

**Universidade Estadual de Campinas**

**Instituto de Química  
Departamento de Físico-Química**



**Estudo microcalorimétrico em tempo real do  
metabolismo da bactéria *Chromobacterium violaceum***

**Candidata  
Denise Aparecida de Oliveira**

**Orientador  
Prof. Dr. Pedro Luiz Onófrio Volpe**

**Tese de Doutorado**

**Campinas, junho de 2003**

UNIDADE	IQ
Nº CHAMADA	7/UNICAMP
V	EX
TOMBO BC/	56523
PROC.	16-12-4103
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	07/11/03
Nº CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA  
UNICAMP

OL4e

Oliveira, Denise Aparecida de.  
Estudo microcalorimétrico em tempo real do  
metabolismo da bactéria *Chromobacterium*  
*violaceum* / Denise Aparecida de Oliveira. --  
Campinas, SP: [s.n], 2003.

Orientador: Pedro L. O. Volpe

Tese (doutorado) – Universidade  
Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. \*Microcalorimetria biológica. 2. \*Microcalori-  
metria de fluxo. 3. \*Metabolismo bacteriano.  
4. \*Cadeia respiratória. I. Volpe, Pedro L. O.  
II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

*Aos meus pais, Manuel e Alzira*  
*Aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhas*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Pedro Volpe pela orientação, apoio, compreensão e amizade sobretudo nos momentos difíceis.

Ao pessoal do grupo, pela convivência agradável e companheirismo: Alexandre, Alvimar, Ana Carolina, André, Carlos, Chrislane, Fabiana, Jucelio, Madalena, Marcos, Mauricio, Priscyla, Ricardo Belchior, Ricardo Cachichi, Vanessa e Vera.

Às alunas de iniciação científica, Chrislane e Priscyla, que me ajudaram nos estudos de respiração bacteriana e de consumo de açúcares, respectivamente.

Ao Prof. Dr. Nelson Durán, pela colaboração imprescindível, disponibilizando a estrutura do Laboratório de Química Biológica para a execução de uma parte deste trabalho. Pelo apoio, amizade e dicas importantes.

Ao amigo Daniel Rettori, ao qual serei eternamente grata pelo apoio e incentivo.

À Dra. Alda Lerayer do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas (ITAL) pelo empréstimo do reator biológico Bioflo I, utilizado na etapa inicial do trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Química Biológica pela amizade, convivência agradável e apoio sempre presente.

A todos os colegas do laboratório B-218 pela agradável convivência.

À Profa. Dra. Inés Joekes e ao pessoal do grupo pelo apoio e amizade.

Aos amigos Carla, Ricardo, Maria Alice, Natália, Joely, Lúcio, Sandrinha, Edgar, Carol e Daniel (os DJ's). Pelas diversas manifestações de apoio e carinho. Aos bons momentos de festas e bares da vida.

Ao Grupo de Capoeira Cordão de Ouro - Barão Geraldo e ao Prof. Fábio "Pintado" (Iêê, viva meu Mestre, camará!!). Aos amigos que conheci na Capoeira (Gabi, Escova, Fábio, Adriana, Abacaxi), companheiros de todas as horas e vadiagens capoeirísticas.

Ao Euler, por tudo que vivemos, pela nossa eterna amizade e pelas batalhas vencidas...  
À Marildinha, Eura e Márcio, pelo carinho e amizade de sempre.

À Laiz, minha terapeuta, que tem me ajudado de forma incontestável a vencer alguns obstáculos da vida com força e tranquilidade.

Ao povo de casa, César, Antonio, Rodrigo e Anna pela amizade, apoio e convivência agradabilíssima. Aos não humanos, porém, não menos amáveis Linus, Paloma e Shiva.

Aos funcionários do IQ pela valiosa ajuda.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

*"A vida só pode ser compreendida olhando-se para trás;  
mas só pode ser vivida olhando-se para a frente."*

Søren Kierkegaard  
Filósofo dinamarquês (1813-1855)

# ESTUDO MICROCALORIMÉTRICO EM TEMPO REAL DO METABOLISMO DA BACTÉRIA *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM*

Autora: Denise A. de Oliveira  
Orientador: Prof. Dr. Pedro L. O. Volpe

Palavras-chave: microcalorimetria de sistemas biológicos, metabolismo bacteriano, açúcares, desacopladores, violaceína

## Resumo

Neste trabalho, a microcalorimetria em regime de fluxo contínuo foi utilizada com o objetivo de se investigar, em tempo real, os processos de crescimento e respiração da *C. violaceum*. Os experimentos referentes ao crescimento bacteriano foram realizados variando-se a composição do meio de cultura. Foi feita a análise conjunta dos dados microcalorimétricos com os parâmetros pH, consumo de O<sub>2</sub>, biomassa, biossíntese de violaceína e consumo de açúcares. O efeito do tamanho da cadeia hidrofóbica lateral de *m*-alcoxifenóis (desacopladores da cadeia respiratória) foi investigado sobre a respiração da *C. violaceum* utilizando microcalorimetria. Foi feita a medida simultânea da tensão de oxigênio dissolvido (TOD) utilizando um eletrodo de oxigênio conectado à linha de fluxo. A padronização do sistema para o estudo microcalorimétrico do metabolismo da bactéria foi realizada com êxito. O estudo microcalorimétrico referente ao crescimento da *C. violaceum* mostrou reprodutibilidade na ocorrência de um pico de efeito térmico em cerca 9 h de experimento. O aumento da biomassa, acompanhado pelo consumo de glicose, ocorreu sempre após este pico. Não foi observado um efeito térmico significativo durante a fase exponencial de crescimento e a produção de violaceína. A quantidade total dos açúcares e a natureza dos mesmos exerce uma influência sobre a posição e a altura do primeiro pico das curvas obtidas. A ordem crescente de produção de energia, relativa ao açúcar utilizado, é galactose-lactose-glicose. As curvas de efeito térmico, biomassa e consumo de carboidratos indicam que, nas condições utilizadas, a bactéria não apresentou diauxismo. O efeito inibitório dos *m*-alcoxifenóis sobre a respiração da *C. violaceum* é proporcional ao aumento da cadeia lateral destes compostos e o monitoramento da TOD confirmou este resultado. A *C. violaceum* mostrou-se mais sensível aos *m*-alcoxifenóis que a bactéria *E. coli*.

# MICROCALORIMETRIC ON TIME STUDY OF METABOLISM OF *BACTERIUM CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM*

Author: Denise A. de Oliveira  
Advisor: Prof. Dr. Pedro L. O. Volpe

Keywords: biological systems microcalorimetry, bacterial metabolism, sugars, uncouplers, violacein

## Abstract

In this work, the flow through microcalorimetry was used to investigate on real time, the growth and respiratory processes of *Chromobacterium violaceum*. The experiments relative to bacterial growth were done using culture media with different compositions. A combined analysis of microcalorimetric data with pH, oxygen consumption, biomass, violacein biosynthesis and sugar uptake was performed. The effect of the hydrophobic side chain of m-alkoxyphenols (uncouplers of respiratory process) was investigated on the *C. violaceum* respiration by microcalorimetry and a simultaneous measurement of dissolved oxygen tension (DOT) was done through a connection of the oxygen electrode in the flow line. The system for microcalorimetric study of bacterial metabolism was successfully standardized. Microcalorimetric study related to *C. violaceum* growth showed a reproducible occurrence of a thermal effect peak at 9 h of experiment. In all the experiments exponential growth, followed by glucose uptake occurred after this peak. During exponential growth phase and violacein production no significant thermal effect was observed. Total amount of sugars and their characteristics play an influence over the height and position of this peak in the microcalorimetric curves obtained. The increasing energy order, relative to the sugar utilized, is galactose-lactose-glucose. The thermal effect, biomass and carbohydrate uptake indicated that, in this conditions, no diauxic growth was presented by *C. violaceum*. The inhibitory effect of m-alkoxyphenols on the respiration of *C. violaceum* is proportional to the increasing of side chain of these compounds. The simultaneous measurement of DOT confirmed these results. A comparison between *C. violaceum* and *Escherichia coli* showed that the first bacterium is more sensitive to m-alkoxyphenols.

# ***CURRICULUM VITAE***

## **TÍTULOS ACADÊMICOS**

Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológicas – IQ – Unicamp (dez/1995)

Mestrado em Farmacologia – FCM – Unicamp (nov/1998) – bolsa FAPESP

## **EXPERIÊNCIA ACADÊMICA**

Iniciação científica - IQ – Unicamp (maio-dezembro/1995) bolsa FAPESP.

## **PUBLICAÇÕES EM PERIÓDICOS INTERNACIONAIS**

- De Conti R, Oliveira DA, Fernandes AMAP, Melo PS, Rodriguez JA, Haun M, De Castro SL, Souza-Brito ARM, Durán N. (1998). Application of a multi-endpoint cytotoxicity assay to the trypanocidal compounds 2-propen-1-amine derivatives and determination of their acute toxicity. *In Vitro and Molecular Toxicology*. **11(2)**: 153.
- Oliveira DA, Fernandes AMAP, De Conti R, Rodriguez JA, Haun M, Souza-Brito ARM, De Castro SL, Duran N. (1999). "Evaluation of in vitro toxicity of N,N-dimethyl-2-propen-1-amines isomers". *Pharmazie*. **54(11)**: 847.

## **PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS**

- De Conti, R.; Oliveira, D.A.; Fernandes, A.M.A.P.; Moraes, S.G.; Haun, M.; Durán, N. "Antichagásicos: síntese, separação de isômeros e avaliação de atividade biológica de n,n-dimetil-2-propen-1-amina". XIX<sup>a</sup> Reunião Anual da SBQ- Poços de Caldas-MG. Resumo QB-010. (1996).
- Oliveira, D.A.; Fernandes, A.M.P.; De Conti, R.; Haun, M.; De Castro, S.L. e Durán, N. "Propriedades biológicas dos isômeros de n,n-dimetil-2-propen-1-amina". XI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. Caxambu - M.G. Resumo 17.059 (1996).
- Oliveira, D.A.; De Conti, R.; Santa-Rita, S.M.; De Castro, S.L.; Haun, M. e Durán, N. "Selectivity in the trypanocidal activity of n,n-dimethyl-2-propen-1-amine isomers". XXIII Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambu - M.G. Resumo 520 (1996).

- Durán, N.; Haun, M.; Pilli, R.A.; Faljoni-Alario, A.; De Castro, S.L.; Souza-Brito, A.R.; De Conti, R.; Pereira, D.G.; Oliveira, D.A.; Fernandes, A.M.P.; De Souza, A.O.; Santa-Rita, R.M. and De Souza, E.M. "Synthesis and biological activity of n,n-dimethyl-2-propen-1-amine derivatives". 1<sup>st</sup> Congress of Pharmaceutical Sciences. Ribeirão Preto - S.P. Resumo: *Bollettino Chimico Farmaceutico* **136** (2), 159.(1997).
- Sato, D.N.; Aily, D.C.G.; Cândido, R.H.; Oliveira, D.A.; Pereira, D.G.; De Souza, A.O. and Durán, N. "Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) and the minimal bactericidal concentration (CBM) of n,n-dimethyl-2-propen-1-amine derivatives against *Mycobacterium tuberculosis*". 1<sup>st</sup> Congress of Pharmaceutical Sciences. Ribeirão Preto - S.P. Resumo: *Bollettino Chimico Farmaceutico* **136** (2), 160.(1997).
- Oliveira, D.A.; De Souza, A.O.; Fernandes, A.M.P.; Durán, M.; Pereira, D.G.; Rodriguez, J.A.; Melo, P.S.; De Castro, S.L.; Souza-Brito, A.R.M.; Haun, M.; De Conti, R.; Esposito, E.; Durán, N. "Synthesis of new 2-propene-1-amine derivatives, trypanocide activities and their squalene epoxidase activity inhibition". XXIV Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambu - M.G. Resumo 524. (1997).
- Oliveira, D.A.; Faljoni-Alario, A.; Souza-Brito, A.R.M. e Durán, N. "Mechanism of action of n,n-dimethyl-2-propen-1-amines on *T. cruzi* epimastigote form". XXV Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambu - MG (1998).
- Oliveira, D.A.; Durán, N., Volpe, P.L.O. "Estudo do crescimento aeróbio da *Chromobacterium violaceum* através da microcalorimetria em regime de fluxo contínuo". XXIII<sup>a</sup> Reunião Anual da SBQ. Poços de Caldas-MG (2001).
- Lisbôa, C.P.; Oliveira, D.A.; Volpe, P.L.O. "Investigação microcalorimétrica do efeito inibidor de *m*-metoxifenol sobre a respiração da bactéria *Chromobacterium violaceum*". XXIII<sup>a</sup> Reunião Anual da SBQ. Poços de Caldas-MG (2001).
- Oliveira, D.A.; Marcato, P.D.; Volpe, P.L.O. "Microcalorimetric studies of *Chromobacterium violaceum* growth". 17<sup>th</sup> International Conference on Chemical Thermodynamics – IUPAC. Rostock - Alemanha (2002).

## LISTA DE ABREVIATURAS

- $\Delta H_{an}$  - entalpia do anabolismo  
 $\Delta H_{cat}$  - entalpia do catabolismo  
 $\Delta H_{met}$  - entalpia do metabolismo  
ABL -  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butiro-lactona  
ADP - adenosina 5' di fosfato  
AHL - n-acil homoserina lactona  
ATP - adenosina 5' tri fosfato  
CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência  
DMSO - dimetilsulfóxido  
Exp - experimento  
FD - fator de diluição  
HHL - n-hexanoil-L-homoserina lactona  
HTTI - hidrólise da triacetina em tampão imidazol  
Met - m-metoxifenol  
NC - número de colônias presentes na placa de Petri  
PBS - tampão fosfato adicionado de sais  
PHB - poli-3-hidroxi-butirato  
PHVA - poli-3-hidroxi-valerato  
Porc - porcentagem  
Prop - proporções entre açúcares  
 $q_{an}$  - efeito térmico do anabolismo  
 $q_{cat}$  - efeito térmico do catabolismo  
RC - resposta calorimétrica  
RB - resposta biológica  
SDS - dodecilsulfato de sódio  
TOD - tensão de oxigênio dissolvido  
UFC - unidades formadoras de colônias

# ÍNDICE

## 1. INTRODUÇÃO 1

1.1. <i>Chromobacterium violaceum</i> _____	1
1.2. Biossíntese de violaceína induzida por “ <i>quorum sensing</i> ” _____	3
1.3. Microcalorimetria aplicada a sistemas biológicos _____	3
1.4. Energética do metabolismo microbiano _____	6
1.4.1. Produção de energia durante o crescimento _____	7
1.4.2. Respiração microbiana _____	9
1.5. Compostos bioativos (m-alcoixifenóis) _____	11
1.6. Diauxismo _____	12
1.7. O contexto _____	12

## 2. OBJETIVOS 13

## 3. PARTE EXPERIMENTAL 14

3.1. Roteiro dos experimentos realizados _____	14
3.2. Materiais e equipamentos utilizados _____	14
3.2.1. Reatores biológicos _____	15
3.2.2. Espectrofotômetros _____	15
3.2.3. Cromatógrafo _____	15
3.2.4. Sistema de medida microcalorimétrica - descrição _____	16
3.3. Reagentes, soluções e meios de cultura _____	19
3.4. Metodologias empregadas _____	21
3.4.1. Curva de calibração de crescimento da <i>C. violaceum</i> _____	21
3.4.2. Curvas de calibração dos açúcares – medidas cromatográficas _____	23
3.4.3. Curva de calibração da violaceína _____	23
3.4.4. Procedimento de estocagem da <i>C. violaceum</i> por criopreservação _____	24
3.4.5. Preparação dos experimentos microcalorimétricos _____	26
3.4.5.1. Montagem e limpeza do sistema _____	26
3.4.5.2. Calibração do microcalorímetro _____	26
3.4.5.2.a. Calibração elétrica _____	26
3.4.5.2.b. Calibração química _____	27

3.4.6. Medidas microcalorimétricas do crescimento da <i>C. violaceum</i>	28
3.4.6.1. Padronização do sistema de medida	28
3.4.7. Monitoramento de outros parâmetros do processo de crescimento	29
3.4.7.1. Biomassa	30
3.4.7.2. Consumo de açúcares – medidas cromatográficas	30
3.4.7.3. Violaceína	30
3.4.8. Efeito de m-alcoxifenóis sobre a respiração da <i>C. violaceum</i>	31
3.4.8.1. Padronização do sistema de medida	31
3.4.8.2. Efeito do aumento da cadeia hidrofóbica de m-alcoxifenóis sobre a respiração da <i>C. violaceum</i>	32
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>34</b>
4.1. Curvas de calibração e procedimentos de manipulação da <i>C. violaceum</i>	34
4.1.1. Curva de calibração de crescimento da <i>C. violaceum</i>	34
4.1.2. Curvas de calibração dos padrões de açúcares	37
4.1.3. Curva de calibração da violaceína	39
4.1.4. Estocagem da <i>C. violaceum</i> por criopreservação	39
4.2. Preparação dos experimentos microcalorimétricos	40
4.2.1. Calibração do sistema calorimétrico	40
4.3. Medidas microcalorimétricas do crescimento da <i>C. violaceum</i>	42
4.3.1. Padronização do sistema de medida	42
4.3.2. Monitoramento de outros parâmetros do processo de crescimento	46
4.3.2.1. Estudo do metabolismo de glicose como fonte única de carbono	48
4.3.2.2. Estudo do metabolismo de duas fontes de carbono	58
4.3.2.3. Investigação do efeito microcalorimétrico da biossíntese de violaceína	63
4.4. Efeito de m-alcoxifenóis sobre a respiração de <i>C. violaceum</i>	66
4.4.1. Padronização dos sistemas de medida microcalorimétrica e de TOD	66
4.4.2. Efeito do aumento da cadeia lateral dos m-alcoxifenóis sobre a respiração da <i>C. violaceum</i>	76
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>82</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>84</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. *Chromobacterium violaceum*

A *C. violaceum* pertence à classe dos bacilos flagelados Gram-negativos e anaeróbios facultativos. Essa bactéria consome, preferencialmente, carboidratos durante a fermentação, sendo definida como um microrganismo saprófita do solo e da água (Sneath, 1974, 1984). A *C. violaceum* é normalmente considerada um agente não-patogênico para humanos. Entretanto, ocorrências de infecção por *C. violaceum*, que causaram desde diarreia moderada até casos raros de morte por septicemia, têm sido relatadas (De Ley e Gillis, 1992). Estudos recentes mostram que, apesar de ser encontrada frequentemente na natureza e poder causar sérias infecções em humanos, a incidência de casos é muito baixa (Petrillo, 1984, Midani e Rathore, 1998).

A *C. violaceum* é freqüentemente encontrada em solos e águas de regiões tropicais e subtropicais sendo que, no território brasileiro, seu habitat mais conhecido é o leito do Rio Negro (Amazônia). Existe a hipótese de que a coloração escura e a baixa fertilidade deste rio sejam decorrentes da presença de violaceína (figura 1), um pigmento violeta produzido pela bactéria durante a fase estacionária de seu crescimento (Caldas e col., 1978).

A biossíntese da violaceína ocorre, essencialmente, a partir do L-triptofano em presença de oxigênio molecular (De Moss e Evans, 1959; Hoshino e col., 1987(a, b)). Além de estudos sobre a biossíntese, há trabalhos na literatura que relatam os diferentes efeitos biológicos da violaceína (Riveros e col., 1988). Foi observada a atividade bactericida da violaceína (Lichstein e Van de Sand, 1945; De Moss, 1967; Hoshino e col., 1987a; Durán e col., 1983). Tanto a própria *C. violaceum* quanto a violaceína foram letais para alguns protozoários ciliados e amebas (Singh, 1942, 1945). Foram relatadas atividades da violaceína como tripanosomicida (Caldas, 1978; Riveros, 1988; Durán e col., 1989), anti-viral (May e

col., 1991), anti-tumoral (Hoshino e col., 1992; Durán e col., 1996<sub>(a,b)</sub>) e anti-oxidante (Aoki e col., 1997).

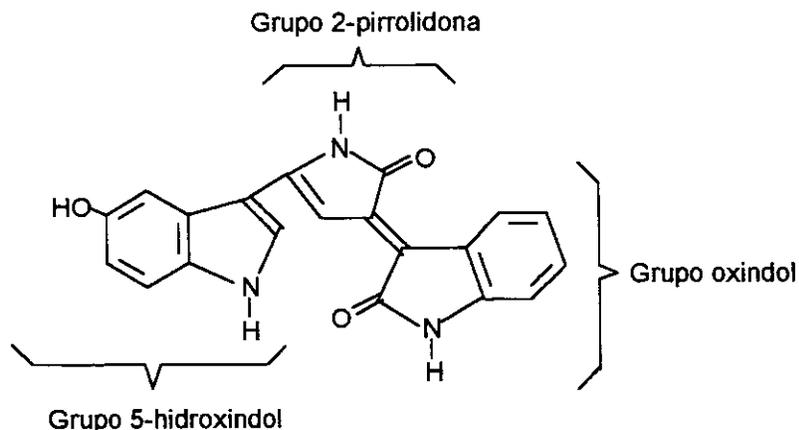


Figura 1: Estrutura da violaceína.

A violaceína e outras substâncias produzidas pela *C. violaceum* têm despertado interesse quanto a possíveis aplicações nas áreas farmacêutica (antibióticos, ativadores da resposta imunológica), cosmética, têxtil e alimentícia (corantes) (Gillis e De Ley, 1992; Hoshino e col., 1994; Hoshino e col., 1994<sub>(patente)</sub>; Aoki e col., 1998<sub>(patente)</sub>, Shirata e col., 1998<sub>(patente)</sub>; Durán e Menck, 2001).

Além disso, estudos recentes têm mostrado a possibilidade de aplicação da *C. violaceum* como organismo capaz de produzir polímeros biodegradáveis, os chamados PHB (poli-3-hidroxi-butilato) e PHVA (poli-3-hidroxi-valerato) (Kolibachuk e col., 1999) e de degradar filmes plásticos obtidos através de celulose modificada (Gourson e col., 1999).

Devido à capacidade da *C. violaceum* de produzir traços de HCN, sob anaerobiose, a captação de resíduos de ouro em minério, através da complexação do metal por íons cianeto, tem sido considerada como uma outra forma de aplicação importante do microrganismo (Campbell e col., 2001).

O interesse gerado pelo potencial biotecnológico e farmacêutico da *C. violaceum* e seus metabólitos, fez com que ela se tornasse o primeiro microrganismo a ter seu genoma completamente sequenciado no Brasil, por uma rede de

laboratórios financiada pelo Ministério da Ciência e Tecnologia e pelo CNPq (Durán e Menck, 2001).

### **1.2. Biossíntese de violaceína induzida por “quorum sensing”**

Recentemente, McClean e colaboradores (1997) descobriram que a biossíntese de violaceína está vinculada a um mecanismo regulatório, dependente da densidade celular, empregado por diversas espécies de bactérias. Neste mecanismo, chamado de “quorum sensing”, as bactérias secretam moléculas de feromônios que se acumulam fora da célula. Ao atingir certa concentração desses feromônios, células individuais passam a ‘sentir’ quantas células vizinhas estão próximas a elas. Neste sentido, elas podem determinar se há um número de indivíduos suficiente, um “quorum”, para iniciar a expressão de um fenótipo específico. A expressão genética dependente da densidade celular parece ser amplamente difundida em bactérias. O fenômeno do “quorum sensing” é bem conhecido em bactérias Gram-negativas, sendo que as n-acil homoserinas lactonas são as moléculas difusoras de comunicação, modulando fenótipos de acordo com a densidade celular (McClean e col., 1997).

Na *Chromobacterium violaceum*, a presença de um tipo de n-acil homoserina lactona (AHL) - chamado de n-hexanoil-L-homoserina lactona (HHL) - está envolvido na regulação da produção de violaceína, de cianeto, enzimas quitinolíticas, exoproteases (McClean e col., 1997). A utilização de HHL, como um estimulante da produção de violaceína, pode ser interessante no estudo de efeito térmico deste processo.

### **1.3. Microcalorimetria aplicada a sistemas biológicos**

A atividade metabólica de organismos vivos pode ser medida em termos do efeito térmico produzido por eles durante o ciclo de vida. É através da microcalorimetria, que se pode determinar as variações de entalpia ( $\Delta H$ ) de todos os

processos biológicos que ocorrem na célula, mesmo que a natureza de tais processos não seja totalmente conhecida (James, 1987).

Foi a partir dos anos 80, com o desenvolvimento de calorímetros mais sensíveis, os microcalorímetros, que tornou-se possível o estudo de sistemas que produzem baixos valores de potência térmica, dentre eles, os sistemas celulares vivos. Beezer (1980) e Wadsö (1987) contribuíram fundamentalmente para o estabelecimento da técnica aplicada a sistemas biológicos.

Investigações microcalorimétricas em sistemas microbianos têm sido conduzidas na pesquisa básica e em diversas aplicações. Por exemplo, o efeito de drogas tem sido estudado extensivamente, de modo a explorar o possível uso prático da técnica em áreas como análises clínicas e em farmacologia. A microcalorimetria em condições isotérmicas (a temperatura constante) desenvolveu-se, em grande parte, para atender a necessidades de áreas como a bioquímica e a biologia celular buscando, assim, mais informações sobre o metabolismo celular (Wadsö, 1997).

Em experimentos envolvendo a termoquímica de células vivas, o efeito térmico produzido, isto é, a potência térmica,  $P$ , é determinada em função do tempo ( $P=dq/dt$ ). Geralmente, estas medidas são realizadas através do uso de microcalorímetros que operam, essencialmente, sob condições isotérmicas. Estes instrumentos requerem poucas quantidades de material e apresentam alta sensibilidade (potências na ordem de  $\mu W$ ). Os resultados normalmente são expressos em curvas  $p-t$  (potência térmica *versus* tempo). Como a potência térmica produzida num processo é proporcional à velocidade desse processo, tais experimentos são, também, capazes de fornecer dados cinéticos, que são largamente utilizados no estudo do crescimento de sistemas vivos (James, 1987; Wadsö, 1988).

Há muitas vantagens na utilização da microcalorimetria no estudo de sistemas biológicos. As medidas são reprodutíveis, de alta sensibilidade e geralmente de obtenção rápida. Além disso, ao contrário de outras técnicas, o método não depende do uso de meio homogêneo, sendo universalmente aplicável a sistemas heterogêneos complexos, como o solo, por exemplo (James, 1987, Wadsö, 1997).

A mudança na ênfase de estudos microcalorimétricos qualitativos que descrevem a forma e a posição das curvas de potência térmica *versus* tempo, durante o crescimento bacteriano, para investigações mais quantitativas levam à determinação de variações de entalpia. Isto tem sido possível graças às melhorias na instrumentação e à realização de um controle mais rigoroso das condições de cultura, aliadas ao monitoramento de outros parâmetros. Por se tratar de uma técnica não-específica, outros parâmetros de crescimento celular (biomassa, pH, consumo de O<sub>2</sub>, liberação de CO<sub>2</sub>, etc.) devem ser monitorados de modo a aumentar a especificidade e o entendimento de reações biológicas complexas (James, 1987).

Um exemplo de estudo quantitativo da produção de energia durante o metabolismo microbiano é a investigação do diauxismo em leveduras. A ordem temporal de vias metabólicas sucessivas e alternadas foi observada em leveduras através de estudos microcalorimétricos (Schaarschmidt e Lamprecht, 1977, 1978). As curvas *p-t* obtidas sob condições anaeróbias mostraram a presença de dois picos que refletem o consumo sequencial de duas diferentes fontes de carbono adicionadas ao meio de cultura (por exemplo, glicose e galactose ou sacarose) (Lamprecht, 1980; Volpe, 1997b).

De um modo semi-quantitativo, têm sido estudados efeitos de antibióticos, drogas ou desacopladores do metabolismo celular (Lamprecht, 1980; Beezer e col., 1986(a,b); Volpe, 1997a; Pereira e col., 1998; Rettori e Volpe, 1998).

Teoricamente, todos os microrganismos podem ser estudados por calorimetria. As únicas limitações no caso do regime de fluxo contínuo, largamente utilizado no estudo de células em suspensão, devem-se às dificuldades na agitação e formação de bolhas na cela calorimétrica (Belaich, 1980).

Levando em conta a importância da inclusão do consumo de oxigênio como um parâmetro a ser investigado *in loco*, no estudo de sistemas biológicos, Bäckman e Wadsö (1991) investigaram formas de se medir a tensão de oxigênio dissolvido (TOD), inserindo um eletrodo de oxigênio na própria cela de perfusão (um tipo de modo de fluxo) e obtiveram resultados positivos. No entanto, este modelo não é

tecnicamente aplicável a sistemas de medida em fluxo contínuo pelo fato de que tais sistemas apresentam um desenho diferente que impossibilita a inserção do eletrodo de oxigênio na cela de fluxo.

#### **1.4. Energética do metabolismo microbiano**

Os microrganismos utilizam compostos de carbono oxidáveis para a produção de massa celular e metabólitos (primários ou secundários) assim como para reserva de energia. Durante o metabolismo dessa fonte de carbono, compostos fosfatados altamente energéticos, como o ATP, são produzidos tanto ao nível da fosforilação de substrato quanto da fosforilação oxidativa (respiração aeróbia). Estes compostos são utilizados para os processos biossintéticos celulares e para a manutenção da célula. Além disso, uma parte da energia capturada por estes compostos é perdida na forma de calor e, quanto mais oxidável é a fonte de carbono, maior será o calor liberado. O balanço entre a fração de calor produzida pela cultura celular e a que é perdida depende da escala do processo. Culturas em escala de bancada perdem mais calor do que produzem e, por isso, precisam ser aquecidas ao passo que fermentações em escala industrial podem produzir mais calor do que perdem e, portanto, devem ser resfriadas (Greasham e Herber, 1997).

As condições de resfriamento são na maioria das vezes calculadas por algum balanço material proposto ou estabelecido ao invés de medidos diretamente por calorimetria. Os microcalorímetros de fluxo modernos, além de informações sobre as condições de resfriamento, fornecem um método alternativo não destrutivo de monitoramento em tempo real das mudanças entálpicas do metabolismo microbiano (James, 1987).

Os microrganismos podem ser capazes de metabolizar tanto fontes simples de carbono, como a glicose, quanto compostos orgânicos mais complexos (fenóis, por exemplo).

O caso mais simples para o estudo do metabolismo microbiano é a situação em que o catabolismo (degradação de nutrientes) e o anabolismo (síntese de material

celular e de reserva) estão desacoplados. Bactérias quando lavadas e suspensas em solução tampão contendo glicose, estabelecem uma taxa constante de glicólise e, portanto, uma taxa constante de produção de calor (potência térmica). Neste caso, não há realização de trabalho por células em pleno aumento de biomassa ou acúmulo de material de reserva; uma pequena porção de energia é gasta no transporte da glicose para o citoplasma e na exclusão ou acúmulo de íons. Apesar do equilíbrio termodinâmico não ser aplicável a tal sistema aberto, a variação da entalpia molar calculada para a degradação da glicose por bactérias ou eritrócitos está de acordo com a medida da produção de calor (Monk, 1978a; James, 1987).

#### **1.4.1. Produção de energia durante o crescimento**

Em um meio nutriente contendo glicose como única fonte de carbono onde os processos catabólicos e anabólicos estão acoplados, as bactérias crescem convertendo glicose em material celular e dióxido de carbono com liberação de energia. O crescimento ocorre como resultado do trabalho realizado pelas bactérias no transporte de nutrientes e síntese e organização de estruturas celulares. A energia para esses processos é obtida através dos processos catabólicos envolvidos na quebra da glicose, sendo parte dessa energia conservada em moléculas de ATP. O efeito térmico liberado é o balanço entre a entalpia do anabolismo e do catabolismo (Monk, 1978a; James, 1987).

Estudos sobre o efeito térmico do crescimento bacteriano fornecem somente dados sobre a taxa de produção e a quantidade total de energia liberada. Isto quer dizer que não é possível medir porções particulares de energia para definir processos metabólicos.

O efeito térmico liberado  $q$ , ou  $\Delta H_{\text{met}}$ , é o balanço entre a entalpia dos processos catabólicos e anabólicos.

$$q = \Delta H_{\text{met}} = q_{\text{cat}} + q_{\text{an}} = (1-\alpha) \Delta H_{\text{cat}} + \alpha \Delta H_{\text{an}}$$

O coeficiente  $\alpha$  representa a fração da fonte de carbono que é incorporada no material celular.

Um valor mais exato para  $\alpha$  pode ser obtido através do conhecimento da distribuição experimental de carbono entre a biomassa e o  $\text{CO}_2$ . Quando as células crescem em um meio definido sob condições substrato-limitantes, os valores de  $\Delta H_{\text{cat}}$  e  $\Delta H_{\text{an}}$  podem ser calculados através das entalpias de formação dos compostos e são estabelecidas as estequiometrias dos processos. Este método de cálculo só é possível quando o substrato é completamente consumido durante o crescimento dos microorganismos. Outra condição necessária é que tanto a fonte de energia quanto os produtos do catabolismo devem ser moléculas simples e conhecidas, tais como glicose, ácidos orgânicos, álcoois,  $\text{CO}_2$ . Usando meios de cultura mais complexos e de composição pouco definida, as reações catabólicas são complexas ou até desconhecidas, o que dificulta a obtenção desses parâmetros (James, 1987; Belaich, 1980).

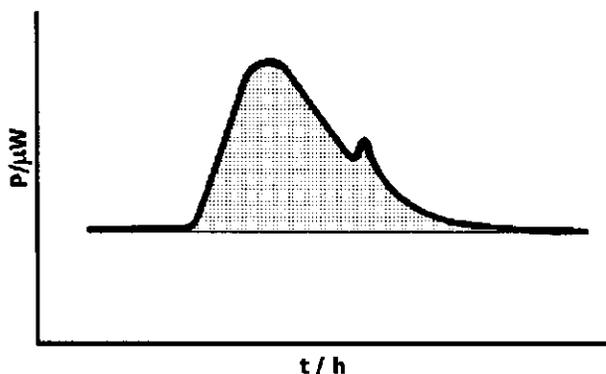
Há, no entanto, uma aproximação que se baseia na relação entre o efeito térmico do anabolismo e o do catabolismo,  $q_{\text{an}} / q_{\text{cat}}$  que apresenta valores baixos independente da natureza do meio nutriente, das condições de incubação (aerobiose ou anaerobiose) ou mesmo do microrganismo estudado. Isto quer dizer que, o valor absoluto do calor relativo ao anabolismo é sempre pequeno em relação ao efeito térmico produzido no catabolismo. Então, de acordo com essa aproximação, pode-se negligenciar  $q_{\text{an}}$  e escrever:

$$\Delta H_{\text{met}} = q_{\text{cat}}$$

Em outras palavras, a quantidade de calor liberado é igual ao calor associado ao catabolismo. É verdade que essa igualdade só é possível quando a fonte de carbono é um açúcar ou quando um substrato oxidado a um grau diferente da glicose é usado com nutriente (Belaich, 1980; Gustafsson, 1991).

Com relação ao registro de um efeito térmico, a figura 2 mostra um exemplo de um processo em que há liberação de calor. Através de medidas microcalorimétricas, o valor do  $\Delta H$  deste processo é obtido através da integração da curva potência térmica *versus* tempo. O efeito térmico produzido aumenta

exponencialmente durante a fase de crescimento tanto em meio nutriente quimicamente definido quanto em meio complexo (James, 1987).



**Figura 2:** Curva potência térmica (P) *versus* tempo (t) típica de um processo de crescimento microbiano.

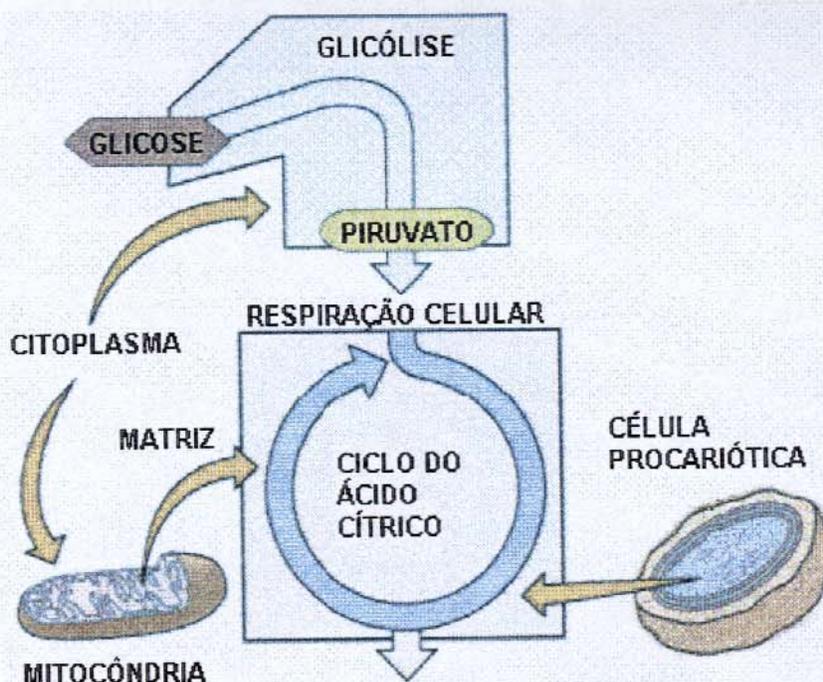
#### 1.4.2. Respiração microbiana

Na presença de oxigênio, muitos organismos vivos precisam passar por duas ou mais etapas (ciclo do ácido tricarbóxico, cadeia transportadora de elétrons) para produzir ATP. Em organismos eucariontes esses processos ocorrem na mitocôndria, enquanto em procariontes eles ocorrem no citoplasma (figura 3) (Purves e col., 1997).

A respiração é a oxidação de uma fonte de energia pela remoção de elétrons e doação destes para um aceptor, como a molécula de oxigênio, por exemplo. O rendimento energético, em termos de ATP, produzido pela respiração é maior (38 moléculas de ATP por mol de glicose) do que na fermentação e na respiração os substratos são completamente oxidados. O ATP é gerado por um sistema de transporte de elétrons que envolve a membrana celular (Paustian, 2001).

Todos os sistemas de transporte de elétrons envolvem algum tipo de membrana celular. A membrana tem duas funções importantes na geração de energia. Primeira, permite a formação de um gradiente de cargas entre o citoplasma e o exterior da célula. É importante ressaltar que moléculas carregadas não são

capazes de penetrar a membrana celular e que o transporte dessas moléculas só é possível na presença de proteínas transportadoras específicas. Segunda, a membrana suporta muitos componentes envolvidos no transporte de elétrons para que estes sejam disponibilizados na medida exata para a execução correta de suas funções dentro da célula (Paustian, 2001).



**Figura 3.** Desenho esquemático dos processos que ocorrem na respiração celular. (Purves e col., 1997).

O transporte de elétrons é realizado através de uma série de reações de oxidação-redução (cadeia transportadora de elétrons) onde os elétrons se movem através de transportadores de maior potencial elétrico para os de menor potencial. O receptor final de elétrons é o oxigênio, no caso da respiração aeróbia. À medida em que os elétrons são transferidos, os prótons ( $H^+$ ) se movem de dentro para fora da célula e íons hidróxido ( $OH^-$ ) são acumulados no interior do citoplasma de uma célula procariótica. O acúmulo de íons  $H^+$  e  $OH^-$  em lados opostos gera um gradiente de carga e de pH. Este gradiente é análogo a uma bateria, pois possui potencial para realizar trabalho (transportes, movimentos de flagelos e síntese de ATP). À medida em que a enzima ATP sintase transfere os prótons do exterior para o interior da

célula, o ATP vai sendo sintetizado a partir de ADP e fosfato inorgânico (Paustian, 2001).

### 1.5. Compostos bioativos (m-alcoixifenóis)

Sabe-se que, desde a década de 60, alguns fenóis (2,4-dinitrofenol e m-alcoixifenóis, por exemplo) são desacopladores da fosforilação oxidativa (através da interrupção do gradiente de prótons) e que, quando usados em concentrações maiores do que  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , inibem a respiração celular. Como resultado desse modo de ação, esses compostos atuam como fungicidas e bactericidas (Pereira e col., 1998).

A atividade dos m-alcoixifenóis tanto contra bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas está relacionada ao caráter lipofílico desses compostos, permitindo que atuem no citoplasma após atravessarem a parede celular ou mesmo danificando irreversivelmente as membranas celulares (Volpe, 1997a).

A figura 4 apresenta algumas curvas de potência térmica *versus* tempo relativas ao processo respiratório da bactéria *Escherichia coli* sob efeito do m-propoxifenol (Volpe, 1997b). Num estudo sobre o efeito térmico da respiração bacteriana, a altura máxima da curva fornece o efeito térmico máximo produzido pelos microrganismos durante o processo e é chamada de resposta calorimétrica, RC. O efeito de um xenobiótico sobre a respiração celular é determinado em relação à resposta calorimétrica obtida para o controle (ensaio sem adição de xenobiótico) e é dado em porcentagem.

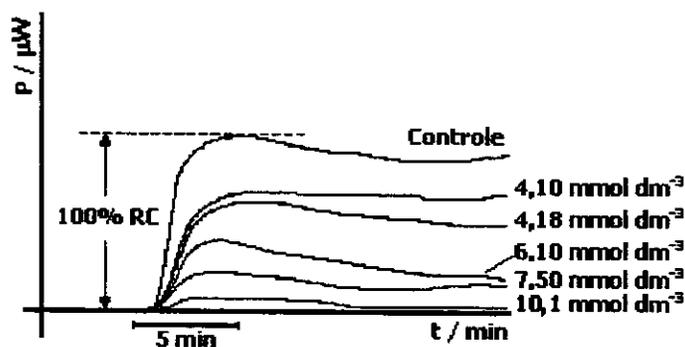


Figura 4 – Curvas de potência térmica *versus* tempo da respiração bacteriana no controle e sob m-propoxifenol a concentrações variadas. RC: resposta calorimétrica.

## 1.6. Diauxismo

O fenômeno do diauxismo ( do grego di = duplo, aux = crescimento) ocorre quando dois carboidratos diferentes estão presentes no meio e são consumidos seqüencialmente. No entanto, o organismo deverá possuir enzimas para a degradação do primeiro carboidrato e um sistema de indução para enzimas específicas que degradem o segundo carboidrato (Schaarschmidt e Lamprecht, 1978).

Quando o microrganismo apresenta crescimento diáuxico, a curva de crescimento apresenta uma inflexão na fase exponencial. Esta inflexão corresponde ao momento em que se esgota o primeiro carboidrato e o sistema enzimático para o consumo do segundo carboidrato presente no meio começa a ser induzido geneticamente. Ocorre, então, uma diminuição na taxa de crescimento. A partir do momento em que se inicia o consumo do segundo açúcar, o microrganismo volta a crescer exponencialmente (Moat e Foster, 1988).

Em investigações relativas ao fenômeno do diauxismo, a determinação da concentração dos nutrientes tem sido realizada através de técnicas enzimáticas convencionais e cromatográficas. A principal vantagem da cromatografia é a possibilidade de se quantificar, simultaneamente, o consumo de dois ou mais açúcares utilizados na cultura microbiana. Vários estudos utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido realizados para melhorar a especificidade e a sensibilidade em estudos dessa natureza (Marko-Varga e col., 1994; Groussac e col., 2000; Lendenmann e col., 1996).

## 1.7. O contexto

Levando-se em consideração a importância e o potencial apresentado pela *C. violaceum* em diversas áreas, foi proposto um estudo que pudesse gerar dados adicionais relativos à energética do metabolismo da bactéria. Para tal investigação, foram utilizadas duas abordagens diferentes - o crescimento e a respiração celular - e a microcalorimetria em fluxo contínuo foi utilizada como ferramenta principal.

## 2. OBJETIVOS

- Investigação microcalorimétrica (análise conjunta dos parâmetros pH, consumo de O<sub>2</sub>, biomassa, biossíntese de violaceína) do metabolismo bacteriano sob composições variadas do meio de cultura, considerando as seguintes abordagens:
  - quantidade e natureza do açúcar utilizado como fonte de carbono
  - utilização de um provável indutor da produção de violaceína ( $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona)
- Estudo microcalorimétrico da respiração da *C. violaceum* utilizando os compostos da série homóloga de m-alcoxifenóis como desacopladores.

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1. Roteiro dos experimentos realizados**

- Curva de calibração de crescimento bacteriano
- Curvas de calibração dos padrões de açúcares (medidas cromatográficas)
- Curva de calibração da violaceína
- Procedimento de estocagem da *C. violaceum* por congelamento em nitrogênio líquido (criopreservação)
- Preparação dos experimentos microcalorimétricos (calibração do sistema calorimétrico)
- Medidas microcalorimétricas do crescimento da *C. violaceum*
  - Padronização do sistema de medida
  - Monitoramento de outros parâmetros do processo de crescimento (pH, consumo de oxigênio, biomassa, violaceína, consumo de açúcares)
- Estudo sobre o efeito de desacopladores (m-alcoxifenóis) sobre a respiração da *C. violaceum* (medidas microcalorimétricas e de consumo de oxigênio)
  - Padronização do sistema de medida
  - Efeito do aumento da cadeia lateral dos m-alcoxifenóis sobre a respiração da *C. violaceum*

#### **3.2. Materiais e equipamentos utilizados**

O fornecimento e a manipulação da *C. violaceum*, bem como a utilização de equipamentos específicos tiveram a colaboração do grupo do Prof. Dr. Nelson Durán (Laboratório de Química Biológica, Instituto de Química - UNICAMP).

### **3.2.1. Reatores biológicos**

A construção da curva de calibração de crescimento da *C. violaceum* foi realizada utilizando-se um fermentador New Brunswick Scientific, Bioflo III.

O fermentador New Brunswick Scientific, Bioflo I (cedido por empréstimo pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos, ITAL) foi utilizado durante a padronização das medidas calorimétricas do crescimento da *C. violaceum*. O reator B. Braun Biotech, Biostat B2, adquirido recentemente através de projeto de auxílio à pesquisa proc. FAPESP nº 99/12776-4), foi utilizado nos demais experimentos.

### **3.2.2. Espectrofotômetros**

Neste trabalho, foram utilizados os espectrofotômetros Beckman (DU-070, DU-640B) em medidas de espalhamento de luz para determinação indireta da biomassa de *C. violaceum*, nas etapas de construção da curva de calibração de crescimento, congelamento da bactéria e durante os experimentos de crescimento bacteriano. Os espectrofotômetros Beckman DU-070 e HP-8453 foram utilizados para construção da curva de calibração de violaceína e monitoramento da concentração do pigmento durante os experimentos de crescimento.

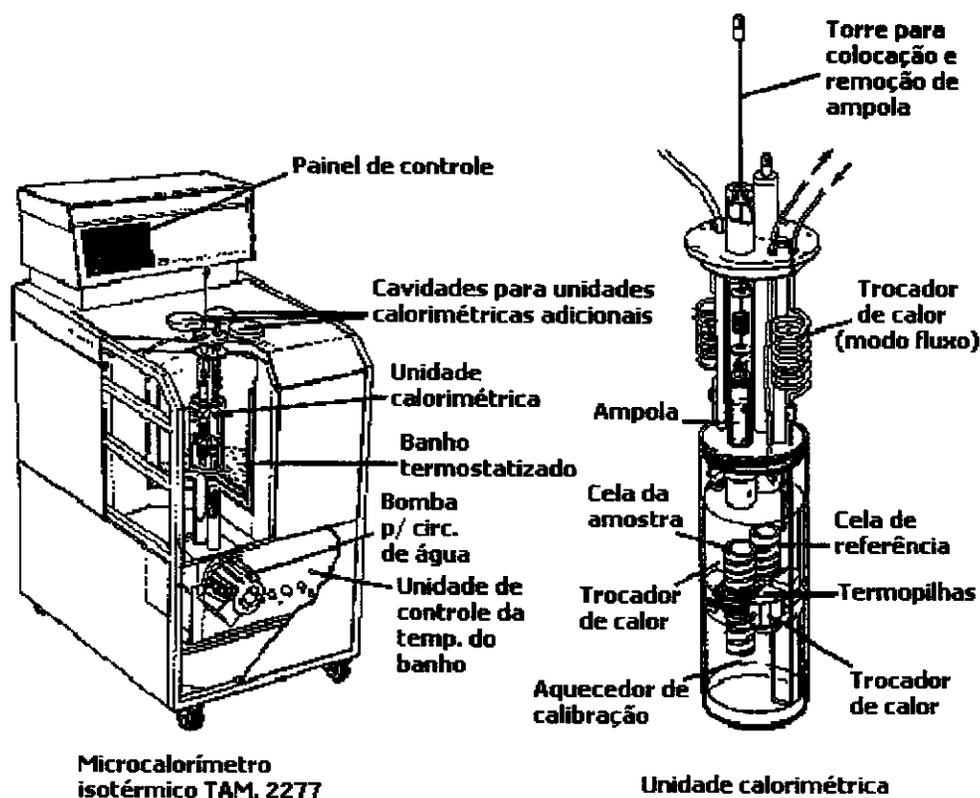
### **3.2.3. Cromatógrafo**

As medidas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de açúcares presentes nas culturas de *C. violaceum* foram feitas utilizando o equipamento Waters 717, emprestado pela Empresa LASA - Laboratório de Química Orgânica e Inorgânica Ltda. A coluna cromatográfica utilizada é da marca BioRad, Aminex<sup>®</sup> (Carbohydrate HPX-87C, 300mm x 7,80 mm) e a pré-coluna Phenomenex<sup>®</sup> (Rezex 8% Ca. Monos., 50mm x 7,80 mm).

A coluna HPX-87C é empacotada com uma resina de troca catiônica de poliestireno-divinil-benzeno que contém  $\text{Ca}^{2+}$  como contra íon. Em separações de monossacarídeos e moléculas pequenas, ocorre a troca de ligantes, um mecanismo que envolve a ligação de grupos OH dos açúcares com o contra íon da resina.

### 3.2.4. Sistema de medida microcalorimétrica - descrição

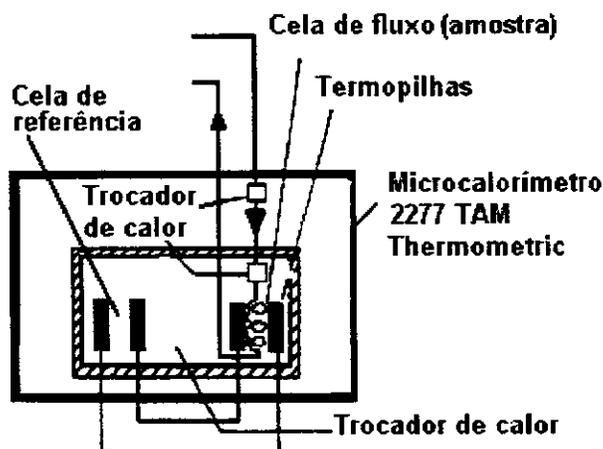
Em todos os experimentos realizados, utilizou-se um microcalorímetro isotérmico de condução Thermometric (2277 TAM, Thermal Activity Monitor). Este modelo consiste de um sistema multicanal (figura 5), possuindo quatro unidades calorimétricas (canais) para medidas independentes. O canal 1 do referido microcalorímetro dispõe de um arranjo que combina dois tipos de celas calorimétricas. Além da cela para medidas utilizando uma ampola estática, possui uma cela para medidas em fluxo. Este modelo em particular, apresenta uma cela específica para medidas de fluxo com mistura de reagentes (*in situ*), podendo, também ser utilizada em experimentos em fluxo contínuo.



**Figura 5:** Esquema do microcalorímetro e unidade calorimétrica contendo cela de fluxo e ampola simples.

Nos calorímetros de fluxo as celas são tubos capilares em espiral ou ampolas por onde são bombeados os reagentes através de trocadores de calor (figura 6). As

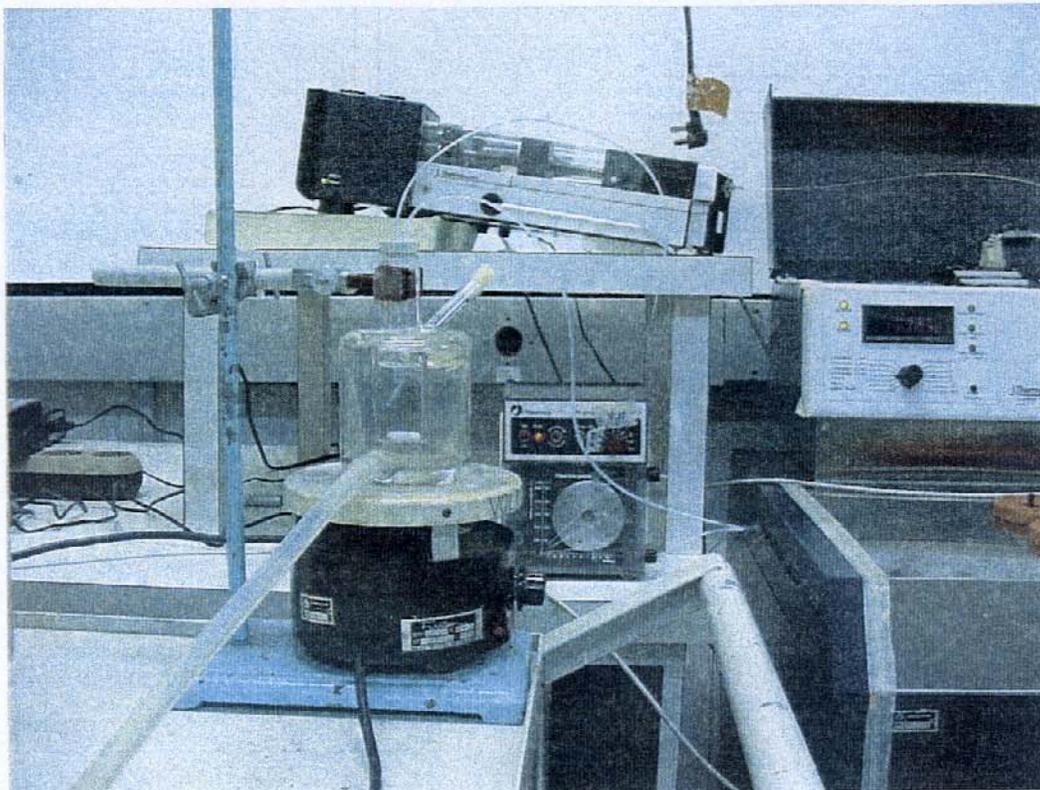
celas de fluxo contínuo são largamente utilizadas em experimentos com suspensões de células.



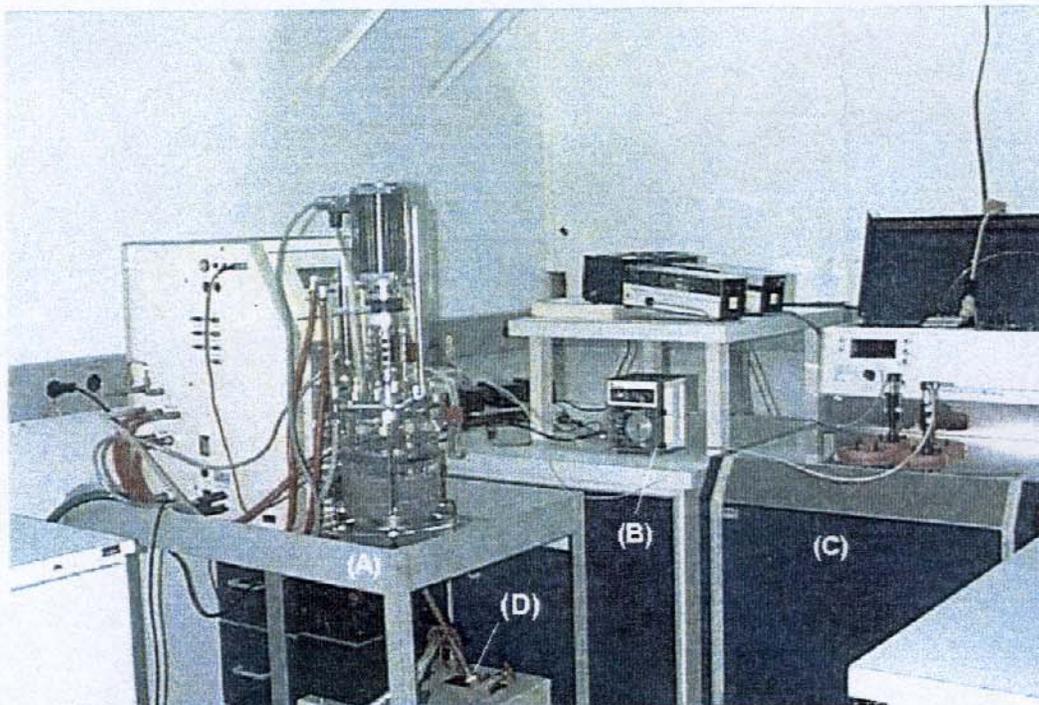
**Figura 6:** Desenho esquemático da unidade calorimétrica utilizada contendo as celas de referência e de amostra e seus respectivos sensores (termopilhas).

No calorímetro isotérmico, o calor é liberado (ou absorvido) e transferido do vaso de reação para um trocador de calor (figura 6), normalmente um bloco de alumínio. Geralmente, uma termopilha ou dispositivo Peltier alojada entre o vaso calorimétrico e o bloco de alumínio é usada como sensor para o fluxo de calor. A diferença de temperatura entre o vaso e o trocador de calor causará uma diferença de potencial elétrico sobre a termopilha. No microcalorímetro utilizado, a termopilha consiste de placas semicondutoras termoelétricas (placas de efeito Peltier), que possuem condutividade térmica relativamente alta e detectam uma diferença de temperatura pequena, tipicamente da ordem de 1 mK (miliKelvin) (Volpe, 1993).

Durante os experimentos executados neste trabalho, foram empregados dois arranjos experimentais, consistindo basicamente do microcalorímetro e um vaso de reação externo, conectados através de uma bomba peristáltica. A figura 7 mostra a foto do sistema contendo um micro reator (confeccionado para a realização de medidas de respiração bacteriana) e a figura 8 refere-se ao sistema contendo um dos reatores biológicos utilizados nas medidas de crescimento bacteriano.



**Figura 7:** Fotografia do sistema microcalorimétrico, em fluxo contínuo, utilizado no estudo do efeito de desacopladores (m-alcóxifenóis) sobre a respiração bacteriana.



**Figura 8:** Fotografia do sistema de medida microcalorimétrica do crescimento da *C. violaceum*. (A) Reator biológico B. Braun Biotech, Biostat B2; (B) Bomba peristáltica

Pharmacia LKB, P1; (C) Microcalorímetro Thermometric, 2277 TAM; (D) Banho termostático Micro Química, MQBTC 99-20.

### 3.3. Reagentes, soluções e meios de cultura

Todos os materiais, soluções tampão e meios de cultura utilizados nos experimentos para cultivo e manipulação da *C. violaceum* foram previamente esterilizados em autoclave (Phoenix, AV 75) a 121° C e  $1,0 \times 10^5$  Pascal (1 atm) por 30 min. Além disso, os procedimentos que exigiam atmosfera estéril foram realizados em capela de fluxo laminar com luz germicida (ultravioleta).

A tabela 1 mostra o grau de pureza e a proveniência dos reagentes utilizados na preparação de soluções e meios de cultura.

**Tabela 1: Reagentes utilizados para preparação de soluções e meios de cultura.**

Reagente	Grau de pureza
NaCl (anidro)	PA
KCl (anidro)	PA
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anidro)	PA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (anidro)	PA
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anidro)	PA
Ágar (anidro)	PA
Glicose (anidra)	PA
peptona bacteriológica (anidra)	PA
extrato de levedura (anidra)	PA
lactose (anidra)	PA
galactose (anidra)	PA
etanol (absoluto)	PA
DMSO	espectroscópico
SDS	PA
imidazol	PA
ácido acético (glacial)	PA
triacetina	PA

Para o desenvolvimento da etapa inicial do trabalho (obtenção da curva de crescimento bacteriano, estocagem da bactéria e padronização de experimentos), foram definidos meios de cultura e soluções tampão a serem utilizados os quais foram preparados de acordo com a composições descritas na tabela 2.

**Tabela 2:** Composição das soluções e dos meios de cultura utilizados.

PBS*	Tampão fosfato A*	Meio de cultura sólido	Meio de cultura líquido
8,0g de NaCl	1,8g de glicose	ágar a 1,5%	glicose a 0,5%
0,2g de KCl	8,8g de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	glicose a 0,5%	peptona** a 0,5%
1,2g de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,8g de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	peptona** a 0,5%	extrato de levedura 0,2%
0,2g de KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		extrato de levedura 0,2%	

\* composição para 1dm<sup>3</sup> de solução aquosa. \*\* peptona bacteriológica. PBS = tampão fosfato adicionado de sal. Porcentagens em massa/volume.

Nos experimentos de respiração, além da solução tampão fosfato A (vide tabela acima), foi utilizada a solução tampão B cuja composição continha o dobro da quantidade de glicose (3,60 g) utilizada na solução A.

No caso do meio de cultura líquido, a composição indicada acima refere-se ao definido como meio de cultura padrão para o cultivo da *C. violaceum*. As demais composições de meio de cultura líquido, empregadas no estudo do metabolismo da bactéria estão na tabela 3.

**Tabela 3:** Composição dos meios de cultura utilizados nos experimentos realizados\*

Experimento	% Extr.		%			Prop. entre açúcares
	Peptona	Levedura	Glicose	Galactose	Lactose	
1	0,2	0,08	0,1	0,1	0	1:1
2	0,5	0,2	0,2	0,2	0	1:1
3	0,5	0,2	0,07	0,07	0	1:1
4	0,5	0,2	0,07	0	0,07	1:1
5	0,5	0,2	0,07	0,13	0	1:2
6	0,5	0,2	0	0,5	0	1
7	0,5	0,2	0	0	0,5	1
8, E1-E11, C1-C3**	0,5	0,2	0,5	0	0	1
9	0,5	0,2	0	0	0	0
10	0,5	0,2	1	0	0	1
11	0,5	0	0,5	0	0	1
12	0	0,2	0,5	0	0	1
13	0,5	0	0	0	0	0
14	0	0,2	0	0	0	0
15 <sup>a,***</sup>	0	0	0,5	0	0	1
16 <sup>b,***</sup>	0,5	0,2	0,5	0	0	1
17 <sup>a,***</sup>	0,5	0,2	0,5	0	0	1
18 <sup>b,***</sup>	0,5	0,2	0,5	0	0	1

\*composição para 1,5 dm<sup>3</sup> de solução; \*\*meio de cultura padrão; <sup>(a,b)</sup>adição de α-amino-butiro-γ-lactona 20 nmol dm<sup>-3</sup> e 500 nmol dm<sup>-3</sup>, respectivamente; \*\*\* Solução tampão (PBS); <sup>(a,b)</sup>com e sem inóculo da bactéria, respectivamente. Porcentagens em massa/volume.

Na tabela 3, os experimentos representados pelas letras E (onze experimentos sob aerobiose) e C (três experimentos sob anaerobiose) foram realizados na padronização do sistema para o estudo do crescimento bacteriano.

Os experimentos 9, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 (tabela3) constituíram medidas calorimétricas em branco. Em microcalorimetria, tais experimentos são essenciais para se garantir a interpretação correta dos dados obtidos, pois existe a possibilidade de ocorrerem efeitos conhecidos como “artefatos” durante as medidas. Além disso, quando se deseja investigar a contribuição calorimétrica de um determinado nutriente do meio de cultura, o efeito térmico proveniente do metabolismo dos outros nutrientes deve ser descontado do sinal calorimétrico através dos resultados obtidos em experimentos isolados.

### **3.4. Metodologias empregadas**

#### **3.4.1. Curva de calibração de crescimento da *C. violaceum***

A construção da curva de calibração de crescimento da *C. violaceum* foi realizada utilizando-se o fermentador New Brunswick Scientific, Bioflo III, mantido a 30°C, 190 rpm e borbulhamento de oxigênio com fluxo de  $3,3 \times 10^{-2} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ . Após o inóculo da bactéria no reator contendo  $3,0 \text{ dm}^3$  de meio estéril, foram feitas medidas espectrofotométricas periódicas do espalhamento de luz, a 720 nm, de alíquotas do meio de cultura (tabela 4).

Após cada medida, foi feita a diluição em série (fatores de diluição  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ) da alíquota correspondente em PBS estéril. Para a contagem de células viáveis presentes em cada alíquota diluída, foi feito o inóculo de  $0,1 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  das mesmas em placas de Petri, contendo meio de cultura sólido estéril. A contagem de colônias a olho nu (em triplicata) foi feita após a incubação das placas a 30° C por 24 h. Cada placa deve conter entre 30 e 300 colônias para que a contagem a olho nu forneça um número estatisticamente correto de microrganismos (Aragón e Bengoechea, 1994). Para calcular o número de bactérias

presentes em cada alíquota, antes da diluição, utilizou-se a equação 1. Esta equação estabelece uma relação entre o número de colônias obtido na contagem a olho nu e o número de bactérias (UFC) da alíquota correspondente.

$$\text{UFC} = \text{NC.FD} / \text{V} \qquad \text{Equação 1}$$

onde: UFC = unidades formadoras de colônias

NC = número de colônias presentes na placa de Petri

FD = fator de diluição

V = volume utilizado no plaqueamento

Os valores de espalhamento de luz descritos na tabela 4 foram graficados em relação ao tempo (cinética de crescimento) e ao número de UFC  $\times 10^{-3} \text{ dm}^{-3}$  correspondente a cada alíquota da cultura. Esta curva de calibração foi utilizada para se obter indiretamente valores de biomassa durante os experimentos de crescimento bacteriano, através da medida de espalhamento de luz de alíquotas da cultura a 720 nm.

**Tabela 4:** Experimento relativo à curva de crescimento da *C. violaceum*.

t /h	Aliquota
11,50	01
12,00	02
12,50	03
13,00	04
13,50	05
14,00	06
14,50	07
15,00	08
15,50	09
16,25	10
16,75	11
17,33	12
18,00	13
18,83	14
20,00	15

### 3.4.2. Curvas de calibração dos açúcares – medidas cromatográficas

As medidas cromatográficas para obtenção das curvas de calibração dos açúcares e para quantificação dos mesmos nas culturas de *C. violaceum* por CLAE foram realizadas de acordo com as condições descritas na tabela 5.

Foram construídas curvas de calibração de padrões de glicose, lactose, galactose e misturas de glicose/lactose e glicose/galactose, a partir de soluções (previamente filtradas com filtro Millex® 0,45 µm) dos mesmos nas concentrações de 2,00; 1,50; 1,00; 0,50; 0,30 e 0,10 g dm<sup>-3</sup>.

**Tabela 5:** Condições dos experimentos cromatográficos para determinação de carboidratos em amostras de cultura aeróbia de *C. violaceum*.

Parâmetro	Condições
Fase móvel	Água
Temperatura da Coluna	85 °C
Temperatura do detector	40 °C
Temp. compartimento de amostras	-5 °C
Fluxo	0,01 x10 <sup>-3</sup> dm <sup>3</sup> s <sup>-1</sup>
Volume Injetado	0,01 x10 <sup>-3</sup> dm <sup>3</sup>
Atenuação	16
Tempo de Corrida	17 min

### 3.4.3. Curva de calibração da violaceína

Para a construção da curva de calibração da violaceína partiu-se de uma solução estoque contendo 0,24 mg do composto, dissolvido em 2,50 x10<sup>-3</sup> dm<sup>3</sup> de etanol com a ajuda de ultrassom (equipamento Thornton-Unique, T7). A leitura da absorbância dessa solução (0,28 mmoldm<sup>-3</sup>) foi feita utilizando espectrofotômetro em 575 nm. Em seguida, foram feitas 16 diluições e respectivas medidas de absorbância. A curva de calibração foi obtida graficando-se os valores de absorbância *versus* concentração de violaceína (Rettori, 2000).

#### **3.4.4. Procedimento de estocagem da *C. violaceum* por criopreservação**

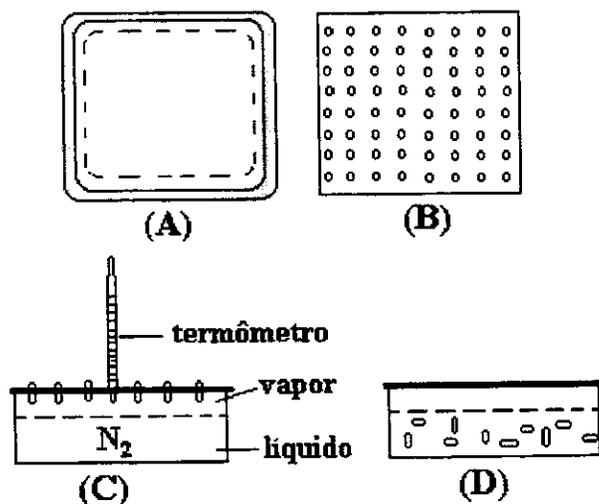
O método escolhido para a manutenção e estocagem da *C. violaceum* foi o congelamento do microrganismo por imersão e armazenamento em nitrogênio líquido (criopreservação).

A manutenção da bactéria em nitrogênio líquido tem a função de manter um número fixo de células e evitar a possibilidade de alteração genética dos microrganismos no decorrer do trabalho. Devido à sensibilidade da técnica calorimétrica utilizada, esse cuidado é necessário para que seja garantida a reprodutibilidade dos experimentos, uma vez que, a variação do número de microrganismos ou a alteração metabólica causada por uma mutação genética, podem acarretar interpretações errôneas dos resultados (Beezer, 1980).

O processo de congelamento iniciou-se com o inóculo de  $1,00 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  do microrganismo em  $1,50 \text{ dm}^3$  de meio de cultura líquido em reator (NBS, Bioflo I ou B. Braun Biotech., Biostat B2) a  $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ , 200 rpm e borbulhamento de ar na vazão de  $2,50 \text{ dm}^3\text{s}^{-1}$ . Após 12 h, a turbidez da cultura foi monitorada para uma estimativa da população microbiana a ser congelada. Para tanto, foi utilizada a correlação entre a turbidez da cultura e os dados da curva de calibração de crescimento previamente construída. Para confirmar a estimativa, quando a cultura de  $1,50 \text{ dm}^3$  atingiu a turbidez correspondente a  $1,00 \times 10^{12}$  bactérias  $\text{dm}^{-3}$  (cerca de 16 h de inóculo), uma alíquota foi retirada para contagem de células viáveis através de diluições em série em placas de Petri, contendo meio de cultura sólido.

A cultura foi centrifugada a 4000 rpm por 20 min. O sobrenadante foi descartado e as células remanescentes foram lavadas três vezes com solução PBS. Após cada lavagem as células foram ressuspensas com a ajuda de um agitador de tubos (Phoenix, AT 56A). As células lavadas foram finalmente ressuspensas em PBS contendo 10% de DMSO. A solução com DMSO foi previamente filtrada com filtro de porosidade de  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ , Millipore. As suspensões resultantes, contendo cerca de  $1,00 \times 10^{11}$  bactérias  $\text{dm}^{-3}$ , foram rapidamente colocadas em ampolas criogênicas de polipropileno de  $1,00 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  (Corning). As ampolas foram

encaixadas nos furos de uma placa de isopor (figura 9B), de forma que ficassem a uma distância de cerca de 5,00 cm da superfície do nitrogênio líquido, contido numa bandeja de alumínio revestida externamente de isopor (figura 9A). Com o auxílio de termômetro de baixa temperatura (escala -100° C a 30° C; figura 9C), a temperatura das ampolas foi monitorada e, assim que se atingiu -80° C, as ampolas foram imediatamente mergulhadas no nitrogênio líquido (figura 9D). As ampolas foram acondicionadas em tubos de aço inoxidável (cânisters) os quais foram mantidos em botijões criobiológicos contendo nitrogênio líquido (Volpe, 1997b).



**Figura 9:** Desenho esquemático do sistema utilizado no congelamento da bactéria *C. violaceum*. (A) Bandeja de alumínio (vista de topo); (B) Placa de isopor; (C) Sistema montado (vista lateral) na primeira fase de congelamento (ampolas contendo a bactéria mantidas no vapor de nitrogênio); (D) Sistema após o mergulho das ampolas em nitrogênio líquido.

O descongelamento do microrganismo foi feito através da rápida retirada de uma ampola criogênica do nitrogênio líquido e imersão imediata da mesma em banho-maria a 37,0-40,0 °C (Kirsop e Snell, 1991). Após exatos 3 min, os tubos descongelados foram retirados do banho e, em no máximo 5 min, foram utilizados nos experimentos de microcalorimétricos. A capacidade de recuperação da *C. violaceum* ao processo de congelamento foi avaliada através da contagem de células

viáveis (em placas de Petri) e através de medidas microcalorimétricas de respiração celular.

Durante o desenvolvimento deste trabalho, o procedimento para manutenção do estoque de bactérias congeladas foi realizado quatro vezes.

### **3.4.5. Preparação dos experimentos microcalorimétricos**

#### **3.4.5.1. Montagem e limpeza do sistema**

Após a etapa de padronização do sistema de medida microcalorimétrica (será descrita no item 3.4.6.1), todos os experimentos foram realizados utilizando o microcalorímetro Thermometric, 2277 TAM no modo fluxo contínuo e a cela calorimétrica de  $0,60 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  foi mantida sempre a  $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ . Um fluxo contínuo de  $0,50 \times 10^{-3} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$  entre o microcalorímetro e um fermentador ou um micro reator foi mantido através da bomba peristáltica Pharmacia P1, LKB. Estabeleceu-se, então uma rotina de montagem e limpeza do sistema.

Antes e ao final de cada experimento, o sistema de fluxo foi lavado utilizando-se soluções (previamente filtradas com filtro Millex<sup>®</sup>  $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ ) na seguinte ordem: água deionizada, solução de SDS  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ , água deionizada, etanol a 70% e, por último, água deionizada.

Após a limpeza do sistema, um fluxo de  $8,3 \times 10^{-6} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$  de meio de cultura líquido estéril (no caso de experimentos de crescimento) ou de solução tampão fosfato (no caso de experimentos de respiração) foi estabelecido para a obtenção da linha base e posterior calibração elétrica do microcalorímetro.

#### **3.4.5.2. Calibração do microcalorímetro**

##### **3.4.5.2.a. Calibração elétrica**

A calibração elétrica é um procedimento de rotina que faz parte da etapa de preparação do sistema microcalorimétrico para medidas em uma escala previamente

determinada. Durante a calibração, uma quantidade de calor conhecida é gerada por dispositivos (resistência) de calibração colocados numa região abaixo da cela de medida (cela de amostra) do calorímetro. O objetivo desse procedimento é assegurar que o calor produzido pela resistência de calibração tenha o mesmo valor que o calor medido pelo instrumento (Wilson e col., 1999).

As condições experimentais para calibração devem ser as mais próximas o possível das condições utilizadas no experimento. Por isso, as calibrações realizadas neste trabalho foram feitas sempre nas mesmas condições de fluxo e temperatura dos experimentos.

A calibração elétrica sempre foi realizada após a montagem, estabelecimento do sistema em fluxo e obtenção da linha base do sinal calorimétrico. O processo de calibração era acionado através do programa computacional dedicado (Digitam). Para os experimentos de crescimento bacteriano, as calibrações foram feitas na potência de 500  $\mu$ W durante 4000 s e utilizou-se meio de cultura padrão na linha de fluxo. A calibrações para os experimentos de respiração celular foram feitas na escala de 100  $\mu$ W durante 2700 s e utilizou-se água deionizada ou solução tampão fosfato na linha de fluxo.

#### **3.4.5.2.b. Calibração química**

Os microcalorímetros são normalmente calibrados através de resistências elétricas mas, os valores de potência térmica dissipada na calibração podem não ser representativos para alguns processos químicos ou biológicos. Além disso, quando se usa celas de fluxo é fácil introduzir erros sistemáticos na calibração elétrica do instrumento. É importante, portanto, a utilização de um teste químico através do qual os valores da calibração elétrica possam ser conferidos e controlados. (Chen e Wadsö, 1982, Wadsö, 2001).

Uma das reações utilizadas é a hidrólise da triacetina em presença de tampão imidazol/ácido acético. Alterando-se a composição do tampão, a taxa de hidrólise (e, conseqüentemente a potência térmica) pode ser regulada.(Chen e Wadsö, 1982).

O método de calibração através da hidrólise da triacetina em tampão imidazol foi desenvolvido por Chen e Wadsö (1982) com o objetivo de aumentar a precisão de medidas microcalorimétricas, em fluxo contínuo, de processos que ocorrem lentamente (cultura de células vivas, por exemplo).

A reação de hidrólise da triacetina em tampão imidazol (HTTI) foi utilizada para a calibração química do microcalorímetro.

As soluções tampão foram preparadas, dissolvendo-se 6,80 g de imidazol em 25,0 g de água deionizada. A seguir adicionou-se 4,00 g de ácido acético .

As soluções utilizadas no experimento calorimétrico foram preparadas adicionando-se 20,0 g de solução tampão imidazol a 1,00 g de triacetina. A mistura foi agitada vigorosamente em um reator, termostatizado e sob agitação magnética, externo ao calorímetro (um sistema de medida semelhante ao da figura 7). Os experimentos foram realizados a 25,0 ° C durante cerca de 40 h.

De acordo com a literatura, a utilização de 1,00 g de triacetina fornece calibrações na escala de 0 a 30  $\mu$ W, enquanto 10,0 g do triéster fornecem efeito térmico na escala de 0 a 300  $\mu$ W (Briggner e Wadsö, 1991; Guan e Kemp, 2000). Neste trabalho, foi realizada uma calibração química na escala de 30  $\mu$ W e as demais, na escala de 300  $\mu$ W.

### **3.4.6. Medidas microcalorimétricas do crescimento da *C. violaceum***

#### **3.4.6.1. Padronização do sistema de medida**

A etapa inicial de monitoramento do crescimento e do metabolismo da *C. violaceum*, em regime fluxo contínuo, sofreu um atraso devido à indisponibilidade de um fermentador que pudesse ser colocado ao lado do microcalorímetro para a realização das medidas em tempo real. Enquanto não havia um fermentador disponível, o aprendizado da técnica e da utilização correta do “software” Digitam (programa responsável pelo controle computacional das condições de operação do

microcalorímetro e pela aquisição de dados) ocorreu através de testes utilizando a cela do tipo ampola de  $20,0 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  no canal 2 do calorímetro.

Os experimentos microcalorimétricos em fluxo contínuo foram iniciados utilizando o fermentador BioFlo I. Após a etapa de preparação do sistema de fluxo (limpeza e calibração do canal 1 do microcalorímetro) e retorno da potência térmica ( $\mu\text{W}$ ) à linha base, cada experimento foi iniciado inoculando-se  $0,90 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de cultura de *C. violaceum* no reator contendo meio de cultura líquido estéril. As condições de crescimento da bactéria no reator biológico foram: temperatura de  $25,0 \text{ }^\circ\text{C}$ , 200 rpm de agitação e borbulhamento de ar ou nitrogênio (experimentos sob aerobiose e anaerobiose, respectivamente) na vazão de  $2,50 \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ .

Durante a padronização, foi investigado o efeito térmico da utilização de dois procedimentos diferentes para o inóculo do microrganismo no reator biológico. Testou-se a adição de cultura bacteriana reativada previamente por 24 h, além do inóculo imediatamente após o descongelamento. A reativação consiste do inóculo e manutenção da bactéria, a qual foi previamente descongelada, por um ou mais dias em erlenmeyer contendo meio de cultura estéril. Este procedimento tem como função favorecer a adaptação do microrganismo a uma nova condição, antes de sua utilização nos experimentos.

Os experimentos subsequentes foram iniciados com o inóculo de *C. violaceum* descongelada previamente e utilizada, no máximo, depois de 5 min.

#### **3.4.7. Monitoramento de outros parâmetros do processo de crescimento**

Durante os experimentos microcalorimétricos, foram monitorados os parâmetros pH, tensão de  $\text{O}_2$  dissolvido (TOD), biomassa, consumo de fonte de carbono e produção de violaceína. As medidas de pH e TOD foram feitas *in situ*, enquanto as demais foram realizadas através da retirada periódica de alíquotas da cultura.

#### **3.4.7.1. Biomassa**

O aumento da biomassa foi monitorado indiretamente através da medida do espalhamento de luz a 720 nm, de acordo com a curva de calibração de crescimento bacteriano previamente construída, utilizando os espectrofotômetros Beckman 640B e DU 70.

#### **3.4.7.2. Consumo de açúcares – medidas cromatográficas**

As medidas cromatográficas para quantificação dos açúcares nas culturas de *C. violaceum* por CLAE foram realizadas nas mesmas condições utilizadas para a construção das curvas de calibração como mostra a tabela 5.

Durante os experimentos para a determinação da concentração de açúcares presentes na cultura de *C. violaceum*, foram coletadas alíquotas do meio de cultura do reator biológico, em diferentes intervalos de tempo. Cada amostra foi centrifugada a 4000 rpm (centrífuga Fanem, Excelsa Baby II 206R ) por 5 min e filtrou-se o sobrenadante com filtro Millex® 0,22 µm. As amostras filtradas foram transferidas para frascos plásticos e congeladas a -10,0 °C até a realização do experimento de CLAE. Antes da injeção, descongelou-se as amostras e as mesmas foram mantidas a 5,00 °C no equipamento de CLAE, evitando deste modo, a degradação dos açúcares por decorrência de reações de hidrólise ou oxidação.

#### **3.4.7.3. Violaceína**

A biossíntese de pigmentos violetas, que inclui majoritariamente a violaceína, foi monitorada após cerca de 12 h de experimento. Durante a preparação das amostras para a análise de CLAE, a biomassa acumulada nos tubos de ensaio após a centrifugação, foi ressuspensa em  $3,00 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de etanol. Extraíu-se, desta forma, os pigmentos presentes no interior das células. As suspensões foram filtradas e as amostras obtidas foram medidas no visível, a 575 nm, utilizando o espectrofotômetro Beckman, DU70.

### **3.4.8. Efeito de m-alcoxifenóis sobre a respiração da *C. violaceum***

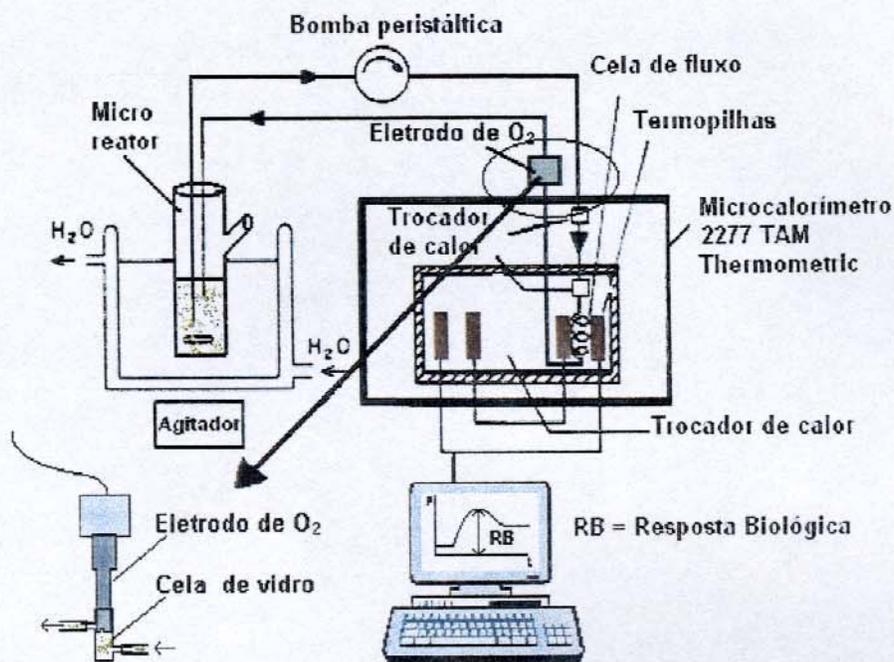
#### **3.4.8.1. Padronização do sistema de medida**

Os experimentos de padronização e otimização do sistema microcalorimétrico para medidas de respiração bacteriana (vide figura 7) consistiram na confecção de um micro reator de vidro e obtenção de curvas de efeito térmico do controle que corresponde à resposta biológica sem a adição de um xenobiótico, a partir do inóculo da bactéria em solução tampão de fosfato contendo glicose. Foram feitos testes variando-se o volume total do meio, a quantidade de glicose adicionada à solução tampão e o volume do inóculo de *C. violaceum*. Nesta etapa, além de medidas do controle foram feitos testes com o composto m-metoxifenol a concentrações variadas. Os experimentos foram realizados sempre a 25,0 °C, sob agitação magnética e fluxo de  $0,50 \times 10^{-3} \text{ dm}^3 \text{ s}^{-1}$ .

Os estudos preliminares relativos ao consumo de oxigênio foram realizados em um arranjo experimental isolado do microcalorímetro e se utilizou um oxímetro YSI (Biological Oxygen Monitor), modelo 53. Durante este estudo foram feitas medidas do controle e utilizando m-metoxifenol  $19,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ . As medidas de TOD foram feitas nas mesmas condições das microcalorimétricas para que fosse possível a comparação entre os resultados obtidos nos dois casos.

Com o objetivo de se montar um sistema de medida simultânea de TOD e de efeito térmico, foi adquirido um novo medidor de oxigênio marca Orion, 810A Plus, contendo um eletrodo polarográfico para medidas de oxigênio dissolvido marca Orion, modelo 081010F.

Uma cela de vidro contendo o eletrodo de oxigênio foi construída e conectada à linha de fluxo do sistema, após a passagem pela cela de fluxo do microcalorímetro, como se vê na figura 10. Neste caso, foram realizadas medidas de TOD, em tempo real, utilizando o sistema microcalorimétrico já padronizado. Testou-se apenas a posição do eletrodo, na horizontal ou vertical e, após esta fase, foram feitas as medidas com os m-alcoxifenóis  $3,00 \text{ mmol dm}^{-3}$ .



**Figura 10:** Esquema utilizado nas medidas simultâneas de efeito térmico e de TOD durante o estudo do efeito de *m*-alcoxfenóis  $3,00 \text{ mmol dm}^{-3}$  sobre a respiração da *C. violaceum*.

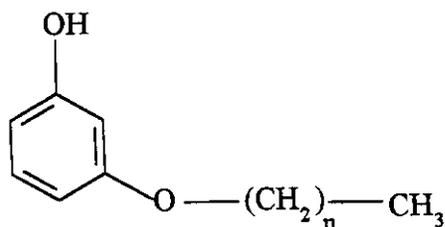
### 3.4.8.2. Efeito do aumento da cadeia hidrofóbica de *m*-alcoxfenóis sobre a respiração da *C. violaceum*

Após a padronização do sistema, utilizou-se cultura bacteriana, previamente descongelada e  $15,0 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de solução tampão de fosfato (contendo ou não *m*-alcoxfenol). Os *m*-alcoxfenóis foram testados nas concentrações  $3,00$  e  $14,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Durante o desenvolvimento dos estudos de respiração, o volume do inóculo de bactéria utilizado variou conforme a população de microrganismos mantida no estoque sob nitrogênio. Neste caso, a concentração de células interfere significativamente na magnitude do efeito térmico do processo respiratório da bactéria.

Os compostos da série homóloga de *m*-alcoxfenóis (figura 11), obtidos da Eastman Kodak, foram previamente purificados por destilação sob vácuo para a utilização dos mesmos nos experimentos microcalorimétricos. Devido à baixa solubilidade de *m*-butoxfenol e *m*-pentoxifenol em solução aquosa, as soluções estoque de todos os compostos da série foram preparadas em acetona pura.

Para avaliar o efeito dos compostos da série de m-alcoxifenóis (na concentração de  $3,00 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) sobre o consumo bacteriano de oxigênio, foi realizado o monitoramento simultâneo da TOD (tensão de oxigênio dissolvido) e do efeito térmico. Para tais medidas, foi utilizado o oxímetro Orion, 810A Plus.

- N = 1: m-metoxifenol
- N = 2: m-etoxifenol
- N = 3: m-propoxifenol
- N = 4: m-butoxifenol
- N = 5: m-pentoxifenol



$$N = n + 1$$

**Figura 11:** Representação estrutural das moléculas dos m-alcoxifenóis utilizados.

O valores de TOD coletados periodicamente foram graficados em relação ao tempo e comparados com a curva de efeito térmico obtida para cada composto. Além disso, foi feito o cálculo da taxa de consumo de oxigênio através da regressão linear das curvas TOD *versus* tempo.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Roteiro de apresentação dos resultados obtidos

- Curvas de calibração e procedimentos de manipulação da *C. violaceum*
  - Curva de calibração de crescimento bacteriano
  - Curvas de calibração dos padrões de açúcares
  - Curva de calibração da violaceína
  - Estocagem da *C. violaceum* por congelamento em nitrogênio líquido
- Preparação dos experimentos microcalorimétricos
- Medidas microcalorimétricas do crescimento da *C. violaceum*
  - Padronização do sistema de medida
  - Monitoramento de outros parâmetros do processo de crescimento
- Medidas microcalorimétricas e de TOD da respiração da *C. violaceum*
  - Padronização do sistema de medida
  - Efeito do aumento da cadeia lateral dos m-alcoxifenóis sobre a respiração da *C. violaceum*

#### 4.1. Curvas de calibração e procedimentos de manipulação da *C. violaceum*

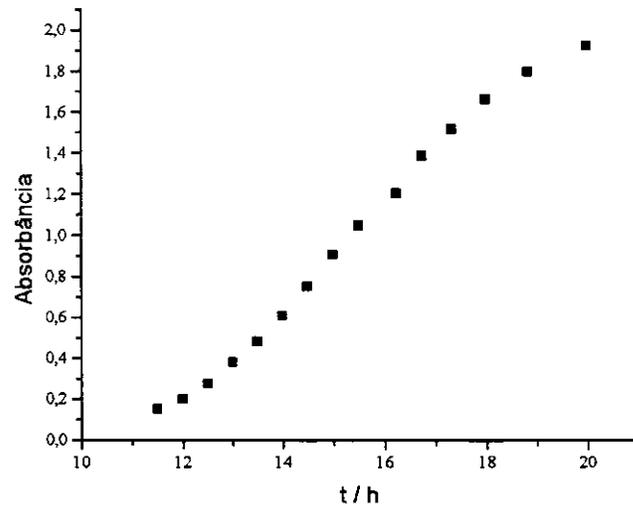
##### 4.1.1. Curva de calibração de crescimento da *C. violaceum*

A construção da curva de calibração de crescimento da *C. violaceum* foi o primeiro procedimento de preparação para os experimentos de monitoramento dos parâmetros da cultura bacteriana.

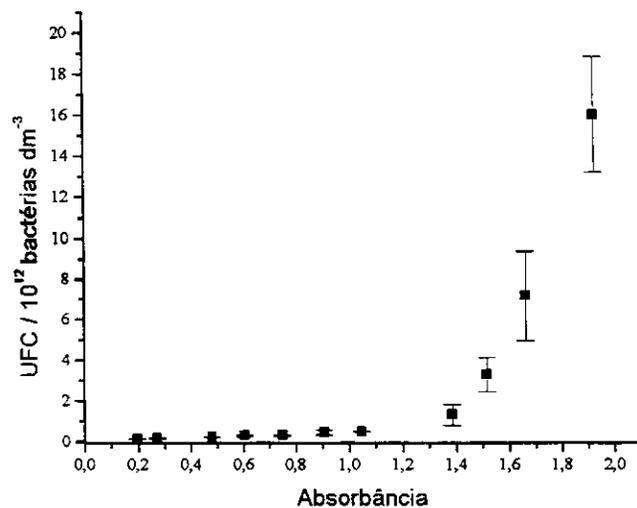
Durante o experimento para a obtenção da curva de calibração do crescimento da bactéria, foram feitas medidas periódicas da turbidez de alíquotas retiradas da cultura utilizando dois espectrofotômetros. Este procedimento visava garantir a utilização dos dados da curva no decorrer de todos os experimentos que exigissem o monitoramento da biomassa bacteriana. Os gráficos das figuras 12, 13 e 14 referem-se, no entanto, aos dados obtidos com o espectrofotômetro Beckman, DU-640B. Os dois equipamentos mostraram, como

esperado, poucas variações em termos de resultados (figura 15). O gráfico da figura 12 mostra a curva obtida pela variação da turbidez do meio em relação ao tempo.

O gráfico da figura 13 mostra a variação da turbidez do meio em relação ao respectivo número de unidades formadoras de colônias (obtido pela diluição de cada alíquota do meio).



**Figura 12:** Curva da cinética de espalhamento de luz durante o crescimento da *C. violaceum* em 720 nm.

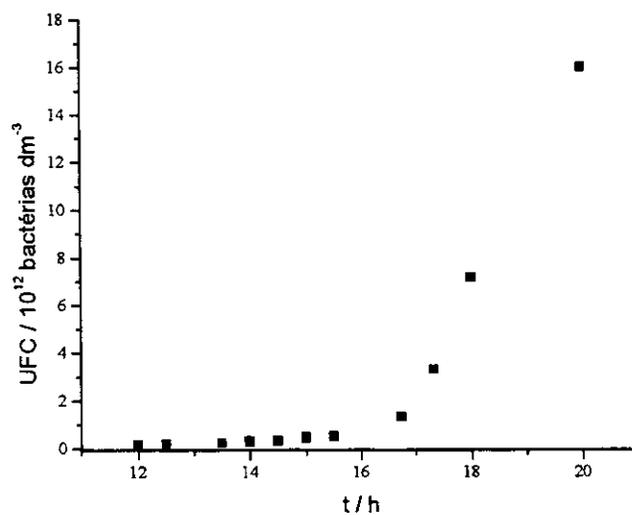


**Figura 13:** Variação do espalhamento de luz com o aumento médio da biomassa da *C. violaceum* em 720 nm.

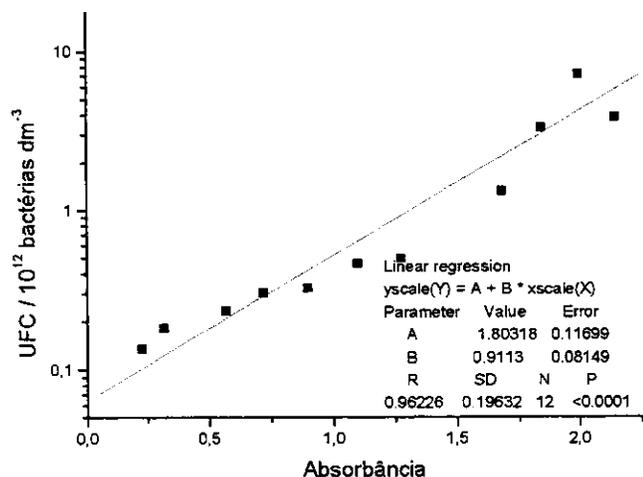
O gráfico da figura 13 apresenta menos pontos que o da figura 12 porque não foi possível obter, para todas as alíquotas retiradas do reator, um número de colônias dentro da faixa estatisticamente aceitável (entre 30 e 300), restando onze dos quinze pontos iniciais. Ainda assim, foi possível obter resultados satisfatórios.

A figura 14 apresenta a curva de cinética de crescimento da *C. violaceum* (unidades formadoras de colônias *versus* tempo). A estreita relação entre a variação da turbidez do meio e o número de microrganismos com a própria cinética do crescimento do microrganismo pode ser observada ao se comparar os gráficos das figuras 13 e 14.

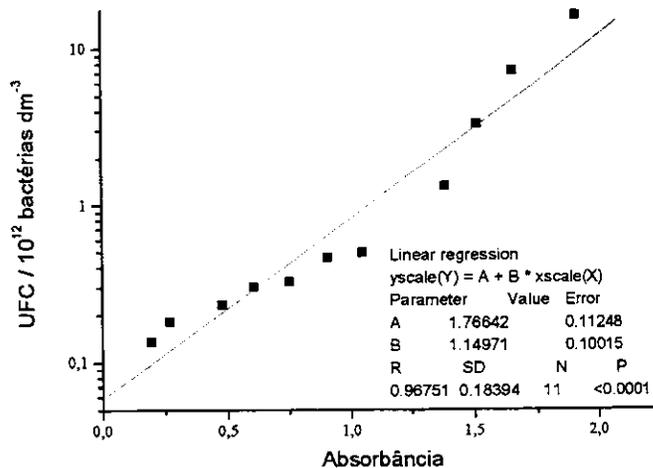
Os gráficos da figura 15 correspondem à curva de calibração de crescimento da *C. violaceum*, obtida utilizando-se os dois espectrofotômetros. Essa curva foi obtida através da linearização da curva UFC *versus* absorbância. Os coeficientes de correlação R referentes à regressão linear das curvas A e B foram 0,96226 e 0,96751, respectivamente. As equações obtidas foram utilizadas para determinação indireta da biomassa nos experimentos em que seu monitoramento se fez necessário.



**Figura 14:** Curva da cinética de crescimento da *C. violaceum*.



(A)



(B)

**Figura 15:** Curva de calibração do crescimento da *C. violaceum*. (A) espectrofotômetro Beckman, DU-70; (B) espectrofotômetro Beckman DU-640B.

#### 4.1.2. Curvas de calibração dos padrões de açúcares

Para a determinação de açúcares por CLAE, construiu-se as curvas de calibração dos padrões de glicose, galactose e lactose, em diferentes concentrações (figura 16).

As curvas foram construídas através da integral da área dos picos referentes a cada açúcar. O cálculo da concentração dos carboidratos presentes nas amostras foi realizado através da equação obtida pela regressão linear de cada curva de calibração.

A tabela 6 mostra os tempos de retenção determinados a partir dos cromatogramas obtidos dos padrões de glicose, galactose e lactose.

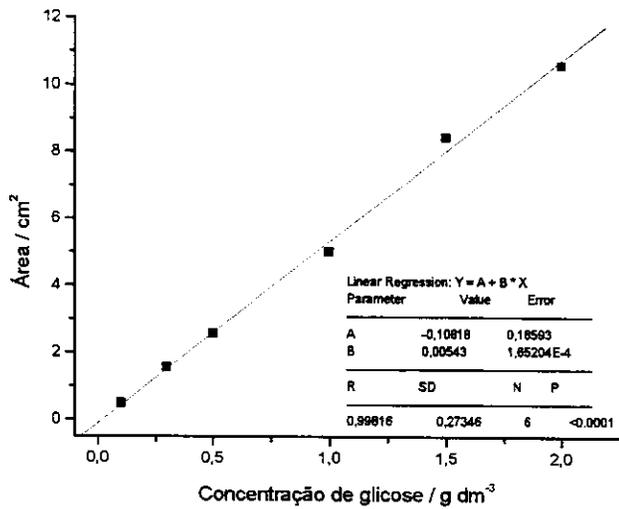
**Tabela 6:** Tempo de retenção (t) dos diferentes açúcares testados.

Padrão	t / min
Lactose	10,7
Glicose	12,4
Galactose	13,7

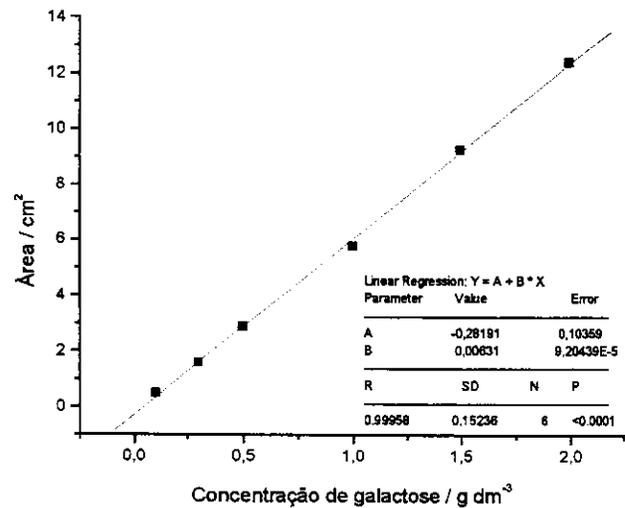
A ordem de retenção observada para os três açúcares está de acordo com a prevista no manual da coluna cromatográfica (Aminex, Bio Rad). Em análise cromatográfica de carboidratos, um fator importante é a habilidade do cátion fixado à resina (no caso,  $\text{Ca}^{2+}$ ) em se coordenar com os grupos hidroxila adjacentes do açúcar. Outro fator é a orientação

especial dos grupos hidroxila do carboidrato. Consequentemente, quanto maior o número de grupos hidroxila adjacentes complexados ao cátion da resina, maior o efeito de interação entre o açúcar e a matriz polimérica da coluna.

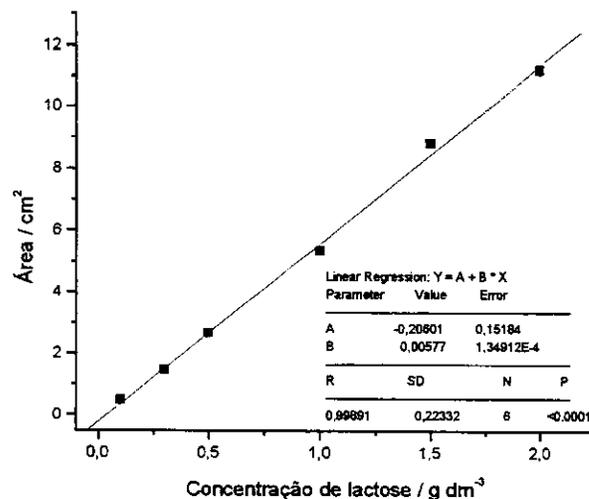
A lactose é um dissacarídeo que, sendo maior que os outros dois açúcares, tem interação mais fraca com a fase estacionária da coluna, provavelmente, por fatores estéricos. Os tempos de retenção da glicose e da galactose são próximos e a razão para a diferença entre eles pode estar relacionada com a disposição espacial dos grupos hidroxila que, neste caso, favorece a interação da galactose com a resina da coluna.



(A)



(B)



(C)

**Figura 16:** Curvas de calibração dos padrões dos açúcares utilizados para o estudo do metabolismo da *C. violaceum*. (A): glicose; (B): galactose; (C): lactose.

### 4.1.3. Curva de calibração da violaceína

O gráfico da figura 17, correspondente à curva de calibração da violaceína, foi obtido através da medida da absorbância (575 nm) de soluções contendo concentrações variadas de violaceína dissolvida em etanol. O coeficiente de correlação obtido para essa curva foi igual a 0,99956. A curva de calibração da violaceína foi utilizada nos experimentos relativos à investigação do efeito térmico da biossíntese de pigmentos violetas pela bactéria *C. violaceum*.

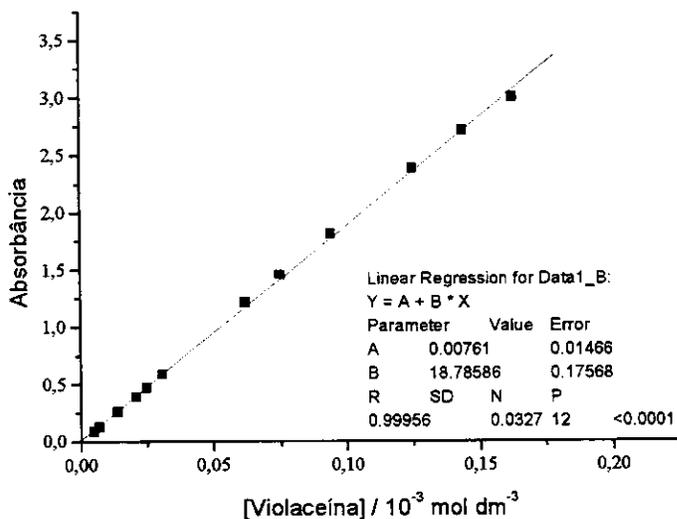


Figura 17: Curva de calibração da violaceína. Solvente: etanol. Absorbância: 575 nm

### 4.1.4. Estocagem da *C. violaceum* por criopreservação

De todos os métodos de preservação, o armazenamento em nitrogênio líquido é o mais aplicado universalmente. Uma grande variedade de microrganismos, células de animais e plantas e culturas de tecidos tem sido preservada com sucesso através desse método (Kirsop e Snell, 1991).

A criopreservação é uma técnica de congelamento de células e tecidos a temperaturas muito baixas nas quais o material biológico mantém-se geneticamente estável e metabolicamente inerte. Em geral, quando um tecido é sujeito a baixas temperaturas, formam-se cristais de gelo que podem causar o rompimento da membrana celular levando à morte da célula. O objetivo da criopreservação é substituir uma parte da água presente na célula utilizando outros compostos que não irão formar cristais grandes de gelo quando

congelados. Estes compostos são chamados de agentes crioprotetores e os mais comuns são o DMSO e o glicerol. Os crioprotetores são capazes de proteger as células de danos físicos e mecânicos, além de reduzir a quantidade de água no interior das células e, deste modo, minimizar a lise celular causada pelos cristais de gelo (Kirsop e Snell, 1991).

O meio a ser utilizado no processo de congelamento deve ser escolhido de acordo com a natureza do material celular. No entanto, ele deve consistir de um meio nutricional, contendo uma fonte de proteínas e o crioprotetor.

Como a *C. violaceum* tem apresentado baixa recuperação após o processo de liofilização, o armazenamento em nitrogênio líquido pode ser o método mais indicado para a preservação da bactéria por longos períodos.

Apesar de Kirsop e Snell (1991) terem citado o sucesso do congelamento da *C. violaceum*, em nitrogênio líquido, não se sabe ao certo que tipo de agente crioprotetor (DMSO ou glicerol, por exemplo) teria sido utilizado e em que tipo de meio o microrganismo foi congelado. Por isso, decidiu-se observar a capacidade de recuperação da bactéria, congelando-a em meio de cultura e em solução PBS, utilizando o DMSO como crioprotetor.

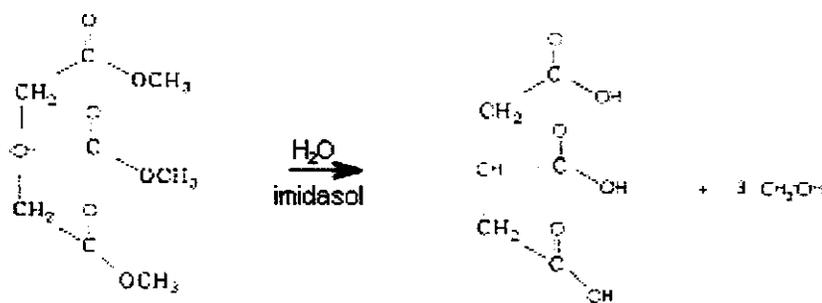
O número de bactérias existentes antes do processo de congelamento foi de  $2,39 \times 10^{12}$  bactérias.  $\text{dm}^{-3}$ . A bactéria manteve uma recuperação de 100% após 5 dias de congelamento, tanto em DMSO quanto em PBS. Após três meses, a capacidade de recuperação foi de 98%. Esses resultados mostram que o processo de congelamento realizado não causou danos irreversíveis à estrutura celular da bactéria.

## **4.2. Preparação dos experimentos microcalorimétricos**

### **4.2.1. Calibração do sistema calorimétrico**

As celas calorimétricas podem ser calibradas tanto através de reações químicas quanto eletricamente através do efeito Joule. Para calibrações relativamente rápidas, reações puramente químicas, existem diversos sistemas bem caracterizados que podem ser utilizados. No entanto, reações biológicas e de decomposição de vários compostos são lentas e, por enquanto, apenas a reação de hidrólise da triacetina tem sido sugerida como candidata.

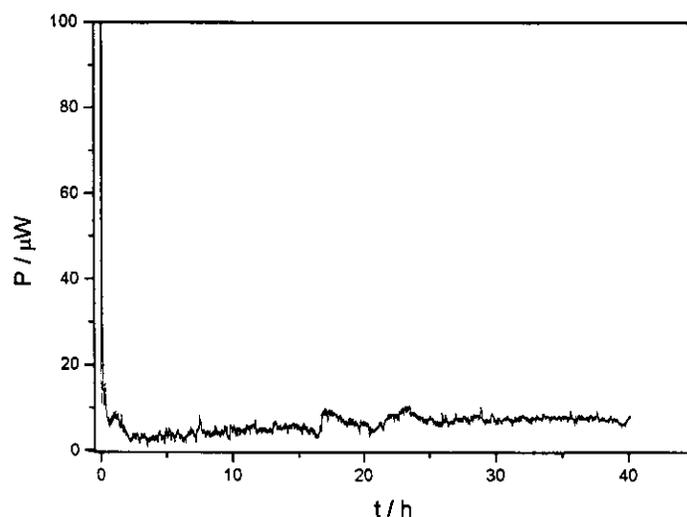
Para calibrar celas calorimétricas, usadas para estudos de células vivas, é essencial que o sistema reacional escolhido possa gerar um efeito térmico dentro da faixa requerida. O método de calibração através da reação de hidrólise da triacetina (figura 18) é frequentemente utilizado pois, é capaz de gerar diferentes faixas de efeito térmico. Para isso, basta variar a concentração de triacetina, enquanto se mantém fixa a quantidade de imidazol do tampão (Guan e Kemp, 2000).



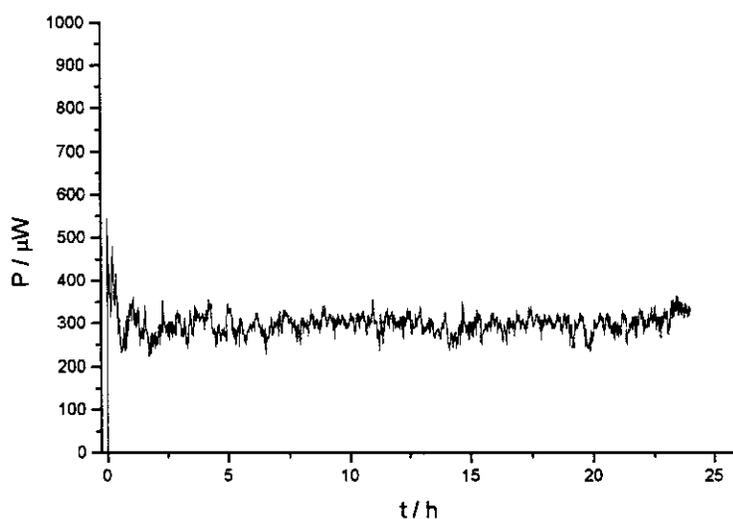
**Figura 18:** Reação de hidrólise da triacetina, catalisada por imidazol.

Neste trabalho, foi feita uma medida preliminar, utilizando triacetina na concentração de  $0,15 \text{ mol dm}^{-3}$ . A quantidade de triacetina utilizada gerou um efeito térmico na faixa de 0 a  $30 \mu\text{W}$ . As demais calibrações foram realizadas utilizando triacetina na concentração de  $1,5 \text{ mol dm}^{-3}$  e foi possível calibrar quimicamente o microcalorímetro na faixa de efeito térmico correspondente à maioria dos resultados calorimétricos relativos aos processos envolvendo a *C. violaceum* (0 a  $300 \mu\text{W}$ ).

As curvas potência térmica *versus* tempo da figura 19 mostram que o efeito térmico produzido pela HTTI manteve-se constante no decorrer das medidas calorimétricas. A eficiência da reação de hidrólise da triacetina, foi testada primeiramente na escala  $30 \mu\text{W}$ , de maior sensibilidade, fornecendo um efeito térmico médio ( $6,2 \pm 1,9 \mu\text{W}$ ) distante do valor nominal da escala. As demais calibrações foram realizadas na escala de  $300 \mu\text{W}$ , produzindo um desvio menor. No experimento da figura 19B, obteve-se um efeito térmico médio de  $299,2 \pm 25,1 \mu\text{W}$ .



(A)



(B)

**Figura 19:** Curvas de potência térmica ( $P$ ) versus tempo ( $t$ ) relativas à calibração química do microcalorímetro de fluxo, utilizando a reação de hidrólise da triacetina em tampão imidazol/ácido acético. Calibrações nas escalas de  $30 \mu\text{W}$  (A) e  $300 \mu\text{W}$  (B).

### 4.3. Medidas microcalorimétricas do crescimento da *C. violaceum*

#### 4.3.1. Padronização do sistema de medida

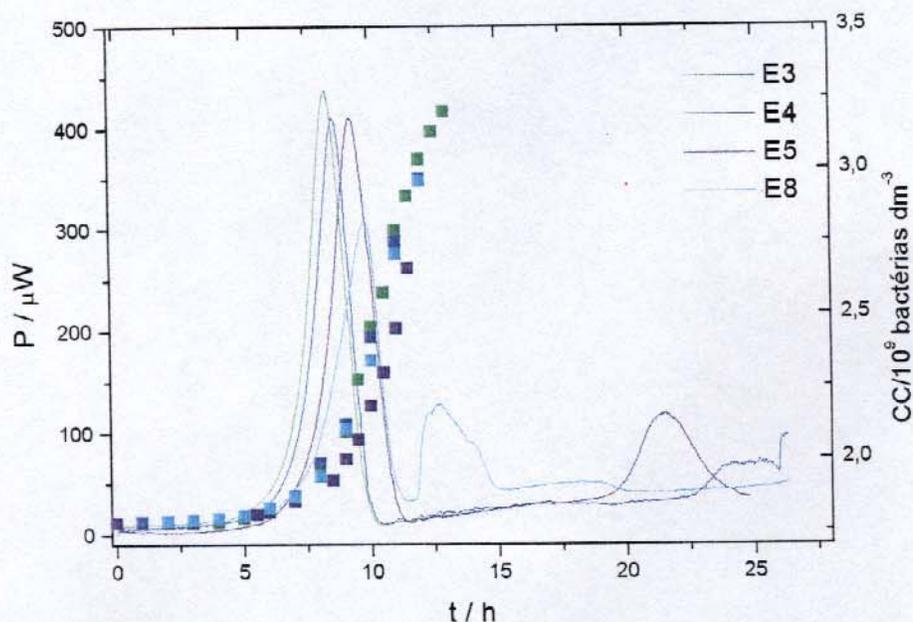
Quando os experimentos de crescimento bacteriano em fluxo contínuo foram iniciados, observou-se que os mesmos seriam mais longos que o esperado e que haveria uma grande dificuldade em se monitorar a biomassa até o fim da fase exponencial. A medida da

biomassa se tornou complexa devido à indisponibilidade de um espectrofotômetro que pudesse permanecer no laboratório de calorimetria durante a execução dos experimentos.

É difícil estabelecer comparações entre os primeiros experimentos no que se refere ao número de bactérias pois, os primeiros valores de biomassa obtidos em todos os experimentos, por serem baixos, estão fora da curva de calibração obtida anteriormente. Como se tratam de experimentos preliminares, foi feita uma extrapolação da curva de calibração e se obteve, em todos os casos, uma estimativa da população bacteriana.

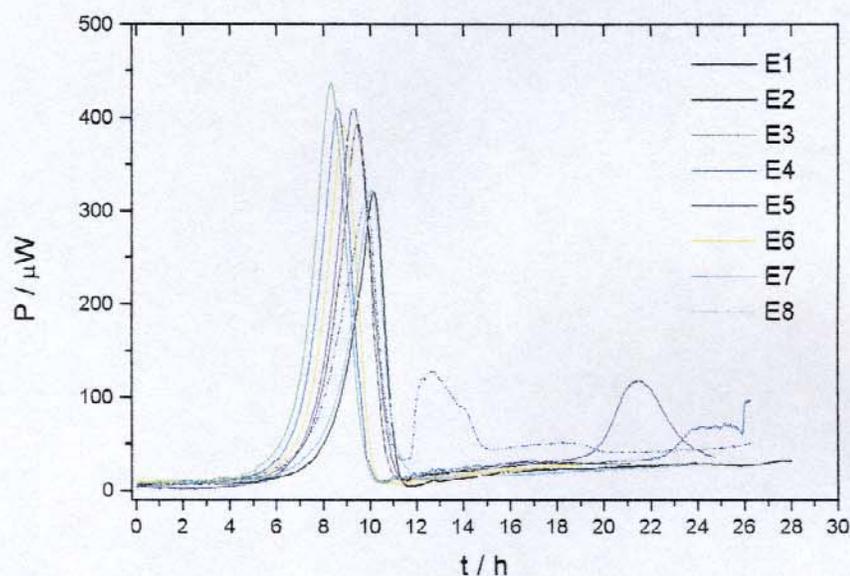
Algumas considerações, no entanto, foram feitas a respeito dos resultados calorimétricos e sua correlação com a fase inicial do crescimento da bactéria. Observou-se que não há relação entre o máximo da curva potência térmica *versus* tempo, produzida pela cultura, e o crescimento da população bacteriana, ou seja, a *C. violaceum* entra na fase exponencial após o pico calorimétrico (figura 20).

Os resultados obtidos mostram claramente que é essencial a utilização de outras técnicas analíticas capazes de fornecer dados relativos a outros parâmetros da cultura ( $O_2$ , pH, glicose, por exemplo) e, dessa forma, contribuir na interpretação dos sinais calorimétricos. O perfil das curvas obtidas mostra que o efeito térmico produzido pela cultura aeróbia da *C. violaceum* foi semelhante em todos os experimentos.



**Figura 20:** Curvas de potência térmica (linha cheia) e de biomassa (pontilhado) *versus* tempo, referentes ao crescimento de *C. violaceum* sob aerobiose.

A utilização de inóculos diferentes de *C. violaceum* (descongelada imediatamente antes dos experimentos ou reativada através de repique de 24 h), não causou alteração significativa nas curvas de potência térmica *versus* tempo obtidas (figura 21), nem mesmo nas curvas de crescimento do microrganismo (figura 22).



**Figura 21:** Curvas de potência térmica e de biomassa da *C. violaceum* *versus* tempo, sob aerobiose. E1-E4: inóculo após reativação por 24h; E5-E8: inóculo imediato após descongelamento.

Em apenas três curvas da figura 21 (E4, E5 e E8) ocorrem efeitos significativos após o pico máximo. Esses efeitos térmicos podem ser atribuídos a interferências externas ao sistema como falhas ocorridas na termostatização do ambiente, por exemplo. Os efeitos observados após 20 h de experimento podem ainda estar relacionados com a alteração da viscosidade do meio causada pelo aumento da biomassa.

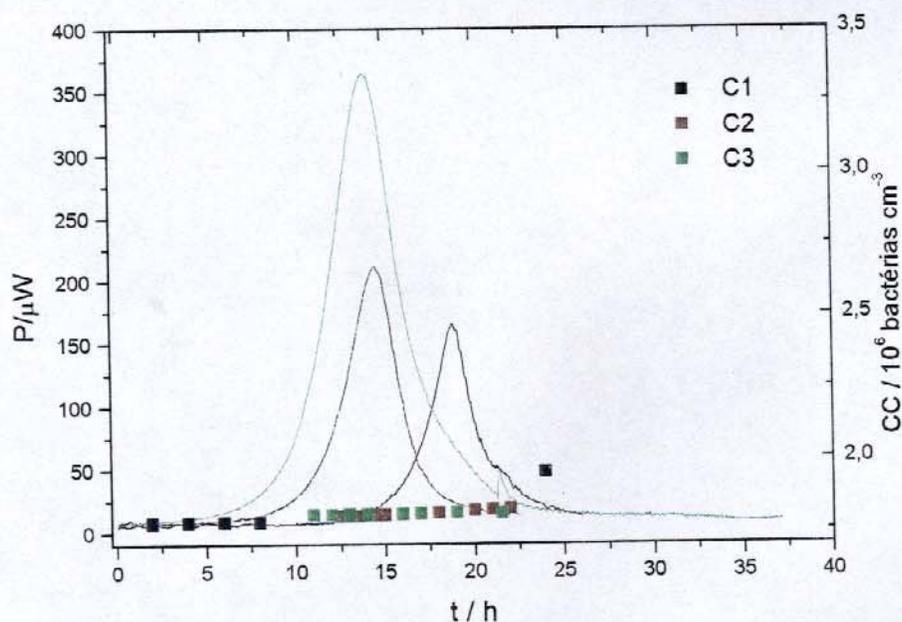
Através da linearização das curvas *P versus t*, utilizando a equação 2, obteve-se a taxa de produção de efeito térmico durante o crescimento aeróbio da bactéria.

$$\ln(dq / dt) = \ln a + kt \quad \text{Equação 2}$$

O valor da taxa de produção de efeito térmico corresponde à inclinação (*k*) da reta obtida após a linearização das curvas e está relacionado com a reprodutibilidade de dados da

Nos três experimentos sob condições anaeróbias, o crescimento da *C. violaceum* foi significativamente mais lento e as curvas potência térmica *versus* tempo indicam um efeito térmico tardio em relação aos experimentos sob aerobiose. Observa-se, no entanto, pouca reprodutibilidade entre os experimentos sob anaerobiose. A razão para esse fato pode estar relacionada com problemas técnicos apresentados pelo fermentador BioFlo I.

Como os experimentos sob anaerobiose eram mais demorados, se tornou mais difícil acompanhá-los durante o tempo das medidas, principalmente, devido à necessidade de se monitorar a biomassa. Decidiu-se, nesta ocasião do trabalho, dar continuidade ao estudo do crescimento da bactéria apenas sob condições aeróbias pois, restava pouco tempo disponível para a execução de todos os experimentos propostos.



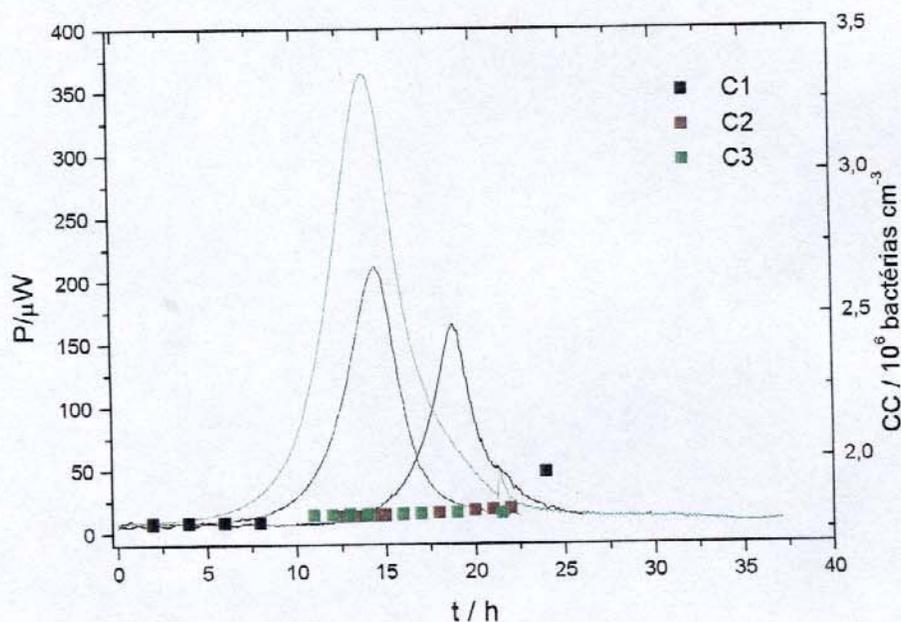
**Figura 23:** Curvas de potência térmica e de aumento da biomassa (pontilhadas) em função do tempo, referentes ao crescimento da bactéria *C. violaceum*. Experimentos sob anaerobiose.

#### 4.3.2. Monitoramento de outros parâmetros do processo de crescimento

Após o período de instalação e adaptação ao manuseio do novo reator biológico, Biostat B2, o mesmo foi testado em alguns experimentos e mostrou-se eficiente e de fácil operação. Os valores de biomassa e outros parâmetros da cultura (pH e O<sub>2</sub>) foram monitorados e mostraram-se reprodutíveis. O gráfico da figura 24 mostra, como exemplo,

Nos três experimentos sob condições anaeróbias, o crescimento da *C. violaceum* foi significativamente mais lento e as curvas potência térmica *versus* tempo indicam um efeito térmico tardio em relação aos experimentos sob aerobiose. Observa-se, no entanto, pouca reprodutibilidade entre os experimentos sob anaerobiose. A razão para esse fato pode estar relacionada com problemas técnicos apresentados pelo fermentador BioFlo I.

Como os experimentos sob anaerobiose eram mais demorados, se tornou mais difícil acompanhá-los durante o tempo das medidas, principalmente, devido à necessidade de se monitorar a biomassa. Decidiu-se, nesta ocasião do trabalho, dar continuidade ao estudo do crescimento da bactéria apenas sob condições aeróbias pois, restava pouco tempo disponível para a execução de todos os experimentos propostos.



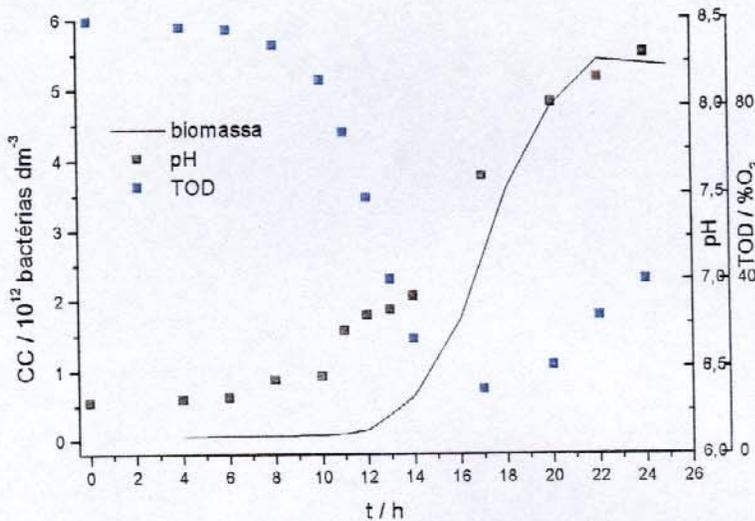
**Figura 23:** Curvas de potência térmica e de aumento da biomassa (pontilhadas) em função do tempo, referentes ao crescimento da bactéria *C. violaceum*. Experimentos sob anaerobiose.

#### 4.3.2. Monitoramento de outros parâmetros do processo de crescimento

Após o período de instalação e adaptação ao manuseio do novo reator biológico, Biostat B2, o mesmo foi testado em alguns experimentos e mostrou-se eficiente e de fácil operação. Os valores de biomassa e outros parâmetros da cultura (pH e  $O_2$ ) foram monitorados e mostraram-se reprodutíveis. O gráfico da figura 24 mostra, como exemplo,

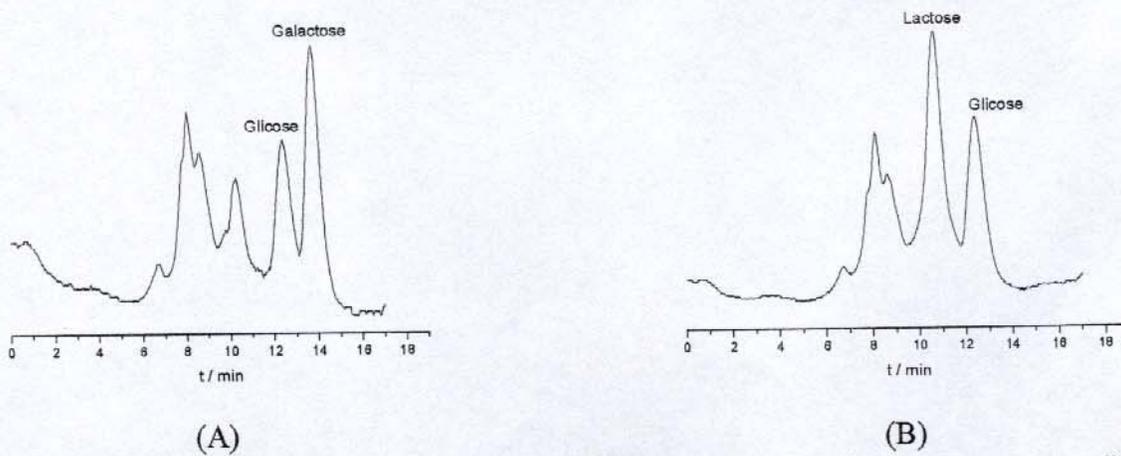
curvas obtidas a partir dos dados de biomassa, pH e de TOD para um dos experimentos utilizando a combinação de glicose com galactose na proporção 1:1.

Utilizando-se o reator Biostat B2 nos experimentos subsequentes, esses parâmetros foram analisados em conjunto com os dados calorimétricos.



**Figura 24:** Curvas referentes aos dados de biomassa, pH e TOD, obtidos durante um experimento utilizando o reator Biostat B2. Composição do meio de cultura: glicose/galactose 1:1.

A figura 25 mostra o perfil típico dos resultados obtidos na avaliação do consumo de carboidratos. Estes cromatogramas referem-se à análise de amostras de meio de cultura retiradas do fermentador, contendo combinações de dois açúcares na proporção 1:1 (glicose/galactose e glicose/lactose, respectivamente).



**Figura 25:** Cromatogramas de amostras retiradas após 14 h de experimento na proporção de açúcares no meio de 1:1: (A) glicose/galactose; (B) glicose/lactose.

Em todas as curvas obtidas, observou-se a presença de picos em cerca de 10 min de retenção. Não foi possível identificar os compostos referentes a estes picos; provavelmente são metabólitos (ácidos orgânicos, álcoois, etc.) da cultura microbiana presentes nas amostras que apresentam tempo de retenção próximo ao da lactose.

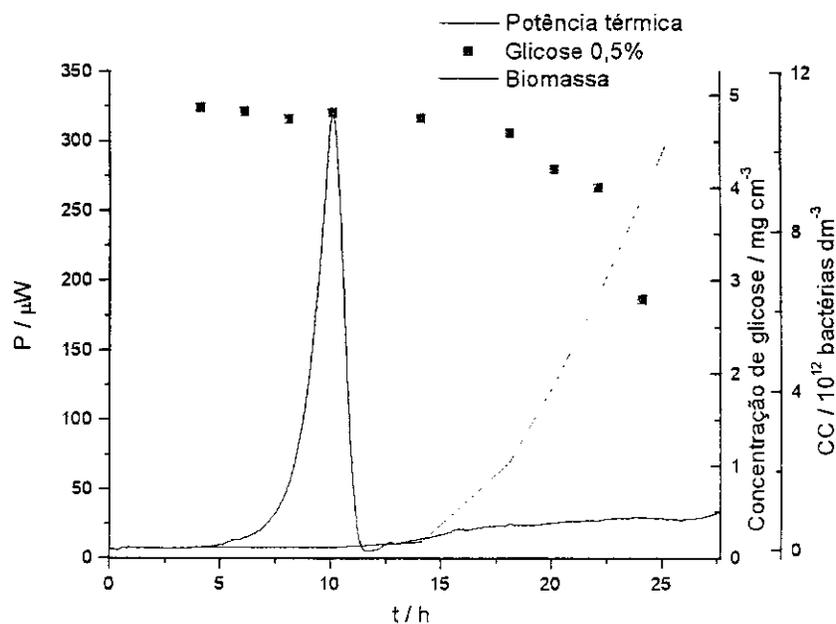
#### **4.3.2.1. Estudo do metabolismo de glicose como fonte única de carbono**

Os primeiros resultados apresentados a seguir correspondem aos experimentos sobre a influência da quantidade de glicose, utilizada em cultura aeróbia de *C. violaceum*, quanto à magnitude do efeito térmico, ao consumo de glicose e ao aumento da biomassa observado.

Na presença de glicose como única fonte de carbono e na concentração de 0,5%, (figura 26), verifica-se que o início da fase exponencial de crescimento da bactéria e a degradação do carboidrato ocorrem ao mesmo tempo. Entretanto, estes eventos ocorreram após o pico de efeito térmico máximo produzido pela cultura bacteriana (cerca de 9 h de experimento). No trabalho publicado por James (1987), alguns pesquisadores citaram a ocorrência de uma discrepância temporal entre a curva calorimétrica e a de biomassa em experimentos envolvendo culturas de microrganismos. Vários fatores experimentais como agitação, aeração, composição do meio de cultura ou forma de inóculo do microrganismo (se proveniente de uma cultura descongelada ou mantida em erlenmeyer) podem causar esse tipo de discrepância (James, 1987; Monk, 1978b; Monk, 1979).

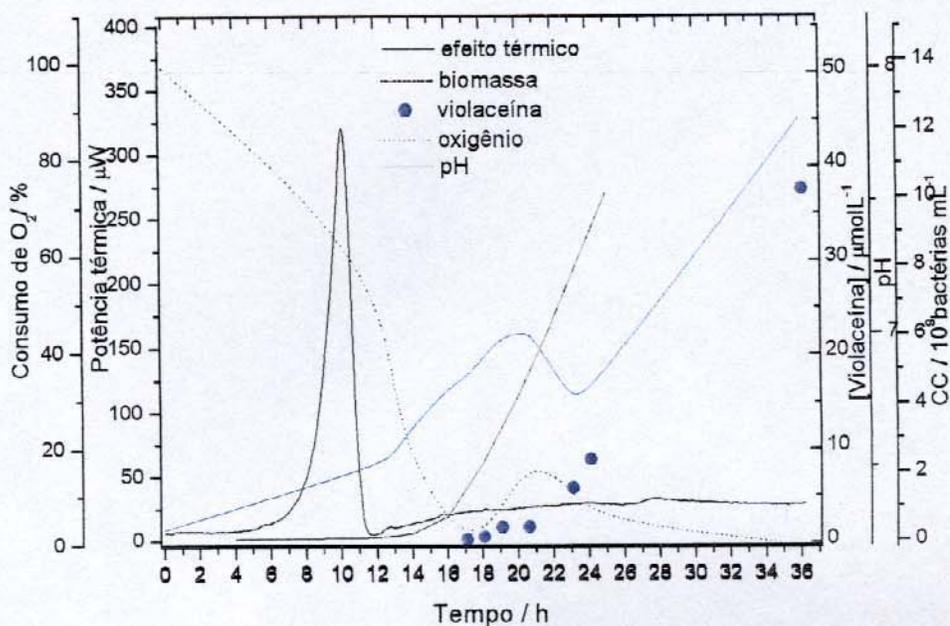
Uma das limitações enfrentadas neste trabalho foi a impossibilidade técnica de se utilizar a temperatura ideal para as medidas microcalorimétricas do crescimento do microrganismo. A faixa de temperatura ótima para o crescimento da *C. violaceum* é de 30-37°C. Como o microcalorímetro trabalha a 25°C (temperatura utilizada pela maioria dos usuários do aparelho), todos os experimentos foram realizados nesta temperatura.

Num experimento em que a temperatura utilizada é abaixo da temperatura ótima, o crescimento é mais lento, ou seja, há uma diminuição na atividade das enzimas envolvidas no processo (Greasham e Herber, 1997). Por essa razão, a utilização de uma temperatura abaixo da ideal poderia ser considerada como um dos fatores que influenciaram na discrepância observada entre as curvas calorimétricas, de biomassa e de consumo de carboidratos.



**Figura 26:** Curvas de potência térmica, biomassa e de consumo de glicose *versus* tempo relativas à cultura de *C. violaceum* em meio de cultura padrão (glicose 0,5%).

Os dados da figura 27 mostram que, nas condições utilizadas, além da fase exponencial de crescimento bacteriano, a produção de violaceína não foi acompanhada por um efeito térmico significativo. A razão para essa tendência não foi encontrada. No entanto, há suspeitas de que o balanço energético entre as reações que ocorrem durante esta etapa do processo não seja tão favorável, como ocorre no metabolismo de outros microrganismos. Este balanço desfavorável pode estar relacionado com a biossíntese de violaceína, além da questão da temperatura já citada.



**Figura 27:** Curvas de potência térmica, biomassa, produção de violaceína, TOD e de pH *versus* tempo relativas ao metabolismo da *C. violaceum* em meio de cultura padrão.

Observando as curvas de TOD e pH, nota-se que desde o início há um curso gradativo de queda na TOD e de acréscimo em relação ao pH. Pouco antes da fase exponencial de crescimento da bactéria, essas tendências se acentuam de forma significativa. Neste momento, em torno de 13 h de experimento, a potência térmica se aproximava da linha base.

A alteração mais brusca ocorreu na porcentagem de oxigênio presente no meio, chegando próximo a zero em 17 h de experimento e subindo novamente (até cerca de 15%) no início da produção de violaceína. Este comportamento é esperado devido ao grande número de eventos metabólicos que levam à queda da TOD. No caso da *C. violaceum*, o aumento pode ser atribuído à respiração aeróbia que aumenta de acordo com a biomassa e também ao início da biossíntese de violaceína, que requer oxigênio do ar para ocorrer. É interessante observar esta relação entre o consumo de oxigênio e a biossíntese do pigmento. Como o oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) é utilizado na biossíntese da violaceína, à medida em que este processo ocorre, a porcentagem de oxigênio cai novamente (figura 27).

A curva de pH mostrou que houve uma tendência preferencial de aumento durante quase todo o processo, apresentando, no entanto, uma inflexão entre 20 e 24 h de experimento. Sabe-se que a variação do pH está vinculada à natureza da fonte de nitrogênio

utilizada no meio de cultura. Neste caso, tratando-se de fontes orgânicas de nitrogênio (extrato de levedura e peptona bacteriológica) em abundância, pode ocorrer um acúmulo de amônia no meio, durante o metabolismo de aminoácidos provenientes de tais nutrientes, fazendo com que o meio se torne alcalino (Greasham e Herber, 1997). Tal tendência na variação do pH também foi observada em experimentos utilizando outras fontes de carbono. A variação do pH nesta etapa do processo pode ser governada por vários fatores, no entanto, foram levantadas duas hipóteses para a ocorrência da inflexão na curva de pH no intervalo entre 20 e 24 h de experimento.

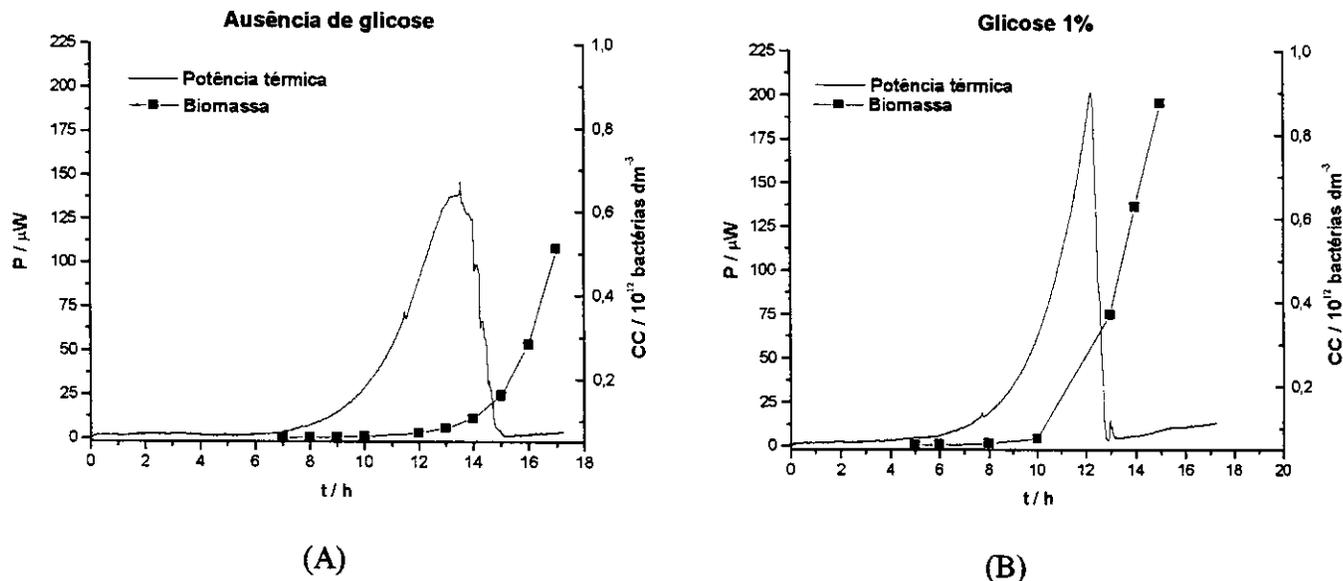
À medida em que o crescimento aumenta, há uma produção maior de  $\text{CO}_2$  como consequência do próprio processo de respiração aeróbio. A presença de  $\text{CO}_2$  em meio aquoso proporciona a formação de ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), através da ocorrência dos equilíbrios entre as espécies  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{CO}_3^{2-}$ . A liberação de prótons no meio, devido à ionização do ácido carbônico, leva a um decréscimo do pH em torno de 20 h de experimento.

A inflexão observada pode estar relacionada com o fato de que, no período entre 16 e 19 h, houve uma escassez de oxigênio no meio. A *C. violaceum* é um microrganismo que, sob tais condições, pode produzir ácido láctico, o qual é descarboxilado posteriormente (Sneath, 1984; Rettori, 2000), liberando prótons no meio. A produção de ácido láctico se interrompe à medida que a TOD aumenta novamente e, após algum tempo, a curva de pH retorna à tendência anterior.

A partir de 24 h, a produção de violaceína parece ser o fator dominante sobre a variação do pH. Esta mudança, provavelmente, é decorrente da desaminação de uma das duas cadeias laterais condensadas do aminoácido L-triptofano, as quais constituem o grupo pirrolidona da molécula da violaceína. Consequentemente, esta desaminação provoca a liberação de amônia no meio e faz com que o pH aumente (Hoshino e col., 1987; Rettori, 2000).

Para avaliar o efeito da quantidade de carboidratos sobre o crescimento da bactéria e sobre o efeito térmico durante o processo, foram realizados experimentos sob duas condições diferentes; na ausência de glicose e contendo glicose a 1%. Observa-se na figura 28A que o crescimento da bactéria, na ausência de glicose, é mais lento em comparação com

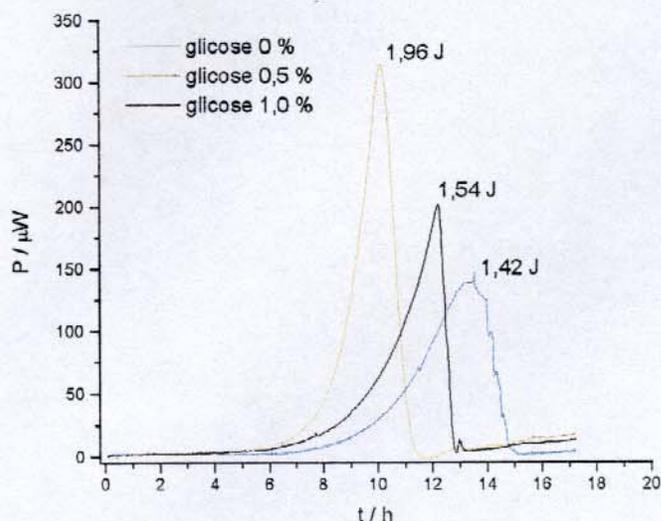
o experimento utilizando 1% do carboidrato (18B). Além disso, o perfil da curva potência térmica *versus* tempo obtida é diferente do obtido em meio de cultura com 1% de glicose (figura 28) e também com 0,5 % do carboidrato (figura 29).



**Figura 28:** Curvas de potência térmica e de biomassa *versus* tempo, relativas ao metabolismo da glicose pela *C. violaceum* sob porcentagens diferentes do açúcar:

A variação da magnitude do efeito térmico de acordo com a quantidade de glicose utilizada pode ser visualizada de forma mais clara na figura 29. Esta figura apresenta as curvas calorimétricas resultantes de experimentos utilizando glicose a 0%, 0,5% e 1% e os respectivos valores de produção de efeito térmico em Joule. Verifica-se que os valores obtidos nos experimentos com glicose a 1% e 0% foram muito próximos (1,54 J e 1,42 J, respectivamente).

O efeito térmico produzido pela bactéria em meio sem glicose foi significativo (1,42 J) cerca de 72,4% em relação ao valor obtido em meio com glicose 0,5% (1,96 J). Isso mostra que, apesar de apresentarem condições iniciais e cinéticas diferentes, os três experimentos resultaram em processos com valores de produção de energia na mesma ordem de grandeza.



**Figura 29:** Comparação entre curvas de potência térmica *versus* tempo de experimentos relativos ao metabolismo bacteriano sob 0, 0,5 e 1% de glicose.

As quantidades extremas de carboidrato, 0% e 1%, estabelecem condições de estresse ou dano celular diferentes que provocam uma diminuição na taxa de crescimento da bactéria em comparação com o crescimento observado em meio de cultura contendo 0,5% de glicose. A utilização de uma quantidade excessiva de glicose pode causar a desidratação da célula, efeito conhecido como plasmólise. Além disso, a alta concentração da fonte de carbono pode causar a repressão de uma ou mais enzimas envolvidas na síntese de metabólitos secundários de interesse. Este tipo de repressão é conhecido como repressão catabólica ou repressão da fonte de carbono (Greasham e Herber, 1997). No segundo caso, a ausência de uma fonte primária de carbono (glicose, por exemplo) obriga o microrganismo a se adaptar ao meio, buscando novas rotas metabólicas para a degradação de outra fonte de carbono que, por ventura, esteja presente.

Nem sempre, porém, o microrganismo possui ou mesmo é capaz de expressar geneticamente as enzimas responsáveis pela degradação da fonte de carbono disponível. O que determina a ocorrência do crescimento diáuxico é justamente essa capacidade, a qual está vinculada à natureza da segunda fonte de carbono (Moat e Foster, 1988; White, 1995).

Para se conhecer a contribuição, em termos de efeito térmico, de cada constituinte de uma amostra, por exemplo, de cada nutriente do meio de cultura utilizado em uma seqüência de experimentos microcalorimétricos, são realizados experimentos em branco. Em

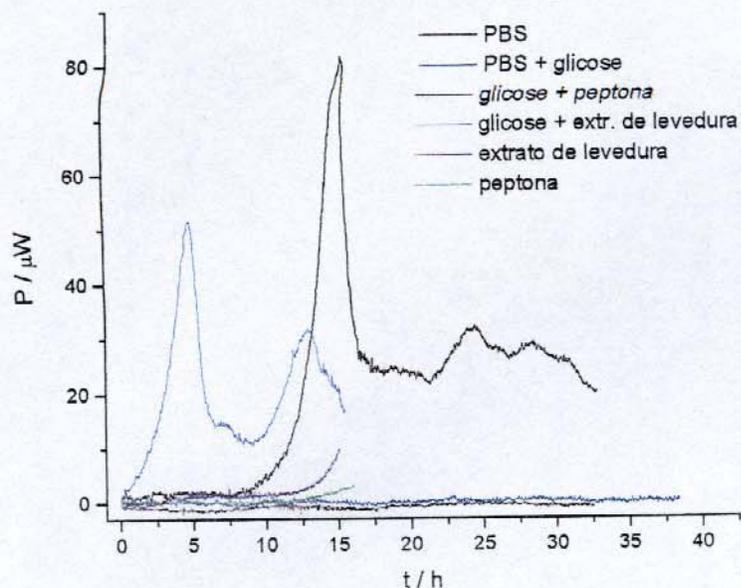
microcalorimetria tais experimentos são essenciais para se garantir a interpretação correta dos dados obtidos. Quando se deseja investigar a contribuição calorimétrica de um determinado nutriente do meio de cultura, o efeito térmico proveniente do metabolismo dos outros nutrientes deve ser descontado do sinal calorimétrico através dos resultados obtidos em experimentos isolados.

A figura 30 mostra os resultados de experimentos realizados em branco. As curvas obtidas mostram que a cultura de *C. violaceum* em solução tampão, contendo ou não glicose, não apresentou sinal calorimétrico e, tampouco, houve crescimento bacteriano. Se forem consideradas as exigências apontadas pela *C. violaceum* em termos nutritivos, este resultado parece óbvio, pois este microrganismo necessita de meio de cultura complexo para crescer. No entanto, ao se comparar a curva em azul, que correspondente à utilização de meio sem glicose da figura 29 com o efeito observado na figura 30, verifica-se que existe uma contribuição importante dos outros ingredientes do meio de cultura padrão na magnitude e ocorrência do pico calorimétrico observado (figuras, 28A e 29).

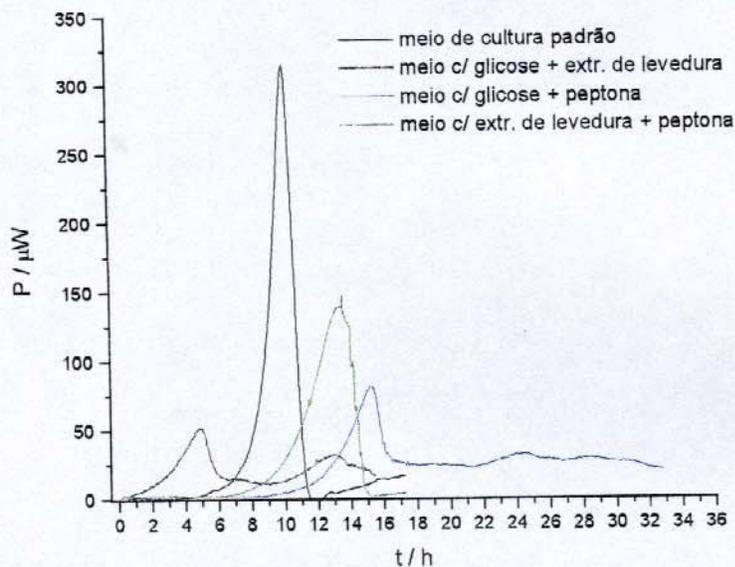
As combinações de glicose com peptona e com extrato de levedura proporcionaram a ocorrência de picos de potência térmica significativos, embora menos energéticos que os obtidos para a cultura com meio de cultura padrão (figura 31). Apenas nesses dois experimentos ocorreu, embora que lento, um crescimento bacteriano. Isto sugere que o pico calorimétrico ocorre quando a bactéria está presente num meio que favoreça de alguma forma o seu crescimento.

Nos experimentos em branco não foi possível monitorar o crescimento da bactéria, sendo este acompanhado visualmente.

Os perfis das curvas relativas às combinações de glicose com os outros nutrientes são semelhantes entre si, apesar da ocorrência dos picos ser em tempos diferentes. Um segundo pico pode ser observado nos dois experimentos. No entanto, quando os resultados desses experimentos são comparados com os obtidos utilizando meio de cultura padrão, observa-se que este pico é pouco significativo (figura 31), considerando-se a escala utilizada nos demais experimentos.



**Figura 30:** Curvas de potência térmica *versus* tempo de experimentos em branco, nos quais a bactéria *C. violaceum* foi mantida em meios de cultura limitados nutritivamente.

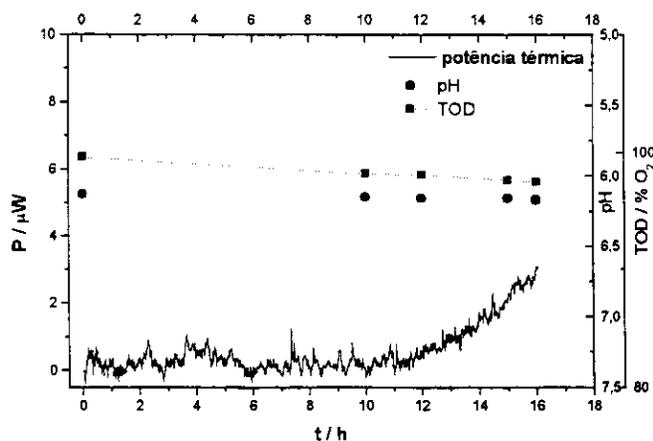


**Figura 31:** Comparação entre as curvas de potência térmica *versus* tempo, obtidas em experimentos utilizando combinações de dois nutrientes (brancos) e com meio de cultura padrão.

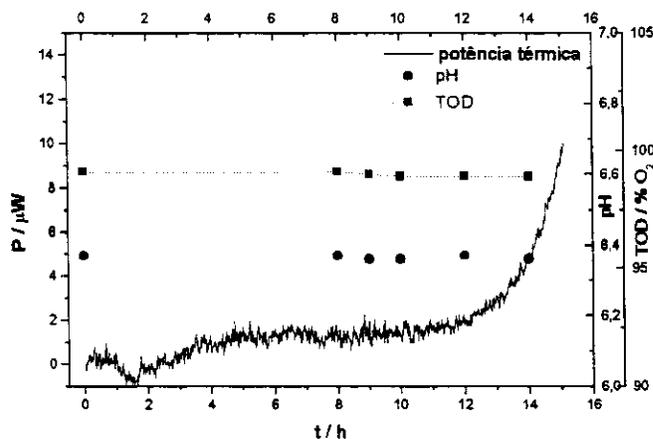
No experimento utilizando apenas peptona bacteriológica não se observou crescimento bacteriano e, também, não ocorreu variação no pH e na TOD (figura 32A). Já no experimento em que se utilizou somente extrato de levedura, houve um crescimento

bacteriano, embora lento, em comparação com os estudos em meio de cultura padrão (figura 32B). Neste caso, também não houve variação do pH e da TOD.

As culturas de *C. violaceum* utilizando combinações de peptona e extrato de levedura com glicose apresentaram variação desses dois parâmetros, figuras 33 e 34, respectivamente. Com relação ao pH, observou-se um decréscimo nos valores obtidos. Essa tendência pode ser explicada pelo fato de que em tais condições experimentais, não havia fonte de nitrogênio em abundância como no caso do meio de cultura padrão. Como discutido anteriormente, esta é uma condição que favorece o aumento do pH.



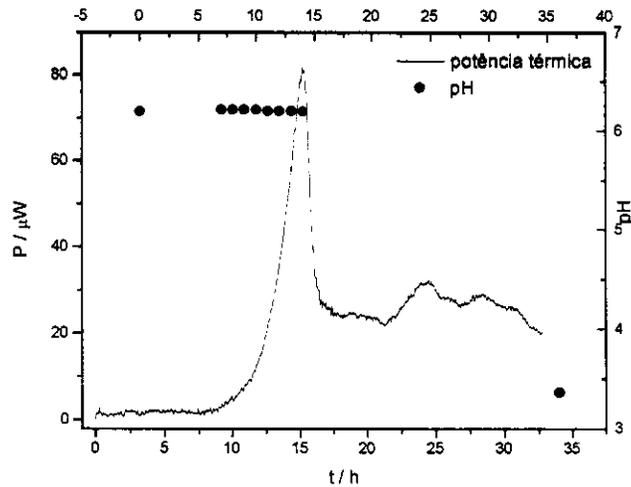
(A)



(B)

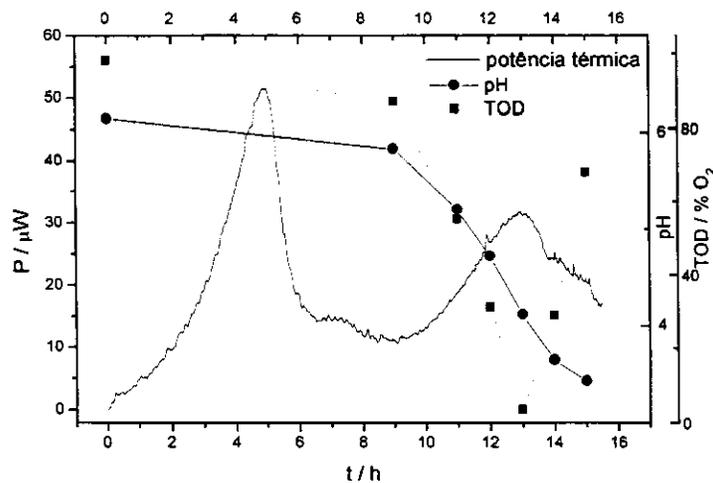
**Figura 32:** Curvas de potência térmica, de TOD e de pH *versus* tempo, relativas à cultura de *C. violaceum* em meio contendo apenas peptona (A) e extrato de levedura (B).

No experimento da figura 33 não foi possível medir a TOD devido ao rompimento da membrana do eletrodo após a montagem e esterilização do fermentador.



**Figura 33:** Curvas de potência térmica e de pH *versus* tempo, relativas à cultura de *C. violaceum* em meio contendo glicose e peptona.

As curvas da figura 34 mostram uma relação entre a TOD, o pH e o crescimento da bactéria. O meio de cultura começou a turvar-se em cerca de 8 h de experimento, momento em que a TOD aumenta e que o pH começa a cair. À medida em que a biomassa aumenta, o valor da TOD cai a zero rapidamente devido à respiração da bactéria. Com a escassez de oxigênio no meio, provavelmente, a bactéria passa a produzir ácido lático anaerobicamente. A bactéria tem à disposição uma fonte primária de carbono e, como não há abundância de fonte de nitrogênio, a liberação de amônia é menos provável, conseqüentemente, o pH cai.



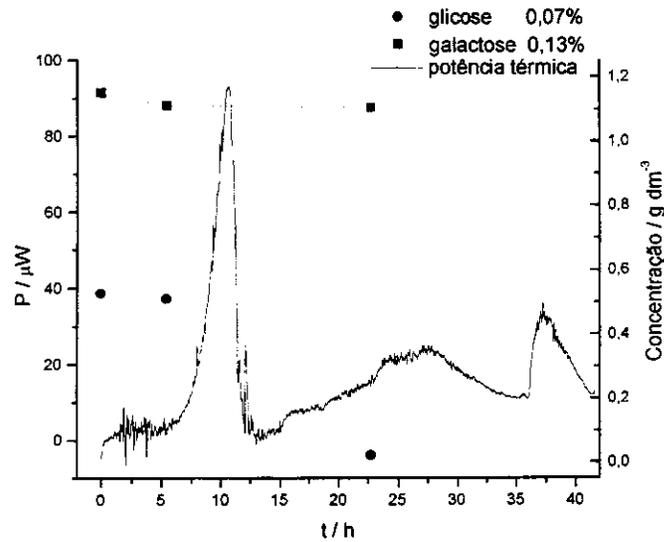
**Figura 34:** Curvas de potência térmica, de pH e de TOD *versus* tempo, relativas à cultura de *C. violaceum* em meio contendo glicose e extrato de levedura.

A análise dos resultados desta etapa do trabalho mostra que a variação na posição do pico de efeito térmico observado e a magnitude do mesmo estão relacionadas com a composição dos nutrientes adicionados à cultura de *C. violaceum*, apesar de não ser possível prever quais processos metabólicos estariam relacionados a este efeito.

#### **4.3.2.2. Estudo do metabolismo de duas fontes de carbono**

Os experimentos com duas fontes de carbono tinham como principal objetivo a verificação da ocorrência de diauxismo durante o crescimento da *C. violaceum*. A escolha dos açúcares utilizados foi feita de acordo com a disponibilidade dos açúcares no laboratório e com os dados existentes na literatura para microrganismos semelhantes à *C. violaceum*. O caso mais típico e próximo é o da bactéria *E. coli*, a qual apresenta diauxismo em meio contendo glicose e lactose. Como a lactose é resultante da ligação entre uma molécula de glicose com galactose, decidiu-se pela escolha da galactose (monossacarídeo) e da lactose para facilitar uma comparação entre os resultados.

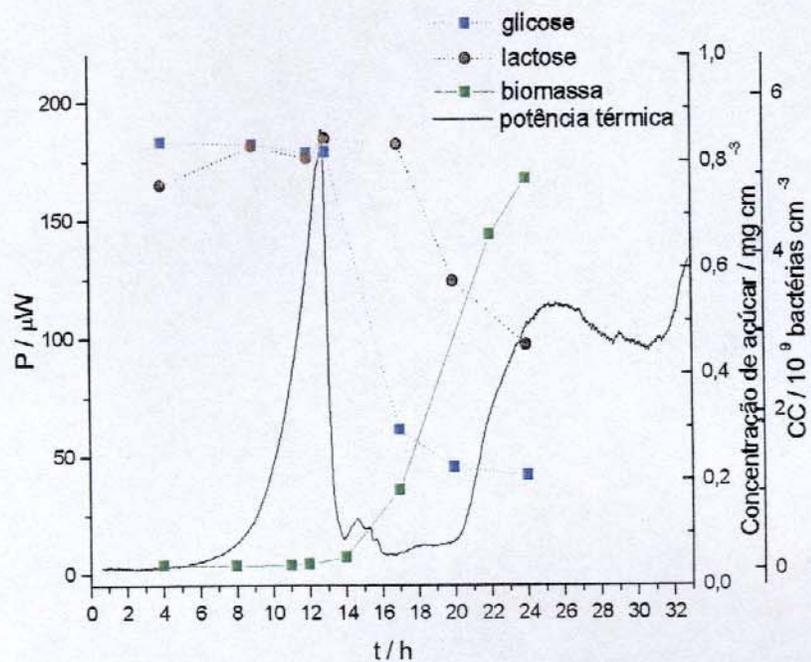
A primeira medida simultânea do consumo de dois carboidratos, foi realizada utilizando-se glicose 0,07% e galactose 0,13% no meio (figura 35). Por ser um experimento preliminar, um número pequeno de amostras foi retirado para a análise do consumo de carboidratos por CLAE e, por isso, não foi possível observar com clareza a relação do pico de efeito térmico com as curvas de consumo dos carboidratos. Nota-se que nas curvas de consumo dos carboidratos não há pontos suficientes que possam identificar com maior exatidão o momento em que a concentração de glicose começa a declinar e nem o perfil da mesma em relação ao pico calorimétrico.



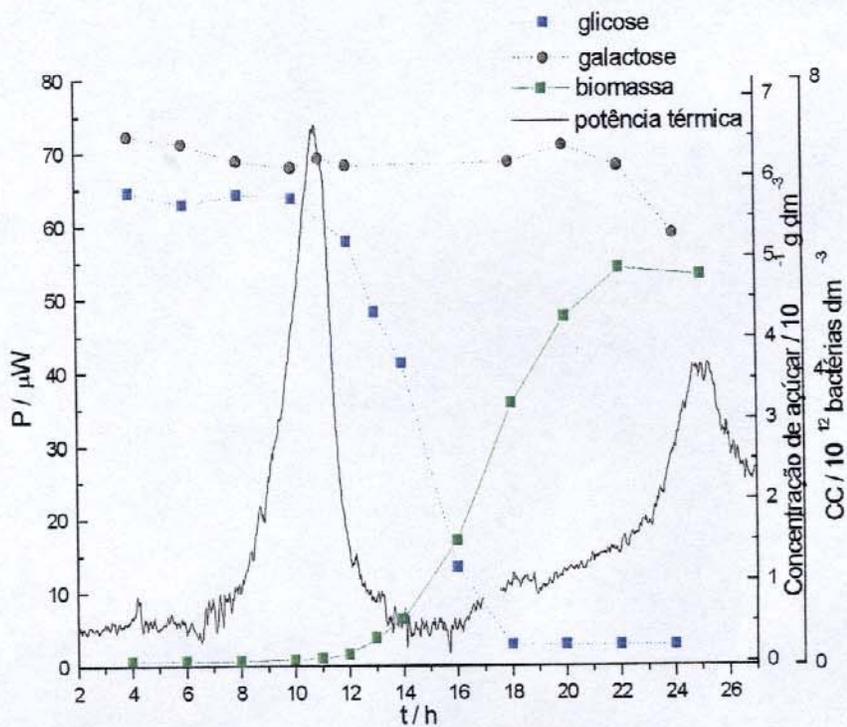
**Figura 35:** Curvas de potência térmica e de concentração de açúcares *versus* tempo, do metabolismo aeróbio de duas fontes de carbono pela *C. violaceum*. Proporção galactose/glicose: 2:1.

Observou-se, no entanto, que o consumo de glicose inicia-se em aproximadamente 5 h e que após 22 h toda glicose foi consumida. A concentração de galactose mantém-se constante no mesmo intervalo, sugerindo que a bactéria não foi capaz de consumir os dois açúcares simultaneamente. O mesmo comportamento foi observado no experimento utilizando os dois açúcares na proporção 1:1 (figura 36B).

Os experimentos relativos à figura 36 mostram a correlação entre os dados calorimétricos, de consumo de carboidratos e de biomassa.



(A)

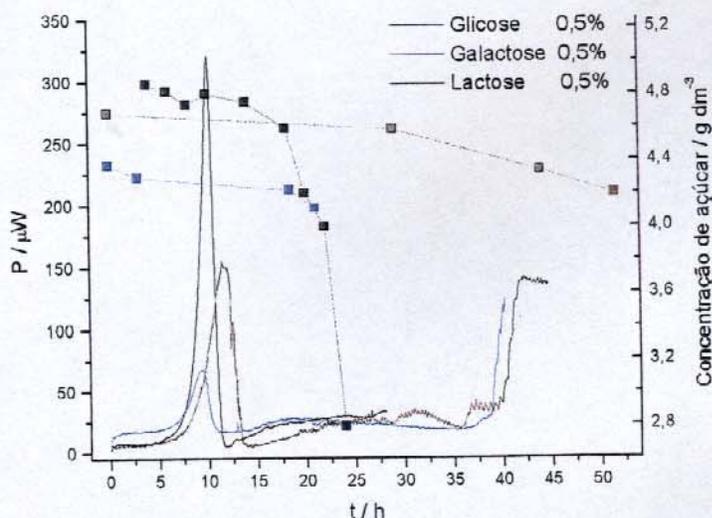


(B)

**Figura 36:** Curvas de potência térmica, de biomassa e de concentração de carboidratos *versus* tempo referentes ao metabolismo aeróbio de duas fontes de carbono pela *C. violaceum*: (A) glicose/lactose; (B) glicose/galactose, em proporção 1:1.

Observa-se que o início da fase exponencial de crescimento da bactéria e de degradação do carboidrato ocorre ao mesmo tempo. A ocorrência simultânea desses eventos indica que, provavelmente, os processos catabólicos e anabólicos estão acoplados (Monk, 1978a; James, 1987), ou seja, que o microrganismo foi capaz de utilizar a energia obtida, na etapa de degradação dos nutrientes, para a manutenção e posterior divisão celular.

Para a utilização de um dissacarídeo como a lactose, a bactéria necessita de um número maior de enzimas do que de para degradar um monossacarídeo como a galactose. No caso da lactose, o microrganismo precisa de enzimas específicas para promover a entrada do açúcar no citoplasma, mediada pela lactose permease e a reação de hidrólise (hidrolase) (Moat e Foster, 1988). Por este motivo, o tempo para o consumo da lactose é maior do que o tempo de consumo dos monossacarídeos (figura 37). Pelos valores de efeito térmico obtidos, verifica-se que a *C. violaceum* produz mais efeito térmico quando a única fonte de carbono é a glicose seguida da lactose e da galactose (figura 37, tabela 7).



**Figura 37:** Curvas de potência térmica e de concentração de carboidratos *versus* tempo, referentes ao metabolismo aeróbico de três fontes de carbono diferentes pela *C. violaceum*.

A tabela 7 mostra os valores de produção de efeito térmico obtidos a partir do cálculo da integral da área do primeiro pico da curva de efeito térmico de todos os gráficos.

Observa-se um efeito térmico maior quando se utiliza um meio de cultura com 100% de peptona e extrato de levedura comparando com o meio com 40% destes nutrientes. Esse

resultado e os apresentados anteriormente (figuras 29, 30 e 31) sugerem que parte da energia liberada pela bactéria, neste momento, se refere ao metabolismo de alguma fonte de carbono (aminoácidos, provavelmente) presente em tais nutrientes.

**Tabela 7:** Valores obtidos de tempo (t) e produção de efeito térmico (Q) para o primeiro pico das curvas P *versus* t, quando consideradas as proporções entre açúcares (Prop) e as porcentagens (Porc). Experimentos (Exp) referentes aos da tabela 3.

Prop	Porcent	t / h	Q / Joule	Exp
0	0	13,6	1,42± 0,10	9
1	1,0% glicose	12,2	1,54± 0,11	10
1	0,5% glicose	10,2	1,96 ± 0,06	8,E3,E4,E6,E9
1	0,5% galactose	9,3	0,38± 0,04	6
1	0,5% lactose	11,5	1,57± 0,05	7
1:1	0,07% glicose / galactose	10,9	0,53± 0,08	3
1:1	0,07% glicose / lactose	12,8	1,27± 0,13	4
1:1	0,2% glicose / galactose	11,6	1,10± 0,09	2
1:1	0,2%glicose / galactose *	11,6	0,54± 0,04	1
1:2	0,07% glicose / 0,13% galactose	10,65	0,78± 0,07	5

\*meio de cultura contendo 40% de peptona e extrato de levedura.

Nos experimentos onde se utilizou uma única fonte de carbono, observa-se que a ocorrência de consumo do açúcar e de crescimento da bactéria ocorre várias horas após o pico de efeito térmico. Quando foram utilizados dois carboidratos (proporção 1:1) no meio de cultura, tais eventos se iniciaram cerca de 1 h após o pico calorimétrico. Estes resultados mostram que, provavelmente, o máximo de energia produzido pela bactéria em torno de 9 h não está exatamente relacionado com a diminuição da concentração dos carboidratos. No entanto, a natureza dos açúcares e a composição entre eles parecem influenciar na energia e na cinética de ocorrência desse efeito térmico.

Os resultados obtidos mostram também que, nas condições utilizadas, a bactéria não apresentou crescimento diáuxico. Não foi observada a presença do fenômeno nem através das curvas potência térmica *versus* tempo, nem na curvas de monitoramento da biomassa.

A ocorrência do primeiro pico de efeito térmico em todos os experimentos calorimétricos pode estar relacionada com a utilização de reservas de fontes de carbono endógenas para o transporte do açúcar para dentro da célula e para a síntese de enzimas responsáveis pelo consumo do carboidrato presente no meio (White,1995). O conjunto dos

experimentos relativos ao metabolismo aeróbio da *C. violaceum* mostrou que a composição do meio de cultura realmente influencia o sinal calorimétrico, sempre anterior à fase exponencial de crescimento da bactéria.

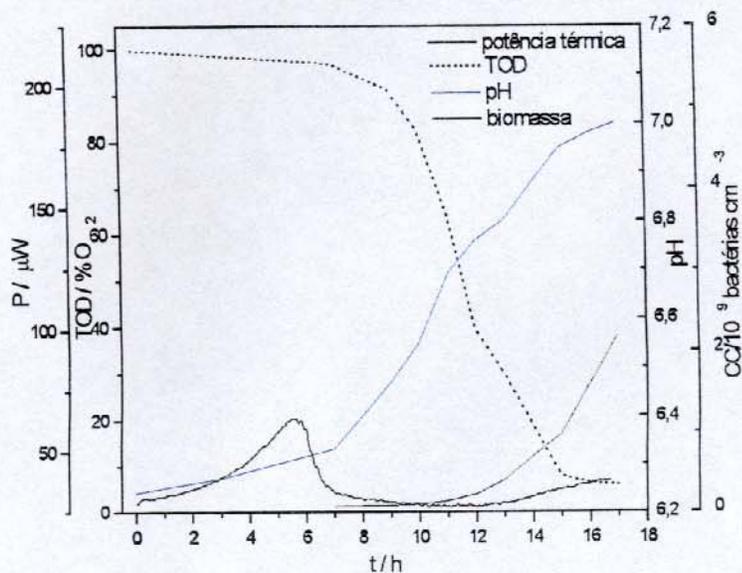
#### 4.3.2.3. Investigação do efeito microcalorimétrico da biossíntese de violaceína

Com o objetivo de estimular a produção bacteriana de violaceína, utilizou-se um composto  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona (ABL) que é um análogo sintético da n-hexanoil-L-homoserinalactona (HHL) que possui cadeia curta. Substâncias sintéticas análogas HHL, têm sido testadas em culturas de *C. violaceum* e os resultados relativos à produção de violaceína são positivos (McClellan e col., 1997; Blosser e Gray, 2000; Ravn e col., 2001).

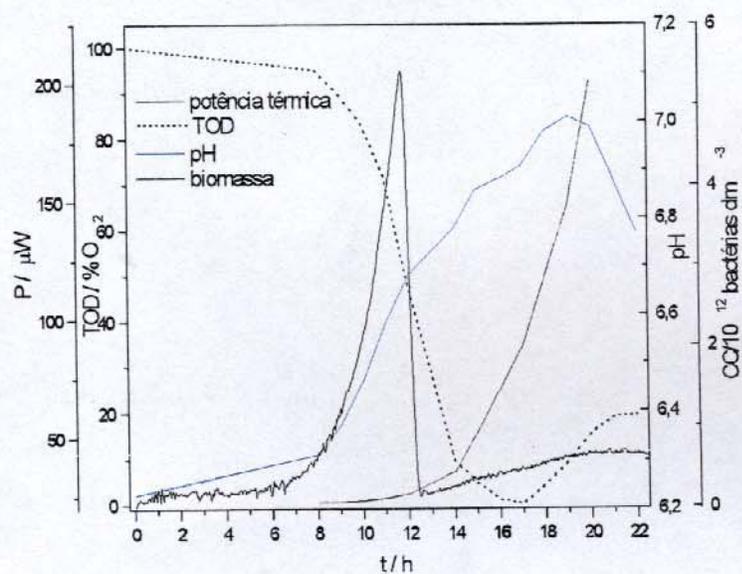
As figuras 38 e 39 referem-se a dois experimentos nos quais utilizou-se  $\alpha$ -amino- $\gamma$ -butirolactona (ABL) nas concentrações de  $500 \text{ nmol dm}^{-3}$  e  $20 \text{ nmol dm}^{-3}$ , em meio de cultura padrão.

Na figura 38A, observa-se que a curva potência térmica *versus* tempo tem um perfil diferente, quando comparada com o experimento da figura 38B ou mesmo em experimentos onde se utilizou a mesma proporção de nutrientes. Além disso, a magnitude do pico calorimétrico e o tempo de ocorrência do mesmo foram diferentes neste experimento. A curva de efeito térmico da figura 38B (ABL  $20 \text{ nmol dm}^{-3}$ ), mostrou um perfil semelhante resultando, porém, num efeito térmico menor que nos experimentos em meio de cultura padrão.

Com relação aos outros parâmetros estudados (TOD, variação de pH e biomassa) a bactéria parece ter o mesmo comportamento nos dois experimentos (figura 38). Em termos de aumento da biomassa é possível observar que a variação na concentração de ABL não provocou alterações na taxa de crescimento da *C. violaceum* (figura 39). Observa-se na figura 39 que, a partir do início da fase exponencial (cerca de 13 h de experimento), o perfil calorimétrico é o mesmo nos dois experimentos.



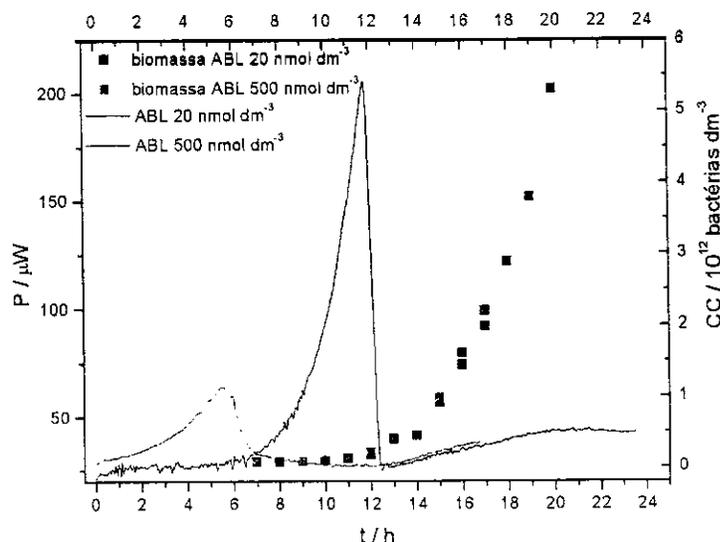
(A)



(B)

**Figura 38:** Curvas de potência térmica, TOD, pH e de aumento da biomassa *versus* tempo relativas ao metabolismo da *C. violaceum* em cultura contendo ABL 500 nmol dm<sup>-3</sup> (A) e 20 nmol dm<sup>-3</sup> (B).

Este resultado parece mostrar que tanto a cinética de crescimento quanto o balanço energético que é traduzido pelo efeito térmico, referente a esta etapa do processo são dependentes das concentrações de ABL utilizadas. Porém, como era esperado, este comportamento não se repetiu quanto à produção de violaceína.

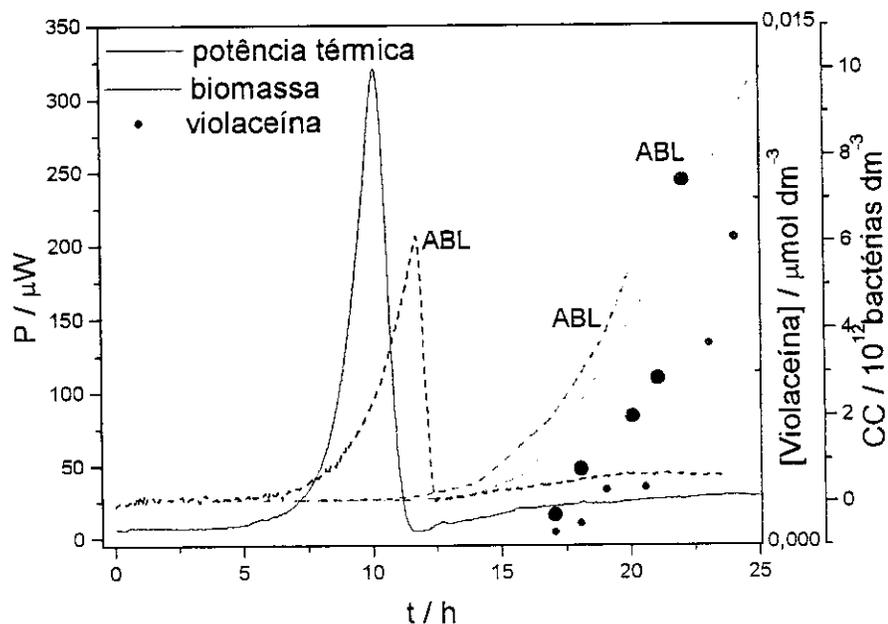


**Figura 39:** Curvas de potência térmica (linhas cheias) e de aumento da biomassa (linha pontilhadas) *versus* tempo, de experimentos utilizando ABL 20 nmol dm<sup>-3</sup> e 500 nmol dm<sup>-3</sup>.

A figura 40 mostra a comparação entre os resultados obtidos nos experimentos em meio de cultura padrão (figura 27) e em meio contendo ABL 20 nmol dm<sup>-3</sup>, respectivamente.

No início da fase exponencial, em 18 h de experimento, a figura 40A mostra que a concentração de violaceína é mais baixa (0,7 μmol dm<sup>-3</sup>). Esse é um resultado esperado para um experimento em meio de cultura padrão que não contém um estimulante da biossíntese do pigmento, pois em tais condições, este processo começa a acontecer no final da fase exponencial (após 24 h). Já a figura 40B, referente ao experimento em meio contendo ABL 20 nmol dm<sup>-3</sup>, apresenta uma concentração de violaceína significativamente maior (2,0 μmol dm<sup>-3</sup>) do que no caso anterior para o mesmo instante do processo.

Apesar dos valores estarem na mesma ordem de grandeza, pode-se observar que a concentração de violaceína foi maior em todos os pontos em relação ao experimento sob condições padrão do meio de cultura. Esses resultados sugerem que houve um efeito estimulador da produção do pigmento quando a bactéria esteve em contato com o análogo de homoserina lactona.



**Figura 40:** Curvas de potência térmica, de biomassa e de concentração de violaceína *versus* tempo, relativas ao metabolismo da *C. violaceum* em meio de cultura padrão, na ausência de ABL (linhas cheias e círculos menores) e contendo ABL 20 nmol dm<sup>-3</sup> (linhas tracejadas e círculos maiores).

Os dados da literatura mostram que a partir de uma certa concentração de homoserina lactona, a produção de violaceína se torna constante. Nos casos estudados, esse patamar não ultrapassa a concentração de 100 nmol dm<sup>-3</sup> (Blosser e Gray, 2000; Ravn e col., 2001).

A idéia de estimular a produção da violaceína, além de investigar o efeito térmico decorrente do processo, foi procurar a razão para o não aparecimento de um sinal calorimétrico significativo durante todo o processo de crescimento da bactéria.

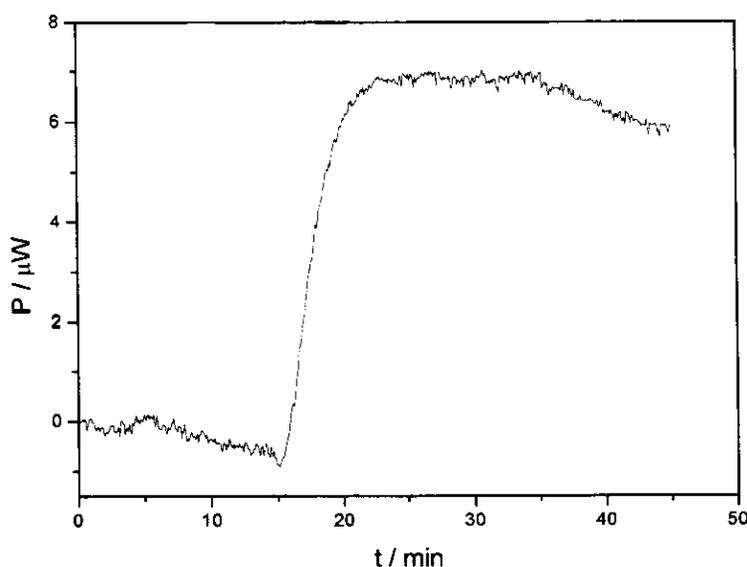
#### 4.4. Efeito de m-alcoxifenóis sobre a respiração de *C. violaceum*

##### 4.4.1. Padronização dos sistemas de medida microcalorimétrica e de TOD

Na tentativa de se obter um sistema com condições apropriadas para a medida da respiração da *C. violaceum*, foram realizados experimentos exploratórios no quais o volume total utilizado foi 50,0 x 10<sup>-3</sup> dm<sup>3</sup>. No primeiro experimento, uma alíquota

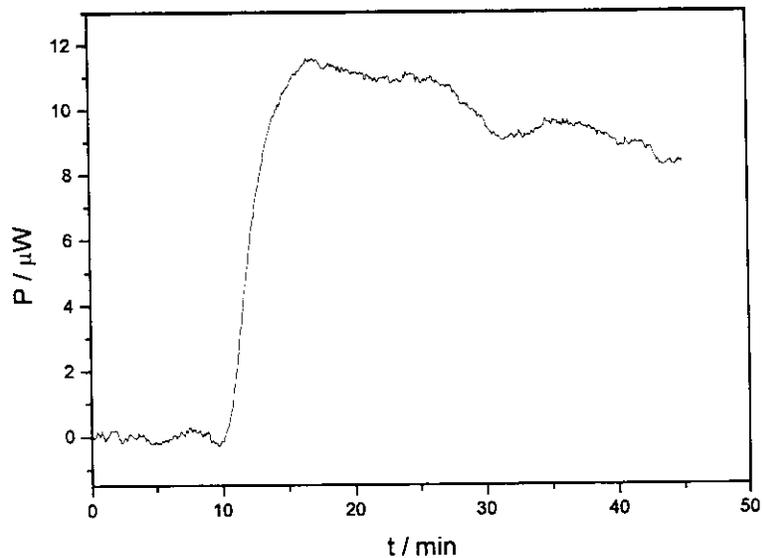
da cultura bacteriana ( $0,50 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$ ) recém descongelada foi adicionada a  $49,5 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de solução tampão A (tampão contendo 1,80 g de glicose vide tabela 2, parte experimental).

O gráfico da figura 41 mostra que a resposta biológica (RB) máxima observada nesse experimento foi muito baixa (por volta de  $7 \mu\text{W}$ ), tendo-se em vista o fundo de escala utilizado na calibração ( $100 \mu\text{W}$ ).



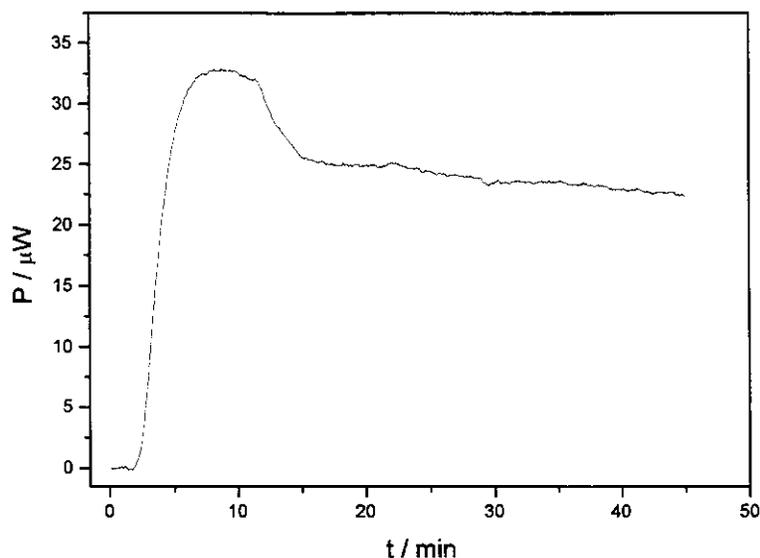
**Figura 41:** Curvas de potência térmica *versus* tempo da respiração de *C. violaceum*. Experimento realizado com  $50,0 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de solução tampão A e  $0,50 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de cultura bacteriana.

Como a intensidade do efeito térmico, relativo à respiração microbiana, é proporcional ao número de microrganismos existentes no sistema, aumentou-se o volume de cultura bacteriana pré descongelada para  $0,80 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$ . O resultado deste experimento encontra-se na figura 42.



**Figura 42:** Curvas de potência térmica *versus* tempo da respiração de *C. violaceum*. Experimento realizado com  $50,0 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de solução tampão A e  $0,80 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de cultura bacteriana.

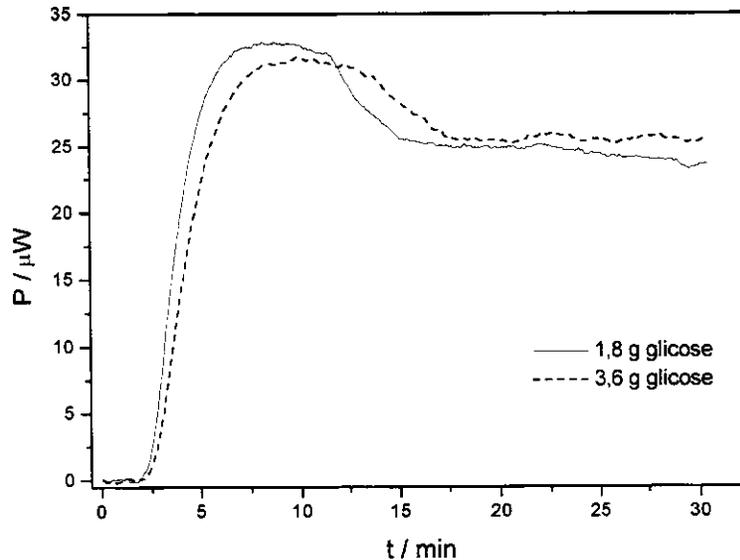
Apesar desse aumento na concentração bacteriana, não houve um aumento significativo da RB, já que, o valor máximo do sinal obtido para este último foi aproximadamente  $12 \mu\text{W}$ . Como o registro de sinais baixos permanecia, optou-se por fazer um novo experimento, onde o volume de solução tampão do micro reator foi reduzido para  $25,0 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  e foi adicionado ao meio uma alíquota de  $0,90 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  da cultura bacteriana. O resultado obtido é mostrado na figura 43.



**Figura 43:** Curvas de potência térmica *versus* tempo da respiração de *C. violaceum*. Experimento realizado com  $25,0 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de solução tampão A e  $0,90 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de cultura bacteriana.

Ainda assim, houve a necessidade de novos ajustes em virtude dos baixos valores registrados. Em outro experimento, onde as condições utilizadas foram análogas ao experimento anterior, alterou-se somente a composição da solução tampão. Utilizou-se a solução tampão B (tampão contendo 3,60 g de glicose) que possuía maior concentração de glicose.

Supôs-se que, aumentando a quantidade de glicose presente no meio, o sinal calorimétrico seria ampliado. Porém, as diferenças dos sinais calorimétricos registrados não foram significativas. Concluiu-se que as bactérias não consomem glicose a uma taxa maior, mesmo com esta em maior abundância. Confirmou-se que bactérias consomem somente a quantidade necessária para respirar. A diferença dos sinais para os dois tipos de meio seria significativamente diferente se a quantidade de glicose da solução A fosse inferior à necessária para as bactérias realizarem o processo de respiração. O gráfico da figura 44 compara as respostas obtidas para as duas diferentes soluções tampão.

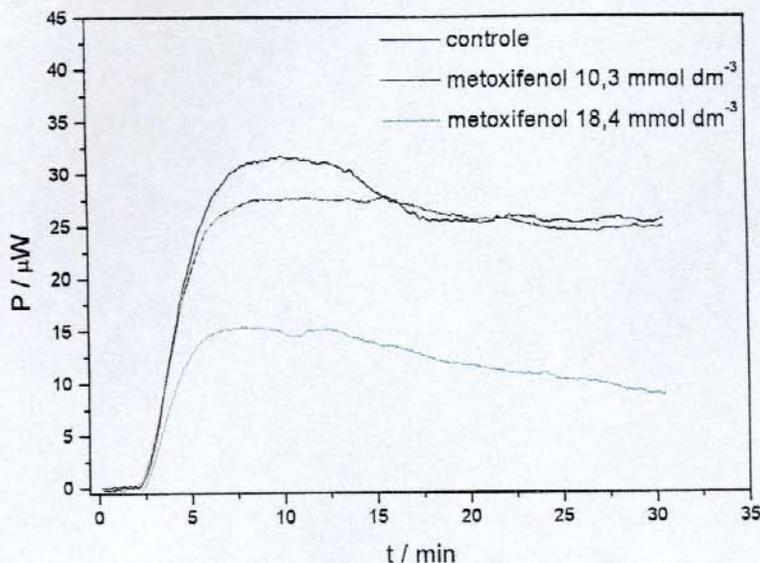


**Figura 44:** Curvas de potência térmica *versus* tempo da respiração de *C. violaceum*. Experimentos realizados com  $0,90 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de alíquota de cultura bacteriana em  $25,0 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de solução tampão A e em  $25,0 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de solução tampão B.

Desta forma, a partir do levantamento da resposta biológica controle obtida, resolveu-se iniciar os experimentos com os m-alcoxifenóis.

Testou-se o primeiro composto da série homóloga, o m-metoxifenol, em duas concentrações, de modo a avaliar o efeito da concentração desse composto sobre a respiração da bactéria. Os experimentos foram realizados sob as mesmas condições anteriores ( $25,0 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de solução tampão B e  $0,90 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de cultura bacteriana). O objetivo inicial do trabalho era observar qual seria o efeito de um m-alcoxifenol sobre a respiração da *C. violaceum*. Os experimentos seguintes, foram realizados utilizando-se a solução tampão A.

Os primeiros resultados relativos ao efeito de um m-alcoxifenol sobre a respiração da *C. violaceum* estão indicados na figura 45.



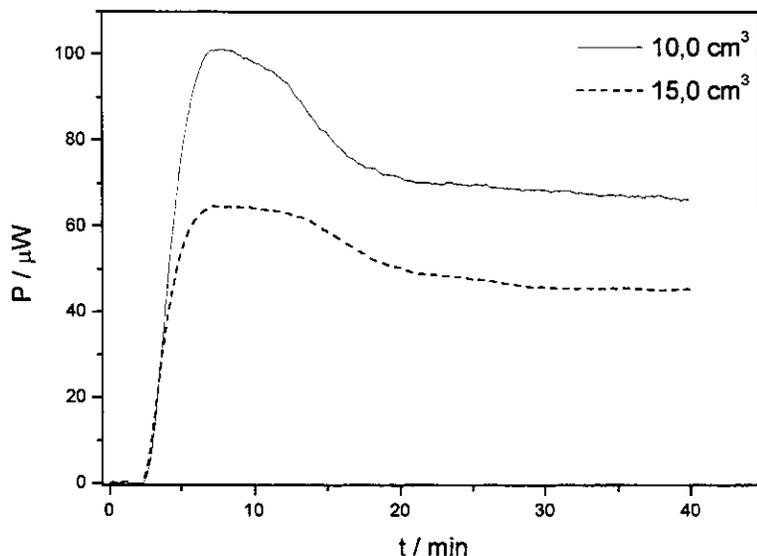
**Figura 45:** Curvas de potência térmica *versus* tempo da respiração de *C. violaceum*. Experimentos realizados com  $25,0 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de solução tampão B (sem m-metoxifenol, com m-metoxifenol na concentração de  $10,3$  e de  $18,4 \text{ mmol dm}^{-3}$  no meio reacional) e  $0,90 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de alíquota de cultura bacteriana.

Observou-se que, nas condições utilizadas, o m-metoxifenol inibiu o processo respiratório da *C. violaceum* e essa inibição foi maior com o aumento da concentração do composto no meio reacional. Através do valor máximo da resposta biológica registrada no experimento, obteve-se a porcentagem de inibição em relação ao controle. A inibição do m-metoxifenol foi de 12,1 % para a concentração de  $10,2 \text{ mmol dm}^{-3}$  e de 48,7 % para a concentração de  $18,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Verificou-se que o perfil das curvas obtidas sugere uma correlação linear entre o logaritmo da concentração do fenol utilizado e a intensidade máxima da resposta biológica.

Ao observar os resultados da figura 45 e considerar que o m-metoxifenol poderia ser o composto menos tóxico da série investigada, decidiu-se reduzir novamente o volume da solução tampão no micro reator para ampliar o efeito

térmico relativo à resposta biológica do controle, permitindo assim o estudo dos outros compostos da série.

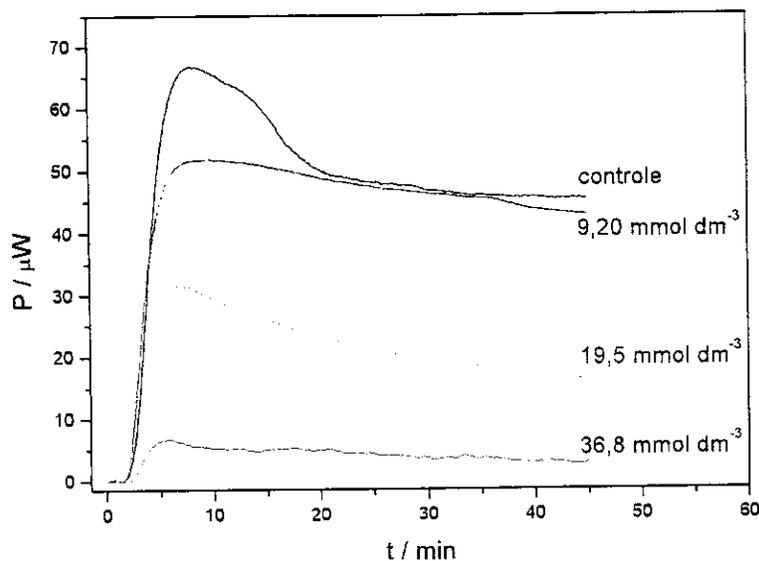
Novas respostas biológicas controle foram testadas nos volumes de 10,0 e de  $15,0 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de solução tampão A e  $0,90 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  cultura bacteriana, utilizando um novo micro reator. Os resultados obtidos estão ilustrados na figura 46.



**Figura 46:** Curvas de potência térmica *versus* tempo da respiração de *C. violaceum*. Experimentos realizados com  $0,90 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de alíquota de cultura bacteriana em 10,0 e em  $15,0 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de solução tampão A.

Observa-se, pelas curvas da figura 46, que os sinais aumentaram significativamente, tanto para o volume de 10,0 como de  $15,0 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$ . O sinal obtido para o volume reacional de  $10,0 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  foi maior mas, ele não foi apropriado à realização dos experimentos subsequentes, pois apresentou sinais que extrapolaram o limite de calibração utilizado. A partir da análise desses resultados, o volume reacional foi definitivamente alterado para  $15,0 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$ . As concentrações de m-metoxifenol testadas foram 9,20, 19,5 e  $36,8 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Os experimentos

foram realizados em duplicata e as curvas relativas às médias dos dados obtidos estão no gráfico da figura 47.



**Figura 47:** Curvas de potência térmica *versus* tempo da respiração de *C. violaceum*. Experimentos realizados com  $0,90 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de alíquota de cultura bacteriana em  $15,0 \times 10^{-3} \text{ dm}^3$  de meio reacional (solução tampão A) sem m-metoxifenol (controle) e contendo m-metoxifenol nas concentrações: 9,20, 19,5 e 36,8  $\text{mmol dm}^{-3}$ .

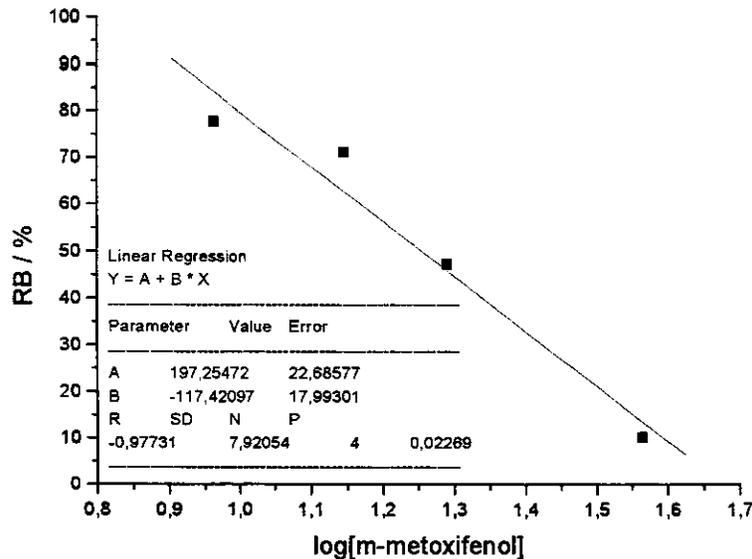
O m-metoxifenol apresentou, neste experimento, um efeito inibitório semelhante ao observado na figura 45. A tabela 8 mostra os valores percentuais obtidos nesta etapa do trabalho referentes ao efeito do m-metoxifenol (em relação ao controle) sobre a respiração da bactéria.

**Tabela 8:** Valores percentuais relativos à resposta biológica (RB) obtidos nos experimentos sobre o efeito de m-metoxifenol (met) sobre a respiração de *C. violaceum*.

met / $\text{mmol dm}^{-3}$	% RB*
9,20	$77,6 \pm 0,2$
14,0	$71,1 \pm 0,3$
19,5	$47,1 \pm 0,6$
36,8	$10,1 \pm 0,4$

\* dados obtidos em duplicata

Uma correlação linear entre a concentração de m-metoxifenol utilizada e a resposta biológica pode ser claramente observada na figura 48. O gráfico log [m-metoxifenol] x RB foi obtido com os dados da tabela 8 e o coeficiente de correlação foi  $R = 0,97731$  (figura 48).



**Figura 48:** Correlação entre o logaritmo das concentrações do m-metoxifenol (em  $\text{mmol dm}^{-3}$ ) e a resposta biológica do processo respiratório da *C. violaceum*.

Os experimentos microcalorimétricos de padronização e de avaliação do efeito do m-metoxifenol sobre a respiração da *C. violaceum*, apresentaram resultados satisfatórios. Foi, então, possível dar continuidade a este estudo, utilizando os outros desacopladores.

As medidas preliminares de TOD utilizando m-metoxifenol foram feitas em aparato experimental separado do sistema microcalorimétrico. Devido às características intrínsecas do sistema de medida de TOD disponível, não era possível adaptá-lo à linha de fluxo do microcalorímetro. Para que os dados de consumo de oxigênio durante a respiração da *C. violaceum* pudessem ser comparados com os resultados dos experimentos calorimétricos futuros, foram utilizadas exatamente as mesmas condições experimentais.

No primeiro experimento, em que foi usada uma alíquota de cultura de *C. violaceum* previamente descongelada, a bactéria apresentou um consumo de 6,90 % O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> e a queda da porcentagem de oxigênio para cerca de 0,00 % ocorreu em apenas 14 min. Quando a solução tampão foi saturada novamente com ar, houve um consumo semelhante, em torno de 5,70 % O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>. Este resultado mostra que a bactéria consumiu o oxigênio presente no meio e, quando se adicionou mais oxigênio, a população microbiana se mostrou ainda viável.

O experimento utilizando uma alíquota de cultura violeta retirada do reator foi totalmente exploratório pois, não se tinha idéia da população existente. No entanto, a taxa de consumo de O<sub>2</sub> forneceu um dado interessante, 2,20 % O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>. Este resultado mostrou que, a cultura de *C. violaceum* após 24 h possui metabólitos suficientemente tóxicos para reduzir o grau de viabilidade da bactéria. Em tais condições, a bactéria gastou cerca de 45 min para consumir pequena porcentagem de oxigênio do meio.

No experimento com metoxifenol a 19,5 mmol dm<sup>-3</sup>, a taxa de consumo de oxigênio caiu para 0,90 % O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>, em média. Os dois experimentos realizados com metoxifenol mostraram resultados muito próximos. Neste caso, a respiração da bactéria foi consideravelmente inibida pois, após 50 min, a bactéria apresentou baixa viabilidade para continuar um consumo significativo de oxigênio.

Os dados da tabela 9 mostram os resultados dos experimentos de medida da TOD durante a respiração da bactéria, expressos em % O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>.

**Tabela 9:** Resumo dos resultados das medidas de TOD durante a respiração da *C. violaceum*.

Experimento	TOD / % O <sub>2</sub> min <sup>-1</sup>
Cultura previamente descongelada (A)	6,90
(A) após nova saturação com ar	5,70
Alíquota de cultura violeta de 24h	2,20
Cultura sob metoxifenol 19,5 mmol dm <sup>-3</sup> *	0,80
Cultura sob metoxifenol 19,5 mmol dm <sup>-3</sup> *	1,00

\* duplicata

Para que as medidas de TOD pudessem ser efetuadas em conjunto com os experimentos calorimétricos de respiração da *C. violaceum*, foi adquirido um medidor portátil de oxigênio Orion, modelo 810.

Após a fase de confecção do aparato utilizado para a medida da TOD (figura 6, parte experimental) conectado ao sistema de fluxo, foram realizados ensaios variando-se a posição do eletrodo (horizontal ou vertical). Mediu-se o efeito térmico e a TOD relativos à respiração da bactéria (medidas controle) e os valores de TOD mostraram que não há diferença entre as duas disposições e os dados foram reprodutíveis.

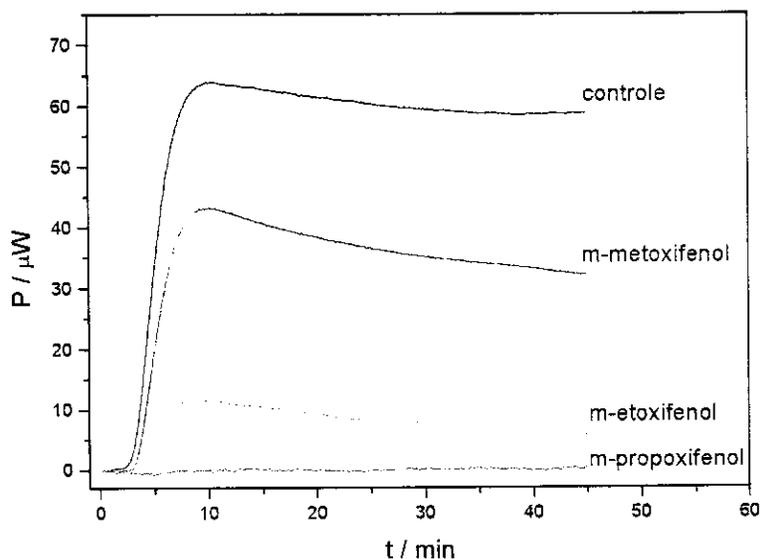
Os experimentos subsequentes, referentes ao consumo de oxigênio durante a respiração da *C. violaceum*, foram realizados com os outros compostos da série homóloga de m-alcoxifenóis na concentração de  $3,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ .

#### **4.4.2. Efeito do aumento da cadeia lateral dos m-alcoxifenóis sobre a respiração da *C. violaceum***

Dando continuidade ao trabalho, optou-se por utilizar os compostos da série homóloga de m-alcoxifenóis em uma única concentração com o objetivo de avaliar do efeito do aumento do tamanho da cadeia lateral sobre a inibição da respiração da *C. violaceum*.

Devido à baixa solubilidade em água dos m-alcoxifenóis de cadeia maior, foi necessário utilizar acetona no preparo das soluções estoque destes compostos. Foram realizados experimentos de resposta biológica controle (meio contendo tampão e acetona) para avaliar o efeito da acetona sobre a bactéria. Verificou-se que o meio reacional poderia conter no máximo 5,00 % de acetona. A partir desta informação, decidiu-se preparar as soluções estoque numa concentração alta dos fenóis, utilizando acetona pura como solvente. As soluções estoque de todos os compostos foram preparadas em acetona para garantir a reprodutibilidade dos resultados.

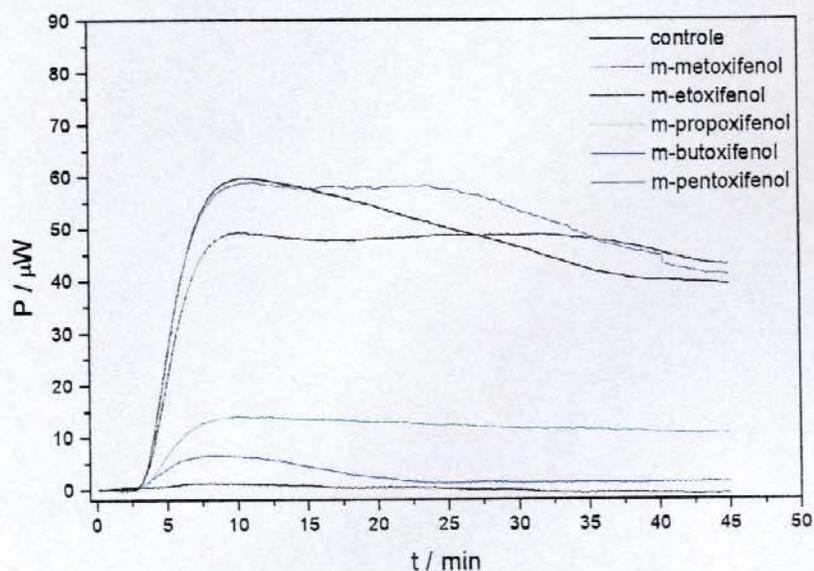
Os experimentos desta etapa da investigação foram iniciados utilizando-se os compostos da série de m-alcoxifenóis todos na concentração de  $14,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Os resultados estão indicados na figura 49.



**Figura 49:** Curvas de potência térmica *versus* tempo da respiração de *C. violaceum*. Solução tampão sem m-alcoxifenol (controle) e contendo os m-alcoxifenóis na concentração de  $14,0 \text{ mmol dm}^{-3}$  e 1,80 % de acetona.

Observa-se na figura 49 que o desacoplador m-propoxifenol foi tóxico a ponto de reduzir drasticamente o efeito térmico, atingindo praticamente o zero da escala utilizada.

Considerando o fato de que os m-alcoxifenóis de cadeia maior seriam ainda mais tóxicos na concentração de  $14,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ , decidiu-se fazer medidas calorimétricas utilizando os desacopladores na concentração de  $3,00 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Desta forma seria possível comparar o efeito térmico da respiração da bactéria frente a todos os compostos da série homóloga. Os resultados estão indicados nas curvas da figura 50.



**Figura 50:** Curvas de potência térmica *versus* tempo da respiração de *C. violaceum*. Solução tampão sem m-alcoxifenol (controle) e contendo m-alcoxifenóis na concentração de  $3,00 \text{ mmol dm}^{-3}$  e 5 % de acetona.

Nas condições utilizadas, o m-pentoxifenol e o m-butoxifenol mostraram-se significativamente mais tóxicos que os outros compostos da série. A bactéria praticamente não apresentou efeito térmico relativo ao processo de respiração, em solução contendo m-pentoxifenol  $3,00 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Já o m-metoxifenol mostrou-se pouco tóxico nestas condições, apresentando efeito térmico semelhante ao do controle.

Na tabela 10, estão descritos os valores percentuais, em duplicata (em relação ao controle) das respostas calorimétricas máximas, correspondentes à respiração da bactéria na presença dos m-alcoxifenóis.

A inibição do processo respiratório (100 - resposta biológica) variou consideravelmente em função do aumento da cadeia lateral do m-alcoxifenol nas duas concentrações utilizadas. Observou-se que o efeito sobre a respiração de *C. violaceum* seguiu, como esperado, a seguinte ordem decrescente de toxicidade: m-pentoxifenol > m-butoxifenol > m-propoxifenol > m-etoxifenol > m-metoxifenol. Como a respiração bacteriana está relacionada com a função da membrana

bacteriana, quanto maior a penetração do m-alcoxifenol (devido ao aumento da cadeia lateral hidrofóbica) na célula, maior o efeito tóxico sobre o microrganismo (Volpe, 1997a).

Todos os resultados verificados neste trabalho confirmaram a hipótese de que os m-alcoxifenóis agem também como inibidores do processo respiratório da *C. violaceum*, pois não há dados na literatura relatando o efeito desses compostos sobre a bactéria em questão. Esse efeito foi observado anteriormente em estudos microcalorimétricos do efeito da série homóloga de m-alcoxifenóis sobre a bactéria *Escherichia coli* Volpe (1997a) e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Pereira e col., 1998). A comparação entre os resultados obtidos por Volpe (1997a) com os deste trabalho, mostrou que a bactéria *C. violaceum* foi cerca de três vezes mais sensível que a *E. coli* quando exposta aos mesmos desacopladores.

**Tabela 10:** Valores percentuais da resposta biológica (RB) obtidos na avaliação do efeito da variação do tamanho da cadeia lateral de m-alcoxifenóis (em duas concentrações) sobre a respiração de *C. violaceum*.

m-alcoxifenol	% RB	
	3,00 mmol dm <sup>-3</sup>	14,0 mmol dm <sup>-3</sup>
metoxi	97,5	71,1
etoxi	81,5	17,3
propoxi	23,6	0,39
butoxi	11,2	-
pentoxi	2,15	-

\*medidas em duplicata

Os resultados das medidas simultâneas de efeito térmico e de TOD, relativas à exposição da *C. violaceum* aos compostos desacopladores (concentração de 3,0 mmol dm<sup>-3</sup>) estão apresentados na figura 51.

Observa-se uma tendência de diminuição no consumo bacteriano de oxigênio à medida em que é testado um composto de cadeia mais longa. A perda da viabilidade celular causada pela presença de um composto tóxico faz com que haja menos consumo de oxigênio. Este resultado está em total concordância com os dados microcalorimétricos obtidos.

Os resultados do cálculo da taxa de consumo de oxigênio referentes à respiração da *C. violaceum*, na presença dos m-alcoxifenóis, estão na tabela 11. Observa-se que o valor da taxa de consumo de oxigênio é inversamente proporcional ao tamanho da cadeia lateral dos desacopladores utilizados. Este resultado mostra que nas condições utilizadas, a bactéria perdeu drasticamente a viabilidade celular sob efeito dos compostos de cadeia hidrofóbica maior (a partir do m-propoxifenol). Com isso, diminuiu a capacidade do microrganismo de consumir oxigênio, fazendo com que a TOD se tornasse praticamente constante no caso dos compostos m-butoxifenol e m-pentoxifenol (figura 51).

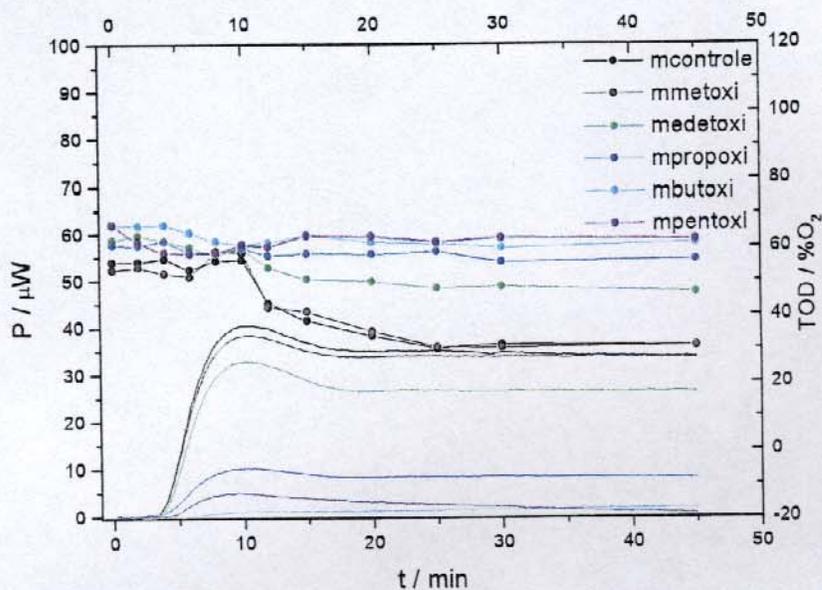
De acordo com os dados da tabela 11, as taxas de consumo de oxigênio obtidas nos experimentos com m-propoxifenol, m-butoxifenol e m-pentoxifenol são estatisticamente iguais pois, os valores estão dentro dos desvios obtidos. Este resultado pode ser observado, de uma forma mais evidente, no gráfico da figura 52.

**Tabela 11:** Valores relativos à taxa de consumo de oxigênio obtida durante a respiração da *C. violaceum*, na presença dos m-alcoxifenóis e no controle.

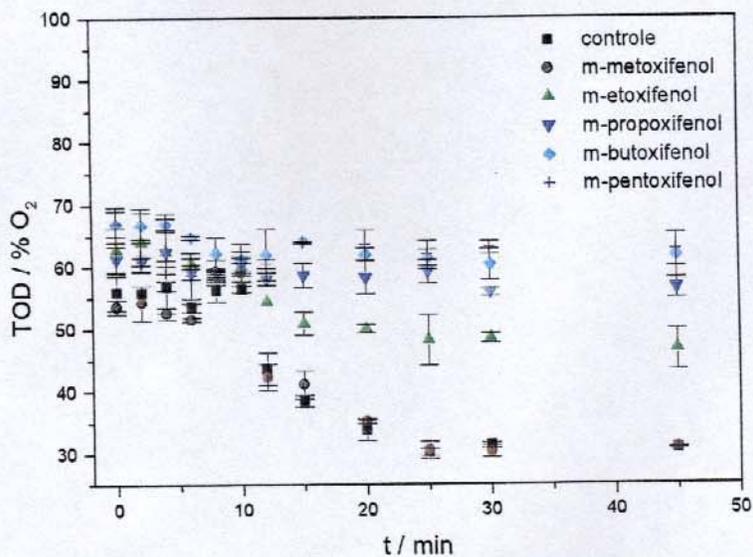
Experimento	Consumo de oxigênio / % O <sub>2</sub> min <sup>-1</sup>
Controle	1,00 ± 0,13
m-metoxifenol	0,95 ± 0,09
m-etoxifenol	0,43 ± 0,11
m-propoxifenol	0,12 ± 0,03
m-butoxifenol	0,16 ± 0,03
m-pentoxifenol	0,20 ± 0,08

Um dos efeitos biológicos esperados para um desacoplador é, num primeiro momento, promover a aceleração do processo respiratório, aumentando a taxa de consumo de oxigênio (White, 1995). No caso dos experimentos realizados, este comportamento não pode ser observado, provavelmente, devido às características do sistema de medida. A partir do momento em que se efetuava o inóculo da *C. violaceum*, se passavam cerca de 5 min até a chegada do microrganismo na cela de vidro com o eletrodo de oxigênio, o qual estava instalado no fim da linha de fluxo (vide figura 6, parte experimental). Portanto, é possível que o efeito supra citado

tenha ocorrido. Uma solução para este tipo de problema seria a alteração do arranjo experimental, colocando o eletrodo de O<sub>2</sub> logo após o micro reator.



**Figura 51:** Curvas de TOD e de potência térmica *versus* tempo relativas ao efeito do aumento da cadeia hidrofóbica de m-alcoixifenóis sobre a respiração de *C. violaceum*.



**Figura 52:** Medidas de TOD relativas ao estudo do efeito do aumento da cadeia hidrofóbica de m-alcoixifenóis sobre a respiração aeróbia de *C. violaceum*.

## 5. CONCLUSÕES

Foi possível estabelecer as condições experimentais para medida microcalorimétrica e para a determinação de carboidratos por CLAE com o objetivo de se investigar o metabolismo de açúcares pela *C. violaceum*. Apesar da variação na proporção de nutrientes nos experimentos, todas as curvas calorimétricas obtidas mostraram reprodutibilidade na ocorrência de um pico de efeito térmico em aproximadamente 9 h de experimento.

A quantidade total dos açúcares e a natureza dos mesmos exerce uma influência importante sobre a posição e a altura do primeiro pico das curvas calorimétricas obtidas. Além disso, a observação dos dados microcalorimétricos permite concluir que a magnitude do efeito térmico é reduzida pela presença de galactose, testada como segunda fonte de carbono em meio de cultura contendo glicose. Em termos energéticos, de acordo com os açúcares utilizados, a ordem crescente de produção de energia (referente ao pico em 9 h de experimento) é: galactose-glicose-lactose. Esta ordem foi observada tanto em meio contendo combinações de dois carboidratos quanto em meio de cultura contendo apenas um deles.

Em todos os casos em que se mediu a biomassa, o início da fase exponencial de crescimento da bactéria e da degradação de carboidrato ocorre ao mesmo tempo indicando que, provavelmente, os processos catabólicos e anabólicos estão acoplados. Os resultados obtidos sugerem que a bactéria não foi capaz de consumir a glicose e a galactose simultaneamente. A análise das curvas de efeito térmico, biomassa e consumo de carboidrato mostra que não foi detectada a ocorrência de crescimento diáuxico na *C. violaceum* nas condições utilizadas.

A respeito do estudo sobre a produção de violaceína, não foi possível observar um efeito térmico significativo relativo a este processo. No entanto, a utilização do indutor ABL e a avaliação dos parâmetros da cultura ( $O_2$ , pH,

biomassa e violaceína) podem auxiliar a eliminar dúvidas a respeito da interpretação dos dados microcalorimétricos.

Neste trabalho foram realizados com êxito diversos experimentos visando a padronização do sistema e o estabelecimento das condições necessárias para o estudo microcalorimétrico do efeito do tamanho da cadeia lateral dos m-alcoxifenóis, bem como da variação da concentração desses compostos sobre a respiração da *C. violaceum*. A maioria dos objetivos pretendidos para esta etapa foram alcançados. A execução de alguns experimentos sobre o consumo de oxigênio durante a medida microcalorimétrica foi importante para a confirmação do efeito inibitório dos alcoxifenóis sobre a respiração da bactéria.

A reprodutibilidade e a coerência dos sinais obtidos, em tempo real, tanto nos experimentos de padronização, como nos de avaliação do efeito dos m-alcoxifenóis sobre a respiração de mais um microrganismo, a *C. violaceum*, ressaltam a adequação da técnica microcalorimétrica ao estudo da atividade biológica de determinados compostos.

O aumento da cadeia lateral de m-alcoxifenóis promoveu um aumento do efeito inibitório do processo respiratório da bactéria *C. violaceum*. Este resultado foi confirmado pela diminuição na taxa de consumo de oxigênio observada na presença dos desacopladores de cadeia maior.

Os resultados obtidos mostraram que a *C. violaceum* é mais sensível aos m-alcoxifenóis que a bactéria *E. coli*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aoki, S.; Nomura, Y.; Mizutani, H.; Hashimoto, O.; Matsuoka, M. (1997). *Sein'i Gakkaishi*. **53**, 453.
- Aoki, S. e Nomura, T. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*. JP 10139612 A2 (CL. A01N063-02) 26 mai. 1998, JP Appl. 96-304984, 15 nov. 1996; 6pp.
- Aragón, V.; Bengoechea, J.A. (1994). Em: "Manual Practico de Microbiologia". Díaz, R; Gamazo, C.; López-Goñi, I. ed., Masson.
- Bäckman, P.; Wadsö, I. (1991). *J. Biochem. Biophys. Meth.* **23**, 283.
- Beezer, A. E. (1980). Em: "Biological Microcalorimetry". Academic Press, London.
- Beezer, A. E.; Volpe, P.L.O.; Miles, R.J.; Hunter, W.H. (1986a). *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **82**, 2929.
- Beezer, A.E.; Volpe, P.L.O.; Gooch, C.A.; Hunter, W.H.; Miles, R.J. (1986b). *Int. J. Pharm.* **29**, 237.
- Belaich, J. P. (1980). Em: "Biological Microcalorimetry". Beezer, A. E. ed., Academic Press, London.
- Blosser, R.S.; Gray, K.M. (2000). *J. Microbiol. Meth.* **40**, 47.
- Briggner, L.E.; Wadsö, I. (1991). *J. Biochem. Biophys. Meth.* **22**, 101.
- Caldas, L.R.; Leitão, A.A.C.; Santos, S. M.; Tyrrel, R.M. (1978). *Inter. Symp. Curr. Topics Radiol. Photobiol.* 121.
- Campbell, S.C.; Olson, G.J.; Clark, T.R.; McFeters, G. (2001). *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 134.
- Chen, A; Wädso, I., (1982) *J. Biochem. Biophys. Meth.* **6**, 297.
- Gillis, M.; De Ley, J. (1992). Em: Ballows, A. e col. "The Procaryotes". 2<sup>a</sup> ed. Springer-Verlag New York Inc., New York. **3**, 2591.
- De Moss, R.D.; Evans, N.R. (1959). *J. Bacteriol.* **78**, 583.
- De Moss, R.D. (1967). *Antibiotics*. **2**, 77.
- Durán, N.; Erazo, S.; Campos, V. (1983). *An. Acad. Bras. Ciênc.* **55**, 231.
- Durán, N.; Campos, V.; Riveros, R.; Joyas, A.; Pereira, M.F.; Haun, M. (1989). *An. Acad. Bras. Ciênc.* **61**, 31.
- Durán, N.; Melo, P.S.; Haun, M. (1996a). *XXV Reun. An. SBBq*, Caxambu, M.G.
- Durán, N.; Melo, P.S.; Haun, M. (1996b). *XI Reun. An. Fed. Soc. Biol.Exp. (FESBE)*, Caxambu, M.G.
- Durán, N.; Menck, C.F.M. (2001). *Critical Rew. Microb.* **27**(3), 201.
- Gillis, M.; De Ley, J. (1992). Em: Ballows, A. e col. "The Procaryotes". 2<sup>a</sup> ed. Springer-Verlag New York Inc., New York. **3**, p. 2591.
- Gourson, C.; Benhaddou, R.; Granet, R.; Krauz, P.; Verneuil, B.; Branland, P.; Chauvelon, G.; Thibault, J.F.; Saulnier, L. (1999). *J. Appl. Pol. Sci.* **74**, 3040.

- Greasham, R.L.; Herber, W.K. (1997). Em: "Applied Microbial Physiology - A Practical Approach". Rhodes, P.M. e Stanbury, P.F. ed . Oxford University Press, New York.
- Groussac, E.; Ortiz, M.; Francois, J. (2000). *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 715.
- Guan, Y.H.; Kemp, R.B. (2000) *Thermochim. Acta.* **349**, 163.
- Guide to Aminex HPLC Columns, Bio Rad.
- Gustafsson, L. (1991) *Therm. Acta.* **193**, 145.
- Hoshino, T.; Kondo, T.; Uchiyama, T.; Ogasawara, N. (1987a). *Agric. Biol. Chem.* **51**, 965.
- Hoshino, T.; Takano, T.; Hori, S.; Ogasawara, N. (1987b). *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2733.
- Hoshino, T.; Kojima, Y.; Takano, T.; Uchiyama, T. (1992). Em: "Frontiers and New Horizons in Amino Acid Research". Takai, K. (ed.), Elsevier, Amsterdam. p. 379.
- Hoshino, T.; Hayashi, T.; Uchiyama, T. (1994). *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 279.
- Hoshino, T.; Kimura, K.; Takahashi, H.; Uchiyama, T.; Yoshihama, M. *Eur. Pat. Appl.* EP 612,742 (CL. C07D403114), 31 ago. 1994, JP Appl. 93/56,510, 22 fev. 1993; 12pp.
- James, A.M. (1987). Em: "The Thermal and Energetic Studies of Cellular Biological Systems". Wright, Bristol.
- Kirsop, B.E.; Snell, J.J. (1984). Em: "Maintenance of Microorganisms". Academic Press, New York.
- Kolibachuk, D.; Miller, A.; Dennis, D. (1999). *Appl. Environm. Microbiol.* **65**, 3561.
- Lamprecht, I. (1980). Em: "Biological Microcalorimetry". Beezer, A. (ed.), Academic Press, London., 41.
- Lendenmann, U.; Snozzi, M.; Egli, T. (1996). *Appl. Environ. Microb.* **62**, 1493.
- Lichstein, H.C.; Van de Sand, V.F. (1945). *J. Infec. Dis.* **76**, 47.
- Marko-Varga, G.; Buttler, T.; Gorton, L.; Olsson, L.; Durand, G.; Barceló, D. J., (1994). *Chromatogr.A* **665**, 317.
- May, G.; Brümmer, B.; Ott, H. *Ger. Offen.* DE 3,935,066 (CL. C12P17/16). 25 abr. 1991, Appl. 20 out. 1989; 5p.
- McClean, K.H.; Winson, M.K.; Fish, L.; Taylor, A.; Chhabra, S.R.; Camara, M.; Daykin, M.; Lamb, J.H.; Swift, S.; Bycroft, B.W.; Stewart, G.S.A.B.; Williams, P. (1997). *Microbiol.* **143**, 3703.
- Midani, S.; Rathore, M. (1998). *Southern Med. J.* **91**, 464.
- Moat, A.G.; Foster, J.W.(1988). Em: "Microbial Physiology". John Wiley and Sons, Singapore.
- Monk, P.R. (1978a). *Process Biochem.* **13**, 4.
- Monk, P.R. (1978b). *J. Bacteriol.* **135**, 373.
- Monk, P.R. (1979). *J. Dairy Res.* **46**, 485.

- Paustian, T. (2001). Em: "On-line Microbiology Textbook". Frontier and Web Warrior. University of Wisconsin, Madison.  
(<http://www.bact.wisc.edu/microtextbook/index.html>).
- Pereira, S.R.; Matheus, A.; Volpe, P.L.O. (1998). *J. Ferm. Bioeng.* **85**, 302.
- Petrillo, V.F.; Severo, V.; Santos, M.M.; Edelweiss, E.L. (1984). *J. Infect.* **9**, 167.
- Purves, W.K, Sadava D., Orians, G.H., Heller, H.C (1997). Em: "LIFE: The Science of Biology". 5<sup>a</sup> ed. Sinauer Associates e WH Freeman, Washington.
- Ravn, L.; Christensen, A.B.; Molin, S.; Givskov, M.; Gram, L. (2001). *J. Microbiol. Meth.* **44**, 239.
- Rettori, D; Volpe, P.L.O. (2000) *Quim. Nova.* **23**, 257.
- Rettori, D. (2000). Em: "Estudos Físico-Químicos e Biológicos da violaceína: Um pigmento Produzido pela *Chromobacterium violaceum*". Tese de Doutorado, Instituto de Química, UNICAMP.
- Riveros, R.; Haun, M.; Campos, V.; Durán, N. (1988). *Arq. Biol. Tecnol.* **31**, 475.
- Schaarschmidt, B.; Lamprecht, I. (1977). *Rad. Environm. Biophys.* **14**, 153.
- Schaarschmidt, B.; Lamprecht, I. (1978). *Thermochim. Acta.* **22**, 333.
- Shirata, A.; Tsukamoto, T.; Kato, H.; Hata, T.; Yasui, T.; Kojima, A. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho.* JP 10113169 A2 (CL. C12N001-20) 6 mai. 1998, JP Appl. 96-268452, 9 out. 1996; 6 pp.
- Singh, B.N. (1942). *Nature.* **149**, 168.
- Singh, B.N. (1945). *Br. J. Exp. Pathol.* **26**, 316.
- Sneath, P.H.A. (1974). Em: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". 8<sup>a</sup> ed. Buchanan, R.E.; Gibbons, N.E.ed. Williams and Wilkins, Baltimore. p. 354.
- Sneath, P.H.A. (1984). Em: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". Krieg, N.R.; Holt, J.G. Williams and Wilkins, Baltimore. vol.1, p. 580.
- Volpe, P.L.O. (1993). *Quim. Nova.* **16**, 49.
- Volpe, P.L.O. (1997a). *J. Braz. Chem. Soc.* **8**, 343.
- Volpe, P.L.O. (1997b). *Quim. Nova.* **20**, 528.
- Wadsö, I. (1987). Em: "Thermal and Energetic Studies of Cellular Biological Systems". James, A.M.ed., Wright, Bristol.
- Wadsö, I. (1988). Em: "Biochemical Thermodynamics (Studies in Modern Thermodynamics: 8). Jones, M.N. ed., Amsterdam., 241.
- Wadsö, I. (1997). *Chem. Soc. Rev.* 79.
- Wadsö, I.; Goldberg, R.N. (2001). *Pure Appl. Chem.* **73**, 1625.
- White, David (1995). Em: "The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes". Oxford University Press, New York, 44, 319.
- Willson, R.J.; Beezer, A.E.; Hills, A.K.; Mitchell, J.C. (1999). *Thermochim. Acta.* **325**, 125.