



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

KAMILA BYANCA BALDIN WESSEL

FENAZINAS DE *Pseudomonas aeruginosa*:
PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE

KAMILA BYANCA BALDIN WESSEL

FENAZINAS DE *Pseudomonas aeruginosa*:
PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia, da Universidade
Estadual de Londrina, como requisito parcial ao
título de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Josiane A. Vignoli
Coorientador: Prof. Dr. Doumit Camilios Neto

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Wessel, Kamila Byanca Baldin.

Fenazinas de *Pseudomonas aeruginosa* : produção, purificação e avaliação do potencial antioxidante / Kamila Byanca Baldin Wessel. - Londrina, 2019.
90 f. : il.

Orientador: Josiane Alessandra Vignoli.

Coorientador: Doumit Camilios-Neto.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Ácido 5-metil fenazina-1-carboxílico - Tese. 2. Aeruginosina A - Tese. 3. Purificação - Tese. 4. Atividade antioxidante - Tese. I. Vignoli, Josiane Alessandra. II. Camilios-Neto, Doumit . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

KAMILA BYANCA BALDIN WESSEL

FENAZINAS DE *Pseudomonas aeruginosa*:
PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
ANTIOXIDANTE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial ao título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Josiane A. Vignoli
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Marcelo Rodrigues de Melo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Rúbia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 26 de Fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dr^a Josiane A. Vignoli, pela oportunidade, orientação e por todo incentivo e grande suporte.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Doumit Camilios-Neto, por todo apoio, ensinamentos e dedicação por este trabalho.

Ao Dr. Ismael Rodrigues Amador por todo o auxílio e conhecimento fornecido para a realização dos experimentos.

Ao Professor Dr. César Tischer, pelas análises de espectrometria de massas e de ressonância magnética nuclear.

À Professora Dr^a Suzana Nixdorf e seus alunos, do Laboratório de Desenvolvimento de Instrumentação e Automação Analítica, pelas análises de cromatografia líquida de alta eficiência.

À Professora Dr^a Rúbia Casagrande, por ceder seu laboratório para a realização dos testes de atividade antioxidante.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Marcelo Rodrigues de Melo e Dr^a Rúbia Casagrande pela disponibilidade em participar deste momento e contribuírem para a melhora do presente trabalho.

À todos os professores do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, pela dedicação em ensinar seus alunos e pelo grande conhecimento fornecido.

Aos meus queridos colegas de laboratório, Gabriela Dornelas, Ana Paula Melo, Maria Teresa, Murilo Ferrari, Karen Stefany e Gabriela Oliveira.

Ao técnico do laboratório, Nelson Janeiro, por todo auxílio prestado durante a rotina laboratorial.

Ao meu pai Bruno e à minha irmã Bruna, por todo apoio e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu amor, Mateus, pela paciência, carinho, incentivo e auxílio em todos os momentos.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse até aqui.

WESSEL, Kamila B. B. **Fenazinas de *Pseudomonas aeruginosa***: produção, purificação e avaliação do potencial antioxidante. 2019. 90 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Fenazinas são metabólitos secundários redox-ativos e pigmentados produzidos por *Pseudomonas aeruginosa*. Estas moléculas exercem importantes atividades biológicas para a bactéria, contribuindo para a competitividade e virulência em hospedeiros humanos e animais. Entretanto, quando purificadas estas biomoléculas podem apresentar propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais com potencial de aplicação nas indústrias farmacêutica e cosmética. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi desenvolver um processo de produção, extração e purificação de fenazinas produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 e avaliar a atividade antioxidante destes compostos. A suplementação do meio de cultivo com caseinato de sódio 1% incrementou a produção de diferentes fenazinas, em especial das piorubrininas, devido a uma maior ativação do sistema de *quorum sensing* da bactéria, sendo constatado que a produção deveria ocorrer por um período de 13 dias. O melhor método de extração consistiu na utilização de clorofórmio na proporção de 1:1 (v/v) por duas vezes consecutivas, para obtenção de um extrato bruto mais concentrado. A purificação do extrato bruto orgânico por cromatografia *flash* mostrou ser o método mais eficaz para a obtenção do composto amarelo 5-metil fenazina-1-carboxilato com maior pureza, entretanto a técnica de cromatografia em camada delgada preparativa também pareceu ser bastante promissora para a separação de diversos pigmentos relativamente puros. Já a purificação do extrato aquoso, visando obter a fenazina vermelha aeruginosina A, pelo processo envolvendo o uso de carvão ativado como adsorvente seguido de extração em fase sólida utilizando sílica de partícula menor como fase estacionária, ainda não foram suficientes para atingir a pureza desejada. O extrato bruto orgânico e o pigmento 5-metil fenazina-1-carboxilato purificado foram submetidos à análise de atividade antioxidante pelos métodos ABTS e FRAP. De acordo com o ensaio de ABTS, constatou-se que o extrato bruto apresentou maior capacidade antioxidante, sendo encontrado que a concentração necessária para alcançar 50% da atividade antioxidante (IC_{50}) foi de $5,083 \pm 0,060 \mu\text{g mL}^{-1}$. Porém, pelo método de redução dos íons de ferro (FRAP), foi encontrado que o pigmento apresentou uma atividade antioxidante maior em relação ao extrato com um valor de $0,78 \mu\text{mol L}^{-1}$ Trolox/ $\mu\text{g mL}^{-1}$ de extrato bruto. Assim, os resultados mostraram que foi possível purificar pigmentos fenazínicos de *Pseudomonas aeruginosa* possibilitando testar sua atividade antioxidante *in vitro*. Dessa forma, essas moléculas podem ser de grande interesse para formulações de produtos nas indústrias de cosméticos e farmacêutica

Palavras-chave: Fenazinas. Ácido 5-metil fenazina-1-carboxílico. Aeruginosina A. Purificação. Atividade antioxidante. *Pseudomonas aeruginosa*.

WESSEL, Kamila B. B. **Phenazines of *Pseudomonas aeruginosa***: production, purification and evaluation of antioxidant potential. 2019. 90 p. Dissertation (Master's Degree Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Phenazines are redox-active and pigmented secondary metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa*. These molecules present important biological activities for the bacteria, contributing to the competitiveness and virulence in human and animal hosts. However, when purified these biomolecules may exhibit antioxidant, anti-inflammatory and antitumor properties with potential for application in the pharmaceutical and cosmetic industries. In this context, the objective of this study was to develop a process of production, extraction and purification of phenazines produced by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and to evaluate the antioxidant activity of these compounds. Supplementation of the culture medium with sodium caseinate 1% increased the production of different phenazines, especially of the pyrorubines, due to a greater activation of the quorum sensing system of the bacteria, and it was verified that the production should occur for a period of 13 days. The best method of extraction consisted of the use of chloroform (1:1 v/v) twice consecutively to obtain a more concentrated crude extract. Purification of the crude organic extract by flash chromatography showed to be the most efficient method for obtaining the yellow compound, 5-methylphenazine-1-carboxylate, with higher purity, however the preparative thin-layer chromatography technique also appeared to be quite promising for the separation of several relatively pure pigments. On the other hand, the purification of the aqueous extract, to obtain the red phenazine aeruginosin A, by the process involving the use of activated charcoal as adsorbent followed by extraction in solid phase using smaller particle silica as stationary phase, was still not enough to reach the desired purity. The crude organic extract and the purified 5-methylphenazine-1-carboxylate pigment were subjected to the analysis of antioxidant activity by the ABTS and FRAP methods. According to the ABTS assay, it was found that the crude extract had a higher antioxidant capacity, being found that the concentration necessary to reach 50% of the antioxidant activity (IC_{50}) was $5,083 \pm 0,060 \mu\text{g mL}^{-1}$. However, by the iron ion reduction method (FRAP), it was found that the pigment presented a higher antioxidant activity than the extract with a value of $0.78 \mu\text{mol L}^{-1}$ Trolox / $\mu\text{g mL}^{-1}$ of crude extract. Thus, the results showed that it was possible to purify phenazinic pigments of *Pseudomonas aeruginosa* to test its antioxidant activity in vitro. Thus, such molecules may be of great interest for formulations of beneficial products in the cosmetic and pharmaceutical industries.

Keywords: Phenazines. 5-Methylphenazine-1-carboxylic acid. Aeruginosin A. Purification. Antioxidant activity. *Pseudomonas aeruginosa*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura do núcleo das fenazinas.	17
Figura 2 - Esquema de atuação da PYO no estresse oxidativo da célula do hospedeiro. Formando espécies reativas de oxigênio por oxidação de NAD(P)H com diminuição dos níveis de glutathiona (GSH).	20
Figura 3 – Esquema do modelo metabólico de sobrevivência de <i>P. aeruginosa</i> em condições anaeróbicas.	21
Figura 4 - Operon da biossíntese de fenazinas. Genes requeridos para biossíntese do núcleo (→), modificação (→) e regulação (→).	23
Figura 5 - Via do ácido chiquímico.	25
Figura 6 - Via de biossíntese do núcleo fenazínico a partir do ácido corísmico.	26
Figura 7 - Biossíntese das principais fenazinas produzidas por <i>P. aeruginosa</i>	27
Figura 8 - Acil-homoserinolactonas: (a) N-(3-oxododecanoil)-HSL e (b) N-butiril-HSL. Quinolona: (c) 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona.	29
Figura 9 - Representação do mecanismo de <i>quorum sensing</i> em <i>P. aeruginosa</i> apresentando os sistemas LasI-LasR, RhII-RhIR e o sistema PQS e suas interações.	30
Figura 10 - Avaliação dos métodos de extração.	37
Figura 11 - Cartucho de sílica utilizado para purificação.	39
Figura 12 - Fluxograma do processo de extração em fase sólida.	40
Figura 13 – Fluxograma do processo de extração em fase sólida das fenazinas presentes na fase aquosa.	43
Figura 14 - Esquema geral da metodologia empregada.	46
Figura 15 – Diferentes tempos de cultivo para produção de fenazinas.	47
Figura 16 - Análise por CCD do extrato bruto e dos extratos orgânicos dos diferentes processos de extração em diferentes dias de cultivo.	49
Figura 17 - Fases aquosas provenientes do primeiro processo de extração em diferentes dias de cultivo.	50
Figura 18 - Cinética de produção de pigmentos fenazínicos da fração orgânica por cultivos submersos de <i>P. aeruginosa</i>	51

Figura 19 - CCD analítica do extrato bruto orgânico do cultivo submerso de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 transformada com plasmídeos de fusão LacZ, em meio de sais adicionado de glicerol 3%.....	53
Figura 20 - Cromatograma obtido por CLAE do extrato bruto orgânico do cultivo submerso de PAO1 transformada com plasmídeos de fusão LacZ, em meio de sais adicionado de glicerol 3%.....	54
Figura 21 - Fluxograma do processo de purificação do extrato bruto orgânico do cultivo submerso de PAO1 transformada com plasmídeos de fusão LacZ, em meio de sais adicionado de glicerol 3% por extração em fase sólida.	55
Figura 22 - CCD analítica para cada etapa de purificação do extrato bruto orgânico do cultivo submerso da PAO1 transformada com plasmídeos de fusão LacZ por extração em fase sólida.	56
Figura 23 - Fluxograma do processo de purificação do extrato bruto orgânico do cultivo submerso da cepa transformada com plasmídeos de fusão LacZ por cromatografia flash.	57
Figura 24 - CCD analítica para o pigmento amarelo purificado por extração em fase sólida (A-9) e por cromatografia <i>flash</i> (F) em comparação com o extrato bruto (EB).....	58
Figura 25 - Cromatograma para comparação das amostras purificadas do pigmento amarelo obtido do cultivo submerso da cepa transformada com plasmídeos de fusão LacZ por extração em fase sólida (em amarelo) e por cromatografia <i>flash</i> (em verde).	59
Figura 26 - Espectro de ressonância nuclear magnética bidimensional ¹ H, ¹³ C.....	61
Figura 27 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CLAE do extrato bruto do cultivo submerso da cepa transformada com plasmídeos de fusão LacZ (em verde) e do extrato bruto do cultivo em meio de sais suplementado com caseinato de sódio 1% (em azul).	63
Figura 28 - Fluxograma do processo de purificação por extração em fase sólida do extrato produzido em meio de sais suplementado com caseinato de sódio 1%.	65

Figura 29 - Cromatograma obtido por CLAE para a amostra purificada do pigmento amarelo (B-10) produzido por PAO1 em meio de sais suplementado com caseinato de sódio 1%.	66
Figura 30 - Cromatograma para a amostra purificada do pigmento amarelo obtido por CLAE em comprimento de onda de 202 nm.....	67
Figura 31 - Espectro de UV e massas das fenazinas PCA, PYO, PCN e 1-OH-PHZ, produzidas por <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	68
Figura 32 - Fluxograma do processo de purificação do extrato obtido do cultivo suplementado com caseinato de sódio 1% por extração em fase sólida e CCD preparativa.....	69
Figura 33 - Resultado da CCD preparativa da fração C-1.....	70
Figura 34 - Recuperação e CCD analítica das frações obtidas por CCD preparativa.	71
Figura 35 - CCD preparativa da quinta sub-fração.	73
Figura 36 - CCD analítica de cada fração obtida após CCDP.	74
Figura 37 - CCD analítica de 5-Me-PCA purificados, produzidos pelos cultivos com e sem suplementação de caseinato de sódio 1%, por todos os processos de purificação empregados.	75
Figura 38 - Espectro de massa Aeruginosina A.	77
Figura 39 - Cromatograma obtido por CLAE do pigmento vermelho purificado com celite e carvão ativado.	78
Figura 40 - Fluxograma do processo de purificação do extrato aquoso obtido do cultivo suplementado com caseinato de sódio 1% por purificação com uso de carvão ativado e extração em fase sólida.....	79
Figura 41 - CCD analítica das frações obtidas da purificação de AA.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio LB (pH 7,0).....	33
Tabela 2 - Composição do meio de sais	35
Tabela 3 - Valores dos fatores de retenção (Rf) encontrado para três possíveis fenazinas	53
Tabela 4 - Dados espectrais de RMN de ¹ H e ¹³ C de fenazina substituída.....	60
Tabela 5 - Rendimento obtido para cada amostra de pigmento amarelo purificado pelos diferentes métodos de purificação.....	76
Tabela 6 - Avaliação da atividade antioxidante de 5-Me-PCA em comparação extrato bruto de fenazinas pelos métodos ABTS e FRAP	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aeruginosina A
Acil-HSL	Acil-homoserinolactonas
ADIC	2-amino-2-desoxi-isocorismato
AOCHC	Ácido 6-amino-5-oxociclohex-2-eno-1-carboxílico
ATP	Adenosina trifosfato
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
D.O.	Densidade óptica
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FRAP	Poder antioxidante de redução do ferro
GSH	Glutathiona reduzida
HAc	Ácido acético
HHQ	2-heptil-4-quinolona
LB	Meio Luria-Bertani
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina
NAPH	Dinucleotídeo de nicotinamida-adenina-fosfato
PCA	Ácido fenazina-1-carboxílico
PCN	Fenazina-1-carboxiamida
PQS	<i>Pseudomonas quinolone signal</i>
PYO	Piocianina
QS	<i>Quorum sensing</i>
QTOF	Espectrômetro de massas quadrupolo-tempo de voo
RMN	Ressonância magnética nuclear
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico
DHHA	Ácido trans-2,3-di-hidro-3-hidroxi-antranílico
LA	Meio LB adicionado de 1,5% de ágar
HHPDC	Ácido hexa-hidrofenazina-1,6-dicarboxílico
PDC	Ácido fenazina-1,6-dicarboxílico
THPCA	Ácido tetrahidrofenazina-1,6-carboxílico
DHPCA	5,10-di-hidro-PCA
DHPDC	5,10-di-hidro-PDC

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	16
3.2	FENAZINAS	17
3.2.1	Principais Fenazinas.....	18
3.2.2	Funções Biológicas e Modos de Ação.....	19
3.3	BIOSSÍNTESE DAS FENAZINAS	22
3.3.1	Via do Ácido Chiquímico.....	23
3.3.2	Montagem do Núcleo Fenazínico	24
3.3.3	Biossíntese das Principais Fenazinas de <i>P. aeruginosa</i> por Modificação do Núcleo Fenazínico	27
3.4	REGULAÇÃO DA BIOSÍNTESE DAS FENAZINAS (<i>QUORUM SENSING</i>)	28
3.5	FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE FENAZINAS DE <i>P.</i> <i>AERUGINOSA</i>	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	MICROORGANISMO	33
4.1.1	Meios de Preservação	33
4.2	PRODUÇÃO DE FENAZINAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA.....	33
4.2.1	Estudos Preliminares para Produção de Fenazinas por Cultivos Submersos de PAO1 Transformada, Utilizando Meio de Sais Adicionado de Glicerol 3%.....	34
4.2.2	Produção de Fenazinas em Meio Contendo Caseinato de Sódio	35
4.3	EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DAS FENAZINAS.....	36
4.4	PURIFICAÇÃO DAS FENAZINAS	38
4.4.1	Fenazinas Presentes na Fase Orgânica.....	38
4.4.1.1	Extração em fase sólida	38

4.4.1.2	Cromatografia <i>flash</i>	41
4.4.1.3	Cromatografia em camada delgada preparativa.....	41
4.4.2	Fenazinas Presentes na Fase Aquosa	42
4.4.2.1	Purificação de aeruginosina A (AA).....	42
4.4.2.2	Extração em fase sólida	42
4.5	CARACTERIZAÇÃO DOS PIGMENTOS PURIFICADOS	43
4.5.1	Cromatografia em Camada Delgada	43
4.5.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	43
4.5.3	Ressonância Magnética Nuclear	44
4.5.4	Espectrometria de Massa de Aeruginosina A (AA).....	44
4.6	ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	45
4.6.1	Atividade Sequestrante de Cátions Radicais ABTS*	45
4.6.2	Poder Redutor do Ferro.....	45
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1	PRODUÇÃO DE FENAZINAS POR <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> PAO1 POR CULTIVOS SUBMERSOS: AVALIAÇÃO DO TEMPO DE PRODUÇÃO E DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO	47
5.2	PURIFICAÇÃO DE FENAZINAS PRODUZIDAS POR CEPA TRANSFORMADA COM PLASMÍDEOS DE FUSÃO LACZ.....	52
5.2.1	Extração em Fase Sólida.....	54
5.2.2	Cromatografia <i>Flash</i>	57
5.2.3	Identificação do Pigmento Fenazínico	59
5.3	PURIFICAÇÃO DAS FENAZINAS PRODUZIDAS EM MEIO DE SAIS SUPLEMENTADO COM CASEINATO DE SÓDIO 1%.....	62
5.3.1	Purificação das Fenazinas Provenientes da Fase Orgânica	62
5.3.2	Purificação das Fenazinas Provenientes da Fase Aquosa	77
5.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	80
6	CONCLUSÕES	82
7	EXPERIMENTOS FUTUROS	83
	REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista muito conhecido, que pode afetar negativamente pacientes infectados devido à habilidade de produzir muitos fatores de virulência (LAU *et al.*, 2004; ORLANDI *et al.*, 2015). Dentre estes fatores de virulência, esta bactéria gram-negativa sintetiza uma classe de pigmentos redox-ativos coletivamente denominados de fenazinas (MAVRODI; BLANKENFELDT; THOMASHOW, 2006; PRICE-WHELAN; DIETRICH; NEWMAN, 2006).

Fenazinas são compostos nitrogenados aromáticos heterocíclicos com derivados carboxi e hidroxí substituídos que apresentam atividade antimicrobiana (DWIVEDI; JOHRI, 2003). Assim sendo, *P. aeruginosa* excreta várias tonalidades destas substâncias fenazínicas que conferem uma aparência característica na cultura (TURNER; MESSENGER, 1986), incluindo piocianina (azul-esverdeada), 5-metilfenazina-1-carboxilato (amarelo) e piorubrina (vermelho).

A regulação da expressão dos genes de produção de fenazinas, bem como de outros fenótipos de virulência, é realizada por um mecanismo de comunicação entre bactérias, vinculado à densidade populacional. Este sistema de linguagem, conhecido como *quorum sensing*, permite a coordenação do comportamento bacteriano por meio da produção e difusão de pequenas moléculas sinalizadoras difusíveis (ABU *et al.*, 2013; SCHAUDER; BASSLER, 2001). Neste sentido, o uso de indutores do mecanismo de *quorum sensing*, como a proteína caseinato de sódio, pode ser realizado a fim de aumentar a produção de fenazinas.

Apesar do grande número de estudos dos diferentes pigmentos fenazínicos produzidos por *P. aeruginosa*, especialmente os relacionados à piocianina, pouco se sabe sobre as funções biológicas dos pigmentos vermelho e amarelo. No entanto, relatos na literatura científica sugerem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e não-citotóxicas destes compostos, indicando um grande potencial de aplicação nas indústrias farmacêutica e cosmética (ABU *et al.*, 2013; KENNEDY *et al.*, 2015). Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo desenvolver um processo de produção, extração e purificação de fenazinas produzidas por *P. aeruginosa* PAO1 e avaliar a atividade antioxidante destas moléculas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um processo de produção, extração e purificação de fenazinas produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 e avaliar a atividade antioxidante destes compostos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar as metodologias de produção, extração, purificação e quantificação de fenazinas obtidas por cultivos submersos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1;
- Determinar a cinética de produção de fenazinas por cultivos submersos de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1;
- Avaliar o efeito indutor da proteína caseinato de sódio na produção de fenazinas;
- Avaliar o potencial antioxidante de fenazinas obtidas por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; pelos métodos ABTS e FRAP.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa metabolicamente versátil capaz de sobreviver em ambientes variados, incluindo solo e água, bem como colonizar tecidos de plantas e animais (STOVER *et al.*, 2000; HUNTER; NEWMAN, 2010).

Este patógeno oportunista é a principal causa de infecções graves em pacientes imunocomprometidos, com queimaduras severas, infecções do trato urinário, AIDS, portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica, fibrose cística e bronquiectasia (ABU *et al.*, 2013; BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2013; HUNTER; NEWMAN, 2010).

P. aeruginosa tem se tornado um problema clínico emergente devido à sua habilidade de desenvolver múltipla resistência à antibióticos, tornando as infecções mais complexas e difíceis de serem tratadas, resultando em altos índices de morbidade e mortalidade (LAU *et al.*, 2004; RADA; LETO, 2013; ZAVASCKI *et al.*, 2010).

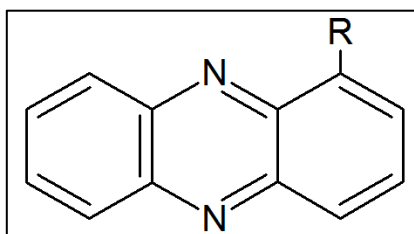
Além da versatilidade metabólica e resistência intrínseca e adquirida à antibióticos, a síntese de múltiplos fatores de virulência tornam a *P. aeruginosa* um patógeno impressionante (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2013).

A maior contribuição para a patogenicidade deste microrganismo deve-se a sua habilidade de produzir vários fatores de virulência, tais como a formação de biofilme, flagelos dentre outros fatores que são secretados, como elastases, exotoxinas, ramnolipídeos, sideróforos, polissacarídeos extracelulares (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2013; FLEMMING; WINGENDER, 2010; LYCZAK; CANNON; PIER, 2000). Dentre estes, existe ainda uma classe de pigmentos redox-ativos coletivamente denominados como fenazinas, na qual a mais conhecida é a piocianina (MAVRODI; BLANKENFELDT; THOMASHOW, 2006; PRICE-WHELAN; DIETRICH; NEWMAN, 2006).

3.2 FENAZINAS

Fenazinas são metabólitos secundários, redox-ativos pigmentados, nitrogenados, aromáticos e heterocíclicos com derivados carboxi-, hidroxí- e metil-substituídos (Figura 1), os quais são sintetizados por muitas bactérias gram-negativas, como *Pseudomonas*, bem como gram-positivas, como *Streptomyces* (GUTTENBERGER; BLANKENFELDT; BREINBAUER, 2017; JIMENEZ *et al.*, 2012; LAURSEN; NIELSEN, 2004).

Figura 1- Estrutura do núcleo das fenazinas.



Fonte: O próprio autor.

Dentre os diversos gêneros de bactérias produtoras de fenazinas, *Pseudomonas* é conhecido por excretar várias tonalidades destas substâncias redox-ativas (azul, verde, amarelo, vermelho até marrom), que lhes conferem uma aparência característica na cultura (TURNER; MESSENGER, 1986; KADAM *et al.*, 2013).

De fato, a descoberta das fenazinas, em meados do século XIX, ocorreu devido à intensidade de suas cores. Nesta mesma época muitos médicos relataram a presença de um “pus azul” nas feridas de pacientes que foram submetidos à procedimentos cirúrgicos mais rigorosos, e que estava relacionado com uma maior dificuldade no tratamento da ferida. Em 1859, Fordos descreveu um processo de extração com clorofórmio do pigmento azul responsável pela coloração do “pus azul”, e denominou este pigmento como “piocianina”, proveniente das palavras gregas para “pus” e “azul” (BLANKENFELDT; PARSONS, 2014; GUTTENBERGER; BLANKENFELDT; BREINBAUER, 2017).

Até o momento mais de 180 produtos naturais de fenazinas já foram reportados, sendo evidenciado que um grande número destes compostos apresenta

importantes atividades biológicas, incluindo efeitos antibióticos, antifúngicos, antitumorais e antiparasitários. Também já foi constatado que estes compostos de fenazóis são de extrema significância para os seus organismos produtores, os quais possuem uma vida útil mais longa no ambiente natural do que os seus homólogos que não produzem estas moléculas (GUTTENBERGER; BLANKENFELDT; BREINBAUER, 2017; LAURSEN; NIELSEN, 2004).

3.2.1 Principais Fenazinas

Os compostos fenazínicos de maior destaque produzidos pela *P. aeruginosa* incluem piocianina (PYO), ácido fenazina-1-carboxílico (PCA), 1-hidroxifenazina (1-OH-PHZ), fenazina-1-carboxiamida (PCN) e as piorubrininas (ABU *et al.*, 2013; MAVRODI *et al.*, 2001; SARANYA; JAYAPRIYA; TAMILSELVI, 2012).

A mais notável destas substâncias fenazínicas, a piocianina (PYO), é azul, solúvel em clorofórmio e não-fluorescente, contribuindo tanto para a virulência quanto para a persistência das infecções causadas pela bactéria. Além disso, a PYO apresenta atividade antibiótica contra bactérias, fungos e protozoários (ABU *et al.*, 2013; JAYASEELAN; RAMASWAMY; DHARMARAJ, 2014; LAU *et al.*, 2004; ORLANDI *et al.*, 2015; RADA; LETO, 2013; SUDHAKAR; KARPAGAM; PREMKUMAR, 2015).

Seu precursor, o ácido fenazina-1-carboxílico (PCA) contribui com a patogênese da bactéria por alterar a resposta imune e inflamatória do hospedeiro. Este composto também inibe o crescimento de vários microrganismos, incluindo fungos e bactérias (DENNING *et al.*, 2003; MAVRODI *et al.*, 2001; RAIIO *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2015).

PCA é o precursor direto da fenazina-1-carboxamida (PCN), um pigmento verde-amarelado solúvel em água, importante para a bactéria por atuar como um mediador no processo de transferência de elétrons extracelular (HUANG *et al.*, 2018; MAVRODI *et al.*, 2001).

Os pigmentos avermelhados de *P. aeruginosa* são coletivamente denominados como piorubrina, para os quais não existe uma composição química conhecida. Neste grupo estão incluídas as aeruginosinas A (AA) e B (5-metil-7-

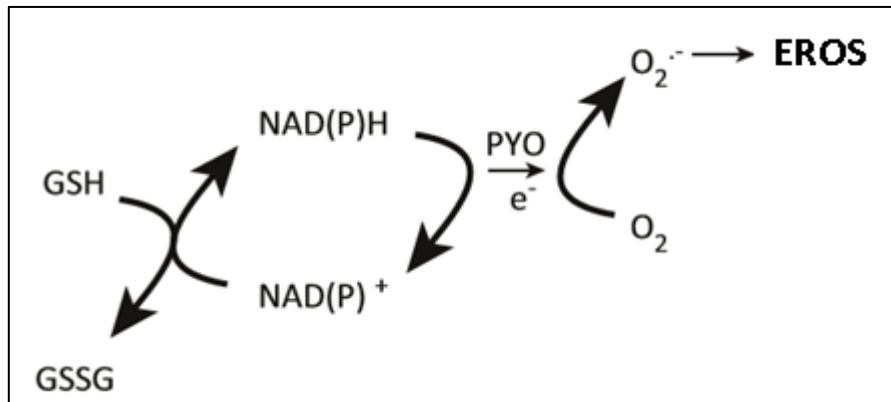
amino-1-carboximetilfenazina e 5-metil-7-amino-1-carboxi-3-sulfo-metilfenazina, respectivamente), ambas produzidas por *P. aeruginosa* após um longo período de incubação aeróbica (ABU *et al.*, 2013). Estes compostos são altamente solúveis em água (HOLLIMAN, 1969), sendo produzidos bioquimicamente a partir do ácido 5-metilfenazina-1-carboxílico (5-Me-PCA), e ácido *m*-amino-benzoico (HANSFORD; HOLLIMAN; HERBERT, 1972). Tal intermediário é o precursor biossintético das aeruginosinas e também da piocianina em vários isolados de *P. aeruginosa* (BYNG; EUSTICE; JENSEN, 1979; HANSFORD; HOLLIMAN; HERBERT, 1972).

3.2.2 Funções Biológicas e Modos de Ação

As fenazinas oferecem diversas vantagens por contribuir com a sobrevivência e persistência de *P. aeruginosa* por meio de diferentes mecanismos. Assim, a produção destes metabólitos fenazínicos auxiliam na competitividade e na virulência de seus produtores (MAHAJAN-MIKLOS *et al.*, 1999; MAZZOLA *et al.*, 1992).

A capacidade de doar e aceitar elétrons é um dos principais modos de ação das fenazinas. Como a PYO pode atravessar facilmente a membrana do hospedeiro, atuando como um transportador de elétrons, acaba possibilitando a oxidação de nucleotídeos reduzidos (NADH e NADPH) à ânions superóxidos ($O_2^{\cdot-}$) formando assim espécies reativas de oxigênio (EROS) responsáveis por expor a célula do hospedeiro ao estresse oxidativo. Neste sentido, a PYO exerce efeitos tóxicos nas células hospedeiras devido à produção de EROS. Devido a isso, ocorre diminuição de NADH acompanhado de depleção do nível de glutathiona (GSH), um antioxidante crucial para a desativação dos radicais de oxigênio muito reativos (Figura 2) (GUTTENBERGER; BLANKENFELDT; BREINBAUER, 2017; RADA; LETO, 2013).

Figura 2 - Esquema de atuação da PYO no estresse oxidativo da célula do hospedeiro. Formando espécies reativas de oxigênio por oxidação de NAD(P)H com diminuição dos níveis de glutathiona (GSH).

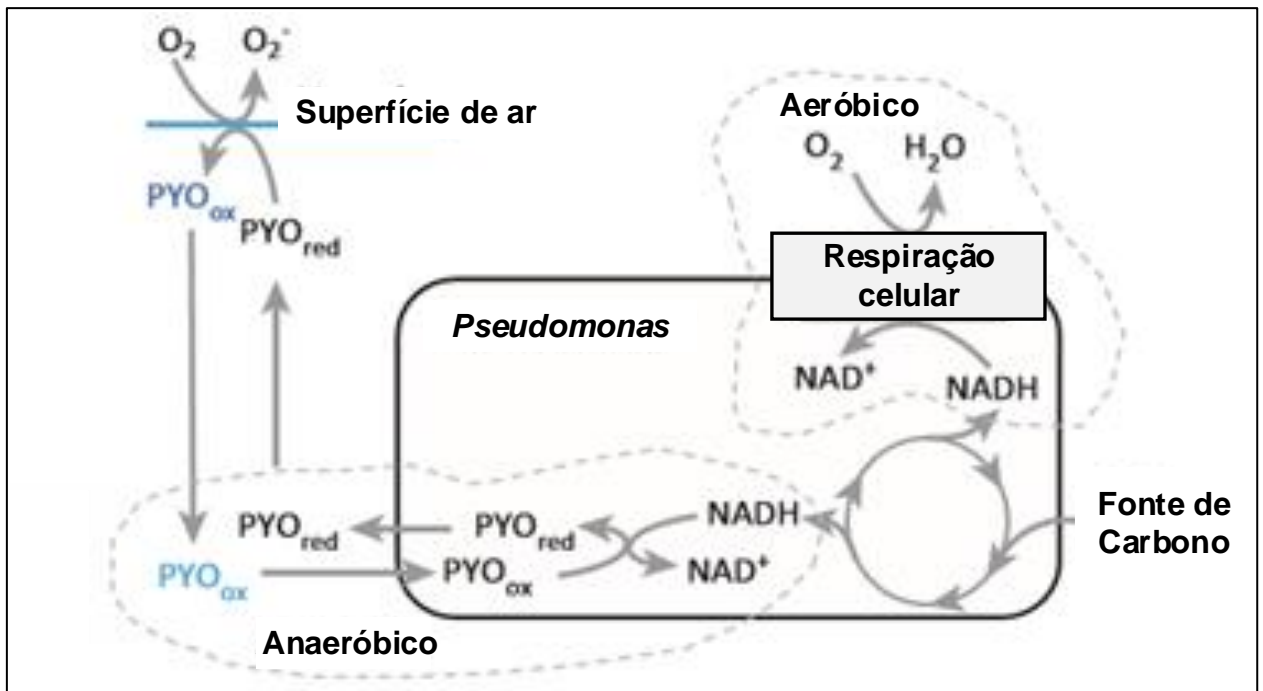


Fonte: Adaptado de Rada; Leto, 2013.

Ainda associado à capacidade de transporte de elétrons, a piocianina também permite a transferência de equivalentes redutores do interior da célula para o ambiente extracelular, promovendo a sobrevivência de *P. aeruginosa* em condições anaeróbicas. Desse modo, a PYO na sua forma reduzida doa um elétron ao O₂, dando origem ao ânion superóxido (Figura 3) (DIETRICH *et al.*, 2006; RADA; LETO, 2013; WANG; KERN; NEWMAN, 2010).

Glasser *et al.* (2014) descobriram que as fenazinas melhoram a sobrevivência de *P. aeruginosa* em ambientes anaeróbicos por facilitar a geração de ATP e de uma força próton-motora, através da oxidação de glicose em acetato. Entretanto, como demonstrado por Wang, Kern e Newman (2010) esta glicólise anaeróbia promove a sobrevivência, mas não o crescimento da bactéria (Figura 3).

Figura 3 – Esquema do modelo metabólico de sobrevivência de *P. aeruginosa* em condições anaeróbicas.



Fonte: Adaptado de Rada; Leto, 2013.

Dietrich *et al.* (2013) sugeriram que o desequilíbrio redox é um fator importante que influencia a morfogênese dos biofilmes de *P. aeruginosa*. Esses autores comprovaram que as colônias que produzem fenazinas são suaves à medida que elas se desenvolvem, enquanto que os mutantes, incapazes de produzir estas substâncias, começam a enrugarem-se conforme o desenvolvimento das colônias.

Sendo assim, ao longo dos dias de incubação e consequente aumento das colônias fica mais difícil para o oxigênio chegar a todas as células, tornando a porção inferior da colônia anóxica. Sem acesso ao oxigênio, as células desta região podem manter a homeostase redox através da redução de fenazinas ou redução de nitrato. Os experimentos conduzidos com mutantes que não produzem fenazinas e que foram cultivados em um meio que não contém nitrato atingiram a homeostase redox por meio de uma adaptação em toda a comunidade, a qual consistiu no enrugamento das colônias, a fim de aumentar a área de superfície da colônia e a disponibilidade de oxigênio.

Como as fenazinas são consideradas transportadores de elétrons, essas moléculas também se encontram envolvidas na aquisição de ferro (HERNANDEZ; KAPPLER; NEWMAN, 2004; WANG; KERN; NEWMAN, 2010). A fenazina-1-carboxiamida (PCN) atua como um quelante de ferro, sendo capaz de promover a redução mineral do íon férrico (Fe^{+3}) presente no ambiente à forma mais solúvel Fe^{+2} , que pode ser capturada por absorção (HERNANDEZ; KAPPLER; NEWMAN, 2004).

As fenazinas podem ainda atuar como moléculas sinalizadoras (DIETRICH *et al.*, 2006). Um exemplo é a fenazina PYO, que ativa o fator de transcrição SoxR, responsável por aumentar a expressão de *mexGHI-opmD*, uma bomba de efluxo que transporta a 5-metil fenazina-1-carboxilato (5-Me-PCA) (DIETRICH *et al.*, 2006; KENNEDY *et al.*, 2015).

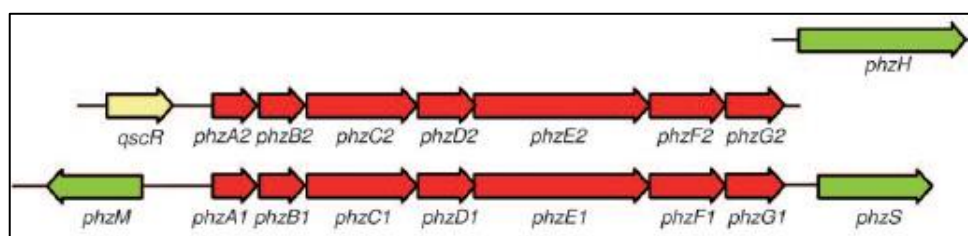
3.3 BIOSÍNTESE DAS FENAZINAS

Em 1986, Turner e Messenger discutiram sobre os possíveis precursores biossintéticos das fenazinas. Entretanto, o estudo acerca da via de biossíntese dos compostos fenazínicos foi dificultado devido à formação de intermediários instáveis. Somente em 1990, com a descoberta das enzimas requeridas para a síntese destas moléculas, que se deu início à compreensão da atual via biossintética (GUTTENBERGER; BLANKENFELDT; BREINBAUER, 2017; MENTEL *et al.*, 2009).

Pierson *et al.* (1995) foram os primeiros a mencionar o envolvimento de genes na biossíntese de fenazinas. Foi então que Mavrodi *et al.* (2001) mostraram que a via para síntese do núcleo fenazínico de *P. aeruginosa* compreende enzimas codificadas por duas cópias de um *operon* de sete genes, sendo eles *phzA1B1C1D1E1F1G1* e *phzA2B2C2D2E2F2G2* (*phz1* e *phz2*) responsáveis pela síntese de PCA. Ainda, enzimas adicionais estão envolvidas na conversão de PCA em piocianina, fenazina-1-carboxamida (PCN) e 1-hidroxifenazina (1-OH-PHZ), sendo elas codificadas pelos genes *phzM*, *phzS* e *phzH*. A Figura 4 apresenta as duas cópias do operon responsáveis por codificar as

enzimas de biossíntese do núcleo fenazínico (PhzB, PhzC, PhzD, PhzE, PhzF e PhzG) bem como as enzimas de modificação (PhzM, PhzS e PhzH).

Figura 4 - Operon da biossíntese de fenazinas. Genes requeridos para biossíntese do núcleo (→), modificação (→) e regulação (→).



Fonte: Mentel *et al.*, 2009.

3.3.1 Via do Ácido Chiquímico

A via do ácido chiquímico é responsável pela formação do intermediário nomeado ácido corísmico. Este composto atua como precursor de importantes metabólitos, tais como vitamina K, aminoácidos aromáticos e ubiquinona. Além disso, esta molécula também é originária do núcleo fenazínico (GUTTENBERGER; BLANKENFELDT; BREINBAUER, 2017).

A Figura 5 esquematiza a via do ácido chiquímico, que se inicia a partir da molécula de eritrose-4-fosfato e da molécula de fosfoenolpiruvato. O gene *phzC* codifica uma 7-fosfato (DAHP) sintase de tipo II. Assim, a sintase DAHP catalisa a primeira reação da via do chiquimato, uma condensação de fosfoenolpiruvato e eritrose-4-fosfato, gerando 3-desoxi-D-arabinoheptulosonato (DAHP), o qual é convertido em ácido chiquímico com posterior conversão em ácido corísmico através de reações comuns de vias biossintéticas de aminoácidos (LAURSEN; NIELSEN, 2004; MENDEL *et al.*, 2009).

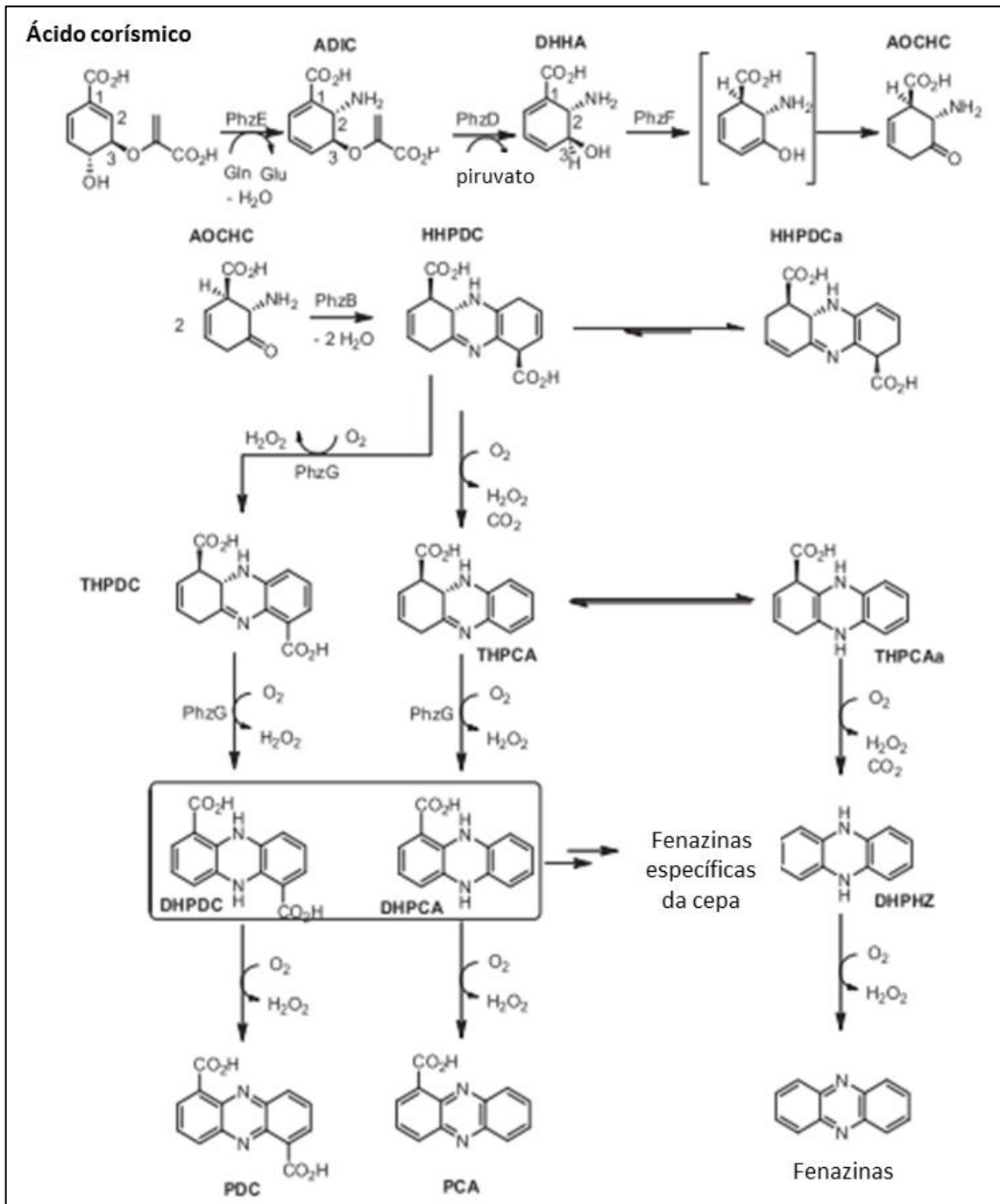
dicarboxílico (HHPDC) possa ocorrer na cavidade dimérica de PhzF, entretanto esta reação envolve também a participação de PhzA/B. As espécies de *Pseudomonas* contêm uma cópia de *phzB* com aproximadamente 70% de identidade chamada de *phzA*, e ambas as enzimas são de importância para biossíntese de fenazinas (BLANKENFELDT; PARSONS, 2014; MCDONALD *et al.*, 2001). AHUJA *et al.* (2008) investigaram reações com as estruturas de cristalografia destas enzimas em complexos com análogos do substrato e produto, e os experimentos conduzidos levaram os autores a concluir que PhzA/B acelera a formação de imina dupla, neutralizando a carga negativa de intermediários tetraédricos por meio da protonação.

Como HHPDC não é estável acaba sofrendo uma reação instantânea de descarboxilação oxidativa, dando origem ao ácido tetrahydrofenazina-1,6-carboxílico (THPCA) (BLANKENFELDT; PARSONS, 2014). A enzima PhzG dependente de flavina é oxidase não específica que utiliza tanto HHPDC quanto THPCA como substratos. Dessa forma, PhzG oxida HHPDC em THPDC e este produto é oxidado novamente por esta enzima, formando molécula de 5,10-di-hidro-PDC (DHPDC). Em contrapartida, THPCA, por ação desta mesma enzima, é oxidado à 5,10-di-hidro-PCA (DHPCA). Tanto DHPDC quanto DHPCA são os principais precursores para construção do núcleo das fenazinas (XU *et al.*, 2013).

Por fim, uma subsequente reação não enzimaticamente catalisada de DHPDC e DHPCA acarretam a formação de PDC e PCA, que atuam como núcleos fenazínicos, os quais enzimas específicas modificam para gerar diferentes fenazinas.

A via descrita para formação do núcleo das fenazinas (molécula de PCA) está representada abaixo, na Figura 6.

Figura 6 - Via de biossíntese do núcleo fenazínico a partir do ácido corísmico.



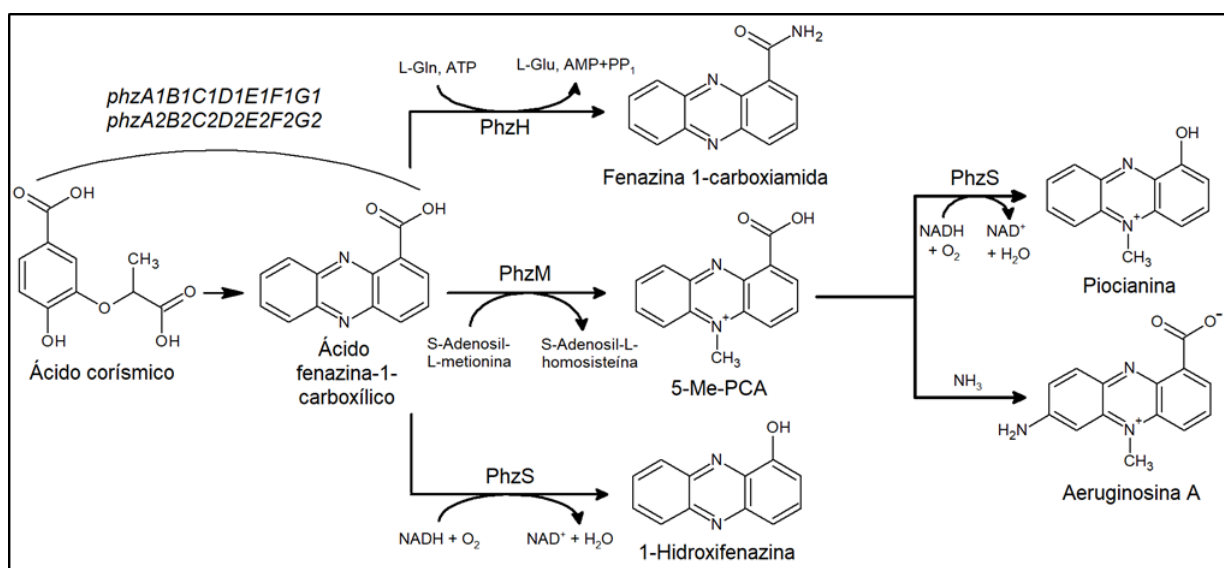
Fonte: Blankenfeldt; Parsons, 2014; Xu *et al.* 2013.

3.3.3 Biossíntese das Principais Fenazinas de *P. aeruginosa* por Modificação do Núcleo Fenazínico

Em *P. aeruginosa* o núcleo fenazínico consiste na molécula de PCA, que passa por uma série de modificações, incluindo hidroxilação, metilação e N-oxidação (GUTTENBERGER; BLANKENFELDT; BREINBAUER, 2017).

Em 2001, Mavrodi *et al.* descreveram uma clonagem minuciosa e análise funcional de genes para via biossintética de piocianina e fenazina-1-carboxiamida em *P. aeruginosa* PAO1. Os autores identificaram os dois operons homólogos (*phz1* e *phz2*) responsáveis pela biossíntese de PCA, bem como três genes adicionais (*phzM*, *phzS* e *phzH*) que codificam enzimas modificadoras responsáveis pela conversão de PCA nas demais fenazinas (Figura 7).

Figura 7 - Biossíntese das principais fenazinas produzidas por *P. aeruginosa*.



Fonte: Adaptado de Abu *et al.*, 2013; Mavrodi *et al.*, 2001.

Como já mencionado, PCA, precursor das fenazinas bioativas, é sintetizado a partir de ácido corísmico por enzimas codificadas em um *cluster* de sete genes em *P. aeruginosa* (MAVRODI *et al.*, 2001). Este composto é convertido em piocianina por dois processos sequenciais envolvendo as enzimas N-metiltransferase putativa (PhzM) dependente de S-adenosilmetionina e hidroxilase dependente de flavina (PhzS) (PARSONS *et al.*, 2007). Assim, a metiltransferase

PhzM converte PCA no composto intermediário ácido 5-metilfenazina-1-carboxílico (5-Me-PCA), que se trata de um pigmento sintetizado em grandes quantidades pela cepa *knockout* de *phzS* de *P. aeruginosa*. Enquanto, PhzS codifica hidroxilase que catalisa descarboxilação hidroxilativa de 5-Me-PCA em piocianina (MAVRODI *et al.*, 2001). Não obstante, PhzS unicamente também pode contribuir para conversão de PCA em 1-hidroxifenazina (1-OH-PHZ) (PIERSON; PIERSON, 2010), que pode ser explicado devido à ampla especificidade de substrato desta enzima (MAVRODI *et al.*, 2001).

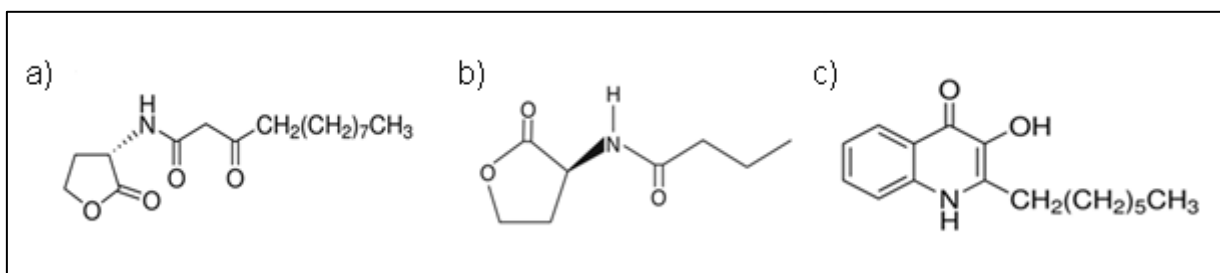
P. aeruginosa PAO1 contém ainda, uma transamidase PhzH que catalisa aaminação da porção de PCA em fenazina-1-carboxamida (PCN), permitindo que essa cepa produza tanto PCA quanto PCN. O gene *phzH*, que codifica para esta enzima, foi identificado pela primeira vez em *P. chlororaphis*, sendo confirmado posteriormente que a proteína PhzH expressa nesta bactéria era homóloga à produzida por *P. aeruginosa* (CHIN-A-WOENG *et al.*, 2001; MAVRODI *et al.*, 2001).

3.4 REGULAÇÃO DA BISSÍNTESE DAS FENAZINAS (*QUORUM SENSING*)

A regulação da expressão dos genes de produção das fenazinas, bem como de outros fenótipos de virulência, é realizada por mecanismo de comunicação entre bactérias, vinculado à densidade populacional. Este sistema de linguagem, conhecido como *quorum sensing* (QS), permite a coordenação do comportamento bacteriano por meio da produção e difusão de pequenas moléculas sinalizadoras, promovendo a sobrevivência do grupo (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2013; SCHAUDER; BASSLER, 2001).

No QS de *P. aeruginosa* existem duas moléculas sinalizadoras do tipo acil-homoserinolactonas (acil-HSL): N-(3-oxododecanoil)-HSL e N-butilil-HSL, produzidas pelas enzimas LasI e RhII, respectivamente, e uma quinolona (2-heptil-3-hidroxil-4-quinolona) também conhecida como "*Pseudomonas quinolone signal*" (PQS) (Figura 8) (DIGGLE *et al.*, 2006). Essas moléculas de acil-HSL ligam-se aos seus respectivos fatores de transcrição (LasR e RhIR) e ativam a expressão de genes alvos. Os dois circuitos são arranjados hierarquicamente, assim LasI-LasR controla a expressão de RhII-RhIR (SCHUSTER; GREENBERG, 2006).

Figura 8 - Acil-homoserinolactonas: **(a)** N-(3-oxododecanoil)-HSL e **(b)** N-butiril-HSL. Quinolona: **(c)** 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona.



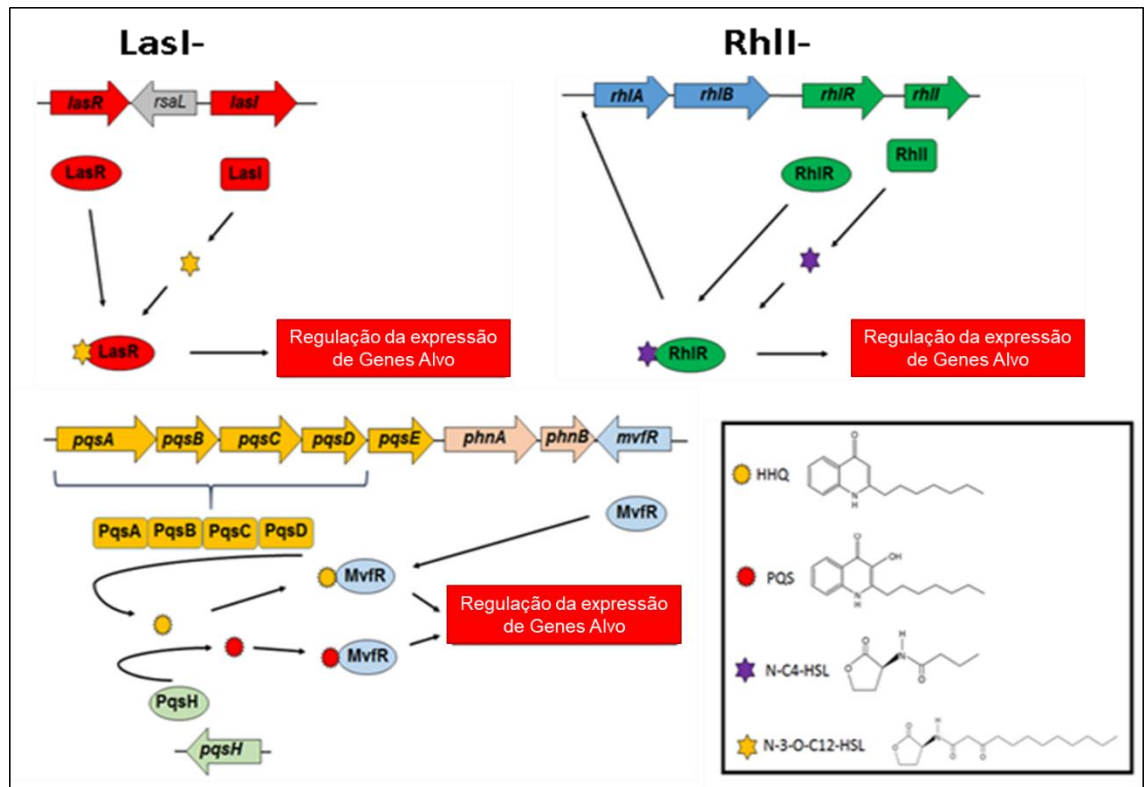
Fonte: Sigma-Aldrich.

Os genes responsáveis pela expressão de PQS são codificados pelo *operon* de cinco genes denominado *pqsABCDE*, sendo que os quatro primeiros genes neste *locus* (*pqsABCD*) são necessários para síntese da molécula PQS a partir de antranilato enquanto o último, *pqsE*, tem função de resposta celular à molécula PQS (RAMPIONI *et al.*, 2016).

Tanto PQS quanto seu precursor 2-heptil-4-quinolona (HHQ) se ligam ao regulador transcricional PqsR (também conhecido com MvfR) e ativam a região promotora do operon *pqsABCDE* e desencadeiam a transcrição do mesmo (RAMPIONI *et al.*, 2016).

O sistema PQS está intrinsecamente associado aos sistemas de acil-HSLs (LasI-LasR e RhII-RhIR), sendo a produção de PQS positivamente regulada por LasI-LasR, enquanto RhIR é considerado como repressor da expressão dos genes que codificam para PqsA e PqsR (McGRATH; WADE; PESCI, 2004; PUSTELNY *et al.*, 2009). A Figura 9 apresenta um esquema que esclarece como acontece esse mecanismo de regulação em *P.aeruginosa*.

Figura 9 - Representação do mecanismo de *quorum sensing* em *P. aeruginosa* apresentando os sistemas LasI-LasR, RhlI-RhIR e o sistema PQS e suas interações.



Fonte: O próprio autor.

Neste sentido, o uso de indutores do sistema de *quorum sensing*, pode ser realizado a fim de aumentar a produção de fenazinas. O emprego da proteína caseinato de sódio no meio de cultivo como indutor foi fundamentado pelo estudo transcricional da PAO1 elaborado por Camilios-Neto (2010), que avaliou o transcriptoma da bactéria na ausência e presença desta proteína.

Este autor identificou diversos genes que foram expressos de forma distinta em resposta ao caseinato de sódio presente no meio. Dentre estes, genes pertencentes ao *operon* de biossíntese de fenazinas (*phzA1*, *phzB1*, *phzC*, *phzD2*, *phzE*, *phzF2*, *phzG2*) também foram super-expressos, com 30 horas de cultivo (dados não publicados). Além disso, este estudo também revelou que o gene que codifica a enzima fosfo-2-dehidro-3-deoxiheptonato aldolase, envolvido na biossíntese de corismato, também foi estimulado no mesmo tempo de cultivo, sendo este um precursor biossintético das moléculas fenazínicas.

O uso desta proteína também foi investigado por Sandoz *et al.* (2007), com intuito de obter maior ativação dos genes do sistema QS. Estes autores relataram que para *P. aeruginosa* crescer em meio contendo caseína e a consumir, é indispensável a expressão de proteases extracelulares que hidrolisem esta proteína. Como já conhecido, as proteases extracelulares de *P. aeruginosa* são reguladas pelo QS, sendo demonstrado que o uso da proteína no meio de cultivo também foi responsável por ativar esse sistema.

Consistente com estes dados, Camilios-Neto (2010) mostrou que os genes responsáveis pela expressão do circuito RhII-RhIR de *P. aeruginosa* também foram ativados ao utilizar caseinato de sódio no meio de cultivo.

Neste sentido, estas evidências contribuíram para a escolha de caseinato de sódio como suplemento no meio de cultivo para produção de fenazinas, visto que este atua como um indutor do mecanismo de QS de *P. aeruginosa* e conseqüentemente contribui para um aumento na produção de moléculas fenazínicas.

3.5 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE FENAZINAS DE *P. AERUGINOSA*

A pigmentação de *P. aeruginosa* ocorre devido à produção de diferentes pigmentos, incluindo pioverdina, piomelanina e as fenazinas piocianina e piorubrina (JAYASEELAN; RAMASWAMY; DHARMARAJ, 2014; LAURSEN; NIELSEN, 2004; ORLANDI *et al.*, 2015).

Além disso, a biossíntese de cada pigmento pode ser influenciada também pela disposição genética, estado celular-fisiológico e condições ambientais. Assim sendo, a pigmentação das culturas *P. aeruginosa* PAO1 muda dependendo da composição do meio, volume do inóculo, temperatura, taxa de aeração e agitação e tempo de incubação (ORLANDI *et al.*, 2015).

A composição do meio afeta muito a pigmentação de *P. aeruginosa* PAO1. Quando células foram cultivadas *overnight* em meio mínimo M9 não foi constada nenhuma pigmentação, já células cultivadas *overnight* em meio LB tornaram o meio verde, o que é compatível com a combinação de piocianina, que é azul, e o amarelo do meio LB. A agitação também influencia a produção, por exemplo, culturas sob agitação vigorosas são verdes, entretanto ao interromper a

agitação forma-se um gradiente verde-amarelo na interface ar-meio, dependendo da perda de tensão de oxigênio e consequente diminuição da forma oxidada azul de piocianina (RADA; LETO, 2013).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a cepa de *P. aeruginosa* PAO1, isolada originalmente na Austrália, a partir de feridas humanas infectadas (HOLLOWAY, 1955). PAO1 é a cepa de *P. aeruginosa* mais utilizada mundialmente em estudos laboratoriais, e cujo genoma está sequenciado e muito bem descrito (STOVER *et al.*, 2000).

4.1.1 Meios de Preservação

A cepa PAO1 foi mantida em meio líquido Luria-Bertani (LB) (Tabela 1) adicionado de glicerol 20 % (v/v), e estocada a -80 °C. A cepa foi transferida para placas contendo meios sólidos LA, que consiste no meio LB adicionado de 1,5 % (m/v) de ágar, e estas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 h a 37 °C.

Tabela 1 - Composição do meio LB (pH 7,0)

Componentes	Concentração
Triptona	10 g L ⁻¹
Extrato de Levedura	5 g L ⁻¹
NaCl	10 g L ⁻¹

Fonte: Sambrook *et al.*, 1989.

4.2 PRODUÇÃO DE FENAZINAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

A produção de fenazinas ocorreu por dois processos. No primeiro processo, descrito no item 4.2.1, foi feito um estudo preliminar para produção de fenazinas. Neste estudo foi utilizada cepa de PAO1 transformada com os plasmídeos pSW205 ou pECP60, contendo o gene repórter *lacZ* e possuindo como marcador genético de seleção a resistência aos antibióticos ampicilina e carbenicilina. Essa cepa transformada foi cultivada em meio de sais acrescentado de glicerol 3% (v/v) em diferentes tempos de cultivo. Os sobrenadantes resultantes

deste cultivo, foram misturados para passarem pelo processo de extração e purificação no presente trabalho. A escolha por este sobrenadante para os testes preliminares foi devido a intensa coloração esverdeada do meio, característica de fenazinas, em relação aos cultivos da cepa selvagem.

Já o segundo processo (item 4.2.2), envolveu o emprego de PAO1 cultivada em meio de sais acrescentado de glicerol 3% (v/v) e caseinato de sódio 1% (v/v) por um período de 13 dias.

4.2.1 Estudos Preliminares para Produção de Fenazinas por Cultivos Submersos de PAO1 Transformada, Utilizando Meio de Sais Adicionado de Glicerol 3%

Foi feito um estudo a fim de avaliar a produção de fenazinas. A princípio, cultivos foram realizados com finalidade de avaliar a expressão gênica, entretanto pelo fato dos meios apresentarem coloração característica de fenazinas foi decidido avaliar também a produção destas moléculas.

4.2.1.1 Preparo do pré-inóculo

Primeiramente, a região promotora do gene *rhIA* foi clonada no plasmídeo parental pSW205, dando origem ao plasmídeo pECP60, ambos incluindo resistência à ampicilina e carbenicilina. Após, a estirpe selvagem PAO1 foi transformada com ambos plasmídeos, e estirpes mutantes resultantes foram preservadas em meio LA adicionado do antibiótico Carbenicilina 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

As cepas mutantes, foram ativadas em 25 mL de meio LB contendo 100 μL do antibiótico Carbenicilina 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por 12 – 16 h a 37 °C e 200 rpm (Pré-inóculo 1). Em seguida, foi inoculado 500 μL da suspensão de células bacterianas em 25 mL de meio LB (2 % v/v) adicionado de 100 μL do antibiótico Carbenicilina 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e incubado a 37 °C de 5 – 6 h sob agitação de 200 rpm (D.O._{600 nm} entre 0,6 e 0,8) (Pré-inóculo 2).

4.2.1.2 Cultivos Submersos

Uma proporção de 2 % (v/v) do segundo pré-inóculo foi inoculada em frascos Erlenmeyer contendo 25 mL de meio de sais (Tabela 2) adicionado de glicerol (3 % v/v) e as culturas foram incubadas nos tempos de 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h. Os cultivos foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos. O *pellet* obtido foi ressuscitado em solução salina 0,9 % para estudo dos perfis de expressão ao longo do tempo (este estudo não está relacionado ao presente trabalho) enquanto que o sobrenadante foi utilizado para que pudesse ser avaliada a produção das fenazinas obtidas por este processo, bem como extraí-las e purificá-las (itens 4.3 e 4.4).

Tabela 2 - Composição do meio de sais

Componentes	Concentração
KH ₂ PO ₄	3 g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄	7 g L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g L ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g L ⁻¹

Fonte: Camilios-Neto, 2010.

4.2.2 Produção de Fenazinas em Meio Contendo Caseinato de Sódio

4.2.2.1 Preparo do pré-inóculo

Os pré-inóculos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL do meio LB. Para ativação do microrganismo foram inoculados de 3-5 colônias de PAO1 proveniente de placas de meio LA (item 4.1.1) em meio LB por 12 h – 16 h a 37 °C sob agitação de 200 rpm (Pré-Inóculo 1). Posteriormente, 2% (v/v) da suspensão de células bacterianas foi inoculada em 25 mL de meio LB e incubada a 37 °C por 5 – 6 h sob agitação de 200 rpm (Pré-Inóculo 2). O crescimento bacteriano durante preparo do segundo pré-inóculo foi acompanhado pela determinação da absorbância do meio de cultivo a 600 nm (D.O._{600 nm}), e

utilizado para o preparo do inóculo (item 4.2.2.2) quando a D.O._{600 nm} atingiu leitura entre 0,6 e 0,8.

4.2.2.2 Cultivos submersos

Os ensaios para cultivos submersos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio de sais (Tabela 2) acrescentado de glicerol 3% (v/v) e caseinato de sódio 1% (v/v). Os meios foram esterilizados por 20 minutos, a 121 °C, resfriados e inoculados com o segundo pré-inóculo (item 4.2.2.1) em proporção de 2 % (v/v). A seguir, foram incubados em agitador orbital rotatório a 37 °C e 200 rpm.

4.2.2.3 Interrupção dos cultivos

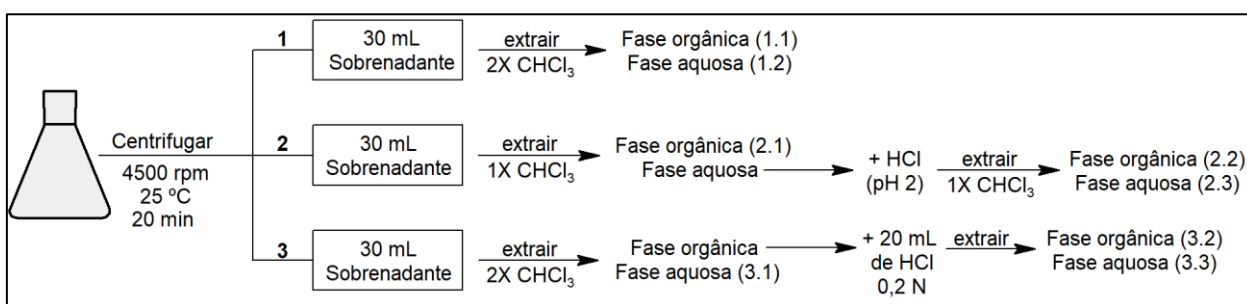
No tempo de fermentação oportuno (48 h e 312 h), os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 4500 rpm e 25 °C por 20 minutos, e o sobrenadante obtido submetido à extração orgânica das fenazinas (item 4.3) com posterior purificação destas moléculas.

4.3 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DAS FENAZINAS

O sobrenadante livre de células dos cultivos de *P. aeruginosa* PAO1 em meio adicionado de caseinato de sódio 1% foi primeiramente aquecido a 80 °C por 45 minutos antes do procedimento de extração. Após ser resfriado, este foi extraído com clorofórmio na proporção de 1:1 (v/v) por três diferentes processos de extração (ABU *et al.*, 2013; ASFAHL; SCHUSTER, 2018; PALUMBO, 1972; SUDHAKAR; KARPAGAM; PREMKUMAR, 2015), esquematizados na Figura 10. No primeiro processo, o sobrenadante foi extraído duas vezes com o solvente clorofórmio. Já para o segundo foi feita extração uma vez com solvente clorofórmio, sendo recolhida a fase aquosa. Esta fase teve seu pH alterado para 2 com HCl e submetida à extração com clorofórmio. E para o terceiro processo, primeiramente extraiu-se duas vezes, e à fase orgânica foi adicionado HCl 0,2 N em proporção de 1:3 (v/v) e extraído novamente. As fases orgânicas, recuperadas por meio de funil de

separação, foram concentradas por evaporação em evaporador rotatório e os extratos resultantes secados e pesados, enquanto que as fases aquosas foram congeladas para posterior purificação. O sobrenadante de PAO1 transformada cultivada em meio de sais adicionado de glicerol 3% foi extraído pelo primeiro processo, apresentado na Figura 10. Destas extrações espera-se que na fase aquosa estejam presentes piorubrinas, como a aeruginosina A, e que a fase orgânica contenha outras fenazinas, solúveis em clorofórmio.

Figura 10 - Avaliação dos métodos de extração.



Os extratos brutos orgânicos obtidos dos processos de extração foram evaporados em agitador rotatório e armazenados em frascos previamente tarados. Estes foram deixados ao ar para evaporação total do solvente e calculou-se a massa por gravimetria.

4.4 PURIFICAÇÃO DAS FENAZINAS

4.4.1 Fenazinas Presentes na Fase Orgânica

4.4.1.1 Extração em fase sólida

Os extratos brutos advindos das fases orgânicas (1.1) foram submetidos a três diferentes processos de purificação utilizando cartucho de sílica. O cartucho consistiu de uma ponteira de 5 mL empacotada com 500 mg de sílica gel (230 – 240 *mesh*) como adsorvente (Figura 11). O cartucho foi primeiramente ativado com 7 mL de metanol e após a ativação a amostra, dissolvida em diclorometano, foi aplicada lentamente no cartucho. A eluição ocorreu por meio de pressão negativa com 7 mL de diferentes solventes extratores eluídos em sequência. Ao final de cada etapa, o cartucho de sílica foi lavado com o mesmo volume de uma solução de CH₃OH:HAc 2% e as frações coletadas, foram secadas e analisadas por cromatografia em camada delgada (item 4.5.1).

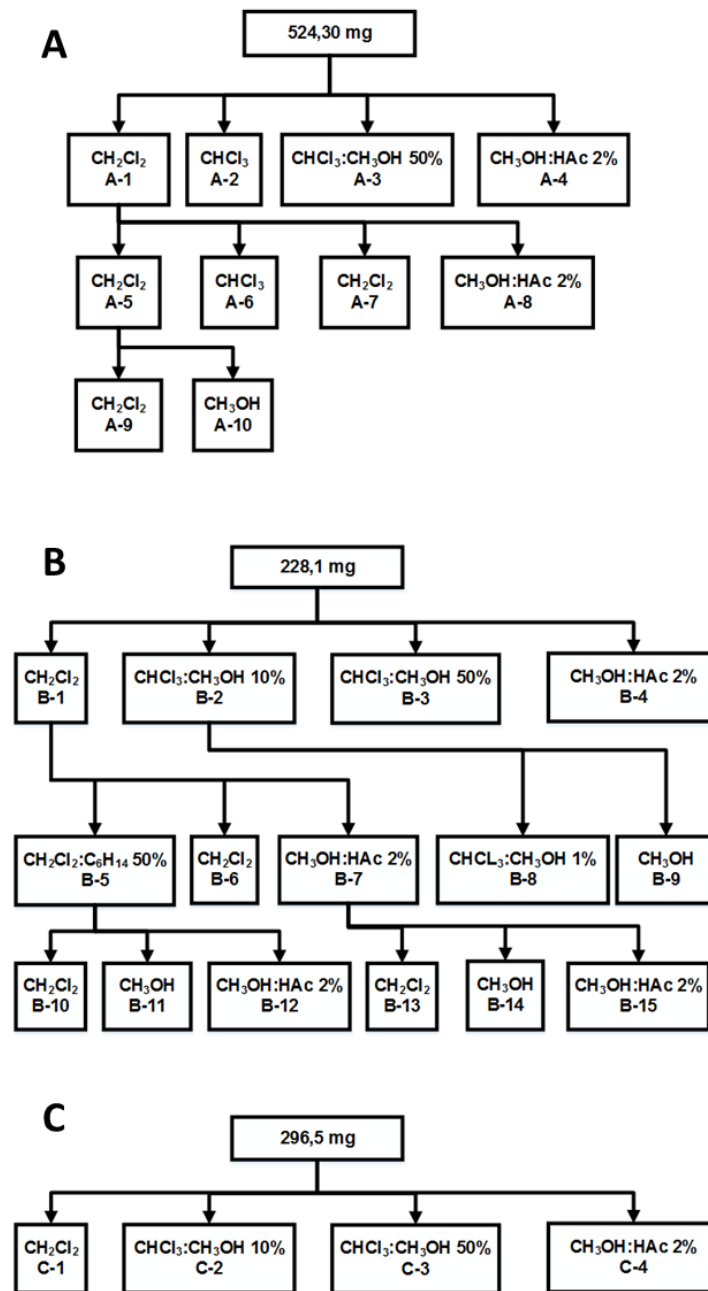
Figura 11 - Cartucho de sílica utilizado para purificação.



Fonte: O próprio autor.

Abaixo encontra-se o fluxograma com a representação deste processo de extração em fase sólida empregado para o extrato bruto orgânico do cultivo com meio sem (Figura 12-A) e com suplementação de caseína (Figura 12-B e 12-C). O fluxograma mostra a massa aplicada de cada extrato, a sequência de fases móveis empregadas em cada etapa e quais frações passaram por mais de uma etapa de purificação.

Figura 12 - Fluxograma do processo de extração em fase sólida.



(A) Processo de extração do extrato bruto orgânico do cultivo de PAO1 transformada em meio não suplementado. (B) e (C) Processo de extração do extrato orgânico do cultivo de PAO1 em meio suplementado com caseinato de sódio 1%. O fluxograma mostra a massa inicial do extrato, o solvente utilizado em cada etapa e a sequência de cada passo.

4.4.1.2 Cromatografia *flash*

Parte da amostra do extrato orgânico do cultivo não-suplementado com caseinato foi submetida à separação em cromatografia *flash*, realizada em coluna com dimensões de 1,4 × 12 cm empacotada com 12 g de sílica gel de partícula 230 – 240 *mesh* como fase estacionária. Foram aplicados 600 µL da amostra (0,2134 mg mL⁻¹ em CHCl₃). Para eluição foram utilizados uma ou duas vezes 30 mL de CHCl₃:CH₃OH em diferentes proporções, com ordem de eluição CHCl₃, CHCl₃:CH₃OH 0,5%, CHCl₃: CH₃OH 1,0% (2×), CHCl₃:CH₃OH 2,0% (2×), CHCl₃:CH₃OH 5,0% e CHCl₃:CH₃OH 10,0%. O processo foi finalizado com 50 mL de CH₃OH acidificado (10% HAc) e 40 mL de CHCl₃. As frações coletadas (12 mL cada) foram secas, pesadas e agrupadas quando exibiam similaridades após avaliação por CCD analítica.

4.4.1.3 Cromatografia em camada delgada preparativa

A amostra denominada como C-1 (Figura 12-C) foi submetida a processo de separação em cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), realizada em placas de vidro de 20 × 20 cm, revestida com 1,0 mm de sílica gel 60 PF₂₅₄ (Merck) como fase estacionária (8 g de sílica por placa). As placas foram previamente ativadas em estufa à 100 °C por 2 h, após o período de ativação foram deixadas em temperatura ambiente para aplicação das amostras. Foi utilizada a mistura CHCl₃:CH₃OH 1% (v/v) como fase móvel para eluição, decorrente do resultado prévio avaliado por CCD analítica. Após eluição, as regiões (R_f) de interesse foram marcadas, raspadas e transferidas para funil, na sequência extraídas com aproximadamente 15 mL de CH₃OH:CH₂Cl₂ 50% e 5 mL de metanol. Finalmente as sub-frações, resultantes da separação por CCDP, foram submetidas à CCD analítica (4.5.1) para avaliar a eficiência da separação quanto a necessidade de novos procedimentos de purificação.

4.4.2 Fenazinas Presentes na Fase Aquosa

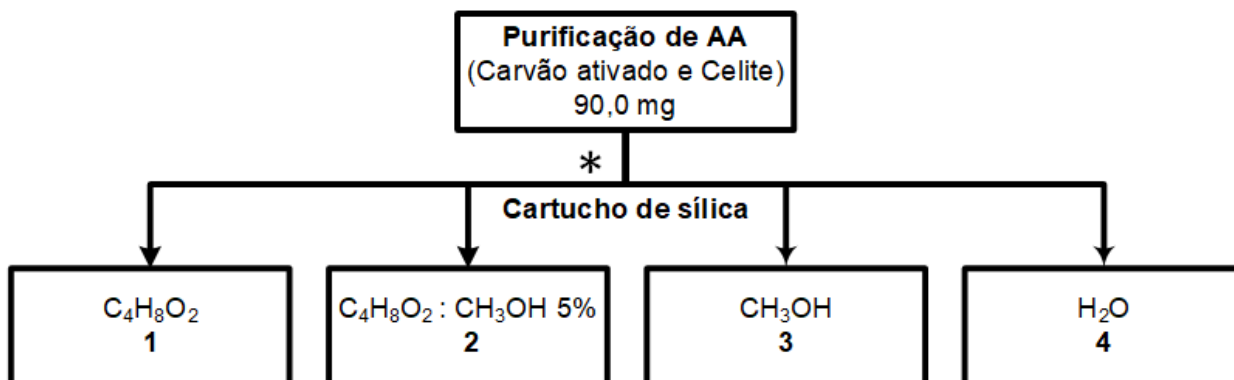
4.4.2.1 Purificação de aeruginosina A (AA)

Para purificação do pigmento vermelho, o sobrenadante livre de células do cultivo de PAO1 em meio suplementado com caseinato de sódio 1% foi primeiramente extraído com clorofórmio (item 4.3). À 30 mL da fase aquosa (1.2) obtida foi adicionado 0,5 g de Celite 545, deixado em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente. Na sequência, a mistura foi centrifugada por 15 minutos a 25 °C sob agitação de 4500 rpm, ao sobrenadante foi adicionado 0,6 g de carvão ativado, o pH ajustado para 4,5 com HCl, sendo na sequência colocado em agitador orbital a 4-8 °C por 1 h à 250 rpm. Posteriormente, o pigmento ligado ao carvão foi recuperado por centrifugação, a 4 °C a 4500 rpm, por 15 minutos, sendo descartado o sobrenadante. Ao *pellet* foi adicionado 0,5 g de Celite e 30 mL de água ultrapura, sendo centrifugado a 4 °C por 10 minutos e 4500 rpm. Descartou-se o sobrenadante e ao *pellet* foi adicionado 30 mL de água ultrapura e centrifugou-se por 10 minutos a 4 °C e 4500 rpm (este passo foi repetido 5 vezes). Após estas lavagens o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* adicionou-se 30 mL de etanol 50%, sendo centrifugado por 10 minutos nas mesmas condições (este passo foi realizado 2 vezes). Descartou-se o sobrenadante e ao *pellet* adicionou-se 30 mL de piridina 5%, sendo agitado vigorosamente, na sequência levado em agitador orbital a 4-8°C por 1 h sob agitação de 250 rpm e centrifugou-se a 4°C por 15 minutos com rotação de 5000 rpm. Por fim, o sobrenadante foi filtrado, extraído com éter 1:1 (v/v) por duas vezes, concentrado em evaporador rotatório e liofilizado (ABU *et al.*, 2013).

4.4.2.2 Extração em fase sólida

Uma parte do pigmento vermelho (45 mg) obtido do processo de purificação descrito no item 4.4.2.1 foi dissolvido em metanol e purificado por extração em fase sólida (Figura 13). O cartucho foi preparado e ativado conforme já relatado no item 4.4.1.1, sendo eluído sequencialmente por 5 mL de acetato de etila, 5 mL de acetato de etila:metanol 5% , 12 mL de metanol e para finalizar 12 mL de água. Cada fração foi avaliada por CCD analítica (item 4.5.1), utilizando metanol como fase móvel e revelada com luz UV (254 nm).

Figura 13 – Fluxograma do processo de extração em fase sólida das fenazinas presentes na fase aquosa.



O fluxograma mostra a massa inicial do extrato, o solvente utilizado em cada etapa e a sequência de cada passo.

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS PIGMENTOS PURIFICADOS

4.5.1 Cromatografia em Camada Delgada

As amostras obtidas de cada etapa de purificação foram solubilizadas em diclorometano e submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD) (DC-Fertigfolien ALUGRAM® Xtra SIL G/UV₂₅₄, 20 × 20 cm). Para cada amostra foi aplicado 1,0 µL. Como fases móveis foram utilizados CHCl₃; CHCl₃:CH₃OH 1 %; CHCl₃:CH₃OH 3 % e CHCl₃:CH₃OH 20%. Foram empregados dois reveladores, ácido sulfúrico (CH₃OH:H₂SO₄ 10%) para identificação das pocianinas e Orcinol para ramnolipídeos (contaminantes) que geralmente estão presentes no meio. Os valores do fator de retenção (R_f) foram calculados segundo Stahl (1969) como demonstrado pela seguinte equação:

$$R_f = \frac{\text{distância do centro da mancha até o ponto de aplicação}}{\text{distância percorrida pelo solvente até o ponto de aplicação}}$$

4.5.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os extratos concentrados de fenazinas bem como as fenazinas purificadas foram submetidos à cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo Shimadzu Prominence LC-20A utilizando coluna Phenomenex Luna

C18 (5 μm ; 4,6 mm X 250 mm). A fase móvel consistiu de acetonitrila: ácido fórmico 0,1% (30:70) com fluxo de 1 mL min^{-1} por 60 min, detecção em 254 nm.

4.5.3 Ressonância Magnética Nuclear

As fenazinas purificadas da fase orgânica foram submetidas a análise de RMN em estado líquido. Os espectros de ^1H e ^{13}C foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance III 400 MHz operado à frequência de 400,6 MHz para ^1H , e 100 MHz para ^{13}C usando probe direto de 5 mm, BBO, a 25°C. Os deslocamentos químicos (δ) para hidrogênio são expressos em ppm e calibrados de acordo com o sinal do TMS presente no CDCl_3 em 0 ppm. Para o carbono foi usado igualmente a escala com unidades em ppm e calibrado com TMS interno em 0 ppm.

4.5.4 Espectrometria de Massa de Aeruginosina A (AA)

As fenazinas purificadas da fase aquosa foram analisadas em Espectrômetro de Massas QTOF, em modo positivo, marca Bruker modelo Compact por injeção direta. As amostras foram extraídas como descrito no item 4.4.2.1 e solubilizadas em metanol. As condições de análise foram: energia do capilar de 2,45 kV, e energia do cone de 43 V. Para aquisição dos espectros foi utilizada uma faixa de m/z de 100 a 300.

4.6 ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.6.1 Atividade Sequestrante de Cátions Radicais ABTS^{•+}

A capacidade antioxidante das fenazinas do extrato bruto orgânico e do pigmento 5-metil fenazina-1-carboxilato purificado frente ao radical livre ABTS^{•+} foi realizada de acordo com Vignoli, Bassoli e Benassi (2012). Primeiramente, foi produzido o cátion ABTS^{•+}, reagindo 7 mM de uma solução estoque ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio. Esta mistura foi armazenada em frasco escuro à temperatura ambiente por 12-16 horas, antes do uso. A solução ABTS^{•+} preparada foi diluída em tampão fosfato (pH 7,4) até atingir absorvância de 0,7 a 730 nm. Para medida da capacidade antioxidante, adicionou-se 10 µL de amostra em diferentes concentrações no tubo de reação (0,0625; 0,2500; 0,6250; 1,2500; 2,500 e 6,2500 µg mL⁻¹) para 4 mL da solução ABTS^{•+} diluída, e após 6 minutos de reação, as leituras de absorvância a 730 nm foram realizadas. Como branco da reação foi utilizada solução de persulfato de potássio diluída em tampão fosfato (pH 7,4) na mesma proporção da solução de ABTS. Como controle positivo foi usado 10 µL de etanol diluído em 4 mL da solução ABTS^{•+} diluída. A atividade antioxidante foi calculada empregando a seguinte equação:

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \frac{(\text{Abs controle} - \text{Abs amostra})}{\text{Abs controle}} \times 100$$

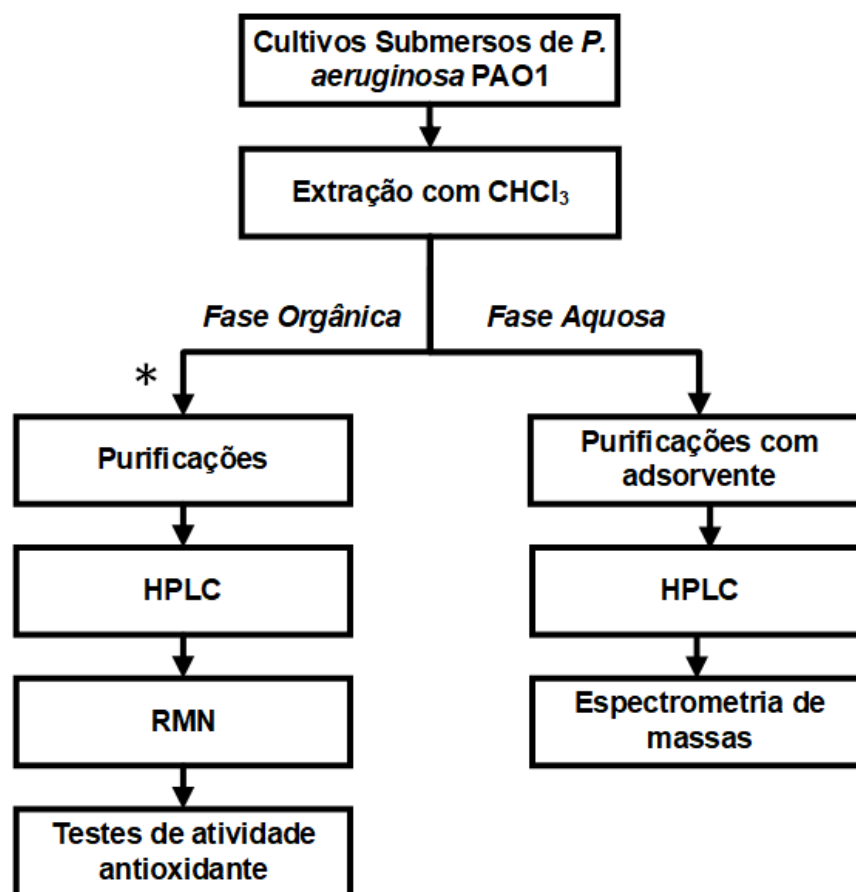
4.6.2 Poder Redutor do Ferro

A avaliação do poder de redução das fenazinas presentes no extrato bruto e da fenazina purificada pelo método de FRAP, foi realizada de acordo com Vignoli, Bassoli e Benassi (2012). O reagente de FRAP foi preparado pela mistura de 2,5 mL de solução 10 mM TPTZ em HCl 40 mM; 2,5 mL de FeCl₃.6 H₂O e 25 mL de tampão acetato 0,3 mM (pH 3,6). A solução foi incubada a 37°C por 30 minutos. Para avaliação da atividade antioxidante, 900 µL do reagente FRAP, preparado previamente, foi misturado com 90 µL de água destilada e 10 µL da amostra em

diferentes concentrações (20; 25 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$) ou padrão. As amostras foram incubadas à 37 °C, por 30 minutos e realizada a leitura a 595 nm. Como branco da reação foi usada a mistura de 900 μL do reagente FRAP, 90 μL de água destilada e 10 μL de etanol absoluto. Soluções padrão com diferentes concentrações de Trolox (4,0; 8,0; 10,0; 12,5 e 16,0 e 20,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$) foram utilizadas para calibração. Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Trolox/ $\mu\text{g mL}^{-1}$ de amostra.

A Figura 14 apresenta uma representação resumida da metodologia descrita.

Figura 14 - Esquema geral da metodologia empregada.



Na purificação da fase orgânica (asterisco) foram empregados diferentes processos. Para o extrato do cultivo com cepa transformada foram utilizados dois processos de purificação, sendo eles: extração em fase sólida e cromatografia *flash*. O extrato bruto do cultivo de PAO1 em meio suplementado com caseinato de sódio 1% foi purificado por extração em fase sólida e por extração em fase sólida seguida de cromatografia em camada delgada preparativa.

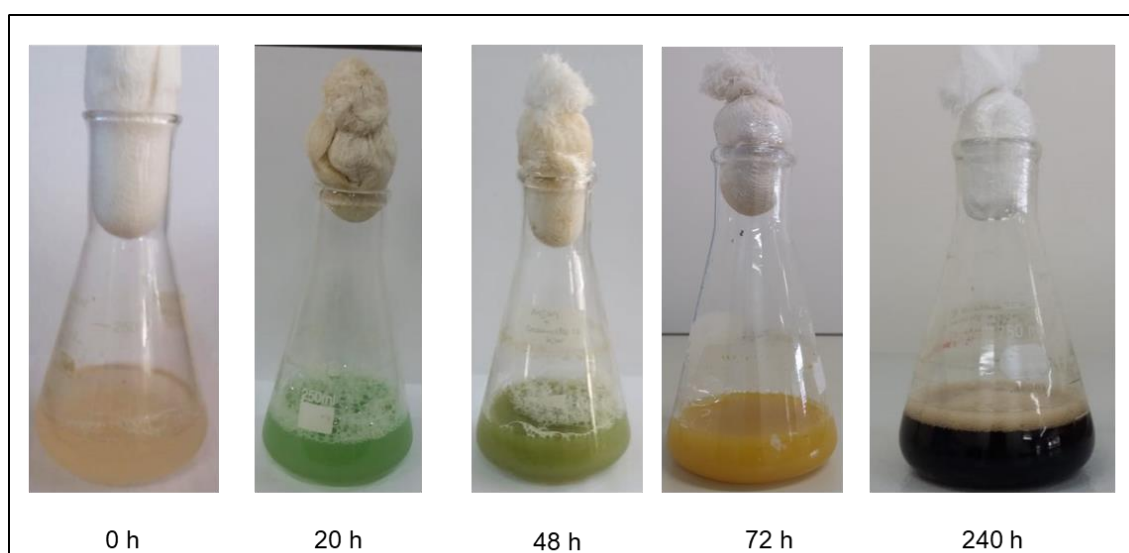
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE FENAZINAS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PAO1 POR CULTIVOS SUBMERSOS: AVALIAÇÃO DO TEMPO DE PRODUÇÃO E DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO

Já é bem conhecido que o gênero *Pseudomonas* sintetiza e excreta diversos pigmentos coloridos (EL-FOULY *et al.*, 2015), sendo esta uma das características mais marcantes deste gênero bacteriano. Os pigmentos de maior destaque produzidos por *P. aeruginosa* incluem a piocianina (azul), pioverdina (verde), piomelanina (marrom) e piorubrina (vermelho) (JAYASEELAN; RAMASWAMY; DHARMARAJ, 2014). Dentre estes, os pertencentes à classe de fenazinas (*i.e.*, piocianina e piorubrininas) são os mais estudados (EL-FOULY *et al.*, 2015), sendo o objeto deste estudo.

No presente trabalho, cultivos submersos de *P. aeruginosa* PAO1, utilizando a proteína caseinato de sódio como indutora de produção de fenazinas, apresentaram diferentes pigmentos, desde verde até marrom-avermelhado, no decorrer do cultivo (Figura 15).

Figura 15 – Diferentes tempos de cultivo para produção de fenazinas.



Com o intuito de saber qual o melhor tempo de produção de pigmentos fenazínicos foi necessário extrair o meio em diferentes dias de cultivo e avaliar de forma qualitativa, por meio de cromatografia em camada delgada (CCD), a

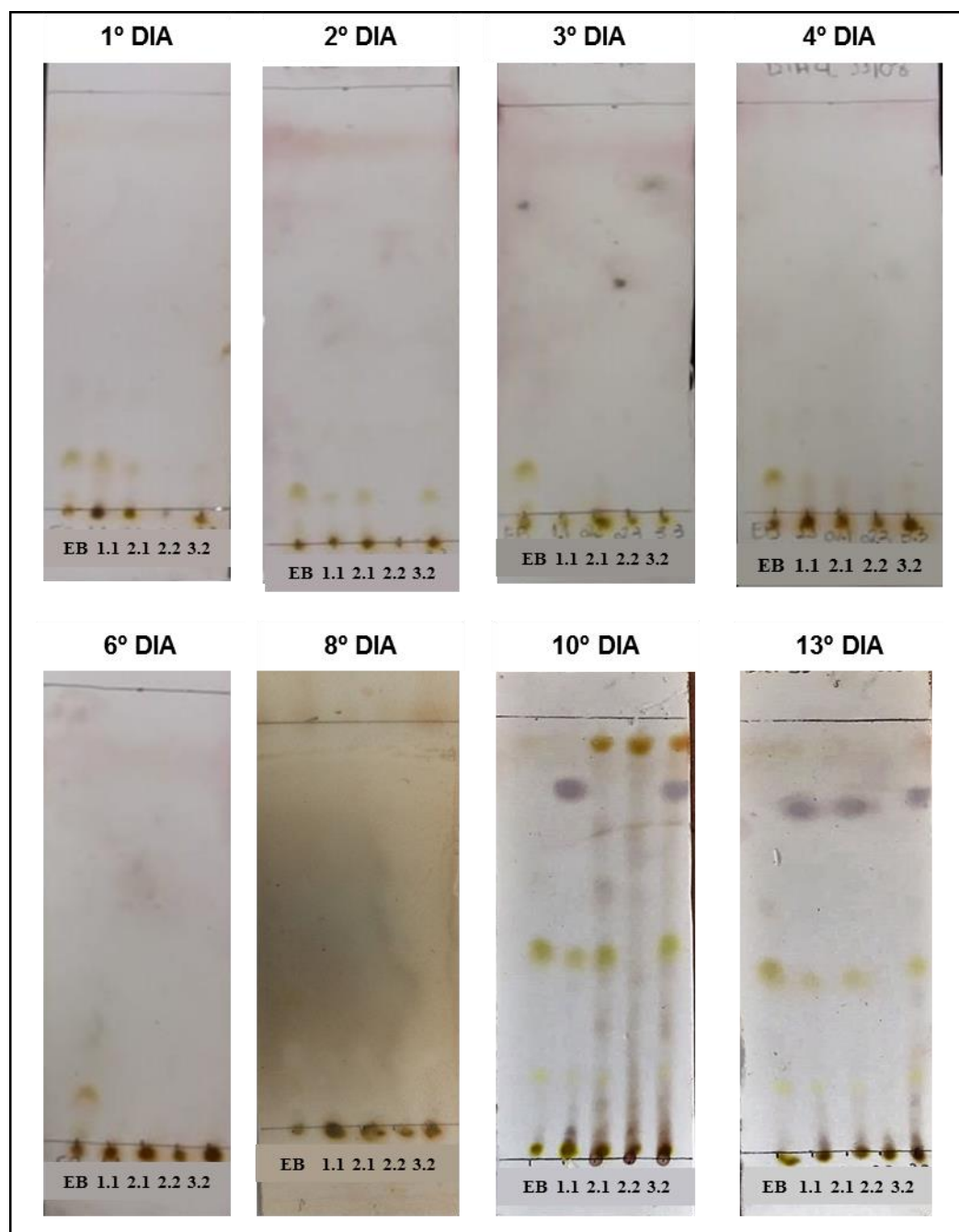
presença destas moléculas de interesse. Entretanto, ainda falta metodologia padronizada para extração de fenazinas, deste modo é crucial que se estabeleça técnicas de extração eficientes para fenazinas. Assim, buscou investigar qual melhor processo se aplicaria na extração de fenazinas.

Para estabelecer o melhor método de extração, foram testados diferentes procedimentos (item 4.3). Na literatura, para extração de fenazinas, em especial a piocianina, partições líquido-líquido utilizando clorofórmio (CHCl_3) e soluções aquosas de ácido clorídrico (HCl) são as mais reportadas (ABU *et al.*, 2013; ASFAHL; SCHUSTER, 2018; PALUMBO, 1972; SUDHAKAR; KARPAGAM; PREMKUMAR, 2015). Assim, no presente trabalho este procedimento foi adotado para os ensaios de extração (Figura 10).

As frações orgânicas dos diferentes processos de extração empregados, foram avaliadas por CCD, sendo constatada a presença simultânea das moléculas de interesse nas amostras obtidas por meio da primeira extração (Figura 16 - 1.1). Com esta metodologia também foi possível avaliar o efeito de duas extrações sequenciais (Figura 16 - comparando 1.1 com 2.1), sendo verificado que a utilização de duas extrações consecutivas apresentou extrato com maior massa. Portanto, foi definido o primeiro método para extração de fenazinas.

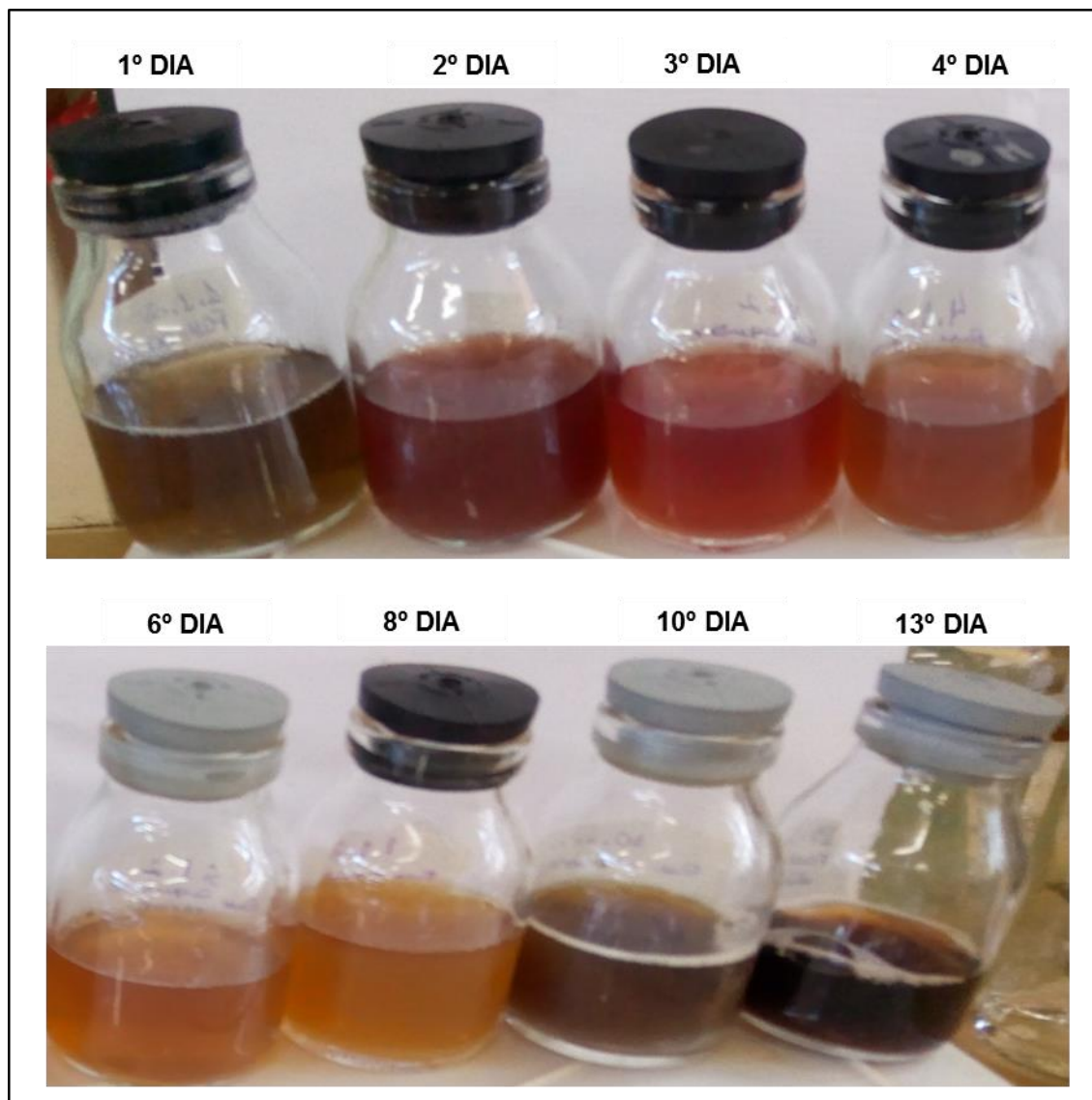
A Figura 15 apresenta o resultado de extrações e produção de fenazinas. Como pode ser observado, os dias em que ocorreram maior produção foram o 10^o e 13^o dias, com destaque para o 10^o dia, o qual aparentemente ocorreu uma maior produção. Entretanto, é necessário lembrar que pigmentos fenazínicos solúveis em água, como os avermelhados, ficam presentes na fração aquosa da extração. Assim, foram comparadas as frações aquosas e, de fato, aquelas com mais tempo de cultivo apresentaram cor vermelha, sendo que o 13^o dia obteve tonalidade mais intensa (Figura 17).

Figura 16 - Análise por CCD do extrato bruto e dos extratos orgânicos dos diferentes processos de extração em diferentes dias de cultivo.



Fase móvel $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 1 %. EB – Extrato bruto orgânico, 1.1 – fase orgânica do 1º processo de extração, 2.1 – 1º fase orgânica do 2º processo de extração, 2.2 – 2º fase orgânica do 2º processo de extração, 3.2 – fase orgânica do 3º processo de extração.

Figura 17 - Fases aquosas provenientes do primeiro processo de extração em diferentes dias de cultivo.

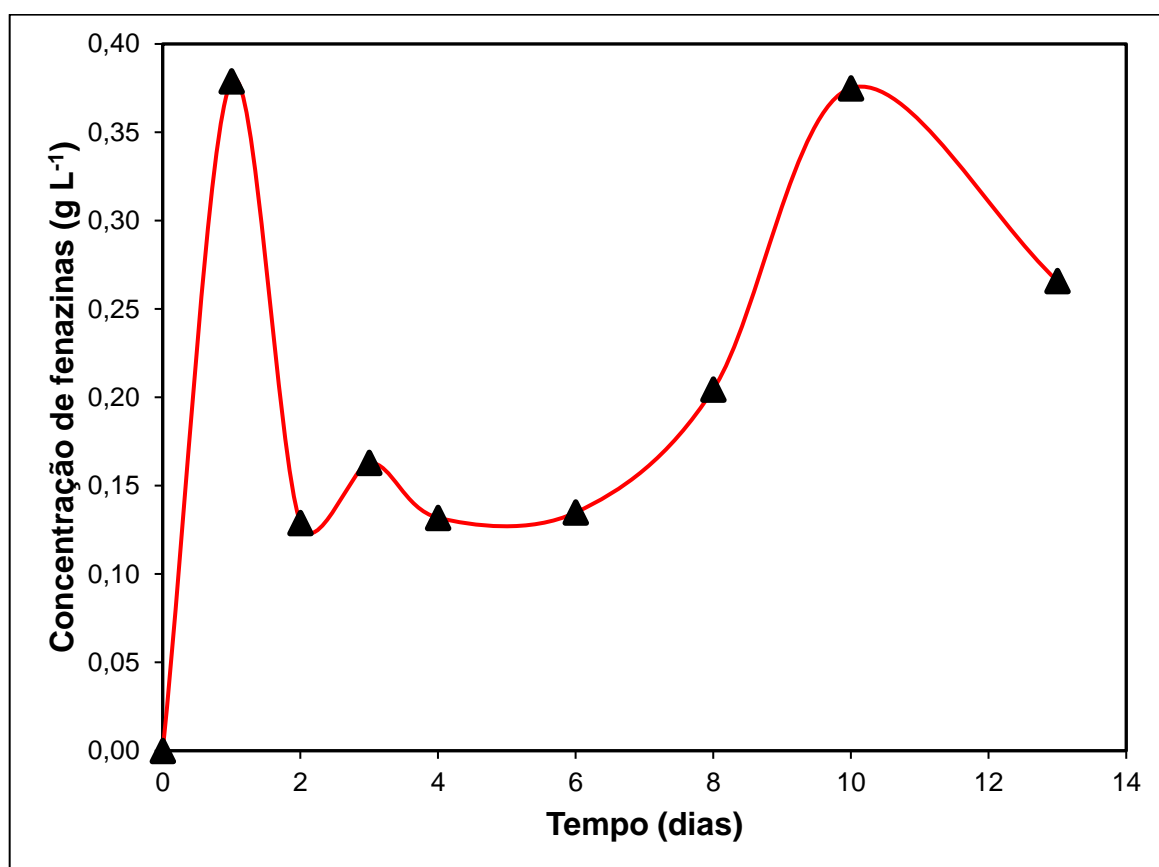


Dessa forma, foi determinado que o 13º dia é melhor para produção de fenazinas por evidenciar síntese de diferentes moléculas desta classe, tanto as solúveis em clorofórmio quanto as solúveis em água.

A cinética de produção de fenazinas por *P. aeruginosa* em cultivos submersos pôde ser avaliada a partir de ensaios de gravimetria da fração orgânica (Figura 18). Como observado, a produção de fenazinas apresenta comportamento oscilatório com relação ao tempo de cultivo. Foi constatado que no 1º dia houve grande produção de moléculas fenazínicas, entretanto a concentração diminuiu após este dia. A partir do 8º dia a produção aumentou, atingindo sua maior concentração

no 10^o dia. Este comportamento pode ser explicado devido a formação de diferentes tipos de fenazinas, uma vez que é conhecido a inter conversão entre os tipos de fenazinas. Neste sentido, a diminuição da concentração no 13^o dia pode sustentar o fato de que houve maior produção do pigmento vermelho (presente na fase aquosa), já discutido anteriormente, que pode ter ocorrido devido a conversão de seu precursor.

Figura 18 - Cinética de produção de pigmentos fenazínicos da fração orgânica por cultivos submersos de *P. aeruginosa*.



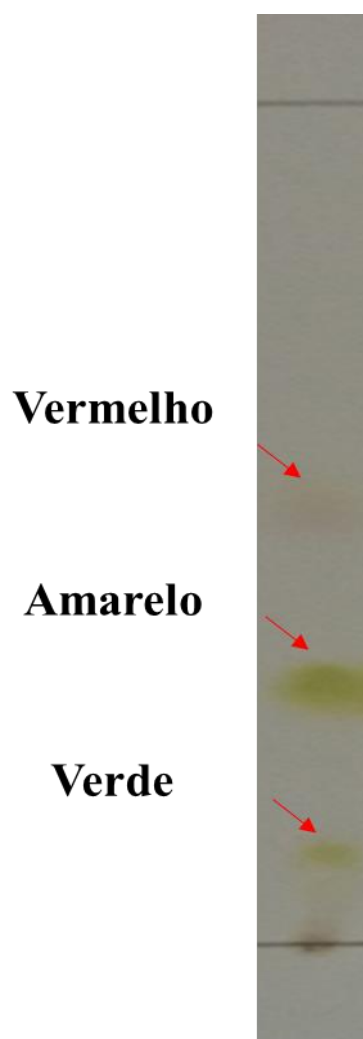
Entretanto, é importante salientar que estes dados tenham sido influenciados pela produção de ramnolipídeos, os quais também são metabólitos secundários produzidos por *P.aeruginosa*. Apesar do método de extração para estas moléculas ser diferente é possível que porções de ramnolipídeos tenham sido coextraídas por se tratarem de moléculas com caráter anfipático. Sendo assim, é necessário realizar ainda uma curva de produção de ramnolipídeos extraídos por este método a fim de estabelecer de forma segura a produção dos pigmentos fenazínicos.

5.2 PURIFICAÇÃO DE FENAZINAS PRODUZIDAS POR CEPA TRANSFORMADA COM PLASMÍDEOS DE FUSÃO LACZ

Neste tópico serão descritos os processos preliminares de purificação de fenazinas produzidas por PAO1 transformada com os plasmídeos *rhlI*, *pqsA*- e *rhlA*-LacZ, em meio de sais adicionado de glicerol 3%. Os sobrenadantes dos cultivos interrompidos em diferentes tempos (24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h) foram agrupados e extraídos duas vezes com clorofórmio, o extrato bruto orgânico obtido foi submetido a dois processos de purificação, sendo extração em fase sólida (item 5.2.1) e cromatografia *flash* (item 5.2.2). A escolha pelo extrato proveniente dos cultivos da linhagem transformada foi baseada na coloração verde mais intensa dos cultivos, quando comparados à linhagem selvagem.

O extrato bruto proveniente da fase orgânica foi analisado previamente por CCD analítica (Figura 19). O resultado desta separação permitiu a visualização de três compostos de diferentes pigmentações, possivelmente fenazinas, apresentando os valores de Rf contidos na Tabela 3.

Figura 19 - CCD analítica do extrato bruto orgânico do cultivo submerso de *P. aeruginosa* PAO1 transformada com plasmídeos de fusão LacZ, em meio de sais adicionado de glicerol 3%.



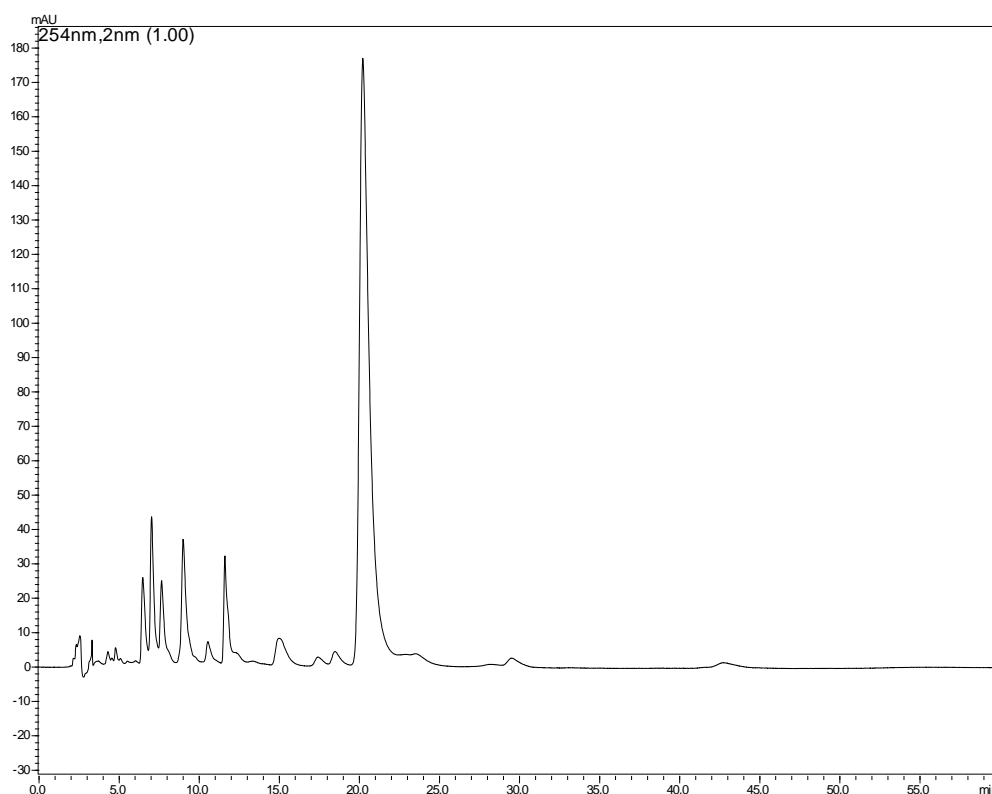
Foi aplicado 1 μL da amostra dissolvida em CHCl_3 , utilizando a fase móvel $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 1%. O revelador empregado consistiu na mistura $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{SO}_4$ 10%.

Tabela 3 - Valores dos fatores de retenção (R_f) encontrado para três possíveis fenazinas

Substância	Valor de R_f
Verde	0,25
Amarelo	0,47
Vermelho	0,64

Na investigação do extrato por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), como pode ser observado na Figura 20, apresenta diversos picos cromatográficos. Em valor absoluto de área, o pico em 21 min possui maior concentração, e comparado com resultados de CCD analítica (Figura 19), aponta na direção do composto de coloração amarela.

Figura 20 - Cromatograma obtido por CLAE do extrato bruto orgânico do cultivo submerso de PAO1 transformada com plasmídeos de fusão LacZ, em meio de sais adicionado de glicerol 3%.



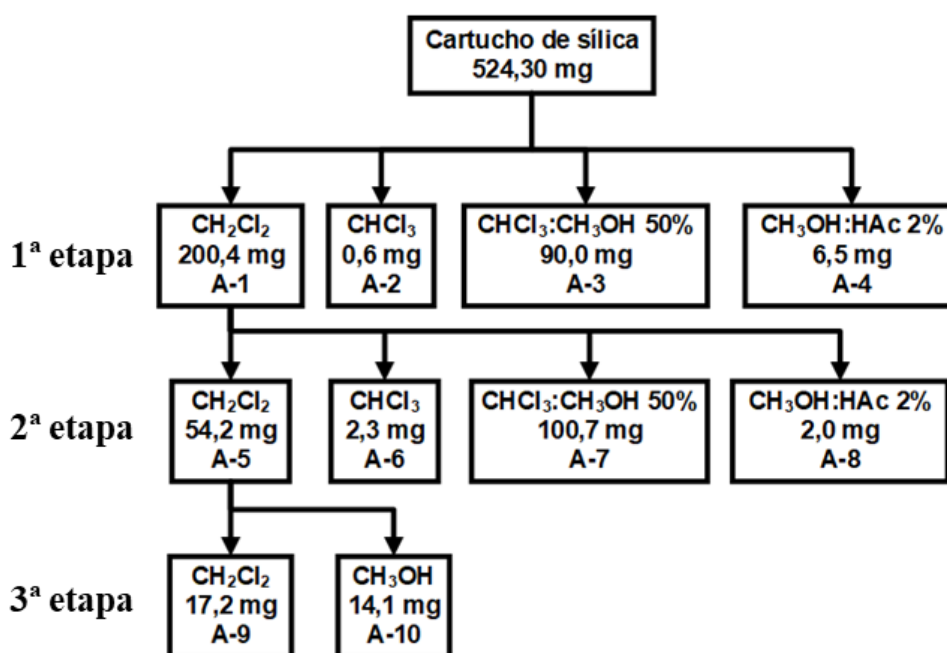
Fase móvel acetonitrila:ácido fórmico 0,10% (30:70), vazão 1,00 mL min⁻¹; tempo de corrida 60 min, coluna – Phenomenex Luna C18 (5 µm; 4,6 × 250 mm), comprimento de onda de 254 nm.

5.2.1 Extração em Fase Sólida

O extrato obtido no item 5.2. foi submetido a uma sequência de processos de extração em fase sólida utilizando cartucho de sílica. O fluxograma do processo de purificação está apresentado na Figura 21. Na primeira etapa do processo foram obtidas 4 frações (A-1, A-2, A-3 e A-4), as quais foram analisadas por CCD (Figura 21). Na figura 21-A é possível observar que houve purificação

parcial da fração A-1 em relação ao extrato bruto, exceto pelos componentes de maior polaridade na região do ponto de aplicação. No entanto, como é visto na figura 22-A, parte destes componentes polares estão presente em maior concentração em A-3.

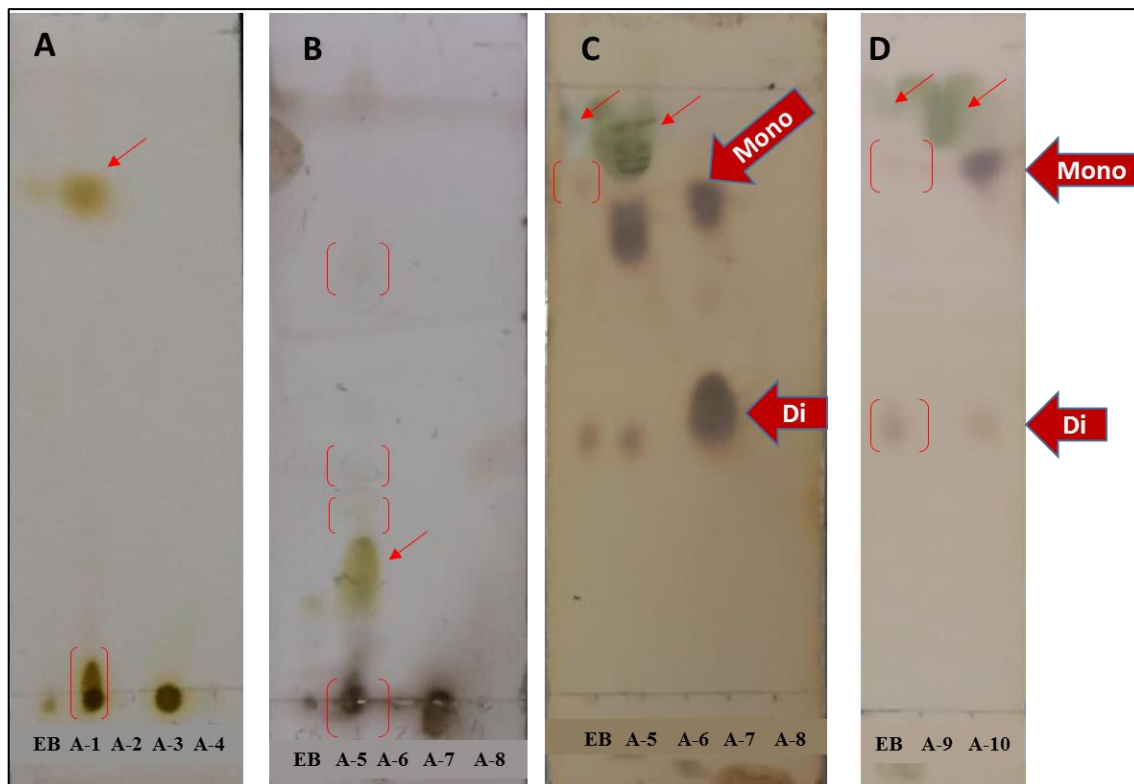
Figura 21 - Fluxograma do processo de purificação do extrato bruto orgânico do cultivo submerso de PAO1 transformada com plasmídeos de fusão LacZ, em meio de saís adicionado de glicerol 3% por extração em fase sólida.



O fluxograma mostra o solvente utilizado em cada etapa, a massa obtida para cada fração e a sequência de cada passo.

A fim de melhorar a purificação do composto amarelo (fração A-1) foi realizada mais uma etapa de eluição com a mesma sequência de solventes utilizados na primeira etapa. As frações desta etapa foram analisadas por CCD analítica utilizando CHCl_3 como fase móvel (Figura 22-B), sendo possível observar que o composto amarelo teve pureza maior (indicado pela seta), mas ainda existem alguns contaminantes na amostra (indicadas pelos colchetes). Foi feita CCD destas amostras purificadas na segunda etapa utilizando fase móvel mais polar ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 20%) e reveladas com orcinol, revelador específico para glicolipídeos, sendo constatada a presença de mono e di-ramnolipídeos nas frações A-5 e A-7 (Figura 22-C).

Figura 22 - CCD analítica para cada etapa de purificação do extrato bruto orgânico do cultivo submerso da PAO1 transformada com plasmídeos de fusão LacZ por extração em fase sólida.



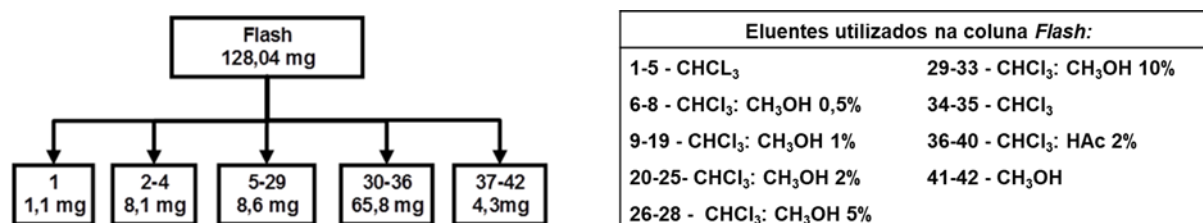
(A) CCD da 1^o etapa de purificação, utilizando a mistura $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 3% como fase móvel e revelação com $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{SO}_4$ 10% seguida de aquecimento. (B) Purificação da fração A-1 (2^o etapa), utilizando CHCl_3 como fase móvel e revelação com $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{SO}_4$ 10% seguida de aquecimento. (C) Purificação da fração A-1 (2^o etapa), utilizando a mistura $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 20% como fase móvel e revelação com orcinol, seguida de aquecimento. (D) Purificação da sub-fração A-5 (3^o etapa), utilizando a mistura $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 20% como fase móvel e revelação com orcinol, seguida de aquecimento.

Assim, a fração A-5 passou por mais um passo de purificação com solventes de polaridades distintas (CH_2Cl_2 e CH_3OH) com o intuito de separar estes compostos. O resultado da CCD analítica para as frações A-9 e A-10 (Figura 22-D), mostrou que foi possível obter o pigmento amarelo (A-9) mais puro, separando-o dos ramnolipídeos (A-10).

5.2.2 Cromatografia *Flash*

A fim de avaliar métodos de purificação, a separação dos componentes do extrato bruto orgânico originário do cultivo submerso da cepa transformada com plasmídeos de fusão LacZ (item 5.2), foi realizada também por cromatografia *flash*. Neste método, foram utilizadas misturas com diferentes proporções de CHCl_3 e CH_3OH , para melhor separação dos compostos. Foram coletadas 42 frações, sendo agrupadas após previa avaliação por CCD analítica conforme observado na Figura 23.

Figura 23 - Fluxograma do processo de purificação do extrato bruto orgânico do cultivo submerso da cepa transformada com plasmídeos de fusão LacZ por

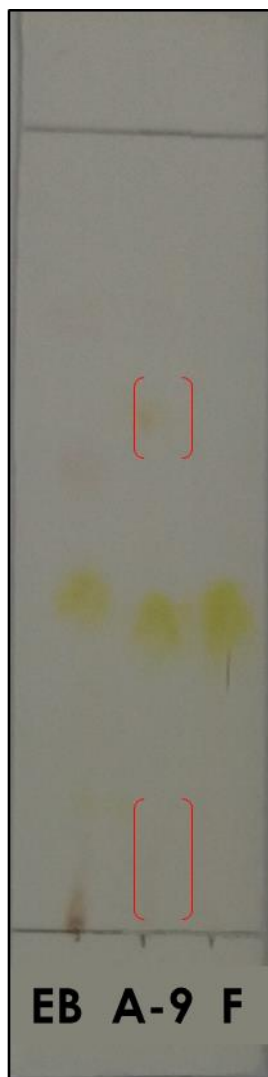


cromatografia *flash*.

Os solventes utilizados em cada fração coletada encontram-se no quadro a direita. O fluxograma consta as frações que foram reunidas por similaridade com base no resultado de CCD analítica de cada fração separadamente.

O componente de coloração amarela esteve presente nas frações 2, 3 e 4 (agrupadas posteriormente). Comparado as duas técnicas de purificação, fase sólida em cartucho e cromatografia *flash*, é possível verificar que ambas exibiram similaridade de resultados de purificação do composto amarelo, isso pode ser observado Figura 24.

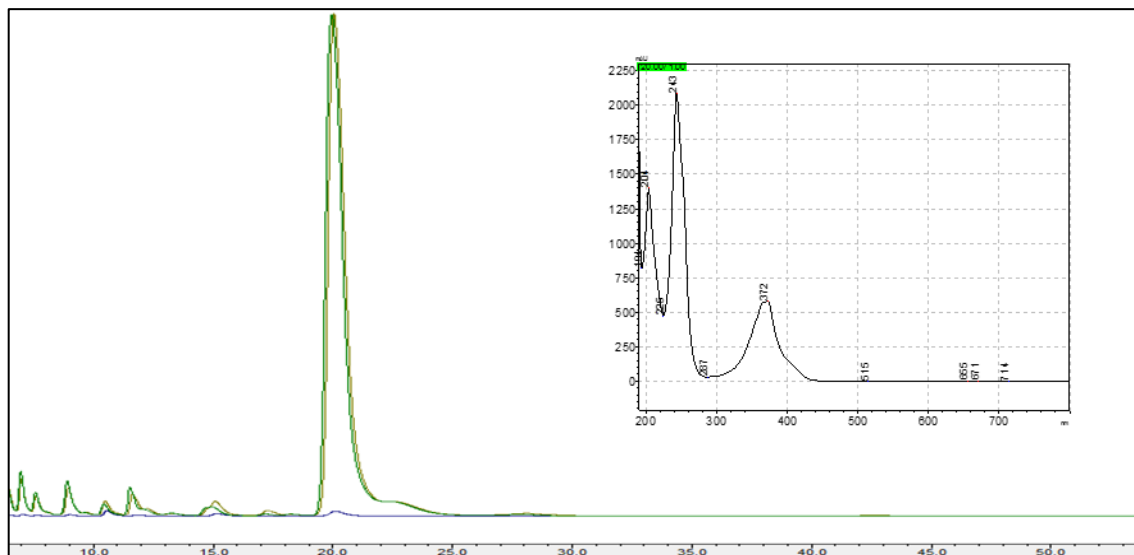
Figura 24 - CCD analítica para o pigmento amarelo purificado por extração em fase sólida (A-9) e por cromatografia flash (F) em comparação com o extrato bruto (EB).



Fase móvel $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 1% e revelador $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{SO}_4$ 10%. Colchetes indicam contaminantes.

Os pigmentos obtidos por estes dois métodos (A-9 e F) também foram analisados e comparados por CLAE, em comprimento de onda de 254 nm. O cromatograma apresentado na Figura 25 revelou a presença do pigmento amarelo em iguais proporções, nas separações por cartucho de sílica e coluna *flash*. Tal resultado indica que ambos os métodos foram eficazes na obtenção do pigmento. A partir da investigação destes métodos foi possível constatar que é mais viável utilizar a cromatografia *flash*, por ser um método simples, rápido, com maior rendimento e possibilita a purificação de maiores quantidades de extrato.

Figura 25 - Cromatograma para comparação das amostras purificadas do pigmento amarelo obtido do cultivo submerso da cepa transformada com plasmídeos de fusão LacZ por extração em fase sólida (em amarelo) e por cromatografia flash (em verde).



Fase móvel acetonitrila:ácido fórmico 0,10% (30:70), vazão 1,00 mL min⁻¹, tempo de corrida 60 min, coluna Phenomenex Luna C18 (5 µm; 4,6 × 250 mm), comprimento de onda de 254 nm.

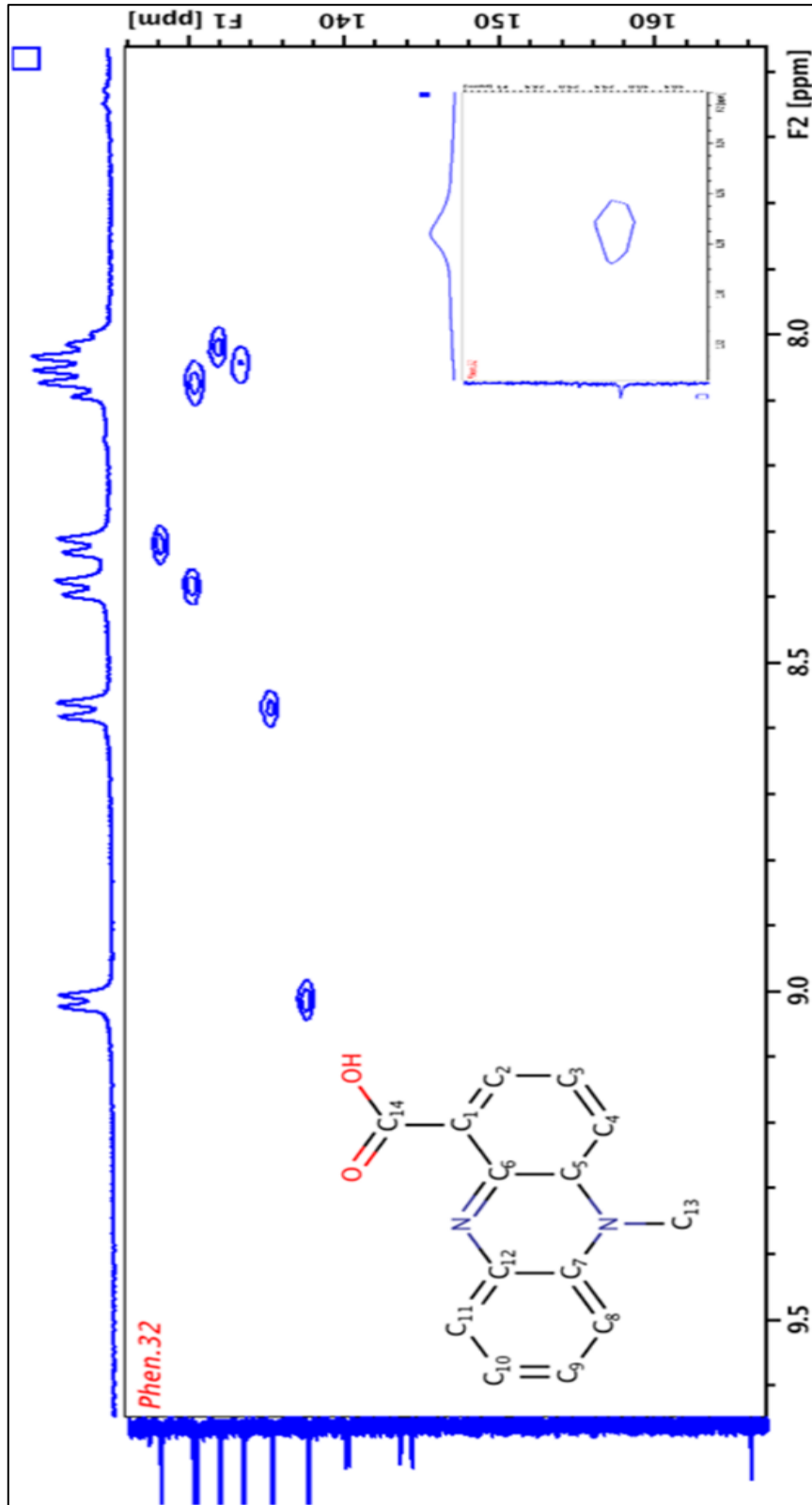
5.2.3 Identificação do Pigmento Fenazínico

A estrutura da fenazina foi identificada por dados de RMN de ¹H e ¹³C uni e bidimensional. Os valores atribuídos aos carbonos estão assinalados na Tabela 4, os dados com asteriscos são assinalamentos prováveis.

O espectro de *Heteronuclear Single Quantum Correlation* (HSQC), apresentado na Figura 26, mostra as correlações entre carbono e hidrogênio de C-2 a C-4, e de C-8 a C-11, e no inserto a direita os H do -CH₃ estão correlacionando com C-13. O sinal em 166 ppm corresponde ao C14, característico de carbonila de ácido carboxílico, com acoplamento e sinal em 9,0 ppm (H2) no espectro de *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC), que mostra correlações entre carbonos e hidrogênios considerando sua distância, independente do número de ligações que as separem. Deste modo H2 demonstra estar acoplado aos sinais em 140 (C1, sem hidrogênio, portanto não aparece no HSQC) e 135 ppm (C4). Estes dados foram refinados com 1H-1H COSY (*Correlation Spectroscopy*), demonstrando o acoplamento sequencial C2, C3 e C4.

Tabela 4 - Dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C de fenazina substituída.

	Núcleo	^1H	^{13}C
1			140
2		9,0	137
3		8,0	130
4		8,5	135
5			143*
6			144*
7			139*
8		8,3	130
9		8,0	131
10		8,0	133
11		8,3	128
12			124*
13	CH ₃	1,2	29
14	COOH	-	165

Figura 26 - Espectro de ressonância nuclear magnética bidimensional ^1H , ^{13}C .

O composto purificado foi identificado como ácido 5-metilfenazina-1-carboxílico (5-Me-PCA). Este metabólito, pertencente à classe de fenazinas, é o precursor biossintético da piocianina (MAVRODI *et al.*, 2001) bem como das aeruginosinas (HANSFORD; HOLLIMAN; HERBERT, 1972).

Recentemente, KENNEDY *et al.* (2015) isolaram 5-Me-PCA de uma linhagem de *Pseudomonas putida*, sendo constatado que o mesmo apresentou propriedades antimicrobianas contra leveduras patogênicas como *Candida albicans* e citotóxicas para células cancerígenas de pulmão e mama. Além disso, mediadores da inflamação, como NF- κ B e óxido nítrico, foram reduzidos nas células tratadas com 5-Me-PCA.

Neste sentido, essa molécula demonstra um grande potencial de aplicação devido às suas atividades antibiótica, anti-inflamatória e antitumoral.

5.3 PURIFICAÇÃO DAS FENAZINAS PRODUZIDAS EM MEIO DE SAIS SUPLEMENTADO COM CASEINATO DE SÓDIO 1%

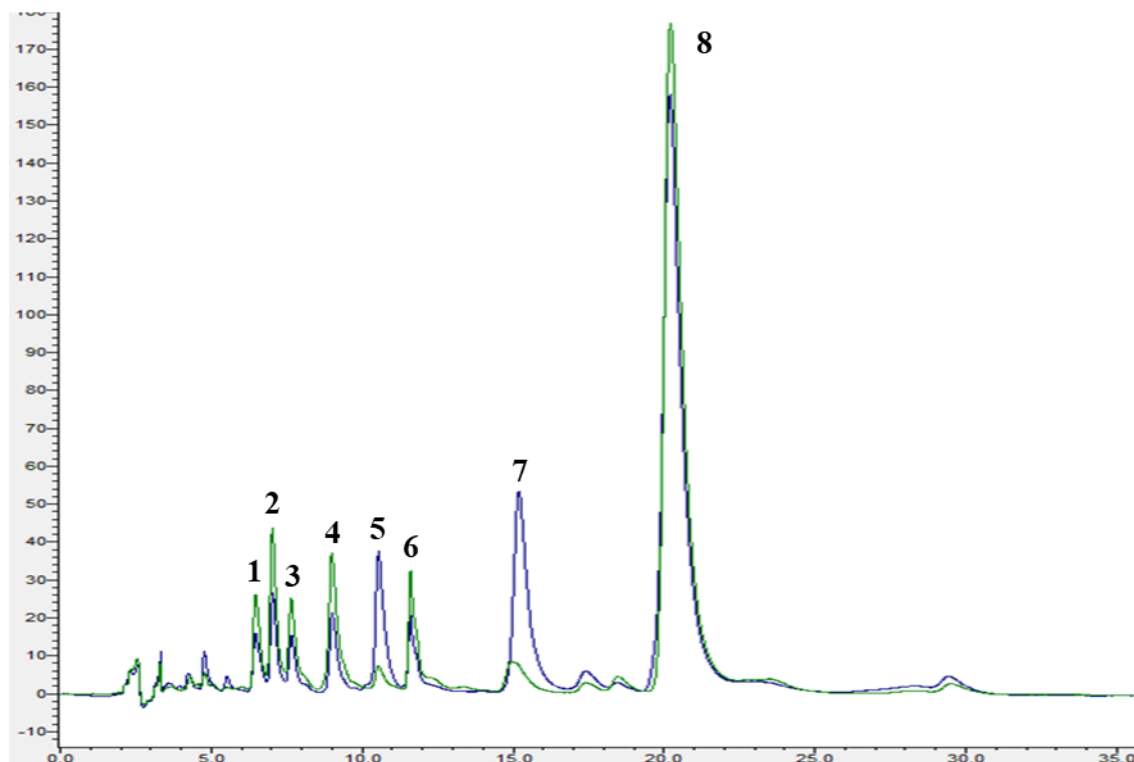
Neste item serão descritos os métodos de purificação empregados para os extratos brutos orgânico e aquoso advindos dos cultivos suplementados com caseinato de sódio 1%.

5.3.1 Purificação das Fenazinas Provenientes da Fase Orgânica

Devido ao resultado dos testes preliminares de purificação do extrato orgânico, descritos no item 5.2, foram realizados novos testes de purificação a fim de obter a molécula 5-Me-PCA com maior pureza. Sendo assim, o extrato bruto do cultivo em questão foi submetido à análise por CLAE para avaliar a produção deste composto em meio de sais suplementado com caseinato de sódio em relação ao cultivo sem caseinato.

O cromatograma a seguir apresenta uma comparação entre os extratos brutos provenientes dos cultivos sem caseinato (verde) e com caseinato (azul), mostrando perfis cromatográficos em 254 nm muito semelhantes (Figura 27) e sugerindo produção dos mesmos metabólitos.

Figura 27 - Comparação dos cromatogramas obtidos por CLAE do extrato bruto do cultivo submerso da cepa transformada com plasmídeos de fusão LacZ (em verde) e do extrato bruto do cultivo em meio de sais suplementado com caseinato de sódio 1% (em azul).



Fase móvel acetonitrila:ácido fórmico 0,10% (30:70), vazão 1,00 mL min⁻¹, tempo de corrida 60 min, coluna Phenomenex Luna C18 (5 µm; 4,6 × 250 mm), comprimento de onda de 254 nm.

Apesar de ocorrer produção dos mesmos compostos é notável que há diferença entre a altura dos picos dos cromatogramas sobrepostos. Como pode ser observado há variações de picos maiores e menores entre os cultivos. Em relação ao pico de destaque (8), referente à 5-Me-PCA, foi constatado que a produção do composto foi maior para o cultivo sem caseinato (verde) enquanto que para os picos 5 e 7 a produção foi maior para os cultivos suplementados com a caseína. Deve-se ressaltar que o cultivo não-suplementado apresentou variáveis bem distintas em relação ao que continha a proteína, apresentando diferentes tempos de cultivo, o emprego de PAO1 transformada com plasmídeos *rhlI*-, *pqsA*- e *rhlA*-LacZ e ativação em meio contendo antibiótico (carbenicilina). Dessa forma, é

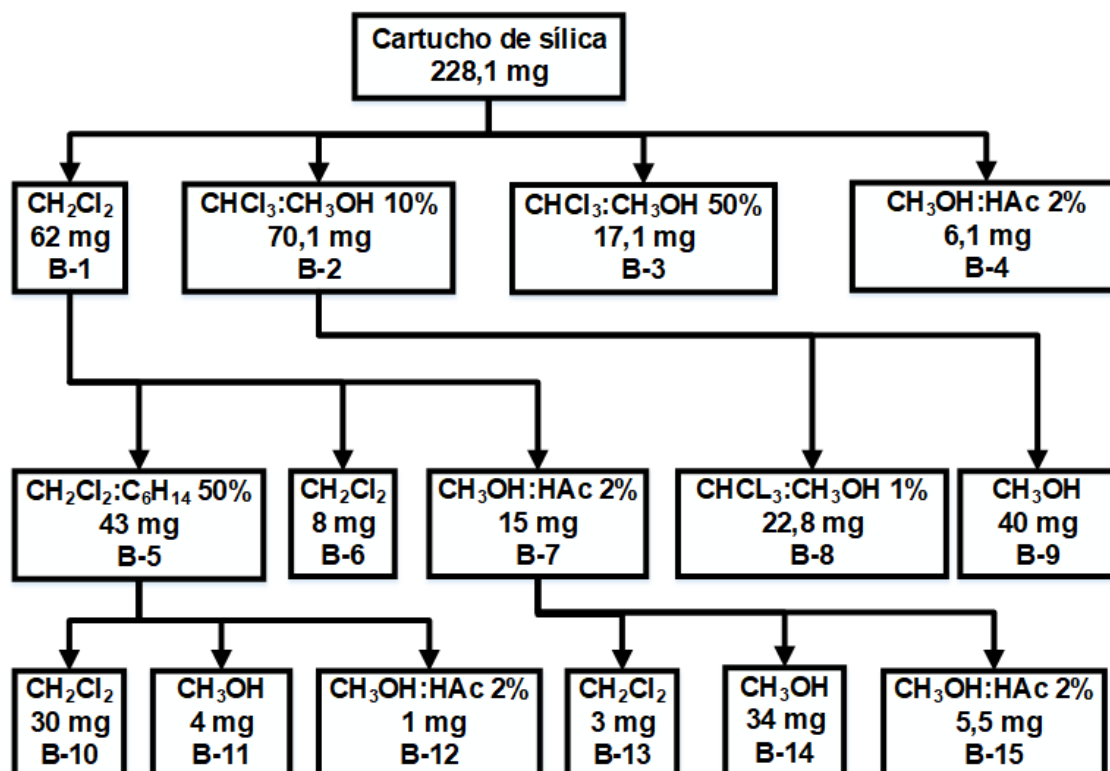
difícil justificar qual desses fatores, ou a combinação deles, acabou acarretando em maior produção do composto principal produzido pela bactéria mutante.

Dessa forma, foram avaliadas duas maneiras de purificação de 5-Me-PCA produzido em meio contendo caseinato: extração em fase sólida e extração em fase sólida seguida de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).

5.3.1.1 Extração em fase sólida

Com base na extração em fase sólida do item 5.2.1, optou-se pelo uso de diclorometano para obtenção do composto de interesse. Seguindo este raciocínio e sabendo que o composto em questão provinha da primeira fração eluída com este solvente foi feito um novo processo de purificação por extração em fase sólida (Figura 28) utilizando apenas diclorometano para separação das sub-frações de interesse. Ao final deste processo, obteve-se novamente o pigmento amarelo (B-10).

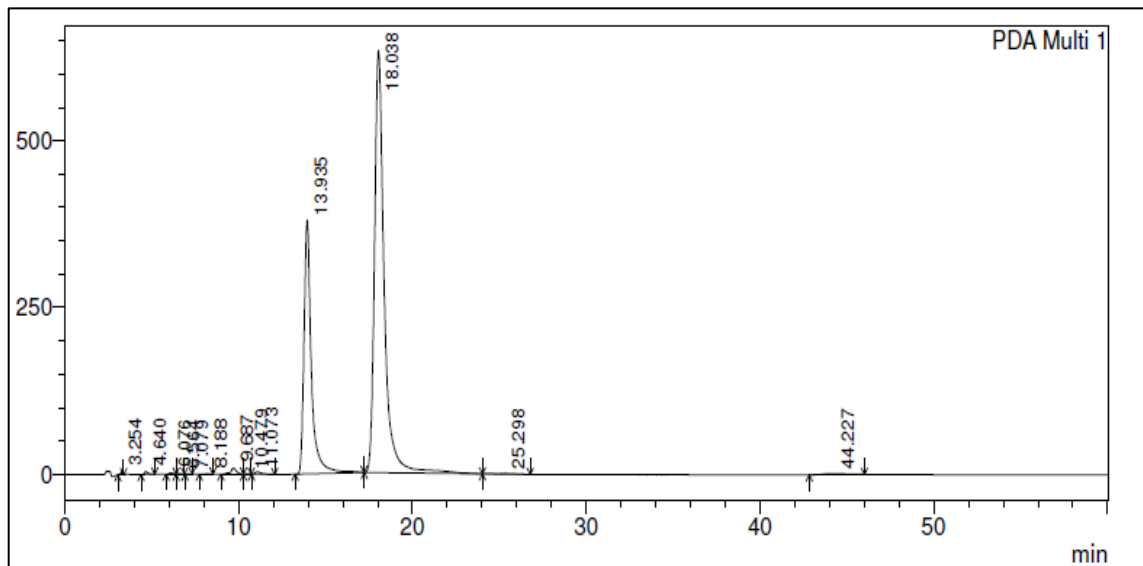
Figura 28 - Fluxograma do processo de purificação por extração em fase sólida do extrato produzido em meio de sais suplementado com caseinato de sódio 1%.



O fluxograma mostra o solvente utilizado em cada etapa, a massa obtida para cada fração e a sequência de cada passo.

O pigmento purificado (B-10) foi submetido à análise por CLAE nas mesmas condições realizadas no item 4.5.2, e de acordo com o cromatograma da Figura 29, foi constatado que este realmente refere-se ao pico correspondente à molécula de interesse, com tempo de retenção de 18,04 minutos.

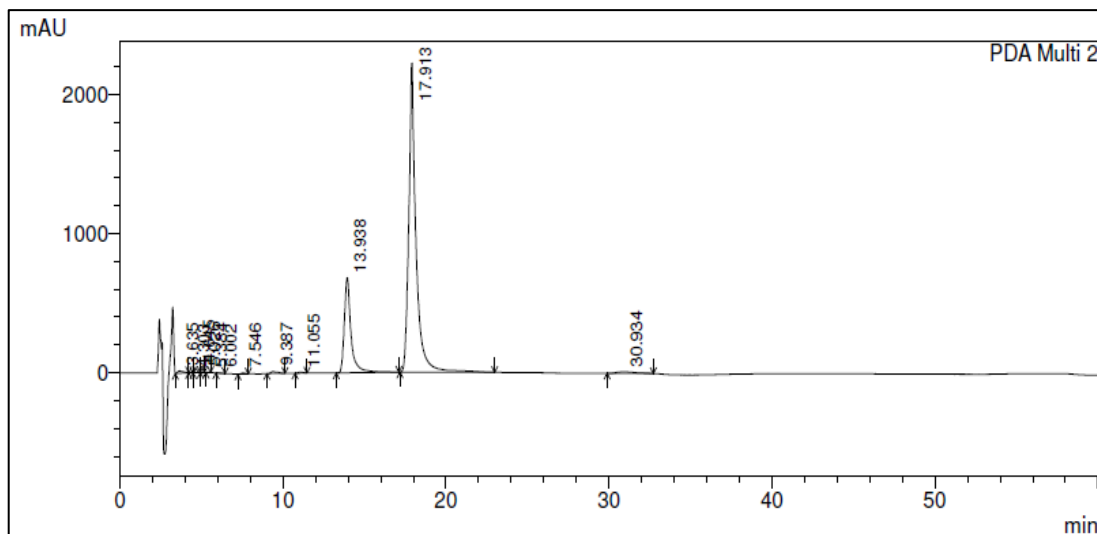
Figura 29 - Cromatograma obtido por CLAE para a amostra purificada do pigmento amarelo (B-10) produzido por PAO1 em meio de sais suplementado com caseinato de sódio 1%.



Fase móvel acetonitrila:ácido fórmico 0,10% (30:70), vazão 1,00 mL min⁻¹, tempo de corrida 60 min, coluna Phenomenex Luna C18 (5 µm; 4,6 × 250 mm), comprimento de onda de 254 nm.

Foi possível realizar a determinação qualitativa deste pigmento purificado pela análise do tempo de retenção em um comprimento de onda de 202 nm. Assim, as informações fornecidas pelo cromatograma em 202 nm (Figura 29) revelaram um tempo de retenção de 17,9 min para o pico referente a este pigmento, com uma porcentagem em área de 75,6%.

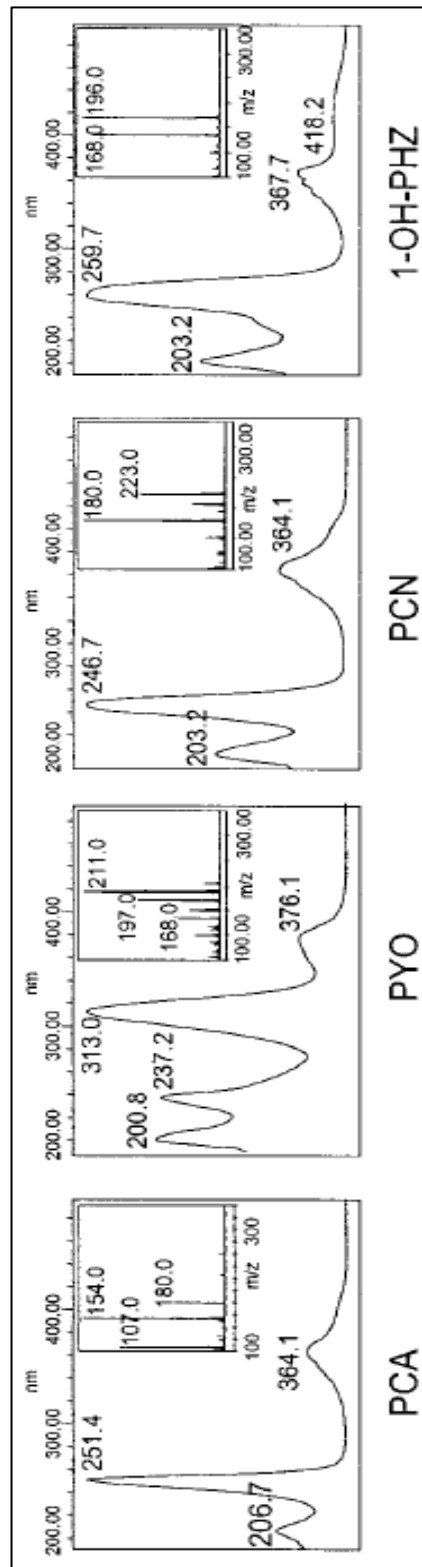
Figura 30 - Cromatograma para a amostra purificada do pigmento amarelo obtido por CLAE em comprimento de onda de 202 nm.



Fase móvel acetonitrila:ácido fórmico 0,10% (30:70), vazão 1,00 mL min⁻¹, tempo de corrida 60 min, coluna Phenomenex Luna C18 (5 µm; 4,6 × 250 mm).

O comprimento de onda foi escolhido com base no trabalho de Mavrodi *et al.* (2001), que utilizaram CLAE para separação de fenazinas produzidas por *P. aeruginosa* PAO1. Analisando os espectros de UV e massas das diferentes substâncias fenazínicas obtidas por estes autores (Figura 31), o comprimento de onda 202 nm aparenta ser mais adequado para avaliação quantitativa em termos relativos. Considerando que PCA, PYO, PCN e 1-OH-PHZ possuem em comum picos de absorção entre 200 a 206 nm.

Figura 31 - Espectro de UV e massas das fenazinas PCA, PYO, PCN e 1-OH-PHZ, produzidas por *P. aeruginosa* PAO1.

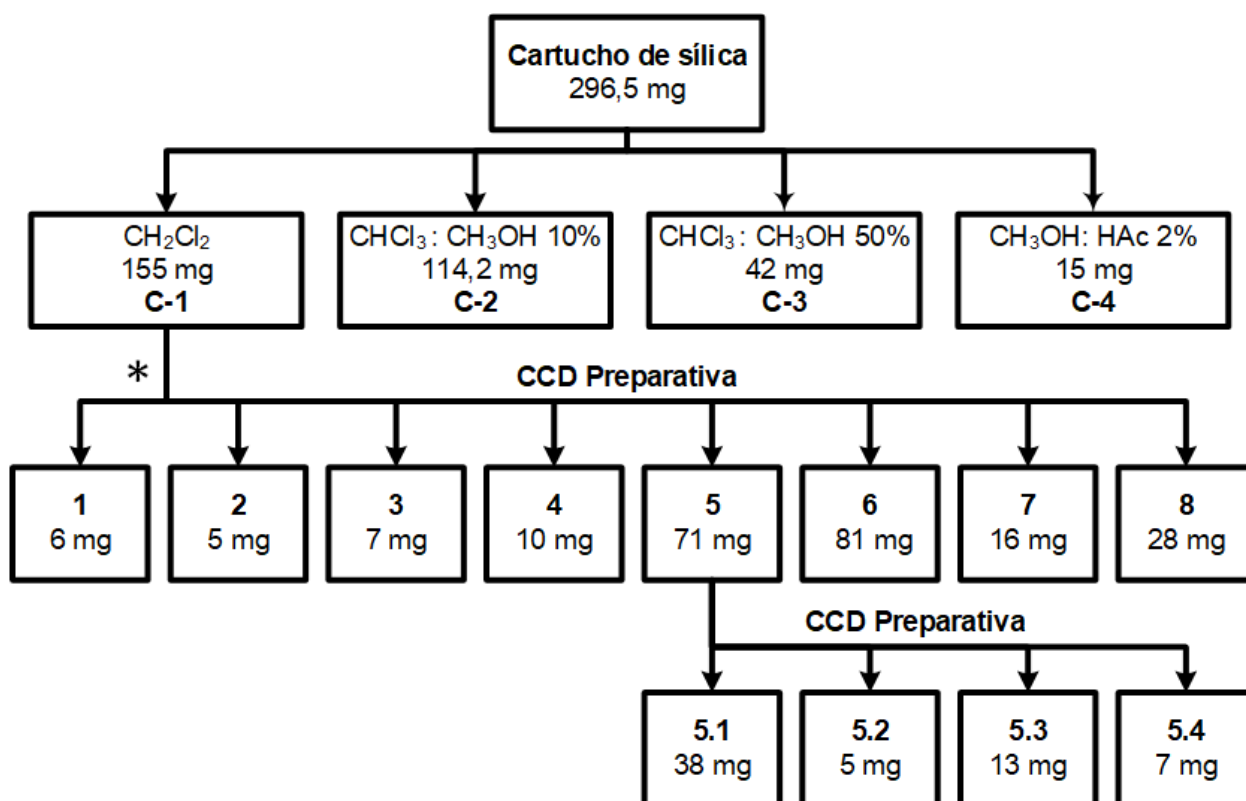


Fonte: Mavrodi *et al.* (2001).

5.3.1.2 Extração em fase sólida seguida de CCD preparativa

A primeira fração deste processo separou um pigmento amarelo (C-1), que foi submetido à CCD preparativa. O fluxograma deste processo de purificação encontra-se na Figura 32.

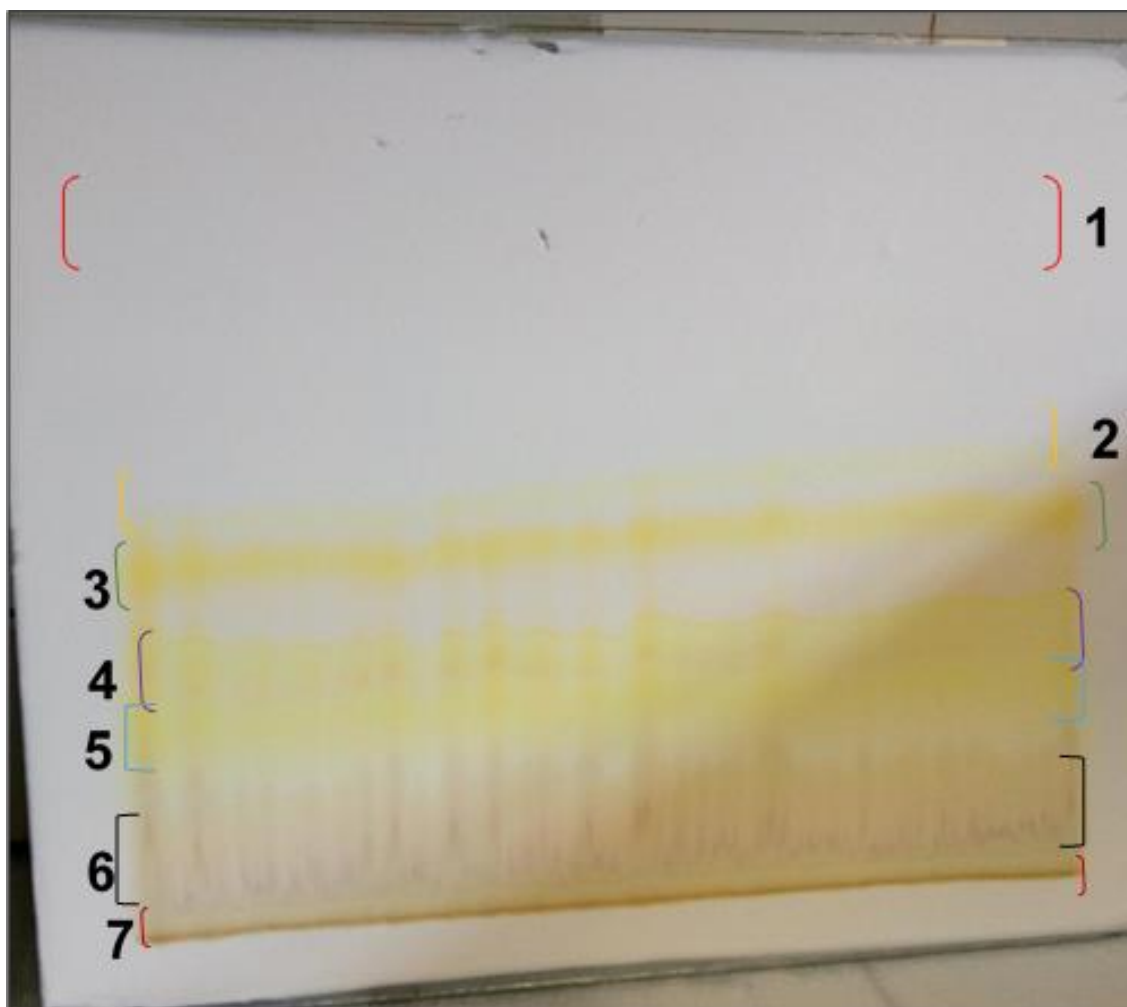
Figura 32 - Fluxograma do processo de purificação do extrato obtido do cultivo suplementado com caseinato de sódio 1% por extração em fase sólida e CCD preparativa.



O fluxograma mostra o solvente utilizado em cada etapa, a massa obtida para cada fração e a sequência de cada passo. * Massa utilizada de 111,3 mg.

A Figura 33 apresenta o resultado para a CCD preparativa, foram obtidas seis bandas de pigmentos. Cada banda, removida e extraída por filtração, foi analisada por CCD analítica a fim de identificar a molécula 5-Me-PCA.

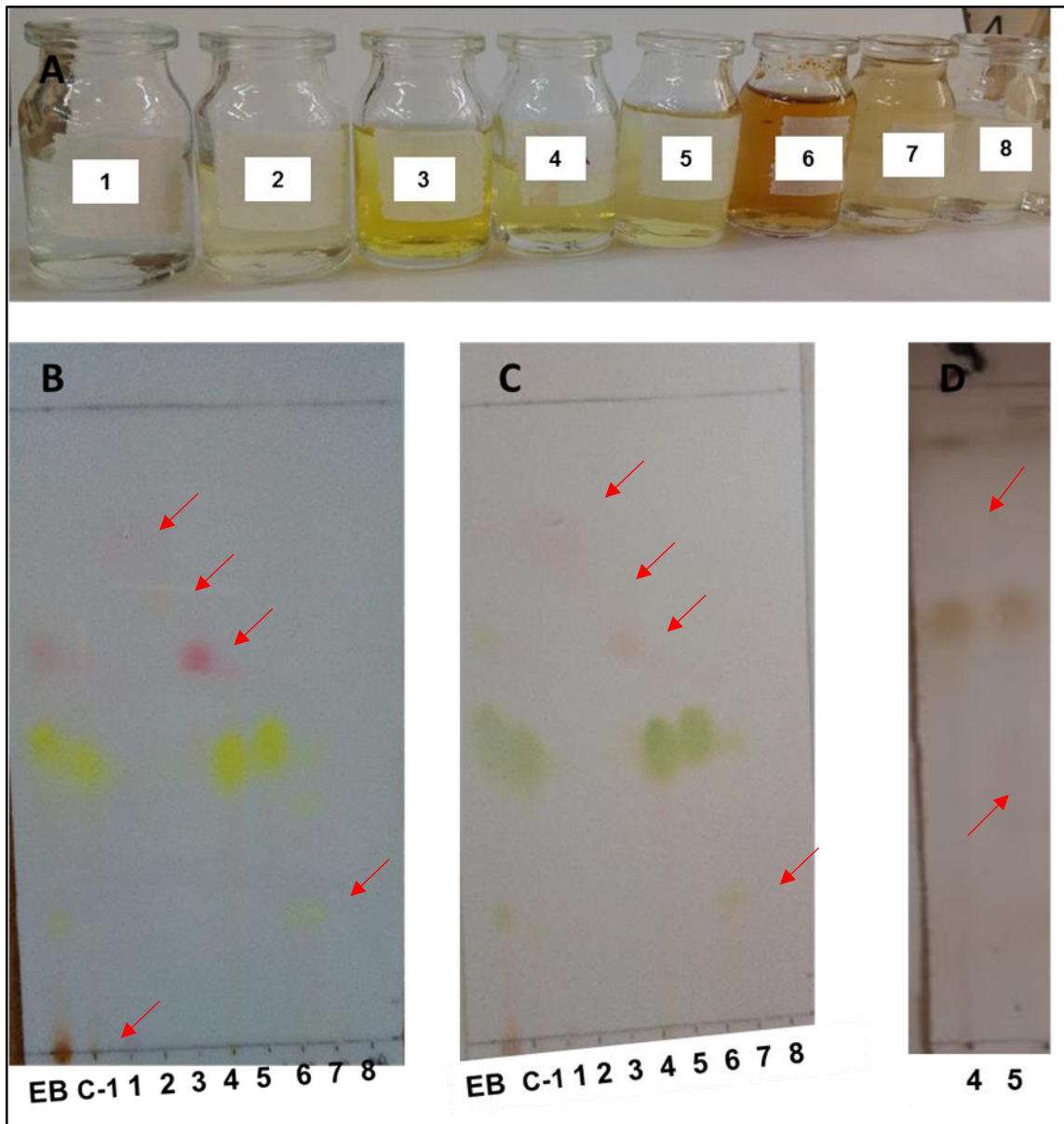
Figura 33 - Resultado da CCD preparativa da fração C-1.



Fase móvel $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 1%. Colchetes indicam seis bandas distintas, que foram removidas e extraídas separadamente para remoção da sílica.

A Figura 33-A ilustra a recuperação das separações obtidas por CCD preparativa. A coloração amarela nas frações 3, 4 e 5 (Figura 34-A), apontam na direção do composto de interesse, para validar esta hipótese realizou-se CCD analítica para todas as frações coletadas.

Figura 34 - Recuperação e CCD analítica das frações obtidas por CCD preparativa.



(A) Coloração de cada fração recuperada da CCDP por filtração com a mistura $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}$ 50% (frações 1-6) e com CH_3OH (frações 7 e 8). Os frascos de 1 a 6 referem-se às diferentes bandas que migraram pela fase estacionária, 7 abrange o que ainda se encontrava no ponto de aplicação e 8 é referente ao restante da placa. (B) CCD analítica de cada fração após revelação com $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{SO}_4$ 10%, incluindo o extrato bruto (EB) e C-1 para comparação. (C) Mesma CCD apresentada na letra B, mas com pouco tempo de aquecimento. (D) CCD para comparação das frações 4 e 5, após aquecimento.

O resultado encontra-se nas Figuras 34-B (sem aquecimento) e 34-C (com aquecimento), sendo possível constatar que o pigmento estava presente nas frações 4 e 5 e já se apresentava mais puro em comparação com C-1, embora ainda apresente algumas impurezas. Assim foi realizada mais uma CCD para analisar

estas duas frações (34-D), sendo observado que a fração 5 apresentou uma mancha maior (seta vermelha) em relação a fração 4 (seta vermelha).

O resultado da CCD preparativa mostrou-se interessante, sendo identificado na 1ª fração um composto de cor azul, que foi separado em dois compostos com diferentes valores de Rf, sendo um de cor azul, que permaneceu no ponto de aplicação, enquanto que o outro se apresentou vermelho, com um Rf de 0,89.

A 2ª fração apresentou um composto de cor laranja e valor de Rf de 0,71, já a 3ª contém um pigmento vermelho com Rf de 0,64, ambos parecendo estar relativamente puros. Ainda faltam dados para identificação destes compostos.

Foi decidido fazer mais um passo de CCD preparativa com a fração 5, uma vez que a massa era maior e a possibilidade de ter um composto mais purificado era significativa. A CCD preparativa desta fração, mostrada na Figura 35, apresentou uma zona amarela visível (5.1), contendo o composto de interesse e uma segunda região de cor mais clara (5.2).

Figura 35 - CCD preparativa da quinta sub-fração.



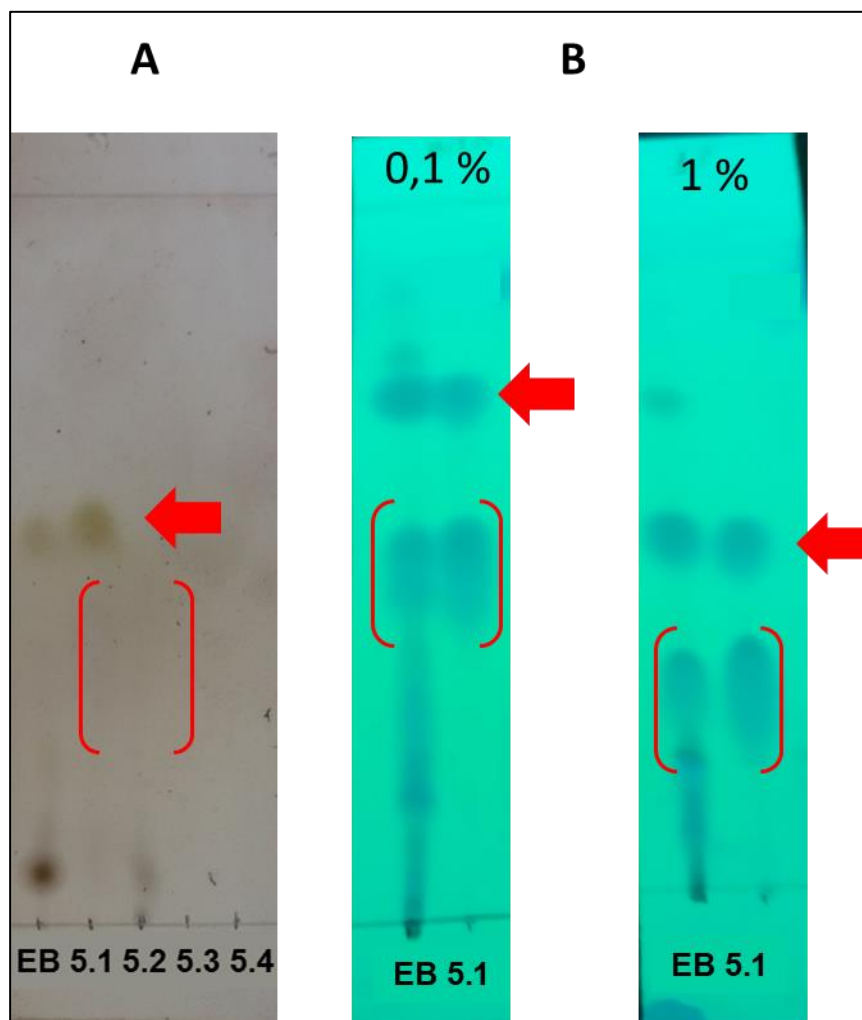
Fase móvel $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 1%. Colchetes indicam duas bandas com cores distintas (5.1 e 5.2) que foram removidas e extraídas separadamente para remoção da sílica. 5.3 é referente ao ponto de aplicação.

Entretanto, a CCD analítica do resultado da CCDP (Figura 36-A) ainda revelou a presença da banda contaminante na amostra 5.1 (seta). A princípio suspeitou-se que esta banda poderia ser 5-Me-PCA na sua forma não-protonada (mais polar) e que por este motivo havia obtido R_f menor.

Ao acidificar a fase móvel com ácido acético 0,1% e 1% (Figura 36-B), foi constatado que as duas manchas presentes na amostra 5.1 são moléculas distintas. As CCDs da Figura 36-B permitiram, inclusive, perceber que a fase móvel contendo proporção de 0,1% de ácido acético seria mais adequada para possível separação por CCDP. Sendo assim, as duas substâncias podem ser separadas por CCDP utilizando luz UV para revelar as regiões e facilitar a delimitação das áreas.

Porém, é mais conveniente realizar este processo ao obter maior massa do composto.

Figura 36 - CCD analítica de cada fração obtida após CCDP.



(A) Após revelação com $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{SO}_4$ 10% seguida de aquecimento da placa, contendo o extrato bruto (EB) e as frações 5.1, 5.2, 5.3 (ponto de aplicação) e 5.4 (restante da placa). (B) CCD analítica da amostra 5.1 com a mesma fase móvel contendo diferentes proporções de ácido acético (0,1% e 1%), observada sob luz UV. Setas indicam 5-Me-PCA e colchetes contaminantes.

5.3.1.3 Rendimento dos processos de purificação empregados

Após etapas de purificação, cada fração de 5-Me-PCA purificado obtida foi analisada por CCD, sendo que as frações A-9, B-10, frações da cromatografia *flash* (2-4) e 5.1 revelaram a obtenção do composto amarelo relativamente puro. A Figura 37 mostra uma CCD comparando estes compostos entre si e com o extrato bruto, sendo possível observar que o composto purificado corresponde àquele predominante nos extratos.

Figura 37 - CCD analítica de 5-Me-PCA purificados, produzidos pelos cultivos com e sem suplementação de caseinato de sódio 1%, por todos os processos de purificação empregados.



Fase móvel $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 1% e revelador $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{SO}_4$ 10%. Incluindo A-9 (extração em fase sólida), B-10 (extração em fase sólida), F (cromatografia flash), 5.1 (extração em fase sólida e CCDP), em comparação com o extrato bruto (EB). Colchetes indicam contaminantes.

O resultado da CCD analítica mostrou que 5-Me-PCA purificado por cromatografia *flash* (F) e purificado por extração em fase sólida seguido de CCDP (5.1) apresentaram-se mais puros em relação aos pigmentos A-9 e B-10, os quais ainda estavam presentes alguns contaminantes. Entretanto, após revelação sob luz UV (Figura 36-B) a amostra 5.1 apresentou contaminantes não visíveis.

O rendimento empregado neste trabalho foi definido como sendo a relação entre a massa da fenazina amarela purificada presente na fase orgânica e o volume do meio de cultivo inicial. O rendimento de cada processo de obtenção deste composto encontra-se na Tabela 5.

Tabela 5 - Rendimento obtido para cada amostra de pigmento amarelo purificado pelos diferentes métodos de purificação.

Amostra	Método de purificação	Rendimento (mg L⁻¹)
A-9	Extração em fase sólida	14,46
B-10	Extração em fase sólida	18,75
<i>Flash</i> (2-4)	Cromatografia <i>Flash</i>	31,75
5.1	Extração em fase sólida e CCD Preparativa	45,96

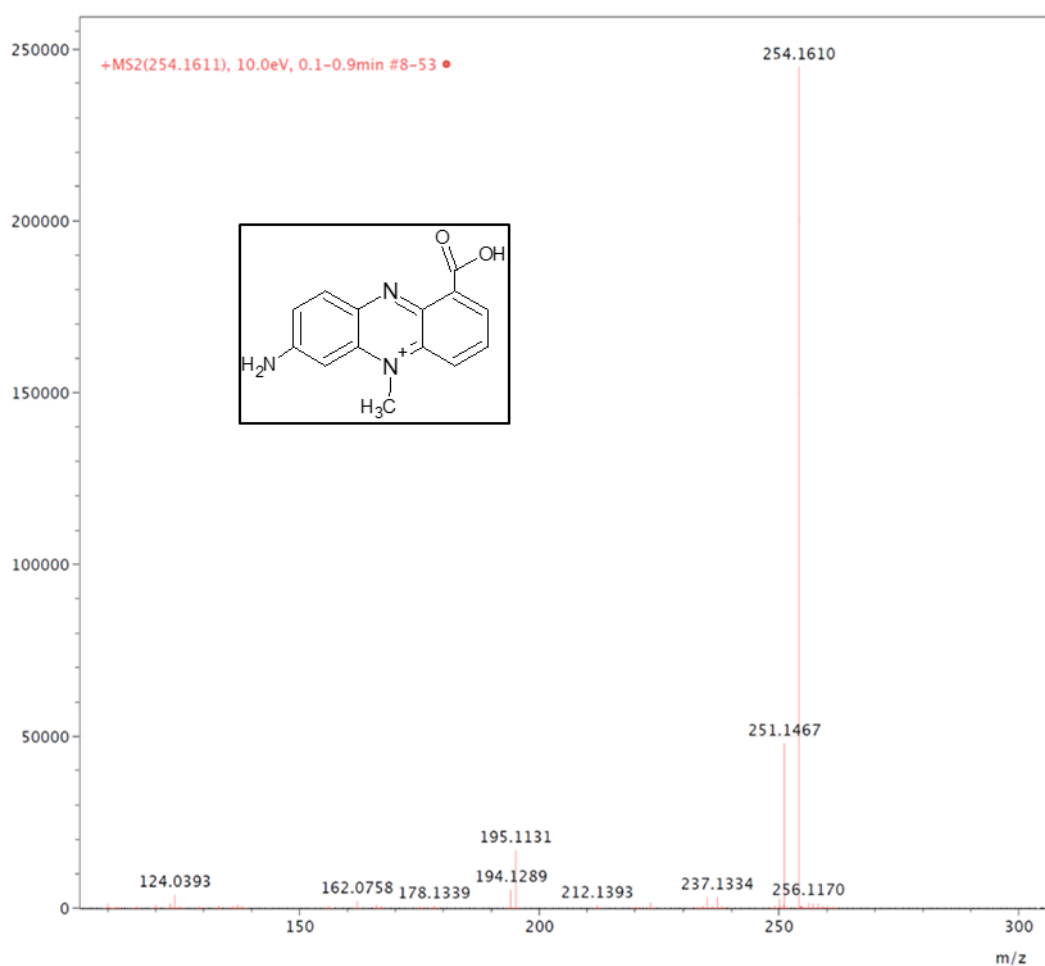
A purificação por cromatografia *flash* foi o método mais eficaz para obtenção de um composto com maior pureza, apresentando rendimento maior em relação aos métodos que utilizaram apenas de extração em fase sólida. O alto rendimento obtido pela fração 5.1 pode ser ponderado, considerando que esta aparenta ser mais impura. Para que possa melhor avaliar 5.1, em termos quantitativos, seriam necessárias novas etapas de purificação.

5.3.2 Purificação das Fenazinas Provenientes da Fase Aquosa

O extrato bruto oriundo da fase orgânica apresentou cor marrom, e após ser submetido ao processo de purificação, o qual utilizou carvão ativado e celite (item 4.4.2.1), foi obtido um pigmento de cor avermelhada.

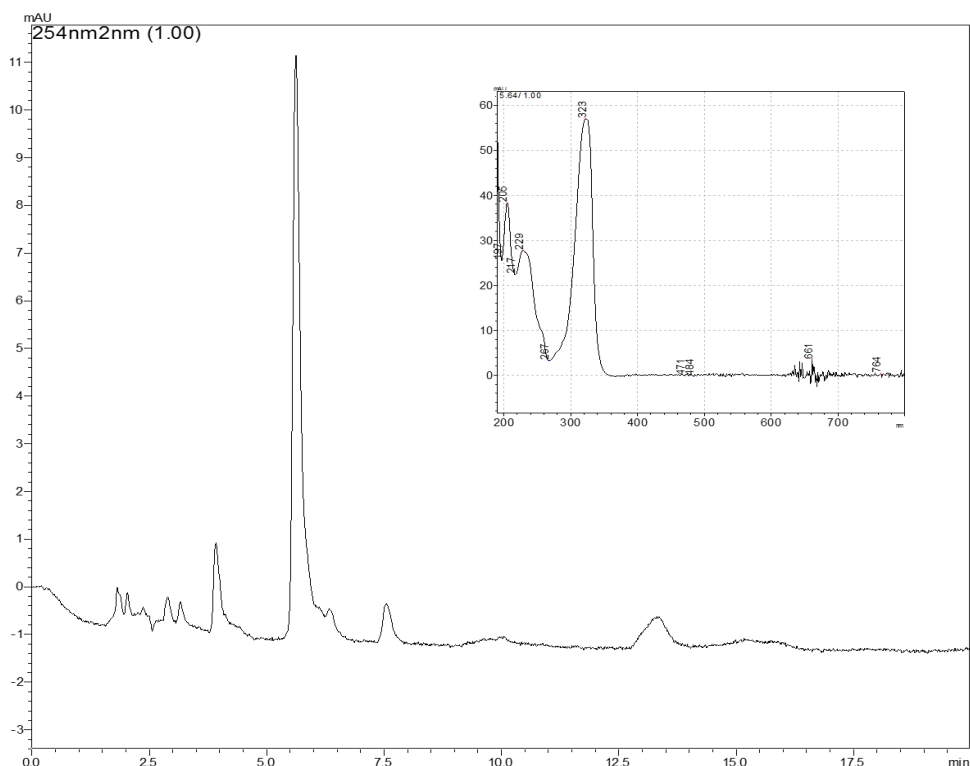
Para saber se esse pigmento se tratava de moléculas de piorubrininas foi feita sua análise por espectrometria de massas (Figura 38), sendo identificado predominância de aeruginosinas A (m/z 254,1610).

Figura 38 - Espectro de massa Aeruginosina A.



A mesma amostra foi analisada por CLAE, o resultado apresentado no cromatograma (Figura 39) indicou presença de um pico predominante com tempo de retenção de 5,7 minutos, referente à molécula de AA.

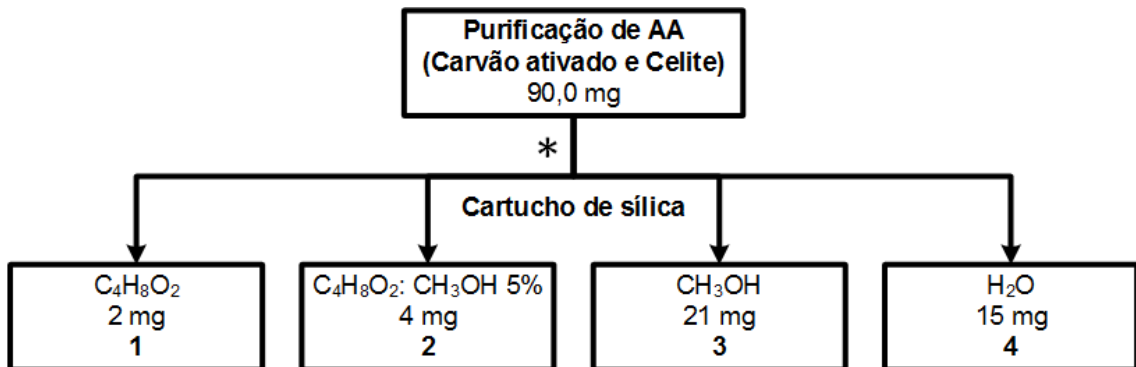
Figura 39 - Cromatograma obtido por CLAE do pigmento vermelho purificado com celite e carvão ativado.



Fase móvel acetonitrila:ácido fórmico 0,10% (30:70), vazão 1,00 mL min⁻¹, tempo de corrida 60 min, coluna Phenomenex Luna C18 (5 µm; 4,6 × 250 mm), comprimento de onda de 254 nm.

A análise de CCD deste pigmento está apresentada na Figura 40 (aplicação A), sendo verificada a presença de substâncias que fluorescem em luz UV a 254 nm e que não apresentaram zonas separadas. A fim de melhorar a separação dos compostos que constituem o pigmento vermelho foi realizada uma etapa de extração em fase sólida (Figura 40), e verificou-se que houve melhora na separação das bandas (Figura 41).

Figura 40 - Fluxograma do processo de purificação do extrato aquoso obtido do cultivo suplementado com caseinato de sódio 1% por purificação com uso de carvão ativado e extração em fase sólida.



O fluxograma mostra o solvente utilizado em cada etapa, a massa obtida para cada fração e a sequência de cada passo. * Massa utilizada de 42 mg.

Figura 41 - CCD analítica das frações obtidas da purificação de AA.



Fase móvel CH_3OH e revelação por luz UV a 254 nm. Pigmento vermelho antes (A) e após o processo de extração em fase sólida (frações 1 a 4).

Entretanto, pôde ser observado que no passo de purificação utilizando o cartucho não foi suficiente, uma vez que manchas com valores de Rf's muito próximos não foram separadas. Dessa forma, será necessário realizar processos de separação que sejam capazes de separar estes compostos.

Devido à similaridade dos compostos presentes nas frações 1 e 2 foi possível agrupar estas amostras, que resultaram em massa de 6 mg com rendimento de 8,04 mg mL⁻¹. Esta amostra será caracterizada por RMN para avaliar sua purificação.

5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Até o momento, relatos na literatura científica sobre o ácido 5-metilfenazina-1-carboxílico são escassos, e não existe nenhum estudo sobre atividade antioxidante deste composto ou de outras moléculas fenazínicas. Sendo assim, 5-Me-PCA e o extrato bruto orgânico de fenazinas foram avaliados *in vitro* quanto à capacidade antioxidante pelos métodos ABTS e FRAP. Estes são métodos muito utilizados para mensurar a atividade antioxidante por mecanismos diferentes.

Ensaio que utilizam o radical ABTS baseiam-se na capacidade dos antioxidantes em sequestrar o cátion ABTS^{•+}, composto de coloração azul esverdeada. Assim, ao adicionar um composto antioxidante irá ocorrer a redução do ABTS^{•+} a ABTS, que leva a diminuição da cor do meio reacional. Com a perda de cor ocorre diminuição da absorbância possibilitando determinar a porcentagem de inibição do ABTS^{•+} causada pelo composto teste. Assim, a capacidade antioxidante do composto pode ser medida com base na sua habilidade de sequestrar esse radical. Paralelamente pode ser feita comparação com Trolox, padrão análogo a vitamina E, solúvel em meio aquoso com alta capacidade antioxidante. Já para o ensaio de FRAP a atividade antioxidante é medida por mecanismos de transferência de elétrons, ao medir a redução do ferro do complexo TPTZ gerando um composto colorido (COSTA, 2012; VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2012).

Os resultados de capacidade antioxidante do extrato bruto e do 5-Me-PCA estão apresentados na Tabela 6. A atividade antioxidante pelo método FRAP foi expressa em equivalentes de Trolox, enquanto que o método ABTS foi analisado a concentração de amostra que causou inibição de 50 % do radical ABTS (IC₅₀).

Tabela 6 - Avaliação da atividade antioxidante de 5-Me-PCA em comparação extrato bruto de fenazinas pelos métodos ABTS e FRAP.

Amostras	FRAP ($\mu\text{mol L}^{-1}$ Trolox/ $\mu\text{g mL}^{-1}$)	ABTS (IC_{50})
5-Me-PCA	0,78	$13,997 \pm 0,063 \mu\text{g mL}^{-1}$
Extrato Bruto Orgânico	0,58	$5,083 \pm 0,060 \mu\text{g mL}^{-1}$

Em relação ao poder de redução do Fe^{3+} (FRAP) foi encontrada atividade antioxidante maior para 5-Me-PCA purificado. Quanto à captura do radical ABTS o extrato bruto apresentou maior capacidade antioxidante, pois uma concentração menor do extrato foi suficiente para inibir 50% do radical livre em comparação à concentração necessária para o pigmento mais puro.

Mais uma vez é importante ressaltar que estes dois métodos atuam por mecanismos diferentes e conseqüentemente estão envolvidos em diferentes reações. O FRAP, por exemplo, não detecta compostos que bloqueiam radicais pela transferência de H e elétrons, como tiol e proteínas (VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2012) e o ABTS é capaz de determinar a capacidade antioxidante de compostos hidrofílicos bem como lipofílicos (LEONG *et al.*, 2002).

Os resultados deste trabalho mostraram que o extrato bruto obtido apresenta antioxidantes naturais, no entanto, será imprescindível realização de mais estudos para identificar as moléculas responsáveis pela capacidade antioxidante e se existem, além de 5-Me-PCA, outras fenazinas com potencial antioxidante neste extrato. Por conseguinte, estas moléculas podem ser de grande interesse para formulações de produtos benéficos no tratamento de várias doenças, na indústria cosmética e farmacêutica.

6 CONCLUSÕES

- Foi possível padronizar as metodologias de produção, extração, purificação e quantificação de fenazinas obtidas por cultivos submersos de *P. aeruginosa* PAO1. A utilização de caseinato de sódio como indutor do sistema de *quorum sensing* promoveu uma maior produção de diferentes moléculas de fenazinas. Sendo constatado predominância de 5-Me-PCA na fase orgânica e presença de piorubrininas na fase aquosa.
- Constatou-se que a realização de duas extrações com clorofórmio obteve um extrato mais concentrado de fenazinas
- Foi obtido 5-Me-PCA com maior pureza por meio da cromatografia flash. Além disso, a cromatografia em camada delgada preparativa também se mostrou uma forma eficaz de purificação sendo possível obter outras moléculas pigmentadas com elevada pureza.
- Foi observado que a produção de fenazinas ocorre a partir do primeiro dia de cultivo, atingindo suas maiores concentrações no primeiro e décimo dias de incubação, para as moléculas fenazínicas solúveis em clorofórmio. Já as moléculas solúveis em água apresentaram maior concentração no 13º dia, sendo este o melhor dia para interrupção dos cultivos.
- Por meio dos métodos FRAP e ABTS pode-se concluir que o extrato bruto apresentou moléculas com efeito antioxidante, sendo necessário investigar quais as moléculas responsáveis por tal efeito. A fenazina 5-Me-PCA purificada também apresentou atividade antioxidante, sugerindo a aplicação desta molécula nas indústrias farmacêutica e cosmética.

7 EXPERIMENTOS FUTUROS

- Ampliação da produção de fenazinas em meio suplementado com caseinato, a fim de obter uma grande quantidade das fenazinas amarela e vermelha.
- Purificação do extrato bruto orgânico por cromatografia *flash* seguido de cromatografia em camada delgada preparativa.
- Utilização de cromatografia líquida de alta eficiência preparativa para purificar Aeruginosina A.
- Avaliação da atividade antioxidante de 5-Me-PCA e Aeruginosina *in vitro* e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

ABU, E.A.; SU, S.; SALLANS, L.; BOISSY, R.E.; GREATENS, A.; HEINEMAN, W.R.; HASSETT, D.J. Cyclic voltammetric, fluorescence and biological analysis of purified aeruginosin A, a secreted red pigment of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 159, n. 8, p. 1736–1747, 2013.

AHUJA, E.G.; JANNING, P.; MENDEL, M.; GRAEBSCHE, A.; BREINBAUER, R.; HILLER, W.; COSTISELLA, B.; THOMASHOW, L.S.; MAVRODI, D.V.; BLANKENFELDT, W. PhzA/B catalyzes the formation of the tricycle in phenazine biosynthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, p. 17053–17061, 2008.

ASFAHL, K. L.; SCHUSTER, M. Additive effects of *quorum sensing* anti-activators on *Pseudomonas aeruginosa* virulence traits and transcriptome. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2018.

BALASUBRAMANIAN, D.; SCHNEPER, L.; KUMARI, H.; MATHEE, K. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. 1–20, 2013.

BLANKENFELDT, W.; PARSONS, J. F. The structural biology of phenazine biosynthesis. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 29, p. 26–33, 2014.

BYNG, G. S.; EUSTICE, D. C.; JENSEN, R. A. Biosynthesis of phenazine pigments in mutant and wild-type cultures of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, n. 3, p. 846–852, 1979.

CAMILIOS-NETO, D. **Produção de Ramnolipídeos por Fermentação em Estado Sólido**. 2010. Tese (Doutorado Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

CHIN-A-WOENG, T. F. C.; THOMAS-OATES, J. E.; LUGTENBERG, B. J. J.; BLOEMBERG, G. V. Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. strains. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 14, n. 8, p. 1006-1015, 2001.

COSTA, N. R. S. A. B. DA S. G. P. J. N. DA C. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, p. 263–269, 2012.

DENNING, G. M.; IYER, S. S.; RESZKA, K. J.; O'MALLEY, Y.; RASMUSSEN, G. T.; BRITIGAN, B. E. Phenazine-1-carboxylic acid, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*, alters expression of immunomodulatory proteins by human airway epithelial cells. **American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 285, n. 3, p. L584–L592, 2003.

DIGGLE, S. P.; CORNELIS, P.; WILLIAMS, P.; CÁMARA, M. 4-Quinolone signalling in *Pseudomonas aeruginosa*: Old molecules, new perspectives. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 83–91, 2006.

DIETRICH, L. E. P.; PRICE-WHELAN, A.; PETERSEN, A.; WHITELEY, M.; NEWMAN, D. K. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1308–1321, 2006.

DIETRICH, L. E. P.; OKEGBE, C.; PRICE-WHELAN, A.; SAKHTAH, H.; HUNTER, R. C.; NEWMAN, D. K. Bacterial community morphogenesis is intimately linked to the intracellular redox state. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 7, p. 1371–1380, 2013.

DWIVEDI, D.; JOHRI, B. N. Antifungals from fluorescent pseudomonads: Biosynthesis and regulation. **Current Science**, v. 85, p. 1693–1703, 2003.

EL-FOULY, M. Z.; Sharaf, A.M.; Shahin, A.A.M.; El-Bialy, Heba A.; Omara, A.M.A. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 8, n. 1, p. 36–48, 2015.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010.

FORDOS, M. J. Recherches sur la matière colorante des suppurations bleues: pyocyanine. **RecTrav Soc d'Émul Sci Pharm**, v. 3, n. 30, 1859.

GLASSER, N. R.; KERN, S. E.; NEWMAN, D. K. Phenazine redox cycling enhances anaerobic survival in *Pseudomonas aeruginosa* by facilitating generation of ATP and a proton-motive force. **Molecular Microbiology**, v. 92, n. 2, p. 399–412, 2014.

GUTTENBERGER, N.; BLANKENFELDT, W.; BREINBAUER, R. Recent developments in the isolation, biological function, biosynthesis, and synthesis of phenazine natural products. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 22, p. 6149–6166, 2017.

HANSFORD, G. S.; HOLLIMAN, F. G.; HERBERT, R. B. Pigments of *Pseudomonas species*. Part IV. In vitro and in vivo conversion of 5-methylphenazinium-1-carboxylate into aeruginosin A. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, v. 1, p. 103–105, 1972.

HERNANDEZ, M. E.; KAPPLER, A.; NEWMAN, D. K. Phenazines and Other Redox-Active Antibiotics Promote Microbial Mineral Reduction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 921–928, 2004.

HOLLIMAN, F. G. Pigments of *Pseudomonas species*. Part I. Structure and synthesis of aeruginosin A. **Journal of the Chemical Society C: Organic**, v.19, p. 2514–2516, 1969.

- HOLLOWAY, B. W. Genetic Recombination in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 572–581, 1955.
- HUANG, Y.; ZHOU, E.; JIANG, C.; JIA, R.; LIU, S.; XU, D.; GU, T.; WANG, F. Endogenous phenazine-1-carboxamide encoding gene PhzH regulated the extracellular electron transfer in biocorrosion of stainless steel by marine *Pseudomonas aeruginosa*. **Electrochemistry Communications**, v. 94, n. July, p. 9–13, 2018.
- HUNTER, R. C.; NEWMAN, D. K. A putative ABC transporter, *hatABCDE*, is among molecular determinants of pyomelanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 22, p. 5962–5971, 2010.
- JAYASEELAN, S.; RAMASWAMY, D.; DHARMARAJ, S. Pyocyanin: Production, applications, challenges and new insights. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 1159–1168, 2014.
- JIMENEZ, P.; KOCH, G.; THOMPSON, J.A.; XAVIER, K.B.; COOL, R.H.; QUAX, W.J. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR**, v. 76(1), p. 46–65, 2012.
- KADAM, M.S.; PATIL, S.G.; DANE, P.R.; PAWAR, M.K.; CHINCHOLKAR, S.B. Methods for Purification and Characterization of Microbial Phenazines. In: Chincholkar S., Thomashow L. Microbial Phenazines. **Springer**, Berlin, Heidelberg, 2013.
- KENNEDY, R.K.; NAIK, P.R.; VEENA, V.; LAKSHMI, B.S.; LAKSHMI, P.; KRISHNA, R.; SAKTHIVEL, N. 5-Methyl phenazine-1-carboxylic acid: A novel bioactive metabolite by a rhizosphere soil bacterium that exhibits potent antimicrobial and anticancer activities. **Chemico-Biological Interactions**, v. 231, p. 71–82, 2015.
- LAU, G.W.; HASSETT, D.J.; RAN, H.; KONG, F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. **Trends in Molecular Medicine**, v. 10, p. 599–606, 2004.
- LAURSEN, J. B.; NIELSEN, J. Phenazine natural products: Biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. **Chemical Reviews**, v. 104(3), p. 1663–1685, 2004.
- LEONG, L. P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chemistry**, v. 76, p. 69–75, 2002.
- LI, Q. A.; MAVRODI, D. V.; THOMASHOW, L. S.; ROESSLE, M.; BLANKENFELDT, W. Ligand binding induces an ammonia channel in 2-amino-2-desoxyisochorismate (ADIC) synthase PhzE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 20, p. 18213–18221, 2011.

- LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: Lessons from a versatile opportunist. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 9, p. 1051–1060, 2000.
- McDONALD, M.; MAVRODI, D. V.; THOMASHOW, L. S.; FLOSS, H. G. Phenazine biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*: Branchpoint from the primary shikimate biosynthetic pathway and role of phenazine-1,6-dicarboxylic acid [9]. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, p. 9459–9460, 2001.
- McGRATH, S.; WADE, D. S.; PESCI, E. C. Dueling *quorum sensing* systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas quinolone signal* (PQS). **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 1, p. 27–34, 2004.
- MAHAJAN-MIKLOS, S.; TAN, M. W.; RAHME, L. G.; AUSUBEL, F. M. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. **Cell**, v. 96, n. 1, 1999.
- MAVRODI, D. V.; BONSALE, R. F.; DELANEY, S. M.; SOULE, M. J.; PHILLIPS, G.; THOMASHOW, L. S. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 21, p. 6454–6465, 2001.
- MAVRODI, D. V.; BLANKENFELDT, W.; THOMASHOW, L. S. Phenazine Compounds in Fluorescent *Pseudomonas* Spp. Biosynthesis and Regulation. **Annual Review of Phytopathology**, 2006.
- MAZZOLA, M.; COOK, R. J.; THOMASHOW, L. S.; WELLER, D. M.; PIERSON, L. S. Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2616–2624, 1992.
- MENTEL, MATTHIAS; AHUJA, EKTA G.; MAVRODI, DMITRI V.; BREINBAUER, ROLF; THOMASHOW, LINDA S.; BLANKENFELDT, WULF. Of two make one: The biosynthesis of phenazines. **ChemBioChem**, v. 10, n. 14, p. 2295–2304, 2009.
- ORLANDI, V.T.; BOLOGNESE, F.; CHIODAROLI, L.; TOLKER-NIELSEN, T.; BARBIERI, P. Pigments influence the tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to photodynamically induced oxidative stress. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 161, n. 12, p. 2298–2309, 2015.
- PALUMBO, S. A. Role of iron and sulfur in pigment and slime formation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 111, n. 2, p. 430–436, 1972.
- PARSONS, J. F.; SONG, F.; PARSONS, L.; CALABRESE, K.; EISENSTEIN, E.; LADNER, J. E.. Structure and function of the phenazine biosynthesis protein PhzF from *Pseudomonas fluorescens* 2-79. **Biochemistry**, v. 43, p. 12427–12435, 2004.

- PARSONS, J. F.; GREENHAGEN, B. T.; SHI, K.; CALABRESE, K.; ROBINSON, H.; LADNER, J. E. Structural and functional analysis of the pyocyanin biosynthetic protein PhzM from *Pseudomonas aeruginosa*. **Biochemistry**, v. 46, n. 7, p. 1821–1828, 2007.
- PIERSON, L. S.; GAFFNEY, T.; LAM, S.; GONG, F. Molecular analysis of genes encoding phenazine biosynthesis in the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. **FEMS Microbiology Letters**, v. 134, n. 2–3, p. 299–307, 1995.
- PIERSON, L. S.; PIERSON, E. A. Metabolism and function of phenazines in bacteria: Impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1659–1670, 2010.
- PRICE-WHELAN, A.; DIETRICH, L. E. P.; NEWMAN, D. K. Rethinking “secondary” metabolism: Physiological roles for phenazine antibiotics. **Nature Chemical Biology**, v. 2, p. 71–78, 2006.
- PUSTELNY, C.; ALBERS, A.; BÜLDT-KARENTZOPOULOS, K.; PARSCHAT, K.; CHHABRA, S.R.; CÁMARA, M.; WILLIAMS, P.; FETZNER, S. Dioxygenase-Mediated Quenching of Quinolone-Dependent *Quorum Sensing* in *Pseudomonas aeruginosa*. **Chemistry and Biology**, v. 16, n. 12, p. 1259–1267, 2009.
- RADA, B.; LETO, T. L. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: Relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. **Trends in Microbiology**, v. 21, p. 73–81, 2013.
- RAIO, A.; PUOPOLO, G.; CIMMINO, A.; DANTI, R.; DELLA ROCCA, G.; EVIDENTE, A. Biocontrol of cypress canker by the phenazine producer *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* strain M71. **Biological Control**, v. 58, n. 2, p. 133–138, 2011.
- RAMPIONI, G.; FALCONE, M.; HEEB, S.; FRANGIPANI, E.; FLETCHER, M.P.; DUBERN, J.F.; VISCA, P.; LEONI, L.; CÁMARA, M.; WILLIAMS, P. Unravelling the Genome-Wide Contributions of Specific 2-Alkyl-4-Quinolones and PqsE to Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS Pathogens**, v. 12, 2016.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning; a laboratory manual. 2. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, v. 3, 1989.
- SANDOZ, K. M., MITZIMBERG, S. M., & SCHUSTER, M. Social cheating in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 40, p. 15876–15881, 2007.
- SARANYA, R.; JAYAPRIYA, J.; TAMILSELVI, A. Dyeing of silk fabric with phenazine from *Pseudomonas* species. **Coloration Technology**, v. 128(6), p. 440–445, 2012.

SCHAUDER, S.; BASSLER, B. L. The languages of bacteria. **Genes and Development**, v. 15, n. 12, p. 1468–1480, 2001.

SCHUSTER, M.; GREENBERG, E. P. A network of networks: Quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 73–81, 2006.

SIGMA ALDRICH. Disponível em:

<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/94398?lang=pt®ion=BR>>.

Acesso em: 25 de Agosto de 2018.

STAHL, E. Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook. **Springer-Verlag Berlin**: New York, 1969.

STOVER, C. K.; PHAM, X. Q.; ERWIN, A. L.; MIZOGUCHI, S. D.; WARRENER, P.; HICKEY, M. J.; BRINKMAN, F. S.; HUFNAGLE, W. O.; KOWALIK, D. J.; LAGROU, M.; GARBER, R. L.; GOLTRY, L.; TOLENTINO, E.; WESTBROCK-WADMAN, S.; YUAN, Y.; BRODY, L. L.; COULTER, S. N.; FOLGER, K. R.; KAS, A.; LARBIG, K.; LIM, R.; SMITH, K.; SPENCER, D.; WONG, G. K.; WU, Z.; PAULSEN, I. T.; REIZER, J.; SAIER, M. H.; HANCOCK, R. E. W.; LORY, S.; OLSON, M. V. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 409, p. 959-964, 2000.

SUDHAKAR, T.; KARPAGAM, S.; PREMKUMAR, J. Biosynthesis, antibacterial activity of pyocyanin pigment produced by *Pseudomonas aeruginosa* SU1. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 921–924, 2015.

TURNER, J. M.; MESSENGER, A. J. Occurrence, Biochemistry and Physiology of Phenazine Pigment Production. **Advances in Microbial Physiology**, v. 27, p. 211–275, 1986.

VIGNOLI, J.A., BASSOLI, D.G., BENASSI, M. DE T. Atividade antioxidante de cafés torrado e solúvel: Padronização e validação de métodos. **Coffee Science**, v. 7, p. 68–75, 2012.

WANG, Y.; KERN, S. E.; NEWMAN, D. K. Endogenous phenazine antibiotics promote anaerobic survival of *Pseudomonas aeruginosa* via extracellular electron transfer. **Journal of Bacteriology**, v. 192, p. 365–369, 2010.

XU, N.; AHUJA, E. G.; JANNING, P.; MAVRODI, D. V.; THOMASHOW, L. S.; BLANKENFELDT, W. Trapped intermediates in crystals of the FMN-dependent oxidase PhzG provide insight into the final steps of phenazine biosynthesis. **Acta Crystallographica Section D**, v. 69, n. 8, p. 1403–1413, 2013.

XU, S.; PAN, X.; LUO, J.; WU, J.; ZHOU, Z.; LIANG, X.; ZHOU, M. Effects of phenazine-1-carboxylic acid on the biology of the plant-pathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 117, p. 39–46, 2015.

ZAVASCKI, A. P.; CARVALHAES, C. G.; PICÃO, R. C.; GALES, A. C. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, p. 71–93, 2010.