

“UM BIORREATOR DE PRATELEIRAS PARA SUPERFÍCIES (BPS) PARA A PRODUÇÃO DE UM METABÓLITO BACTERIANO”.

A *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria anaeróbica facultativa, Gram-negativa, que possui formato de bastonete (Kaufman *et al. J. Clin. Microbiol.* **23**, 956-958, 1986). Ela é considerada não-patogênica, saprófita e é encontrada em amostras de água e solo de regiões tropicais e subtropicais do planeta (Ponte & Jenkins *Pediatric Infect. Disease J.* **11**, 583-586, 1992).

3-[1,2-Dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (doravante chamada de violaceína), possui atividade bactericida (Lichstein & Van de Sand *J. Infect. Diseases* **76**, 47-51, 1945; Durán *et al. An. Acad. Brasil. Ciênc.* **55**, 231-234, 1983), tripanocida (Caldas *et al. Em Proc. Inter. Symp. on Curr. Top. in Radiol. Photobiol.*, ed Tyrrell, R. M. pp. 121-126. Rio de Janeiro: Acad. Brasil. Ciênc. 1978; Durán *et al. World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 686-690, 1994), tumoricida (Durán *et al. Em XXV Reunião An. SBBq*, pp. 150. Caxambu, MG., 1996) além de possuir atividade anti-viral (May *et al. Deutsches Pat. Off. DE 3,935,066 (CL.C12P17/16)*, 25 APR 1991, Appl. 20 OCT 1989, 5pp..1991).

Nesta invenção é descrita em detalhes uma metodologia simples para a obtenção de violaceína de alto grau de pureza. A construção do biorreator utilizado no cultivo da *C. violaceum*, para a produção de violaceína, também é descrita.

Produção Microbiana. São inoculados 4 mL de uma suspensão de bactérias (*Chromobacterium violaceum* CCT 3496) num Erlenmeyer de 2000 mL, contendo 400 mL de meio de cultura. O Erlenmeyer, contendo o meio, é previamente esterilizado em autoclave a 1,94 atm e 121°C, por 15 min. O meio contém D-glicose anidra P.A. (Ecibra), peptona bacteriológica (Difco) e extrato de levedura BBL® (Becton Dickinson) nas proporções de 0,5%: 0,5%: 0,2%, respectivamente. Dois Erlenmeyers como estes são então incubados num agitador rotatório a 120 rpm por 12 horas, antes de serem utilizados para inocular as suas respectivas suspensões de bactérias no algodão. A oito garrafas de Roux de 1 litro (modificadas), cada uma contendo um “tapete” de algodão de aproximadamente 0,5 cm de espessura, 10 cm de largura e 20 cm de comprimento, são inoculados 90 mL/garrafa da suspensão de *C. violaceum*. As oito garrafas são então incubadas a 30°C por 24 horas (sem aeração) no

biorreator BPS que está em uma estufa. Após este tempo, os algodões adquirem uma intensa coloração violeta e inicia-se o procedimento de extração (se não há produção de violaceína em 24 horas, a aeração se faz necessária).

Extração e purificação. Primeiramente espremem-se os algodões para retirar o excesso de meio contendo bactérias, lava-se duas vezes com água e extrai-se a violaceína (dos 8 “tapetes” juntos) duas vezes com 500 mL de etanol comercial. Esta extração é praticamente quantitativa. Os 1000 mL de solução são mantidos em repouso até a sedimentação de um material branco. Filtra-se o sobrenadante, evapora-se o filtrado à pressão reduzida e obtêm-se ≈ 750 mg de um extrato bruto que é introduzido num cartucho apropriado para proceder à extração em Soxhlet. Esta extração é feita primeiro com clorofórmio (quantitativamente), depois com éter etílico (por 3 a 4 horas) e finalmente com etanol (quase quantitativamente). Evapora-se o etanol à pressão reduzida e obtêm-se o extrato semipurificado (≈ 40 mg). Este é purificado por cristalização, dissolvendo parcialmente o extrato em metanol e cristalizando-o com água, na proporção aproximada de 1:2,5, respectivamente. O material sedimentado é recolhido por centrifugação e seco em estufa a ≈ 100 °C por 24 horas. Obtêm-se ≈ 10 mg. Procede-se então a mais uma purificação, desta vez por cromatografia líquida (HPLC). Injeta-se 1,5 mL de solução saturada (em etanol) das 10 mg, previamente filtrado em filtro Millex-SR (0,5µm de diâmetro dos poros), num cromatógrafo HPLC (da Waters, modelo Prep. LC 4000 System). Recolhe-se a fração que possui tempo de eluição inicial de 26 minutos e final de 34 minutos. São feitas 4 injeções. As condições utilizadas para o HPLC são: vazão = 7,0 mL/min; $\lambda_{\text{detector}}$ = 230 nm; fase móvel = 25% H₂O : 75% metanol (% volume); coluna = preparativa DELTA PAK C18, 100 Å (poros), 15 µm (diâmetro das partículas); temperatura da coluna = temperatura ambiente (≈ 23 °C). A solução de violaceína é evaporada à pressão reduzida até a remanescência de cristais de violaceína em água. Os cristais são recolhidos por centrifugação e secos em estufa a 100 °C por 24 horas. Obtêm-se assim aproximadamente 1 mg de violaceína de alto grau de pureza.

Construção do Biorreator. Construiu-se um biorreator de alumínio do tipo BPS (de 4 prateleiras) para a etapa da produção microbiana. Na figura 1a têm-se uma perspectiva do corpo do biorreator. Este é feito de uma chapa de

alumínio de 2 mm de espessura, 36 cm de largura e 68 cm de comprimento. A chapa é dobrada de maneira a comportar as 4 prateleiras, de dimensões indicadas na figura 2. Ainda na figura 1a, podem-se notar os suportes das prateleiras que também são de alumínio. A figura 1b mostra em detalhes um destes suportes. Eles estão rebitados no corpo do biorreator. A figura 1c mostra em detalhes uma das duas laterais paralelas do corpo do biorreator. Estas possuem aberturas nas quais podem-se introduzir as mãos e conseqüentemente carregar o biorreator. Na figura 2, o diâmetro dos 5 orifícios das prateleiras é de 1,1 cm. Na figura 3a têm-se uma perspectiva do biorreator completo. A porta é composta de 3 partes ligadas entre si por dobradiças de latão. A parte central possui uma entrada à qual foi adaptada um vidro para servir de janela. Nesta figura pode-se observar também, ao fundo do biorreator, a extremidade superior do tubo de aeração. As figuras 3b e 3c tratam das dimensões do tubo (de aço-inox) para a aeração. Na figura 3b a extremidade superior do tubo é aberta para permitir a entrada de ar, e a inferior é fechada. Na figura 3c podem-se observar orifícios na lateral do tubo, por onde o ar sai. O diâmetro interno do tubo é de 0,7 cm e o externo de 0,9 cm. O biorreator foi projetado para comportar 2 garrafas de Roux (de 1 litro) por prateleira, e suas dimensões foram calculadas para poder ser autoclavado e incubado em estufa. As garrafas de Roux foram modificadas para facilitar a manipulação. Na superfície superior de cada garrafa, foi feito um orifício de ≈ 8 cm de diâmetro, a fim de poder introduzir e retirar material com facilidade. Também foi feita uma tampa de vidro para o orifício, fazendo uso de borracha de silicone para colar as peças da tampa.

A utilização do biorreator e das 8 garrafas de Roux modificadas resultou na simplificação das etapas de produção e extração da violaceína. Esta nova metodologia é mais rápida e simples que as anteriores (Antônio, R. V. *Tese de Doutorado* Universidade Estadual de Campinas, Campinas 1994; Melo, P. S. *Tese de Mestrado* Universidade Estadual de Campinas, Campinas 1996). Além do biorreator, descreve-se o uso do algodão como meio de suporte para a produção da violaceína. O algodão dispensa o uso da autoclave para a sua esterilização pois, como o volume de inóculo (no algodão) é grande, e o tempo de incubação das bactérias (também no algodão) é curto (24 horas), a probabilidade do crescimento de algum microorganismo estranho é mínima.

Outra vantagem na utilização do algodão surge na etapa da extração com etanol comercial, aonde consegue-se extrair quantitativamente a violaceína.

Na etapa de produção, após as 24 horas de incubação da *C. violaceum* no biorreator, o algodão adquire uma intensa coloração violeta além de se encontrar encharcado com meio de cultura. Ao espremer o algodão, o excesso de meio (de aspecto turvo mas não violeta) é retirado. A turbidez do meio, por um lado, e a intensa coloração violeta do algodão, por outro, indicam que parte das bactérias se imobilizam nas fibras do algodão e as demais permanecem em suspensão, e somente as bactérias imobilizadas são as que produzem violaceína.

Na etapa da extração utiliza-se etanol. A *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria Gram negativa, possuindo uma camada fina de peptidoglicano e uma parede celular rica em lipídeos. Estes dois fatores favorecem a extração da violaceína (que é intracelular). Na purificação em extrator tipo Soxhlet, o clorofórmio arrasta restos de membrana e parede celular, já que lipídeos são solúveis neste solvente (Melo, P. S. *Tese de Mestrado* Universidade Estadual de Campinas, Campinas 1996). O éter etílico arrasta desoxiviolaceína, alguns produtos não identificados e traços de violaceína (Durán *et al.* *An. Acad. Brasil. Ciênc.* **55**, 231-234, 1983). Após a cristalização, obtêm-se um extrato ainda impuro, por isso, recorre-se à cromatografia (HPLC-preparativa) a fim de purificar a violaceína. Após a purificação por HPLC, obtêm-se violaceína de alto grau de pureza.

REIVINDICAÇÕES

“UM BIORREATOR DE PRATELEIRAS PARA SUPERFÍCIES (BPS) PARA A PRODUÇÃO DE UM METABÓLITO BACTERIANO”, caracterizado por:

- 5 1 - Produção de violaceína em algodão como suporte e glicose como fonte de carbono.
- 2 - Alta pureza da violaceína obtida por método inédito.
- 3 - Utilização de um novo biorreator de prateleiras para superfícies construído para a incubação microbiana.

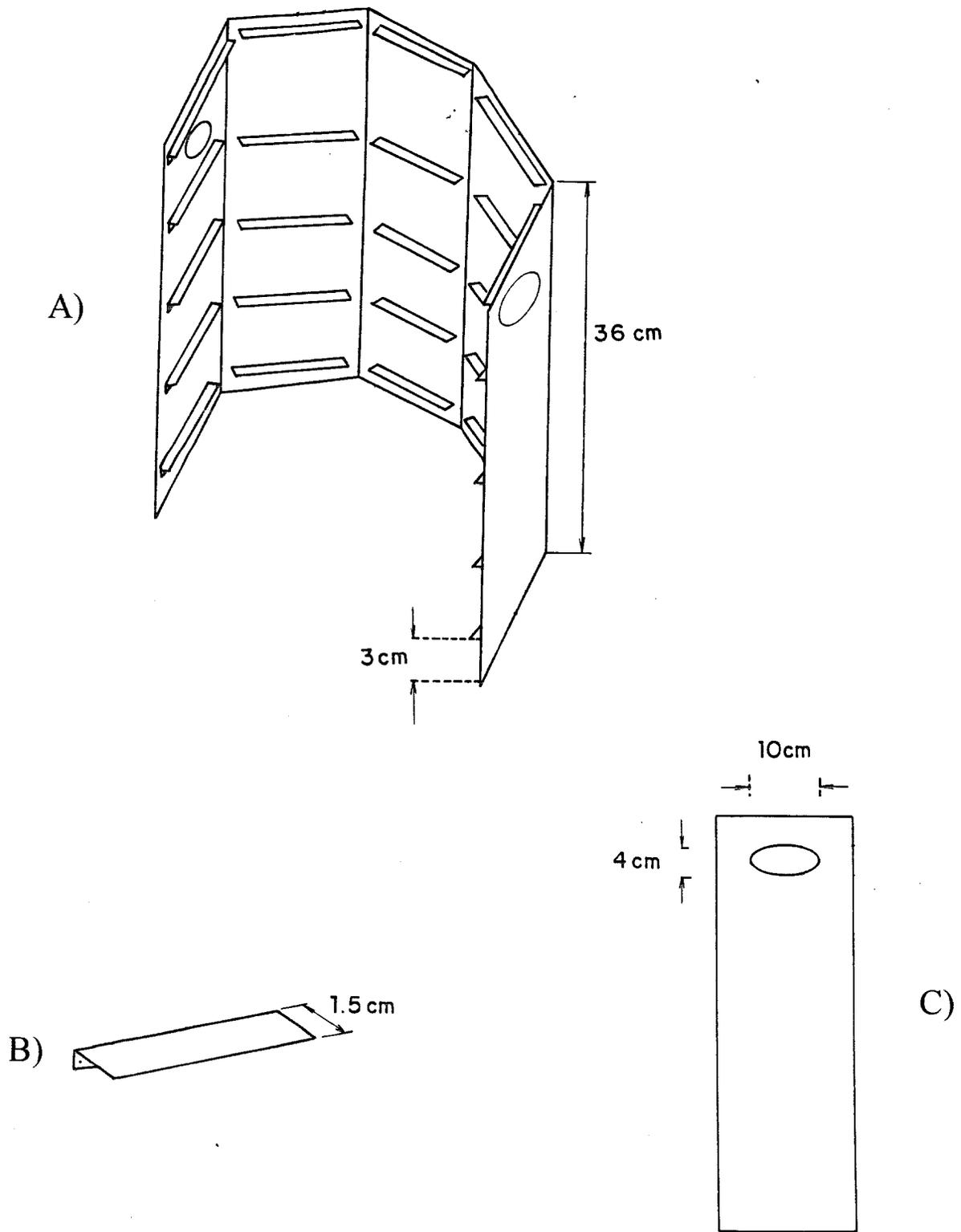


Figura 1

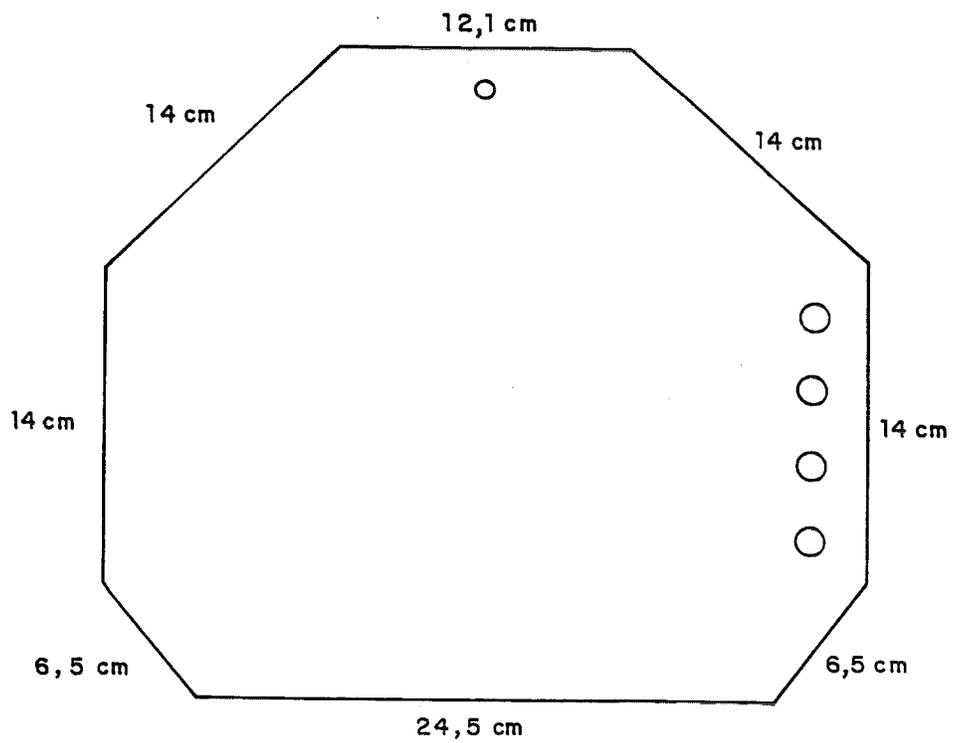
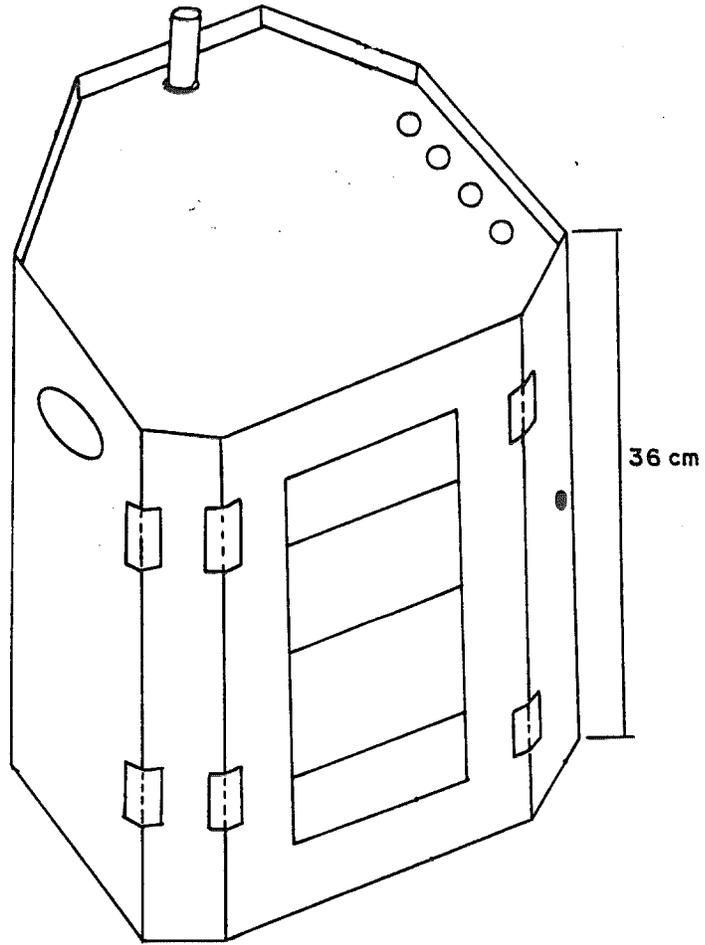
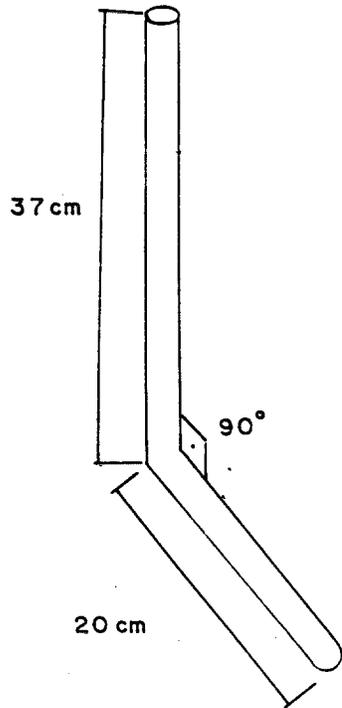


Figura 2

A)



B)



C)

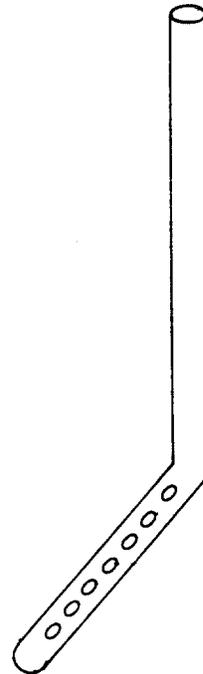


Figura 3

RESUMO

“UM BIORREATOR DE PRATELEIRAS PARA SUPERFÍCIES (BPS) PARA A PRODUÇÃO DE UM METABÓLITO BACTERIANO”.

5 Nesta invenção, desenvolveu-se um procedimento detalhado de produção, extração e purificação da violaceína, partindo do cultivo de *Chromobacterium violaceum* CCT 3496. Construiu-se também um biorreator de prateleiras para superfícies para a etapa de produção da violaceína.

10 Na etapa de produção, foram utilizadas garrafas de Roux de 1 litro e o biorreator tipo BPS. Na extração, empregou-se etanol comercial e na purificação, utilizaram-se as técnicas de filtração, extração em Soxhlet, cristalização e cromatografia líquida (HPLC).