do erro de medida (S_p^2)

$$S_p^2 = \sum (\sqrt{1}S_1^2 + \sqrt{2}S_2^2 + \dots + \sqrt{16}S_{16}^2) / \sum (\sqrt{1} + \sqrt{2} + \dots + \sqrt{16})$$

onde,

$$S_p^2 = \text{variância agregada}; \quad \sqrt{n} = \text{graus de liberdade}; \quad S_n^2 = \text{variância}$$

- Cálculo do erro Padrão da média global ($S_{(y)}$)

$$S_{(R)}^2 = S_p^2 / N \Rightarrow S_{(R)} = (S_p^2 / N)^{1/2}$$

onde,

$$S_{(R)} = \text{erro Padrão}; \quad N = n^{\circ} \text{ total de experimentos}$$

- Cálculo do erro Padrão do Efeito ($S_{(ef)}$)

$$S^2_{(Ef)} = S^2_{(R+)} + S^2_{(R-)} = S_p^2/16 + S_p^2/16 = S_p^2/8 \Rightarrow S_{(ef)} = (S_p^2/8)^{1/2}$$

, onde

$S^2_{(Ef)}$ = variância do efeito; $S^2_{(R)}$ = variância da resposta; $S_{(ef)}$ = erro Padrão do efeito

- Cálculo do Intervalo de confiança:

O intervalo de confiança foi calculado ao nível de 95% com base na distribuição de Student (t_{N-1}). Foram considerados valores estatisticamente significativos, isto é, diferentes de zero, aqueles efeitos cujo valor absoluto excedeu o resultado do cálculo da fórmula abaixo:

$$(0 + t_{16, 95\%} * S_{(ef)}) = | \text{efeito} |.$$

4.1.6.4 Análise de superfície de resposta com 5 fatores

Após os ensaios preliminares, foi montado um planejamento composto central (Tabela 5.9), envolvendo cinco fatores (D-glicose, extrato de levedura, L-triptofano, peptona e sulfato de zinco). As variáveis foram escolhidas com base nos resultados do planejamento fatorial fracionário (Tabela 5.3). Este planejamento composto central consiste de um fatorial 2^5 completo, um planejamento estrela e mais um ponto central em replicata para determinar o erro e também a falta de ajuste do modelo. Ambos os modelos linear e quadrático foram ajustados aos dados experimentais. Desta forma, a fermentação do planejamento composto central foi realizada em frascos de Erlenmeyer com capacidade para 50 mL, contendo 20 mL de meio de cultura, em shaker rotatório. A formulação do meio de cultura, nos vários níveis, é mostrada na Tabela 5.9. A temperatura, agitação e inóculo foram constantes e iguais à 33 °C, 300 rpm e 5% (0,350 mL; ABS=0,71; $\lambda=720$ nm), respectivamente. Em todos os experimentos

foram utilizados três frascos com caldo nutriente acrescido de 0,03% de L-triptofano como controle.

4.1.6.5 Análise de superfície de resposta com 3 fatores

Com base nos resultados do planejamento anterior, foi montado um planejamento composto central (Tabela 5.12) com três fatores (D-glicose, extrato de levedura e L-triptofano). Os níveis dos fatores usados nesse planejamento foram escolhidos baseados nos resultados do planejamento com cinco fatores (Tabela 5.9). Para isso, a fermentação foi realizada em frascos de Erlenmeyer com capacidade para 50 mL, contendo 20 mL de meio nutriente, em shaker rotatório. A formulação do meio nutriente, nos vários níveis, é mostrada na Tabela 5.12. A peptona, sulfato de zinco, temperatura, agitação e inóculo foram constantes e iguais à 0,1%, 0,0625 mM, 33 °C, 300 rpm e 5% (0,350 mL; ABS=0,71; $\lambda=720$ nm), respectivamente. Em todos os experimentos foram utilizados três frascos com caldo nutriente acrescido de 0,03% de L-triptofano como controle.

4.2 Produção, extração, purificação e caracterização da violaceína

4.2.1 Produção da violaceína em biorreator

O pré-inóculo de *C. violaceum* CCT 3496, foi preparado em frascos de Erlenmeyer com capacidade para 50 mL, contendo 20 mL de caldo nutriente acrescido de 0,03% de L-triptofano. Este foi incubado por 18 h em shaker rotatório à 30 °C e 200 rpm (Figura 4.6).

A partir do pré-inóculo, foi preparado 300 mL de inóculo em frasco Erlenmeyer de capacidade para 500 mL, contendo 150 mL do caldo nutriente acrescido de 0,03% L-triptofano, que foi incubado por 10 h em shaker rotatório, à 30 °C e 200 rpm. Este inóculo foi

adicionado ao biorreator contendo meio de cultura estéril para dar início à fermentação, como mostrado na Figura 4.6.

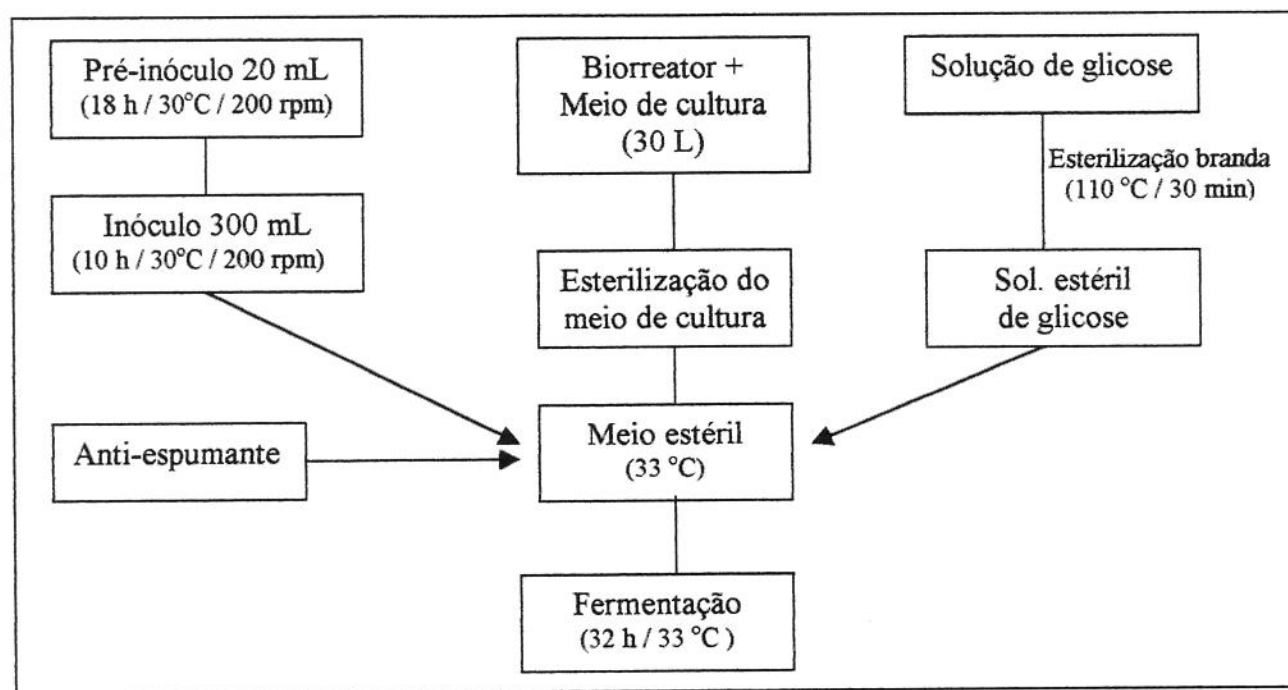


Figura 4.6 Fluxograma da fermentação realizada em biorreator para produção de violaceína.

A fermentação foi realizada em fermentador de aço inoxidável "Mobile Pilot Plant" (New Brunswick Scientific co., Inc.) de capacidade para 80 L contendo 30 L do meio otimizado no planejamento composto central com três fatores. A composição do meio otimizado foi a seguinte: (D-glicose anidra 0,84 %, peptona bacteriológica 0,1%, extrato de levedura 1,68%, L-triptofano 1,34%, sulfato de zinco 0,0625, antiespumante grau biológico 0,005% em água destilada). Foram utilizados 300 mL (1,0 %) de inóculo, sendo o tempo de fermentação de 15 h, à 33 °C, 120 rpm e fluxo de ar de 35 L/min (pressão de ar do fluxômetro 36 Kg/cm²). A esterilização da D-glicose foi feita separadamente, em autoclave à 110 °C por 30 min, sendo esta depois introduzida no biorreator sob condições estéreis. Os outros componentes do meio de cultura foram esterilizados no próprio biorreator. O antiespumante grau biológico (Dow Corning® Medical Antiespumante C Emulsão) é uma emulsão que perde o seu efeito antiespumante (quebra a emulsão) quando autoclavado, devendo ser adicionado diretamente sob condições estéreis.

4.2.2 Processo de extração da violaceína

Após a fermentação, a extração do pigmento (violaceína) foi feita utilizando-se uma centrífuga refrigerada modelo Sorvall RC-5B (refrigerated Superspeed centrifuge - Du Pont Instruments). Um volume de 200 mL do caldo fermentado de bactérias, foi centrifugado em tubo plástico de capacidade de 250 mL, à 9.000 rpm e 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi desprezado permanecendo a biomassa de bactérias de cor azul escuro. Esse procedimento foi repetido até completar o processamento de 4,8 L de caldo (Figura 4.7).

A seguir a biomassa foi lavada manualmente por 3 vezes com 70 mL de água destilada para retirar restos de meio de cultura. Após a lavagem, foi adicionado 200mL de álcool etílico absoluto comercial, homogeneizando-se a com ajuda de uma baguete. A medida que a biomassa foi sendo homogeneizada, o álcool foi adquirindo uma coloração roxa intensa. O processo de homogeneização levou em media 15 min. Em seguida, o material foi centrifugado à 9.000 rpm e 4 °C por 10 min. O sobrenadante (EABV) foi estocado em frasco de vidro âmbar . O procedimento de extração do pigmento com etanol (EABV) foi repetido por 3 vezes, sendo obtidos três diferentes lotes de sobrenadante (Figura 4.7). Este procedimento foi repetido até que os 30 L de caldo fermentado fossem processados.

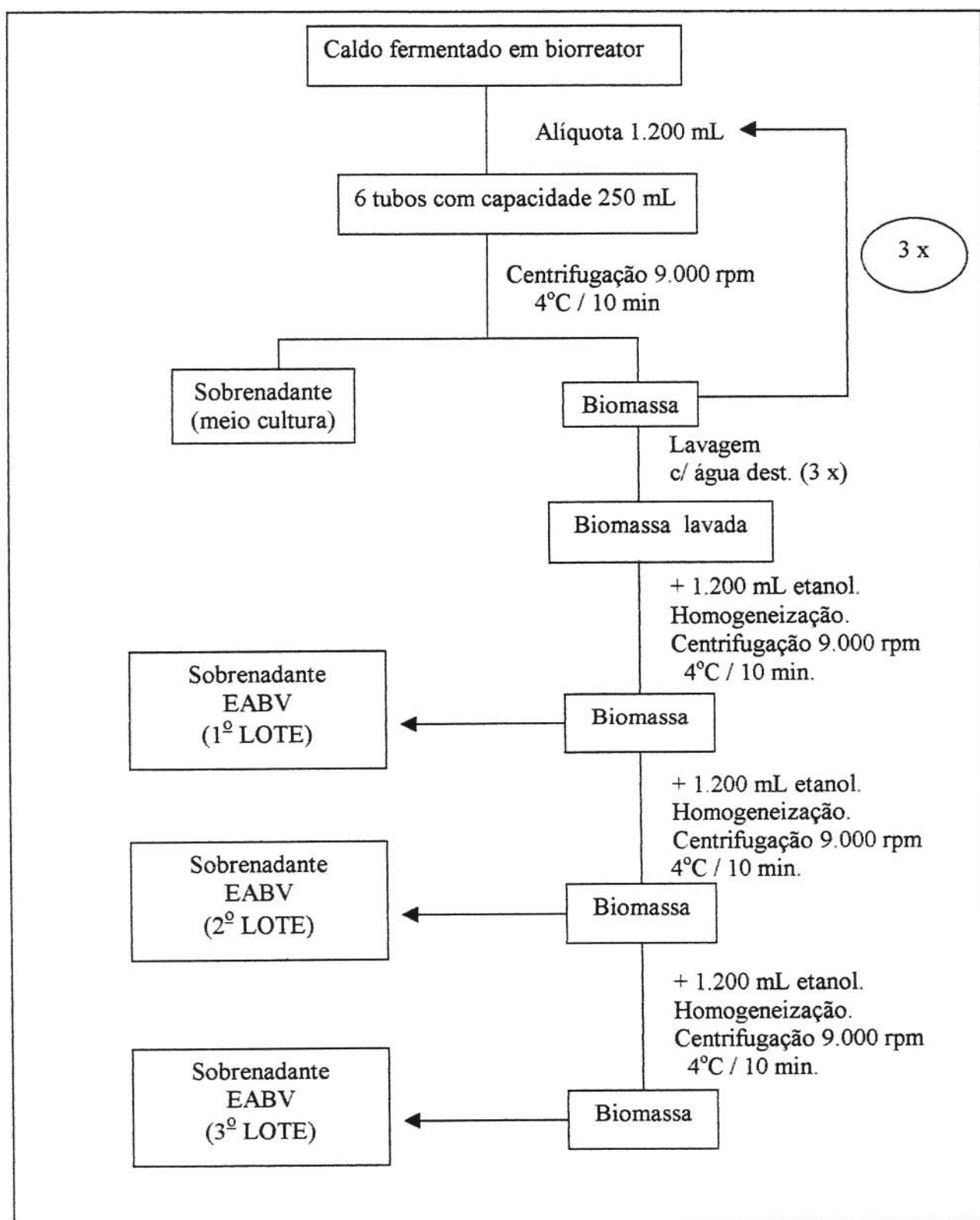


Figura 4.7 Fluxograma da extração da violaceína a partir do caldo fermentado em biorreator.

4.2.3 Processo de purificação da violaceína

Dos três lotes de EABV obtidos no processo de extração, o etanol foi evaporado à pressão reduzida em rotaevaporador. Isto foi feito separadamente, para determinação do rendimento de seus respectivos extratos brutos de violaceína (EBV). O processo de purificação descrito abaixo foi realizado apenas para o 1º lote. Após evaporação do etanol, o material foi retirado do balão e colocado em um aparelho de soxhlet para iniciar o processo de purificação. A sequência de solventes utilizado foi clorofórmio, éter etílico e etanol, como mostrado na Figura 4.8.

Clorofórmio: o tempo neste solvente foi de aproximadamente 1 h, sendo que inicialmente o clorofórmio adquiriu uma coloração preta e já no final a coloração passou a ser quase que incolor. Este solvente tem por objetivo arrastar lipídeos, como por exemplo restos de membrana bacteriana do EBV, obtendo-se um extrato clorofórmico.

Éter etílico: o tempo neste solvente foi de aproximadamente 6 h. Na primeira $\frac{1}{2}$ hora o éter etílico saiu com uma coloração rosado e já no final desta etapa, passou a ter uma coloração quase incolor. O objetivo deste solvente é arrastar a deoxiviolaceína do EBV, obtendo-se um extrato etéreo.

Álcool etílico: esta etapa demorou em média umas 18 h. No início, o álcool etílico saiu com uma coloração roxa-escura e à medida em que o tempo foi passando a coloração do álcool etílico foi diminuindo, até tornar-se um violeta bem claro. Esta etapa tem por objetivo arrastar a violaceína do EBV, obtendo-se o extrato alcoólico semipurificado de violaceína (EASPV). Este foi evaporado a pressão reduzida em rotaevaporador, sendo que a película roxa (extrato semipurificado de violaceína – ESPV) aderida às paredes do balão, foi raspada e transferida para um frasco de Erlenmeyer com ajuda de pequenas quantidades de metanol (ou éter etílico).

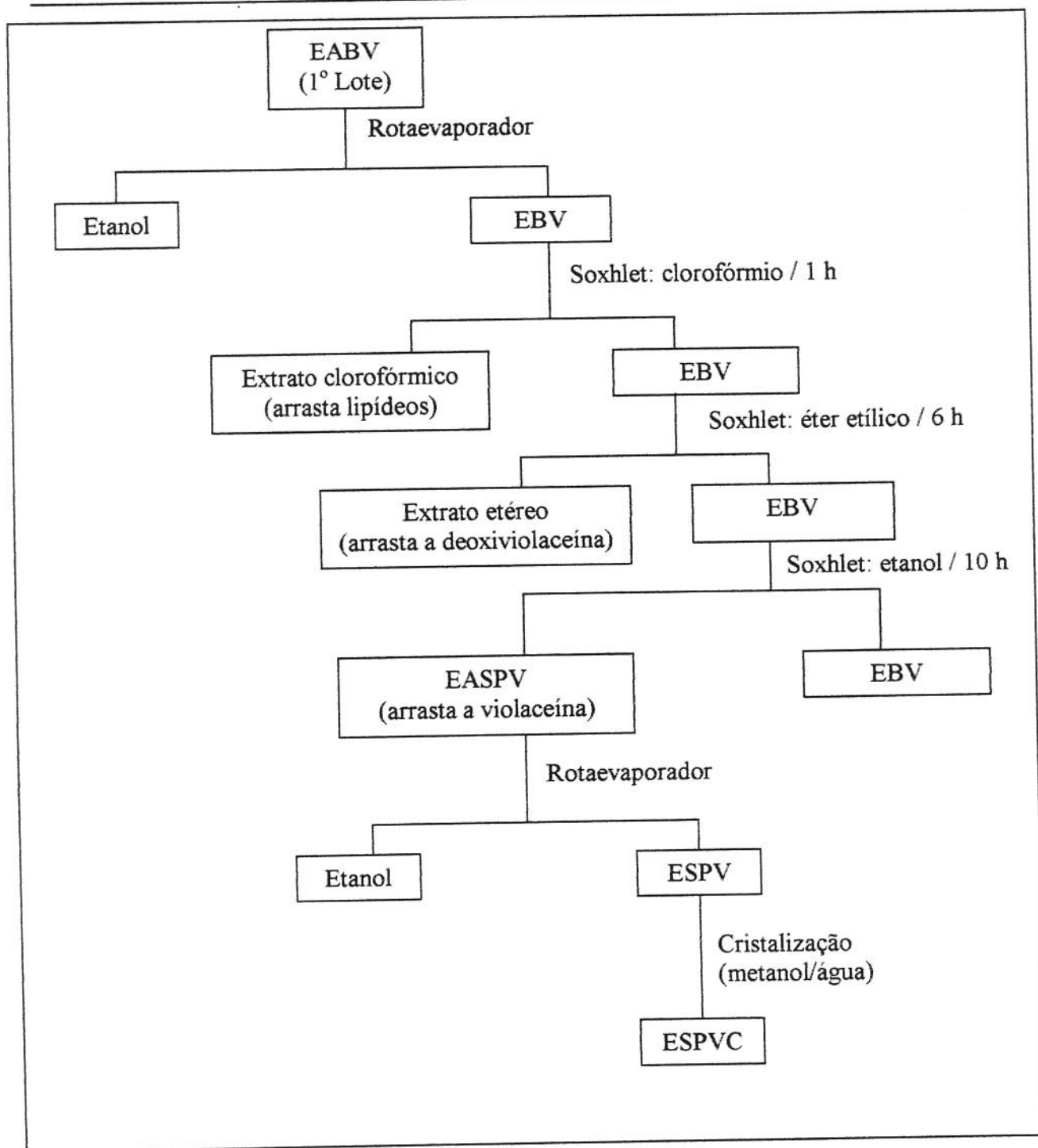


Figura 4.8 Fluxograma da etapa de purificação, à partir do extrato alcoólico bruto de violaceína (EABV) até a obtenção do extrato semipurificado de violaceína por cristalização (ESPVC).

Cristalização: O material a ser cristalizado foi passado por um moinho de bancada, obtendo-se um pó fino. Com a finalidade de diminuir ainda mais a granulometria do ESPV, este foi pulverizado utilizando-se um gral (almofariz) de amalgma. Em um frasco Erlenmeyer, o material pulverizado foi dissolvido em metanol, com a ajuda de um aparelho de ultrasom. A cristalização foi feita com gotejamento lento de água pelas paredes do frasco Erlenmeyer até atingir a seguinte proporção de metanol:água (1:2). Em seguida, o material foi deixado em repouso por 48 h. Os cristais formados nem sempre são grandes e às vezes não ocorre precipitação visível a olho nú. A seguir o material foi centrifugado à 1.500 rpm por 10 min. O sobrenadante (coloração amarela) foi desprezado e o precipitado foi seco em estufa à 100°C por 30 h. Por último este mesmo material foi recristalizado, seguindo o mesmo procedimento.

4.2.4 Caracterização e análise do extrato semi-purificado de violaceína

A caracterização do extrato semi-purificado de violaceína por cristalização (ESPVC) foi feita por espectroscopia de massas (EM), utilizou-se o espectrômetro de Massas VG Autospec – MICROMAR 70 eV, e por HPLC (Waters, modelo PREP.LC 4000 System), como descrito anteriormente.

4.3 Testes farmacológicos

4.3.1 Atividade antiproliferativa

4.3.1.1 Linhagens de células tumorais

As linhagens celulares, utilizadas neste trabalho para realização da triagem de atividade antiproliferativa, cedidas pelo NCI (Instituto Nacional do Câncer dos EUA), estão relacionadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Linhagens celulares utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa.

Tipo celular	Nome	Tipo de cultura
Pulmão	NCI-460	Aderida
Mama	MCF 7	Aderida
Mama	NCI-ADR*	Aderida
Melanoma	UACC-62	Aderida
Renal	786-0	Aderida
Cólon	HT29	Aderida
Ovário	OVCAR.03	Aderida
Próstata	PC.03	Aderida

* Linhagem celular resistente a múltiplas drogas padrões.

Todos os procedimentos descritos foram realizados sob condições estéreis (Fluxo Laminar Veco[®], Classe IIB2).

4.3.1.2 Cultura celular

As células foram mantidas em frascos de 25 cm² (Nunc[®]), com 5mL de meio de cultura RPMI 1640 com soro fetal bovino (SFB) e repicadas quando a monocamada celular atingiu cerca de 80% de confluência. Estes frascos foram mantidos à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade.

4.3.1.3 Curva de Crescimento para determinação da densidade de inoculação

A densidade celular utilizada para cada linhagem já havia sido estabelecida, tornando-se padrão no laboratório. O método utilizado é descrito por Hohn (2001).

4.3.1.4 Determinação das curvas concentração-resposta de drogas-padrões

Como drogas de referência foram utilizados os seguintes quimioterápicos de uso comercial: 5-fluorouracil (5-FU), irinotecam (CPT-11) (Rhône-Poulenc Rorer[®]) e doxorubicina (DOX) (Sigma[®]) nas concentrações 10^{-5} a 10^{-1} , 10^{-12} a 10^{-8} e 10^{-8} a 10^{-4} mol/L, respectivamente. No primeiro dia de experimento foram inoculados 100 µL de células em RPMI/SFB/gentamicina (meio de cultura RPMI 1640, suplementado de 5% de soro fetal bovino inativado e 50µg/mL de gentamicina) nas concentrações pré-determinadas e incubadas por 24 h. Após este período foram adicionados 100 µL em diferentes concentrações de cada droga e realizada a leitura da placa controle (T_0) utilizando o ensaio da SRB. As placas tratadas com as drogas foram incubadas à 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade por 48 h. Após este período foi realizado o ensaio da SRB. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (Kohn 2001).

4.3.1.5 Determinação das curvas concentração-resposta em relação a droga-teste

Para as diferentes linhagens celulares foram inoculados 100 µL de células em meio RPMI/SFB/gentamicina, nas suas respectivas densidades de inoculação, em placas de 96 compartimentos. Estas foram incubadas por 24 h à 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ e 100% de umidade.

Após este período, foram adicionados 100 µL da droga (ESPVC) em diferentes concentrações com a finalidade de correlacionar a dose com o efeito antiproliferativo. Fez-se a

leitura das placas de controle inicial (T_0), sendo as demais placas incubadas por 48 h. A determinação do crescimento celular foi realizado pelo método indireto da SRB.

4.3.1.6 Diluição da amostra (ESPVC)

A solução estoque foi obtida através da diluição da amostra em dimetilsulfóxido (DMSO) com a concentração final de 0,1g/mL, que para adição na cultura de células foi diluída pelos menos em 400 vezes, para evitar a toxicidade do DMSO (Skehan *et al.* 1990). As concentrações de ESPVC utilizadas nos ensaios antiproliferativos, para as várias linhagens celulares foram: 0,25; 2,5; 25 e 250 μ Lg/mL.

4.3.1.7 Ensaio da sulforrodamina B (SRB)

Ao final do tempo de incubação, as placas de 96 compartimentos foram centrifugadas por 3 min à 2000 rpm e fixadas com 50 μ L (4 °C) de uma solução a 50% ácido tricloroacético (TCA). As placas foram incubadas por 1 h à 4 °C. Após este tempo, as placas foram lavadas 4 vezes com água destilada e secas a temperatura ambiente.

Em seguida foi adicionado 50 μ L de SRB a 0,4% (p/v) e mantidas por 30 min à 4 °C. Depois, foram lavadas 4 vezes consecutivas com solução de ácido acético 1% e secas a temperatura ambiente. O corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com uma solução de Trizma Base (Sigma) a 10 μ LM e pH 10,5 por 5 min em ultrasom, para leitura da absorbância em 560 nm em um leitor de microplacas (Labsystems Multiskan[®] MCC/3340)

4.3.1.8 Análise dos resultados

A absorbância da placa do controle inicial (T_0) corresponde à quantidade de células no início do experimento após 24 h de incubação (adição da droga-teste), sendo representada no

gráfico concentração-resposta como uma linha no ponto zero do eixo das ordenadas. Após 48 h obteve-se a absorbância do controle final (T_1). O valor de T_1 foi comparado com o valor de T_0 , representando 100% de crescimento, na ausência da droga-teste. Os experimentos foram realizados em triplicatas e o desvio padrão da média das absorbâncias foi inferior a 5%.

A inibição do crescimento celular (IC) foi calculada segundo as formulas abaixo:

- $T > C$, a droga estimula o crescimento celular.
- $T \geq T_0 < C$, a droga é citostática e a fórmula utilizada é $100 \times [(T - T_0)/(C - T_0)]$
- $T < T_0$, a droga é citocida e a fórmula utilizada é $100 \times [(T - T_0)/(C - T_0)]$

onde,

- T = média da absorbância da célula exposta a droga-teste.
- C = controle de células sem droga-teste.
- T_0 = controle inicial após 24 h de incubação.

Os resultados obtidos foram subtraídos de 100% obtendo-se então a porcentagem de inibição de crescimento (IC %).

Resultados

5. RESULTADOS

5.1 Otimização do processo de produção da violaceína

5.1.1 Curva de crescimento do microrganismo (cinética de crescimento)

O resultado da cinética de crescimento da *C. violaceum* é apresentado na Figura 5.1.

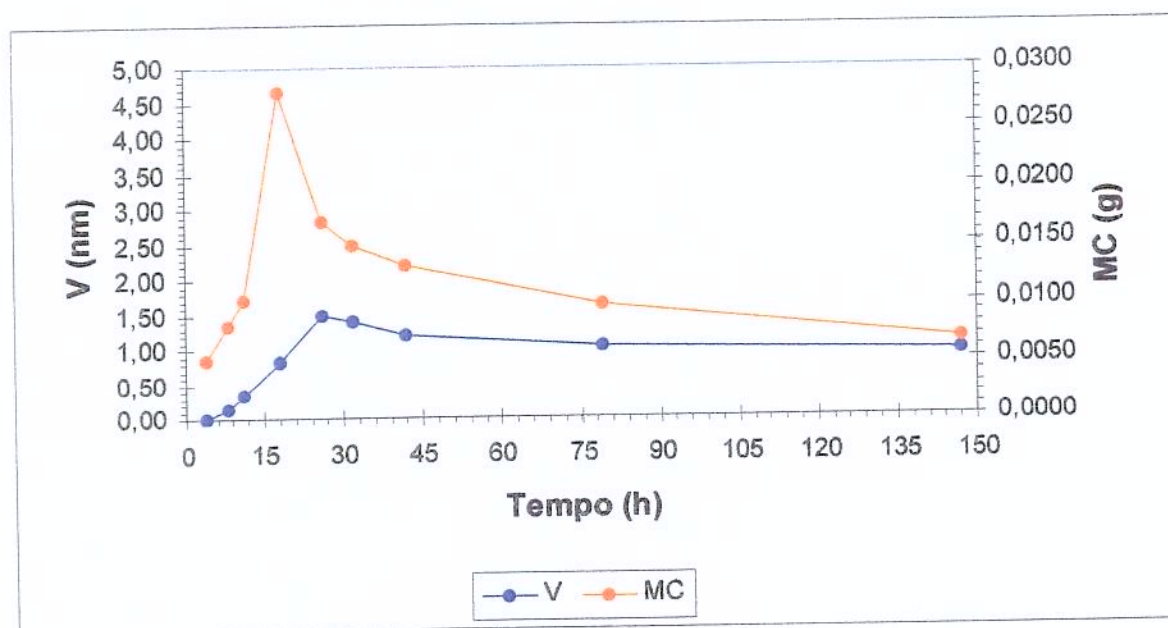


Figura 5.1 Cinética de crescimento do *C. violaceum* em frascos agitados utilizando meio de cultura inicial, com as respectivas curvas de produção de massa celular (MC) e violaceína (V).

5.1.2 Análise da produção de violaceína e deoxiviolaceína por HPLC

Os resultados das análises da produção de violaceína e deoxiviolaceína realizadas por HPLC das amostras coletadas ao longo da curva de cinética da fermentação da *C. violaceum* estão resumidas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Análise por HPLC da produção de violaceína e deoxiviolaceína ao longo da curva de cinética de crescimento do *C. violaceum*.

Tempo de fermentação	Substância ^a	Área % ^b	Att ^c	R=Viol/Deox.
8 h	Viol.	69,2	256	8,1
	Deox.	8,6		
26 h	Viol.	84,7	512	9,0
	Deox.	9,4		
79 h	Viol.	84,5	512	9,2
	Deox.	9,2		
147 h	Viol.	83,5	256	9,2
	Deox.	9,1		

a = tempo de retenção da violaceína (24,8 min) e deoxiviolaceína (33,8 min).

b = área calculada usando todos os picos do cromatograma.

c = Atenuação.

R = área % (violaceína) / área % (deoxiviolaceína)

5.1.3 Planejamento experimental

5.1.3.1 Ensaios preliminares

Os resultados dos ensaios preliminares realizados com *C. violaceum* após 36 h de fermentação estão resumidos na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 Resultado dos ensaios preliminares em relação a massa celular, violaceína bruta e pH, pelo *C. violaceum* após 36 h de fermentação .

	Concs. em 20 ml de meio de cultura.	MC (ABS - 720 nm)	V (ABS - 575 nm)	pH Final
Controle				
Controle	-----	0,53	0,28	8,7
Micronutrientes				
ZnSO ₄	0,1mM	0,62	0,21	8,73
ZnSO ₄	1,0 mM	0,12	0,00	6,90
Aminoácidos				
DL-Metionina	0,005 g/L	0,51	0,25	8,75
DL-Metionina	0,030 g/L	0,51	0,27	8,72
DL-Metionina	0,060 g/L	0,51	0,18	8,70
Vitamina				
Vit-B ₁₂	0,0250 µg/mL	0,49	0,21	8,88
Vit-B ₁₂	0,0500 µg/mL	0,52	0,25	8,79
Vit-B ₁₂	0,1000 µg/mL	0,49	0,23	8,84
Vit-B ₁₂	0,0006 ng/mL	0,52	0,26	8,79
Vit-B ₁₂	0,0060 ng/mL	0,49	0,28	8,85
Vit-B ₁₂	0,0120 ng/mL	0,51	0,33	8,73
Tampão (pH=6,8)				
Tampão Fosfato	0,01 M	0,50	0,34	8,26
Tampão Fosfato	0,05 M	0,79	0,44	7,58
Tampão Fosfato	0,10 M	0,80	0,57	7,31
Tampão Fosfato	0,20 M	0,66	0,44	7,03
Tampão Fosfato	0,30 M	0,71	0,46	6,87
Tampão Fosfato	0,40 M	0,63	0,41	6,81
Tampão Fosfato	0,50 M	0,39	0,22	6,76
Fonte de Nitrogênio				
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1%	0,18	0,10	8,38
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3%	0,20	0,08	8,18
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5%	0,21	0,08	7,97
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,8%	0,19	0,08	7,74
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0%	0,20	-----	7,73
Uréia	0,1%	0,14	0,08	8,41
Uréia	0,3%	0,09	0,04	8,78
Uréia	0,5%	0,05	0,02	8,86
Uréia	0,8%	0,03	-----	8,84
Uréia	1,0%	0,02	-----	8,84

A Figura 5.2 mostra os resultados obtidos em relação ao crescimento celular e produção de violaceína pelo *C. violaceum* para as diferentes concentrações ensaiadas de íon zinco, DL-metionina e vitamina B₁₂, após 36 h de fermentação.

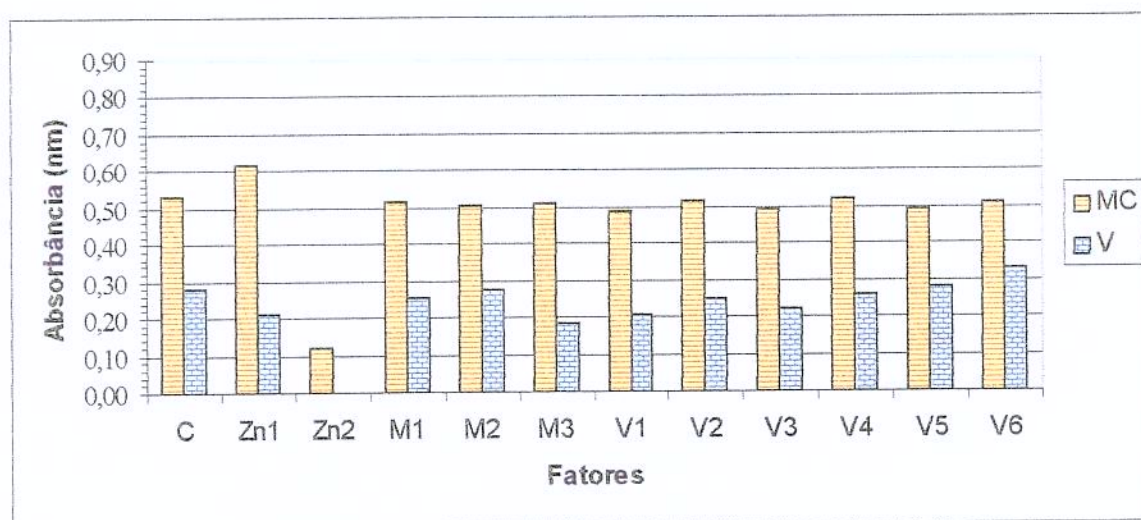


Figura 5.2 Efeito do íon Zn^{+2} , DL-metionina e vitamina B₁₂ sobre a produção de massa celular e violaceína bruta, pelo *C. violaceum* após 36 h de fermentação.

Legenda,

Fatores	
C = controle	V1 = Vitamina B ₁₂ (0,0250 µg/mL)
Zn1 = ZnSO ₄ (0,1 mM)	V2 = Vitamina B ₁₂ (0,0500 µg/mL)
Zn2 = ZnSO ₄ (1,0 mM)	V3 = Vitamina B ₁₂ (0,1000 µg/mL)
M1 = DL-metionina (0,005 g/L)	V4 = Vitamina B ₁₂ (0,0006 ng/mL)
M2 = DL-metionina (0,030 g/L)	V5 = Vitamina B ₁₂ (0,0060 ng/mL)
M3 = DL-metionina (0,060 g/L)	V6 = Vitamina B ₁₂ (0,0120 ng/mL)

A Figura 5.3 mostra os dados obtidos da produção de massa celular e violaceína bruta pelo *C. violaceum* após 36 h de fermentação quando exposto a diferentes concentrações de tampão fosfato.

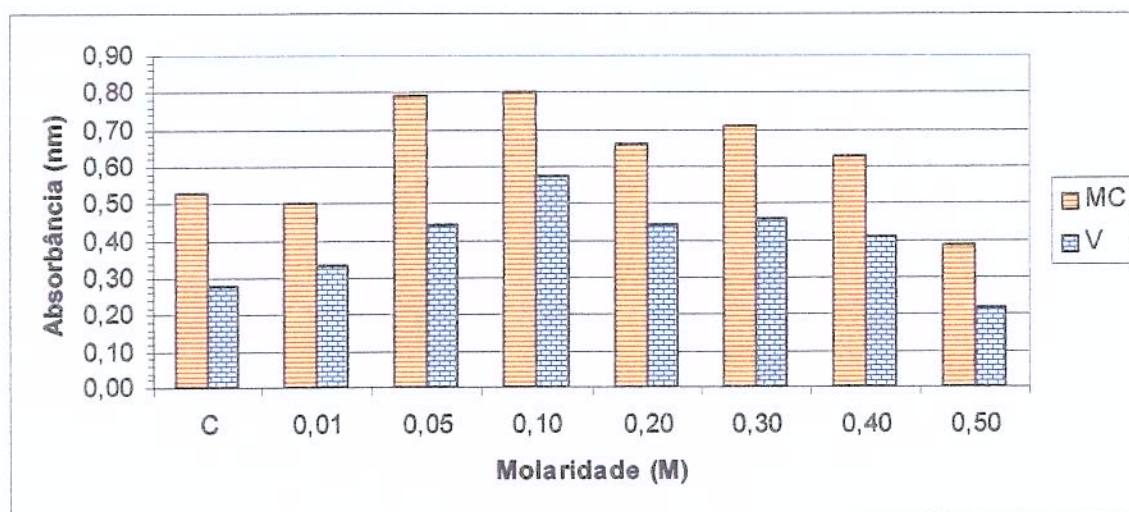


Figura 5.3 Efeito da molaridade do tampão fosfato (pH=6,8) sobre a produção de massa celular e violaceína bruta, pelo *C. violaceum* após 36 h de fermentação ; (C = controle).

A Figura 5.4 mostra os dados obtidos para a produção de massa celular e de violaceína bruta pelo *C. violaceum* quando exposto à diferentes concentrações de duas fontes de nitrogênio distintas (sulfato de amônio e uréia).

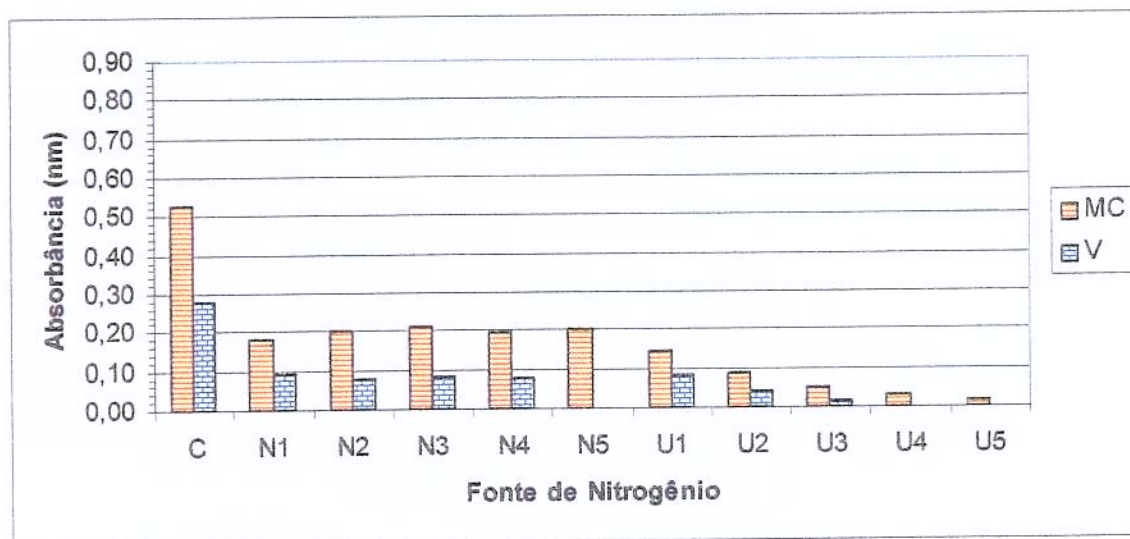


Figura 5.4 Efeitos das fontes de nitrogênio (sulfato de amônio e uréia) sobre a produção de massa celular e violaceína bruta, pelo *C. violaceum* após 36 h de fermentação .

Legenda,

Fonte de Nitrogênio	
C = controle	
N1 = $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,1% p/v)	U1 = Uréia (0,1% p/v)
N2 = $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,3% p/v)	U2 = Uréia (0,3% p/v)
N3 = $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,5% p/v)	U3 = Uréia (0,5% p/v)
N4 = $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0,8% p/v)	U4 = Uréia (0,8% p/v)
N5 = $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,0% p/v)	U5 = Uréia (1,0% p/v)

5.1.3.2 Planejamento fatorial fracionário (triagem de variáveis)

As respostas do planejamento fatorial para produção de massa celular (MC) e violaceína bruta (V) são mostrados na Tabela 5.3. Os dados apresentados são valores médios, sendo os valores das replicatas apresentados nas Tabelas 5.5 e 5.7.

Tabela 5.3 Planejamento fatorial fracionário de resolução III (2^{15-11}) e a matriz de planejamento utilizado na triagem de variáveis.

Fatores		N í v e i s	
		(-)	(+)
1	D-glicose	0.25 % (p/v)	1.00 % (p/v)
2	Extrato de levedura	0.1 % (p/v)	0.6 % (p/v)
3	DL-Metionina	0.01 g l ⁻¹	0.100 g l ⁻¹
4	Vit-B12 (cianocobalamina)	0.012 ng ml ⁻¹	0.100 µg ml ⁻¹
5	L-triptofano	0.02 % (p/v)	0.10 % (p/v)
6	Agitação	150 rpm	250 rpm
7	Temperatura	28 °C	33 °C
8	pH (tampão fosfato)	6.8	7.8
9	Peptona bacteriológica	0.2 % (p/v)	0.8 % (p/v)
10	Inóculo	1.0 % (v/v)	5.0 % (v/v)
11	Sulfato de zinco	0.05 mM	0.1 mM

Exp.	Fatores reais											Fatores virtuais				Respostas	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	MC (g/L)	V (g/L)
1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	3,56	0,21
2	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	7,34	0,10
3	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	3,69	0,14
4	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	4,32	0,07
5	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	5,33	0,20
6	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	6,84	0,08
7	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	6,71	0,17
8	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	0,78	0,00
9	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	3,05	0,05
10	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	0,00	0,00
11	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	5,96	0,13
12	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	11,63	0,14
13	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	4,06	0,09
14	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	6,33	0,07
15	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	5,20	0,14
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	8,23	0,17

MC=massa celular seca (g/L); V=violaceína bruta (g/L)

5.1.3.2.1 Produção de massa celular g/L (MC)

A partir dos valores médios das respostas para produção de MC (Tabela 5.3) foram calculados os valores dos efeitos (contrastes) de cada fator, como mostrado na Tabela 5.4. Estes foram determinados, com 95% de confiança. A comparação de ambas as respostas, MC e V, são apresentadas na Tabela 5.8.

Tabela 5.4 Efeitos calculados na fração 2^{15-11} , para a resposta produção MC (g/L)

Fator		Efeitos
1	Fonte de carbono (D-glicose)	$l_1 = 0,99 \pm 0,199$
2	Extrato de levedura	$l_2 = 1,25 \pm 0,199$
3	DL Metionina	$l_3 = 0,50 \pm 0,199$
4	Vit-B12 (cianocobalamina)	$l_4 = 0,74 \pm 0,199$
5	L-triptofano	$l_5 = -0,17 \pm 0,199$
6	Agitação	$l_6 = -0,76 \pm 0,199$
7	Temperatura	$l_7 = 0,86 \pm 0,199$
8	pH (Tampão fosfato)	$l_8 = -1,62 \pm 0,199$
9	Peptona bacteriológica	$l_9 = 3,13 \pm 0,199$
10	Inóculo	$l_{10} = 0,32 \pm 0,199$
11	ZnSO ₄	$l_{11} = -1,53 \pm 0,199$
12	(=124)	$l_{12} = 2,51 \pm 0,199$
13	(=134)	$l_{13} = 1,44 \pm 0,199$
14	(=234)	$l_{14} = -1,24 \pm 0,199$
15	(=1234)	$l_{15} = -0,49 \pm 0,199$
Média global		$5,18 \pm 0,099$

Tabela 5.5 Dados da produção de MC (g/L) realizados em duplicata no processo de triagem e suas respectivas médias, variância (S^2) e graus de liberdade (ν_i).

Ensaio	Resposta das replicatas		Média	S^2	ν_i
	1	2			
1	3,95	3,18	3,5650	0,29645	1
2	6,92	7,86	7,3900	0,44180	1
3	3,50	3,88	3,6900	0,07220	1
4	3,67	4,85	4,2600	0,69620	1
5	5,22	5,33	5,2750	0,00605	1
6	6,07	7,52	6,7950	1,05125	1
7	6,68	6,78	6,7300	0,00500	1
8	0,00	1,66	0,8300	1,37780	1
9	3,26	2,88	3,0700	0,07220	1
10	0,00	0,00	0,0000	0,00000	1
11	5,93	5,96	5,9450	0,00045	1
12	11,27	11,92	11,5950	0,21125	1
13	3,78	4,30	4,0400	0,13520	1
14	6,20	6,56	6,3800	0,06480	1
15	4,88	5,61	5,2450	0,26645	1
16	7,76	8,64	8,2000	0,38720	1
Média = 5,1881				$\Sigma = 5,08430$	$\Sigma = 16$

- Cálculo do erro de medida (S_p^2)

$$S_p^2 = \Sigma (\nu_1 S_1^2 + \nu_2 S_2^2 + \dots + \nu_{16} S_{16}^2) / \Sigma (\nu_1 + \nu_2 + \dots + \nu_{16})$$

$$S_p^2 = \Sigma (5,0843) / 16 = 0,3178$$

$$S_p = 0,5637$$

onde, (ν = graus de liberdade; S^2 = variância; S_p = variância agregada)

- Cálculo do erro Padrão da média global ($S_{(R)}$)

$$S_{(R)}^2 = S_p^2 / N \Rightarrow S = (S_p^2 / N)^{1/2} ; \text{ onde } N = n^o \text{ total de experimentos}$$

$$S_{(R)} = (0,3178/32)^{1/2} = 0,0997$$

- Cálculo do erro Padrão do Efeito ($S_{(ef)}$)

$$S^2_{(ef)} = S^2(R_+) + S^2(R_-) = S_p^2/16 + S_p^2/16 = S_p^2/8 \Rightarrow S_{(ef)} = (S_p^2/8)^{1/2}$$

$$S_{(ef)} = (0,3178/8)^{1/2} = 0,1993$$

- Cálculo do Intervalo de confiança:

Para saber se os efeitos calculados são estatisticamente significativos, isto é, diferentes de zero, foi empregado o teste-t. Só foi considerado significativo o efeito cujo valor absoluto excedeu o resultado do cálculo da fórmula abaixo, $(0 + t_{\alpha/2, \%} * S_{(ef)})$:

$$0 \pm (t_{16, 95\%}) \times \text{erro Padrão} = 0 \pm 2,120 \times 0,1993 = | 0,4225 |$$

- Cálculo da estimativa do erro Padrão dos contrastes que utilizou as colunas de sinais virtuais (colunas 12, 13, 14 e 15).

$$S^2 = \text{valor (Ef)} = \{ [Ef(12)]^2 + [Ef(13)]^2 + [Ef(14)]^2 + [Ef(15)]^2 \} / 4$$

$$S_{(efv)} = [\{ (2,51)^2 + (1,44)^2 + (-1,24)^2 + (-0,49)^2 \} / 4]^{1/2} =$$

$$S_{(efv)} = 1,5931$$

- Cálculo do Teste-F entre a variância dos fatores reais ($S^2_{(ef)}$) e a variância dos fatores virtuais ($S^2_{(efv)}$), com 95% de confiança.

$$S^2_{(efv)} / S^2_{(ef)} \approx (\sigma^2_{(efv)} / \sigma^2_{(ef)}) F_{\sqrt{(efv)}, \sqrt{(ef)}, 95\%}$$

$$2,5378 / 0,03972 = 63,89 > F_{4, 16, 0.05} = 3,01 \quad (\text{é significativo})$$

Como o F (tabelado) < F (calculado) há evidência que as variâncias populacionais (σ^2) dos efeitos reais e dos efeitos virtuais sejam diferentes. Portanto o teste- F é significativo com 95% de confiança.

Devemos lembrar que os cálculos dos erros virtuais somente são válidos se não existirem efeitos de interação entre os fatores 1 a 11.

5.1.3.2.2 Produção de violaceína bruta g/L (V)

A partir dos valores médios das respostas para produção de violaceína bruta (Tabela 5.3), foram calculados os valores dos efeitos (contrastes) de cada fator, como mostrado na Tabela 5.6. Estes foram determinados, com 95% de confiança. A comparação de ambas as respostas, MC e V, são apresentadas na Tabela 5.8.

Tabela 5.6 Efeitos calculados na fração 2^{15-11} , para a resposta produção V (g/L).

Fator	Efeitos
1 Fonte de carbono (D-glicose)	$l_1 = -0,056 \pm 0,008$
2 Extrato de levedura	$l_2 = 0,013 \pm 0,008$
3 DL Metionina	$l_3 = 0,014 \pm 0,008$
4 Vit-B12 (cianocobalamina)	$l_4 = -0,027 \pm 0,008$
5 L-triptofano	$l_5 = 0,017 \pm 0,008$
6 Agitação	$l_6 = -0,012 \pm 0,008$
7 Temperatura	$l_7 = 0,042 \pm 0,008$
8 PH (Tampão fosfato)	$l_8 = -0,006 \pm 0,008$
9 Peptona bacteriológica	$l_9 = 0,066 \pm 0,008$
10 Inóculo (com 10 hs e ABS = 0,26)	$l_{10} = 0,034 \pm 0,008$
11 ZnSO ₄	$l_{11} = -0,019 \pm 0,008$
12 (=124)	$l_{12} = 0,017 \pm 0,008$
13 (=134)	$l_{13} = 0,016 \pm 0,008$
14 (=234)	$l_{14} = -0,003 \pm 0,008$
15 (=1234)	$l_{15} = 0,006 \pm 0,008$
Média global	$0,1066 \pm 0,004$

Tabela 5.7 Dados da produção de V (g/L) realizados em duplicata no processo de triagem e suas respectivas médias, variância (S^2) e graus de liberdade (ν_i).

Ensaio	Respostas das replicatas		Média	S^2	ν_i
	1	2			
1	0,24	0,18	0,2100	0,00180	1
2	0,09	0,11	0,1000	0,00020	1
3	0,13	0,14	0,1350	0,00005	1
4	0,08	0,07	0,0750	0,00005	1
5	0,18	0,21	0,1950	0,00045	1
6	0,07	0,09	0,0800	0,00020	1
7	0,16	0,17	0,1650	0,00005	1
8	0,00	0,00	0,0000	0,00000	1
9	0,05	0,05	0,0500	0,00000	1
10	0,00	0,00	0,0000	0,00000	1
11	0,07	0,10	0,0850	0,00045	1
12	0,14	0,13	0,1350	0,00005	1
13	0,08	0,10	0,0900	0,00020	1
14	0,08	0,07	0,0750	0,00005	1
15	0,11	0,17	0,1400	0,00180	1
16	0,13	0,20	0,1650	0,00245	1
Media = 0,1063				$\Sigma = 0,00780$	$\Sigma = 16$

- Cálculo do erro de medida (S_p^2)

$$S_p^2 = \sum (\nu_1 S_1^2 + \nu_2 S_2^2 + \dots + \nu_{16} S_{16}^2) / \sum (\nu_1 + \nu_2 + \dots + \nu_{16})$$

$$S_p^2 = 0,0079 / 16 = 0,000488$$

$$S_p = 0,0221$$

- Cálculo do erro Padrão da média global ($S_{(y)}$)

$$S^2_{(R)} = S_p^2 / N \Rightarrow S = (S_p^2 / N)^{1/2} ; \text{ onde } N = n^\circ \text{ total de experimentos.}$$

$$S^2_{(R)} = (0,000488/32)^{1/2} = 0,0039$$

- Cálculo do erro Padrão do Efeito ($S_{(ef)}$)

$$S^2_{(Ef)} = S^2(R_+) + S^2(R_-) = S_p^2/16 + S_p^2/16 = S_p^2/8 \Rightarrow S_{(ef)} = (S_p^2/8)^{1/2}$$

$$S_{(ef)} = (0,000488/8)^{1/2} = 0,008$$

- Cálculo do Intervalo de confiança:

Para saber se os efeitos calculados são estatisticamente significativos, isto é, diferentes de zero, foi empregado o teste-t. Só foi considerado significativo o efeito cujo valor absoluto excedeu o resultado do cálculo da fórmula abaixo, $(0 + t_{\alpha/2, \%} * S_{(ef)})$:

$$0 \pm (t_{16, 95\%}) \text{ erro Padrão} = 0 \pm 2,120 \times 0,008 = | 0,01696 |$$

- Cálculo da estimativa do erro Padrão dos efeitos, utilizando as colunas de sinais virtuais (colunas 12, 13, 14 e 15) para a resposta V.

$$S^2 = \text{Valor (Ef)} = \{ [Ef(12)]^2 + [Ef(13)]^2 + [Ef(14)]^2 + [Ef(15)]^2 \} / 4$$

$$S_{(efv)} = [\{ (0,0169)^2 + (0,0156)^2 + (-0,0031)^2 + (0,0056)^2 \} / 4]^{1/2} =$$

$$S_{(efv)} = 0,0119$$

- Cálculo do Teste-F entre a variância dos fatores reais ($S^2_{(ef)}$) e a variância dos fatores virtuais ($S^2_{(efv)}$), com 95% de confiança.

$$S^2_{(efv)} / S^2_{(ef)} \approx (\sigma^2_{(efv)} / \sigma^2_{(ef)}) \quad F_{\sqrt{(ef)}, \sqrt{(efv)}, 95\%}$$

$$0,000142 / 0,00006325 = 2,25 < F_{4,16, 0.05} = 3,01$$

Como o F (tabelado) $>$ F (calculado) não há evidência que as variâncias populacionais (σ^2) dos efeitos reais e dos efeitos virtuais sejam diferentes. Portanto não são significativos com 95% de confiança.

Tabela 5.8 Efeitos significativos estatisticamente com confiança de 95% para produção de MC (g/L) e V (g/L), obtidos a partir dos dados da Tabela 5.3.

Fatores	E f e i t o s	
	MC	V
Peptona	3,13 $\pm$ 0,20	0,066 $\pm$ 0,008
Temperatura	0,86 $\pm$ 0,20	0,042 $\pm$ 0,008
Glicose	0,99 $\pm$ 0,20	-0,056 $\pm$ 0,008
Inóculo	0,30 $\pm$ 0,20	0,034 $\pm$ 0,008
Vit- B12	0,74 $\pm$ 0,20	-0,027 $\pm$ 0,008
ZnSO ₄	-1,53 $\pm$ 0,20	-0,019 $\pm$ 0,008
L-triptofano	-----	0,017 $\pm$ 0,008
Extr. Levedura	1,25 $\pm$ 0,20	0,013 $\pm$ 0,008
DL-Metionina	0,50 $\pm$ 0,20	0,014 $\pm$ 0,008
Agitação	-0,76 $\pm$ 0,20	0,012 $\pm$ 0,008
PH	-1,62 $\pm$ 0,20	-----

5.1.3.3 Análise de superfície de resposta com 5 fatores

Para a escolha dos fatores que compuseram o planejamento composto central, não foi levado em consideração apenas os resultados matemáticos do planejamento fatorial fracionário. Também teve um grande peso o conhecimento sobre o sistema que estava em estudo.

Com base nos resultados do planejamento fatorial fracionário, um planejamento composto central foi realizado, visando aumentar a produção de MC e V (Tabela 5.9). A temperatura, agitação e o inóculo foram fixados em seus níveis superiores em relação ao fatorial fracionário, sendo 33 °C, 300 rpm e 5% (0,350 mL; ABS = 0,71 nm, $\lambda = 720$ nm; diluição: 1 mL células + 2 mL água dest.), respectivamente. O tampão fosfato, a metionina e a vit.B12 foram excluídos.

Tabela 5.9 Matriz do planejamento experimental com cinco fatores, 2^5 , e os resultados para produção de MC e V, após 36 h de fermentação.

Fatores	Níveis				
	(-2)	(-1)	(0)	(+1)	(+2)
1 Glicose	0,1 %	0,3 %	0,5 %	0,7 %	0,9 %
2 Ext. levedura	0,2 %	0,4 %	0,6 %	0,8 %	1,0 %
3 Peptona	0,1 %	0,3 %	0,5 %	0,7 %	0,9 %
4 Triptofano	0,02 %	0,04 %	0,06 %	0,08 %	0,10 %
5 ZnSO ₄	0,025 mM	0,0375 mM	0,05 mM	0,0625 mM	0,075 mM

Exp.	Glic	Leve	Pep	Trip	Zinc	Respostas	
						MC (g/L)	V (g/L)
1	-1	-1	-1	-1	1	4,57	0,18
2	1	-1	-1	-1	-1	7,22	0,17
3	-1	1	-1	-1	-1	5,45	0,21
4	1	1	-1	-1	1	10,88	0,25
5	-1	-1	1	-1	-1	3,69	0,18
6	1	-1	1	-1	1	8,10	0,20
7	-1	1	1	-1	1	5,20	0,19
8	1	1	1	-1	-1	9,11	0,21
9	-1	-1	-1	1	-1	4,69	0,19
10	1	-1	-1	1	1	7,72	0,22
11	-1	1	-1	1	1	6,21	0,25
12	1	1	-1	1	-1	12,51	0,27
13	-1	-1	1	1	1	3,94	0,19
14	1	-1	1	1	-1	8,60	0,24
15	-1	1	1	1	-1	4,69	0,20
16	1	1	1	1	1	11,13	0,34
17	-2,0	0	0	0	0	2,42	0,14
18	2,0	0	0	0	0	13,15	0,29
19	0	-2,0	0	0	0	7,47	0,21
20	0	2,0	0	0	0	9,49	0,27
21	0	0	-2,0	0	0	9,99	0,29
22	0	0	2,0	0	0	6,71	0,25
23	0	0	0	-2,0	0	8,10	0,18
24	0	0	0	2,0	0	8,86	0,28
25	0	0	0	0	-2,0	7,97	0,26
26	0	0	0	0	2,0	8,23	0,27
27*	0	0	0	0	0	6,59	0,22
28*	0	0	0	0	0	7,22	0,21
29*	0	0	0	0	0	6,33	0,22
30*	0	0	0	0	0	7,72	0,24
31*	0	0	0	0	0	7,47	0,27
32*	0	0	0	0	0	7,72	0,27

* Ponto Central

5.1.3.3.1 Produção de massa celular g/L (MC)

Utilizando ferramentas estatísticas, tais como, análise de variância (ANOVA), teste-F e determinação do intervalo de confiança, foi possível fazer a validação do modelo, isto é, foi possível determinar qual o modelo (linear ou quadrático) que melhor representou a produção de MC. Deste modo, as Tabelas da análise de variância (ANOVA) que estão apresentadas neste capítulo referem-se apenas ao modelo que foi mais significativo. Para os modelos não significativos ou menos significativos, foram feitos apenas a discussão dos dados. O intervalo de confiança utilizado foi de 95%. A análise de variância para a produção de MC está apresentada na Tabela 5.10.

Tabela 5.10 Análise de variância (ANOVA) para o ajuste do modelo linear da produção de MC (g/L) em relação aos dados da Tabela 5.9.

Fonte de Variação	SQ	Nº g. l.	MQ	F	F (tabelado)
Regressão	166,8354	5	33,3671	36,74	2,59
Resíduo	23,6142	26	0,9082		
Falta de ajuste	21,8748	21	1,0417	2,99	4,55
Erro puro	1,7394	5	0,3479		
Total	190,4496	31			

SQ = Soma Quadrática

MQ = Média Quadrática

g.l = graus de liberdade

% de variação explicada: 87,60

% máxima de variação explicável: 99,09

A comparação do valor da razão ($MQ_{faj} / MQ_{ep} = 2,99$) com ($F_{21,5} = 4,55$) indica que não há falta de ajuste do modelo linear. Do mesmo modo, a comparação do valor da razão ($MQ_R / MQ_T = 36,74$) com ($F_{5,26} = 2,59$) indica uma regressão estatisticamente significativa. Isto nos autoriza a determinar os intervalos de confiança para os parâmetros do modelo. Todos

os coeficientes de segunda ordem (tais como, G^2 , T^2 , GT , etc.) não foram significativos. A equação de regressão do modelo linear para produção de MC é dado pela equação 5.1:

$$MC = 7,47^* + 2,43G^* + 0,86E^* - 0,47P^* + 0,28T + 0,09Z \quad (5.1)$$

$(\pm 0,1685) \quad (\pm 0,1945) \quad (\pm 0,1945) \quad (\pm 0,1945) \quad (\pm 0,1945) \quad (\pm 0,1945)$

onde G, E, P, T, e Z representam os valores codificados para glicose, extrato de levedura, peptona, triptofano, e sulfato de zinco respectivamente, e os asteriscos representam os termos significativos com 95%.

O modelo quadrático é inadequado, porque apresenta falta de ajuste ($MQ_{faj} / MQ_{ep} = 5,93$; $F_{6, 5, 95\%} = 4,95$).

Os gráficos de superfície de resposta dos fatores, dados pela equação (5.1), para produção de MC estão representados pelas figuras 5.5, 5.7, 5.9 e 5.11.

5.1.3.4 Produção de violaceína bruta g/L (V)

A análise de variância para a produção de V é apresentado na Tabela 5.11. O modelo linear não mostra falta de ajuste ($MQ_{faj}/MQ_{ep} = 1,50 < F_{21, 5, 0,05\%} = 4,55$) e a proporção ($MQ_R/MQ_r = 8,70$) é substancialmente maior que o F tabelado ($F_{5, 26, 0,05\%} = 2,59$) mostrando que a regressão é significativa com confiança de 95%. Todos os coeficientes de segunda ordem (tais como G^2 , T^2 , GT , etc.) não foram significativos. A equação de regressão do modelo linear para a produção de V é dado pela equação 5.2:

$$V = 0,23^* + 0,0266G^* + 0,0199E^* + 0,0212T^* - 0,0038P + 0,0074Z \quad (5.2)$$

$(\pm 0,0053) \quad (\pm 0,0061) \quad (\pm 0,0061) \quad (\pm 0,0061) \quad (\pm 0,0061) \quad (\pm 0,0061)$

onde G, E, T, P e Z representam os valores codificados para glicose, extrato de levedura, triptofano, peptona e sulfato de zinco respectivamente, e os asteriscos representam os termos significativos com 95%.

Tabela 5.11 Análise de variância (ANOVA) para o ajuste do modelo linear da produção V (g/L) referente aos dados da tabela 5.9.

Fonte de variação	SQ	Nº g. l.	MQ	F	F (tabelado)
Regressão (R)	0,0388	5	0,0078	8,70	2,59
Resíduo (r)	0,0232	26	0,0009		
F. ajuste (faj)	0,0200	21	0,0010	1,50	4,55
Erro puro (ep)	0,0032	5	0,0006		
Total	0,0621	31			

SQ = Soma Quadrática; MQ = Média Quadrática; g.l = graus de liberdade

% de variação explicada: 62,58

% máxima de variação explicável: 94,88

O alternativo modelo quadrático não mostrou falta de ajuste ($MQ_{faj} / MQ_{ep} = 1,80$; $F_{6, 5, 95\%} = 4,95$), mas não é tão significativa quanto o modelo linear ($MQ_R/MQ_T=2,86 \approx 2,65$). Todos os coeficientes dos termos de segunda ordem (tais como G^2 , T^2 , GT, etc.) não são significativos com 95% de confiança.

O gráfico de superfície de resposta dos fatores, dados pela equação (5.2) para produção de V estão representados pelas Figuras 5.6, 5.8, 5.10 e 5.12.

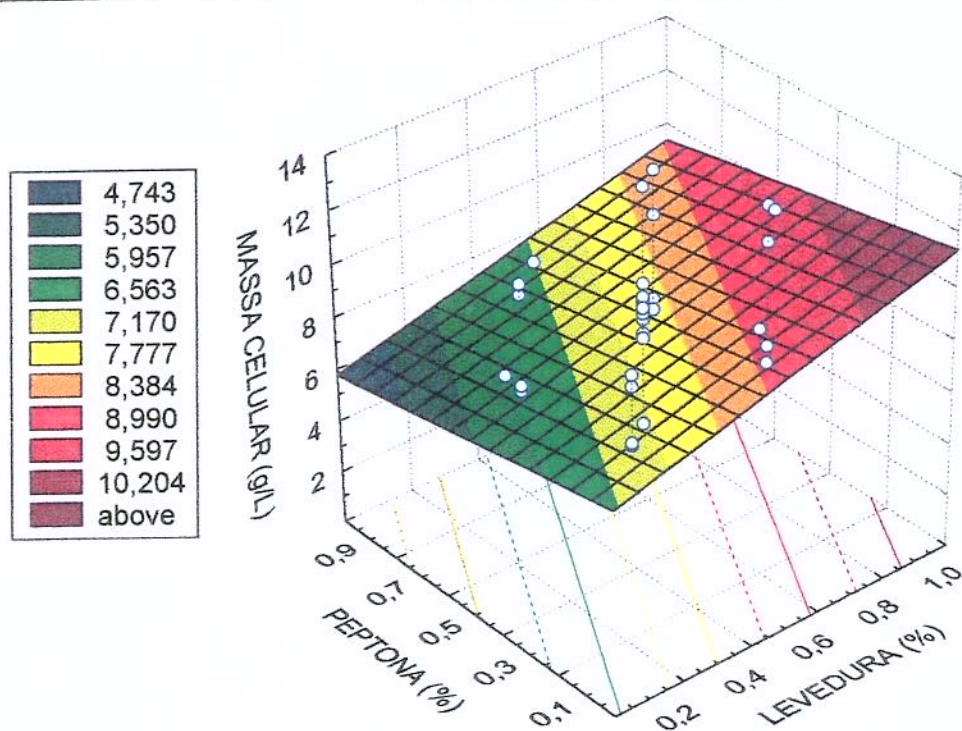


Figura 5.5 Superfície de resposta para produção de MC (g/L), mostra que aumentos nos níveis de extrato de levedura (%) e diminuição nos níveis de peptona (%) levam a aumentos da produção de MC (g/L).

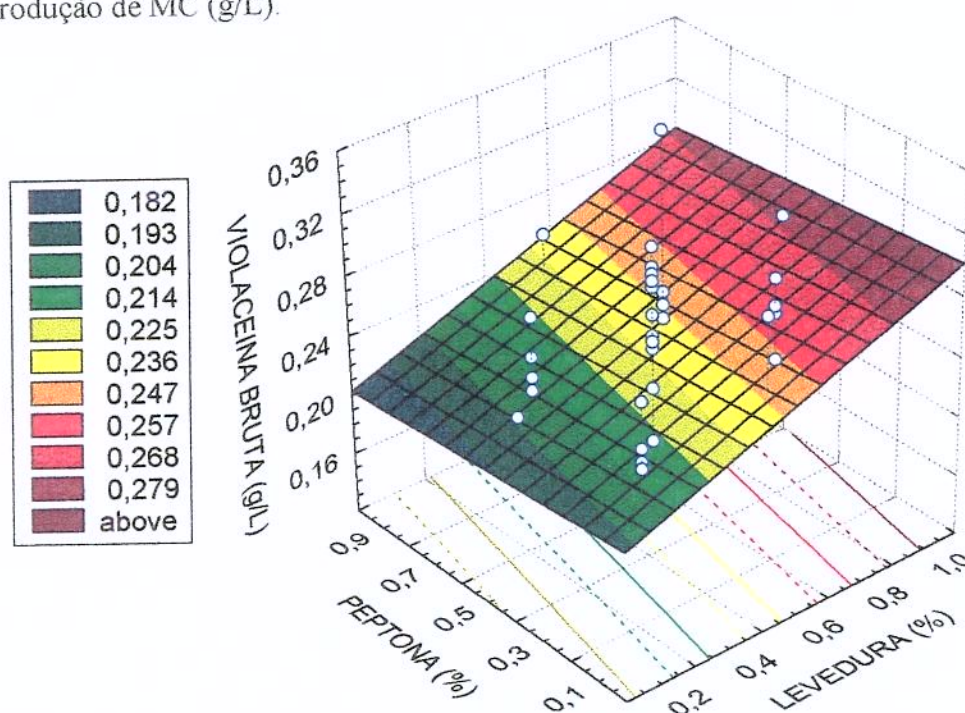


Figura 5.6 Superfície de resposta para produção de V (g/L), mostra que aumentos nos níveis de extrato de levedura (%) levam a aumentos da produção de violaceína bruta (g/L). A peptona não foi estatisticamente significativa nos níveis investigados.

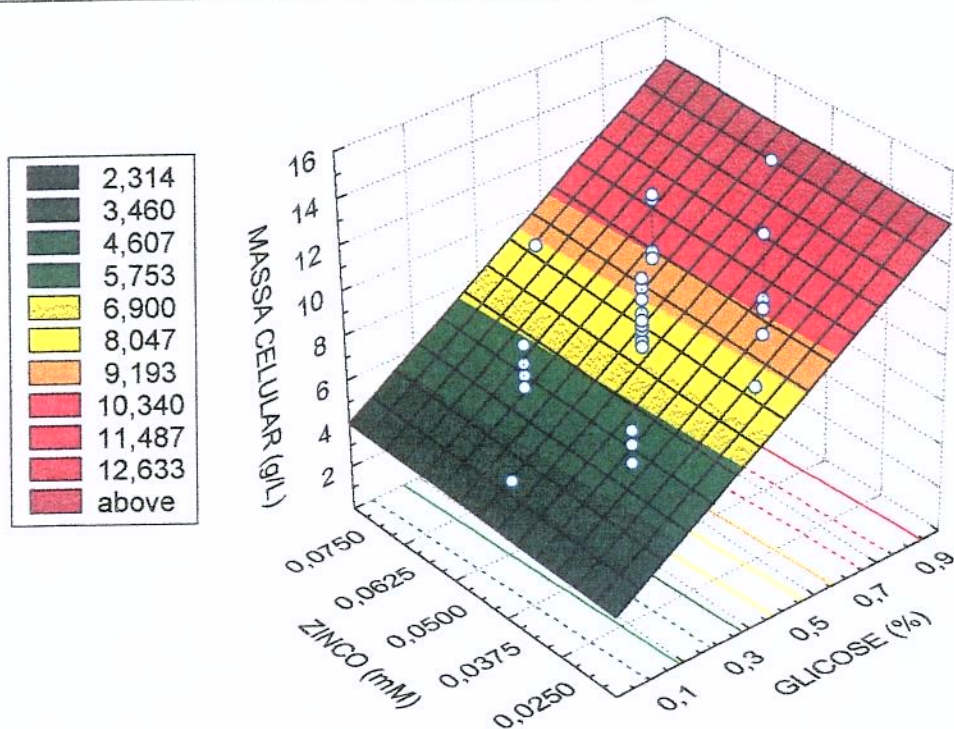


Figura 5.7 Superfície de resposta para produção de MC (g/L), mostra que o zinco (mM) não foi estatisticamente significativo para produção de MC (g/L). Observar as linhas de contorno paralelas ao eixo do zinco.

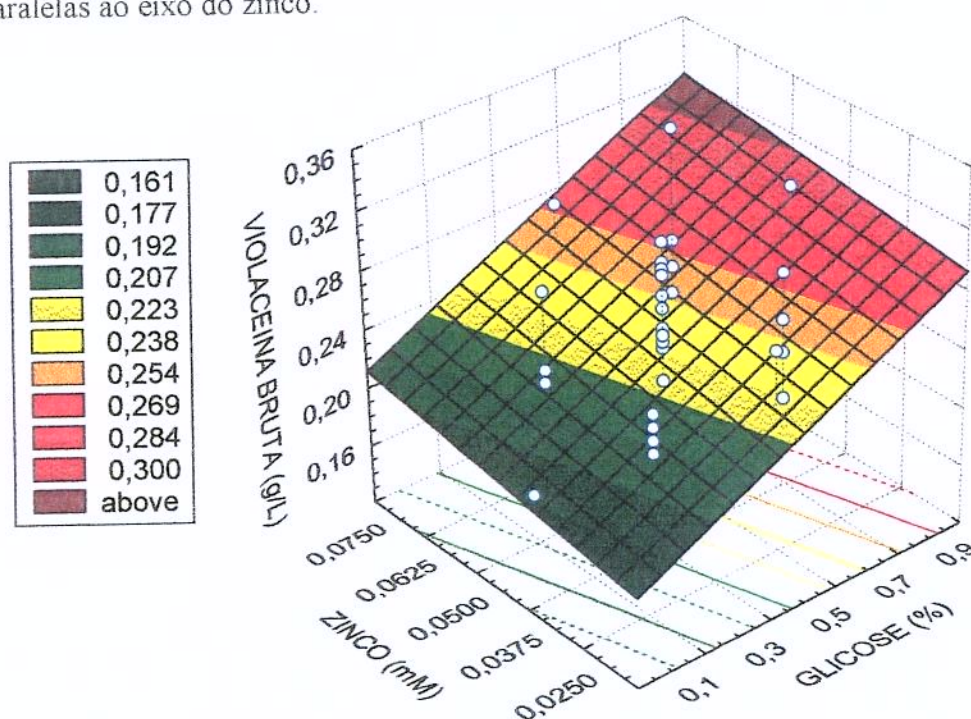


Figura 5.8 Superfície de resposta para produção de V (%), mostra que aumentos nos níveis de zinco (mM) e glicose (%) levam a aumentos da produção de V (g/L).

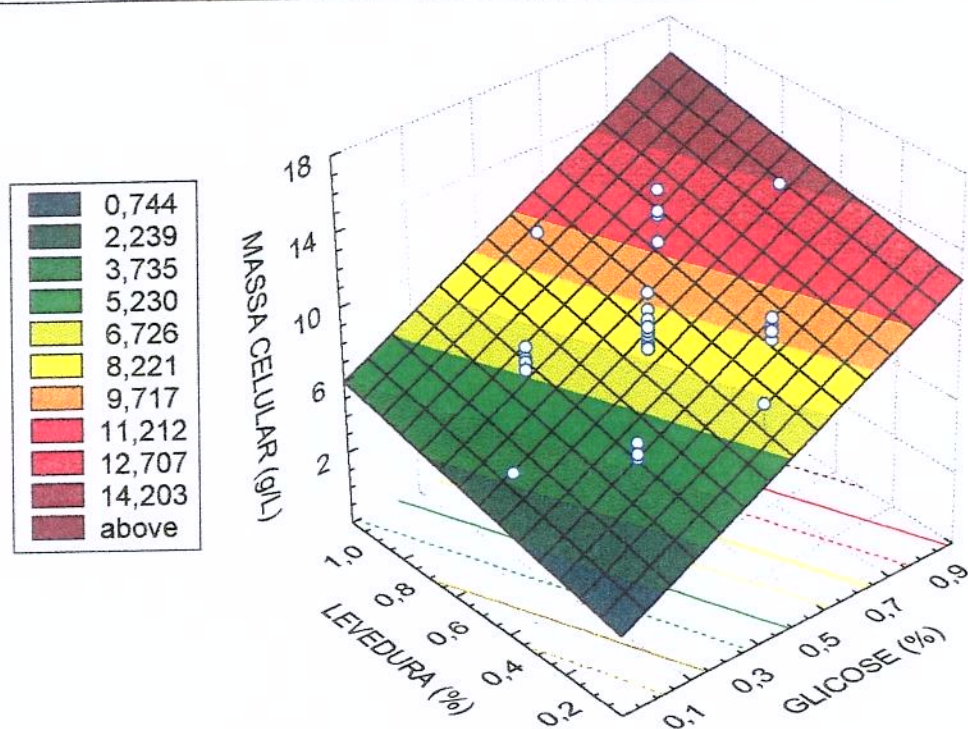


Figura 5.9 Superfície de resposta para produção de MC (g/L), mostra que aumentos nos níveis de levedura (%) e glicose (%) levam a aumentos da produção de MC (g/L).

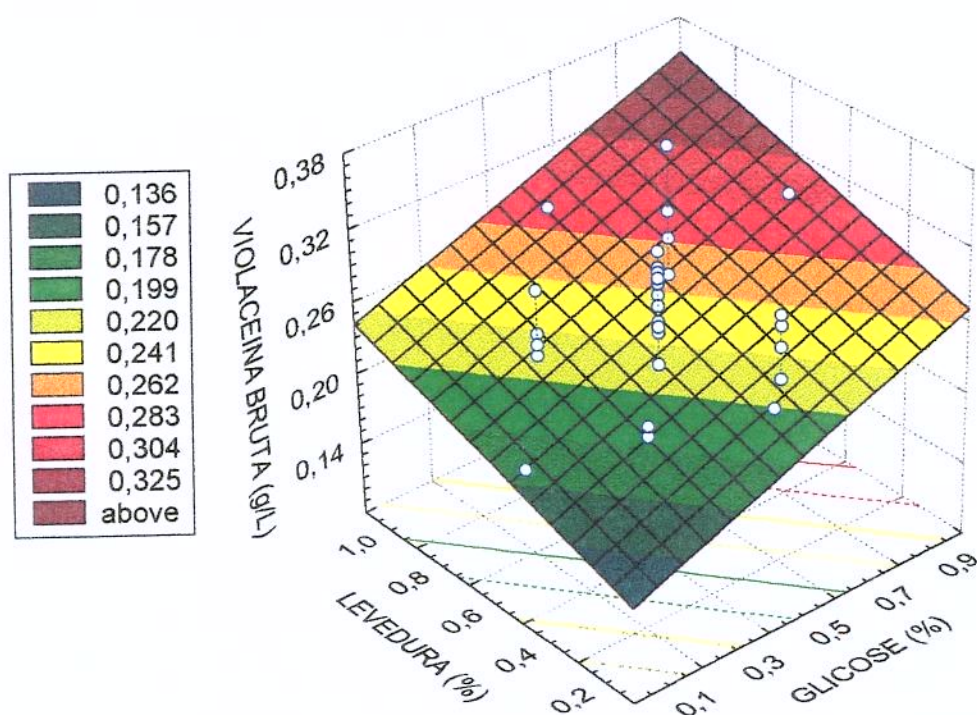


Figura 5.10 Superfície de resposta para produção de V (g/L), mostra que aumentos nos níveis de levedura (%) e glicose (%) levam a aumentos da produção de V (g/L).

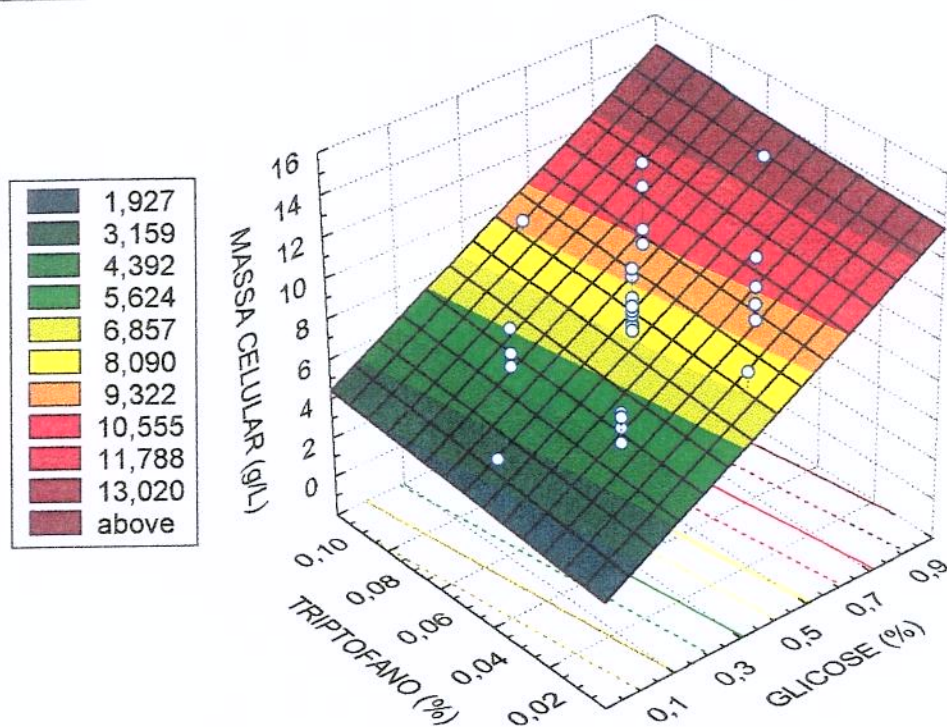


Figura 5.11 Superfície de resposta para produção de MC (g/L), mostra que o triptofano não foi estatisticamente significativo para a produção de MC (g/L). Observar as linhas de contorno quase paralelas ao eixo do triptofano.

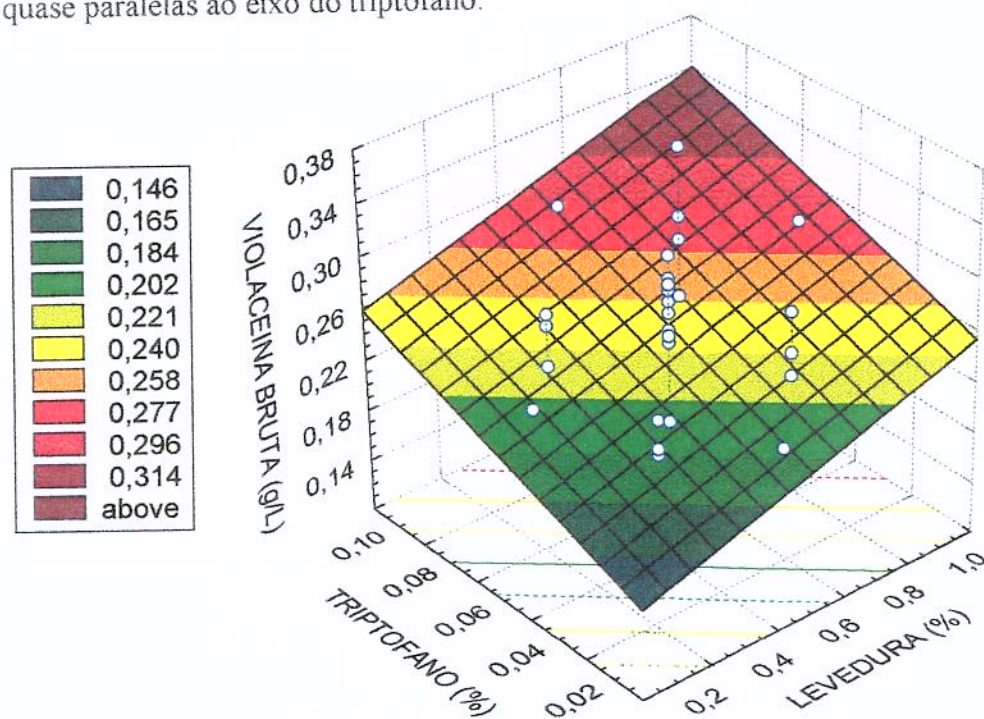


Figura 5.12 Superfície de resposta para produção de V (g/L), mostra que o triptofano (%) apresentou um efeito significativo e positivo para a produção de V (g/L).

5.1.3.4 Análise de superfície de resposta com 3 fatores

Com base nos resultados do planejamento composto central de 5 fatores foi planejado um outro planejamento fatorial com 3 fatores (glicose, extrato de levedura e triptofano), sendo os resultados mostrados na Tabela 5.12.

Tabela 5.12 Matriz do planejamento experimental com três fatores, 2^3 , e os resultados para produção de MC e V, após 36 h de fermentação.

Fatores		Níveis				
		(-1,68)	(-1)	(0)	(+1)	(+1,68)
1	Glicose	0,5%	0,84%	1,04%	1,24%	1,58%
2	Extrato de Levedura	0,6%	0,94%	1,14%	1,34%	1,68%
3	Triptofano	0,06%	0,094%	0,114%	0,134%	0,168%

Exp.	Glicose	Levedura	Triptofano	Respostas	
				MC (g/L)	V (g/L)
1	-1	-1	-1	15,42	0,35
2	1	-1	-1	15,29	0,35
3	-1	1	-1	17,56	0,39
4	1	1	-1	18,82	0,41
5	-1	-1	1	16,05	0,37
6	1	-1	1	14,91	0,31
7	-1	1	1	17,94	0,44
8	1	1	1	17,81	0,35
9	-1,68	0	0	12,89	0,37
10	1,68	0	0	16,30	0,32
11	0	-1,68	0	10,88	0,28
12	0	1,68	0	21,09	0,43
13	0	0	-1,68	17,43	0,33
14	0	0	1,68	17,18	0,36
15*	0	0	0	16,80	0,32
16*	0	0	0	18,06	0,38
17*	0	0	0	17,56	0,37
18*	0	0	0	16,55	0,35

* Ponto Central

Os fatores não significativos para a produção de V, no planejamento com 5 fatores, tais como peptona e o sulfato de zinco, foram fixados nos seus níveis mais convenientes, 0,1%

e 0,0625 mM respectivamente. A temperatura foi fixada em 33 °C, a agitação do shaker em 300 rpm e o inóculo em 5%.

5.1.3.4.1 Produção de massa celular g/L (MC)

A análise de variância para a produção de MC é apresentado na Tabela 5.13. O modelo linear não apresentou falta de ajuste nos limites investigados ($MQ_{faj} / MQ_{ep} = 5,00$; $F_{11, 3, 95\%} = 8,76$) e a comparação do valor da razão MQ_R / MQ_T com o F tabelado indica uma regressão estatisticamente significativa no nível de 95% ($MQ_R / MQ_T = 9,71$; $F_{3, 14, 95\%} = 3,34$). Todos os coeficientes de segunda ordem (tais como G^2 , T^2 , GT^2 , etc.) não foram significativos. A equação de regressão do modelo linear para produção MC é dada pela equação 5.3.

Tabela 5.13 Análise de variância (ANOVA) para o ajuste do modelo linear da produção de MC (g/L) referente aos dados da tabela 5.12.

Fonte de variação	SQ	Nº g. l.	MQ	F	F (tabelado)
Regressão	58,3030	3	19,4343	9,71	3,34
Resíduo	28,0146	14	2,0010		
F. ajuste	26,5668	11	2,4152	5,00	8,76
Erro puro	1,4477	3	0,4826		
Total	86,3176	17			

SQ = Soma Quadrática MQ = Média Quadrática g.l = graus de liberdade

% de variação explicada: 67,54

% máxima de variação explicável: 98,32

$$MC = 16,59^* + 0,41G + 2,03E^* - 0,06T \quad (5.3)$$

$(\pm 0,3334) \quad (\pm 0,3829) \quad (\pm 0,3829) \quad (\pm 0,3829)$

onde G, E e T representam os valores codificados para glicose, extrato de levedura e triptofano, respectivamente e os asteriscos representam os termos significativos ao nível de 95%.

O modelo quadrático não apresenta falta de ajuste ($MQ_{faj} / MQ_{ep} = 6,51$; $F_{5, 3, 0,05\%} = 9,01$), mas apresenta uma baixa correlação ($MQ_R / MQ_T = 3,53$; $F_{9, 8, 0,05\%} = 3,54$) em relação ao modelo linear.

O gráfico de superfície de resposta dos fatores significativos, dado pela equação (5.3), para produção de MC está representado pela figura 5.13.

5.1.3.4.2 Produção de violaceína bruta g/L (V)

A análise de variância para a produção V é apresentado na Tabela 5.14. A comparação do valor da razão ($MQ_{faj} / MQ_{ep} = 1,04$; $F_{11, 3, 95\%} = 8,76$) mostra que não apresenta falta de ajuste para o modelo linear nos limites investigados. Do mesmo modo a comparação da razão MQ_R / MQ_T com o F tabelado indica uma regressão estatisticamente significativa ao nível de 95% ($MQ_R / MQ_T = 8,29$; $F_{3, 14, 95\%} = 3,34$). A equação de regressão do modelo linear é representada pela equação 5.4. Todos os coeficientes de segunda ordem (tais como G^2 , E^2 , GE^2 , etc.) não foram significativos.

$$V = 0,36^* - 0,0156G^* + 0,033E^* + 0,0012T \quad (5.4)$$

$(\pm 0,007) \quad (\pm 0,007) \quad (\pm 0,007) \quad (\pm 0,007)$

onde G, E e T representam os valores codificados para glicose, extrato de levedura e triptofano, respectivamente e os asteriscos representam os termos significativos ao nível de 95%.

Tabela 5.14 Análise de variância (ANOVA) para o ajuste do modelo linear da produção V (g/L), referente aos dados da Tabela 5.12.

Fonte de variação	SQ	Nº g. l.	MQ	F	F (tabelado)
Regressão (R)	0,0183	3	0,0061	8,29	3,34
Resíduo (r)	0,0103	14	0,0007		
F. ajuste (faj)	0,0082	11	0,0007	1,04	8,76
Erro puro (ep)	0,0021	3	0,0007		
Total	0,0286	17			

SQ = Soma Quadrática MQ = Média Quadrática g.l = graus de liberdade

% de variação explicada: 63,99

% máxima de variação explicável: 92,51

O modelo quadrático não apresenta falta de ajuste ($MQ_{faj} / MQ_{ep} = 1,09$; $F_{5, 3, 95\%} = 9,01$), mas apresenta uma baixa correlação ($MQ_R / MQ_r = 3,32$; $F_{9, 8, 95\%} = 3,39$) em relação ao modelo linear.

O gráfico de superfície de resposta dos fatores significativos, dado pela equação (5.4) está representado pela Figura 5.14.

Em termos práticos, a utilidade da Equação 5.4 é prever que condições experimentais resultarão num valor de interesse para a produção de violaceína.

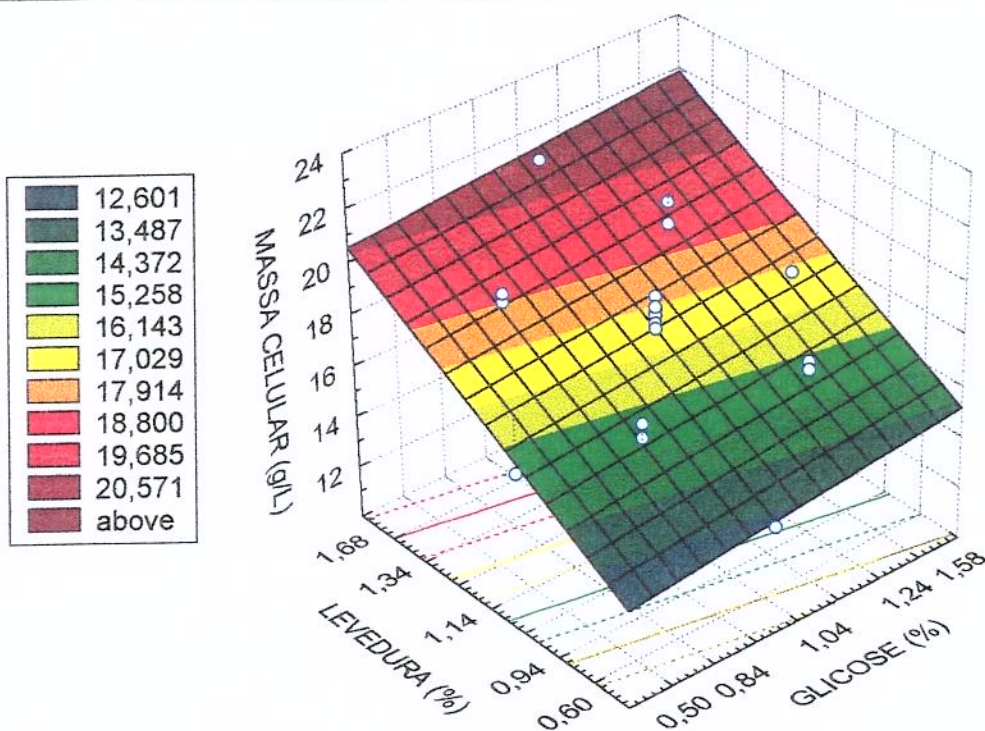


Figura 5.13 Superfície de resposta para produção de MC (g/L), mostra que apenas o extrato de levedura (%) foi significativo para a produção de MC (g/L). Observar as linhas de contorno quase paralelas ao eixo da glicose.

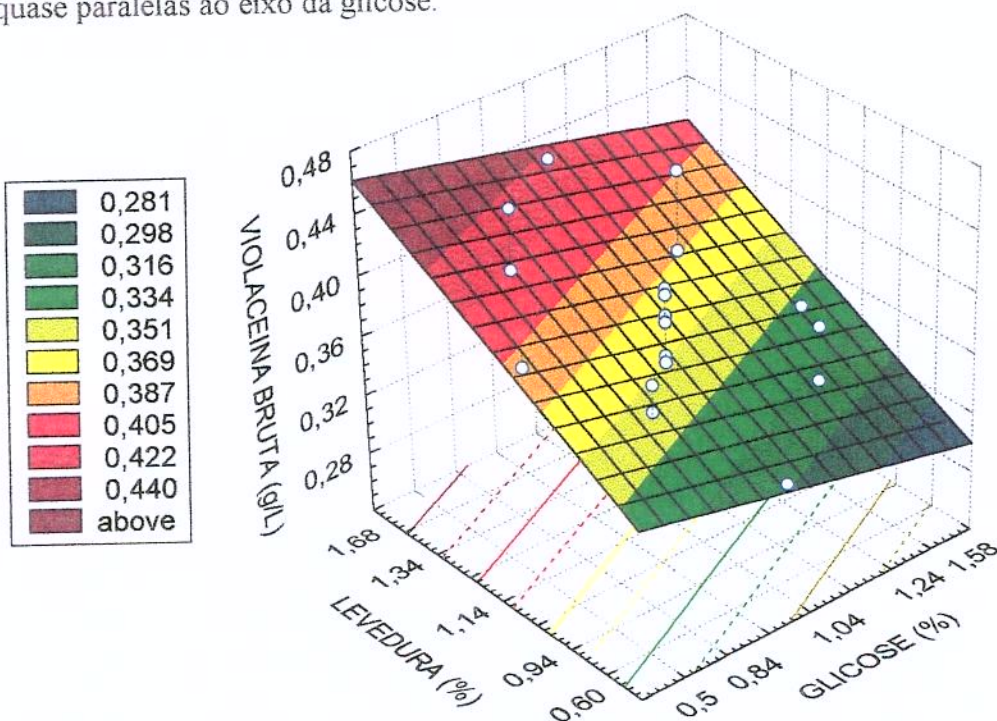


Figura 5.14 Superfície de resposta para produção de V (g/L), mostra que aumentos nos níveis de extrato de levedura (%) e diminuição nos níveis de glicose (%), levam a aumentos na produção de V (g/L).

5.2 Produção, extração, purificação e caracterização da violaceína

5.2.1 Produção da violaceína em biorreator

A partir do meio de cultura otimizado em shaker foi realizado uma fermentação em biorreator, com o objetivo de conseguir quantidade de violaceína bruta em escala-piloto. Os resultados da fermentação são mostrados na Tabela 5.15 e Figura 5.15.

Tabela 5.15 Produção de MC e V pelo *C. violaceum* em biorreator. Os dados desta tabela referem-se às variáveis que foram monitoradas durante o tempo de fermentação.

Tempo de fermentação (hh:mm)	MC (g/L)	V (g/L)	% [O ₂]	pH	Pressão (PSI)
00:00	0,22	0,00	107,7	6,87	3
04:00	0,41	0,00	129,1	6,92	3
05:00	0,50	0,00	125,8	7,09	3
06:00	0,86	0,00	129,9	7,35	3
07:00	2,00	0,00	110,0	7,69	3
08:00	4,53	0,00	67,80	7,90	3
09:00	6,15	0,00	49,80	7,76	3
10:00	8,88	0,01	77,00	7,67	11
11:00	10,62	0,04	79,00	7,84	8
12:00	11,51	0,08	90,20	7,76	7,5
13:00	12,26	0,07	----	----	----
15:00	10,72	0,11	158,70	7,18	16
16:00	11,15	0,12	128,00		13
17:00	12,50	0,13	111,00	7,88	10
19:00	11,90	0,19			
21:00	12,54	0,25	155,40	8,04	17
22:00	13,56	-----	125,30	8,44	11
22:01	-----	-----	----	----	2
32:00	12,70	0,33	0,6	8,16	2

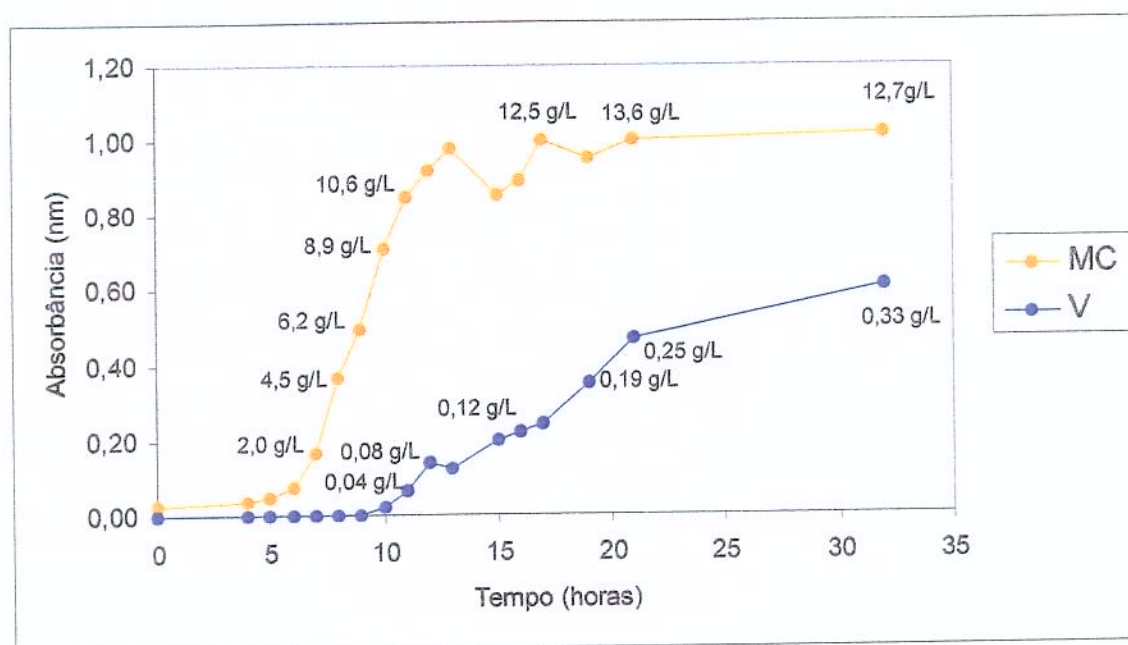


Figura 5.15 Fermentação em biorreator do *C. violaceum* utilizando o meio de cultura otimizado em Shaker, com suas respectivas curvas de produção de MC e V obtidas por dosagem off-line.

Os resultados dos rendimentos obtidos em relação a produção de MC e V pelo *C. violaceum* para o meio cultura antes e após a otimização em Shaker, e em biorreator estão apresentados na Tabela 5.16.

Tabela 5.16 Comparação da produção de MC (g/L) e V (g/L), realizada por fermentação em shaker (meio inicial e otimizado) e em biorreator.

Fermentação	MC (g/L)	V (g/L)
Meio inicial em Shaker	6,84	0,15
Meio otimizado em Shaker	21,09	0,44
Biorreator	12,51	0,32

5.2.2 Processo de extração da violaceína

No processo de extração da violaceína a partir dos 30 L de caldo fermentado, foram obtidos três lotes de EABV como ilustrado na Figura 4.7. Os rendimentos percentuais de cada lote, após extração do álcool à pressão reduzida em rotaevaporador, são mostrados na Tabela 5.17

Tabela 5.17 Rendimento percentual do extrato bruto seco obtido nos três lotes de extração.

Lotes (EBV)	Extrato bruto seco (g)	%
1 ^o	21,88	79,6
2 ^o	3,63	13,2
3 ^o	1,97	7,2

5.2.3 Processo de purificação da violaceína

As 21,88 g de EBV obtidas no 1^o lote foram semi-purificadas como descrito no item 4.2.3, e foram obtidos 9,03 g de extrato semipurificado de violaceína (ESPV).

O procedimento de cristalização foi realizado apenas para obtenção de quantidade necessária a ser utilizada nos ensaios biológicos.

5.2.4 Caracterização e análise do ESPVC

O ESPVC foi submetido à análise de espectro de massas (EM) e HPLC sendo o resultado mostrado nas Figuras 5.16 e 5.17, respectivamente.

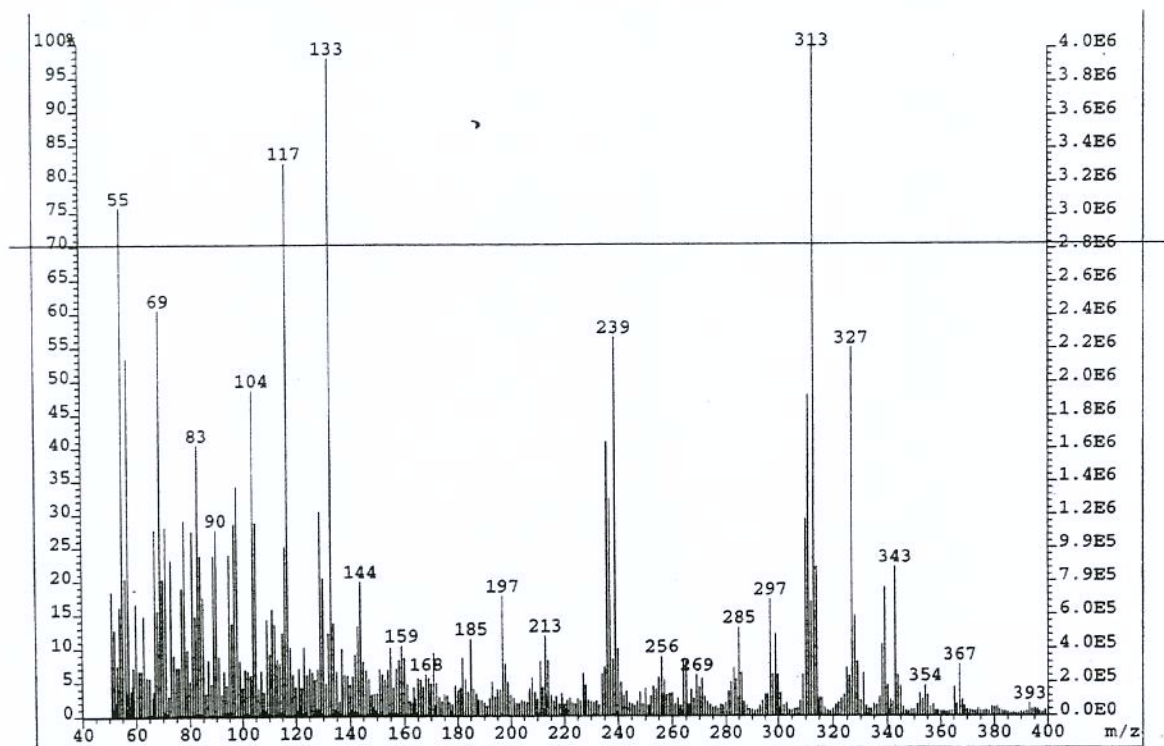


Figura 5.16 Espectro de massas (EM) do ESPVC obtido no espectrômetro Massa VG Autospec – MICROMAR 70 eV. Os picos 327 e 343 correspondem a deoxiviolaceína e violaceína, respectivamente.

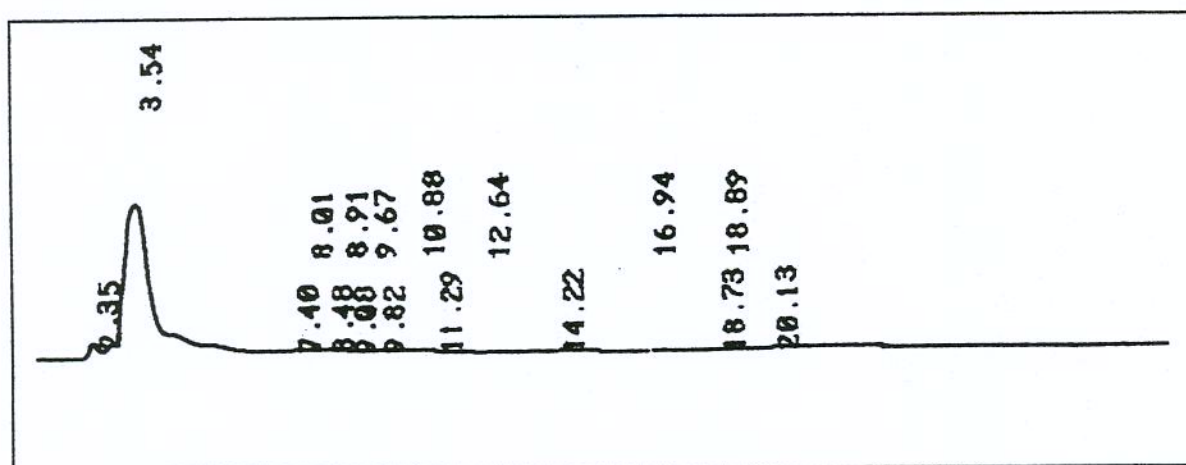


Figura 5.17 Cromatograma do ESPVC obtida por HPLC. O maior pico, com tempo de retenção de 3.54, corresponde ao da violaceína. Embora existam impurezas, estas estão em quantidades muito pequenas.

5.3 Testes farmacológicos

5.3.1 Curvas concentração-resposta da draga-teste (ESPVC)

A Figura 5.18 apresenta os resultados sobre a proliferação celular obtidos com a ESPVC. Pode-se observa, que a atividade antiproliferativa foi concentração-dependente com maior seletividade para as linhagens de melanoma (UACC-62), mama (NCIADR), próstata (PC.03) e rim (786-0).

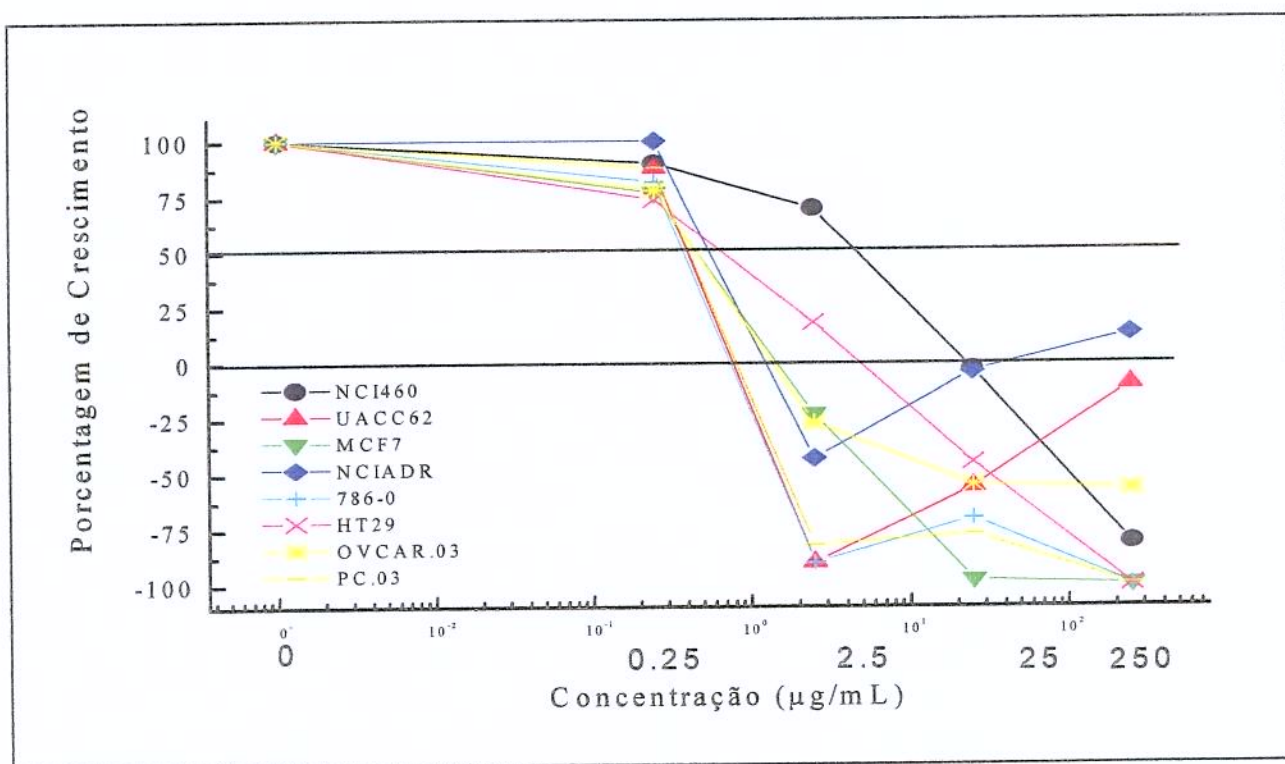


Figura 5.18 Curva concentração-resposta da atividade antiproliferativa do ESPVC sobre as linhagens tumorais humanas após 48 h de exposição.

Discussão

6. DISCUSSÃO

6.1 Otimização do processo de produção da violaceína

6.1.1 Curva de crescimento do microrganismo (cinética de crescimento)

A curva de cinética de crescimento foi construída para obter-se informações sobre a produção de violaceína bruta ao longo da fermentação e verificar se a cepa utilizada neste trabalho, CCT 3496, apresentava dados similares aos descritos na literatura. Segundo os dados da curva de cinética, a maior produção de violaceína bruta é alcançada entre 24 e 36 hs de fermentação (Figura 5.1), o que está de acordo com os dados da literatura (Hoshino & Takano 1987).

6.1.2 Análise da produção de violaceína e deoxiviolaceína por HPLC

O resultado da análise dos dados da produção de violaceína e deoxiviolaceína para as amostras coletadas durante a curva de cinética da fermentação do *C. violaceum* estão resumido na Tabela 5.1. Eles mostram que a produção de violaceína e deoxiviolaceína pelo *C. violaceum* é praticamente constante após 26 h de fermentação. Baseado nesses dados e nos dados da curva de cinética foi utilizado 36 h de tempo de fermentação, para os experimentos de planejamento fatorial e análise de superfície de resposta.

6.1.3 Planejamento experimental

A produção de violaceína e de massa celular são influenciadas por muitos fatores. Além disso, os níveis mais adequados desses fatores para maximizar a produção de violaceína

sempre foram realizados por processos univariados. Por essa razão um estudo de otimização sistemático utilizando grupos de experimentos planejados estatisticamente foi realizado. Esses planejamentos (multivariados) tem por objetivo reduzir o número de experimentos que são necessários para conduzir o processo de otimização assim como fornecer resultados mais precisos do que aqueles obtidos utilizando-se procedimentos univariados.

O trabalho foi realizado com o microrganismo, *C. violaceum*, que está sendo estudado desde 1913 e, portanto, existem muitos dados na literatura sobre a influência dos constituintes nutricionais e físicos sobre a produção de sua massa celular e de violaceína. No entanto, os dados de trabalhos anteriores foram obtidos por metodologia univariada. Deste modo, os fatores mais importantes descritos na literatura foram selecionados e outros foram ensaiados no laboratório para verificar a existência de algum efeito que fosse de interesse para a maximização de ambas as respostas.

Após selecionar os fatores que se julgou mais importantes, foi realizada uma triagem multivariada e foi determinada a importância de cada um destes fatores para ambas as respostas. Os fatores mais importantes para maximizar a produção de MC e V, simultaneamente, foram utilizados em planejamentos estrela sucessivos.

Ao contrário do recente trabalho publicado por Gouveia *et al.* (2001), no qual os autores utilizam uma triagem univariada dos fatores importantes para maximizar a produção do ácido clavulânico, tais como fontes de nitrogênio, e depois subsequente otimização multivariada, foi aplicado em nosso trabalho um planejamento experimental multivariado em ambas as fases de triagem e otimização. Isto minimiza a possibilidade de exclusão de fatores que são importantes para a otimização de um determinado metabólito secundário.

Neste trabalho foram utilizadas uma fonte de carbono e duas fontes de nitrogênio. Embora o processo de otimização não tenha sido totalmente concluído, as etapas otimizadas forneceram informações importantes, como por exemplo, qual a melhor fonte de nitrogênio a ser utilizada e qual a relação entre as fontes de carbono/nitrogênio para a maximização das respostas. O mesmo processo pode ser aplicado para micronutrientes que envolvem normalmente mais de dez fatores. Deste modo, pode-se otimizar a produção de qualquer

metabólito secundário produzido por qualquer microrganismo, com um gasto reduzido de dinheiro e em um curto período de tempo (2 a 3 meses).

O Brasil, apesar de ser o país detentor da maior biodiversidade, não tem um único medicamento inédito, comercializado à nível mundial. Por outro lado, os pesquisadores que trabalham com microrganismos sabem as dificuldades em conseguir com que estes produzam quantidades suficientes de metabólitos secundários para os estudos multidisciplinares, principalmente quando se iniciam os estudos toxicológicos com animais de laboratório, onde são requeridas quantidades da ordem de miligramas da droga. Assim, planejamentos experimentais podem ser de grande utilidade na otimização de metabólitos secundários novos com importância farmacológica, nos estudos iniciais da pesquisa de desenvolvimento de novas drogas.

6.1.3.1 Ensaios preliminares

Os ensaios preliminares tiveram como objetivo determinar as concentrações "grosseiras" dos constituintes que seriam utilizados na otimização do meio de cultura. Foram utilizadas concentrações que produziram respostas no fatorial, evitando-se usar faixas de concentração letais para o microrganismo e que poderiam inutilizar todo o experimento.

O Zn^{+2} na concentração de 0,1 mM ocasionou aumento na produção de MC e diminuição na produção de V em relação ao controle. No entanto, quanto utilizado na concentração de 1,0 mM, diminuiu em mais de 70% a produção de MC e inibiu a produção de V, como mostrado na Figura 5.2. Com apenas estes dois dados foi possível saber que a concentração a ser utilizada na etapa de triagem deveria estar ao redor de 0,1 mM.

A variação da concentração de DL-metionina e vitamina B12 (Figura 5.2), não influenciou a produção de MC. Por outro lado, a produção de V diminuiu ligeiramente quando foi utilizado DL-metionina na sua concentrações mais alta (0,060 g/L). A vitamina B₁₂ propiciou melhor desempenho da bactéria, quando utilizada na concentração de 0,0120 ng/mL. Assim, no fatorial de triagem, foi escolhido para a DL-metionina o valor de 0,01 g L⁻¹ como

nível inferior, por que este valor produziu respostas para a produção de MC e V. Já o valor do nível superior foi um valor acima dos valores ensaiados, 0,10 g L⁻¹. O importante é que um dos valores dos níveis superior ou inferior produza uma resposta para a produção de MC e V. Se os valores escolhidos para os níveis superior (+) e inferior (-) apresentarem respostas muito próximas, a tendência do fatorial é nos fornecer um valor de efeito pouco significativo.

Analizando a Figura 5.3 e a Tabela 5.2 foi constatado que a produção de MC e V foi maior na concentração de 0,10 M de tampão fosfato, porém a concentração não é suficiente para tamponar o meio de cultura durante o processo fermentativo. Para efeito de tamponamento, concentrações inferiores a 0,3 M revelaram-se insuficientes, enquanto valores acima de 0,5 M inibiram o crescimento celular e a produção do metabólito secundário. Baseado nestes dados foi utilizada a concentração de 0,3 M para tamponar o meio de cultura no fatorial de triagem.

No ensaio que analisou as fontes de nitrogênio para produção de MC e V (Figura 5.4), foi observado que o sulfato de amônio e a uréia resultaram nas menores taxas de produção de MC e V quando comparados com o controle. Níveis de 1,0% (p/v) de (NH₄)₂SO₄ e uréia à 0,8% p/v, causaram inibição na produção de violaceína. Com base nestes dados, optou-se por preservar as duas fontes de nitrogênio orgânico (peptona e extrato de levedura) do meio de cultura inicial.

6.1.3.2 Planejamento fatorial fracionário (triagem de variáveis)

Os fatores que apresentaram valores de efeitos significativos ao nível de 95% de confiança, para ambas as respostas simultaneamente, foram escolhidos para estudo no segundo estágio do processo de otimização (Tabela 5.8). Os outros fatores foram fixados nos seus níveis mais convenientes. A peptona apresentou o melhor valor de efeito para as produções de MC (3,13) e V (0,066). Aumentos no nível de glicose irão resultar em aumento da MC e diminuição na produção V. Isto pode sugerir a existência de mecanismos de repressão genética sobre a produção de V pela glicose (Drew & Demain 1977, Antônio 1994). O sulfato de zinco

e o extrato de levedura mostraram um efeito mais pronunciado sobre a produção de MC (-1,53 e 1,25) do que a produção de V (-0,019 e 0,013). Embora o L-triptofano tenha apresentado um efeito fraco mas significativo sobre a produção V (0,017), este foi mantido no planejamento seguinte, por que a biossíntese da violaceína se dá pela condensação de duas moléculas modificadas de L-triptofano, sendo que sua presença no planejamento experimental é fundamental (Ruhul Momen & Hoshino 2000). O motivo pelo qual este aminoácido apresentou um baixo efeito neste planejamento experimental, foi que a escolha do nível inferior (0,02%) estava próximo ao do valor ótimo. A temperatura e o inóculo apresentaram efeitos positivos, principalmente em relação a produção de V (0,042 e 0,034) e por esta razão foram fixados em seus níveis superiores (33 °C e 5%). A taxa de agitação nos níveis investigados, não foi significativa para a produção de V e somente ligeiramente importante para a produção de MC. Os outros fatores menos importantes, tais como DL-metionina e vitamina B12, ou aqueles que apresentaram efeito significativo para somente uma das respostas, tais como pH (tampão fosfato), foram eliminados a partir do estágio seguinte, permitindo uma redução no planejamento experimental. Contudo, seus estudos em futuros trabalhos de otimização poderão ser requeridos especialmente o pH.

6.1.3.3 Análise de superfície de resposta com 5 fatores

Em geral, ambas as produções de MC e V aumentaram, tendo apresentado valores médios no primeiro fatorial fracionário de 5,19 e 0,11 g/L para 7,47 e 0,23 g/L, respectivamente, no segundo planejamento composto com cinco fatores. Em contraste com os resultados da Tabela 5.3, aqueles da Tabela 5.9 mostraram uma alta correlação entre massa celular e violaceína bruta. Os experimentos que resultaram na maior produção de massa celular, experimentos 12, 16 e 18, também resultaram na maior quantidade de produção de violaceína bruta. A única exceção foram os valores de violaceína bruta para os experimentos 21 e 24, com produção de 0,29 e 0,28 g/L, respectivamente, os quais são ligeiramente maiores do que os obtidos no experimento 12, com produção de 0,27 g/L de violaceína bruta. Contudo,

as diferenças entre esses valores estão dentro do erro experimental estimado pelo erro padrão do ponto central, 0,028 g/L de violaceína bruta.

Os modelos lineares provaram ser mais significativos que os modelos quadráticos para ambas as respostas e nenhum dos coeficientes de segunda ordem foram significativos.

Os experimentos deste planejamento mostraram que a relação entre as duas fontes de nitrogênio utilizadas, extrato de levedura e peptona, devem estar em quantidades inversamente proporcionais para obtenção de respostas máximas. Isto pode ser visualizado pelas equações 5.1 e 5.2, e pelas Figuras 5.5 e 5.6, correspondentes às superfícies de resposta. Deste modo, o uso de altas concentrações de extrato de levedura e baixas concentrações de peptona resultaram em aumentos da produção de MC e V. Alterações nos níveis de peptona são insignificantes para a produção de V (equação 5.2) e apresentaram um baixo efeito negativo para produção de MC (equação 5.1). Assim, o extrato de levedura demonstrou ser a melhor fonte de nitrogênio, sendo a peptona fixada em seu nível inferior no estágio subsequente de investigação.

O Zn^{+2} não apresentou um efeito tão acentuado na produção de violaceína utilizando células integras, como o descrito por Hoshino & Yamamoto (1997), que utilizaram sistema de células lisadas por ultra-som. Quando se utiliza células lisadas por ultra-som, fatores, tais como micronutrientes adicionados ao meio, podem interagir diretamente com as enzimas da biossíntese da violaceína e atuarem como cofatores destas, aumentando o rendimento da produção deste pigmento. No entanto, quando se trata de células íntegras, estas possuem a membrana celular intacta, que é responsável por manter os gradientes de concentração interno destes micronutrientes, proporcionando a homeostase do microrganismo. Assim, os resultados em relação ao zinco(II) podem indicar que os níveis de zinco interno, mantidos pela *C. violaceum*, devem ser menores que aqueles necessários para atuarem como cofatores das enzimas que compõem a biossíntese da violaceína.

A concentração de zinco não teve efeito significativo sobre a produção de MC (ver equação 5.1 e Figura 5.7) e V (ver equação 5.2 e Figura 5.8), e pode ser mantido em qualquer nível conveniente. Deste modo, foi fixado em 0,0625 mM na etapa seguinte.

Os modelos para produção MC e V apresentam termos significativos e positivos para glicose e extrato de levedura. Eles predizem que um aumento no nível desses fatores irão resultar em um grande aumento na produção de MC e V, como mostrado graficamente pela superfície de resposta das Figuras 5.9 e 5.10, e pelas equações 5.1 e 5.2. Por essa razão, o nível desses fatores foi mudado de 0,1 – 0,9% e 0,2 – 1,0% no planejamento de 5 fatores para 0,50 – 1,58% e 0,60 – 1,68%, respectivamente, no terceiro estágio de otimização utilizando um planejamento composto central com três fatores.

Embora o L-triptofano tenha apresentado um efeito não significativo em relação à produção de MC (equação 5.1 e Figura 5.11), ele teve um efeito positivo e significativo em relação à produção V (equação 5.2 e Figura 5.12). Assim, seus níveis foram aumentados de 0,020 – 0,100% para 0,060 – 0,168% no planejamento fatorial com 3 fatores.

6.1.3.4 Análise de superfície de resposta com 3 fatores

A média de produção dos experimentos neste planejamento (Tabela 5.12) é 0,36 g/L de violaceína bruta, 50% maior que a média dos resultados na Tabela 5.9. A média na Tabela 5.12, em relação à massa celular (16,59 g/L) é mais do que o dobro da Tabela 5.9 (7,47 g/L massa celular). O modelo linear para produção de violaceína bruta e massa celular não exibiu evidência de falta de ajuste e foi estatisticamente mais significativo que o modelo quadrático.

A Figura 5.13 e a equação 5.3 mostram a produção de MC em função da concentração de glicose e extrato de levedura, sendo que a produção máxima de MC é obtido nos níveis máximos de ambos os fatores, 1,58% e 1,68%, respectivamente. É interessante notar que neste planejamento, nos limites investigados, o extrato de levedura apresentou uma importância maior do que a glicose para o crescimento celular. A glicose nem chegou a ter um efeito estatisticamente significativa ao nível de 95%.

A Figura 5.14 mostra a superfície de resposta para a produção de V em função da concentração de glicose e extrato de levedura. A produção máxima de V se encontra no nível mínimo de glicose (0,5%) e no nível máximo de extrato de levedura (1,68%), o que é

mostrado também pela equação 5.4. Estes dados estão de acordo com a literatura, que mostram que a glicose é repressora de muitos metabólitos secundários, inclusive a violaceína (Drew & Demain 1977; Antônio 1994).

O L-triptofano em concentrações acima de 0,06% não apresentou importância significativa para a produção de V, equação 5.3. Hoshino & Takano (1987) relata que a produção máxima de violaceína é obtida pela adição de 0,024 a 0,04% de L-triptofano ao meio.

Futuros aumentos nos níveis de extrato de levedura podem resultar em igual aumento de violaceína bruta (Figura 5.14) e massa celular (Figura 5.13). A superfície de resposta planar mostra uma taxa muito mais ascendente ao longo do eixo do extrato de levedura do que ao longo do eixo da glicose para a produção de V. As linhas de contorno são quase perpendiculares ao eixo do extrato de levedura, mostrando uma alta taxa de ascendência.

Neste trabalho foi utilizado uma fonte de carbono (glicose) e duas fontes de nitrogênio (peptona e extrato de levedura). Estes planejamentos fatoriais permitiram selecionar qual a melhor fonte de nitrogênio para o crescimento celular e produção de violaceína bruta, e a relação entre as fontes de carbono/nitrogênio. Do mesmo modo, pode-se utilizar planejamentos fatoriais para determinar qual a melhor fonte de carbono entre várias fontes de carbono de metabolização rápida (p.e. glicose), bem como fontes de carbono de metabolização mais lenta (p.e. sucrose, lactose). Sabe-se que para alguns microrganismos, as fontes de carbono de metabolização rápida levam a um aumento da massa celular e diminuição da produção do metabólito secundário. No entanto, a utilização de fontes de carbono de metabolização mais lenta levam a uma diminuição no crescimento celular e a um aumento na produção do metabólito secundário (Drew & Demain 1977, Vicik *et al.* 1990). Neste caso, planejamentos fatoriais podem ser úteis para determinar a relação entre as fontes de carbono de metabolização rápida/lenta, chamado de digoxismo (Basak *et al.* 1995), com o objetivo de se obter o máximo de crescimento celular com a fonte de carbono de metabolização rápida e a máxima produção do metabólito secundário com a fonte de carbono de utilização lenta. Este digoxismo pode ser visualizado utilizando microcalorimetria (Rettori & Volpe 2000). Este mesmo princípio pode ser aplicado a fontes de nitrogênio de metabolização rápida e lenta para

aumentar a produção do metabólito secundário (Ahoronowitz 1980). Segundo os resultados dos ensaios preliminares e do planejamento experimental, a utilização de fontes de nitrogênio de metabolização mais lenta pelo *C. violaceum*, levam a uma maior produção de MC e V. Isso abre as portas para investigações futuras sobre a utilização de outras fontes de nitrogênio de metabolização lenta que possam ser utilizadas para aumentar a produção de violaceína.

Em resumo, a aplicação de planejamento fatorial e análise de superfície de resposta resultaram no aumento da produção de MC 21 g/L e de V 0,43 g/L ($34,79 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$), pelo *C. violaceum*, quando comparados com 7,5 g/L e 0,17 g/L ($= 13,17 \text{ nmol mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$), respectivamente, em relação ao meio inicial. Produções ainda maiores podem ser obtidas realizando-se futuros ajustes nos níveis de glicose, extrato de levedura e pH, ou introduzindo-se outras fontes de carbono além da glicose, com o objetivo de obter-se uma otimização que envolva digoxismo, ou pesquisando-se outras fontes de nitrogênio de metabolização mais lenta.

6.2 Produção, extração, purificação e caracterização da violaceína

6.2.1 Produção da violaceína em biorreator

A fermentação do *C. violaceum* em biorreator apresentou uma produção MC e V de 12,51 g/L e 0,32 g/L, respectivamente, comparados com valores de 21,51 g/L e 0,44 g/L para o meio otimizado em ensaios com frascos agitados (Tabela 5.15). Estes dados são 40,7% e 27,3%, respectivamente, menores que os obtidos em shaker.

Quando muda-se a escala de produção, por exemplo, de 20 mL para 30 L, normalmente não se obtém o mesmo rendimento conseguido na menor escala (meio otimizado). É necessário reotimizar o meio de cultura para as novas condições. A vantagem é que nesta etapa, já eram conhecidos os fatores principais do meio de cultura para a produção do metabólito secundário.

O consumo de oxigênio pela *C. violaceum* a partir de 9 h de fermentação, quando a bactéria começa a adquirir coloração roxa, aumentou consideravelmente, o que pôde ser observado pela elevação da pressão e velocidade de agitação (dados não mostrados) para manter uma taxa constante de oxigênio dissolvido (Tabela 5.15). Após 22 h, o fluxo de ar e a velocidade de agitação foram reduzidos a níveis baixos para manter uma taxa de pressão interna ao redor de 2 PSI. Embora o crescimento celular aparente ter alcançado um platô, as condições de baixa aeração proporcionaram um aumento na produção de violaceína (Figura 5.15).

6.2.3 Processo de extração da violaceína

Aproximadamente 80% do extrato bruto seco foi obtido na primeira extração alcoólica (1º lote), como mostrado na Tabela 5.17. Este deve conter a maior parte da violaceína produzida pelo *C. violaceum*, sendo a coloração do extrato alcoólico de um azul bem mais intenso que a dos outros dois lotes.

6.2.3 Processo de purificação da violaceína

Esta etapa foi conduzida segundo a metodologia descrita por Rettori & Durán (1998). Embora as etapas de clorofórmio e éter etílico tenham a finalidade de arrastar impurezas, tais como lipídeo de membrana e deoxiviolaceína, elas parecem também arrastar uma grande quantidade de violaceína. Essa hipótese é fundamentada na observação de que no início das etapas de purificação com clorofórmio e éter etílico, ambos os solventes arrastam uma grande quantidade de material de coloração escura. No trabalho publicado por Blosser & Gray (2000), os autores fizeram a ruptura das células e a extração da violaceína por um sistema de separação de fases constituído de butanol:água. Esse processo pode ser melhorado e aperfeiçoado para se conseguir uma separação da violaceína e deoxiviolaceína, por uma mistura de solventes apropriados. As concentrações dos solventes a serem utilizadas podem

ser facilmente determinadas utilizando planejamentos experimentais aplicados à modelagem de misturas (Barros Neto *et al.* 1996).

6.2.4 Caracterização e análise do ESPVC por EM e HPLC

O Espectro de massas (EM) do ESPVC (Figura 5.16), contém os picos 327 e 343, correspondentes à estrutura da deoxiviolaceína e violaceína, respectivamente.

A análise por HPLC do ESPVC (Figura 5.17), mostra que a violaceína encontra-se como composto majoritário.

6.3 Testes Farmacológicos

6.3.1 Atividade antiproliferativa

Os ensaios da atividade antiproliferativa mostram que o ESPVC utilizado na concentração de 0,25 µg/mL, em todas as linhagens celulares, não apresentou inibição de crescimento (IC) maior que 50%. No entanto, na concentração de 2,5 µg/mL apresentou uma seletividade sobre as linhagens celulares. Para a linhagem NCI460 (pulmão) não apresentou atividade e para a linhagem HT29 (cólon) foi citostática. Em relação a todas as outras linhagens o efeito foi citocida.

Em concentrações acima de 0,25 µg/mL o efeito do ESPVC foi citocida para todas as linhagens celulares com exceção da NCI-ADR (mama). Para as linhagens celulares NCI-ADR e UACC62 (melanoma) concentrações acima de 2,5 µg/mL parecem diminuir o efeito citocida da droga. No caso específico da NCI-ADR a concentração mais alta (250 µg/mL) produz um efeito apenas citostático.

Sabe-se que algumas drogas anti-câncer e com propriedade anti-oxidante, como por exemplo o 4-hidroxianisole (4-HA), apresenta efeitos de citotoxicidade tempo-dependente e concentração-dependente (Schiller *et al.* 1991). Como a violaceína apresenta propriedade anti-oxidante (De Azevedo *et al.* 2000), é possível que para algumas linhagens, principalmente as de mama (NCI-ADR) e melanoma (UACC62) esta droga em concentrações acima de 0,25 µg/mL apresente efeitos de autocitoproteção celular concentração-dependente.

Todos os dados da violaceína disponíveis na literatura sobre ensaios biológicos e toxicidade referem-se a ensaios com células ou enzimas. Até o momento não foram relatados trabalhos que envolvam ensaios toxicológicos com animais (p.e. camundongos). No entanto, observa-se uma grande preocupação de alguns grupos de pesquisa no exterior com a produção da violaceína em uma escala-maior (clonagem do gene e produção da violaceína em células de alta densidade celular). Talvez estes estudos de toxicidade até existam, mas ainda não foram publicados por questões de segurança, devido a pretensão de acelerar as pesquisas e desenvolvimento da droga ou de seus derivados com o objetivo de comercialização.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Através dos experimentos de planejamento fatorial e análise por superfície de resposta conseguiu-se aumentar a massa celular de *C. violaceum*, de 7,47 g/L para 21 g/L e a produção de violaceína de 0,17 g/L para 0,44 g/L.

O meio de cultura otimizado para a produção de violaceína, nas condições investigadas, apresenta a seguinte composição: glicose (0,50 %), extrato de levedura (1,68 %), L-triptofano (0,06 %), peptona (0,10 %), sulfato de zinco (0,0625 mM), temperatura de 33 °C e agitação de 300 rpm.

O modelo linear, nos limites investigados, apresentou-se mais adequado que o modelo quadrático e as interações de segunda e terceira ordem não mostraram-se significativas, em ambos os planejamentos estrela.

O Zn^{+2} não apresentou um efeito tão acentuado na produção de violaceína quando utilizamos células íntegras, quanto o descrito por Hoshino *et al.* (1997), que utilizaram sistema de células lisadas por ultra-som.

A fonte de carbono utilizada (glicose), parece apresentar mecanismos de repressão genética em relação à produção do metabólito secundário (violaceína).

Entre as duas fontes de nitrogênio investigadas, o extrato de levedura demonstrou ser a melhor. Além disso, demonstrou ser um fator estimulante do crescimento celular, sem no entanto inibir a produção de violaceína.

O planejamento permitiu estabelecer qual a melhor relação entre as fontes de carbono/nitrogênio para aumentar a produção de massa celular e produção de violaceína bruta.

A análise por HPLC em relação ao meio inicial (glicose 0,5%, peptona 0,5%, extrato de levedura 0,2% e L-triptofano 0,03%) mostrou que a produção de violaceína e deoxiviolaceína pela bactéria é praticamente constante após 26 h de fermentação.

Os ensaios antiproliferativos mostraram que o ESPVC apresenta seletividade celular e, provavelmente, autocitoproteção concentração-dependente para algumas linhagens de células tumorais humanas, principalmente para melanoma (UACC-62) e mama (NCIADR).

Referências Bibliográficas

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agnew, Bruce (2000) Whem pharma merges, R&D is the dowry. *Science* 17(287), 1952-53.
- Aharonowitz, Y (1980) Nitrogen Metabolite Regulation of Antibiotic Biosynthesis. *Annual Review of Microbiology* 34: 209-233.
- Aharonowitz, Y and Deamin, AL (1980) *Biotechnol. Bioeng.* 22:(Supl. 1), 5.
- Albagli, S (1998) Da biodiversidade à biotecnologia: a nova fronteira da informação. *Ci Inf Brasília* 27: (1), 7-10.
- Antônio, RV (1994) Biossíntese de violaceína por *Chromobacterium violaceum*: síntese e atividades biológicas de um provável intermediário. Tese de Doutorado – Instituto de Biologia – Unicamp.
- Ballantine, J. A.; Barrett, C. B.; Beer, R. J. S.; Eardley, S.; Robinson, A.; Shaw, B. L. and Simpson, T. B. (1958) Chemistry of the bacteria VII. The structure of violacein. *J. Chem. Soc.* 765:760-791.
- Ballantine, J. A.; Beer, R. J.; Crutchley, D. J.; Dodd, G. M. and Palmer, D. R. (1958) The synthesis of violacein and related compound. *Proc. Chem. Soc.* 232-233.
- Ballows, A, Trüper, HG, Dworkin, M, Harder, W. Schleifer, KH (1992) "The Prokaryotes", Vol. III, Second edition; Springer-Verlag York inc.: New York; p. 2591-2600.
- Barros Neto, B de; Spacino, IS and Bruns, RE (1996) Planejamento e otimização de experimentos, 2ª edição. Campinas-SP: Editora da Unicamp, pp. 61-177.
- Basak, S, Velayudhan, A, Ladisch, R (1995) Simulation of diauxic production of cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*: Lag model for fed-batch fermentation. *Biotechnol. Prog.* 11: 626-631.
- Bentley R. (1999) Secondary metabolite biosynthesis: the first century. *Crit. Ver. Biotechnol* 19: 1-40.
- Beydon, HM; Fournier; AL, Drugesult; Becquart, J (2000) Microbiological high throughput screening: na opportunity for the lead discovery process. *Journal of Biomolecular Screening* 5: (1) 13-21.
- Bhat, Mahadev G. (1999) On biodiversity access, intellectual property rights, and conservation. *Ecological Economics* 29: 391-403.
- Bier, Otto (1985) Microbiologia e Imunologia. 24ª edição, editora Melhoramentos, pp 980.

- Bills, Gerald F. and Polishook, Jon D. (1994) Abundance and diversity of microfungi in leaf litter of a lowland rain forest in Costa Rica. *Mycologia* **86**: (2), 187-198.
- Blosser, RS and Gray, KM (2000) Extraction of violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. *Journal of microbiological Methods*. **40**: 47-55.
- Borman, Stu (2000) Combinatorial Chemistry: Redefining the Scientific Method. *Chemical & Engineering News*. May 15, 53-65.
- Box, GEP; Hunter, WG and Hanter, JS (1978) Statistics for experiments. An introduction to design, data analysis, and model building. Nova York; Wiley. pp. 291-535.
- Brennan, Mairin B. (2000) Drug Discovery – Filtering out failures early in the game. *Chemical & Engineering News*. June 5, 63-73.
- Burley, SK. *et al.* (1999) Structural genomics: beyond the Human Genome Project. *Nature Genetics* **23**: 151-157.
- Burres, N.S. (1997) Journal of Biomolecular Screening: the official journal of the Society for Biomolecular Screening. *Nature* **389**: 144.
- Caldas, LR; Leitão, AAC; Santos, SM; Tyrrell, RM (1978) Preliminary experiments on the photobiological properties of violacein. *Inter. Proceedings o Symposium on Current Topics in Radioogy and Photobioogy*, ed Tyrrell, R.M. pp. 121-126. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências.
- Campisi, B; Chicco D; Vojnovic, D and Phan-Tan-Luu, R (1998) Experimental design for a pharmaceutical formulation: optimisation and robustness. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **18**: (1-2) 57-65.
- Cordell, GA. (2000) Biodiversity and drug discovery – a symbiotic relationship. *Phytochemistry* **55**, 463-480.
- Corpe, WA (1951) A study of the wide spread distribution of *Chromobacterium* species in soil by simple technique. *J. Bacteriolo.* **62**: 515-546.
- Cragg, GM; Newman, DJ and Snader, KM (1997) Natural products in drugs discovery and development. *J. Nat. Prod.* **60**, 52-60.
- De Azevedo, MBM; Alderete, J; Rodriguez, JÁ; De Souza, AO; Faljoni-Alario, A and Durán, N (2000) Biological activities of violacein, a new antitumoral indole derivative, in an inclusion complex with beta-cyclodextrin. *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **37**, 93-101.
- Demain, AL (1981) Industrial Microbiology. *Science* **214**:(27), 987-995.

- Demain, AL (1999) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**:(4), 455-463.
- Demain, AL (2000a) Small bugs, big business: The economic power of the microbe. *Biotechnology Advances* **18**, 499-514.
- Demain, AL. (2000b) Microbial biotechnology. *Trends in Biotechnology* **18**, 26-31.
- DeMoss, RD and Evans, NR (1959) Physiological aspects of violacein biosynthesis in nonproliferating cells. *Journal Bacteriol.*, **78**:583-588.
- DeMoss, RD and Evans, NR (1960) Incorporation of C¹⁴ labeled substrates into violacein. *J. Bacteriol.*, **79**:729-733.
- DeMoss, RD and Happel, ME (1959) Nutritional requirements of *Chromobacterium violaceum*. *J. Bacteriolog.* **77**: 137-141.
- DeMoss, RD. (1967) Violacein. *Antibiotics* **2**: 77-80.
- DeWitt, S.H.; Kiely, J.S.; Stankovic, C.J. and Schroeder, M.C. (1993) "Diversomes": Na approach to nonpeptide, nonoligomeric chemical diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 6909-6913.
- Dixit, S.G.; Joshi, M.S. and Bodhankar, S.L. (1998) Combinatorial Chemistry – Principles and Practices. *Journal of Scientific & Industrial Research* **57**: 173-183.
- Drew, SW and Demain, AL (1977) Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Ann. Ver. Microbiol.* **31**: 343-356.
- Drews, Jürgen (2000) Drug discovery: a historical perspective. *Science* **287**: (17), 1960-1964.
- Dufresne, C (2000) The planning and establishment of a sample preparation laboratory for drug discovery. *Journal of Automated Methods & Management in Chemistry* **22**: (6) 175-179.
- Durán, N (1990) Violaceína: A descoberta de um antibiótico. *Ciencia Hoje* **11**: 58-60.
- Durán, N and Haun, M (1991) *Mem. Inst. Oswald Cruz* Supl. I, 86,29.
- Durán, N; Campos, V; Riveros, R; Joyas, A; Pereira, MF; Haun, M (1989). Bacterial chemistry-III: Preliminary studies on trypanosomal activities of *Chromobacterium violaceum*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* **61**: 31-36.
- Durán, N; Melo, PS and Haun, M (1996) In vitro evaluation of violacein on AIDS-related lymphoma and human tumor cell lines. In *XXV Annual Meetings of the Brazilian Society of Biochemistry and molecular Biology*, pp. 150. Caxambú: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq).

- Durán, N; Rettori, D and Menck, CFM (2001) Quem é a *Chromobacterium violaceum* ? *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento* **20**: 38-43.
- Endo, A (1985) Compactin (ML-236B) and related compounds as potential cholesterol-lowering agents that inhibit HMG-CoA reductase. *J. Med. Chem.* **28**: 401-5.
- Época-Revista (2001) O Genoma é Nosso. pp 86, 15 de janeiro.
- Farnsworth, N and Morris, RW (1976) Higher-plants - sleeping giant of drug development. *American Journal of Pharmacology* **148**: 46-52.
- Ferreira, Vitor Francisco (2000) Biodiversidade, lei de recursos genéticos e política científica. *Química Nova* **23**: (5) 579.
- Garcia, Eloi S. (1998) O passo seguinte ao genoma. *Ciência Hoje* **24**: 50-51.
- Gávez, A.; Maqueda, M.; Martínez-Bueno, M.; Valdivia, E. (1998) Publication rates reveal trends in microbiological research *ASM News* **64**: 5, 269-275.
- Gilman, A.G., Goodman, L.S., Rall, T.W. and Murad, F. (1987) As bases farmacológicas da terapêutica. 7ª edição, editora Guanabara. p.731.
- Gong, Xiandi and Chen, Feng (1998) Influence of medium components on astaxanthin content and production of *Haematococcus pluvialis*. *Process Biochemistry* **33**: 4, 385-391.
- Gouveia, E. R., Baptista-Neto, A., Badino Jr. A. C., e Hokka, C. O. (2001) Optimisation of medium composition for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnology Letters* **23**: 157-161.
- Hadden, C.E. and Martin, G.E. (1998) Low-level long-range ¹H-¹⁵N heteronuclear shift correlation at natural abundance using submicro NMR techniques. *J. Nat. Prod.* **61**: 969-972.
- Hartley, WJJ (1913) On a violet colouring-matter and its production by a certain bacterium. *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.*, **14**: 63-67.
- Harvey, Alan L. (1999) Medicines from natural: are natural products still relevant to drug discovery ? *Trends in Pharmacological Sciences* **20**, 196-198.
- Haselsberger, K; Peterson, DC; Thomas, DGT and Darling, JL (1996) Assay of anticancer drugs in tissue culture: Comparison of a tetrazolium-based assay and a protein binding dye assay in short-term cultures derived from human malignant glioma. *Anticancer Drugs*, May **7**:3, 331-8.
- Hassan, H; Suntharalingam, S and Dhillon, KS (1993) *Singapore Med. J.* **34**, 456.

- Haun, M; Pereira, MF; Hoffman, ME; Joyas, A; Campos, V; Lizardi, LD; De Castro, S; Durán, N (1992) Bacterial chemistry. VI: Biological activities and cytotoxicity of 1,3-dihydro-2H-indol-2-one derivatives. *Biol. Res.* **25**: 21-25.
- Higgs, RE; Zahn, JÁ; Gygi, JD and Hilton, MD (2001) Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: (1) 371-376.
- Hill, D.C, Wrigley, S.K., Nisbet, L.J. (1998) Novel Screen methodologies for identification of new microbial metabolites with pharmacological activity. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology* **58**, 75-121.
- Holmes, K.C. (1999) Structural biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences.* **354**: (1392) 1977-1984.
- Hols P, Kleerebezem M., Schanck NA, Ferain T., Hgenholtz J., Delcour, de Vos QM. (1999) Conersion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering. *Nature Biotechnol* **17**: 588-92.
- Hoshino, T and Ogasawara, N (1990) Studies on the biosynthesis of violacein .3. biosynthesis of violacein - evidence for the intermediacy of 5-hydroxy-L-tryptophan and the structure of a new pigment, oxyviolacein , produced by the metabolism of 5-hydroxytryptophan. *Agricultural and Biological Chemistry* **54**: (9) 2339-2346.
- Hoshino, T and Yamamoto, M (1997) Conversion from tryptophan precursor into violacein pigments by a cell-free system from *Chromobacterim violaceum*. **61**: (12), 2134-2136.
- Hoshino, T; Kondo, T; Uchiyama, T and Ogasawara, N (1987) Biosynthesis of violacein: a novel rearrangement in tryptophan metabolism with a 1, 2-shift of the indole ring. *Agric. Biol. Chem.*, **51**:965-968).
- Hoshino, T; Takano, T; Hori, S and Ogasawara, N (1987) Biosynthesis of violacein: Origins of hydrogen, nitrogen and oxygen atoms in the 2-pyrrolidone nucleus. *Agric. Biol. Chem.*, **51**: (10), 2733-2741.
- Hostettmann, K.; Wolfender, J.L and Rodriguez, S. (1997) Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. *Planta Medica* **63**: 2-10.
- Kate, KT & Laird, SA (2000) Biodiversity and business: coming to terms with the “grand bargain”. *International Affairs* **76**: (2) 241-264.
- Kempf, M., Theobald, U., Fiedler, H-P. (1999) Economic improvement of the fermentative production of gallidermin by *Staphylococcus gallinarum*. *Biotechnology Letters.* **21**: 663-667.

- Kimmel, KE and Maier, S (1969) Effect of cultural conditions on synthesis of violacein in mesophilic and psychrophilic strains of *Chromobacterium*. *Canadian Journal Microbiology* **15**: (1) 111-221.
- Kleman, GL and Strohl, WR (1994) Developments in high cell density and high productivity microbial fermentation. *Current Opinion in Biotechnology* **5**, 180-186.
- Kochweser, J and Schechter, PJ (1978) Schmiedberg in strassburg 1872-1918 - Making of modern pharmacology. *LIFE SCIENCES* **22**: (13-1) 1361-1372.
- Kohn, L.K. (2001) Atividade antiproliferativa do extrato bruto e das frações de *Aspidosperma tomentosum* Mart. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências Médicas, Depto de farmacologia – Unicamp.
- Korolkovas, A. and Burckhalter, J.H. (1982) Química Farmacêutica – Guanabara Dois. p. 576-577.
- Kursar, TA; Capson, TL; Coley, PD; Corley, DG; Gupta, MB; Harrison, LA; Ortega-Barria, E and Windsor DM (1999) Ecologically guided bioprospecting in Panama. *Pharmaceutical Biology* **37**: 114-126, Suppl. S.
- Laatsch, H and Thonson, RH (1984) Spectroscopic properties of violacein and related compounds: crystal structure of tetramethyl violacein. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1331-1339.
- Lalonde J. (1997) Enzyme catalysis: cleaner, safer, energy efficient. *Chem Eng* **9**: 108-12.
- Larsen, N; Overbeek, R; Pramanik, S; Schmidt, TM; Selkov, EE; Strunk, O; Tiedje, JM and Urbance, JW (1997) Towards microbial data integration. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **18**: (1) 68-72.
- Lee, Jung-Kul; Kim, Sang-Yong and Oh, Deok-Kun (2000) Increased erythritol production in *Torula sp.* by Mn^{2+} and Cu^{2+} . *Biotechnology Letters*. **22**: 983-986.
- Lehninger, AL (1984) Princípios de bioquímica. Editora Sarvier – São Paulo, pp 254.
- Leitão, A.; Montanari, C.A. and Donnici, C.L. (2000) Sobre o uso de métodos quimiométricos em química combinatória. *Química Nova* **23**:2, 178-184.
- Lichstein, HC and Vandesand, VF (1945) Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Infectious Diseases* **76**: (1) 47-51.
- Lipinski CA (2000) Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. **44**: (1), 235-249.

- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advandec Drug Delivery Reviews* **23**:(3), 3-25
- Lu, Hong *et al.* (2000) New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum sp.*, na endophytic fungus in *Artemisia annua* **151**: 67-73.
- Malakoff, D. (2000) The Rise of the Mouse Biomedicine's Model Mammal. *Science* **288**: 248-253.
- Mansur, A and Segatto, C (2001) O genoma é nosso. *Revista Época*, 15/janeiro – pp. 86-90.
- Maria, PSMSS; Vidal, BC; Haun, M and Durán, N (2000) Violaceina cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal* **36**: 539-543
- Martin, JF; Liras, P and Demain, AL (1997) Inhibition by phosphate of activity of candidin synthases. *Fems Microbiology Letters* **2**: (3) 173-176.
- May, G; Brümmer, B and Ott, H (1991) Verfahren zur isolierung von violacein und seine verwendung zur prophylaxe und therapie von viruserkrankungen. Deutsches Patentamt *Offenlegungsschrift De* 3,935,066 (CL. C12P17/16), 25 Abril 1991. Application. 20 outubro 1989, 5pp.
- McDaniel R, Thamchaipenet A, Gustafsson C., Fu H., Betlach M, Ashley G. (1999) Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel "unnatural" natural products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 1846-51.
- Melo, PS (1996) "Pigmento obtido de *Chromobacterium violaceum* e *Serratia Marcescens*, Propriedade tripanocida da Prodigiosina e Estudos Toxicológicos". Tese de Mestrado – Instituto de Biologia (IB) - Unicamp; pp. 11, 12, 19-21.
- Metz A.M. *et al.* (2000) Induction of the sexual stage of *Pestalotiopsis microspora*, a taxol-producing fungus. *Microbiology-UK* **146**: 2079-2089, Part 8 Aug.
- Monks, A; Scudiero, D; Skehan, P; Shoemaker, R; Paull, K; Vistica, D; Hose, C; Langley, J; Cronise, P; Vaigrowolff, A; Graygoodrich, M; Campbell, H; Mayo, J and Boyd, M (1991) Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor-cell lines. *Journal of the National Cancer Institute* **83**: (11) 757-766.
- Montanari, Carlos A. and Bolzani, Anderlan da S. (2001) Planejamento racional de fármaco baseado em produtos naturais. *Química Nova* **24**: (1), 105-111.
- Munder, T and Hinnen, A (1999) Yeast cells as tools for target-oriented screening. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 311-320.

- Pemberton, J M; Vicent, KM and Penfold, RJ (1991) Cloning and heterologous expression of the violacein biosynthesis gene cluster from *Chromobacterium violaceum*. *Curr. Microbiol.*, **22**:355-358.
- Pereira, Maristela de Freitas (1991) Estudo da ação cito e genotóxica da violaceína e derivados em células de mamíferos em cultura. Tese de Mestrado – Instituto de Biologia (IB) – Universidade Estadual de Campinas (Unicamp).
- Pesquisa FAPESP (junho de 2001) Mapeamento de Proteínas. pp. 26.
- Pettilho, VF, Severo, V, Santos, MM, Edelweiss, EL (1984) *J. Infect.* **9**, 167.
- Polikarpov, I; Hwa, LW (1999) Biologia estrutural: Mais luz sobre os segredos das proteínas. *Ciência Hoje* **25**: (149), 32-39.
- Ragot, Jacques P. *et al.* (1998) Syntheses of Palmarumycin CP1 and CP2, CJ-12,371 and novel analogues. *Tetrahedron Letters* **39**: 4921-4924.
- Reilly, J and Pyne, G (1927) On the pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *Biochemical Journal* **21**: 1059-1061.
- Relman, David A. (1999) The search for unrecognized pathogens. *Science* **284**: 1308-1310.
- Rettori, D (1996) Produção, extração e purificação da violaceína: Um antibiótico produzido pela *Chromobacterium violaceum*. Tese de mestrado. Instituto de Química (IQ). Universidade Estadual de Campinas – Unicamp.
- Rettori, D and Volpe, PLO (2000) Microcalorimetry: A useful technique for studying the diauxism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Química Nova* **23**: (2) 257-261.
- Rettori, Daniel and Durán, N (1998) Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *World J. Microb. Biotechn.* **14**:, 685-688.
- Riesenberg, D. and Guthke, R (1999) High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl. Microbiol Biotechnol* **51**, 422-430.
- Riveros, R (1989) Química de bactérias: Biossíntese e atividade biológica de metabólitos da *Chromobacterium violaceum brasiliensis*. Tese de Doutorado – Instituto de Química (IQ) – Unicamp.
- Riveros, R; Haun, M and Durán, N (1989) Effect of growth conditions on production of violacein by *Chromobacterium violaceum* (BB-78 strain). *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **22**: 569-577.
- Rouhi, A. Maureen (1999) Chemistry from unknown microbes. *Chemical & Engineering News*. **4**, 21-23.

- Ruhul Momen, AZM, Hoshino, T (2000) Intact incorporation of the tryptophan molecule on the oxindole side, with intramolecular rearrangement of the indole ring on the 5-hydroxindole side. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 539-549.
- Santos, A.J.O. (1999) Animais transgênicos e nocautes: soluções para muitos enigmas. *Ciência Hoje* **25**: 146, 16-24
- Sartory, AJ; Meyer, J et Wealdele, J (1938) Contribution à l'étude d'une violacéine obtenue à l'état cristallisé et provenant d'un bacille violette isolé du pus d'un abcès dentaire. *Comp. Rend. Soc. Biol.*, **206**:950-954.
- Schiller, CD; Gescher, A; Jheeta, P (1991) Mechanismo of toxicity of the antimelanoma drug 4-hydroxyanisole in mouse hepatocytes. *Eur. J. Cancer* **27**: (8), 1017-1022.
- Schmid, I; Sattler, I; Grabley, S; Thiericke, R. (1999) Natural products in high throughput screening: Automated high-quality sample preparation. *Journal of Biomolecular Screening* **4**: (1) 15-25.
- Seidl, Peter Rudolf (1999) Prospects for Brazilian Natural Products. *An. Acad. Bras. Ci.* **71**: (2) 239-247.
- Service, Robert F. (2000) Structural Genomics Offers High-Speed Look at Proteins. *Science* **287**: 1954-1956.
- Shu, Yeu-Zhong (1998) Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. *J. Nat. Prod.* **61**, 1053-1071.
- Sivendra, R and Lo, HS (1975) Identification of *Chromobacterium violaceum*: pigmented and nonpigmented strains. *J. Gen. Microbiol.* **90**: 21-31.
- Skehan, P. et al. (1990) New colorimetric cytotoxicity for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**(13): 1107-1112.
- Strobel, G.A. and Long, D.M. (1998) Endophytic Microbes Embody Pharmaceutical Potential. *ASM News* **64**: 5, 263-268.
- Strong, FM (1944) Isolation of violaccin. *Science*, **100**:287-288.
- Tashito, T (1992) Cell culture and its application in vitro evaluation of anticancer activity using human tumor cell lines. *Gan To Kagaku Ryoho* **19**: 12, 2107-12.
- Terlau, H; Bach, G; Zeeck, A. (2000) The medical potential of natural products. *Gynakologe* **33**: (1) 6-10.
- Timmermann, NB. et al. (1999) The latin americam: the first five years. *Pharmaceutical Biology* **37**, 35-54, Suppl. S.

- Tobie, WC (1934) The pigment of *Bacillus violaceus* III. The apparent relation of violacein to indigo. *Soc. Am. Bacteriol. 39th General meeting* p. 11-12.
- Turner, David M. (1996) Natural product source material use in the pharmaceutical industry: the Glaxo experience. *Journal of Ethnopharmacology* **51**, 39-44.
- Vicik, SM, Fedor, AJ, Swartz, W (1990) Defining an Optimal Carbon Source/Methionine Feed Strategy for Growth and Cephalosporin C Formation by *Cephalosporium acremonium*. *Biotechnol. Prog.* **6**: 333-340.
- Vogel, Gretchen (2000) The Mouse House as a Recruiting Tool. *Science* **288**: 254-255.
- Wrede, F and Rothaas, A (1934) Über das violacein und violette Farbstoffe des *Bacillus violaceus*, I. Hoppe Seyler's Z, *Physiol. Chem.* **223**:113-115.
- Young, Robert N. (1999) Importance of biodiversity to the modern pharmaceutical industry. *Pure Appl. Chem.* **71**(9), 1655-1661.
- Zangirolami, Teresa Cristina (1992) "Otimização da produção de xilitol a partir de xilose por *Candida parapsilosis* através de análise por superfície de resposta". Tese mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) – Unicamp.

Sugestões e Perspectivas

9. Sugestões e Perspectivas

1. Fontes de carbono como amido, parecem proporcionar um baixo crescimento celular, mas uma alta produção de violaceína. Talvez, seja uma boa fonte de carbono na obtenção processos fermentativos utilizando digoxismo.
2. Otimizar em escala-semipiloto (biorreator) variáveis tais como, agitação, O₂ e pH.
3. Futuramente poderá ser feito um fatorial que envolva micronutrientes (Fe, Co, Ni, Cu, Mg, Mn, Na, K, Cl,...), osmolaridade e atividade de água.
4. Otimizar a maximização da violaceína e minimizar a produção da deoxiviolaceína.
5. Fermentação com alimentação continuada, por exemplo glicose, para manter seus níveis ao redor de 0,5%. A medida que a glicose for sendo consumida, ela vai sendo adicionada para manter uma porcentagem média de 0,5%. O monitoramento da glicose pode ser feito por métodos quimiométricos através de medidas on-line. Isto pode ser conseguidos pela instalação de uma pistola de NIR (infravermelho próximo) no biorreator. Com isso obtém-se sensores de software. Com esses sensores de software pode-se obter não apenas a monitorização da glicose on-line, mas também de qualquer outro constituinte do meio de cultura de modo rápido, econômico, o que permitirá melhorar muito os processos de otimização de microrganismos.
6. Pode-se otimizar a separação da violaceína e deoxiviolaceína por sistemas de separação de fases com ajuda de planejamentos experimentais para modelagem de misturas. Quando se utiliza separação de fases, a parte mais difícil é determinar qual porcentagem de solventes a ser utilizado entre os reagentes, por exemplo água, butanol e acetato de etila. Utilizando modelagem de misturas e acompanhamento por HPLC é possível determinar qual a melhor porcentagem entre os reagentes que melhor separam a violaceína e deoxiviolaceína, utilizando poucos ensaios de laboratório.
7. A purificação do extrato bruto de violaceína (EBV) talvez possa ser melhorada utilizando um sistema de colunas filtrantes. Esse sistema é utilizado normalmente pela divisão de fitoquímica do CPQBA/Unicamp na purificação de extratos obtidos a partir de plantas.
8. Como o extrato de levedura foi uma forte fonte estimuladora da produção de violaceína e massa celular, pode-se pesquisar a utilização de outras fontes de nitrogênio complexas, como por exemplo extrato protéico de soja ou milho.
9. A Unicamp é um campos avançado, a qual tem as ferramentas básicas de trabalho (equipamentos e softwares) para se transformar em um polo de descobertas de novos medicamentos a partir de produtos naturais. No entanto há necessidade de articulação entre os laboratórios existentes e outros laboratórios a nível nacional. Há uma necessidade de integração da informação. Criar algo parecido, a nível organizacional, ao projeto genoma brasileiro, mas voltado para área de triagem molecular (bibliotecas de moléculas), otimização de metabólitos secundários e ensaios biológicos. A matéria-prima o Brasil tem, que é a natureza, o que falta é criar projetos temáticos a nível nacional que tornem essa exploração molecular rápida e eficaz.

Anexos

Balanço de massa celular (MC):

Colheu-se quadro amostras (5ml) após 15 h de fermentação e centrifugou-se a 10.000 rpm por 10 min. Desprezou-se o sobrenadante, adicionou-se água destilada ao pelete e após homogeneização transferiu-se para quatro bekers previamente tarados. Deixou-se secar em estufa a 80 °C por 12 h e depois por 24 h em dessecador com sílica gel.

Becker	Massa de células secas (g)
1	0,0602
2	0,0627
3	0,0701
4	0,0548
média	0,0620

Portanto, a concentração de células no caldo de fermentação é igual a 12,40 g de células secas/L.

Curva de calibração (massa celular vs ABS)

Diluição Vol. de susp. Células Volume total	Concentração de células na susp. Diluída (g/L)	ABS ($\lambda=720$ nm)	Vol. células (mL)	Vol. água (mL)
1/12	1,0333	0,9700	0,250	2,750
1/14	0,9093	0,8600	0,220	2,780
1/15	0,8267	0,8256	0,200	2,800
1/17	0,7233	0,7074	0,180	2,820
1/20	0,6200	0,5706	0,150	2,850
1/24	0,5167	0,5130	0,130	2,870
1/30	0,4133	0,4154	0,100	2,900
1/43	0,2893	0,2820	0,070	2,930
1/60	0,2067	0,2060	0,050	2,950
1/150	0,0827	0,0836	0,020	2,980
infinita	0,0000	0,0000	0,000	3,000

A equação abaixo representa a reta de regressão em relação as concentrações de células diluídas e suas respectivas absorvâncias.

$$Y = - 0,0082 + 1,0511 * \text{ABS} \quad (r = 0,9986)$$

onde,

$$Y = \text{concentração de células diluída (g/L)} \quad \text{ABS} = \text{absorvância (720 nm)}$$

Ao medir a absorvância da massa celular, diluiu-se a alíquota de células na própria cubeta. Logo, quando se substitui o valor da absorvância na equação de regressão, obtemos a concentração (g/L) da solução diluída. Para obter-se o valor da concentração no caldo de fermentação é só aplicar a formula da diluição ($CV = C'V'$).

Cálculo da concentração de MC na solução diluída (ABS = 0,6000):

$$Y = - 0,0082 + 1,0511 * \text{ABS}$$

$$Y = - 0,0082 + 1,0511 * 0,6000$$

$$Y = 0,6225 \text{ g/L (solução diluída)}$$

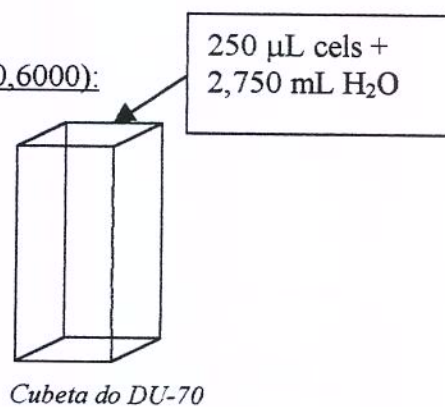
Obtenção da concentração no caldo de fermentação:

$$C * V = C' * V'$$

$$C * 0,00025 \text{ L} = 0,6225 * 0,0030 \text{ L}$$

$$C = 0,6225 * 0,0030 \text{ L} / 0,00025 \text{ L} = 7,47 \text{ g/L}$$

$$K = 12$$



Formula geral: $Y = [- 0,0082 + 1,0511 * \text{ABS}] * 12$

ABS ($\lambda=720 \text{ nm}$) Sol. diluída	Concentração de MC no caldo de fermentação (g/L)	Observação
0,6000	7,47	meio inicial - Shaker
1,0000	12,51	biorreator
1,6800	21,09	meio otimizado - Shaker

Balanço de massa da violaceína bruta (V):

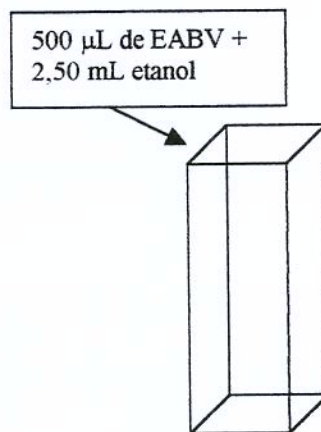
A dosagem de V foi realizada com base no valor do coeficiente de extinção molar da violaceína pura ($\epsilon = 0,05601 \text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $\lambda = 575 \text{ nm}$; em etanol; $d = 1 \text{ cm}$ de caminho óptico percorrido pela luz, na cubeta).

Cálculo da concentração de V na cubeta do DU-70:

$$C = \text{ABS} / \epsilon * d = 0,6 / 0,05601 * 1 = 10,71 \mu\text{g/mL}$$

Cálculo da massa de V contida na cubeta do DU-70:

$$C = m/V \Rightarrow m = C * V = 10,71 * 3 = 32,13 \mu\text{g}$$



Cubeta do DU-70

Portanto, a massa de V contida na cubeta do DU-70 ($= 32,13 \mu\text{g}$) dividido pelo volume de EABV adicionado ($= 500 \mu\text{L} = 0,5 \text{ mL}$) dará a concentração de V no EABV.

$$C = m/V = 32,12 / 0,5 = 64,26 \mu\text{g} / \text{mL}$$

Na fase de extração, para cada 1 mL de caldo fermentado obteve-se 5 mL de EABV ($= 321,3 \mu\text{g}$ de V). Assim, a relação de V (g) por litro de caldo fermentado é igual a 0,321 g/L.

Caldo Fermentado (L)	Massa de V (g)
1 mL = 0,001 L	0,000321 g

$$C = \{ [(\text{ABS} / \epsilon * d) * V_1 * V_3] / V_F * V_2 \} = \text{massa de V (g) em 1 L de caldo fermentado}$$

onde,

$d = 1 \text{ cm}$ (caminho óptico percorrido pela luz)

$V_1 = 3 \text{ mL}$ (volume na cubeta = $500 \mu\text{L}$ de EABV + $2,5 \text{ mL}$ de álcool)

$V_2 = 0,5 \text{ mL}$ (volume de EABV adicionado na cubeta)

$V_3 = 5 \text{ mL}$ (volume de EABV obtido a partir de 1 mL de caldo fermentado)

$V_F = 1000 \text{ mL}$ (volume de 1 L de caldo fermentado)

$$C = \frac{ABS * V_1 * V_3}{\epsilon * d * V_2 * V_F} \rightarrow K = 0,535618$$

$C \text{ (g/L)} = ABS * K \Rightarrow$ g de violaceína bruta por Litro de caldo fermentado.

ABS	C (g/L)	Massa em 30 L de caldo
0,3	0,166	4,98 g
0,6	0,32	9,60 g
0,8	0,428	12,85 g

As tabelas abaixo mostram o valor das absorbâncias obtidas experimentalmente.

Tabela 5.3 Planejamento fatorial fracionário de resolução III (2^{15-11}) e a matriz de planejamento utilizado na triagem de variáveis.

Fatores		N í v e i s	
		(-)	(+)
1	D-glicose	0.25 % (p/v)	1.00 % (p/v)
2	Extr. levedura	0.1 % (p/v)	0.6 % (p/v)
3	DL-Metionina	0.01 g l ⁻¹	0.100 g l ⁻¹
4	Vit-B12 (cianocobalamina)	0.012 ng ml ⁻¹	0.100 µg ml ⁻¹
5	L-triptofano	0.02 % (p/v)	0.10 % (p/v)
6	Agitação	150 rpm	250 rpm
7	Temperatura	28 °C	33 °C
8	pH (tampão fosfato)	6.8	7.8
9	Peptona bacteriologica	0.2 % (p/v)	0.8 % (p/v)
10	Inóculo	1.0 % (v/v)	5.0 % (v/v)
11	Sulfato de zinco	0.05 mM	0.1 mM

Exp.	Fatores reais											Fatores virtuais				Respostas			
																Células		violaceína	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	ABS ^a	CM	ABS ^b	V
1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	0,29	3,56	0,39	0,21
2	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	0,59	7,34	0,19	0,10
3	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	0,30	3,69	0,26	0,14
4	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	0,35	4,32	0,14	0,07
5	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	0,43	5,33	0,37	0,20
6	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	0,55	6,84	0,15	0,08
7	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	0,54	6,71	0,31	0,17
8	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	0,07	0,78	0,00	0,00
9	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	0,25	3,05	0,09	0,05
10	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	0,00	0,00	0,00	0,00
11	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	0,48	5,96	0,24	0,13
12	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	0,93	11,63	0,26	0,14
13	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	0,33	4,06	0,17	0,09
14	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	0,51	6,33	0,14	0,07
15	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	0,42	5,20	0,26	0,14
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,66	8,23	0,31	0,17

a=absorbância ($\lambda=720$ nm); *CM*=massa celular seca g/L; *b*=absorbância ($\lambda=575$ nm); *V*=violaceína bruta (g/L)

Tabela 5.9 Matriz do planejamento experimental com cinco fatores, 2^5 , e os resultados para produção de MC e V, após 36 h de fermentação.

Fatores		Níveis					Respostas			
		(-2)	(-1)	(0)	(+1)	(+2)				
1	Glicose	0,1 %	0,3 %	0,5 %	0,7 %	0,9 %				
2	Ext. levedura	0,2 %	0,4 %	0,6 %	0,8 %	1,0 %				
3	Peptona	0,1 %	0,3 %	0,5 %	0,7 %	0,9 %				
4	Triptofano	0,02 %	0,04 %	0,06 %	0,08 %	0,10 %				
5	ZnSO ₄	0,025 mM	0,0375 mM	0,05 mM	0,0625 mM	0,075 mM				

Exp.							Respostas			
	Glic	Leve	Pep	Trip	Zinc		MC		V	
							ABS	g/L	ABS	g/L
1	-1	-1	-1	-1	1		0,37	4,57	0,33	0,18
2	1	-1	-1	-1	-1		0,58	7,22	0,32	0,17
3	-1	1	-1	-1	-1		0,44	5,45	0,39	0,21
4	1	1	-1	-1	1		0,87	10,88	0,46	0,25
5	-1	-1	1	-1	-1		0,30	3,69	0,33	0,18
6	1	-1	1	-1	1		0,65	8,10	0,38	0,20
7	-1	1	1	-1	1		0,42	5,20	0,35	0,19
8	1	1	1	-1	-1		0,73	9,11	0,39	0,21
9	-1	-1	-1	1	-1		0,38	4,69	0,35	0,19
10	1	-1	-1	1	1		0,62	7,72	0,42	0,22
11	-1	1	-1	1	1		0,50	6,21	0,47	0,25
12	1	1	-1	1	-1		1,00	12,51	0,51	0,27
13	-1	-1	1	1	1		0,32	3,94	0,35	0,19
14	1	-1	1	1	-1		0,69	8,60	0,44	0,24
15	-1	1	1	1	-1		0,38	4,69	0,37	0,20
16	1	1	1	1	1		0,89	11,13	0,63	0,34
17	-2,0	0	0	0	0		0,20	2,42	0,26	0,14
18	2,0	0	0	0	0		1,05	13,15	0,55	0,29
19	0	-2,0	0	0	0		0,60	7,47	0,39	0,21
20	0	2,0	0	0	0		0,76	9,49	0,51	0,27
21	0	0	-2,0	0	0		0,80	9,99	0,55	0,29
22	0	0	2,0	0	0		0,54	6,71	0,47	0,25
23	0	0	0	-2,0	0		0,65	8,10	0,34	0,18
24	0	0	0	2,0	0		0,71	8,86	0,52	0,28
25	0	0	0	0	-2,0		0,64	7,97	0,49	0,26
26	0	0	0	0	2,0		0,66	8,23	0,51	0,27
27*	0	0	0	0	0		0,53	6,59	0,42	0,22
28*	0	0	0	0	0		0,58	7,22	0,40	0,21
29*	0	0	0	0	0		0,51	6,33	0,41	0,22
30*	0	0	0	0	0		0,62	7,72	0,45	0,24
31*	0	0	0	0	0		0,60	7,47	0,51	0,27
32*	0	0	0	0	0		0,62	7,72	0,50	0,27

* Ponto Central

ABS = Absorbância (nm)

Tabela 5.12 Matriz do planejamento experimental com três fatores, 2^3 , e os resultados para produção de MC e V, após 36 h de fermentação.

Fatores		Níveis				
		(-1,68)	(-1)	(0)	(+1)	(+1,68)
1	Glicose	0,5%	0,84%	1,04%	1,24%	1,58%
2	Extrato de Levedura	0,6%	0,94%	1,14%	1,34%	1,68%
3	Triptofano	0,06%	0,094%	0,114%	0,134%	0,168%

Exp.	Glicose	Levedura	Triptofano	Respostas			
				MC		V	
				ABS	g/L	ABS	g/L
1	-1	-1	-1	1,23	15,42	0,65	0,35
2	1	-1	-1	1,22	15,29	0,66	0,35
3	-1	1	-1	1,40	17,56	0,73	0,39
4	1	1	-1	1,50	18,82	0,77	0,41
5	-1	-1	1	1,28	16,05	0,69	0,37
6	1	-1	1	1,19	14,91	0,58	0,31
7	-1	1	1	1,43	17,94	0,82	0,44
8	1	1	1	1,42	17,81	0,65	0,35
9	-1,68	0	0	1,03	12,89	0,69	0,37
10	1,68	0	0	1,30	16,30	0,59	0,32
11	0	-1,68	0	0,87	10,88	0,53	0,28
12	0	1,68	0	1,68	21,09	0,80	0,43
13	0	0	-1,68	1,39	17,43	0,61	0,33
14	0	0	1,68	1,37	17,18	0,67	0,36
15*	0	0	0	1,34	16,80	0,60	0,32
16*	0	0	0	1,44	18,06	0,71	0,38
17*	0	0	0	1,40	17,56	0,70	0,37
18*	0	0	0	1,32	16,55	0,66	0,35

* Ponto Central ABS = absorbância (nm)

Tabela 5.15 Produção de MC e V pelo *C. violaceum* em biorreator. Os dados desta tabela referem-se as variáveis que foram monitoradas durante o tempo de fermentação.

Tempo de fermentação (hh:mm)	MC (ABS)	MC (g/L)	V (ABS)	V (g/L)	% [O ₂]	pH	Pressão (PSI)
00:00	0,0253	0,22	0,0000	0,00	107,7	6,87	3
04:00	0,0401	0,41	0,0000	0,00	129,1	6,92	3
05:00	0,0478	0,50	0,0000	0,00	125,8	7,09	3
06:00	0,0760	0,86	0,0000	0,00	129,9	7,35	3
07:00	0,1666	2,00	0,0000	0,00	110,0	7,69	3
08:00	0,3666	4,53	0,0000	0,00	67,80	7,90	3
09:00	0,4956	6,15	0,0000	0,00	49,80	7,76	3
10:00	0,7116	8,88	0,0224	0,01	77,00	7,67	11
11:00	0,8501	10,62	0,0661	0,04	79,00	7,84	8
12:00	0,9240	11,51	0,1426	0,08	90,20	7,76	7,5
13:00	0,9800	12,26	0,1250	0,07	----	----	----
15:00	0,8579	10,72	0,2000	0,11	158,70	7,18	16
16:00	0,8914	11,15	0,2200	0,12	128,00		13
17:00	0,9986	12,50	0,2420	0,13	111,00	7,88	10
19:00	0,9510	11,90	0,3500	0,19			
21:00	1,0018	12,54	0,4680	0,25	155,40	8,04	17
22:00	1,0829	13,56	-----	-----	125,30	8,44	11
22:01	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2
32:00	1,0144	12,70	0,61	0,33	0,6	8,16	2