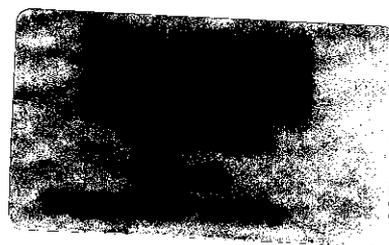


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
LABORATÓRIO DE QUÍMICA BIOLÓGICA



Dissertação de Mestrado

BIOTRANSFORMAÇÃO DA VIOLACEÍNA

Natália Bromberg

Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

Março - 2000



UNIDADE I Ch
N.º CHAMADA:
I/Unicamp
B787b
V. _____ Ex. _____
TOMBO BC/ 43600
PROC. 16-392/01
C D
PREÇO R\$ 11,00
DATA 06/02/10
N.º CPD _____

CM-00154319-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP

B787b

Bromberg, Natália
Biotransformação da violaceína / Natália Bromberg. –
Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientador: Nelson Eduardo Durán Caballero.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. Bioconversão. 2. *Chromobacterium violaceum*.
3. Enzimas. 4. Microrganismos. I. Durán Caballero,
Nelson Eduardo. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Aos meus pais, Nazareth e Sansom,

Às minhas irmãs, Carla e Patrícia,

Eu queria oferecer-lhes uns versos lindos...

No entanto, trago-lhes minhas mãos vazias,

Mas que lentamente, deram forma a esse trabalho.

Com amor, carinho e admiração.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Nelson Durán pela orientação dessa dissertação, pela liberdade e confiança na realização dos experimentos, mas principalmente, por sua integridade, senso humanístico e exemplo de dedicação à ciência.

Ao Chico, figura imprescindível no Laboratório de Química Biológica, pela sua ajuda, companheirismo e dedicação.

Aos colegas do Laboratório de Química Biológica: Airton, Ana Laura, Ana Olívia, Carlos, Daniel, Dárcio, Denise, Fernando, João Fernando, Lívia, Mariângela Burgos, Mariângela Santiago, Pedro, Raquel, Renato, Rodrigo, Rosana e Sandrinha, pelos palpites, explicações, sugestões, brincadeiras, bate-papos e bocas que tanto contribuíram para o desenvolvimento e finalização desse trabalho.

Às minhas queridas amigas Gugui, Denise, Keren, Mirela, Silvia L. e Silvia G. por tantos anos de "aturação" e convívio compartilhados e únicos.

À minha amiga e companheira Laura por nossos 8 e inesquecíveis anos de vida sob o mesmo teto em Campinas.

À Sandrinha e ao Carlos pelo companheirismo e realização dos testes de toxicidade aguda.

À Patrícia Melo e ao Neto do Laboratório de Cultura de Células - IB/UNICAMP pela disponibilidade, orientação e grande auxílio na realização dos testes de citotoxicidade.

À Silvana, Buba e Rinaldo, colegas do Laboratório I-200, pela sempre agradável convivência e colaboração.

Ao Instituto de Química e seus funcionários pelo apoio técnico e material.

À FAPESP pelo apoio financeiro e assessoria concedidos durante a realização desse trabalho.

"...Lembrei-me de uma manhã em que encontrei um casulo preso à casca de uma árvore, no momento em que a borboleta rompia o invólucro e preparava-se para sair. Esperei algum tempo, mas estava com pressa e ela demorava muito.

Enervado, debrucei-me e comecei a esquentá-lo com meu sopro. Eu o esquentava, impaciente, e o milagre começou a desfiar diante de mim em ritmo mais rápido que o natural. Abriu-se o invólucro e a borboleta saiu arrastando-se. Não esquecerei jamais o horror que senti então: suas asas ainda não haviam se formado, e com todo o seu pequeno corpo trêmulo, ela se esforçava para desdobrá-las.

Debruçado sobre ela, eu a ajudava com meu sopro. Em vão. Era necessário um paciente amadurecimento, e o crescimento das asas devia ser feito lentamente ao sol. Agora era tarde demais. Meu sopro obrigara a borboleta a se mostrar toda enrugada antes do tempo. Ela se agitou desesperada, e alguns segundos depois morreu na palma da minha mão.

Creio que aquele pequeno cadáver é o maior peso que tenho na consciência pois, compreendo atualmente, é um pecado mortal violar as leis da natureza. Não devemos apressarmo-nos, nem impacientarmo-nos, mas seguir com confiança o ritmo eterno."

Nikos Kazantzakis (Zorba, o grego)

RESUMO

O composto 3-[1,2-dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona, conhecido como violaceína, é o principal pigmento produzido pela bactéria *Chromobacterium violaceum* (CCT 3496). Este pigmento violeta apresenta diversas atividades biológicas como antibiótica, antitumoral, antichagásica, antimicobacteriana e antioxidante, além de apresentar citotoxicidade para células de mamíferos. Pela modificação estrutural da molécula e suas implicações nas atividades biológicas e toxicidade, propôs-se a biotransformação da violaceína utilizando dois procedimentos diferenciados: tratamento da substância diretamente com enzimas e tratamento com células inteiras (microrganismos). A seguinte ordem cinética foi obtida para as biotransformações com as enzimas: Lignina peroxidase / Manganês peroxidase < Lacase-mediador (HBT) < Lacase < Peroxidase de raiz forte < Lactoperoxidase. Nos procedimentos utilizando os microrganismos *Trametes versicolor* (CCT 4521), *Trametes villosa* (CCT 5567), *Lentinus edodes* (CCT 4519), *Azotobacter vinelandii* (ESALQ 1228), *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 24725) e *Pseudomonas putida* (CCT 0548) observou-se uma maior rapidez nas biotransformações realizadas em meio de cultura líquido. Após a seleção de uma única biotransformação, isolou-se o produto obtido da reação com a enzima Peroxidase de raiz forte caracterizando-o por técnicas espectroscópicas corriqueiras (EM, RMN ¹H, RMN ¹³C, IV, UV-Vis., CLAE). Os resultados dos testes de toxicidade revelaram um caráter menos citotóxico para o novo produto quando comparado à violaceína.

Palavras-chaves: violaceína, biotransformação, enzimas, microrganismos, *Chromobacterium violaceum*.

ABSTRACT

3-[1,2-dihydro-5-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)-2-oxo-3H-pyrrol-3-ylidene]-1,3-dihydro-2H-indol-2-one compound known as violacein, it is the main pigment produced by the bacteria *Chromobacterium violaceum* (CCT 3496). This violet pigment presents several biological activities as antibiotic, antitumoral, antichagasic, antimycobacterial and antioxidant, besides it presents cytotoxicity on mammals' cells. Through structural modification of the molecule and its implications on the biological activities and toxicity, two strategies to violacein biotransformation were proposed: the use of pure or partially purified commercial enzymes and the use of whole cells (microorganisms). The kinetics observed for the biotransformations using enzymes were: Lignin Peroxidase / Manganese Peroxidase < Laccase-mediator (HBT) < Laccase < Horseradish peroxidase < Lactoperoxidase. In the treatment with whole cells using *Trametes versicolor* (CCT 4521), *Trametes villosa* (CCT 5567), *Lentinus edodes* (CCT 4519), *Azotobacter vinelandii* (ESALQ 1228), *Phanerochaete chrysosporium* (ATCC 24725) and *Pseudomonas putida* (CCT 0548 T) was observed that biotransformations in liquid medium were faster than in solid medium. The product which was obtained from the reaction with HRP-VI was isolated and characterized by current spectroscopic techniques (ME, NMR ¹H, NMR ¹³C, IR, UV-Vis., HPLC). Cytotoxicity tests with the new product showed a lower toxic effect in mammals cells than violacein values.

Keywords: violacein, biotransformation, enzymes, microorganisms, *Chromobacterium violaceum*.

CURRICULUM VITAE

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Graduação

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

-Bacharelado em Química Tecnológica

Concluído em: agosto/1995

-Bacharelado em Química

Concluído em: dezembro/1996

-Licenciatura em Química

Concluído em: dezembro/1997

Pós-graduação

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Mestrado:

Projeto: Biotransformação da Violaceína

Departamento de Físico-Química - Lab. de Química Biológica

Orientador: Nelson Eduardo Durán Caballero

Período: Agosto/1997 - Março/2000

PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS

- Congressos Nacionais:

- Primeira Reunião de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente
UNICAMP - Campinas - São Paulo
Período: 16, 17 e 18 de agosto de 1996.
- Workshop "Educação Ambiental e reciclagem de lixo"
São Paulo - S.P.
Período: 21 de setembro de 1996.
- Workshop sobre Biodegradação
Campinas - S.P.
Período: 14, 15 e 16 de outubro de 1996.
- Bromberg, N. and Durán, N.; "Violacein transformation by peroxidases and laccase"; - XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq ; Caxambu-MG; 22 - 25 de maio; Abstr. K-73; 1999.
- Bromberg, N. and Durán, N.; "Descoloração da violaceína pelos fungos *Trametes versicolor*, *Trametes villosa* e *Lentinus edodes* em meio sólido"; - XX Congresso Brasileiro de Microbiologia ; Salvador-BA; 24 - 28 de outubro ; Abstr. MI-042; 1999.

- Congressos Internacionais:

- Bromberg, N. e Durán, N.; "Violacein transformation by peroxidases and oxidases: Implications on its biological properties";- Biotrans' 99 - Giardini Naxos (Taormina) Italia - 26 Setembro - 1º Outubro; Abstrc. P3000; 1999.

- Cursos:

- "Métodos para a avaliação da interação de bactérias com células eucarióticas *in vitro*"; XX Congresso Brasileiro de Microbiologia ; Salvador-BA; 24 - 28 de outubro ; 1999.
- "Curso para Coordenador de Gestão Ambiental" - AFAM Tech. - São Paulo - S.P.; 1999.

PUBLICAÇÕES

- Durán, N.; Bromberg, N. e Kunz, A.; "Biotransformation of veratryl alcohol by peroxidase"; - J. Inorg. Biochem. - Submetido (2000).
- Bromberg, N. e Durán, N.; "Violacein transformation by peroxidases and oxidases: Implications on its biological properties"; J. Molec. Catal. B: Enz.; No prelo (2000).

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

- **UNICAMP - Instituto de Química**

Monitoria em Química Geral

Período: 1993 - 1994 - 1995

- **CSN (Companhia Siderúrgica Nacional)**

Projeto para Tratamento de Resíduos Industriais

Período: agosto/1994 - dezembro/1994

- **TELEBRÁS - Depto. de Pesquisa e Desenvolvimento**

Projeto para Determinação de Tintas sobre Substratos Plásticos

Período: julho/1994 - novembro/1994

- **TST - Isolantes térmicos e refratários Ltda.**

Estágio: Área Controle de qualidade - Processo de certificação ISO 9000

Período: fevereiro/1996 - julho/1996

- **Unicamp - Instituto de Química**

Estágio: Tratamento de Resíduos Químicos, Biológicos e Radioativos

(Participação na Comissão de Resíduos da Unicamp)

Período: abril/1996 - dezembro/1996

- **Quest International - Gessy Lever**

Estágio: Área de produção

Período: fevereiro/1997 - julho/1997

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Estrutura molecular da violaceína - 3-[1,2 dihidro-5(3,5-dihidroxi-1H-indol-3-il)-2-pirrol-4-ilideno]1,3 dihidro-2H-indol-2-ona.....	4
Figura 02: Estrutura molecular do L-triptofano.....	6
Figura 03: Condensação de duas moléculas de L-triptofano.....	6
Figura 04: Ciclo catalítico das peroxidases clássicas.....	20
Figura 05: Estrutura química do HBT e do ABTS.....	23
Figura 06: Cromatograma da amostra de violaceína em etanol.....	57
Figura 07: Espectro de UV-Vis. da amostra de violaceína em etanol.....	58
Figura 08: Ressonância do cromóforo merocianínico existente na molécula de violaceína.....	58
Figura 09: Espectro na região IV da amostra de violaceína em pastilha de KBr.....	59
Figura 10: Espectro de RMN ¹ H da amostra de violaceína em DMSO-d ₆	60
Figura 11: Representação de contorno do espectro ¹ H-COSY de amostra de violaceína em DMSO-d ₆	61
Figura 12: Espectro de RMN ¹³ C da amostra de violaceína em DMSO-d ₆	62
Figura 13: Espectro de massa da amostra de extrato bruto de violaceína.....	63
Figura 14: Espectro UV-Vis. da violaceína 250 µmol.L ⁻¹ em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L ⁻¹ (-A-); após adição HRP-VI 2 µmol.L ⁻¹ (-B-); após adição de H ₂ O ₂ 4 µmol.L ⁻¹ (-C-) e após 30 minutos de reação (-D-).....	68
Figura 15: Cinética do espectro UV-Vis. da variação na intensidade de absorção da violaceína a 558 nm durante tratamento com HRP-VI (tampão fosfato de sódio 50 mmol.L ⁻¹ , pH 7,6) em vários intervalos.....	69
Figura 16: Cinética do espectro UV-Vis. da variação na intensidade de absorção da violaceína a 558 nm durante tratamento com LPO (tampão fosfato de sódio 50 mmol.L ⁻¹ , pH 7,6) em vários intervalos.....	70

Figura 17: Cinética do espectro UV-Vis. da variação na intensidade de absorção da violaceína a 558 nm durante tratamento com Lac sem a adição do HBT (tampão acetato de sódio 50 mmol.L ⁻¹ , pH 5,0) em vários intervalos.....	71
Figura 18: Cinética do espectro UV-Vis. da variação na intensidade de absorção da violaceína a 558 nm durante tratamento com Lac com a adição do HBT (tampão acetato de sódio 50 mmol.L ⁻¹ , pH 5,0) em vários intervalos.....	72
Figura 19: Cinética do espectro UV-Vis. da variação na intensidade de absorção da violaceína a 558 nm durante tratamento com o "pool" enzimático LiP/MnP (tampão fosfato de sódio 50 mmol.L ⁻¹ , pH 7,6) em vários intervalos.....	73
Figura 20: Cromatograma da amostra do produto de transformação do 5-hidroxiindol com a enzima HRP-VI (em etanol).....	76
Figura 21: Cromatograma da amostra do produto de transformação da violaceína com a enzima HRP-VI (em etanol).....	76
Figura 22: Espectro UV-Vis. do 5-hidroxiindol 250 µmol.L ⁻¹ em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L ⁻¹ pH 7,6 (-A-); após a adição HRP-VI de 2 µmol.L ⁻¹ (-B-) e após adição de H ₂ O ₂ 4µmol.L ⁻¹ (-C-).....	77
Figura 23: Espectro UV-Vis. do produto de reação da violaceína com a enzima HRP-VI em etanol.....	78
Figura 24: Espectro de IV da amostra do produto de transformação da violaceína com a enzima HRP-VI (filme em CH ₂ Cl ₂).....	79
Figura 25: Espectro de massa de amostra do produto de reação da violaceína com a enzima HRP-VI.....	80
Figura 26: Estrutura proposta para o produto de reação obtido pela biotransformação da violaceína com a enzima HRP-VI: 3-[1,2 dihidro-5(3,5-dihidroxi-1H-indol-3-il)-2-azetina-4-ilideno]1,3 dihidro-2H-indol-2-ona.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Algumas vantagens e desvantagens da utilização de sistemas com células inteiras ou enzimas isoladas.....	14
Tabela 02: Composição do tampão tartarato 0,04 mol.L ⁻¹ pH 4,5 empregado na formulação do meio de cultura sintético usado para o crescimento do fungo <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	39
Tabela 03: Composição da solução de elementos traço empregada na formulação do meio de cultura sintético usado para o crescimento do fungo <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	40
Tabela 04: Composição da solução de vitaminas empregada na formulação do meio de cultura sintético usado para o crescimento do fungo <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	41
Tabela 05: Composição do meio de cultura necessário para o crescimento da bactéria <i>Escherichia coli</i>	47
Tabela 06: Composição do meio de manutenção utilizado para o crescimento da bactéria <i>Azotobacter vinelandii</i>	49
Tabela 07: Composição do meio de cultura líquido utilizado no experimento de biotransformação da violaceína pelos fungos <i>Trametes versicolor</i> , <i>Lentinus edodes</i> , <i>Trametes villosa</i> e <i>Phanerochaete chrysosporium</i> e as bactérias <i>Azotobacter vinelandii</i> e <i>Pseudomonas putida</i>	52
Tabela 08: Valores de RMN ¹ H da violaceína em DMSO-d ₆	60
Tabela 09: Valores de RMN ¹³ C da violaceína em DMSO-d ₆	62
Tabela 10: Parâmetros cinéticos obtidos nas reações da solução de violaceína com as enzimas HRP-VI, LPO, Lac e LiP/MnP.....	73
Tabela 11: Valores de IC ₁₀ obtidos para a violaceína e seu produto biotransformado pela enzima HRP-VI utilizando três ensaios diferentes.....	87
Tabela 12: Determinações das atividades enzimáticas e presença de sideróforos para amostras obtidas na descoloração da violaceína em meio sólido pelos microrganismos <i>Lentinus edodes</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Trametes villosa</i> e <i>Pseudomonas putida</i>	92

Tabela 13: Valores obtidos para as determinações das atividades enzimáticas e presença de sideróforos das amostras do 3º dia de experimento de descoloração da violaceína pelos microrganismos em meio líquido..... 94

Tabela 14: Valores obtidos para as determinações das atividades enzimáticas e presença de sideróforos das amostras referentes à descoloração completa da violaceína pelos microrganismos em meio líquido..... 96

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01: Reação típica da lacase, oxidação da hidroquinona.....	22
Esquema 02: Fragmentação da violaceína para obtenção do fragmento m/z 133.....	63
Esquema 03: Principais fragmentos obtidos do produto de reação obtido pela biotransformação da violaceína com a enzima HRP-VI.....	82
Esquema 04: Suposto mecanismo enzimático responsável pela hidroxilação do grupo indólico da violaceína.....	83
Esquema 05: Suposto mecanismo enzimático responsável pela modificação do grupo pirrolidona da violaceína.....	84

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01: Curva de calibração da glicose.....	42
Gráfico 02: Curva de calibração de CO ₂	48
Gráfico 03: Curvas obtidas pelas reações de biotransformação da violaceína com as enzimas HRP-VI, LPO, Lac (com e sem a adição de HBT) e LiP/MnP.....	74
Gráfico 04: Ensaios citotóxicos realizados com a violaceína biotransformada.....	85
Gráfico 05: Ensaios citotóxicos realizados com a violaceína.....	86
Gráfico 06: Descoloração da violaceína em meio sólido pelos microrganismos <i>Lentinus edodes</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Trametes villosa</i> e <i>Pseudomonas putida</i>	91
Gráfico 07: Descoloração da violaceína em meio líquido pelos microrganismos <i>Lentinus edodes</i> , <i>Trametes versicolor</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , <i>Trametes villosa</i> e <i>Pseudomonas putida</i>	95
Gráfico 08: Estudo de adsorção da violaceína nos "pellets" dos microrganismos <i>Lentinus edodes</i> , <i>Trametes versicolor</i> e <i>Trametes villosa</i>	98
Gráfico 09: Estudo de adsorção da violaceína nos "pellets" dos microrganismos <i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Phanerochaete chrysosporium</i> e <i>Pseudomonas putida</i>	99

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABTS:** (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolone)-6-sulfonato)
- ATCC:** American Type Culture Collection
- ATV:** Associação tripsina-versene
- CCT:** Coleção de Culturas Tropical
- CLAE:** Cromatografia líquida de alta eficiência
- COSY ¹H:** Correlated Spectroscopy
- DMEM:** Meio Eagle modificado por Dulbecco
- DMSO-d₆:** Dimetil sulfóxido deuterado
- DNS:** Dinitric salicilic acid (Ácido dinitro salicílico)
- EM:** Espectrometria de Massa
- FIA:** Análise de injeção em fluxo
- HBT:** 1-hidroxibenzotriazol
- HRP-VI:** Horseradish peroxidase VI (Peroxidase de raiz forte)
- IC₁₀:** Concentração inibitória responsável por 10% de morte celular
- IC₅₀:** Concentração inibitória responsável por 50% de morte celular
- IV:** Infravermelho
- Lac:** Lacase
- LiP:** Lignina peroxidase
- LPO:** Lactoperoxidase
- MnP:** Manganês peroxidase
- MTT:** Sal de tetrazólio - [Brometo de (3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)]
- RMN ¹H:** Ressonância magnética nuclear de próton
- RMN ¹³C:** Ressonância magnética nuclear de carbono
- SFB:** Soro fetal bovino
- UV-Vis.:** Ultravioleta-visível
- VN:** Vermelho neutro - (2-amino-3-metil-7-dimetil-amino-cloreto de fenanzina)

ÍNDICE

Capítulo 1: <i>Chromobacterium violaceum</i>, violaceína e biotransformação.....	1
1.1 O surgimento da <i>Chromobacterium violaceum</i> e seu pigmento, a violaceína.....	3
1.2 Determinação da estrutura química, caracterização e bioquímica da violaceína.....	3
1.3 <i>Chromobacterium violaceum</i> , violaceína e o Rio Negro.....	8
1.4 A <i>Chromobacterium violaceum</i> e sua patogenicidade.....	9
1.5 Propriedades especiais da violaceína.....	10
1.6 Breve histórico à biocatálise usando enzimas e microrganismos.....	11
1.7 Biotransformação.....	13
1.7.1 Tratamento utilizando microrganismos.....	14
1.7.1.1 Biotransformação de compostos indólicos.....	17
1.7.2 Tratamento utilizando enzimas purificadas ou isoladas.....	18
1.8 Avaliação de toxicidade de novas substâncias.....	23
1.8.1 Ensaio citotóxicos em células de mamíferos.....	24
1.8.1.1 Ensaio com Vermelho Neutro.....	25
1.8.1.2 Ensaio de determinação do conteúdo protéico.....	25
1.8.1.3 Ensaio com MTT.....	26
1.8.2 Ensaio de toxicidade aguda utilizando a bactéria <i>Escherichia coli</i>	26
Capítulo 2: Objetivos.....	27
Capítulo 3: Material e métodos.....	31
3.1 Biossíntese da violaceína.....	33
3.1.1 Produção microbiana.....	33
3.1.2 Extração e purificação.....	33
3.1.3 Caracterização.....	34

3.2 Tratamento da violaceína via enzimática.....	35
3.2.1 Biotransformação utilizando Peroxidase de raíz forte (HRP-VI).....	35
3.2.1.1 Determinação da atividade da enzima de raíz forte (HRP).....	36
3.2.2 Biotransformação utilizando Lactoperoxidase (LPO).....	36
3.2.3 Biotransformação utilizando Lacase (Lac) obtida a partir do cultivo do fungo <i>Trametes versicolor</i>	36
3.2.3.1 Produção da enzima Lacase.....	37
3.2.4 Biotransformação utilizando "pool" enzimático de Lignina peroxidase e Manganês peroxidase (LiP/MnP) obtido pelo cultivo do fungo <i>Phanerochaete chrysosporium</i>.....	37
3.2.4.1 Produção do "pool" enzimático LiP/MnP.....	37
3.3 Análise dos produtos obtidos pela biotransformação da violaceína e do 5 - hidroxindol utilizando-se a enzima comercial HRP-VI.....	43
3.3.1 Teste pela reação de Salkowsky.....	43
3.3.2 Tentativa de caracterização do produto de reação da violaceína com a enzima comercial HRP-VI.....	43
3.4 Ensaios biológicos realizados com o produto obtido pela biotransformação da violaceína utilizando-se a enzima comercial HRP-VI.....	44
3.4.1 Ensaios citotóxicos em células de mamíferos.....	44
3.4.1.1 Manutenção das células.....	44
3.4.1.2 Ensaio com Vermelho Neutro.....	45
3.4.1.3 Ensaio de determinação do conteúdo protéico.....	45
3.4.1.4 Ensaio com MTT.....	46
3.4.2 Ensaio de toxicidade aguda <i>in vitro</i>.....	46
3.4.2.1 Cultura da bactéria.....	46
3.4.2.2 Preparação do meio de cultura.....	46
3.4.2.3 Realização do ensaio.....	47
3.4.2.4 Obtenção da curva de calibração.....	47
3.5 Tratamento da violaceína via microrganismos.....	48
3.5.1 Biotransformação da violaceína utilizando os fungos <i>Trametes versicolor</i> CCT 4521, <i>Trametes villosa</i> CCT 5567 e <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725 e as bactérias <i>Azotobacter vinelandii</i> 1228-ESALQ e <i>Pseudomonas putida</i> CCT 0598 em meio sólido.....	48
3.5.1.1 Meios de manutenção.....	48

3.5.1.2 Condições de inoculação e cultivo.....	50
3.5.1.3 Determinação das atividades enzimáticas.....	50
3.5.1.4 Determinação de sideróforos.....	51
3.5.2 Biotransformação da violaceína utilizando os fungos <i>Trametes versicolor</i> CCT 4521, <i>Trametes villosa</i> CCT 5567 e <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725 e as bactérias <i>Azotobacter vinelandii</i> 1228-ESALQ e <i>Pseudomonas putida</i> CCT 0598 em meio líquido.....	51
3.5.2.1 Meio de manutenção.....	51
3.5.2.2 Condições de inoculação e cultivo.....	51
3.5.3 Estudo do efeito de adsorção da violaceína nos "pellets" de inóculo dos microrganismos utilizados para biotransformação.....	53
Capítulo 4: Biossíntese e caracterização da violaceína.....	55
4.1 Biossíntese da violaceína.....	57
4.2 Caracterização da violaceína.....	57
Capítulo 5: Tratamento da violaceína via enzimática.....	65
5.1 Biotransformação utilizando Peroxidase de raiz forte (HRP-VI).....	67
5.2 Biotransformação utilizando Lactoperoxidase (LPO).....	69
5.3 Biotransformação utilizando Lacase (obtida a partir do cultivo do fungo <i>Trametes versicolor</i> CCT 4521).....	70
5.4 Biotransformação utilizando "pool" de Lignina peroxidase e Manganês peroxidase - LiP/MnP (obtido pela produção do fungo <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725).....	72
5.5 Comparação dos dados obtidos na biotransformação da violaceína pelas enzimas HRP-VI, LPO, Lac (com e sem uso de HBT) e o "pool" enzimático LiP/MnP.....	73
5.6 Análise do produto obtido do tratamento da violaceína com a enzima HRP-VI.....	75
5.7 Ensaios biológicos realizados com o produto obtido pela biotransformação da violaceína utilizando-se a enzima comercial HRP-VI.....	84
5.7.1 Ensaios citotóxicos em células de mamíferos.....	84
5.7.2 Ensaio de toxicidade aguda <i>in vitro</i>	87

Capítulo 6: Tratamento da violaceína via microrganismos.....	89
6.1 Biotransformação da violaceína utilizando os fungos <i>Trametes versicolor</i> CCT 4521, <i>Trametes villosa</i> CCT 5567 e <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725 e as bactérias <i>Azotobacter vinelandii</i> 1228-ESALQ e <i>Pseudomonas putida</i> CCT 0598 em meio sólido.....	91
6.2 Biotransformação da violaceína utilizando os fungos <i>Trametes versicolor</i> CCT 4521, <i>Trametes villosa</i> CCT 5567 e <i>Phanerochaete chrysosporium</i> ATCC 24725 e as bactérias <i>Azotobacter vinelandii</i> 1228-ESALQ e <i>Pseudomonas putida</i> CCT 0598 em meio líquido.....	94
6.2.1 Estudo do efeito da adsorção da violaceína na massa dos microrganismos.....	97
 Capítulo 7: Conclusões.....	 101
 Capítulo 8: Perspectivas.....	 105
 Referências Bibliográficas.....	 109

CAPÍTULO 1

***CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM,*
VIOLACEÍNA E BIOTRANSFORMAÇÃO**

CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM, VIOLACEÍNA E BIOTRANSFORMAÇÃO

1.1 O surgimento da *Chromobacterium violaceum* e seu pigmento, a violaceína

"*Cromobacterium violaceum* - elementos celulares cilíndricos dotados de movimento oscilante, corados de violeta por uma substância especial insolúvel em água - Grossura de 0,6 a 1 μ ; comprimento de 2 a 3 μ - Vegetam especialmente em solução de albumina de ovo." Foi essa a primeira descrição documentada sobre a *Chromobacterium violaceum* e a violaceína. Em 1881, seu autor, Curzio Bergonzini, esqueceu um frasco controle de seu estudo "Sobre o modo de ação de algumas causas que retardam a putrefação" contendo uma solução de albumina de ovo. A partir dela pôde contemplar um acontecimento jamais observado: o recobrimento da superfície da solução de albumina bovina por uma densa película de coloração intensa violeta escura. Inicialmente ele pensou tratar-se da *Cromococcus violaceus*, única bactéria a apresentar tal coloração até então. No entanto, ao fracassar na tentativa de dissolver em água um pequeno fragmento da película violeta, desistiu de aceitar a possibilidade. Após alguns experimentos, concluiu tratar-se de uma nova bactéria violeta, a *Cromobacterium violaceum* (Bergonzini, 1881).

Nesse mesmo ano, Zimmerman corrigiu o nome da bactéria para *Chromobacterium violaceum*, grafia aceita pela maior parte dos autores até os dias de hoje (Buchanan, 1918).

1.2 Determinação da estrutura química, caracterização e bioquímica da violaceína

Em 1882 Lecoq Boisbaudran extraiu um pigmento violeta produzido por uma bactéria crescida em pasta de amido a qual ele não descreveu, registrando o seu espectro de absorção. Materiais de coloração similar foram obtidos de *Bacillus violaceus* e *Bacillus janthinus* e descritos por Schneider (1895). O pigmento de *B. violaceus* foi submetido à análise espectroscópica por Hartley (1913) e, finalmente, considerado por ele diferente daqueles registrados anteriormente, uma vez que

apresentava absorção na região do infravermelho. É possível, entretanto, que o pigmento obtido nesses três casos fosse o mesmo, apesar das divergências com relação à sua obtenção e da diferença de época da realização dos experimentos.

Após Lasseur e Girardet (1926) prepararem e purificarem uma pequena quantidade de violaceína obtida pelo cultivo de um bacilo violeta, Reilly e Pyne conseguiram isolar 60 mg do pigmento produzido pela então conhecida *Chromobacterium violaceum*, chegando até mesmo a sugerir sua fórmula química, muito aproximada da real ($C_{10}H_{12}O_8N$)_n (Reilly e Pyne, 1927).

Quando a química da bactéria estava sendo estudada, vários experimentos de degradação da violaceína e síntese de derivados seus foram realizados, até a determinação de sua verdadeira estrutura. Beer e col. (1949) iniciaram o processo com a determinação dos resíduos de indol e hidroxindol na molécula. Em 1954, após decomposição térmica, concluíram que a molécula continha um núcleo 5-hidroxindol, um oxindol e provavelmente um resíduo hidroxipirrol, resultando na fórmula $C_{21}H_{15}O_3N_3$ ou $C_{21}H_{13}O_3N_3$ (Beer e col., 1954). Finalmente, Ballantine e col. (1958, 1960) conseguiram concluir a fórmula química e a estrutura exata da violaceína (Figura 01).

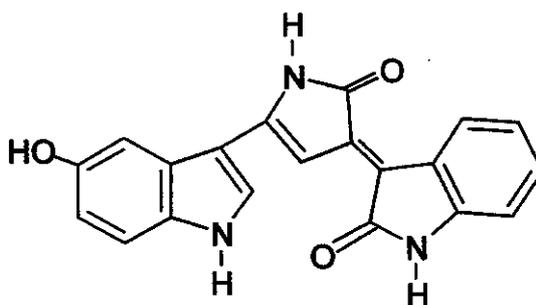


Figura 01: Estrutura molecular da violaceína -

3-[1,2 dihidro-5(3,5-dihidroxi-1H-indol-3-il)-2-pirrol-4-ilideno]1,3 dihidro-2H-indol-2-ona.

A caracterização da violaceína começou a ser realizada na década de 80, possibilitando a obtenção de dados de RMN ^1H (Laatsch *e col.*, 1984; Hoshino *e col.*, 1987_a; Riveros *e col.*, 1988; Rettori e Durán, 1998), ^1H COSY (Hoshino *e col.*, 1987_a), IV (Laatsch *e col.*, 1984; Riveros *e col.*, 1988; Rettori e Durán, 1998), UV-Vis. (Riveros *e col.*, 1988; Rettori e Durán, 1998), Massa (Riveros, 1986; Riveros *e col.*, 1988; Rettori e Durán, 1998), RMN ^{13}C (Hoshino *e col.*, 1987_a; Rettori e Durán, 1998) e de cromatografia de alta eficiência (CLAE) (Rettori e Durán, 1998).

O papel fisiológico da violaceína ainda não foi completamente esclarecido. Friedheim (1932) estudou os efeitos do pigmento sobre a respiração de células vivas da bactéria verificando um aumento dessa atividade, além da supressão da síntese do pigmento quando do crescimento da bactéria em meio de glicose.

Em revisão realizada por De Moss (1967), algumas sugestões quanto a possíveis funções da violaceína na fisiologia da bactéria foram propostas: (1) a violaceína poderia funcionar como protetor da bactéria contra radiação - seu alto coeficiente de extinção molar e sua insolubilidade em água confinariam o pigmento nas células; (2) a violaceína funcionaria como fonte de precursores de triptofano; (3) a violaceína seria um produto final da degradação do triptofano - assim o nível intracelular de triptofano seria mantido relativamente baixo e não tóxico; no entanto, nenhuma dessas sugestões pôde ser comprovada (De Moss, 1967).

Alguns estudos bioquímicos também contribuíram para elucidar pontos-chaves com relação à biossíntese da violaceína. Tobie (1934) descobriu que ao oxigenar culturas de *C. violaceum*, o tempo necessário para máxima produção do pigmento era consideravelmente reduzido. Esta observação contribuiu para postular a essencial importância do oxigênio molecular na biossíntese da violaceína.

A primeira indicação de que o L-triptofano fosse um precursor da violaceína foi proposta por Mitoma *e col.* (1956), quando adicionaram o aminoácido à uma suspensão de *C. violaceum* com produção de violaceína. Ainda na década de 50, De Moss e Evans (1959) confirmaram que a única fonte de carbono necessária para a síntese do

pigmento pela bactéria era o L-triptofano (na presença de oxigênio molecular) enquanto que o D-triptofano não podia ser convertido em violaceína. Estudos de incorporação de isótopos (^{14}C) em diferentes posições na molécula de triptofano (figura 02) mostraram que o carbono da carboxila (C1) era eliminado provavelmente por um processo de descarboxilação e o restante da molécula era incorporado na estrutura do pigmento (De Moss e Evans, 1960).

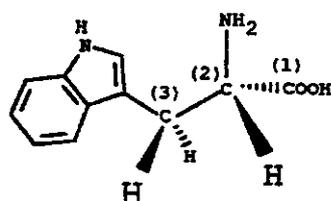


Figura 02: Estrutura molecular do L-triptofano.

Por meio de experimentos utilizando triptofanos [$2\text{-}^{13}\text{C}$] e [$3\text{-}^{13}\text{C}$], Hoshino *e col.* conseguiram estabelecer que a origem do esqueleto carbônico do grupamento pirrolidona da molécula de violaceína provinha da condensação de duas moléculas de triptofano (ligação C3-C3 e C2-N-C2 entre as cadeias laterais das moléculas) acompanhada pela mudança 1-2 de um dos dois anéis indólicos da molécula (figura 03) (Hoshino *e col.*, 1987_a).

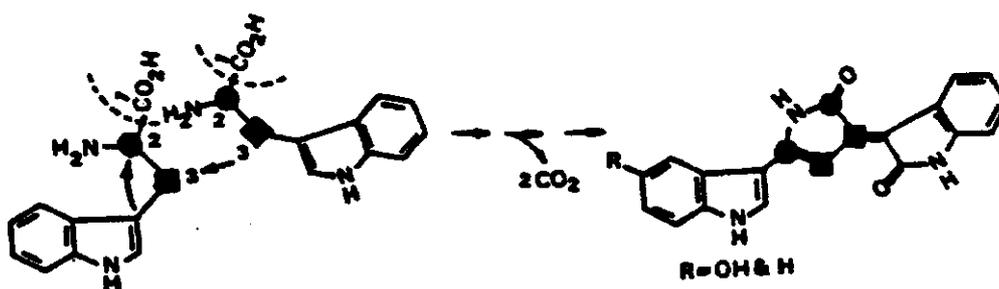


Figura 03: Condensação de duas moléculas de L-triptofano.

Pouco tempo depois, com a ajuda dos isótopos ^2H , ^{15}N e ^{18}O , a proveniência dos demais átomos da molécula de violaceína foi estabelecida: o nitrogênio se originaria do grupo amino ligado ao carbono α (C2) do L-triptofano; o hidrogênio, de um dos dois H do carbono β (C3) e todos os átomos de oxigênio seriam provenientes do oxigênio molecular e não do meio (Hoshino *e col.*, 1987_b).

Em 1994, com o auxílio de rádio-isótopos, sugeriu-se a possibilidade da *Chromobacterium violaceum* ser capaz de sintetizar a violaceína a partir do indol-3-ácido acético (Durán *e col.* 1994). Trabalho mais recente mostrou ainda um novo sistema livre de células, capaz de converter o precursor triptofano em violaceína (Hoshino e Yamamoto, 1997; Momen *e col.*, 1998).

Outros trabalhos indicaram e isolaram enzimas produzidas pela *Chromobacterium violaceum*, no entanto, o único sistema enzimático envolvido na biossíntese da violaceína foi o da triptofano hidroxilase (Hoshino e Ogasawara, 1990).

O triptofano exógeno em altas concentrações atua como inibidor na produção do pigmento (De Moss e Evans, 1959) enquanto outras substâncias, como as lactonas N-acil-homoserinas, podem atuar como indutores na produção da violaceína pela *Chromobacterium violaceum* (McClellan *e col.*, 1997).

Além da violaceína, a *Chromobacterium violaceum* produz muitos outros compostos: oxiviolaceína (Hoshino e Ogasawara, 1990), HS-1 (Hoshino *e col.*, 1994_b), pseudodeoxiviolaceína e prodeoxiviolaceína (Hoshino *e col.*, 1994_a), proviolaceína e pseudoviolaceína (Hoshino *e col.*, 1995), 3-[2-{{(Z)-[3,5-di(1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2-il]metilideno}-5-(1H-indol-3-il)-2H-pirrol-3-il]-1H-indol e 3-[2-{{(Z)-[3,5-di(1H-indol-3-il)-1H-pirrol-2-il]metilideno}-5-(1H-indol-3-il)-2H-pirrol-3-il]-1H-indol-5-ol (Momen *e col.*, 1998), alguns inclusive com propriedades antibióticas: aerocianidin (Parker *e col.*, 1988), aerocavin (Singh *e col.*, 1988), 3,6-dihidroindoxageno (Hamada *e col.*, 1983) dentre outros.

1.3 *Chromobacterium violaceum*, violaceína e o Rio Negro (AM)

A região amazônica é uma das maiores regiões ainda virgens na Terra. A vida de plantas e animais nessa região, fortemente carente da luz do sol, é tão intensa e diversa que praticamente, tudo o que se vê e estuda é novo. A coloração natural dos rios é particularmente destinta: águas pretas, azuis-esverdeadas e brancas. A biomassa produzida nas águas escuras é pelo menos 200 vezes menor quando comparada às produzidas por águas claras. Essas águas pretas, que também são cristalinas, possuem pH entre 4 e 5, são ricas em material orgânico mas pobres em inorgânico. A natureza da coloração das águas pretas tão peculiar é ainda duvidosa. Inicialmente ela foi atribuída à presença de ácidos húmicos, mas medidas posteriores no rio Amazonas e no Rio Negro, comprovaram níveis aproximadamente iguais (Caldas, 1977; Caldas e col., 1978).

A descoberta de altas quantidades de *Chromobacterium violaceum* nas águas e solos das margens do Rio Negro, deu-se quando uma amostra foi retirada de uma profundidade de 30 metros, em frente à estação de tratamento de água da cidade de Manaus em 1976. Uma análise bacteriológica determinou a presença de dois tipos de colônias: uma branca e uma violeta. A violeta foi identificada como sendo *Chromobacterium violaceum*, microrganismo jamais isolado e estudado no Brasil (Caldas e col., 1978). Esse fato adicionou mais uma possível explicação da coloração das águas: a existência de um pigmento (violaceína) que em combinação com a luz solar, poderia funcionar como um fotosensibilizador tornando as águas com baixa fertilidade.

Apesar disso, a dúvida ainda persiste: as águas do Rio Negro são pretas devido à presença da *Chromobacterium violaceum* ou a bactéria se desenvolve graças às propriedades das águas negras? (Caldas, 1990).

1.4 A *Chromobacterium violaceum* e sua patogenicidade

A *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria Gram-negativa pertencente à família Rhizobiaceae e à ordem Eubacteriales, é anaeróbia facultativa em forma de bastonetes (0,6-0,9 x 1,5-3,0 cm) frequentemente coccobacilares. Suas colônias são ligeiramente convexas, não gelatinosas, regulares e violetas, embora sejam encontradas variantes irregulares e não pigmentadas (Sneath, 1974).

Trata-se de uma bactéria saprófita amplamente distribuída, encontrada em águas e solos de regiões tropicais e subtropicais, onde constitui componente minoritário da microflora total. Considerada não patogênica para os homens, revela-se ocasionalmente de extrema virulência para animais e humanos (Ballows, 1992; Kumar e col., 1999).

O potencial patogênico dessa bactéria foi descrito pela primeira vez por Wooley (1905) ao identificá-la como a responsável pela morte de búfalos d'água por septicemia. A *C. violaceum* já foi isolada de infecções em humanos, sendo o primeiro caso reportado na Malásia em 1927. Eventos fatais de infecção foram registrados, desde então, em vários países: EUA (Lichstein e Van de Sand, 1945; Johnson e col., 1971; Ponte e Jenkins, 1992; Midani e Rathore, 1998), Vietnã (Ognibene e Thomas, 1970), Austrália (Wilkey e Mc Donald, 1983; Huffam e col., 1998), Brasil (Petrillo e col., 1984), Nigéria (Onille e col., 1984), Cuba (Machín Villafranca e col., 1986), Argentina (Kaufman e col., 1986), Malásia (Hassan e col., 1993), Tailândia (Roberts e col., 1997) e Coréia (Lee e col., 1999).

Estudos comparativos entre linhagens virulentas e não virulentas determinaram diferenças nas propriedades bioquímicas da membrana externa da bactéria, explicando sua sobrevivência nos organismos hospedeiros (Miller e col., 1987). Os únicos documentos relatando infecção humana por linhagem não pigmentada foram descritos por Sorensen e col. (1985) e Lee e col. (1999), embora a patogenicidade pareça não estar relacionada à produção de pigmento (Ponte e Jenkins, 1992).

Um rápido diagnóstico, uma identificação bacteriana apurada e um tratamento específico são muito importantes pois a *C. violaceum* pode causar sérias infecções principalmente em pessoas imunodeprimidas (Petrillo e col., 1984; Kaufman e col., 1986; Martin e Brimacombe, 1992). Não existe nenhuma evidência clínica de fatores de predisponentes ou doenças pré-existentes que tornem um indivíduo mais susceptível à infecção por esse organismo. No entanto, já foi sugerida a predisposição de portadores de granulomatose crônica. A via de entrada mais comum ocorre em lesões cutâneas, podendo passar vários dias ou até meses, até que a doença sistêmica se manifeste. A presença de diarreia sugere eventual via de acesso pelo trato gastrointestinal (Kaufman e col., 1986).

O processo de infecção quando sistêmico, forma abscessos em múltiplos órgãos incluindo fígado, baço, pulmões e coração. A causa morte do paciente geralmente é por septicemia. A bactéria é sensível à tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina e gentamicina, sendo resistente à cefalosporina (Hassan e col., 1993).

1.5 Propriedades especiais da violaceína

Kidder e Stuart (1939) descreveram a morte de protozoários ciliados quando expostos às culturas de *C. violaceum*, enquanto Singh (1942) mostrou que extratos brutos de violaceína adicionados às suspensões de bactérias impediam que essas fossem ingeridas por amebas de solo.

A existência de pigmentação ao redor das lesões dos pacientes infectados com a *C. violaceum* associada à ausência de organismos contaminantes, sugeriu a possibilidade de que algum produto metabólico do organismo dessa bactéria pudesse ter ação inibitória contra outros microrganismos, particularmente aqueles encontrados abundantemente na flora normal da pele. Baseados nesse fato e nas informações anteriormente descritas, Lichstein e Van de Sand testaram as propriedades antibióticas da violaceína cristalina em 51 cepas de bactérias. O

pigmento mostrou marcante efeito inibitório no crescimento de bactérias Gram-positivas, com exceção do *Clostridium welchii* e discreto efeito inibitório na proliferação de bactérias Gram-negativas (Lichstein e Van de Sand, 1945; De Moss, 1967).

Em 1966, duas amostras de *Chromobacterium violaceum* (diferentes entre si pelas concentrações de pigmento em suas soluções) foram examinadas quanto a sua susceptibilidade à morte por irradiação contínua de luz de um laser a gás, na presença ou não de fotosensibilizador exógeno. O fato da suspensão de *C. violaceum* contendo a maior concentração de pigmento ter se mostrado como única a resistir por mais de 30 minutos de irradiação, foi atribuído ao pigmento (violaceína) que se depositava na superfície das células, protegendo-as da luz (Macmillan e col., 1966).

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

Trabalhos posteriores atribuíram à violaceína propriedades tripanocida (Caldas e col., 1978; Riveros e col., 1988; Durán e col., 1989), antiviral (May e col., 1991), tumoricida (Durán e col., 1996), antioxidante (Aski e col., 1997; Rettori e col., 1998) e anti-micobacteriana (Souza e col., 1999), além de apresentar atividade citotóxica a células de mamíferos (Durán e col., 1989; Haun e col., 1992).

1.6 Breve histórico à biocatálise usando enzimas e microrganismos

Com o passar dos tempos vem crescendo o interesse na aplicação de enzimas e microrganismos como catalisadores em química orgânica. O potencial de crescimento da biotecnologia, sem mencionar os numerosos trabalhos na área de biotransformação, tem demonstrado as vantagens que a catálise biológica pode trazer à complexa síntese

orgânica. No entanto, essa explosão de interesses atuais possui um contexto histórico como alicerce, no qual as tecnologias e ciências subordinadas foram se desenvolvendo.

No início do século XIX, o desenvolvimento em bioquímica estava intimamente associado àqueles realizados na química orgânica. Além disso, a ciência desses assuntos não era distinta da tecnologia de suas aplicações. As reações químicas e bioquímicas, nas quais participavam amido e açúcar, foram tópicos importantíssimos para a pesquisa científica e desenvolvimento tecnológico. No entanto, foram os trabalhos de Pasteur (1858-1864) que revolucionaram a ciência e a tecnologia da microbiologia, pela conclusão de que o curso de cada fermentação era determinado pelos organismos que ela continha e que o processo em si era dependente da ação de um organismo vivo.

Não há dúvidas de que, comparativamente ao químico do século XIX, o bioquímico do século XX direcionou seu interesse à medicina e fisiologia. Os químicos orgânicos também puseram-se em caminho diferente. As duas disciplinas começaram a ter objetivos separados: bioquímicos investigavam processos vivos enquanto químicos orgânicos concentravam-se em análises e sínteses. Isso foi essencial para as duas ciências realizarem rápidos progressos que foram atingidos no século XX.

Os avanços recentes no final do século XX desenvolveram-se graças ao conhecimento adquirido por essas duas disciplinas e pela identificação de problemas a serem resolvidos em conjunto. Entretanto, a base de conhecimento é tão grande agora que essa convergência e integração das disciplinas torna impraticável a possibilidade de estudos isolados. O mais promissor é o trabalho de grupos de indivíduos executando a mesma sinergia entre a química orgânica, bioquímica e engenharia, união que demonstrou ser sumamente eficiente no século passado (Roberts *e col.*, 1995).

1.7 Biotransformação

As definições mais recentes de biotransformação (ou bioconversão) são:

(1) A sequência de reações químicas que um determinado composto sofre ou é submetido dentro do corpo de um organismo;

(2) A conversão de um composto de uma forma à outra, pela ação de organismos ou enzimas (<http://biotech.icmb.utexas.edu/search/dict.search>).

A primeira definição está diretamente relacionada à conversão de drogas em substâncias mais solúveis em água e portanto, mais fáceis de serem eliminadas pelo organismo. As propriedades físicas do composto são modificadas e o que antes favorecia a absorção (efeito lipofílico) passa a favorecer a excreção (efeito hidrofóbico). Além disso, as propriedades toxicológicas iniciais também são alteradas, diminuindo ou aumentando imprevisivelmente (<http://www.tamu-commerce.edu/coas/biology/weinstein/bsc597/biotrans.html>).

A segunda definição de biotransformação é a adotada por trabalhos realizados no limite da biologia e química, que utilizam transformações bioquímicas nas suas pesquisas, estudando reações catalisadas por enzimas ou sob ação de microrganismos (Poppe e Novák, 1992; Durán *e col.*, 2000). As aplicações industriais vêm sendo adotadas na área de alimentos, medicina, indústria têxtil e papelaria assim como na monitoração do meio ambiente. Enzimas e células microbianas em geral participam na produção de compostos de alta pureza enantiomérica, campo antes reservado à química fina, como por exemplo fármacos e pesticidas (http://www.igb.fhg.de/Biokat/en/Biotrans_home.en.html).

Basicamente existem duas estratégias na realização das biotransformações: (1) uso de enzimas puras ou enzimas isoladas e parcialmente purificadas e (2) uso de células inteiras, cada uma com suas vantagens e desvantagens (tabela 01).

Tabela 01: Algumas vantagens e desvantagens da utilização de sistemas com células inteiras ou enzimas isoladas (Roberts *e col.*, 1995).

SISTEMA DE BIOTRANSFORMAÇÃO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
CÉLULAS INTEIRAS	<ul style="list-style-type: none"> - Baixo custo; - Presença de co-fatores enzimáticos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Necessidade de volumosa vidraria; - Possibilidade de interferência de reações laterais; - Muita mão de obra.
ENZIMAS ISOLADAS	<ul style="list-style-type: none"> - Aparentemente simples; - Pouca mão de obra; - Especificidade de reação; - Melhor tolerância de co-solventes. 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto custo; - Necessidade de adição ou reciclagem de co-fatores para a enzima.

Outros sistemas vêm demonstrando promissores resultados como o uso de enzimas semi-sintéticas, enzimas obtidas por engenharia genética, anticorpos catalíticos e enzimas sintéticas (não protéicas) (Poppe e Novák, 1992; Justo, 1998).

As biotransformações são empregadas quando uma dada reação química não é facilmente conseguida por métodos químicos ou ainda para obter modificações de uma molécula relativamente complexa (antibiótico ou outra droga) por reações específicas. Dessa maneira, os análogos das drogas preparadas são comparados com o composto inicial no que diz respeito a sua toxicidade, atividade e farmacocinética (Leuenberger, 1984).

1.7.1 Tratamento utilizando microrganismos

O primeiro passo a ser realizado para a biotransformação desejada é encontrar o microrganismo que catalise a reação de interesse com o maior rendimento possível. Geralmente é necessária a realização de uma seleção ("screening") com um grande número de culturas puras. Para evitar o empirismo de uma seleção aleatória, é prudente testar microrganismos considerados em observações anteriores realizadas

com compostos de ordem estrutural similar ao composto de partida do estudo (Leuenerger, 1984).

As transformações com microrganismos podem ser realizadas com células em diferentes estados de seu ciclo de vida, isto é, células em crescimento, massa celular em repouso ou por meio de esporos. Pode-se efetuar uma imobilização em todos esses casos ou ainda fazer uso combinado de mais de um microrganismo para um processo multi-fásico.

- Com biotransformações realizadas com culturas de microrganismos em crescimento, o substrato é adicionado em um estágio específico do crescimento microbiano. O momento e o modo ótimos de adição são importantes pois o fato do substrato ser um indutor para a(s) enzima(s) responsável(eis) pela transformação desejada é de muita ajuda, ao contrário por exemplo, de ser uma substância inibidora. No método de culturas em crescimento, a transformação do substrato ocorre simultaneamente ao crescimento das células e portanto toda a operação leva menos tempo, motivo que torna o método mais simples e frequentemente adotado. Por outro lado, a dificuldade em isolar e purificar o produto desejado é maior, devido à presença de outros metabólitos produzidos pelo microrganismo. A adição do substrato diretamente às culturas em crescimento é também um método de opção para experimentos de seleção.

- Quando se trabalha com células em repouso, a preparação da massa celular e a biotransformação em si ocorrem em operações separadas. Inicialmente, as células crescem em meio favorável e após separação e centrifugação/filtração, elas são ressuspendidas em meio tamponado já otimizado no qual o substrato é adicionado e finalmente a biotransformação é efetuada. Assim, é possível otimizar ambos os passos independentemente e obter então a melhor razão substrato-massa celular. Além disso, numa mistura menos complexa, onde os nutrientes celulares são escassos ou até ausentes no meio da transformação, torna-se mais fácil isolar o produto. A

predisposição às contaminações também são reduzidas, possibilitando até manipulações com operação não estéril.

- A utilização de esporos requer o cultivo do fungo em um meio especial, capaz de promover a esporulação do microrganismo. Esporos são formas mais resistentes das células produzidas por alguns microrganismos, fungos filamentosos em sua maioria. As mesmas transformações realizadas com esporos podem ser realizadas com micélios apesar do uso de esporos oferecer algumas vantagens como maior produtividade e estabilidade, uma vez que os esporos podem ser estocados em grandes quantidades por longos períodos de tempo.

- Para a biotransformação consistindo de duas ou mais etapas requer-se a utilização de diferentes microrganismos em uma única operação ou a combinação de microrganismos e enzimas. A vantagem desses sistemas tão complexos é que não existe a necessidade de isolar os intermediários.

- O emprego de sistemas de imobilização podem ser adotados tanto para as células dos microrganismos como para as enzimas. Geralmente os procedimentos adotados para imobilização de células são os mesmos para a imobilização de enzimas com pequenas alterações. Entre esses métodos pode-se citar: inclusões em matrizes poliméricas, adsorções em suportes sólidos insolúveis em água, ligações efetuadas a suportes sólidos insolúveis em água, etc. A experiência prática demonstrou que esses métodos são melhor aplicados às bactérias e leveduras do que a fungos filamentosos. A imobilização de células é realizada no seu ambiente natural, onde conserva portanto sua estabilidade e oferece ainda outras vantagens como a tolerância de temperatura, pH, maior resistência a efeitos tóxicos, além de poder ser empregada em operação contínua e ser reutilizável. Comparativamente ao volume equivalente de células em crescimento, a atividade catalítica das células imobilizadas é significativamente reduzida, provavelmente devido às limitações na difusão do substrato na preparação (Poppe e Novák, 1992; Roberts *e col.*, 1995).

1.7.1.1 Biotransformação de compostos indólicos

A primeira publicação de grupos indólicos metabolizados por microrganismos utilizou uma bactéria obtida de água de torneira e foi registrada em 1953. Depois, somente no ano de 1968 é que apareceu um segundo trabalho no assunto utilizando uma bactéria do solo. Uma revisão de degradação microbiológica de compostos N-heterocíclicos foi publicada por Callely em 1978, referindo-se sempre ao metabolismo aeróbio. Shanker *e col.* (1991) descreveram também a transformação de moléculas heterocíclicas (incluindo o indol) por microrganismos aeróbios e anaeróbios. Uma das primeiras biotransformações realizadas com o indol foi uma reação de hidroxilação pela ação da bactéria *Desulfobacterium indolicum* (Licht *e col.*, 1997). A conversão de derivados indólicos com substituintes variados também foi realizada utilizando culturas de bactérias produtoras de metano e culturas de *Polygonum tinctorium* (Shcherbakova *e col.*, 1997; Shim *e col.*, 1998). Diversos outros trabalhos foram publicados nesse tema, no entanto, o único a utilizar um dos mesmos microrganismos empregados nesse trabalho foi o da formação do indigo e compostos correlatos a partir do indol e de uma linhagem de *Pseudomonas putida* (Eaton e Chapman, 1995).

Atualmente, a utilização de microrganismos para biotransformar diferentes substratos têm sido cada vez maior e mais diversificada. *Phanerochaete chrysosporium*, fungo branco lignolítico, mineraliza uma grande variedade de poluentes aromáticos incluindo clorofenóis, nitrotoluenos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, etc (Paszczynski e Crawford, 1991; Spadaro *e col.*, 1992; Ralph *e col.*, 1996; Ralph e Catcheside, 1998; Krcmar *e col.*, 1999; Manimekalai e Swaminathan, 2000). Adicionalmente a esses compostos, o fungo mostrou-se eficiente na descoloração/degradação de corantes e efluentes têxteis (Spadaro *e col.*, 1992; Sani *e col.*, 1998; Tatarko e Bumpus, 1998; Guimarães *e col.*, 1999; Swamy e Ramsay, 1999_a; Manimekalai e Swaminathan, 2000), na degradação de inseticidas e herbicidas (Mougin *e col.*, 1996; Liu *e col.*, 1997; Mougin *e col.*, 1997) e na degradação de efluentes papeleiros (Durán *e col.*, 1999_a). Outros fungos lignolíticos como *Trametes versicolor*,

Trametes villosa e *Lentinus edodes* também vêm sendo empregados na biotransformação de compostos do gênero (Ralph e Catchside, 1996; Okeke e col., 1997; Vinciguerra e col., 1997; Gramss e col., 1999; Pankratov e col., 2000; Johannes e Majcherczyk, 2000), na descoloração/ degradação de corantes (Heinfling e col., 1997) e efluentes têxteis e papeleiros (D'Annibale e col., 1998; Rodriguez e col., 1999; Knapp e Newby, 1999; Swamy e Ramsay, 1999_b). A utilização das bactérias *Pseudomonas putida* e *Azotobacter vinelandii* em transformações já é mais limitada no entanto, estudos de conversão de fluorobenzenos e benzaldeídos já foram realizados pela bactéria *Pseudomonas putida* (Lynch e col., 1997; Simmonds e Robinson, 1998) assim como degradação de compostos aromáticos fenólicos (Annadurai e col., 1999) e não aromáticos (Horinouchi e col., 1999).

O estudo dos fungos *Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Lentinus edodes*, *Phanerochaete chrysosporium* e das bactérias *Azotobacter vinelandii* e *Pseudomonas putida* voltado para a aplicação no branqueamento de polpas para a indústria papeleira, tem tido bastante interesse devido também às suas produções de sideróforos (Fekete e col., 1989; Sevinc e Page, 1992; Rodríguez e col., 1997; Durán e col., 1999_a), que são quelantes específicos com alta afinidade por metais e que formam complexos estáveis (Neilands, 1981; Milagres e col., 1999), além de poderem exercer ainda uma segunda função como por exemplo a mimetização de enzimas (Durán e col., 1999_b).

1.7.2 Tratamento utilizando enzimas purificadas ou isoladas

Em muitos casos é extremamente vantajoso o emprego de enzimas para a realização de biotransformações principalmente se: (1) a membrana das células dos microrganismos não permite a permeação do substrato ou do produto; (2) a enzima de interesse é excretada pela célula e facilmente purificada; (3) a enzima de interesse é de origem animal ou vegetal e (4) a enzima escolhida é disponível comercialmente (Leuenberger, 1984).

As enzimas são catalisadores efficientíssimos que aumentam a velocidade de uma reação em fatores de 10^8 - 10^{10} , são ambientalmente aceitáveis, atuam em condições suaves (pH 5-8, T= 20 - 40°C), são compatíveis umas com as outras o que possibilita a utilização de sistemas multienzimáticos, catalisam uma ampla faixa de substratos além de apresentarem alta seletividade (químio, regio, diastereo e enantioseletividade) e não se restringem à ação em meio aquoso (Faber, 1997).

Apesar das reações de hidrólises e esterificações serem as mais exploradas pelas biotransformações, aplicações variadas vêm sendo realizadas com diferentes enzimas (Demirjian, 1999).

As peroxidases catalisam a oxidação de uma larga variedade de compostos. Elas ocorrem em animais, plantas, microrganismos e suas especificidades e funções biológicas variam conforme a origem da enzima. As peroxidases atraíram a atenção industrial devido às suas utilidades como catalisadores em exames clínicos e outras aplicações. A compreensão da relação da estrutura-função assim como do mecanismo catalítico das peroxidases é baseada no trabalho com a Horseradish peroxidase (HRP) ou peroxidase de raiz forte. Talvez seja essa a peroxidase mais conhecida e que possui grande especificidade por doadores de hidrogênio e alta eficiência catalítica (Nakayama e Amachi, 1999).

Nas peroxidases clássicas, o grupo prostético é a protoporfirina férrica IX. A atividade característica das peroxidases é a oxidação por um elétron que normalmente ocorre conforme o mecanismo mostrado na figura 04. O composto I é reduzido ao seu estado férrico fundamental por dois processos consecutivos de transferência de um elétron da peroxidase para o substrato ou por um processo de oxidação por dois elétrons associado com a transferência do oxigênio ferril aos substratos. Os radicais produzidos na reação geralmente envolvem produtos não enzimáticos e/ou não radicalares que variam conforme a característica de cada substrato. Dos dois elétrons necessários para a redução do peróxido, um é proveniente do Fe(III), enquanto o outro provém da porfirina, produzindo um cátion radical porfirínico. A redução por um

elétron do composto I fornece o composto II, no qual as espécies $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$ permanecem intactas e a porfirina é reduzida. Em geral, a reação do composto II com o substrato é pelo menos 10-20 vezes mais lenta do que aquela com o composto I e, sob condições constantes, é a reação limitante de velocidade (Colonna *e col.*, 1999).

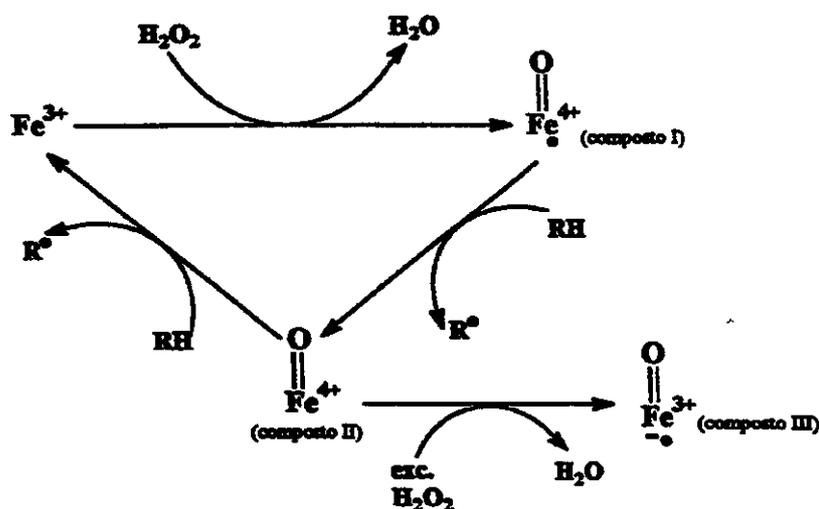


Figura 04: Ciclo catalítico das peroxidases clássicas.

Se durante o número de renovação ("turnover") de qualquer peroxidase, um grande excesso do agente oxidante, peróxido de hidrogênio, estiver presente, um outro intermediário enzimático, Composto III, pode ser formado. Uma vez que esse composto é bem menos reativo, seu acúmulo durante o número de renovação ("turnover") reduz a atividade da enzima (Monzani *e col.*, 1997).

A peroxidase de raiz forte (HRP) vem sendo utilizada em determinações espectrofotométricas de materiais biológicos (Mazerska *e col.*, 1998; Matsumoto *e col.*, 1999; Zhu *e col.*, 1999), conversões de substratos fenólicos (Zahida *e col.*, 1998; Kazunga *e col.*, 1999; Ferrari *e col.*, 1999; Ghiourelotis e Nicell, 2000) e diversas aplicações industriais (Peralta-Zamora *e col.*, 1998; Kawai *e col.*, 1999; Almelda e Tabak, 2000).

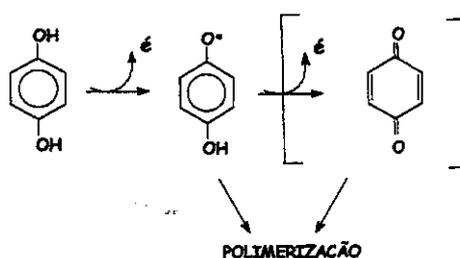
A lignina peroxidase (LiP), inicialmente chamada de ligninase, foi descoberta em 1982 como resultado de uma pesquisa para enzimas degradadoras de lignina (Glend *et al.*, 1983; Tien e Kirk, 1984). Esta enzima apresenta múltiplas formas e dependendo da cepa, condições de cultura, idade e tipo de separação, diferentes tipos de enzimas podem ser isolados. A LiP foi obtida pela primeira vez de culturas de *Phanerochaete chrysosporium* onde ela é excretada como metabólito secundário sob condições limitantes de carbono e nitrogênio. A LiP gera a oxidação de álcoois benzílicos, quebra de cadeias aromáticas laterais, desmetilação, rearranjos intramoleculares, etc (Gold *et al.*, 1989; Timofeevski *et al.*, 2000). O álcool veratrílico tem um papel importante no ciclo catalítico da LiP, é o redutor preferido pela enzima e aparentemente a protege contra a inativação do excesso de peróxido de hidrogênio (Ollikka *et al.*, 1998). Trabalhos recentes foram publicados principalmente na área de descoloração de corantes e efluentes industriais (Young e Yu, 1997; Ollikka *et al.*, 1998; Kwang-Soo e Chang-Jin, 1998; Ferreira *et al.*, 1999; Manimekalai e Swaminathan, 2000).

A manganês peroxidase (MnP) foi descoberta em culturas de *Phanerochaete chrysosporium* juntamente com a LiP (Kawahara *et al.*, 1984). Essa enzima é muito semelhante à LiP entretanto, além da dependência do peróxido de hidrogênio, ela depende também da presença de Mn^{2+} e por isso seus mecanismos catalíticos se diferenciam um pouco (Swamy e Ramsay, 1999_b). A MnP é capaz de oxidar uma grande variedade de compostos principalmente substratos aromáticos fenólicos e não fenólicos (Palma *et al.*, 2000). A aplicação dessa enzima também tem se focado bastante no tratamento industrial de corantes (Spadaro e Renganathan, 1994; Heinfling *et al.*, 1998).

A lactoperoxidase (LPO), membro de outra superfamília de peroxidases diferente da HRP, uma hemoproteína contendo tiol em seu grupo porfirínico, pode ser encontrada na saliva, leite e lágrimas de mamíferos. Ela oxida SCN^- pelo H_2O_2 produzindo o ácido hipotiocianico, que possui potente atividade bactericida. Trata-se de uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 78 KDa sendo 10%

carboidratos. O que a distingue bastante das outras peroxidases é o comportamento de seus intermediários enzimáticos (Monzani *e col.*, 1997; Tuyenman *e col.*, 1998). Estudos de oxidação de materiais biológicos são a maioria dos trabalhos publicados até hoje (Chatterjee *e col.*, 1998; Reszka *e col.*, 1998, 1999).

A lacase (Lac) difere das peroxidases uma vez que não necessita do peróxido de hidrogênio para oxidar substratos. Essa enzima é uma fenol oxidase que catalisa a oxidação de várias substâncias aromáticas e inorgânicas com a concomitante redução de oxigênio e formação de água. As lacases são não-específicas ao seu substrato redutor e a variação de substratos oxidados varia de uma lacase para outra. Uma reação típica da lacase pode ser exemplificada utilizando uma hidroquinona:



Esquema 01: Reação típica da lacase, oxidação da hidroquinona.

A dihidroquinona é oxidada pela perda de um elétron para formar um radical livre. Esta espécie ativa de oxigênio pode ser convertida a uma quinona em uma segunda etapa de oxidação. Tanto a quinona quanto a forma radicalar podem sofrer polimerização. Como a oxidação do substrato pela perda de um elétron está acoplada à redução do oxigênio molecular por quatro elétrons, acredita-se que o mecanismo de reação possa não ser tão simples, sugerindo-se a formação de compostos intermediários durante a reação (Thurston, 1994). Sabe-se que a presença de mediadores como (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazoline)-6-sulfonato) (ABTS) ou 1-hidroxibenzotriazol (HBT) (figura 05), podem catalisar quebras de anel e até mesmo oxidar substratos não fenólicos incluindo álcool veratrílico (Jakob *e col.*, 1999).

A Lacase é um dos grupos mais promissores das enzimas para descontaminação de poluentes de sistemas fenólicos e para aplicações biotecnológicas como produção e tratamentos de bebidas, biosensores, etc. Trabalhos de transformação de compostos aromáticos sem utilização de mediadores (Jonas *e col.*, 1998; Osiadacz *e col.*, 1999; Itoh *e col.*, 2000), com utilização de mediadores (Li *e col.*, 1999; Kawai *e col.*, 1999; Johannes e Majcherczyk, 2000) e de descoloração de corantes (Swamy e Ramsay, 1999_b) são frequentemente relatados.

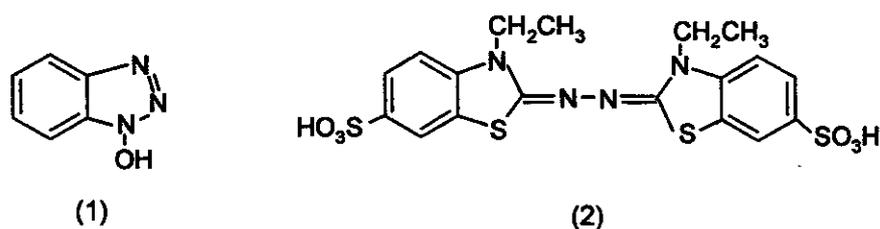


Figura 05: Estrutura química do HBT (1) e ABTS (2).

1.8 Avaliação de toxicidade de novas substâncias

As novas substâncias que sobrevivem aos processos iniciais de pesquisa e que apresentam atividades biológicas variadas, necessitam ser avaliadas quanto aos seus potenciais riscos antes de se iniciarem testes clínicos.

Testes de toxicidade já foram realizados com a violaceína, promissora substância a ser utilizada como droga, no entanto sua insolubilidade em água é um verdadeiro empecilho. Um trabalho de complexo de inclusão da violaceína com β -ciclodextrina realizado, apresentou redução na citotoxicidade além de melhora na sua solubilidade (De Azevedo *e col.*, 1999).

1.8.1 Ensaio citotóxicos em células de mamíferos

Um grande interesse tem sido dispensado no uso de testes *in vitro* para avaliação de toxicidade celular contribuindo ao desenvolvimento de alternativas para o emprego de animais na pesquisa biomédica (Renzi *e col.*, 1993).

A aplicação de sistemas de culturas de células, o sistema vivo de mamíferos mais simples que existe, pode oferecer várias vantagens sobre modelos animais completos. Por exemplo, o uso de culturas primárias, linhagens de células clonadas ou células contínuas, conferem um comportamento relativamente homogêneo da população celular a ser estudada, excluindo complicações encontradas em tecidos inteiros ou em animais. Várias descobertas no campo da biologia celular resultaram de experimentos *in vitro*, e alguns estudos em assuntos específicos como controle de proliferação celular, são virtualmente impossíveis de serem realizados *in vivo*. Apesar disso, o principal problema na introdução de testes *in vitro* para determinação de risco toxicológico em relação à exposição humana deve-se à extrapolação dos dados *in vitro* para a situação *in vivo*. O ponto central na comparação *in vitro* / *in vivo* refere-se às diferenças no processamento metabólico de xenobióticos por organismos inteiros ou culturas de células (Knox *e col.*, 1986; Cingi *e col.*, 1991).

Para aperfeiçoar o conhecimento dos mecanismos de ação tóxica e suas avaliações, torna-se fundamental a investigação de efeitos tóxicos por técnicas que forneçam informações sobre funções e/ou organelas celulares diferentes. Um número de testes foi designado para um estudo geral de citotoxicidade de xenobióticos como a exclusão do corante Azul de Tripán, a determinação do conteúdo protéico da célula, a retenção do corante Vermelho Neutro e a redução do sal de tetrazólio (Huveneers-Oorsprong *e col.*, 1997; De Conti *e col.*, 1998).

A exclusão do Azul de Tripán juntamente com observações morfológicas permitem a avaliação da integridade estrutural da célula. A habilidade das células vivas (que possuem a membrana celular intacta) em expulsar o corante, permite a

quantificação dessas células. As três outras técnicas fornecem informação sobre funções metabólicas celulares (Renzi *et al.*, 1993).

1.8.1.1 Ensaio com Vermelho Neutro (2-amino-3metil-7-dimetil-amino-cloreto de fenanzina)

A avaliação por esse ensaio baseia-se na habilidade de células viáveis incorporarem e reterem o vermelho neutro, corante supravital. Esse corante fracamente catiônico penetra a membrana celular por difusão passiva não-iônica e concentra-se nos lisossomas onde por ligações hidrofóbicas eletrostáticas, liga-se aos grupos fosfato da matriz lisossomal.

Dessa maneira, esse ensaio depende de dois fatores principais:

(1) número de células viáveis na cultura: existe uma correlação linear entre o vermelho neutro extraído de uma cultura e o número de células viáveis nessa cultura, o que implica na possibilidade de alterações tóxicas da proliferação celular modificarem os resultados.

(2) Os resultados são dependentes da viabilidade lisossomal precisa ou função das células. O termo "viabilidade de uma cultura" representa a porcentagem de células que expressam certas características reservadas às células vivas, por exemplo a exclusão de um corante como o Azul de Tripán. A retenção do Vermelho Neutro pelas células viáveis pode ser modificada por alterações na superfície celular ou nas membranas lisossomais (Repetto e Sanz, 1993).

1.8.1.2 Ensaio de determinação do conteúdo protéico

A razão para seleção desse ensaio de determinação do conteúdo protéico foi a consideração do fato da existência de uma velocidade ótima conhecida de proliferação celular na cultura contínua. Essa velocidade seria reduzida na presença de compostos químicos que por sua vez, afetariam uma ou mais funções citológicas essenciais como por exemplo, atividade mitocondrial, síntese de DNA, síntese protéica, etc. O ensaio

de determinação do conteúdo protéico é rápido e não requer o uso de produtos químicos radioativos ou outros equipamentos caros. O objetivo da determinação do conteúdo protéico é avaliar o material celular total o que é uma indicação do número total de células (Knox *e col.*, 1986; Renzi *e col.*, 1993).

1.8.1.3 Ensaio com MTT [Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)]

A clivagem do sal de tetrazólio a um produto de coloração azul denominado formazan pela uma enzima mitocondrial succinato dehidrogenase é um método potencialmente útil para realização de ensaios de sobrevivência celular e proliferação. A conversão ocorre somente em células vivas e a quantidade de formazan produzida é proporcional ao número de células viáveis presentes (Denizot e Lang, 1986).

1.8.2 Ensaio de toxicidade aguda utilizando a bactéria *Escherichia coli*

Testes de toxicidade aguda usando microrganismos vêm sendo largamente utilizados uma vez que possibilitam a obtenção de informações em curtos períodos de tempo. Apesar da toxicidade poder ser monitorada pela variação interna de ATP e DNA, outras inibições de funções vitais dos microrganismos podem ser mais facilmente medidas como por exemplo a respiração, parâmetro confiável para ser monitorado em um teste de toxicidade aguda.

A velocidade de produção de CO_2 pelo microrganismo reflete uma série completa de reações bioquímicas que constituem seu processo de respiração. Uma inibição nesse processo acarreta na alteração da quantidade de CO_2 produzida e mantida no meio de cultura aquoso.

Esse teste de toxicidade aguda utilizando a *Escherichia coli* adotado é uma técnica sofisticada e com alta taxa de reprodução para quantificar as respostas microbianas a agentes tóxicos (Moraes, 1995).

CAPÍTULO 2
OBJETIVOS

OBJETIVOS

2.1 Seleção de enzimas e sideróforos eficientes na biotransformação da violaceína.

2.2 Seleção de microrganismos eficientes na biotransformação da violaceína.

2.3 Tratamento da violaceína com as enzimas e microrganismos selecionados.

2.4. Seleção da enzima ou microrganismo mais adequado para realização da biotransformação em maior escala.

2.5 Análise do produto da biotransformação escolhida por técnicas espectroscópicas (CLAE, UV-Vis., IV, RMN ^1H , ^1H COSY, RMN ^{13}C e Massa) para tentativa de determinação de sua estrutura química.

2.6 Realização de testes de avaliação de toxicidade aguda e citotoxicidade com o produto obtido.

CAPÍTULO 3
MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Biossíntese da violaceína

3.1.1 Produção microbiana

Inoculou-se 1,0 mL de suspensão de *Chromobacterium violaceum* CCT 3496, crescida por 12 horas em agitador orbital à 30°C e 120 rpm, em 400 mL de um meio líquido (0,5% D-glucose; 0,5% peptona; 0,2% extrato de levedura; 0,002% L-triptofano) contidos em um frasco Erlenmeyer de 1000 mL. Dois desses frascos inoculados foram incubados à 30°C por 24h em agitador orbital à 120 rpm. A seguir, inoculou-se a suspensão de *C. violaceum* em oito tapetes de algodão (aproximadamente 10x20x0,5 cm) não esterilizados (90 mL/tapete) colocados em garrafas de Roux modificadas e não esterilizadas (p.ex. um tapete por garrafa). As oito garrafas foram incubadas à 30°C por 3 dias num bioreator de prateleiras (Rettori, 1996) com aeração. Ao término dessa etapa os algodões apresentam uma coloração violeta intensa indicando a produção intracelular do pigmento violaceína pela bactéria.

3.1.2 Extração e purificação

Os oito tapetes de algodão foram retirados das garrafas de Roux modificadas e lavados duas vezes com água destilada após de eliminado o excesso de meio de cultura existente. A violaceína foi extraída dos tapetes de algodão com 500 mL de etanol comercial a cada procedimento realizado. A solução de etanol foi filtrada e evaporada sob pressão reduzida. Purificou-se a massa obtida em sistema Soxhlet utilizando-se inicialmente como solvente o clorofórmio, para retirar impurezas lipídicas como restos de membranas de bactérias, a seguir utilizou-se o éter etílico e por fim, etanol.

O etanol foi evaporado à pressão reduzida obtendo-se então o extrato semi-purificado de violaceína. Esse extrato foi purificado por cristalização através de sua dissolução em mínima quantidade de metanol e adição gota a gota de água. O material

sedimentado foi centrifugado e seco em estufa à aproximadamente 100°C por 24h. Obteve-se 25-30 mg do extrato semi purificado de violaceína. Esse foi o material utilizado para caracterização e estudo de biotransformação com enzimas e microrganismos.

3.1.3 Caracterização

Amostras do extrato semi purificado de violaceína foram submetidas às seguintes análises espectroscópicas: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), ultra violeta-visível (UV-Vis.), infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de próton (RMN-¹H, COSY), ressonância magnética nuclear de carbono, além de espectrometria de massa (EM).

- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): para a injeção de amostra etanólica de violaceína utilizou-se um equipamento Shimadzu LC-10AD com vazão = 0,5 mL/min; fase estacionária = coluna analítica Shim-Pak C18; temperatura da coluna = temperatura ambiente (~25°C); fase móvel = 75% etanol : 25% água (% em volume); comprimento de onda do detector = 230 nm.

- Análise espectroscópica na região Ultravioleta-Visível (UV-Vis.): utilizou-se espectrofotômetro Hitachi U-2000 para a obtenção do espectro de solução etanólica da violaceína.

- Espectroscopia na região infravermelha (IV): utilizou-se o espectrômetro Bomen - modelo B 100 e a amostra de violaceína foi preparada em pastilha de KBr.

- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton (RMN ¹H) e de Correlação H-H (¹H COSY): utilizou-se o espectrômetro Bruker Ac 300/P, 500 MHz para a análise da amostra de violaceína dissolvida em DMSO-d₆.

- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ¹³C): utilizou-se o espectrômetro Bruker Ac 300/P, 500 MHz para a análise da amostra de violaceína dissolvida em DMSO-d₆.

- Espectrometria de massa (EM): utilizou-se espectrômetro de Massa VG Autospec - MICROMAR 70 eV.

3.2 Tratamento da violaceína via enzimática

As cinéticas das reações das biotransformações da violaceína em presença de enzimas foram realizadas em cubeta de quartzo de 1,0 mL de volume, 1,0 cm de caminho óptico e monitoradas por 30 minutos utilizando-se espectrofotômetro Beckman DU-70. O decaimento da intensidade no comprimento de onda de maior absorção da violaceína em meio tamponado (558 nm) foi utilizado para a determinação da taxa de conversão do substrato. Os coeficientes lineares obtidos das equações dos gráficos $\ln A_i - \ln A_f$ versus Tempo/min realizados para cada enzima, forneceram os valores das velocidades de cada reação.

Várias concentrações e pHs dos tampões fosfato de sódio e acetato de sódio foram testadas para as reações com as diferentes enzimas até a determinação daquele mais adequado à cada uma delas.

3.2.1 Biotransformação utilizando Peroxidase de raiz forte (HRP-VI) (Sigma)

O meio reacional tamponado (tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹ pH 7,6) continha violaceína (em etanol) 250 µmol.L⁻¹, HRP-VI (Sigma) 15 U.mL⁻¹ e H₂O₂ 4 µmol.L⁻¹ em volume final de 1000 µL. Os reagentes foram adicionados na ordem citada em um primeiro experimento e num segundo experimento, a ordem foi alterada para estudo da formação do Composto II da enzima.

O substrato 5-hidroindol também foi submetido à biotransformação com essa enzima sob idênticas condições, funcionando como modelo de reação para a violaceína.

3.2.1.1 Determinação da atividade da enzima de raiz forte (HRP-VI) (Sigma)

A atividade da enzima de raiz forte (HRP-VI) foi determinada utilizando-se o-dianisidina como substrato enzimático. A mistura de reação continha 0,6 mL da solução de enzima preparada, 0,2 mL de tampão citrato-fosfato $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 5,0, 0,1 mL de o-dianisidina $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ e 0,1 mL de H_2O_2 num volume final de 1,0 mL. A reação teve início pela adição da o-dianisidina e a velocidade de oxidação ($\epsilon_{460}=29400 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) desta foi acompanhada durante 5 minutos a 460 nm. Uma unidade de atividade de raiz forte (HRP-VI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar $1 \mu\text{mol}$ de substrato por minuto e por litro da solução de enzima preparada (Szkларz *e col.*, 1989).

3.2.2 Biotransformação utilizando Lactoperoxidase (LPO) comercial (Sigma)

A reação de biotransformação da violaceína em presença de LPO foi realizada nas mesmas condições adotadas para a biotransformação da violaceína em presença de HRP-VI, sem no entanto realizar o experimento com o 5-hidroxiindol.

3.2.3 Biotransformação utilizando Lacase (Lac) obtida a partir do cultivo do fungo *Trametes versicolor* CCT 4521

O volume final do meio reacional tamponado (tampão acetato de sódio 50 mmol.L^{-1} pH 5,0) foi de $1000 \mu\text{L}$ e continha violaceína (em etanol) $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$, Lac 2500 U.L^{-1} e H_2O_2 $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$. A reação com a adição do mediador 1-hidroxibenzotriazol (HBT) $80 \mu\text{mol.L}^{-1}$ também foi realizada para estudo de sua influência na cinética da reação. Os reagentes foram adicionados na ordem citada em um primeiro experimento e num segundo experimento, a ordem foi alterada para estudo comparativo às demais reações.

3.2.3.1 Produção da enzima Lacase

A Lacase utilizada foi obtida a partir do cultivo de *Trametes versicolor* CCT 4521 em ágar extrato de malte acrescido de ácido ferúlico ($0,25 \text{ mmol.L}^{-1}$) por 20 dias em estufa à 28°C . A lacase foi então extraída do meio sólido com tampão acetato 20 mmol.L^{-1} pH 5,0 após 30 minutos de agitação à 30°C e 120 rpm. O caldo enzimático obtido foi filtrado em membrana Millipore $0,45 \mu\text{m}$ seguido de liofilização. A atividade da enzima foi determinada pela oxidação da siringaldazina ($\epsilon_{525}=65.000 \text{ L.mol}^{-1}\text{.cm}^{-1}$) até sua forma quinona. A reação foi conduzida numa mistura contendo 0,6 mL da solução de enzima preparada, 0,3 mL de tampão citrato-fosfato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 5,0 e 0,1 mL de siringaldazina $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$, num volume final de 1,0 mL. A reação teve início pela adição da siringaldazina e a velocidade de oxidação do substrato foi acompanhada durante 5 minutos a 525 nm. Uma unidade de atividade de Lacase foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar $1 \mu\text{mol}$ de substrato por minuto e por litro da solução de enzima preparada (Szklarz e col., 1989).

3.2.4 Biotransformação utilizando "pool" de Lignina peroxidase e Manganês peroxidase - LiP/MnP obtido pelo cultivo do fungo *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725

O volume do meio reacional tamponado (tampão fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} pH 7,6) contendo violaceína (em etanol) $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$, "pool" enzimático 65 U.mL^{-1} LiP / $1,5 \text{ U.L}^{-1}$ MnP, álcool veratrílico $5,7 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e H_2O_2 $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ foi de $1000 \mu\text{L}$. Os reagentes foram adicionados na ordem citada em um primeiro experimento e num segundo experimento, a ordem foi alterada para estudo da formação do Composto II da enzima.

3.2.4.1 Produção do "pool" enzimático LiP/MnP

a. Meio de manutenção:

O fungo de *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 liofilizado foi reidratado e repicado em placas de Petri com meio de cultura contendo extrato de

malte-ágar 5% e pH 5,4. A incubação foi feita em estufa à 37°C por 5 dias ou até o crescimento atingir toda a extensão da placa, sendo considerado então como máxima esporulação.

b. Preparação da suspensão de esporos:

Após cinco dias, as placas de Petri contendo o meio citado foram lavadas com água esterilizada e a suspensão resultante filtrada em funil contendo lã de vidro, também previamente esterilizado. Uma alíquota de 1 mL foi retirada da solução filtrada e após diluição à 5 mL, sua absorbância foi medida a 650 nm para determinação de sua concentração conforme descrito pela relação abaixo (Linko, 1986):

$$\text{número de esporos} / \text{mL} = \frac{\text{abs} \cdot 5 \cdot 10^6}{0,1843}$$

c. Inoculação da suspensão de esporos:

A suspensão de esporos obtida foi inoculada em Erlenmeyers contendo 75 mL de meio de cultura para crescimento do fungo e 1,7 g de Nylon (marca 3M) cortado em pedaços de 0,5x1x1 cm, utilizado como suporte. O volume da suspensão de esporos inoculado foi o correspondente a $2,2 \times 10^5$ esporos/mL conforme o autor Linko (1986) descreveu. Os Erlenmeyers foram incubados sob agitação à 150 rpm e 37°C.

Após redução e estabilização dos açúcares redutores, álcool veratrílico e Tween-80 (concentrações finais de 0,6 mmol.L⁻¹ e 0,13% respectivamente) foram adicionados ao meio de crescimento e a agitação foi reduzida à 60 rpm.

Nos dias seguintes à ativação com álcool veratrílico, pulsos de oxigênio (vazão entre 10 e 15 L/h) com duração de 2 minutos foram dados às amostras contendo o meio de crescimento e o fungo inoculado.

d. Meio sintético para crescimento do fungo:

O meio sintético, limitado em nitrogênio, foi preparado para o crescimento do fungo *P. chrysosporium* conforme descrito pelos autores Linko e Zhong (1987) contendo no entanto, algumas modificações. Para a preparação de 1000 mL de meio sintético final adicionou-se:

- 500 mL da solução tampão tartarato 0,04 mol.L⁻¹;
- 20 mL de solução de glicose 10%;
- 1 mL de solução de vitaminas (não deve ser esterilizada em autoclave);
- 479 mL de água destilada.

e. Preparação do tampão tartarato:

Os reagentes da tabela 01 foram dissolvidos com aproximadamente 800 mL de água destilada adicionou-se ainda 21,8 mL de H₃PO₄ 1 mol.L⁻¹ e 2 mL da solução de elementos traço. Ajustou-se o pH da solução em 4,5 com NaOH (5 mol.L⁻¹) e completou-se o volume a 1000 mL.

O tampão foi esterilizado juntamente com 500 mL de água destilada e 50 mL de glicose 10% em autoclave à 1 atm e 120°C por 15 minutos.

Tabela 02: Composição do tampão tartarato 0,04 mol.L⁻¹ pH 4,5 empregado na formulação do meio de cultura sintético usado para o crescimento do fungo *Phanerochaete chrysosporium*.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO (g.L ⁻¹)
Ácido (L+) tártico	6,00
Sulfato de magnésio heptaidratado	1,00
Cloreto de cálcio hexaidratado	0,20
Sulfato de ferro heptaidratado	36,00 x 10 ⁻²
Tartarato de amônio	1,32

f. Preparação da solução de elementos traço:

A solução de elementos traço foi preparada contendo os elementos relacionados na tabela 03 a seguir. O volume da solução estoque preparada foi de 100 mL.

Tabela 03: Composição da solução de elementos traço empregada na formulação do meio de cultura sintético usado para o crescimento do fungo *Phanerochaete chrysosporium*.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO (g.L ⁻¹)
Sulfato de manganês monoidratado	1,00
Sulfato de zinco heptaidratado	3,00
Sulfato de cobre pentaidratado	0,01
Cloreto de cálcio hexaidratado	1,00
Sulfato de alumínio e potássio dodecaidratado	0,01
Ácido bórico	0,01
Molibdato de sódio	0,01
Nitriloacetato de sódio	1,50

g. Preparação da solução de vitaminas:

Para a preparação de 100 mL da solução de vitaminas, dissolveu-se a biotina em água quente (~15 mL) e adicionou-se 3 a 4 gotas de NaOH 5 mol.L⁻¹. Os demais reagentes (tabela 03) foram dissolvidos em água destilada. A solução de vitaminas foi esterilizada por filtração (Filtro Millex, poro 0,22 µm), diluída à 100 mL e finalmente estocada à 4°C.

Na preparação do meio sintético, esta solução foi diluída dez vezes assim, para 1000 mL de meio de cultura sintético utilizou-se 1 mL da solução de vitaminas estocada.

Tabela 04: Composição da solução de vitaminas empregada na formulação do meio de cultura sintético usado para o crescimento do fungo *Phanerochaete chrysosporium*.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO (g.L ⁻¹)
Biotina	0,04
Ácido fólico	0,04
Riboflavina	0,10
Ácido p-aminobenzóico	0,10
Ácido tióico	0,10
Cianocobalamina	2,00 × 10 ⁻³
Piridoxina	0,20
Ácido nicotínico	0,10
Dicloreto de tiamina	1,00
DL pantotenato de cálcio	0,10

h. Determinação de açúcares redutores:

Essa determinação foi realizada utilizando-se o Método do DNS (Miller, 1959).

Para a preparação de 1000 mL do reagente DNS utilizou-se:

- Ácido 3,5 dinitrosalicílico	10,0 g
- Hidróxido de sódio 2 mol.L ⁻¹	300,0 mL
- Tartarato de sódio e potássio	300,0 g
- Fenol 50%	4,0 mL
- Bissulfito de sódio 35%	1,4 mL

Adicionou-se ao DNS um pouco de água e o NaOH, sob agitação e ligeiro aquecimento até completa dissolução. A adição do tartarato de sódio e potássio foi efetuada lentamente e o volume final levado à 1000 mL com o restante de água. O fenol e o bissulfito de sódio foram adicionados somente ao volume de solução desejado para uso.

Para a determinação de açúcares redutores adicionou-se à 1,5 mL do reagente DNS, 0,75 mL de amostra previamente centrifugada à 3000 rpm por 5 minutos. A mistura foi incubada em banho térmico à 100°C por 5 minutos. Após esse período a amostra foi resfriada à temperatura ambiente e a absorbância medida em

comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram interpolados na curva padrão de glicose obtida:

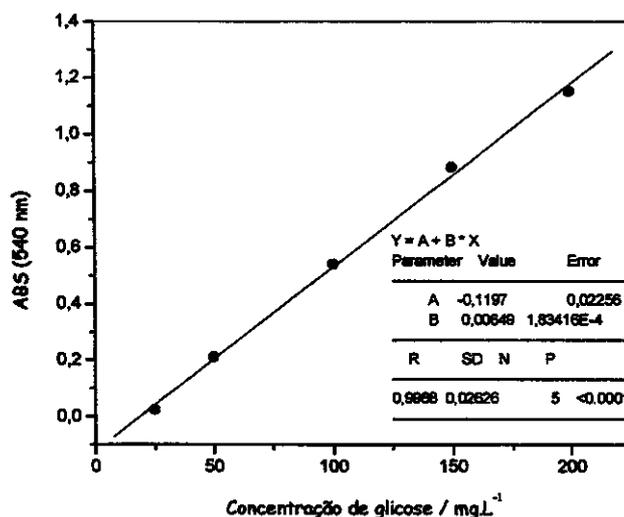


Gráfico 01: Curva de calibração da glicose.

i. Determinação da atividade da enzima Lignina peroxidase (LiP):

A atividade da enzima LiP foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico a aldeído veratrílico segundo metodologia modificada dos autores Tien e Kirk (1984). Foram adicionados 250 μL de caldo de cultivo filtrado a 50 μL de H_2O_2 10 mmol.L^{-1} , 125 μL de uma solução de álcool veratrílico 4,0 mmol.L^{-1} em tampão tartarato de sódio 0,33 mmol.L^{-1} pH 3,0 e 450 μL de água destilada. O aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado medindo-se absorvância a 310 nm ($\epsilon_{310}=9300 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Uma unidade de Lignina peroxidase corresponde à quantidade de enzima que oxida 1,0 μmol de álcool veratrílico por minuto por mL.

j. Determinação da atividade da enzima Manganês peroxidase (MnP):

A atividade da enzima MnP foi determinada adicionando-se a 100 μL de vermelho de fenol 0,1% 100 μL de lactato de sódio 250 mmol.L^{-1} , 200 μL de albumina bovina 0,5%, 50 μL de H_2O_2 2 mmol.L^{-1} em tampão succinato de sódio 20 mmol.L^{-1} pH

4,5. A solução resultante foi incubada por 5 minutos à 30°C e a reação foi interrompida pela adição de 40 µL de NaOH 2 mmol.L⁻¹. A absorvância foi medida a 610 nm ($\epsilon_{610}=4460 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) e uma unidade de Manganês peroxidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1,0 µmol de vermelho de fenol por minuto por litro (Michel *e col.*, 1991).

3.3 Análise dos produtos obtidos pela biotransformação da violaceína e do 5-hidroindol utilizando-se a enzima comercial HRP-VI

Os produtos biotransformados foram extraídos do meio reacional utilizando-se acetato de etila como solvente, foram secos com MgSO₄ e filtrados. Placas cromatográficas foram realizadas utilizando-se como fase móvel acetato de etila e hexano (9:2). Após a eluição, efetuou-se um teste (reação de Salkowsky) para a verificação da presença ou não de grupos indólicos nas estruturas dos compostos obtidos.

3.3.1 Teste pela reação de Salkowsky

Este teste permite a identificação de grupos indólicos em determinada substância e consiste na borrifação de uma solução spray sobre a placa seguida de aquecimento à 60°C por 5 minutos. Vapores de água régia podem ser utilizados para intensificação das colorações. A solução spray foi obtida pela mistura de 3 mL de solução aquosa de cloreto de ferro (III) 1,5 mol.L⁻¹ com 100 mL de água destilada e 60 mL de ácido sulfúrico 97 % (Merck Catalog, 1971).

3.3.2 Tentativa de caracterização do produto de reação da violaceína com a enzima comercial HRP-VI

Após realização do teste, o solvente da amostra do produto obtido pela transformação da violaceína foi evaporado sob pressão reduzida e a amostra

purificada por cromatografia em placa delgada. Esse produto final foi submetido às mesmas técnicas e condições espectrométricas realizadas com a amostra de violaceína.

3.4 Ensaios biológicos realizados com o produto obtido pela biotransformação da violaceína utilizando-se a enzima comercial HRP-VI

3.4.1 Ensaios citotóxicos em células de mamíferos

A avaliação da citotoxicidade do produto obtido foi realizada com a colaboração do grupo da Prof^a. Marcela Haun (Laboratório de Cultura de Células, Instituto de Biologia - UNICAMP).

3.4.1.1 Manutenção das células

As células utilizadas nos experimentos foram do tipo fibroblástico, linhagem estabelecida em cultura V-79 e oriundas de pulmão de hamster chinês. Os fibroblastos foram mantidos em cultura contínua através de repiques periódicos ao atingirem a densidade de semi-confluência. As células foram descoladas da parede do recipiente usando solução de ATV (Associação Tripsina 0,1% - Versene 0,016%). Homogenizou-se uma alíquota dessa suspensão celular com uma quantidade equivalente de solução de Azul de Tripán 0,1% e determinou-se o número de células viáveis para o cultivo e plaqueamento por contagem em câmara de Neubauer, excluindo-se as células que incorporaram o corante. O cultivo foi realizado em meio DMEM (Meio Eagle modificado por Dulbecco) contendo 11 U.mL⁻¹ de penicilina, 100 µg.mL⁻¹ de sulfato de estreptomicina e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). A incubação foi feita em estufa à 37°C sob atmosfera úmida e contendo 5% de CO₂.

O composto utilizado nesse estudo foi dissolvido diretamente em DMEM previamente ao tratamento. Para os três tipos de ensaios realizados, descritos a seguir, o plaqueamento foi realizado inoculando-se 3x10⁴ células.mL⁻¹ em cada cavidade

da placa (96 cavidades) e incubando-se à 37°C por 48h (Melo, 1996). As células foram tratadas durante 24h com diferentes concentrações do produto (2,5 a 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). A citotoxicidade é expressa por valores de IC_{50} que representa a concentração da droga que inibe 50% da proliferação celular.

3.4.1.2 Ensaio com Vermelho Neutro (2-amino-3metil-7-dimetil-amino-cloreto de fenanzina)

Depois da inoculação das células e tratamento com o produto à diferentes concentrações, o meio foi removido e trocado por um outro contendo 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do corante vermelho neutro (VN), previamente incubado durante 12h à 37°C e filtrado em membrana Millipore (0,22 μm). Após 3 horas de incubação, as células foram lavadas com PBS- Ca^{2+} à 37°C para retirada do excesso de corante não incorporado pelos lisossomas. À cada cavidade foi adicionado 1 mL de uma solução aquosa contendo ácido acético glacial 1% e etanol 50% para fixar as células e extrair o corante VN incorporado nos lisossomas. As placas foram agitadas por 20 minutos em um agitador de placas e as absorbâncias das soluções foram medidas em 540 nm. O valor de IC_{50} foi obtido por interpolação do valor de A_{540} em um gráfico de captação de corante por células tratadas (com relação ao controle) versus concentração do composto. O experimento foi realizado em triplicata (Riddell *et al.*, 1986).

3.4.1.3 Ensaio de determinação do conteúdo protéico

A mesma placa usada para o ensaio com vermelho neutro, contendo ainda a monocamada de células fixadas no fundo das cavidades sem a presença do corante VN, foi reutilizada para realização do ensaio de determinação do conteúdo protéico. As células foram secas sob temperatura ambiente e lisadas com NaOH 0,5 mol.L^{-1} (1 mL/cavidade) por 1h à 37°C. A absorbância do lisado foi medida em comprimento de onda 260 nm. O crescimento relativo das células tratadas com o produto foi expresso por porcentagem em relação ao controle (células sem tratamento sob idênticas

condições experimentais). O valor de IC_{50} do produto foi obtido pela interpolação do dado de A_{260} (nº de células no lisado) em um gráfico de proliferação celular versus concentração do composto. O experimento foi realizado em triplicata (Cingi e col., 1991).

3.4.1.4 Ensaio com MTT [Brometo de (3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)]

Após incubação das células com a droga por 24h, o meio foi removido e trocado por outro sem soro contendo o corante amarelo MTT 1mg.mL^{-1} . As células foram incubadas por 5h, tempo necessário para o corante ser reduzido pelas células viáveis à um composto azul (formazan), insolúvel em água. O meio foi retirado cuidadosamente e para solubilização do formazan, adicionou-se 1 mL de etanol. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância da solução de cada cavidade foi medida espectrofotometricamente em 570 nm. O valor de IC_{50} para o composto foi obtido por interpolação do valor de A_{570} em um gráfico de captação de corante por células tratadas (com relação ao controle) versus concentração do composto. O experimento foi realizado em triplicata (Denizot e Lang, 1986).

3.4.2 Ensaio de toxicidade aguda *in vitro*

3.4.2.1 Cultura da bactéria

A avaliação da toxicidade aguda do produto obtido foi realizada com a bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922 como organismo indicador. A bactéria foi mantida em cultura contínua através de repiques em placas contendo meio sólido ágar-sangue incubadas à 37°C por 48 horas. Estas placas foram armazenadas sob refrigeração (tempo de meia-vida de 15 dias) até a realização do experimento.

3.4.2.2 Preparação do meio de cultura

O meio líquido para o crescimento da bactéria, foi obtido pela dissolução dos componentes da tabela 05 (com exceção da glicose) em 800 mL de água deionizada e ajustando-se o pH em 7,2. A glicose foi diluída em 200 mL de água deionizada

esterilizada separadamente ao meio de cultura. Após resfriamento, as soluções foram misturadas em condições estéreis e guardadas sob refrigeração.

Tabela 05: Composição do meio de cultura necessário para o crescimento da bactéria *Escherichia coli*.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO (g.L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	7,00
KH ₂ PO ₄	3,00
Ácido cítrico	0,50
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,00
MgSO ₄	0,20
Glicose	20,00

3.4.2.3 Realização do ensaio

O meio de cultura foi inoculado com a bactéria *E. coli* (organismo teste) e a concentração de CO₂ produzido pela respiração microbiana foi monitorada até atingir 0,5 mmol.L⁻¹. O frasco foi mantido em banho termostatizado à 37°C. Aliquotas de 40 mL do meio contendo a bactéria foram transferidas para Erlenmeyers de 125 mL e inoculadas com 560 µL da amostra de violaceína biotransformada. O pH das alíquotas foi ajustado para 7,0. Paralelamente monitorou-se um controle do crescimento bacteriano no qual 560 µL de água destilada foram adicionados ao invés da amostra. As determinações foram feitas a cada 20 minutos, finalizando o experimento em 4 horas. A concentração de CO₂ nos frascos foi obtida pela interpolação dos dados em uma curva de calibração (gráfico 02) realizada previamente (Moraes, 1995).

Uma solução de tetraciclina foi utilizada como padrão positivo do teste, apresentando uma inibição de aproximadamente 50% na respiração da bactéria em relação ao controle (Durán *et al.*, 1998).

3.4.2.4 Obtenção da curva de calibração

Primeiramente preparou-se um volume de 100 mL de uma solução estoque de Na₂CO₃ 100 mmol.L⁻¹ (previamente seco em estufa à 120°C por 1 hora). Em seguida

preparou-se a partir da solução estoque, soluções com concentrações de 0,25; 0,5 ; 1,0 ; 2,0 ; 3,0 mmol.L⁻¹ de Na₂CO₃. Amostras dessas soluções (135 µL) foram injetadas no sistema FIA (Análise de Injeção em Fluxo) condutimétrico para obtenção da curva de calibração.

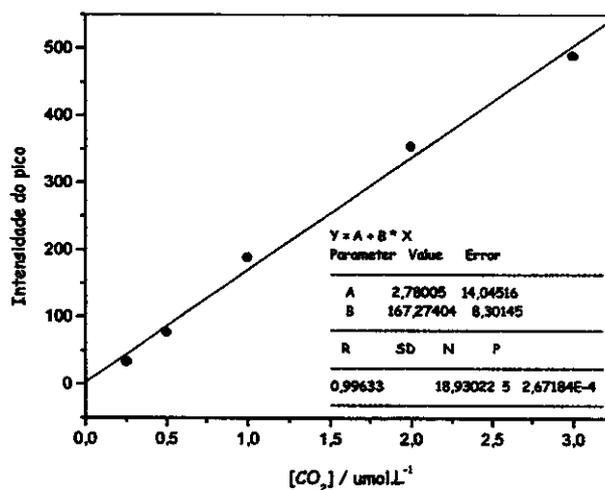


Gráfico 02: Curva de calibração de CO₂.

3.5 Tratamento da violaceína via microrganismos

3.5.1 Biotransformação da violaceína utilizando os fungos *Trametes versicolor* CCT 4521, *Lentinus edodes* CCT 4519, *Trametes villosa* CCT 5567 e *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 e as bactérias *Azotobacter vinelandii* 1228-ESALQ e *Pseudomonas putida* CCT 0598 em meio sólido

3.5.1.1 Meios de manutenção

(1) *Trametes versicolor*, *Lentinus edodes*, *Trametes villosa*: foram mantidos e repicados semanalmente em Placas de Petri contendo o meio ágar-extrato de malte 5%, pH 5,4 aproximadamente. A incubação foi realizada à 28°C por cinco a dez dias ou até o crescimento atingir toda a extensão da placa (máxima esporulação).

(2) *Phanerochaete chrysosporium*: foi mantido e repicado semanalmente em Placas de Petri contendo o meio extrato de malte 2% e pH 5,4 aproximadamente. A incubação foi realizada à 30°C por cinco a dez dias ou até máxima esporulação.

(3) *Pseudomonas putida*: foi mantida e repicada semanalmente em Placas de Petri contendo o meio ágar 5%, pH 5,4 aproximadamente. A incubação foi realizada à 30°C por três a cinco dias.

(4) *Azotobacter vinelandii*: foi mantida e repicada semanalmente em Placas de Petri contendo o seguinte meio de cultura (Catálogo de Linhagens da Fundação de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", 1996):

Tabela 06: Composição do meio de manutenção utilizado para o crescimento da bactéria *Azotobacter vinelandii*.

COMPONENTES	QUANTIDADE
Glicose	5,00 g
Manitol	5,00 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,10 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	0,10 g
Na ₂ Mo ₄ . 2H ₂ O	5,00 mg
K ₂ HPO ₄	0,90 g
KH ₂ PO ₄	0,10 g
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	0,01 g
CaCO ₃	5,00 g
Ágar	15,00 g
Água destilada	950,00 mL

O pH do meio de cultura preparado foi acertado em 7,3 e a esterilização foi realizada à 120°C e 1 atm. A glicose e o manitol foram colocados em 50 mL de água destilada e autoclavados separadamente. Em seguida foram adicionados ao meio de cultura. A incubação da bactéria *Azotobacter vinelandii* também foi realizada à 30°C por três a cinco dias.

3.5.1.2 Condições de inoculação e cultivo

Discos de tamanho padronizado (0,8 x 0,8 x 0,2 cm) retirados dos meios de manutenção dos fungos (1) e (2) crescidos, foram utilizados para inocular placas contendo ágar-dextrose-batata (39 g.L⁻¹) e violaceína 0,06% (dissolvida em etanol). Para as bactérias, a inoculação foi feita com o auxílio de alça a partir de Placas de Petri contendo as bactérias crescidas no meio de manutenção. A violaceína foi esterilizada em autoclave juntamente com o meio de cultura em um dos procedimentos adotados e no outro, foi adicionada ao meio (já esterilizado) por filtração em filtro Millipore estéril (0,22 µm). Ambos experimentos foram realizados em triplicata utilizando-se controle de crescimento dos microrganismos e controle de coloração do meio durante todo o experimento.

Os fungos (1) foram mantidos à 28°C e os diâmetros de crescimento e halos de descoloração foram medidos com régua diariamente até completa descoloração pelos fungos.

Os microrganismos (2), (3) e (4) foram mantidos à 30°C e seus crescimentos e descoloração do meio foram verificados diariamente até completa descoloração pelos mesmos.

A cada placa de Petri descolorida completamente pelo microrganismo, amostras foram retiradas para determinação de atividade das enzimas Lignina peroxidase, Manganês peroxidase, Lacase e determinação da presença de sideróforos.

3.5.1.3 Determinação das atividades enzimáticas

As enzimas foram extraídas do meio sólido utilizando-se tampão citrato-fosfato 20 mmol.L⁻¹ pH 5,0. As culturas foram filtradas em membrana Millipore (0,45 µm) e as atividades das enzimas LiP, MnP e Lac determinadas no caldo de cultura filtrado conforme metodologias descritas no item 3.2.

3.5.1.4 Determinação de sideróforos

As amostras submetidas à determinação de sideróforos foram extraídas com tampão acetato de sódio $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ e pH 4,0. A 500 μL de amostra foram adicionados 500 μL da solução de Cromo Azurol (CAS) e após 24h a mistura de reação foi medida espectrofotometricamente em comprimento de onda 630 nm (Schwyn e Neilands, 1987). Uma alíquota do tampão usado para a extração foi utilizada como branco.

3.5.2 Biotransformação da violaceína utilizando os fungos *Trametes versicolor* CCT 4521, *Lentinus edodes* CCT 4519, *Trametes villosa* CCT 5567 e *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 e as bactérias *Azotobacter vinelandii* 1228 (ESALQ) e *Pseudomonas putida* CCT 0598 em meio líquido

3.5.2.1 Meio de manutenção

O meio de manutenção utilizado foi o mesmo descrito no item 3.5.1.1.

3.5.2.2 Condições de inoculação e cultivo

Inicialmente toda a vidraria utilizada foi submetida à uma lavagem na tentativa de eliminar ao máximo o ferro contido no vidro. O material foi colocado de molho em uma solução de HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ seguida de imersão em solução de EDTA 100 mmol.L^{-1} . Logo depois, a vidraria foi enxaguada com HNO_3 2% e finalmente com água deionizada.

O meio de cultura líquido utilizado foi preparado conforme descrito por Durán e col. (1999_a) (Tabela 07).

Tabela 07: Composição do meio de cultura líquido utilizado no experimento de biotransformação da violaceína pelos fungos *Trametes versicolor*, *Lentinus edodes*, *Trametes villosa* e *Phanerochaete chrysosporium* e as bactérias *Azotobacter vinelandii* e *Pseudomonas putida*.

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO (g.L ⁻¹)
Sacarose	20,00
Bactocasaminoácidos	2,00
K ₂ HPO ₄	1,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50

Para a inoculação dos microrganismos no meio de cultura líquido, adicionou-se quatro discos de tamanho padronizado (0,8 x 0,8 x 0,2 cm) em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura. Estes frascos foram colocados em agitador orbital à 120 rpm e 30°C. Após o terceiro dia de crescimento dos microrganismos, foram retiradas alíquotas dos frascos para determinação das atividades enzimáticas e presença de sideróforos (conforme item 3.5.1.4). A violaceína (40 mg/1000µL etanol/Erlenmeyer) foi adicionada através de filtração estéril com filtro Millex 0,22 µm de poro. As absorbâncias das soluções dos frascos foram medidas a 558 nm (comprimento de onda de máxima absorção da violaceína) em espectrofotômetro Beckman DU-70.

Para cada microrganismo empregado no experimento, preparou-se dois Erlenmeyers controles de crescimento, um controle de coloração (violaceína no meio de cultura) e quatro contendo o microrganismo em crescimento e a violaceína. Alíquotas de 1000 µL foram retiradas em diferentes intervalos de tempo do experimento, centrifugadas à 2000 rpm por 5 minutos e submetidas à leitura espectrofotométrica para acompanhamento da descoloração do pigmento na solução.

3.5.3 Estudo do efeito da adsorção da violaceína nos "pellets" de inóculo dos microrganismos utilizados para biotransformação

O meio de manutenção utilizado para os microrganismos foi o mesmo descrito anteriormente (item 3.5.1.1) assim como o meio líquido utilizado (item 3.5.2.2).

Em Erlenmeyers de 125 mL adicionou-se 50 mL de meio de cultura e para a inoculação dos microrganismos no meio adicionou-se quatro discos de tamanho padronizado (0,8 x 0,8 x 0,2 cm) a cada Erlenmeyer. Estes frascos foram colocados em agitador orbital à 120 rpm e 30°C. Após o terceiro dia de crescimento dos microrganismos, os frascos foram autoclavados durante 20 minutos à 1 atm e 121°C e pesados. Adicionou-se aos frascos do experimento a violaceína (40 mg/1000µL etanol/Erlenmeyer) através de filtração estéril com filtro Millex 0,22 µm de poro.

No experimento havia um Erlenmeyer controle de crescimento (sem adição de violaceína) e dois contendo o microrganismo morto e a violaceína para cada microrganismo. Todos os frascos foram recolocados sob agitação orbital à 120 rpm e 30°C. Em variados intervalos de tempo foram retiradas dos frascos alíquotas de 1000µL para realização de medidas espectrofotométricas a 558 nm e consequente determinação da quantidade de violaceína adsorvida pela massa microbiana morta. Os controles do experimento foram utilizados como branco para as leituras. Ao final do experimento os frascos Erlenmeyers vazios foram pesados novamente para determinação do peso da massa microbiana contida em cada um.

CAPÍTULO 4
BIOSSÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO
DA VIOLACEÍNA

BIOSSÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DA VIOLACEÍNA

4.1 Biossíntese da violaceína

A produção e extração seguiram metodologia descrita por Rettori (1996). Após a etapa de cristalização, a quantidade de extrato bruto obtida é de aproximadamente 25-30 mg e o tempo gasto para tanto varia de três a quatro semanas.

4.2 Caracterização da violaceína

Observou-se os seguintes aspectos para cada análise realizada:

- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): por esta técnica determinou-se o tempo de eluição da amostra de violaceína em etanol, utilizando-se água e etanol (25:75) V/V como fase móvel. A violaceína mostrou um tempo de retenção de 5,56-6,34 minutos.

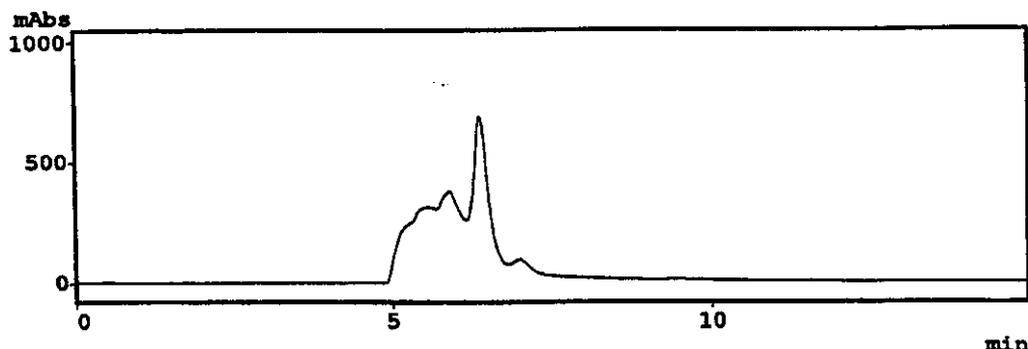


Figura 06: Cromatograma da amostra de violaceína em etanol.

- Análise espectroscópica na região Ultravioleta-Visível (UV-Vis.): pelo espectro obtido (figura 07) observou-se que a amostra de violaceína em etanol apresentou o máximo de absorção em comprimento de onda 574 nm, além de absorções menores em 266, 368 nm que condizem com os da literatura (Riveros *e col.*, 1988).

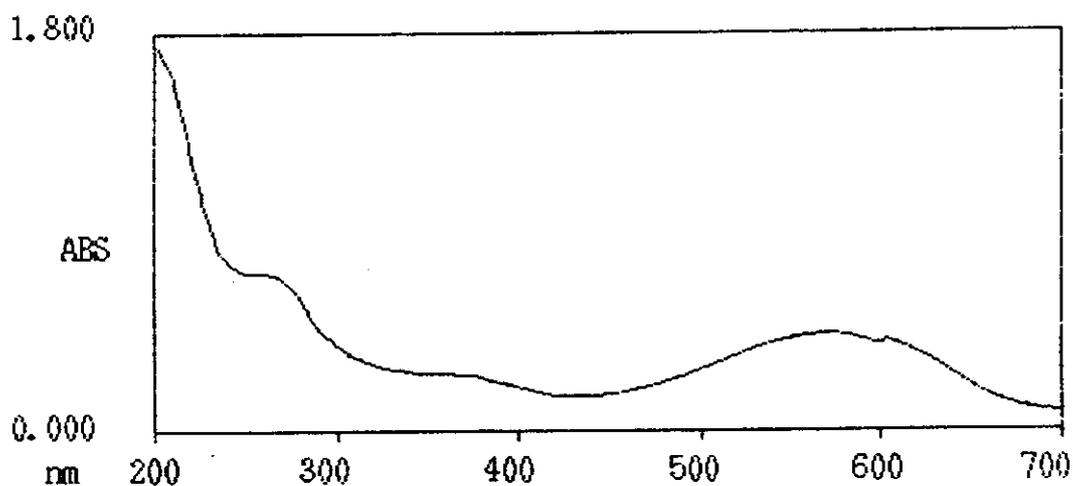


Figura 07: Espectro UV-Vis. da amostra de violaceína em etanol (1 mmol.L^{-1}).

O núcleo indólico da violaceína interage fortemente com o sistema de dilactama conjugada da molécula, o que leva-nos a confirmar que a violaceína possui um cromóforo merocianínico esquematizado a seguir (Laatsch *et al.*, 1984):

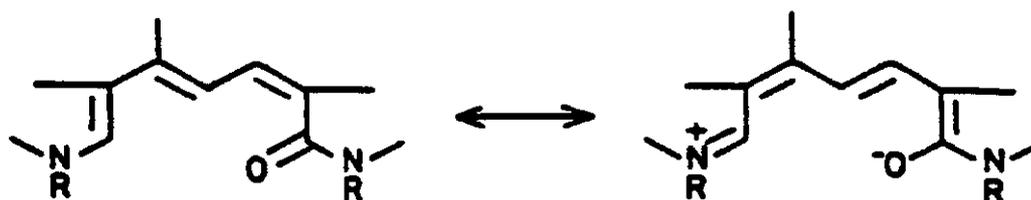


Figura 08: Ressonância do cromóforo merocianínico existente na molécula de violaceína.

- Espectroscopia na região infravermelha (IV): a presença de bandas características da violaceína pode ser observada no espectro de infravermelho obtido (figura 09) e confirmadas de acordo com a literatura (Riveros *et al.*, 1988; Laatsch *et al.*, 1984) apesar de pequenas alterações nos valores devido ao preparo da amostra realizado. A banda larga em 3400 cm^{-1} corresponde à frequência de deformação axial

do O-H; a banda em 3250 cm^{-1} refere-se à ν N-H; em $2900\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ aparece a absorção relacionada à vibração do estiramento da ligação C-H; em 1655 e 1701 cm^{-1} as bandas relativas ao ν C=O e em 1618 cm^{-1} a banda correspondente ao ν C=C. A presença da banda em 2300 cm^{-1} é atribuída ao CO_2 atmosférico.

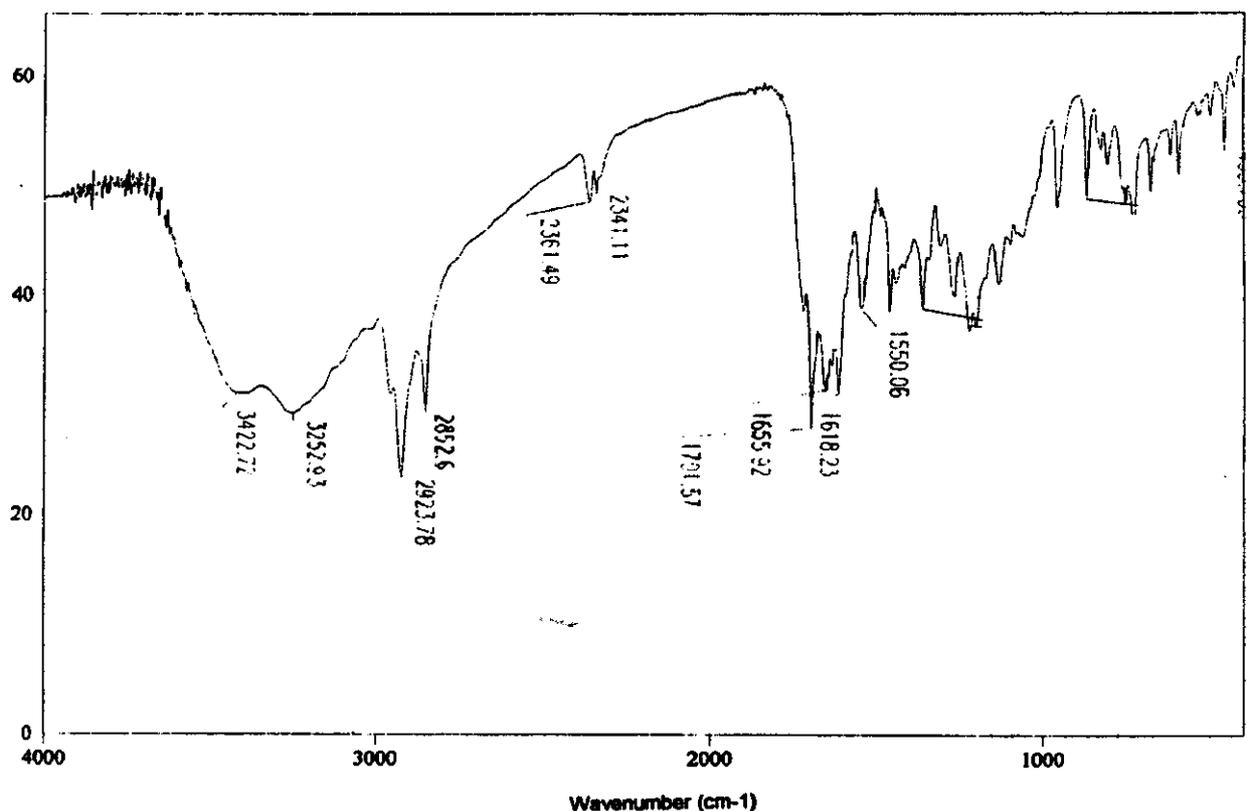


Figura 09: Espectro na região IV da amostra de violaceína em pastilha de KBr.

• Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H) e Espectroscopia de Correlação H-H (^1H COSY): pelo espectro desacoplado de RMN ^1H (figura 10), apesar das impurezas, é possível observar a presença de todos os picos que caracterizam a violaceína. Na tabela 08 encontram-se os valores dos deslocamentos obtidos assim como aqueles provenientes da literatura (Hoshino *et al.*, 1987_a).

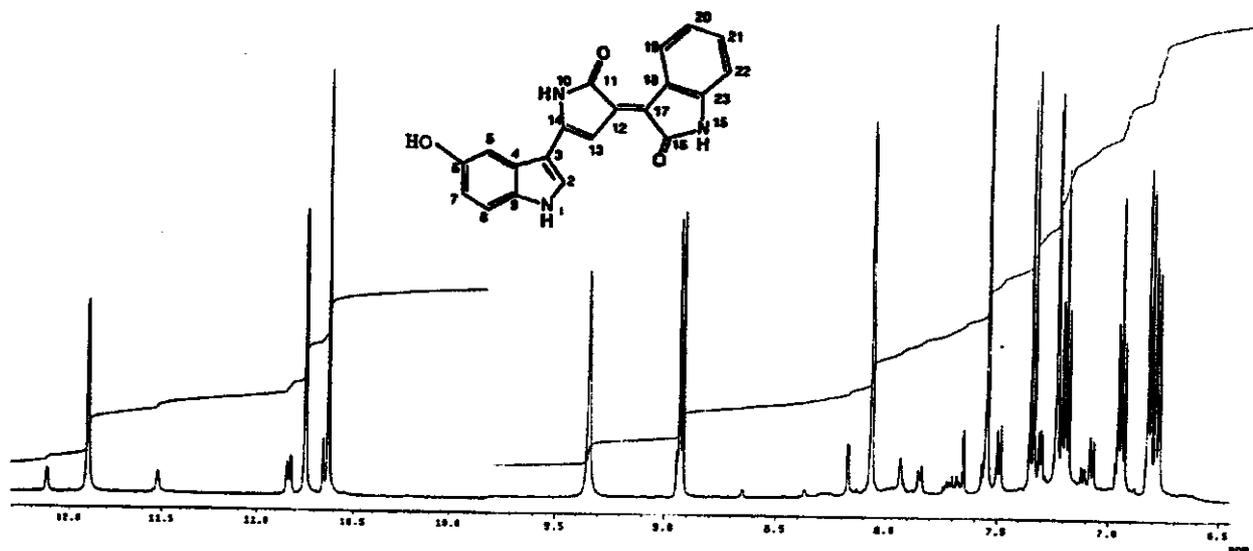


Figura 10: Espectro de RMN ^1H da amostra de violaceína em DMSO-d_6 .

Tabela 08: Valores de RMN ^1H da violaceína em DMSO-d_6 .

POSIÇÃO	DESLOCAMENTOS OBTIDOS	DESLOCAMENTOS DA LITERATURA*	POSIÇÃO	DESLOCAMENTOS OBTIDOS	DESLOCAMENTOS DA LITERATURA*
1	11,90 (s)	11,89 (s)	13	7,55 (d)	7,55 (d)
2	8,07 (d)	8,07 (d)	14	-	-
3	-	-	15	10,63 (s)	10,64 (s)
4	-	-	16	-	-
5	7,24 (d)	7,24 (d)	17	-	-
6	9,35 (s)	9,35 (s)	18	-	-
7	6,79(dd)	6,78 (dd)	19	8,91 (dd)	8,93 (dd)
8	7,35 (d)	7,35 (d)	20	6,97 (dt)	6,95 (dt)
9	-	-	21	7,19 (dt)	7,20 (dt)
10	10,74 (s)	10,74 (s)	22	6,82 (dd)	6,82 (dd)
11	-	-	23	-	-
12	-	-			

O espectro de RMN ^1H foi obtido a 500 MHz. Os deslocamentos químicos do espectro, em δ (ppm), são referentes ao TMS interno. Os parênteses referem-se à multiplicidade do sinal.

* Hoshino *et al.*, 1987-.

Pela representação de contorno do espectro ^1H COSY obtida, pôde-se observar quais prótons acoplam entre si na molécula de violaceína. Percebe-se claramente que os prótons nas posições 6 e 15 não acoplam com nenhum outro da molécula uma vez que não apresentam picos fora da linha diagonal. O próton na posição 1 acopla-se com o próton em C2. O próton em C10 acopla-se com o próton em C13 conforme descrito por Hoshino *et al.*, 1987, no entanto o acoplamento do próton em C19 ao C20 não foi observado assim como os demais acoplamentos descritos. Uma investigação mais próxima (expansão da região 6,5-9,1 ppm no detalhe) revela que o próton em C19 também está correlacionado com aquele em C21 embora trate-se de um sinal menos intenso; esse próton em C21 ainda se acopla com os prótons em C22 e C20. O próton em C7 acopla-se com o próton em C8 e em C5. As correlações entre o próton em C5 e C20, C5 e C22, C7 e C21, C8 e C20 e C8 e C22 devem-se provavelmente à presença de moléculas dímeras na solução de violaceína.

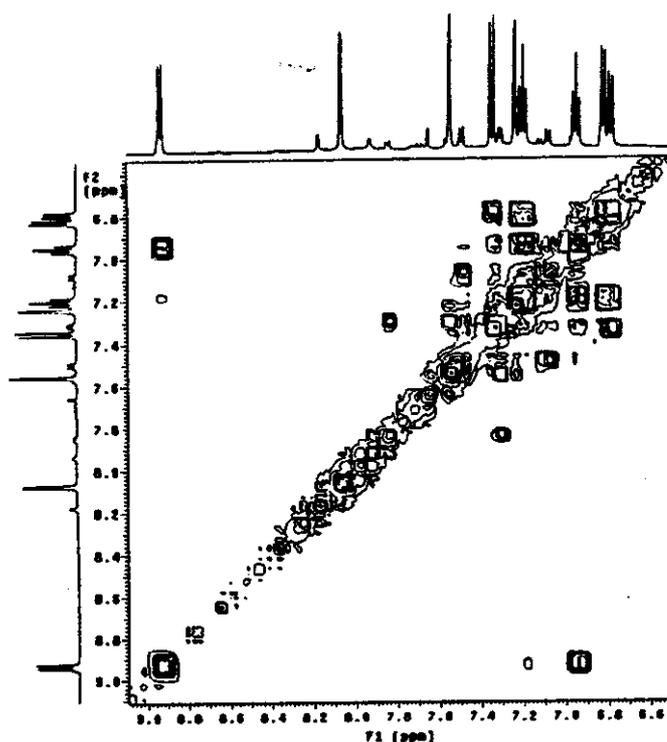


Figura 11: Representação de contorno do espectro ^1H -COSY de amostra de extrato bruto de violaceína em DMSO-d_6 .

• Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ^{13}C): pelo espectro de carbono obtido pode-se verificar a presença dos picos que caracterizam a molécula de violaceína. A tabela 09 mostra a concordância dos deslocamentos dos picos obtidos com aqueles descritos na literatura.

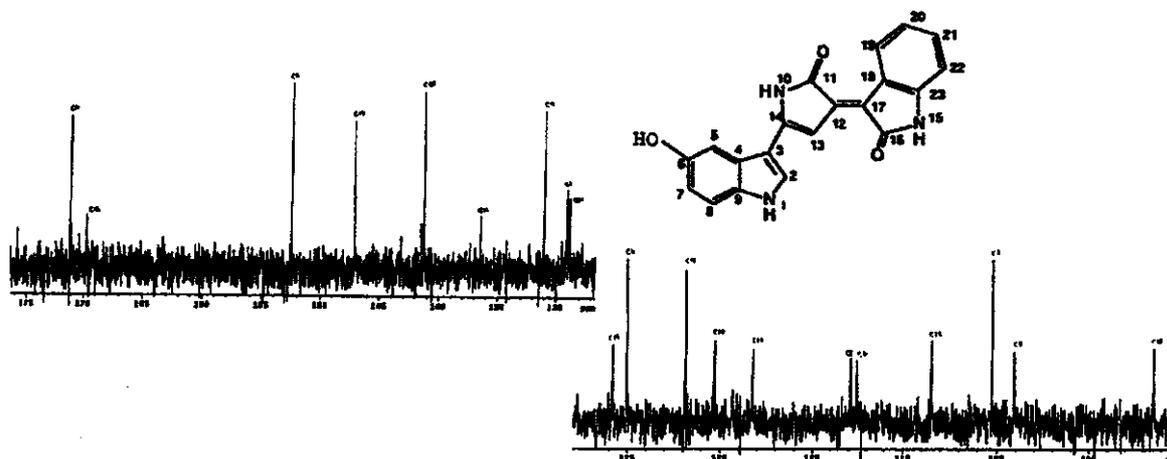


Figura 12: Espectro de RMN ^{13}C da amostra de violaceína em DMSO-d_6 .

Tabela 09: Valores de RMN ^{13}C da violaceína em DMSO-d_6 .

POSIÇÃO	DESLOCAMENTOS OBTIDOS	DESLOCAMENTOS DA LITERATURA*	POSIÇÃO	DESLOCAMENTOS OBTIDOS	DESLOCAMENTOS DA LITERATURA*
1	-	-	13	96,50 (d)	96,90 (d)
2	129,20 (d)	129,50 (d)	14	147,20 (s)	147,50 (s)
3	105,30 (s)	105,80 (s)	15	-	-
4	125,10(s)	125,50 (s)	16	169,90 (s)	170,10 (s)
5	104,10 (d)	104,50 (d)	17	118,30 (s)	118,70 (s)
6	152,50 (s)	152,90 (s)	18	121,90 (s)	122,30 (s)
7	112,90 (d)	113,20 (d)	19	125,90 (d)	126,30 (d)
8	113,40 (d)	113,40 (d)	20	120,40 (d)	120,80 (d)
9	131,10 (s)	131,50 (s)	21	128,90 (d)	129,30 (d)
10	-	-	22	108,50 (d)	108,90 (d)
11	171,16 (s)	171,50 (s)	23	141,40 (s)	141,80 (s)
12	136,50 (s)	136,90 (s)			

O espectro de RMN ^{13}C foi obtido a 500 MHz. Os deslocamentos químicos do espectro, em δ (ppm), são referentes ao TMS interno. Os parênteses referem-se à multiplicidade do sinal.

* Hoshino e col., 1987.

• Espectrometria de massa (EM): no espectro de massa obtido para a amostra de extrato bruto da violaceína pode-se verificar a presença do íon molecular de $m/z=343$ e de três outros íons de maior abundância nos valores de 214, 133 e 104 m/z . Esses fragmentos estão de acordo com aqueles atribuídos por Riveros *et al.* (1988). O fragmento de $m/z=327$ bastante intenso refere-se à deoxiviolaína, composto produzido também pela *Chromobacterium violaceum*, ainda presente no extrato da amostra que sofreu apenas uma semi purificação.

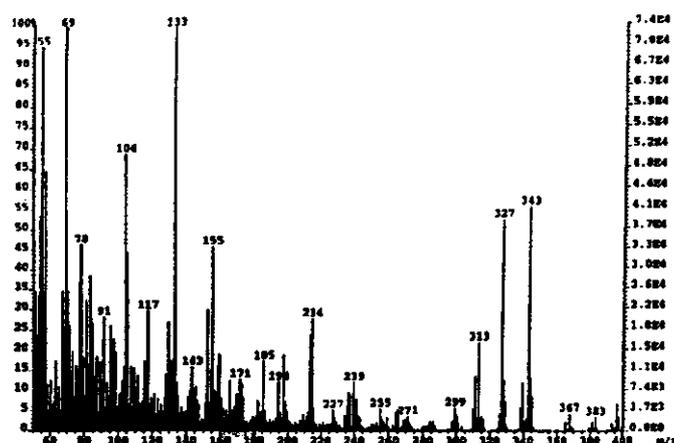
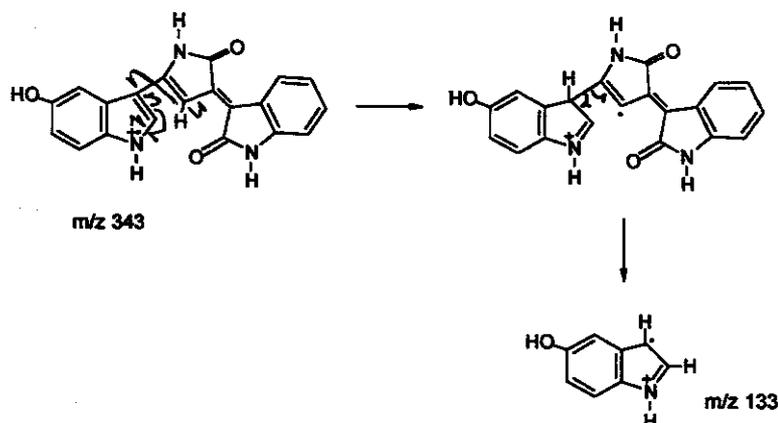


Figura 13: Espectro de massa da amostra de extrato bruto de violaceína.

A fragmentação para a obtenção do fragmento m/z 133, um dos íons de maior intensidade, pode ser demonstrada conforme esquema abaixo:



Esquema 02: Fragmentação da violaceína para obtenção do fragmento m/z 133.

CAPÍTULO 5
TRATAMENTO DA VIOLACEÍNA VIA ENZIMÁTICA

TRATAMENTO DA VIOLACEÍNA VIA ENZIMÁTICA

O tratamento da violaceína com as enzimas HRP-VI, LPO, Lac e LiP/MnP foi monitorado espectrofotometricamente na região 200-700 nm por uma hora. A banda de absorção máxima da violaceína em meio tamponado ocorreu em comprimento de onda 558 nm. Observou-se que a coloração da solução da violaceína (inicialmente violeta) tornou-se de um amarelo pálido em todas as reações realizadas, indicando transformação do substrato por cada enzima.

5.1 Biotransformação utilizando peroxidase de raiz forte (HRP-VI) (Sigma)

Geralmente os oxindóis possuem propriedades biológicas interessantes, assim como a violaceína, no entanto, os métodos químicos disponíveis para suas produções necessitam de procedimentos com vários passos. O uso da enzima HRP ofereceu rendimentos quantitativos em reações utilizando indóis e indóis substituídos como substratos conforme Colonna *e col.* (1999) descreveram. Dessa maneira, e considerando-se o conhecimento do mecanismo da enzima, resolveu-se estudar mais detalhadamente a biotransformação com essa enzima.

O tratamento da violaceína utilizando a enzima HRP-VI iniciou-se com a adição da enzima numa solução tamponada contendo $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de violaceína. A enzima mostrou uma absorção máxima em comprimento de onda 400 nm referente ao Composto I (figura 14-B). Após a adição do peróxido de hidrogênio na mistura da cubeta, houve a formação do Composto II observada pela mudança no comprimento de onda da absorção para 414 nm (figura 14-C). A este procedimento denominou-se ordem normal de adição dos reagentes.

A peroxidase de raiz forte necessita do peróxido de hidrogênio para catalisar a oxidação (de um elétron) de um substrato a radical livre. O peróxido de hidrogênio oxida a enzima heme (por dois elétrons) ao Composto I, que é um cátion radical ferril (Fe(IV)) π -porfirina da enzima. Uma molécula de substrato pode então ser oxidada a um radical (por um elétron) e o Composto I é reduzido ao Composto II (por um

elétron). Uma oxidação subsequente de outra molécula de substrato pelo Composto II permite o retorno da peroxidase ao seu estado férrico natural. A presença de grande quantidade de peróxido de hidrogênio ou a lenta redução do Composto II ao estado natural da enzima, podem levar à oxidação do Composto II ao Composto III, forma menos reativa da enzima.

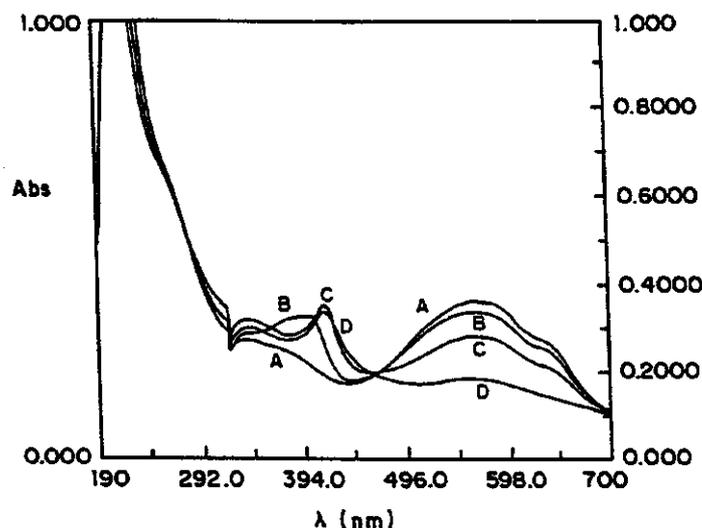


Figura 14: Espectro UV-Vis. da violaceína $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} (-A-); após a adição HRP-VI de $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (-B-); após adição de H_2O_2 $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (-C-) e após 30 minutos de reação (-D-).

A absorbância da solução de violaceína foi monitorada continuamente como mostra a figura 15. Após trinta minutos de reação não se observou mudanças no espectro. A intensidade de absorção da violaceína diminuiu cerca de 40% do seu valor inicial. Testes foram realizados colocando-se água destilada ao invés da enzima HRP-VI e nenhum efeito de descoloração pelo H_2O_2 foi considerado significativo (< 2% mudança na absorção).

Quando utilizado o outro procedimento de adição dos reagentes permitindo a formação do Composto II da enzima anterior à adição do substrato (violaceína), observou-se um pequeno aumento na velocidade de reação. Os mecanismos envolvidos

na biotransformação (esquema 04-pág. 83 e 05-pág. 84) mostram mais claramente a ação do composto II da enzima. Entretanto, a taxa de conversão observada diminuiu (vide tabela 10-pág. 73).

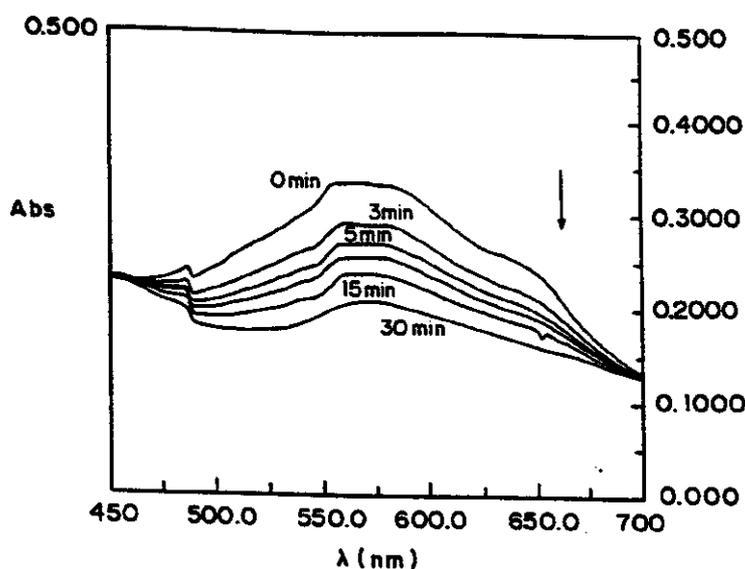


Figura 15: Cinética do espectro UV-Vis. da variação na intensidade de absorção da violaceína a 558 nm durante tratamento com HRP-VI (tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 7,6) em vários intervalos.

5.2 Biotransformação utilizando lactoperoxidase (LPO) comercial (Sigma)

A reação da violaceína com a enzima LPO foi mais rápida do que com a realizada com a enzima HRP apesar da taxa de conversão não ter mostrado mudança significativa (tabela 10).

Um fator importante que distingue a lactoperoxidase das outras peroxidases é o comportamento dos intermediários enzimáticos. A LPO reage com o peróxido de hidrogênio fornecendo o Composto I, um cátion radical ferril porfirínico [Comp I (IV, P^{••})], que rapidamente decai formando espécies que contenham um equivalente oxidante na cadeia polipeptídica [Comp I(IV, R^{••})]. Essa espécie reage com o ferrocianeto usando o equivalente oxidante radical aminoácido (pH neutro ou básico) (Monzani *et al.*, 1997).

A cinética de reação pode ser observada conforme mostra a figura a seguir:

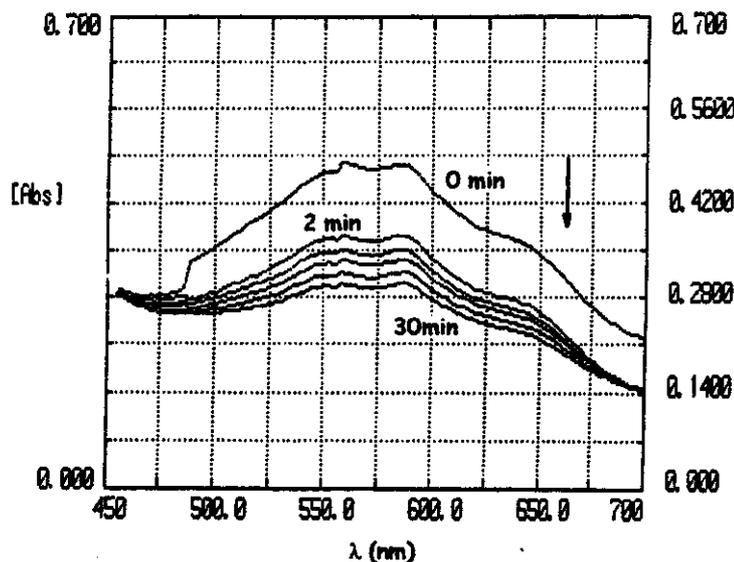


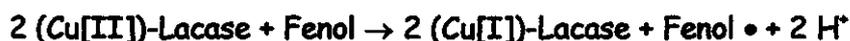
Figura 16: Cinética do espectro UV-Vis. da variação na intensidade de absorção da violaceína a 558 nm durante tratamento com LPO (tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 7,6) em vários intervalos.

Os compostos intermediários dessa enzima absorvem em 500–600 nm o que tornou impossível suas visualizações devido a absorção da violaceína ser bastante intensa na região de 550 nm.

5.3 Biotransformação utilizando lacase (obtida a partir do cultivo do fungo *Trametes versicolor* CCT 4521)

A transformação da violaceína pela enzima lacase também pôde ser observada mesmo na presença do mediador 1-hidroxibenzotriazol (HBT). A velocidade de reação observada na presença do HBT foi menor do que aquela na sua ausência (vide tabela 10-pág. 73). Esse comportamento indica a ocorrência de diferentes mecanismos de ação da enzima no substrato quando usado o mediador.

Um mecanismo geral da Lac atuando em substratos fenólicos pode ser descrito conforme os autores Durán e Esposito (1997) escreveram:



A Lac reduz o oxigênio à água e simultaneamente permite a oxidação (de um elétron) de diversos substratos aromáticos. A faixa de substratos da lacase pode ser estendida a compostos não fenólicos pela simples inclusão de um mediador como o HBT por exemplo. Existem várias hipóteses que explicam porque o sistema da Lacase-mediador pode oxidar compostos não fenólicos: (1) o mediador da lacase é um mediador redox; (2) intermediários ativos são gerados durante a oxidação do mediador pela lacase; (3) o mediador atua como um co-substrato ou ativador; (4) espécies ativas de oxigênio como radicais livres hidroxilas ($\text{OH} \bullet$) são gerados durante a reação. Apesar da existência de todas essas hipóteses, o mecanismo exato dos mediadores ainda não foi estabelecido (Li *et al.*, 1998).

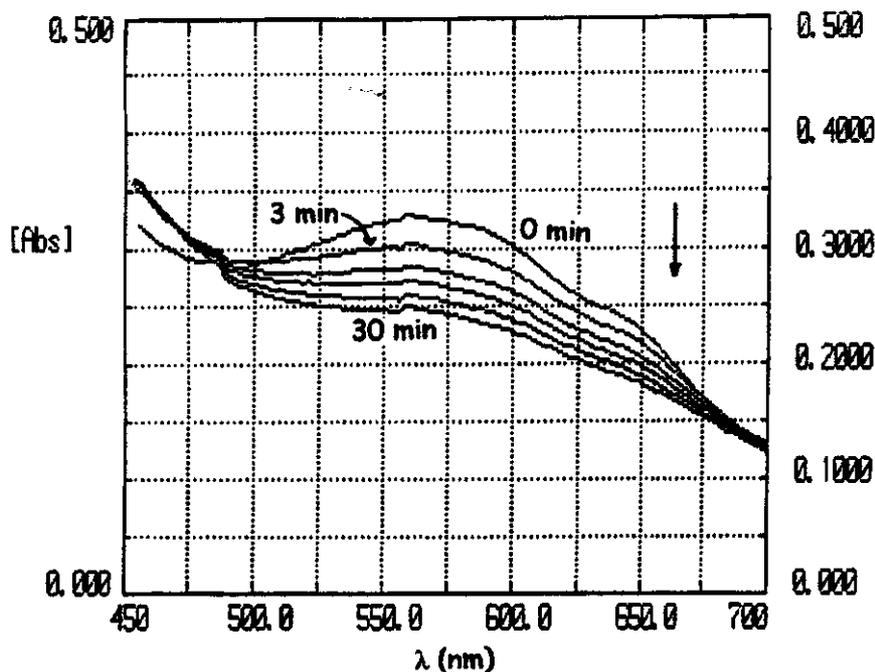


Figura 17: Cinética do espectro UV-Vis. da variação na intensidade de absorção da violaceína a 558 nm durante tratamento com Lac sem a adição do HBT (tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 5,0) em vários intervalos.

Com relação às taxas de conversão do substrato ilustradas nas figuras a seguir, verificou-se que a reação utilizando a lacase com a adição do mediador apresentou uma porcentagem de conversão maior indicando que o mecanismo envolvido no processo foi mais eficiente.

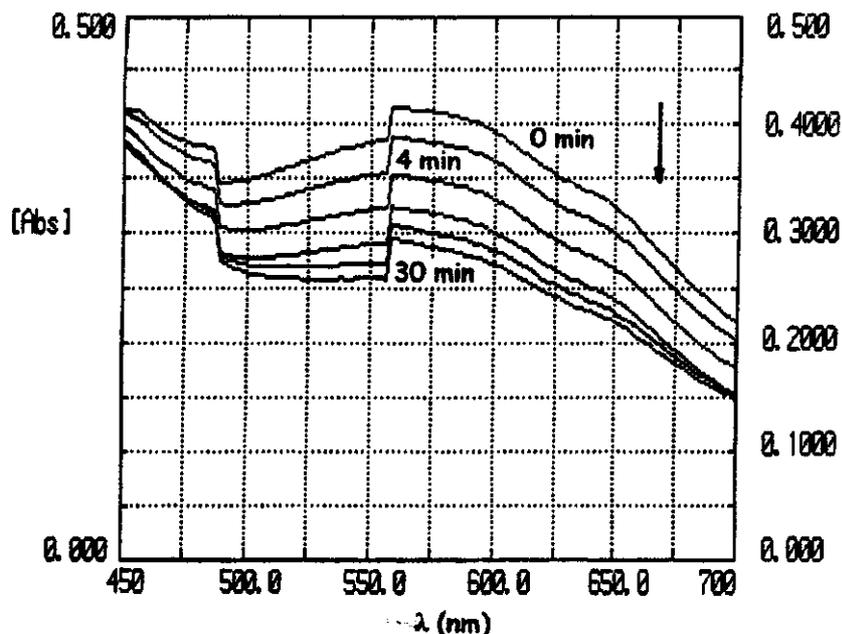


Figura 18: Cinética do espectro UV-Vis. da variação na intensidade de absorção da violaceína a 558 nm durante tratamento com Lac com a adição do HBT (tampão acetato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 5,0) em vários intervalos.

5.4 Biotransformação utilizando "pool" de Lignina peroxidase e Manganês peroxidase - LiP/MnP (obtido pela produção do fungo *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725)

A transformação da violaceína pelo "pool" enzimático LiP/MnP mostrou-se a mais lenta de todas as reações realizadas e a sua taxa de conversão do substrato a mais baixa. Acredita-se que o fraco desempenho da reação com essas enzimas tenha ocorrido devido à atividade reduzida do "pool" enzimático obtido uma vez que seus ciclos catalíticos são muito similares aos da HRP.

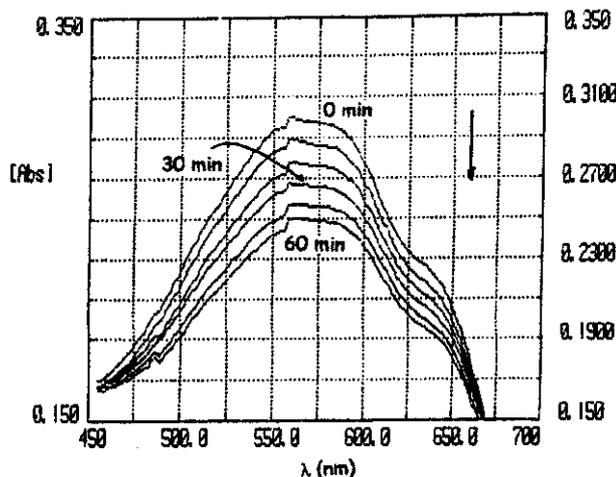


Figura 19: Cinética do espectro UV-Vis. da variação na intensidade de absorção da violaceína a 558 nm durante tratamento com o "pool" enzimático LiP/MnP (tampão fosfato de sódio 50 mmol.L⁻¹, pH 7,6) em vários intervalos.

5.5 Comparação dos dados obtidos na biotransformação da violaceína pelas enzimas HRP-VI, LPO, Lac (com e sem o uso de HBT) e o "pool" enzimático LiP/MnP

Os parâmetros obtidos para cada reação foram as taxas de conversão do substrato e os valores das velocidades das biotransformações que são mostrados na tabela a seguir:

Tabela 10: Parâmetros cinéticos obtidos nas reações da solução de violaceína com as enzimas HRP-VI, LPO, Lac e LiP/MnP.

ENZIMAS	ORDEM NORMAL DE ADIÇÃO	ORDEM DE ADIÇÃO MODIFICADA
HRP-VI	$k_R = 0,0377$	$k_R = 0,0379$
	TAXA= 37,57%	TAXA= 27,10%
LPO	$k_R = 0,112$	$k_R = 0,0194$
	TAXA= 37,27%	TAXA= 38,84%
LiP/MnP	$k_R = 0,0045$	N.A.
	TAXA= 21,60%	N.A.
	SEM USO DE HBT	COM USO DE HBT
Lac	$k_R = 0,0210$	$k_R = 0,0164$
	TAXA= 24,20%	TAXA= 28,80%

k_R = Constante de velocidade de reação (min⁻¹); TAXA= Decaimento da intensidade de absorção da violaceína no espectro UV-Vis.; N.A.= Não aplicável.

A ordem crescente da taxa de conversão do substrato considerando-se a ordem normal de adição foi: LiP/MnP < Lac < Lac-HBT < LPO < HRP-VI, no entanto, a ordem das velocidades de reação apresentou-se diferente, indicando a não correlação dos dois parâmetros cinéticos.

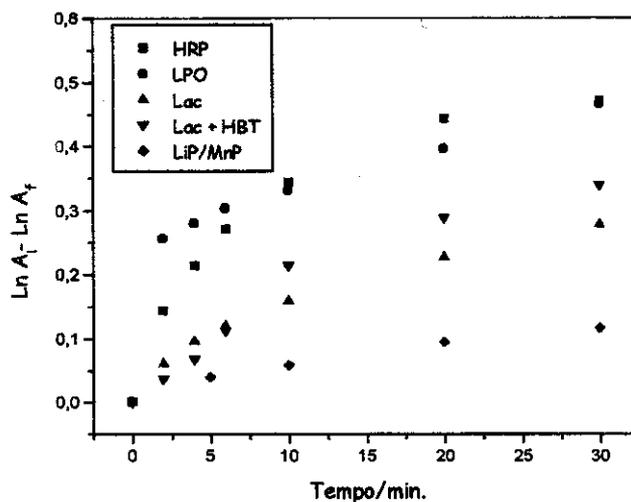


Gráfico 03: Curvas obtidas pelas reações de biotransformação da violaceína com as enzimas HRP-VI, LPO, Lac (com e sem a adição de HBT) e LiP/MnP.

Após a realização das cinéticas de reação com cada enzima estudada, foi possível construir gráficos $\ln A_i - \ln A_f$ versus Tempo/min para a obtenção dos valores da velocidade de reação envolvida em cada biotransformação. Os valores dos coeficientes lineares das equações de reta dos gráficos realizados para cada enzima, forneceram os valores das velocidades de reação conforme o gráfico 03. A ordem cinética obtida foi: LiP/MnP < Lac-HBT < Lac < HRP-VI < LPO.

5.6 Análise do produto obtido do tratamento com a enzima HRP-VI

Apesar da reação da violaceína com a enzima LPO ter se mostrado mais rápida, optou-se em adotar a reação com a enzima HRP-VI para estudo e possível detecção e caracterização de produtos devido ao maior conhecimento existente com relação ao seu mecanismo de ação.

Inicialmente realizou-se cromatografia em placa delgada (fase estacionária sílica; fase móvel acetato de etila - hexano 9:2) com os produtos obtidos pela reação da violaceína com a enzima HRP-VI e do 5-hidroxiindol com a enzima HRP-VI também. O produto da reação com a violaceína apresentou fator de retenção maior que o da violaceína indicando tratar-se de um composto mais apolar que o de partida. O produto da reação com o 5-hidroxiindol apresentou fator de retenção menor que o do 5-hidroxiindol indicando portanto, tratar-se de um composto mais polar que o de partida. Em seguida, realizou-se o teste de Salkowsky nas placas e os resultados indicaram que o produto da violaceína continha grupo indólico na molécula mas que o produto do 5-hidroxiindol não possuía. Tal fato indicou que diferentes alterações haviam ocorrido em cada molécula.

Amostras do produto de transformação da violaceína com a enzima HRP-VI foram submetidas às seguintes análises espectroscópicas: infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^1H) e carbono (RMN ^{13}C), análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectrometria de massa (EM) além da análise na região ultra violeta-visível (UV-Vis.). Para o produto de reação da enzima HRP-VI com o 5-hidroxiindol só foram realizadas as análises em região UV-Vis. e de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

- Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): por esta técnica observou-se que o tempo de eluição da amostra do produto de transformação do 5-hidroxiindol (em etanol) foi menor que o do 5-hidroxiindol comprovando então sua maior polaridade com relação ao seu composto de partida (figura 20).

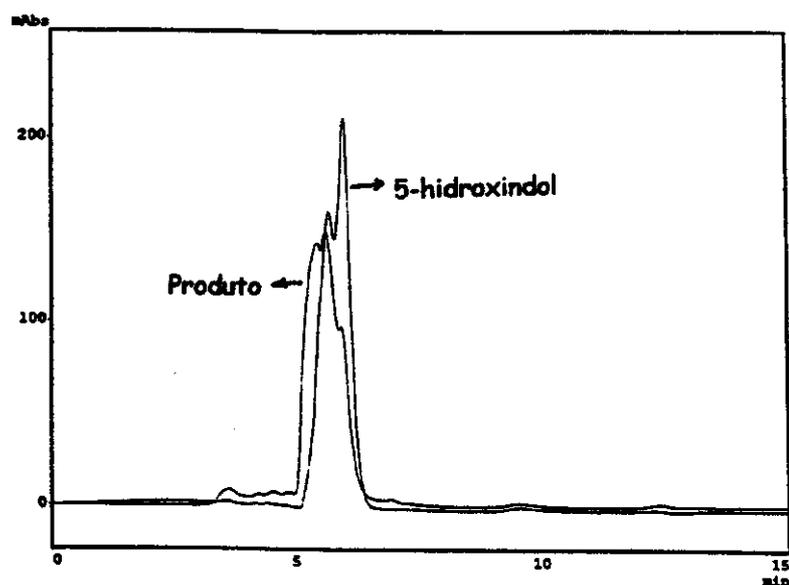


Figura 20: Cromatograma da amostra do produto de transformação do 5-hidroxiindol com a enzima HRP-VI (em etanol).

O produto da biotransformação da violaceína com a enzima HRP-VI mostrou seu caráter mais apolar com relação à violaceína uma vez que o tempo necessário para sua eluição foi maior (figura 21). Esse dado é concordante com a cromatografia em placa delgada realizada anteriormente.

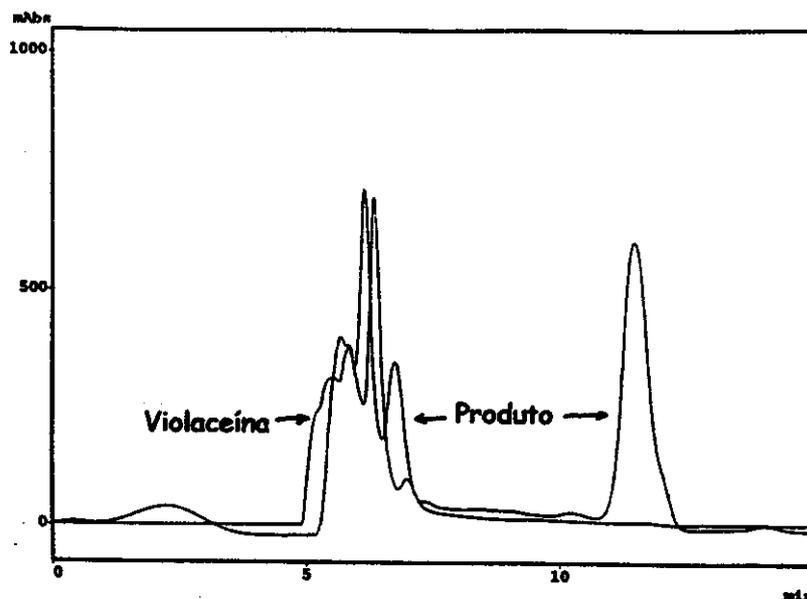


Figura 21: Cromatograma da amostra do produto de transformação da violaceína com a enzima HRP-VI (em etanol).

• Análise espectroscópica na região Ultravioleta-Visível (UV-Vis.): pelos espectros obtidos observou-se que a amostra do produto de transformação do 5-hidroxiindol com a enzima HRP-VI apresentou um alargamento de um dos seus picos de máximo absorção em comprimento de onda 212 nm e uma diminuição na absorção em 270 nm. A solução em tampão obtida após a reação apresentava coloração amarelo alaranjada intensa.

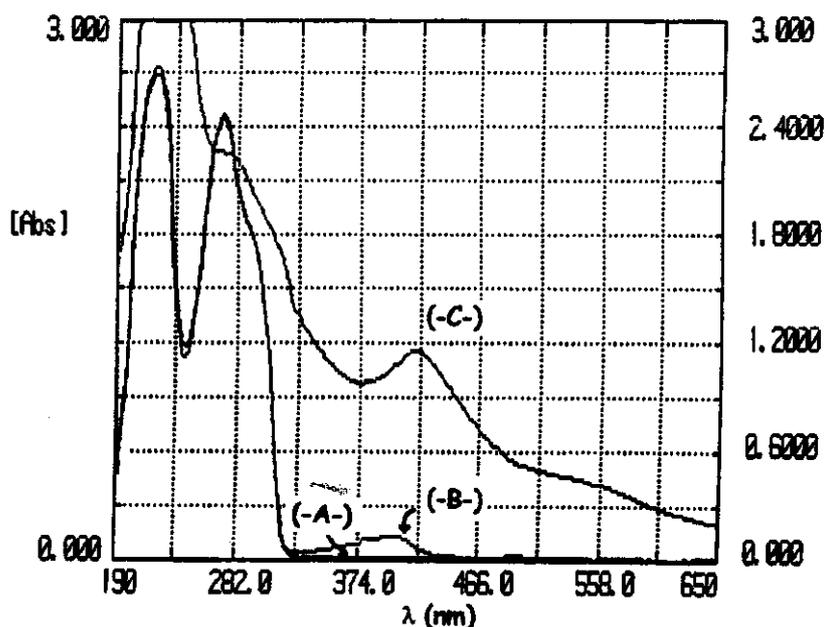


Figura 22: Espectro UV-Vis. do 5-hidroxiindol $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em tampão fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} pH 7,6 (-A-); após a adição HRP-VI de $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (-B-) e após adição de H_2O_2 $4 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (-C-).

Com relação ao produto de biotransformação da violaceína com a enzima HRP-VI que apresenta coloração amarelo castanho em etanol, praticamente não se observa absorção na região do visível (figura 23) ao contrário do espectro obtido para a violaceína em etanol (figura 07-pág. 58).

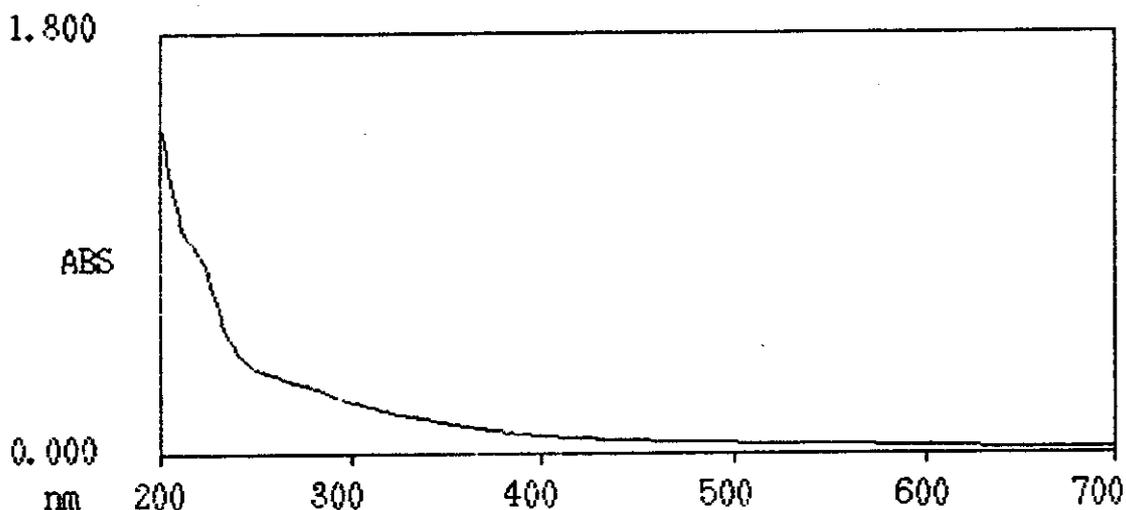


Figura 23: Espectro UV-Vis. do produto de reação da violaceína com a enzima HRP-VI em etanol.

• Espectroscopia na região infravermelha (IV): pode-se observar pelo espectro de infravermelho obtido (figura 24) que, comparativamente ao espectro da violaceína (figura 09-pág. 59), houve uma alteração da absorção na região entre $3100-3500\text{ cm}^{-1}$ referente à frequência de deformação axial de O-H e N-H, um aumento na absorção relacionada à vibração do estiramento da ligação C-H em $2900-2800\text{ cm}^{-1}$. Houve o desaparecimento de uma das absorções relacionadas à $\nu\text{ C=O}$ e a absorção restante encontra-se em uma região de deslocamento maior, aproximadamente 1720 cm^{-1} . O aparecimento de uma forte absorção em 1260 cm^{-1} levam-nos a suspeitar da possibilidade de uma nova hidroxila ter sido adicionada ao anel aromático intensificando a absorção referente ao $\nu\text{ C-O}$ dos fenóis. A nova absorção em 740 cm^{-1} deve-se referir ainda à deformações N-H de aminas secundárias.

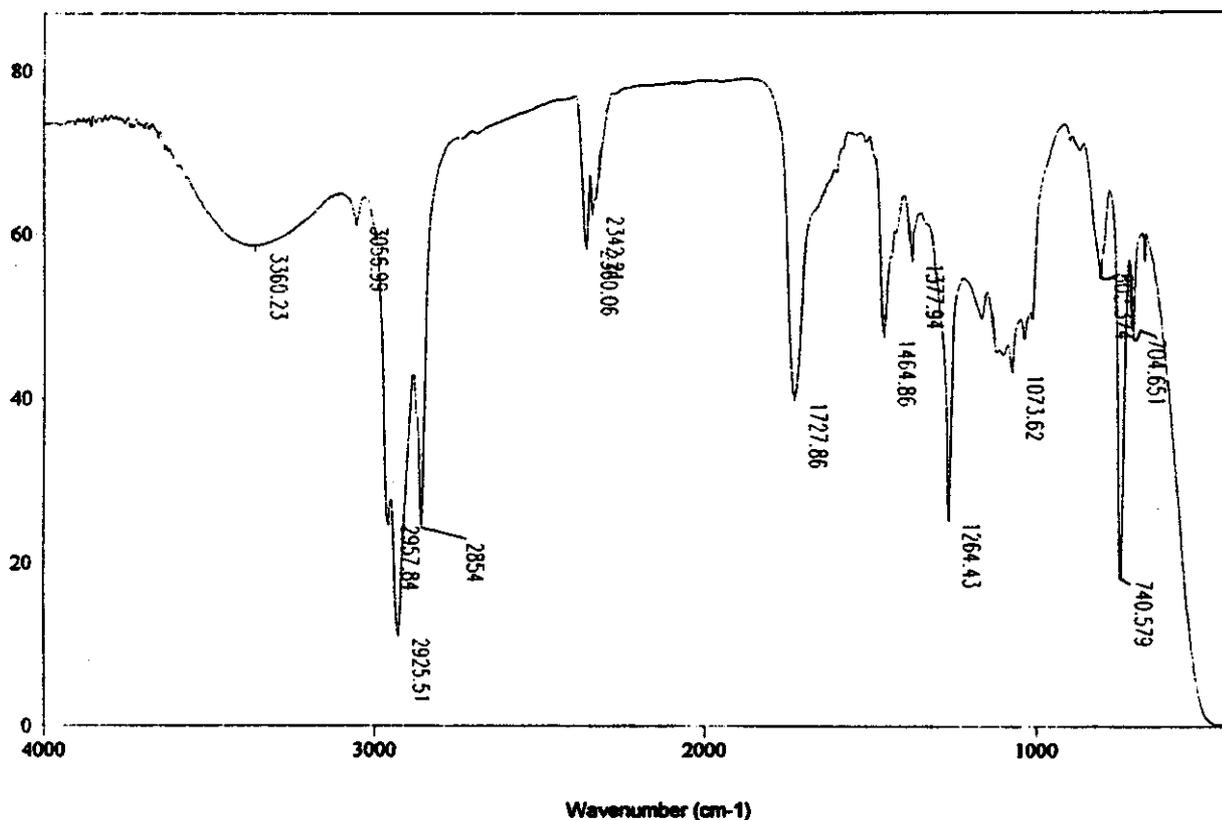


Figura 24: Espectro de IV da amostra do produto de transformação da violaceína com a enzima HRP-VI (filme em CH_2Cl_2).

• Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN- ^1H e RMN ^{13}C): pelo espectro desacoplado de RMN ^1H (espectro não incluso) há indícios da ausência do sinal referente ao próton da posição 7 (6,79 ppm) na molécula de violaceína, no entanto, um novo sinal apareceu com deslocamento 10,20 ppm, o qual pode ser atribuído ao próton da hidroxila recém incorporada à molécula. Também observou-se um grande deslocamento do sinal do próton da posição 10 na molécula da violaceína (10,74 ppm) para 10,95 ppm, indicando uma possível alteração no grupo pirrolidona da molécula do produto obtido.

Com relação ao espectro de carbono obtido (não mostrado) quando comparado com o da violaceína, possibilitou a consideração do desaparecimento do sinal referente ao carbono da posição 11 (171,20 ppm) indicando a possível eliminação dessa carboxila.

• **Espectrometria de massa (EM):** a figura a seguir apresenta o espectro de massa obtido para uma amostra do produto de reação da violaceína com a enzima HRP-VI. Pode-se verificar a ausência do íon molecular da violaceína ($m/z= 343$) e a presença do fragmento $m/z= 331$ deveria ser referente ao íon molecular do produto obtido. No entanto, acredita-se que o verdadeiro produto obtido pela biotransformação não é estável suficiente e não pôde ser detectado, assim o que se identificou no espectro como íon molecular é o resultado do rearranjo da molécula para obtenção da estabilidade.

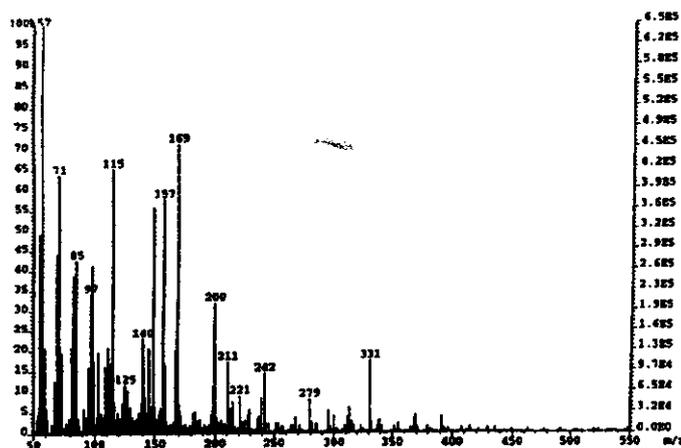


Figura 25: Espectro de massa de amostra do produto de reação da violaceína com a enzima HRP-VI.

A partir desse íon molecular foi possível explicar a presença de alguns dos fragmentos existentes no espectro obtido e mostrados no esquema 03.

Apesar da realização de todas essas técnicas não foi possível a determinação exata da estrutura química da violaceína biotransformada devido à dificuldade de obtenção de espectros confiáveis mesmo utilizando amostras do produto purificado. O

rendimento da reação é extremamente baixo o que inviabilizou a obtenção do produto em quantidades suficientes para a realização de análises repetidas.

Diversas considerações foram descritas sobre oxidações seletivas catalisadas pela HRP como por exemplo a capacidade de realizar sulfoxidações de alquil aril sulfetos, oxidações de derivados de anilinas, epoxidações de alcenos, oxidações em fenóis e clorofenóis. No entanto, com relação às reações de compostos indólicos um dos únicos comentários foi sobre uma oxidação de indol fornecendo um oxindol (Van de Velde *et al.*, 1999).

Pôde-se observar que a reação ocorrida para o substrato 5-hidroindol não foi a mesma obtida para a violaceína. Na estrutura do produto da violaceína transformada houve a preservação do grupo indólico da molécula ao contrário do ocorrido para a molécula do produto da reação com o 5-hidroindol. Considerando-se as informações obtidas com as análises juntamente com esse fato, propôs-se uma estrutura para o composto sem no entanto ter a presunção de afirmarmos ser a estrutura correta.

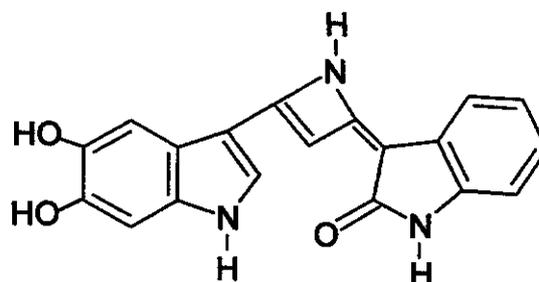
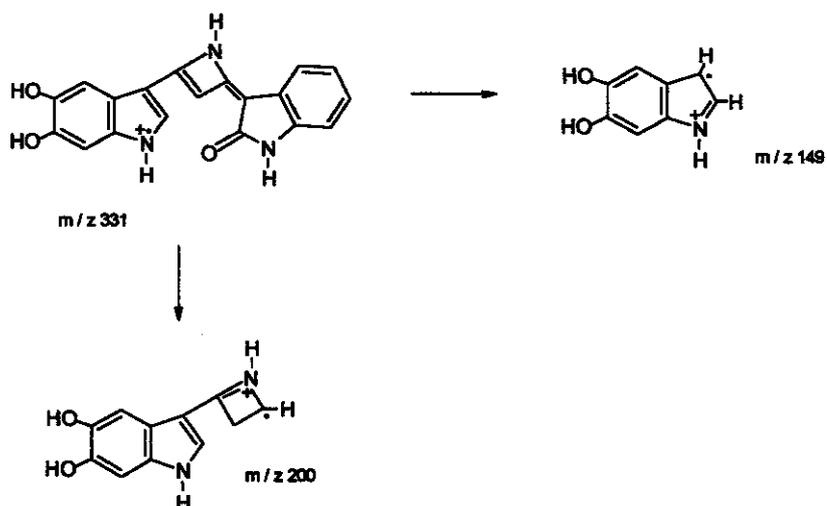


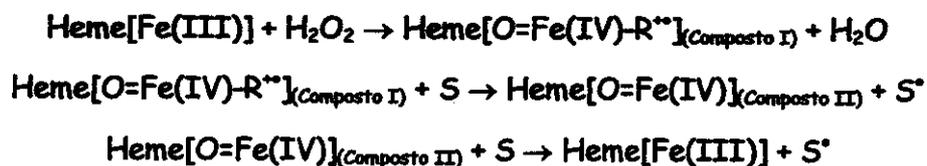
Figura 26: Estrutura proposta para o produto de reação obtido pela biotransformação da violaceína com a enzima HRP-VI: 3-[1,2 dihidro-5(3,5-dihidroxi-1H-indol-3-il)-2-azetina-4-ilideno]1,3 dihidro-2H-indol-2-ona.

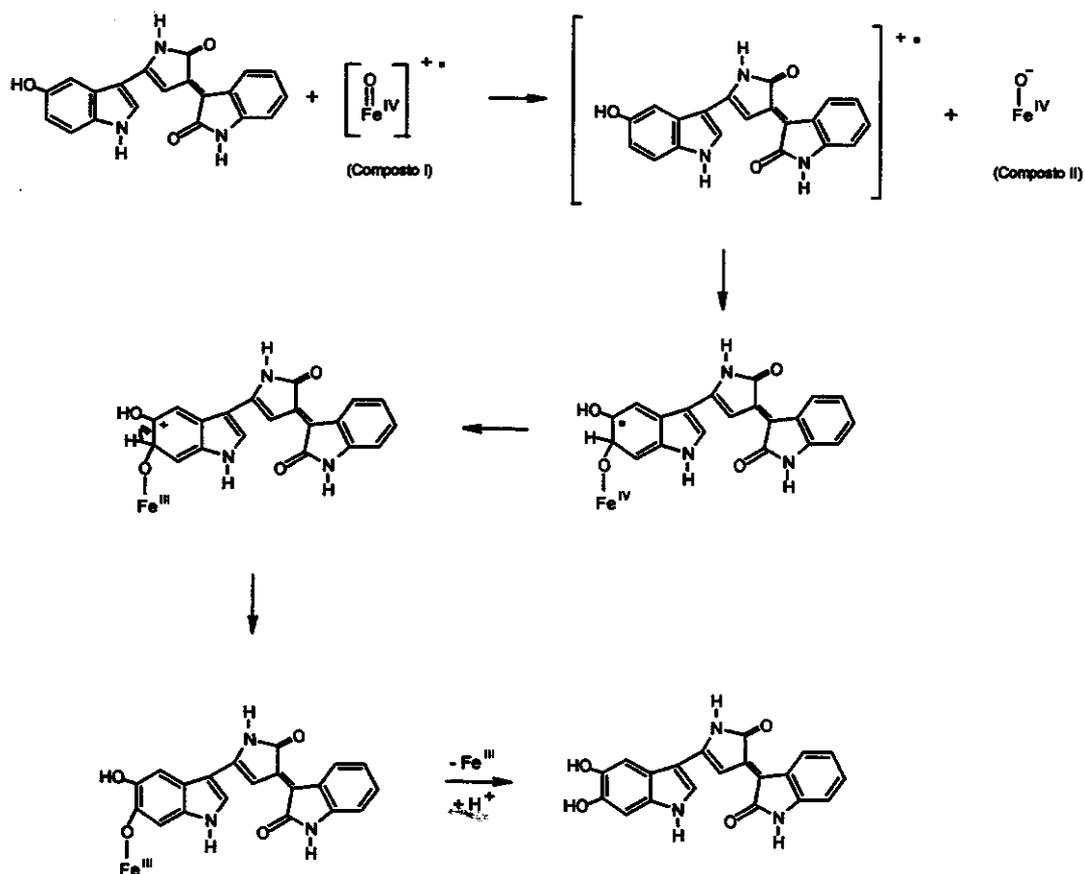


Esquema 03: Principais fragmentos obtidos do produto de reação obtido pela biotransformação da violaceína com a enzima HRP-VI.

A partir da consideração da estrutura do composto obtido, pôde-se propor um possível mecanismo pelo qual a enzima tenha catalisado as transformações na molécula.

Com relação à hidroxilação da violaceína, após o sítio ativo da enzima ter reagido com o peróxido de hidrogênio formando o composto I, considerou-se uma transferência inicial de um elétron dessa espécie enzimática para o substrato formando um intermediário cátion radical. A seguir, o composto II liga-se à molécula do substrato por um ataque eletrofílico, ocorre uma redistribuição de elétrons e então o ganho de um próton fornece a molécula hidroxilada (esquema 04).

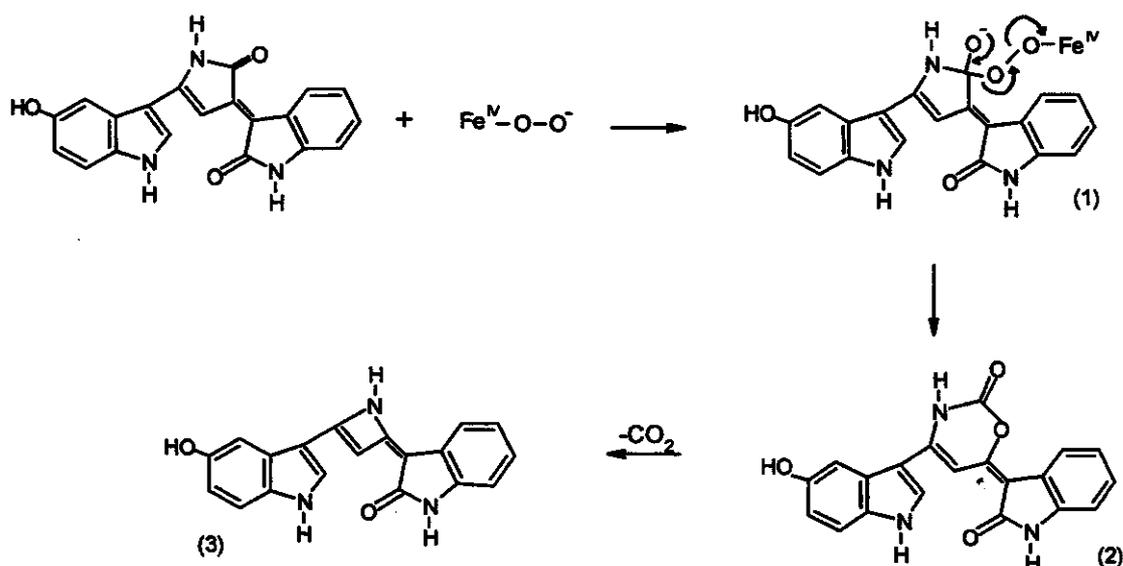




Esquema 04: Suposto mecanismo enzimático responsável pela hidroxilação do grupo indólico da violaceína.

Com relação ao mecanismo envolvido na alteração ocorrida no grupo pirrolidona da molécula de violaceína considerou-se o mecanismo da reação de Baeyer-Villiger (Hamilton, 1974; Faber, 1997) na tentativa de explicar o processo ocorrido.

A primeira etapa desse mecanismo envolveria um ataque nucleofílico do composto I da enzima, representado por Heme[Fe(IV)-O-O], na carbonila do anel formando um intermediário instável (1). A segunda etapa procederia pela expulsão do restante da molécula do composto enzimático e a migração de uma ligação carbono-carbono nesse intermediário, resultando na estrutura (2) que altamente instável, se rearranjará formando então o produto (3).



Esquema 05: Suposto mecanismo enzimático responsável pela modificação do grupo pirrolidona da violaceína.

5.7 Ensaios biológicos realizados com o produto obtido pela biotransformação da violaceína utilizando-se a enzima comercial HRP-VI

5.7.1 Ensaios citotóxicos em células de mamíferos

A avaliação da citotoxicidade do produto da violaceína biotransformada foi realizada com células fibroblásticas V 79 provenientes de pulmão de hamster chinês. Foram utilizadas três metodologias variadas para essa avaliação: ensaio com vermelho neutro, ensaio de determinação do conteúdo protéico e ensaio com MTT que fornecem informações sobre organelas e/ou funções diferentes das células.

Os ensaios foram feitos em triplicatas e cada curva obtida no gráfico a seguir é resultado da média dos valores de seis replicatas de cada concentração da droga utilizada.

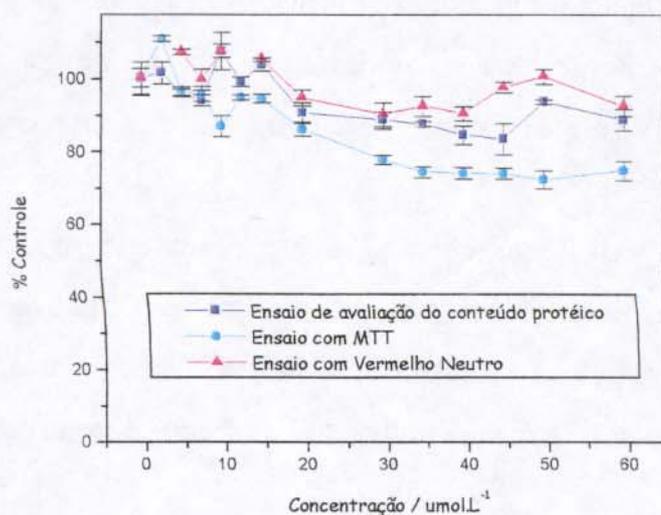


Gráfico 04: Ensaios citotóxicos realizados com a violaceína biotransformada.

O objetivo da construção desse gráfico é a obtenção da IC_{50} (Concentração inibitória 50) na qual a droga é responsável pela morte de 50% das células. Para os experimentos realizados, foi impossível a determinação da IC_{50} devido à escassez de material para testar concentrações da droga mais elevadas. Apenas para efeito comparativo entre os três ensaios realizados, adotamos o valor de IC_{10} (Concentração da droga responsável pela morte de 10% das células) como referência.

Pelos perfis das curvas representadas no gráfico 04 percebe-se que o composto estudado apresentou comportamento similar nos diferentes ensaios realizados. Para os três testes as menores concentrações do produto utilizadas (2,5-15,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) não mostraram efeito tóxico sobre as células. O início da ação tóxica do produto foi observado somente a partir de 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ em todos os testes realizados.

No ensaio com o vermelho neutro (VN), onde se avalia a integridade lisossomal das células viáveis por suas capacidades em incorporar o corante, o produto avaliado apresentou a menor citotoxicidade dos três testes, considerando-se a concentração ($30 \mu\text{mol.L}^{-1}$) na qual houve 10% de morte celular. Para o teste de avaliação de conteúdo protéico que mede a capacidade proliferativa das células a IC_{10} obtida foi de $23 \mu\text{mol.L}^{-1}$ enquanto o resultado mais tóxico observado foi obtido pelo teste com o MTT, $IC_{10} = 17 \mu\text{mol.L}^{-1}$, o qual avalia o funcionamento das mitocôndrias das células viáveis.

Comparando os resultados obtidos para o produto biotransformado com os resultados obtidos para a violaceína (Melo, 1996 - gráfico 05) observa-se que o novo composto é pelo menos 4 vezes menos citotóxico que a violaceína considerando-se os valores para IC_{10} . A tabela 11 exprime melhor os resultados encontrados.

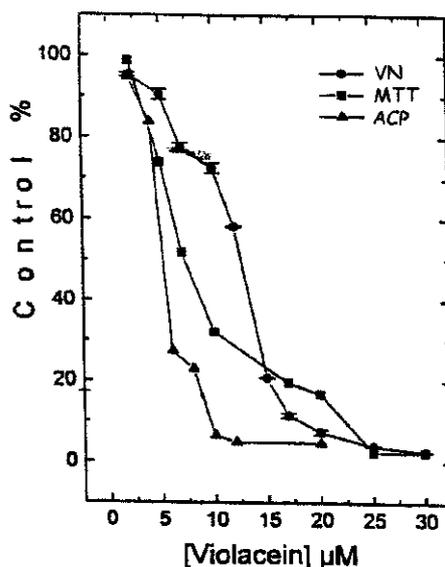


Gráfico 05: Ensaio citotóxico realizado com a violaceína.

Conforme o gráfico pode-se observar que a violaceína apresentou maior citotoxicidade no ensaio de avaliação do conteúdo protéico ($IC_{50} = 5 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e resultado similar na técnica de redução de MTT ($IC_{50} = 7 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Para o teste de incorporação do VN revelou uma $IC_{50} = 12 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Tabela 11: Valores de IC_{10} obtidos para a violaceína e seu produto biotransformado pela enzima HRP-VI utilizando três ensaios diferentes.

COMPOSTO	VALORES DE IC_{10} / $\mu\text{mol.L}^{-1}$		
	MTT	VN	Conteúdo protéico
Violaceína biotransformada	17	30	23
Violaceína*	4,7	5	2,6

* Os valores de IC_{50} obtidos para a violaceína foram 5,7 e 12 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ para os testes do conteúdo protéico, com MTT e VN respectivamente.

No decorrer de cada experimento, a morfologia celular foi observada permitindo a possibilidade de visualização de fatores resultantes das respostas biológicas como por exemplo, inchaço celular, vacuolização, permeabilização, etc.

Os resultados obtidos ilustram o valor do emprego de ensaios variados para a formulação de hipóteses do mecanismo de ação tóxica.

5.7.2 Ensaio de toxicidade aguda *in vitro*

A avaliação da toxicidade aguda do produto obtido foi realizada com a bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922 como organismo indicador. A concentração de CO_2 produzido pela respiração microbiana foi determinada por interpolação na curva padrão realizada previamente. Um determinado volume de amostra padrão (contendo as espécies HCO_3^- , CO_3^{2-} , CO_2) junta-se ao fluxo carregador (água deionizada) que conflui com o fluxo de ácido sulfúrico diluído (0,5%). O meio ácido desloca o equilíbrio no sentido da formação do CO_2 , de acordo com a equação abaixo:



O CO_2 formado no meio ácido ao passar pela cela de difusão permeia por uma membrana de PTFE (Teflon®) e atinge um fluxo de água deionizada, deslocando o

equilíbrio para a formação dos íons bicarbonato e carbonato. A condutividade deste fluido é então alterada devido ao CO_2 presente na amostra. A mudança na condutância é proporcional à concentração total de CO_2 presente na amostra (Moraes, 1995).

O experimento foi realizado em duplicata apenas para uma concentração do produto ($20 \mu\text{mol.L}^{-1}$) devido à falta de material. Coincidentemente, após interpolação dos dados na curva de calibração obtida (gráfico 02), observou-se que essa concentração foi responsável por 53% de morte das bactérias. A partir desse valor pode-se estimar que o valor para IC_{50} do produto biotransformado deva estar entre $18-19 \mu\text{mol.L}^{-1}$. A IC_{50} referente à violaceína ainda não foi determinada.

Observa-se que os valores obtidos para os ensaios de citotoxicidade e toxicidade aguda são bastante distantes uma vez que medem a ação tóxica em células muito diferentes, ou seja, o mecanismo envolvido é completamente diverso para cada tipo de célula. Apesar disso, é interessante observar que o teste citotóxico que apresentou o maior valor do efeito tóxico está relacionado à capacidade respiratória da célula V79 (por meio das mitocôndrias) assim como o teste de toxicidade aguda também está relacionado à respiração das células bacterianas. Esses fatos podem sugerir que o efeito tóxico apresentado pelo composto estudado interfira no mecanismo de respiração celular.

CAPÍTULO 6
TRATAMENTO DA VIOLACEÍNA VIA MICRORGANISMOS

TRATAMENTO DA VIOLACEÍNA VIA MICRORGANISMOS

6.1 Biotransformação utilizando os fungos *Trametes versicolor* CCT 4521, *Lentinus edodes* CCT 4519, *Trametes villosa* CCT 5567 e *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 e as bactérias *Azotobacter vinelandii* 1228-ESALQ e *Pseudomonas putida* CCT 0598 em meio sólido

Os seis microrganismos selecionados foram capazes de descolorir a violaceína apenas quando esta foi adicionada ao meio de cultura por filtração estéril. Para o outro procedimento adotado, violaceína autoclavada juntamente com o meio de cultura, não houve descoloração alguma do meio até o 20º dia de experimento.

A ordem cinética de descoloração da violaceína observada para estes microrganismos foi: *Lentinus edodes* > *Trametes versicolor* > *Azotobacter vinelandii* > *Phanerochaete chrysosporium* > *Trametes villosa* > *Pseudomonas putida* como pode ser observado no gráfico 06.

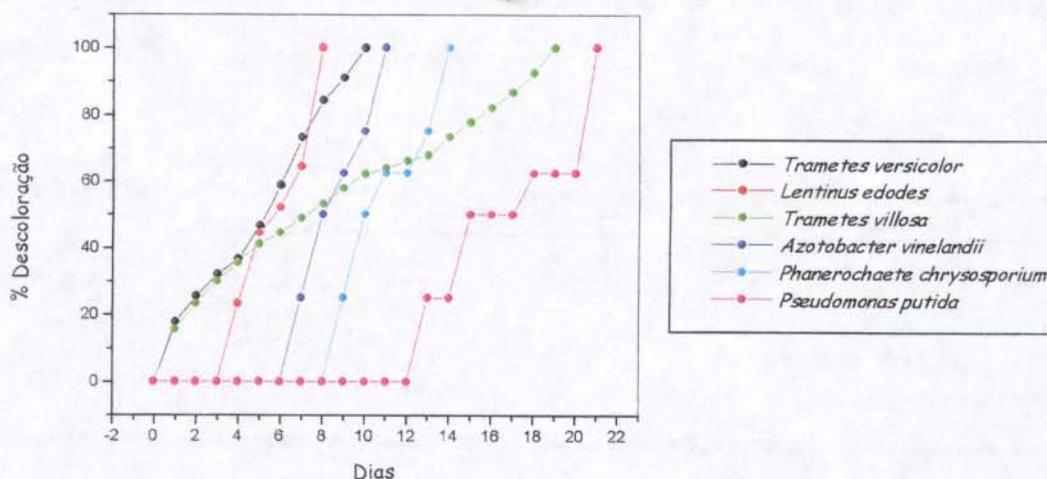


Gráfico 06: Descoloração da violaceína em meio sólido pelos microrganismos *Lentinus edodes*, *Trametes versicolor*, *Azotobacter vinelandii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes villosa* e *Pseudomonas putida*.

Para os fungos *Trametes versicolor* e *Trametes villosa* a descoloração do meio pôde ser visualizada a partir do 1º dia de experimento, no entanto, para o *Lentinus edodes*, *Azotobacter vinelandii*, *Phanerochaete chrysosporium*, e *Pseudomonas putida* a descoloração do meio foi observada a partir do 4º, 7º, 9º e 13º dia respectivamente.

A descoloração completa das placas foi atingida no 8º dia pelo fungo *Lentinus edodes*, no 10º dia pelo fungo *Trametes versicolor*, no 11º dia pela bactéria *Azotobacter vinelandii*, no 14º dia pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*, no 19º dia pelo fungo *Trametes villosa* e no 21º dia pelo bactéria *Pseudomonas putida*.

No dia em que cada microrganismo atingiu 100% de descoloração da placa contendo o pigmento, amostras foram retiradas para determinações de atividade enzimática das enzimas Lac, LiP e MnP e para determinação da presença de sideróforos. A tabela a seguir mostra os dados obtidos nessas determinações.

Tabela 12: Determinações das atividades enzimáticas e presença de sideróforos para amostras obtidas na descoloração da violaceína em meio sólido pelos microrganismos *Lentinus edodes*, *Trametes versicolor*, *Azotobacter vinelandii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes villosa* e *Pseudomonas putida*.

Microrganismo	Lac / U L ⁻¹	LiP / U L ⁻¹	MnP / U L ⁻¹	Sideróforos
<i>Lentinus edodes</i>	2,78	1,72	18,10	11,79%
<i>Trametes versicolor</i>	5,11	0,43	26,25	9,70%
<i>Azotobacter vinelandii</i>	0,79	N.D.	20,07	0,51%
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	11,08	N.D.	12,63	N.D.
<i>Trametes villosa</i>	2,96	0,86	11,47	3,98%
<i>Pseudomonas putida</i>	38,15	N.D.	0,11	7,52%

N.D.= Não Detectável.

Apesar da determinação desses dados, não foi possível afirmar com exclusividade o fator responsável pela descoloração da violaceína para cada microrganismo estudado uma vez que pelo experimento de tratamento direto do pigmento com as enzimas, todas mostraram-se capazes de transformá-lo. Da mesma maneira que somente uma enzima possa ter sido a responsável pela descoloração da

violaceína, a ação conjunta de dois fatores (enzima-enzima ou enzima-sideróforo) ou mais também pode ter ocorrido. Todos os valores medidos, com exceção dos referentes à Lignina peroxidase, foram sempre superiores aos obtidos de amostras controle (sem adição da violaceína ao meio de cultura).

Observa-se na tabela que os valores obtidos para a atividade de Lignina peroxidase foram muito baixos chegando por muitas vezes a não ser detectável o que a exclui da responsabilidade pela descoloração do meio das culturas.

As atividades apresentadas para a MnP já apresentaram valores relativamente altos (exceto para *Pseudomonas putida*) indicando uma possível contribuição para a descoloração do pigmento para a maioria dos microrganismos usados.

As porcentagens de sideróforos presentes nas amostras também mostraram-se bastante significativas para contribuir na biotransformação da violaceína exceto para o fungo *Phanerochaete chrysosporium*.

Sabe-se que para o fungo *Lentinus edodes*, a Lac é produzida durante sua fase primária de crescimento enquanto que a MnP é produzida apenas no metabolismo secundário sob concentrações de nitrogênio escassas (Vinciguerra e col., 1997). Dessa maneira, ambas as enzimas podem haver contribuído para a transformação da violaceína, assim como a presença dos sideróforos.

A transformação de compostos orgânicos por microrganismos é extremamente complicada e qualquer generalização deve ser feita com cuidado. A habilidade de cada microrganismo agir sobre um substrato depende inclusive das concentrações dos componentes no meio de cultura utilizado.

A presença da violaceína no meio de crescimento dos microrganismos mostrou-se tóxica somente para o fungo *Trametes villosa* uma vez que, comparativamente ao seu controle, as taxas de crescimento do fungo foram inferiores.

6.2 Biotransformação utilizando os fungos *Trametes versicolor* CCT 4521, *Lentinus edodes* CCT 4519, *Trametes villosa* CCT 5567 e *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 24725 e as bactérias *Azotobacter vinelandii* 1228 (ESALQ) e *Pseudomonas putida* CCT 0598 em meio líquido

Após a inoculação dos frascos com os microrganismos utilizados, determinou-se a quantidade de tempo necessária para crescimento significativo dos microrganismos assim como suas produções enzimáticas. Ao completar o terceiro dia de crescimento dos microrganismos, amostras foram retiradas para determinações enzimáticas (Lacase, Lignina e Manganês peroxidase) e presença de sideróforos.

Tabela 13: Valores obtidos para as determinações das atividades enzimáticas e presença de sideróforos das amostras do 3º dia de experimento de descoloração da violaceína pelos microrganismos em meio líquido.

Microrganismos	Lac / UL ⁻¹	LiP / UL ⁻¹	MnP / UL ⁻¹	Sideróforos
<i>Lentinus edodes</i>	2,79	1,08	4,12	34,77%
<i>Trametes versicolor</i>	1,76	4,12	11,11	24,22%
<i>Azotobacter vinelandii</i>	2,73	N.D.	N.D.	18,33%
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	3,06	N.D.	1,82	2,45%
<i>Trametes villosa</i>	0,97	2,48	1,8	16,89%
<i>Pseudomonas putida</i>	37,23	N.D.	6,6	N.D.

N.D.= Não detectável.

No quarto dia de experimento, a violaceína foi adicionada ao meio de cultura líquido e a partir de então alíquotas foram sendo retiradas em intervalos de tempo variados para análise espectrofotométrica em 558 nm, comprimento de onda de máxima absorção da violaceína no meio de cultura. O gráfico 07 apresenta a descoloração da violaceína para os diferentes microrganismos.

A ordem cinética de descoloração da violaceína em meio líquido observada para estes microrganismos foi: *Azotobacter vinelandii* > *Trametes versicolor* > *Lentinus edodes* > *Trametes villosa* > *Phanerochaete chrysosporium* > *Pseudomonas putida*.

A bactéria *Azotobacter vinelandii* foi a que apresentou mais rápida descoloração da violaceína, em duas horas de experimento praticamente 95% do pigmento no meio já havia sido descolorido, ou seja, a violaceína havia sido biotransformada.

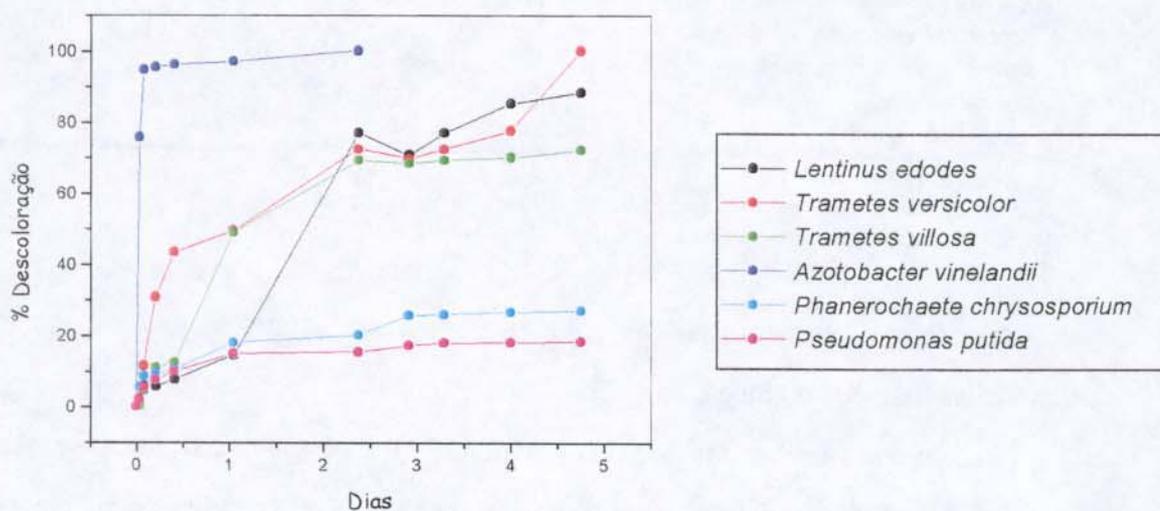


Gráfico 07: Descoloração da violaceína em meio líquido pelos microrganismos *Lentinus edodes*, *Trametes versicolor*, *Azotobacter vinelandii*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes villosa* e *Pseudomonas putida*.

Uma vez atingida a descoloração completa, novas amostras foram retiradas para determinação enzimática e presença de sideróforos.

Tabela 14: Valores obtidos para as determinações das atividades enzimáticas e presença de sideróforos das amostras referentes à descoloração completa da violaceína pelos microrganismos em meio líquido.

Microrganismos	Lac / UL ⁻¹	LiP / UL ⁻¹	MnP / UL ⁻¹	Sideróforos
<i>Lentinus edodes</i> *	1,13	N.D.	0,96	69,10%
<i>Trametes versicolor</i>	42,57	N.D.	5,94	69,25%
<i>Azotobacter vinelandii</i>	1,14	N.D.	N.D.	65,95%
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> *	1,30	N.D.	23,74	50,59%
<i>Trametes villosa</i> *	1,6	N.D.	3,05	51,67%
<i>Pseudomonas putida</i> *	0,38	N.D.	49,64	11,61%

N.D.= Não detectável.

* Amostras retiradas juntamente com a da bactéria *Azotobacter vinelandii*.

* Amostras retiradas juntamente com a do fungo *Trametes versicolor*.

Novamente, nota-se que os valores referente às atividades da enzima LiP foram insignificantes ou nulos.

Conforme os dados das tabelas 13 (pág. 79) e 14 (pág. 80), pôde-se observar que para a bactéria *Azotobacter vinelandii*, a porcentagem de sideróforos apresentou grande aumento e a atividade da enzima lacase diminuiu. Desta maneira a possibilidade de que eles tenham sido responsáveis pela rápida descoloração da violaceína é perfeitamente viável.

Para o fungo *Trametes versicolor* que também descoloriu completamente a violaceína, o valor relativo à atividade de enzima Lac aumentou bastante além da porcentagem de sideróforos. Nesse caso as possibilidades aceitas como fatores de descoloração do pigmento podem ser atribuídas à ação da enzima Lac ou à ação de sideróforos ou ainda à associação dos dois fatores.

Os fungos *Trametes villosa* e *Lentinus edodes* apresentaram valores baixos para as atividades enzimáticas de Lac e MnP mas um alto valor de porcentagem de sideróforos. Provavelmente foram os fatores responsáveis pela descoloração da violaceína apresentada, de forma isolada ou associada.

O fungo *Phanerochaete chrysosporium* apresentou um valor da atividade da enzima MnP mais alto além do aumento na porcentagem de sideróforos (vide tabela 13

e 14). Daí pode-se considerar que esses foram os fatores que contribuíram para a transformação do substrato.

Os valores da atividade da enzima lacase obtidos para a bactéria *Pseudomonas putida* chegaram quase a zero, contrastando muito com os altos valores determinados inicialmente e com a lentidão da descoloração do meio. Suspeita-se que essa bactéria produza alguma outra enzima ou ainda um sideróforo que interfiram na determinação da atividade da lacase. Os valores para a atividade da enzima MnP aumentou consideravelmente com o tempo, o que pode implicar na responsabilidade pela descoloração atingida.

O experimento de descoloração da violaceína em meio líquido apresentou ordem cinética diferente daquela do experimento em meio sólido, além de exigir um tempo muito inferior para a completa descoloração. As porcentagens de sideróforos determinadas nesse meio também foram superiores às das do experimento em meio sólido. Apesar disso, um fator importantíssimo a ser considerado no experimento em meio líquido é a quantidade de pigmento que pode ser adsorvida pela massa do microrganismo em crescimento.

6.2.1 Estudo do efeito da adsorção da violaceína na massa dos microrganismos

Pelo estudo de descoloração da violaceína pelos microrganismos *Azotobacter vinelandii*, *Trametes versicolor*, *Lentinus edodes*, *Trametes villosa*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Pseudomonas putida* em meio líquido, observou-se que adicionalmente à transformação enzimática, a adsorção de moléculas do pigmento nos "pellets" também contribuíram para a remoção da coloração da solução. Desta maneira, um experimento de adsorção do pigmento foi realizado utilizando os "pellets" dos microrganismos mortos.

As moléculas de violaceína adsorvidas estão sujeitas à ligação permanente ao "pellet", desorção física e até mesmo à degradação enzimática por enzimas extra ou

intracelulares caso os microrganismos não tivessem sido autoclavados (Wang e Yu, 1998).

Os gráficos 08 e 09 ilustram mais claramente os resultados encontrados para a adsorção da violaceína pelos "pellets" de cada microrganismo. Pelas suas interpretações pôde-se estabelecer que as taxas de adsorção apresentaram a seguinte ordem entre os microrganismos: *Trametes villosa* > *Azotobacter vinelandii* > *Lentinus edodes* > *Phanerochaete chrysosporium* > *Trametes versicolor* > *Pseudomonas putida*.

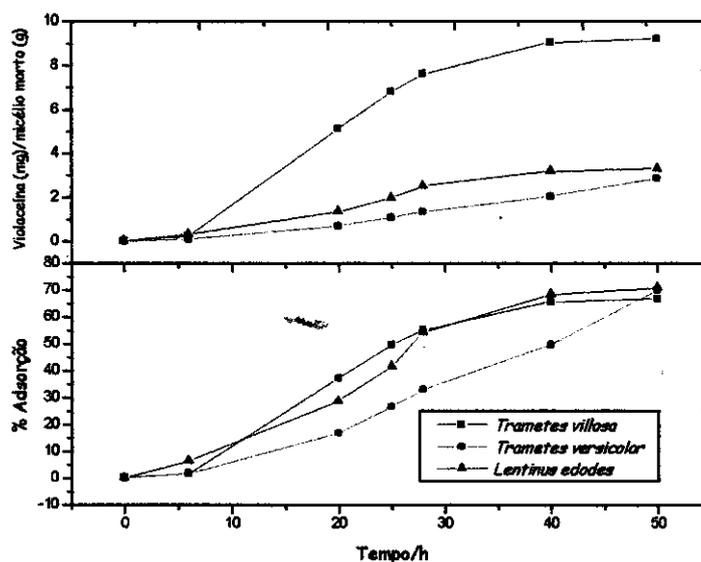


Gráfico 08: Estudo de adsorção da violaceína nos "pellets" dos microrganismos *Lentinus edodes*, *Trametes versicolor* e *Trametes villosa*.

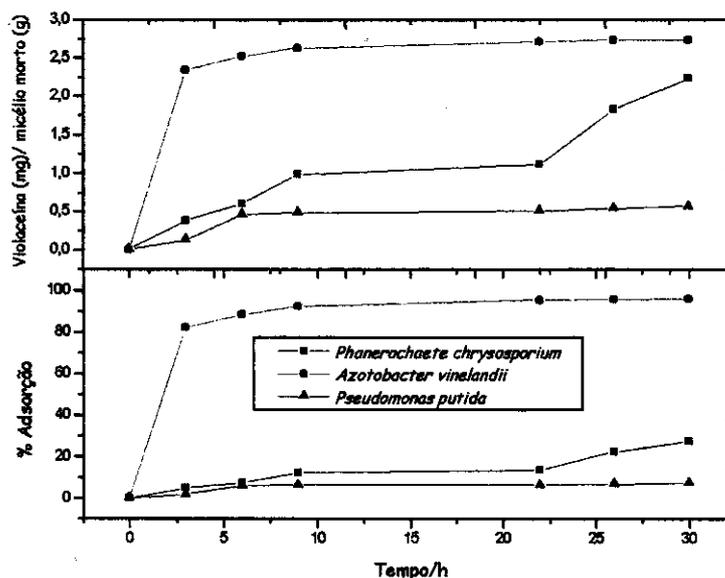


Gráfico 09: Estudo de adsorção da violaceína nos "pellets" dos microrganismos *Azotobacter vinelandii*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Pseudomonas putida*.

Para a bactéria *Azotobacter vinelandii* que mostrou-se o microrganismo mais rápido a descolorir completamente a violaceína em meio líquido, a adsorção observada também foi grande. No entanto, ao observar o gráfico da descoloração (gráfico 06), nota-se que em apenas duas horas a bactéria descoloriu cerca de 95% da violaceína presente no meio, ou seja, quando o efeito de adsorção deveria iniciar praticamente não haveria mais violaceína no meio de cultura.

Considerando o fungo *Trametes versicolor*, que apresentou a segunda descoloração mais rápida da violaceína em meio líquido, observou-se uma adsorção inferior (cerca de 70% em 50 horas). Apesar disso, pelo gráfico 06 notamos que em dois dias o fungo já apresentava mais de 70% de descoloração do substrato, ou seja, o processo de descoloração ocorre antes do início do processo de adsorção.

Comportamentos similares foram observados para os fungos *Trametes villosa* e *Lentinus edodes* possibilitando afirmar que o processo de adsorção não contribuiu significativamente para a descoloração do meio contendo a violaceína.

A adsorção da violaceína observada para o fungo *Phanerochaete chrysosporium* e para a bactéria *Pseudomonas putida* foi bem inferior aos demais microrganismos e provavelmente não deve ter contribuído para a descoloração do meio líquido contendo a violaceína, uma vez que essa descoloração também não foi alta.

De maneira geral pôde-se observar que apesar do processo de adsorção ser extremamente alto, o tempo necessário para essa adsorção é muito grande quando comparado ao tempo necessário para a descoloração da violaceína em meio de cultura líquido. Assim, a descoloração da violaceína pelos microrganismos ocorreu principalmente devido à ação de enzimas e/ou sideróforos e não ao processo de adsorção.

CAPÍTULO 7
CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- As enzimas selecionadas para a biotransformação da violaceína mostraram-se eficientes nas reações. A ordem cinética observada foi LiP/MnP < Lac-HBT < Lac < HRP-VI < LPO enquanto que a referente à taxa de conversão do substrato foi LiP/MnP < Lac < Lac-HBT < LPO < HRP-VI.

- A biotransformação da violaceína com a enzima HRP-VI mostrou-se a mais adequada para isolar o produto obtido e tentar caracterizá-lo.

- Pela realização de algumas técnicas espectroscópicas sugeriu-se uma estrutura para o produto obtido apesar das dificuldades na interpretação dos resultados.

- Esse novo composto apresentou um efeito citotóxico em células de mamíferos inferior ao obtido para a violaceína, no entanto sua toxicidade aguda apresentou valores maiores.

- O fato do maior valor citotóxico obtido para o composto estudado ter sido no teste relacionado à capacidade respiratória das células V79 adicionado ao fato do alto valor de efeito tóxico apresentado no teste de toxicidade aguda (relacionado à respiração de células bacterianas), podem sugerir que o efeito tóxico apresentado pela droga biotransformada interfira no mecanismo de respiração celular, apesar da diferença entre as células utilizadas nos dois experimentos mencionados.

- A ordem cinética de descoloração observada no experimento de biotransformação da violaceína em meio sólido foi: *Lentinus edodes* > *Trametes versicolor* > *Azotobacter vinelandii* > *Phanerochaete chrysosporium* > *Trametes villosa* > *Pseudomonas putida*. Aparentemente, a enzima LiP não contribuiu significativamente para a transformação do substrato. A presença da violaceína no meio de crescimento dos microrganismos utilizados mostrou-se tóxica somente para o fungo *Trametes villosa*.

- A ordem cinética de descoloração observada no experimento de biotransformação da violaceína em meio líquido foi: *Azotobacter vinelandii* > *Trametes versicolor* > *Lentinus edodes* > *Trametes villosa* > *Phanerochaete chrysosporium* > *Pseudomonas putida*. O tempo utilizado para a completa descoloração do substrato foi pelo menos duas vezes menor do que o tempo gasto no experimento realizado em meio sólido, apesar de nem todos os microrganismos terem apresentado completa descoloração.

- Pelo teste de adsorção da violaceína nos "pellets" inoculados, observou-se a seguinte ordem: *Trametes villosa* > *Azotobacter vinelandii* > *Lentinus edodes* > *Phanerochaete chrysosporium* > *Trametes versicolor* > *Pseudomonas putida*. Apesar da grande adsorção observada deve-se lembrar que os tempos nos quais os microrganismos levaram para descolorir a violaceína foram inferiores ou muito próximos aos do início da adsorção.

- A descoloração da violaceína pelos microrganismos ocorreu principalmente devido à ação de enzimas e/ou sideróforos e não ao processo de adsorção.

CAPÍTULO 8
PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Devido à extensão desse trabalho, diversos pontos podem ser explorados ainda principalmente no que se refere à obtenção de novos produtos, suas caracterizações e determinações de efeitos tóxicos. Assim, sugere-se que:

- O produto obtido da biotransformação da violaceína com a enzima HRP-VI seja caracterizado por completo e que sejam realizados testes para determinação de atividades biológicas a fim de compará-los com aqueles realizados com amostra de Violaceína.
- Um estudo completo da cinética da reação da violaceína com a enzima HRP-VI seja realizado com o intuito de otimizar o rendimento da reação.
- A realização em maior escala de ao menos uma biotransformação utilizando microrganismos (especialmente com o fungo *Trametes versicolor* que apresentou resultados promissores quanto à conversão da violaceína em meio líquido) possibilitando o estudo da formação de um novo produto.
- Novas enzimas (dioxigenases por exemplo) e microrganismos (ascomicetos e actinomicetos por exemplo) sejam testados para biotransformar a Violaceína.
- Realização de um teste de adição de violaceína no próprio cultivo de sua bactéria (*Chromobacterium violaceum*) e o estudo das consequências geradas.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, L.E. e Tabak, M.: Enzymatic oxidation of dipyridamole by horseradish peroxidase; *Biophys. J.*, 78: 2456 Pos; 2000.

Annadurai, G.; Balan, S.M. e Murugesan, T.: Box-Behnken design in the development of optimized complex medium for phenol degradation using *Pseudomonas putida* (NICM 2174); *Biopr. Eng.*, 21: 415-421; 1999.

Aski, S.; Nomura, Y.; Mizutani, H.; Hashimoto, O. e Matsuoka, M.: *Sen'i Gakkaishi*, 53: 453-460; 1997.

Ballantine, J.A.; Beer, R.J.S. e Crutchey, D.J.: The synthesis of violacein and related compounds, *Proc. Chem. Soc.*, 232-233; 1958.

Ballantine, J.A.; Beer, R.J.S., Crutchey, D.J.; Dodd, G.M. e Palmer, D.R.: The chemistry of bacteria. Part VIII. The synthesis of violacein and related compounds, *J. Chem. Soc.*, 459: 2292-2299; 1960.

Ballows, A.: The prokariotes, V 3, Second edition; Springer-Verlag, New York Inc., New York; 1992.

Beer, R.J.S.; Kenneth, C.H.; Khorana, H.G. e Robertson, A.: The chemistry of bacteria. Part II. Some degradation products of violacein; *J. Chem. Soc.*, 186: 885-889; 1949.

Beer, R.J.S.; Jennings, B.E. e Robertson, A.: The chemistry of bacteria. Part III. An indolyppyrrylmethene from violacein; *J. Chem. Soc.*, 327: 2679-2685; 1954.

Bergonzini, C.: Sopra un nuovo bacterio colorato; *Annuario della Società dei Naturalisti in Modena*, 14: 149-158; 1881.

Boisbaudran, L.: Matière colorante se formant dans la colle de farine; Comp. Rend., 94: 562-563; 1882.

Buchanan, R.E.: Studies in the nomenclature and classification of bacteria. V. Subgroups and genera of the Bacteriaceae; J. Bacteriol., 3: 27-61; 1918.

Caldas, L.R.: Photochemistry and photobiology in a virgin land; Photochem. Photobiol., 26: 1-2; 1977.

Caldas, L.R.: Um pigmento na águas negras; Ciência Hoje, 11: 55-60; 1990.

Caldas, L.R.; Leitão, A.A.C.; Santos, S.M. e Tyrrell, R.M.; Inter. Symp. Curr. Topics Radiol. Photobiol., Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, novembro, 121; 1978.

Callely, A.G.: The microbial degradation of heterocyclic compounds, In: Progress in industrial microbiology; Elsevier, 14: 205-281; 1978.

Campos, V.; Erazo, S. e Durán, N.: Novos fotoprodutos com atividade antimicrobiana de *Chromobacterium violaceum*; Arg. Biol. Technol., 25: 147-151; 1982.

Catálogo de Linhagens - Coleção de Culturas Tropical (CCT); Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello", p 139; 1996.

Chatterjee, R.; Bandyopadhyay, U.; Mazumdar, A. e Banerjee, R.K.: Lactoperoxidase-catalysed oxidation of Indomethacin, a nonsteroidal antiinflammatory drug, through the formation of a free radical; Biochem. Pharm., 52: 1169-1175; 1996.

Cingi, M.R.; De Angelis, I.; Fortunati, E.; Reggiani, D.; Bianchi, V.; Tiozzo, R. e Zucco, F.: Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach; Toxic. In Vitro, 5: 119-125; 1991.

Colonna, S.; Gaggero, N.; Richelmi, C. e Pasta, P.: Recent biotechnological developments in the use of peroxidases; *Tib. Tech.*, 17: 163-168; 1999.

D'Annibale, A.; Crestini, C.; Vinciguerra, V. e Sermanni, G.G.: The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus; *J. Biotechnol.*, 61: 209-218; 1998.

De Azevedo, M.B.M.; Alderete, J.; Rodriguez, J.A.; Souza, A.O.; Rettori, D.; Torsoni, M.A.; Faljoni-Alario, A.; Haun, M. e Durán, N.: Biological activities of violacein, a new antitumoral indole derivative, in an inclusion complex with β -cyclodextrin; *J. Incl. Phen. Macr. Chem.*, 20: 1-9; 1999.

De Conti, R.; Oliveira, D.A.; Fernandes, A.M.A.P.; Melo, P.S.; Rodriguez, J.A.; Haun, M.; De Castro, S.L.; Souza-Brito, A.R.M. e Durán, N.: Application of a multi-endpoint cytotoxicity assay to the compounds 2-propen-1-amine derivatives and determination of their acute toxicity; *In vitro Molec. Toxicol.*, 11: 153-160; 1998.

Demirjian, D.C.; Shah, P.C. e Moris-Varas, F.: Screening for novel enzymes; *Biocat. - Disc. Appl.*, 200: 1-29, 1999.

De Moss, R.D.; In : Gottleb, D. e Shaw, P. (ed); Mechanisms of Action and Biosynthesis of Antibiotics; Vol 2: 77-81; Springer-Verlag, New York; 1967.

De Moss, R.D. e Evans, N.R.: Physiological aspects of violacein biosynthesis in nonproliferating cells; *J. Bacteriol.*, 78: 583-588; 1959.

De Moss, R.D. e Evans, N.R.: Incorporation of C^{14} - labeled substrates into violacein; *J. Bacteriol.*, 79: 729-732; 1960.

Denizot, F. e Lang, R.: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability; *J. Immunol. Meth.*, 89: 271-277; 1986.

Durán, N.; Antônio, R.V.; Haun, M. e Pilli, R.A.; Biosynthesis of a Trypanocide of *Chromobacterium violaceum*; W. J. Microbiol. Biotechnol., 10: 686-689; 1994.

Durán, N.; Campos, V.; Riveros, R.; Joyas, A.; Pereira, M.F. e Haun, M.; Bacterial Chemistry-III: Preliminary Studies on Trypanosomal Activities of *Chromobacterium violaceum* products; An. Acad. Bras. Ciências, 61: 31-36; 1989.

Durán, N.; De Conti, R. e Rodrigues, J.A.R.; Biotransformations by microorganisms, organisms and enzymes: state of art; Bol. Soc. Chil. Quím., 45: 000-000; 2000.

Durán, N. e Esposito, E.; In: Melo, I.S. and Azevedo, J.L. (ed); Microbiologia ambiental; Capítulo 12: 269-292; EMBRAPA, Jaguariúna-SP; 1997.

Durán, N. e Faljoni-Alario, A.; Bacterial Chemistry - I: Studies of a potential phototherapeutic substance from *Chromobacterium violaceum*; An. Acad. Bras. Ciências, 52: 297-302; 1980.

Durán, N.; Melo, P.S. e Haun, M.; *In vitro* evaluation of violacein on AIDS-related lymphoma and human tumor cell lines; In XXV Annual Meetings of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology, pp150. Caxambu: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq); 1996.

Durán, N.; Santiago, M.; Parra, C. e Rodríguez, J.; Mimetic phenoloxidase activity: lignin and clorolignin degradation with low molecular weight chelators; 10th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Vol. 1, Japan; 1999_b.

Durán, N.; Santiago, M.; Rodriguez, J.; Parra, C.; Oses, R.; Freer, J. e Baeza, J.; Lignin degradation by low molecular mass iron chelating compounds: application in the pulp and paper industry; 10th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Vol. 1, Japan; 1999_a.

Durán, N.; Sato, L.M.; Jardim, L.A.; Moraes, S.G. e De Conti, R.; Bull. Soc. Chile. Chim., 43: 91-96; 1998.

Eaton, R. W. e Chapman, P. J.; Formation of indigo and related compounds from indolecarboxylic acids by aromatic acid-degrading bacteria: chromogenic reactions for cloning genes encoding dioxygenases that act on aromatic acids; J. Bacteriol., 177: 6983-6988; 1995.

Faber, K.; *Biotransformations in Organic Chemistry - A textbook*; 3ª edição; Springer-Verlag; New York; 1997.

Fekete, F.A.; Chandhoke, V. e Jellison, J.; Iron-binding compounds produced by wood-decaying basidiomycetes; Appl. Environ. Microbiol., 55: 2720-2722; 1989.

Ferrari, R.P.; Laurenti, E. e Trotta, F.; Oxidative 4-dechlorination of 2,4,6-trichlorophenol catalysed by horseradish peroxidase; J. Biol. Inorg. Chem., 4: 232-237; 1999.

Ferreira, V.S.; Da Silva, J.G. e Bom, E.P.S.; Degradação e Síntese de corantes usando lignina peroxidase fúngica; 4º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, Outubro-1999, Rio de Janeiro-R.J, Brasil.

Friedheim, E.A.H; La fonction respiratoire du pigment du *Bacillus violaceus*; Comp. Rend. Soc. Biol., 110: 353-356; 1932.

Ghiourelotis, M. e Nicell, J.A.; Toxicity of soluble products from the peroxidase-catalysed polymerization of substituted phenolic compounds; J. Chem. Technol. Biotechnol., 75: 98-106; 2000.

Glend, J.K.; Morgan, M.A.; Mayfield, M.B.; Kiawahara, M. e Gold, M.H.; An extracellular H₂O₂ - requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by

the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*: *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 114: 1077-1083; 1983.

Gold, M.H.; Wariishi, H. e Valli, K.: Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* ; In: Whitaker, J.R. and Sonnet, P.E. ed., *Biocatalysis in agricultural biotechnology*, Washington: American Chemical Society, 127-140; 1989. (ACS Symposium Series, 389).

Gramss, G.; Kirsche, B.; Voigt, K.D.; Gunther, T. e Fritsche, W.: Conversion rates of five polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid cultures of fifty-eight fungi and the concomitant production of oxidative enzymes; *Myc. Res.*, 103: 1009-1018; 1999.

Guimarães, C.; Bento, L.S.M. e Mota, M.: Biodegradation of colorants in refinery effluents; *Int. Sugar Jnl.*, 101: 246-251; 1999.

Hamada, M.; Kondo, S.; Nakamura, H.; Ikeda, T.; Ykeda, D.; Iinuma, K.; Gome, S.; Ikeda, Y.; Takeuchi, T.; Umezawa, H. e Iitaka, Y.: A new antibiotic, 3,6-dihydroxyindoxazene; *J. Antibiot.*, 36: 445-447; 1983.

Hamilton, G.A.: In: Hayaishi, O. (ed.); *Molecular mechanisms of oxygen activation*; Capítulo 10: 438-440; Nova Iorque; 1974.

Hartley, W.J.: On a violet colouring-matter and its production by a certain bacterium; *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.*, 14: 63-73; 1913.

Hassan, H.; Suntharalingam, S. e Dhillon, K.S.: Fatal *Chromobacterium violaceum* septicemia; *Singapore Med. J.*, 34: 456-458; 1993.

Haun, M.; Pereira, M.F.; Hoffman, M.E.; Joyas, A.; Campos, V.; Filardi, L.D.S.; De Castro, S.L. e Durán, N.; Bacterial chemistry VI. Biological activities and cytotoxicity of 1, 3-dihydro-2H-indol-2-one derivatives; *Biol. Res.*, 25: 21-25; 1992.

Heinfling, A.; Bergbauer, M. e Szewzyk, U.; Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48: 261-266; 1997.

Heinfling, A.; Martínez, M.J.; Martínez, A.T.; Bergbauer, M. e Szewzyk, U.; Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction; *Appl. Environ Microbiol.*, 64: 2788-2793; 1998.

Horinouchi, M.; Yoshida, T.; Nojiri, H.; Yamane, H. e Omori, T.; Oxidation of dimethyl sulfide by various aromatic compound oxygenases from bacteria; *Biotechnol. Lett.*, 21: 929-933; 1999.

Hoshino, T.; Hayashi, T. e Odajima, T.; Biosynthesis of violacein: oxygenation at the 2-position of the indole ring and structures of proviolacein, prodeoxyviolacein and pseudoviolacein, the plausible biosynthetic intermediates of violacein and deoxyviolacein; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1565-1571; 1995.

Hoshino, T.; Hayashi, T. e Uchiyama, T.; Pseudodeoxyviolacein, a new red pigment produced by tryptophan metabolism of *Chromobacterium violaceum*; *Biosc. Biotech. Biochem.*, 58: 279-282; 1994_a.

Hoshino, T.; Kimura, K.; Takahashi, H.; Uchiyama, T. e Yoshihama, M.; Eur. Pat. Appl. EP 612,742 (Cl. C07D403114), 31 Ago 1994, JP Appl. 93/56,510,22 Fev 1993; 12p; 1994_b.

Hoshino, T; Kondo, T.; Uchiama, T. e Ogasawara, N.; Biosynthesis of violacein: a novel tryptophan metabolism with a 1,2-shift of the indole ring; *Agric. Biol. Chem.*, 51: 965-968; 1987_a.

Hoshino, T; Kondo, T.; Uchiama, T. e Ogasawara, N.; Biosynthesis of violacein: a novel tryptophan metabolism with a 1,2-shift of the indole ring; *Agric. Biol. Chem.*, 51: 2733-2741; 1987_b.

Hoshino, T; e Ogasawara, N.; Biosynthesis of violacein: evidence for the intermediacy of 5-hydroxy-L-tryptophan and the structure of a new pigment, oxyviolacein, produced by the metabolism of 5-hydroxytryptophan; *Agric. Biol. Chem.*, 54: 2339-2346; 1990.

Hoshino, T. e Yamamoto, M.; Conversion from tryptophan precursor into violacein pigments by cell-free system from *Chromobacterium violaceum*; *Biosc. Biotech. Biochem.*, 61: 2134-2136; 1997.

<http://biotech.icmb.utexas.edu/search/dict.search>; Life Science Dictionary - Biotechnology Dictionary.

<http://www.tamu-commerce.edu/coas/biology/weinstein/bsc597/biotrans.html>

http://www.igb.fhg.de/Biokat/en/Biotrans_home.en.html; IGB- Institut Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik.

Huveneers-Oorsprong, M.B.M.; Hoogenboom, L.A.P. e Kuiper, H.A.; The use of the MTT test for determining the cytotoxicity of veterinary drugs in pig hepatocytes; *Toxicol. in vitro*, 11: 385-392; 1997.

Huffam, S.E.; Nowotny, M.J. e Currie, B.J.; *Chromobacterium violaceum* in tropical northern Australia; *Med. J. Austr.*, 168: 335-337; 1998.

Itoh, K.; Fujita, M.; Kumano, K.; Suyama, K. e Yamamoto, H.; Phenolic acids affect transformations of chlorophenols by a *Coriolus versicolor* laccase; *Soil Biol. Biochim.*, 32: 85-91; 2000.

Jakob, H.; Del Grosso, M.; Kuver, A. e Hu, S.; Delignification of chemical pulp with laccase and mediators-A concept with a future?; *Papier*, 53: 85-95; 1999.

Johannes, C. e Majcherczyk, A.; Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems; *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:524-528; 2000.

Johnson, W.M.; Di Salvo, A. e Steuer, R.; Fatal *Chromobacterium violaceum* septicemia; *A.J.C.P.*, 56: 400-406; 1971.

Jonas, U.; Hammer, E.; Schauer, F. e Bollag, J.M.; Transformation of 2-hydroxydibenzofuran by laccases of the white rot fungi *Trametes versicolor* and *Pycnoporus cinnabarinus* and characterization of oligomerization products; *Biodegradation*, 8: 321-328; 1998.

Justo, G.Z.; Anticorpos catalíticos: expandindo o alcance da catálise enzimática; *Quím. Nova*, 21:86-98; 1998.

Kaufman, S.C.; Ceraso, D. e Schugurensky, A.; First case report from Argentina of fatal septicemia caused by *Chromobacterium violaceum*. *J. Clin. Microbiol.*, 23: 956-958; 1986.

Kawai, S.; Nakagawa, M. e Ohashi, H.; Aromatic ring cleavage of a non-phenolic beta-O-4 lignin model dimer by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of 1-hydroxybenzotriazole; *FEBS Let.*, 446: 355-358; 1999.

Kazunga, C.; Aitken, M.D. e Gold, A.: Primary product of the horseradish peroxidase-catalysed oxidation of pentachlorophenol; *Environ. Sci. Technol.*, 33: 1408-1412; 1999.

Krcmar, P.; Kubatova, A.; Votruba, J.; Erbanova, P.; Novotny, C. e Sasek, V.: Degradation of polychlorinated biphenyls by extracellular enzymes of *Phanerochaete chrysosporium* produced in a perforated plate bioreactor; *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 15: 269-276; 1999.

Kidder, G.w. e Stuart, C.A.: Growth studies on ciliates I. The role of bacteria in the growth and reproduction of *Colpoda*; *Physiol. Zool.*, 12: 329- 331; 1939.

Knapp, J.S. e Newby, P.S.: The decolourisation of a chemical industry effluent by white rot fungi; *Wat. Res.*, 33: 575-577; 1999.

Knox, P.; Uphill, P.F.; Fry, J.R.; Benford, J. e Balls, M.: The frame multicentre project on *in vitro* cytotoxicology; *Fd. Chem. Toxic.*, 24: 457-463; 1986.

Kumar, M.; Chaturvedi, V.K. e Singh, D.P.: *Chromobacterium violaceum* - an unusual pathogen of swine; *Indian Veter. J.*, 76: 869-871; 1999.

Kuwahara, M.; Glenn, J.K.; Morgan, M.A. e Gold, M.H.: Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ - dependent oxidases from lignolytic culture of *Phanerochaete chrysosporium*; *FEBS Let.*, 169: 247-250; 1984.

Kwang-Soo, S. e Chang-Jin, K.: Decolorisation of artificial dyes by peroxidase from the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*; *Biotechnol. Let.*, 20: 569-572; 1998.

Laatsch, H.; Thomson, T.H. e Cox, P.J.: Spectroscopic properties of violacein and related compounds: crystal structure of tetramethylviolacein; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 27: 1331-1339; 1984.

Lasseur, P. e Girardet, R.; Contribution a l'étude des pigments microbiens; Bull. Trimestriel Soc. Sci. Nancy, 3: 1-77; 1926.

Lee, J.; Kim, J.S.; Choi, J.W.; Kim, J.; Pai, S.H.; Moon, K.H.; Lee, K e Chong, Y.; Two cases of *Chromobacterium violaceum* infection after injury in a subtropical region; J. Clin. Microbiol., 37: 2068-2070; 1999.

Leuenberger, H.G.W.; Methodology - Biotransformations , In: Biotechnology, 6 A: 5-29; Verlag Chemie (ed), Weinheim, Federal Republic of Germany; 1984.

Li, K.; Helm, R.F. e Erikson, K.E.L.; Mechanistic studies of the oxidation of a non-phenolic lignin model compound by the laccase/1-hydroxybenzotriazole redox system; Biotechnol. Appl. Biochem., 27: 239-243; 1998.

Lichstein, H.C. e Van de Sand, V.F.; Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*; J. Infec. Dis., 76: 47-51; 1945.

Licht, D.; Johansen, S.S.; Arvin, E. e Ahring, B.K.; Transformation of indole and quinoline by *Desulfobacterium indolicum* (DSM 3383); Appl. Microbiol. Biotechnol.; 47: 167-172; 1997.

Linko, S.; Continuous production of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*; J. Biotechnol., 4: 283-291; 1986.

Linko, S. e Zhong, L.C.; Comparison of different methods of immobilization for lignin; Biotechnol. Techn., 1:251-256; 1987.

Liu, D.; Maguire, R.J.; Lau, Y.L.; Pacepavicius, G.J., Okamura, H. e Aoyama, I.; Transformation of the new antifouling compound irgarol 1051 by *Phanerochaete chrysosporium*; Wat. Res., 31: 2363-2369; 1997.

Lynch, R. M.; Woodley, J. M. e Lilly, M. D.: Process design for the oxidation of fluorobenzene to fluorocathecol by *Pseudomonas putida*, J. Biotechnol., 58: 167-175; 1997.

Machín Villafranca, C.; Ley, M. e Hernández, L.T.: Infeccion por *Chromobacterium violaceum* presentacion de un caso com evolucion fatal; Rev. Cub. Med Trop., 38: 353-357; 1986.

Macmillan, J.D.; Maxwell, W.A. e Chichester, C.O.: Lethal photosensitization of microorganisms with light from a continuous-wave gas laser; Photochem. Photobiol., 5: 555-565; 1966.

Manimekalai, R e Swaminathan, T.: Removal of hazardous compounds by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*; Bioproc. Eng., 22: 29-33; 2000.

Martin, J. e Brimacombe, J.: *Chromobacterium violaceum* septicemia - the intensive care management of 2 cases; Anaest. Intens. Care, 20: 88-90; 1992.

Matsumoto, K.; Takahashi, H.; Miyake, Y. e Fukuyama, Y.: Convenient synthesis of neurotrophic americanol A isoamericanol A by HRP catalysed oxidative coupling of caffeic acid; Tetr. Let., 40: 3185-3186; 1999.

May, G.; Brümmer, B. and Ott, H; Verfahren zur isolierung von violacein und seine verwendung zur prophylaxe und therapie von viruserkrankungen; Deutsches Patentamt Offenlegungsschrift DE 3,935,066 (CL.C12P17/16), 25 April 1991, Application. 20 october 1989, 5pp.

Mazerska, Z.; Gorlewska, K.; Kraciuk, A. e Konopa, J.: The relevance of enzymatic oxidation by horseradish peroxidase to antitumor potency of imidazoacridinone derivatives; Chem. Biol. Interac., 115: 1-22; 1998.

McClellan, 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. e Williams, P.: Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones, *Microbiol.*, 143:3703-3711; 1997.

Melo, P.S.: Pigmentos obtidos de *Chromobacterium violaceum* e *Serratia marcescens*, propriedade tripanocida da prodigiosina e estudos toxicológicos; Tese de Mestrado; Instituto de Química; Unicamp; Campinas - SP; Brasil; 1996.

Merck Catalog: Dyeing Reagents for thin layer and Paper Chromatography; Darmstadt, Germany; 1971.

Michel, Jr. F. R.; Dass, B.; Grulke, E. A. e Reddy, C. A.: Role of Manganese Peroxidases and Lignin Peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of Kraft Bleach Plant Effluent; *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 2368-2375; 1991.

Midani, S. e Rathore, M.: *Chromobacterium violaceum* infection; *Southern Med. J.*, 91: 464-466; 1998.

Milagres, A.M.F.; Machuca, A. e Napoleao, D.: Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay; *J. Microbiol. Met.*, 37: 1-6; 1999.

Miller, D.P.; Blevins, W.T.; Steele, D.B. e Stowers, M.D.: A comparative study of virulent and avirulent strains of *Chromobacterium violaceum*; *Can. J. Microbiol.*, 34: 249-255; 1987.

Miller, G.L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar; *Anal. Chem.*, 31: 426-428; 1959.

Mitoma, C.; Weissbach, H. e Udenfriend, S.: 5-Hydroxytryptophan formation and tryptophan metabolism in *Chromobacterium violaceum*; Arch. Biochem. Biophys., 63:122-130; 1956.

Momen, A.Z.M.; Mizuoka, T. e Hoshino, T.; Studies on the biosynthesis of violacein. Part 9. Green pigments possessing tetraindole and dipyrromethene moieties, chromoviridans and deoxychromoviridans, produced by cell-free extract of *Chromobacterium violaceum* and their biosynthetic origins; J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 1: 3087-3092; 1998.

Monzani, E.; Gatti, A.L.; Profumo, A.; Casella, L. e Gullotti, M.; Oxidation of phenolic compounds by lactoperoxidase. Evidence for the presence of a low-potential compound II during catalytic turnover; Biochem., 36: 1918-1926; 1997.

Moraes, S.G.; Degradação de compostos organoclorados aromáticos: caracterização e toxicidade de intermediários; Tese de Mestrado; Instituto de Química; Unicamp; Campinas - SP; Brasil; 1995.

Mougin, C.; Laugero, C.; Asther, M. e Chaplin, V.; Biotransformation of s-Triazine and related degradation products in liquide cultures by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*; Pestic. Sci., 49: 169-177; 1997.

Mougin, C.; Pericaud, C.; Malosse, C.; Laugero, C. e Asther, M.; Biotransformation of the inseticide lindane by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*; Pestic. Sci., 47: 51-59; 1996.

Nakayama, T. e Amachi, T.; Fungal peroxidase: its structure, function and application; J. Molec. Cat. B-Enz., 6: 185-198; 1999.

Neilands, J. B.; Microbial iron compounds; Ann. Ver. Biochem., 50: 715-731; 1981.

Ognibene, A.J. e Thomas, E.; Fatal infection due to *Chromobacterium violaceum* in Vietnam; *A.J.C.P.*, 54: 607-610; 1970.

Okeke, B.C.; Paterson, A.; Smith, J.E. e Watson-Craik, I.A.; Comparative biotransformation of pentachlorophenol in soils by solid cultures of *Lentinula edodes*; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48: 563-569; 1997.

Ollikka, P.; Harjunpaa, T.; Palmu, K.; Mantsala, P. e Suominen, I.; Oxidation of Crocein Orange G by lignin peroxidase isoenzymes kinetics and effect of H₂O₂; *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 75: 307-321; 1998.

Onille, A.; Sobowale, B.O. e Odugbemi, T.; Human infection due *Chromobacterium violaceum*: a report from Ilorin, Nigeria; *East Afr. Med.*, 61: 849-852; 1984.

Osiadack, J.; Abdulkareem, A.J.H.; Bajraszewska, D.; Fischer, P. e Peczyńska-Czoch, W.; On the use of *Trametes versicolor* laccase for the conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to actinocin chromophore; *J. Bacteriol.*, 72: 141-149; 1999.

Pankratov, A.N.; Tsivileva, O.M. e Nikitina, V.E.; Laccase of *Lentinus edodes* catalysed oxidation of amines and phenolic compounds: A semiempirical quantum chemical consideration; *J. Biochem. Molec. Biol.*, 33: 37-42; 2000.

Parker, W.L.; Rathnum, M.L.; Johnson, J.H.; Wells, J.S.; Principe, P.A. e Sykes, R.B.; Aerocyanidin, a new antibiotic produced by *Chromobacterium violaceum*; *J. Antibiot.*, 41: 454-460; 1988.

Paszczynski, A. e Crawford, R.L.; Degradation of azo compounds by Ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of veratryl alcohol; *Biochem. Biophys Res. Comm.*, 178: 1056-1063; 1991.

Peralta-Zamora, P.; Esposito, E.; Pelegrini, R.; Groto, G.; Reyes, J. e Durán, N.: Effluent treatment of pulp and paper, and textile industries using immobilized horseradish peroxidase; *Environ. Technol.*, 19: 55-63; 1998.

Petrillo, V. F.; Severo, V.; Santos, M. M. e Edelweiss, E. L.; Recurrent infection with *Chromobacterium violaceum*: first case report from South America; *J. infec.*, 9: 167-169; 1984.

Ponte, R. e Jenkins, S.G.: Fatal *Chromobacterium violaceum* infections associated with exposures to stagnant waters; *Pediatr. Infect. Dis.*, 11:583-586; 1992.

Poppe, L. e Novák, L.: *Selective Biocatalysis - A Synthetic Approach*; VCH (ed); Weinheim, Federal Republic of Germany; 1992.

Ralph, J.P. e Catcheside, D.E.A.: Involvement of manganese peroxidase in the transformation of macromolecules from low-rank coal by *Phanerochaete chrysosporium*; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49: 778-784; 1998.

Ralph, J.P.; Graham, L.A. e Catcheside, D.E.A.: Extracellular oxidases and the transformation of solubilised low-rank by wood-rot fungi; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46: 226-232; 1996.

Reilly, J. e Pyne, G.: On the pigment produced by *Chromobacterium violaceum*; *Biochem J.*, 21: 1059-1064; 1927.

Renzi, D.; Valtolina, M. e Forster, R.: The evaluation of a multi-endpoint cytotoxicity assay system; *ATLA*, 21: 89-96; 1993.

Repetto, G e Sanz, P.: Neutral red uptake, cellular growth and lysosomal function: *in vitro* effects of 24 metals; *ATLA*, 21: 501-507; 1993.

Reszka, K.J.; Matuszak, Z.; Chignell, C.F. e Dillon, J.: Lactoperoxidase-catalysed oxidation of melanin by reactive nitrogen species derived from nitrite (NO_2^-): an EPR study; *Free Rad. Biol. Med.*, 25: 208-216; 1998.

Reszka, K.J.; Matuszak, Z.; Chignell, C.F. e Dillon, J.: Oxidation of biological electron donors and antioxidants by a reactive lactoperoxidase metabolite from nitrite (NO_2^-): an EPR and Spin trapping study; *Free Rad. Biol. Med.*, 26: 669-678; 1999.

Rettori, D.: Produção, extração e purificação da violaceína: um antibiótico produzido pela *Chromobacterium violaceum*; Tese de Mestrado; Instituto de Química; Unicamp; Campinas - SP; Brasil; 1996.

Rettori, D. e Durán, N.: Production, extraction and purification of violacein: na antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*; *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, 14: 685-688; 1998.

Rettori, D.; Rodrigues, R.A. e Durán, N.; *Chromobacterium violaceum* produces violacein oxidative stress; *Rev. Farm. Bioquim. Univ. S.Paulo*, 34: 169; 1998.

Riddell, R.J.; Clothier, R.H. e Balls, M.: An evaluation of three *in vitro* cytotoxicity assays; *Fd. Chem. Toxic.*, 24: 469-471; 1986.

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

Riveros, R.; Haun, M.; Campos, V. e Durán, N.: Bacterial Chemistry-IV. Complete characterization of violacein: na antibiotic and trypanocide pigment from *Chromobacterium violaceum*; *Arq. Biol. Technol.*, 31: 475-487; 1988.

Roberts, S.A.; Morris, A.J.; McIvor, N. e EllisPegler, R.: *Chromobacterium violaceum* infection of the deep neck tissues in a traveler to Thailand; *Clin. Infect. Dis.*, 25: 334-335; 1997.

Roberts, S.M.; Turner, N.J.; Willetts, A.J e Turner, M.K.; Introduction to biocatalysis using enzymes and micro-organisms - Cambridge University Press; New York; 1995.

Rodríguez, J.; Osés, R.; Parra, C.; Freer, J. e Baeza, J.; Siderophore production by lignin degrading fungi; Fifth Brazilian Symposium of the Chemistry of lignins and other wood components, p 601-604, Curitiba, Brasil; 1997.

Rodriguez, S.; Pickard, M.A. e Vazquez-Duhalt, R.; Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi; *Cur. Microbiol.*, 38: 27-32; 1999.

Sani, R.K.; Azmi, W. e Banerjee, U.C.; Comparison of static and shake cultures in the decolorization of textile dyes and dye effluents by *Phanerochaete chrysosporium*; *Folia Microbiol.*, 43: 85-88; 1998.

Schneider, R.; Die Bedeutung der Bakterienfarbstoffe für die unterscheidung der Arten; 1895.

Schwyn, B. e Neilands, J.B.; Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores; *Anal. Biochem.*, 160:47-56; 1987.

Sevinc, M.S. e Page, W.J.; Generation of *Azotobacter vinelandii* strains defective in siderophore production and characterization of a strain unable to produce know siderophores; *J. Gen. Microbiol.*, 138: 587-596; 1992.

Shanker, R.; Kaiser, J.P e Bollag, J.M.; Microbial transformation of heterocyclic molecules in deep subsurface sediments; *Microb. Ecol.*; 22: 305-316; 1991.

Shcherbakova, V.A.; Obratsova, A.Y.; Laurinavichyus, K.S. e Akimenko, V.K.; Transformation of indoles by pure and accumulative cultures of methane-producing bacteria; *Appl. Biochem. Microbiol.*, 33: 65-69; 1997.

Shim, J.Y.; Chang, Y.J. e Kim, S.U.; Indigo and indirubin derivatives from indoles in *Polygonum tinctorium* tissue cultures; *Biotechnol. Lett.*, 20: 1139-1143; 1998.

Simmonds, J. e Robinson, G.K.; Formation of benzaldehyde by *Pseudomonas putida* ATCC 12633; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50: 353-358; 1998.

Singh, B.N.; Toxic effects of certain bacterial products on soil protozoa; *Nature*, 149: 168; 1942.

Singh, P.D.; Liu, W.C.; Gougoutas, J.Z.; Malley, M.F.; Porubcan, M.A.; Trejo, W.H.; Wells, J.S. e Sykes, R.B.; Aerocavin, anew antibiotic produced by *Chromobacterium violaceum*; *J. Antibiot.*, 41: 446-453; 1988.

Sneath, P. H.; *Chromobacterium* Bergonzini 1881, 8th ed., p 354-357. In: R. E. Gibbons (ed), *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore; 1974.

Sorensen, R.U.; Jacobs, M.R e Shurin, S.B.; *Chromobacterium* adenitis acquired in the northern United States as a complication of chronic granulomatous disease; *Pediatr. Infect. Dis.*, 4: 701-705; 1985.

Souza, A.; Aily, D.C.G.; Sato, D.N. e Durán, N.; Atividade da violaceína *in vitro* sobre *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇RA; *Rev. Inst. Adolfo Lutz.*, 58: 59-62; 1999.

Spadaro, J.T.; Gold, M.H. e Renganathan, V.; Degradation of azo dyes by lignin degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*; *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 2397-2401; 1992.

Spadaro, J.T. e Renganathan, V.: Peroxidase-catalysed oxidation of azo dyes - Mechanism of disperse yellow-3 degradation; *Arch. Biochem. Biophys.*, 312: 301-307; 1994.

Swamy, J. e Ramsay, J.A.: The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes; *Enz. Microb. Technol.*, 24: 130-137; 1999_a.

Swamy, J. e Ramsay, J.A.: Effects of Mn^{2+} and NH_4^+ concentrations on laccase and manganese peroxidase production and Amaranth decoloration by *Trametes versicolor*; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51: 391-396; 1999_b.

Szklarz, G.D.; Antibus, R.K.; Sinsabaugh, R.L. and Linkins, A.: Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi; *Mycol.*, 81: 234-240; 1989.

Tatarko, M. e Bumpus, J.A.: Biodegradation of congo red by *Phanerochaete chrysosporium*; *Wat. Res.*, 32: 1713-1717; 1998.

Thurston, C. F.: The structure and function of fungal laccases; *Microbiol.*, 140: 19-26; 1994.

Tien, M. e Kirk, T. K.: Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H_2O_2 -requiring oxygenase; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81: 2280-2284; 1984.

Timofeevski, S.L.; Nie, G.J.; Reading, N.S. e Aust, S.D.: Substrate specificity of lignin peroxidase and a S168W variant of manganese peroxidase; *Arch. Biochem. Biophys.*, 373: 147-153; 2000.

Tobie, W.C.: The pigment of *Bacillus violaceus* - the production, extraction, and purification of violacein; *J. Bacteriol.*, 29: 223-227; 1934.

Tuynman, A.; Vink, M.K.S.; Dekker, H.L.; Schoemaker, H.E. e Wever, R.: The sulphoxidation of thioanisole catalysed by lactoperoxidase and *Coprinus cinereus*

peroxidase: Evidence for an oxygen-rebound mechanism; *Eur. J. Biochem.*, 258: 906-913; 1998.

Wang, Y. e Yu, J.; Adsorption and degradation of synthetic dyes on the mycelium of *Trametes versicolor*; *Wat. Sci. Tech.*, 38: 233-238; 1998.

Wilkey, I.S. e McDonald, A.; A probable case of *Chromobacterium violaceum* infection in Australia; *Med. J. Aust.*, 2: 39-40; 1983.

Wooley, P.G.; *Bacillus violaceus manilae* (apathogenic organism); *Bull. Fohns. Hopkins Hosp.*, 16: 89-93; 1905.

Van de Velde, F.; Van Rantwijk, F. e Sheldon, R.A.; Selective oxidations with molecular oxygen, catalysed by chloroperoxidase in the presence of a reductant; *J. Molec. Cat. B- Enz.*, 6: 453-461; 1999.

Vinciguerra, V.; D'annibale, A.; Gács-Baitz, E. e Delle Monache, G.; Biotransformation of tyrosol by whole-cell and cell-free preparation of *Lentinus edodes*; *J. Molec. Cat. B- Enz.*, 3: 213-220; 1997.

Young, L. e Yu, J.; Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes; *Wat. Res.*, 31: 1187-1193; 1997.

Zahida, M.S.; Deva, W.; Peerzada, G.M. e Behere, D.V.; Oxidation of phenols by horseradish peroxidase and lactoperoxidase compound II-kinetic considerations; *Indian J. Biochem. Biophys.*, 35: 353-357; 1998.

Zhu, M.; Huang, X.M. e Shen, H.X.; Horseradish peroxidase- mediated oxidation of carcinogenic non-aminoazo dyes; *Chinese J. Chem.*, 17: 356-362; 1999.