

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUIMICA

Este exemplar corresponde à versão  
final da tese defendida por  
o Sr. Raul A. Riveros G. e  
aprovada pela Comissão Julgadora

Nelson Durán

9/11/87 Imp. 4/10/88

QUIMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE  
DERIVADOS DE 1,3-DIÍDRO-2H-INDOL-3-ONA

RAUL ALBERTO RIVEROS GONZALEZ

TESE DE MESTRADO

ORIENTADOR: Prof. Dr. NELSON E. DURAN CABALLERO

Campinas

1986

**UNICAMP**  
BIBLIOTECA CENTRAL

## AGRADECIMENTOS

-Ao Professor Dr. Nelson Durán pela eficiência e dedicação na orientação deste trabalho.

-Aos Professores Drs. L. Caldas e A. Leitão da UFRJ por terem cedido a cepa original de Chromobacterium violaceum.

-Ao Dr. V. Campos e Professor A. Joyas, da Facultad de Ciencias de la U. Católica de Valparaiso-Chile, pelos ensaios biológicos.

-A Instituto de Química da UNICAMP pelo apoio material

-Aos meus companheiros e funcionários do Laboratorio.

-A CAPES, CNPq, FAPESP, FINEP, PADCT e OEA pelo apoio financeiro

## RESUMO

Chromobacterium violaceum produz o composto 3-[1,2-dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno]-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (pigmento I). Realizou-se um estudo das condições de cultura para otimizar a produção de pigmento I, como variações de nutrientes, temperatura e pH do meio foram correlacionados com o crescimento celular. Os cultivos feitos a 28 °C durante 24 h de incubação a pH 7, em meio líquido na ausência de luz apresentou os melhores rendimentos.

O pigmento I foi isolado de um extrato acetônico da bactéria e identificado mediante dados espectroscópicos e constantes físicas.

A partir do pigmento I foram preparados os seguintes derivados: pigmento I-bromado, formilado, acetilado e sal de sódio. Estes derivados foram purificados por cromatografia de camada preparativa e identificados por UV, IR, <sup>1</sup>H NMR, EM.

Resultados preliminares de atividade biológica destes compostos mostraram ser antitripanossomais.

Por envelhecimento da cepa nativa obtem-se uma cepa de cor branca que sintetiza um composto que foi identificado parcialmente como um derivado biftalato.

Quando a cepa nativa foi irradiada a  $\lambda > 254$  nm na faixa de fluência entre 25,9 KJ/m<sup>2</sup> e 38,9 KJ/m<sup>2</sup>, obtem-se uma bactéria mutante de cor vermelha. O composto isolado desta mutante foi identificado como isatina.

## ABSTRACT

Chromobacterium violaceum yields 3-[1,2-dihydro-5-(5-hydroxi-1H-indol-3-yl)-2-oxo-3H-pyrrol-3-ylidene]-1,3-dihydro-2H-indol-2-one (pigment I). Culture conditions were optimized for the production of pigment I and changes of nutrients, temperature and pH were correlated to cellular growth. The best results achieved when incubation was done in a liquid medium and in absence of light, at pH 7 for 24 hs at 28°C.

Pigment I was isolated from the acetone extracts and identified by spectroscopic data and physical constants.

Bromo, formyl, acetyl and sodium salt derivatives were prepared from pigment I. These derivatives were purified by preparative thin layer chromatography and identified by UV, IR, <sup>1</sup>H NMR spectroscopies and Mass spectrometry.

Preliminary results have shown that these compounds are anti-trypanosomal.

By aging the native strain, a white one was obtained which yielded a compound which was partially identified as a biphtalate.

When the native strain was irradiated at  $\lambda > 254$  nm, in fluency range of 25,9 KJ/m<sup>2</sup> to 38,9 KJ/m<sup>2</sup>, a red mutant bacteria was obtained, which yielded isatine.

## INDICE

I.	Introdução.	01
I.1.	Aspectos Gerais.	01
I.2.	Fármacos.	06
I.3.	<u>Chromobacterium violaceum.</u>	08
I.4.	Objetivos.	12
II.	Experimental.	14
II.1.	Materiais e Métodos.	14
II.1.1.	Crescimento Bacterial	14
II.1.2.	Extração da Bacteria	14
II.2.	Análise dos Extratos por Cromatografia.	15
II.2.1.	Deteccção dos Constituintes	15
II.2.2.	Separação dos Extratos	16
II.3.	Isolamento e Purificação dos Produtos	16
II.4.	Caraterização dos Compostos Obtidos	16
II.5.	Tratamentos das Amostras	17
II.5.1	Fracionamento do Meio Sólido	17
II.5.1.1	Fracionamento do Extrato Etereo	18
II.5.1.2.	Fracionamento do Extrato Acetônico	19
II.5.2.	Fracionamento do Meio Líquido	19
II.5.3.	Fracionamento das frações 6-7	20
II.6.	Reações de Transformação do Pigmento I	21
II.6.1.	Síntese do Acetato	21
II.6.2.	Síntese do Sal de Sodio	22
II.6.3.	Síntese de Metilol	23
II.6.4.	Síntese de Pigmento I-Br	24
II.6.5.	Oxidação com Reagente de Jones	25

11.6.6.	Acetilação de CV-3	25
11.7.	Otimização do Crescimento Celular	26
11.7.1.	Velocidade de Crescimento	26
11.7.2.	Efeito da Temperatura	26
11.7.3.	Efeito de Aminoácidos Sobre o Crescimento	27
11.7.4.	Efeito da Concentração de Triptofano	27
11.7.5.	Efeito da Concentração de Metionina e Vitamina B-12	28
11.7.6.	Consumo de Oxigênio a Diferentes pH	28
11.7.7.	Crescimento Celular e Síntese de Pigmento I em Diferentes pH	29
11.7.8.	Efeito do pH Sobre o Crescimento Celular em Presença de Metionina e Vitamina B-12	29
11.7.9.	Mutação Fotoquímica	30
11.8.	Ensaio Biológico	30
11.8.1.	Curva de População	31
11.8.2.	Curva de Crescimento	31
	Resultados e Discussão	33
	Composto CV-3	50
	Pigmento I	54
	Pigmento I Acetilado	63
	Pigmento I Sódico	68
	Pigmento I Bromado	71
	Pigmento I Formilado	74
	Conclusões	79
	Referências Bibliográficas	81

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos Gerais

Os processos de fermentação realizados por microorganismos têm sido explorados há milênios pelo homem. No entanto, a utilização industrial da capacidade biossintética das células vivas para a produção em grande escala de produtos químicos e bioquímicos de interesse prático é relativamente recente. É no começo deste século, após ter-se estabelecido as bases da microbiologia e da bioquímica, quando se industrializou a produção de fermentos e de etanol. Já em 1925 foi produzido ácido cítrico em escala industrial, utilizando-se o fungo filamentoso *Aspergillus niger* [1]. Porém sem dúvida alguma, um grande avanço na industrialização dos microorganismos foi devido a descoberta da penicilina em 1928 por A. Fleming, produzido pelo fungo *Penicillium notatum* [2]. A busca sistemática de novos antibióticos foi iniciada por Waksman em 1939, descobridor da estreptomicina e outros antibióticos [3].

De 1940 em diante, foram caracterizados aproximadamente 3000 novos antibióticos produzidos por microorganismos. Na tabela I estão indicados alguns dos antibióticos mais representativos junto com os microorganismos produtores [1,4].

Apesar dos antibióticos serem os produtos mais pesquisados pela microbiologia industrial, outros compostos também são produzidos pela fermentação. Entre eles, podemos citar solventes e ácidos orgânicos, bebidas alcoólicas, nucleotídeos, dextranos e vários outros polímeros. Alguns dos produtos de interesse industrial mais representativos, são apresentados na tabela II [1,5].

TAB. I. Principais Antibióticos Naturais de Interesse Industrial e  
Microorganismos Produtores

Classe	Antibiótico	Microorganismo Produtor
$\beta$ -Lactamas	Penicilina	Penicillium chrysogenum
	Cefalosporinas C	Cephalosporium chrysogenum
	Cefamicinas A, B e C	Streptomyces lipmanii
		Streptomyces lactamdurans
		Streptomyces griseus
Nocardicina	Nocardias uniformis	
Aminoglicosídeos	Estreptomicina	Streptomyces griseus
	Gentamicina	Micronospora chalceae
	Kanamicina	Streptomyces kanamyceticus
	Neomicina	Streptomyces fradiae
Macrólidas	Eritromicina	Streptomyces erythreus
	Carbomicina	
	(Magnamicina)	Streptomyces haldstedii
	Lincomicina	Streptomyces lincolnensis
	Oleandomicina	Streptomyces antibioticus
Aromáticos	Cloranfenicol	Streptomyces venezuelae
Tetraciclinas	Tetraciclina	Streptomyces aureofaciens
	(Aureomicina)	Streptomyces aureofaciens
	Oxitetraciclina	
	(Terramicina)	Streptomyces rimosus
Glutarimidas	Cicloheximida	Streptomyces griseus
Polienos	Amfotericina B	Streptomyces nodosus
	Nistatina	Streptomyces noursei
Peptídicos	Bacitracina	Bacillus subtilis
	Colistina	Bacillus colistinus
	Polimixina	Bacillus polymyxa



TAB. II. Principais Produtos Microbianos Não-Antibióticos de Interesse Industrial

Produtos	Microorganismos Prodotores	Usos
Acetona	<i>Clostridium acetobutyllicum</i>	Solvente químico
Butanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Solvente químico
2,3-butanodiol	<i>Bacillus polymyxa</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	Solvente químico
Diidroxiacetona	<i>Gluconobacter suboxidans</i>	Reagente químico
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	Alimentos, medicina
Ácido láctico	<i>Lactobacillus delbruckii</i> <i>Rhizopus oryzae</i>	Alimentos, cortume, têxtil e lavanderia
Ácido fumárico	<i>Rhizopus nigricans</i>	Resinas, umectante
Ácido glucônico	<i>Aspergillus niger</i>	Medicina, fotografia
Ácido 2-cetoglucônico	<i>Pseudomonas sp</i> <i>Gluconobacter suboxidans</i>	Precursor de vit. C
Ácido acético	<i>Gluconobacter suboxidans</i>	Alimentação
Ácido glutâmico e Lisina	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Alimentação
vinhos	<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	Bebidas
Cerveja	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. carlsbergensis</i>	Bebidas
Whisky, rum	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Bebidas
Amilose bac.	<i>Bacillus subtilis</i>	Hidrólise de amido
Proteases bac.	<i>Bacillus subtilis</i>	Cortume, papel
Pectinases	<i>Aspergillus wentii</i>	Fabric. de sucos
Estreptoquinase	<i>Streptococcus hemolíticus</i>	Medicina
Sorbose	<i>Gluconobacter suboxidans</i>	Síntese da vit. C
Cobalamina	<i>Streptomyces olivaceus</i>	Suplem. alimentícia
Dextrano	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Estab. de alimentos
Prot. Paraesporal	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Inseticidas biodeg

Teoricamente, estes metabólitos celulares poderiam ser produzidos por cultivo de células animais e/ou vegetais [6]. Entretanto os microorganismos apresentam uma série de vantagens que permitem o desenvolvimento de processos economicamente viáveis. Por exemplo, os microorganismos possuem uma alta velocidade de reprodução, logrando-se em poucos minutos, um estágio de crescimento que só seria obtido após horas ou dias pelas células vegetais ou animais. Além disso o crescimento em grande escala não apresenta dificuldades técnicas em fermentadores de até 200.000 litros de cultivo, utilizando para seu crescimento matérias primas diversas, o que permite aproveitar os recursos que existem em cada país.

O conhecimento do metabolismo de certos microorganismos, serve como modelo, em outras cepas, possibilitando alterar determinadas vias metabólicas ou mecanismos reguladores com o objetivo de induzir um fluxo metabólico para sintetizar produtos de interesse desejado. Por este método, obtiveram-se por mutações sucessivas, cepas de Penicillium chrysogenum com a capacidade de produzir aproximadamente entre 35.000 e 40.000 UI/ml de penicilina, sendo que as cepas originais tinham uma baixa capacidade de produção (200 UI/ml) [5].

É sabido que as mutações empíricas sucessivas, alteram as vias biossintéticas e os mecanismos reguladores das cepas nativas de microorganismo. Assim, seria possível induzir os intermediários metabólicos apropriados para aumentar a produção de antibióticos, em detrimento da formação de macromoléculas tais como proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Desta forma, um microorganismo de alta produção tem um crescimento mais lento que a cepa parental [6].

Por exemplo, a utilização de uma cepa mutante de Corynebacte-

rium glutamicum induzida convenientemente, tem permitido a produção em grande escala do aminoácido lisina com um rendimento de 44 gramas por litro de cultivo em 60 horas, com uma conversão de 30 % de glicose adicionado ao meio em lisina [7].

A produção de um grande número de antibióticos pode ser controlada pela concentração de determinados nutrientes do meio. Por exemplo, altas concentrações de fosfato inibem a síntese de antibióticos aminoglicosídeos (estreptomicina, neomicina, butirosina e kanamicina), dos antibióticos peptídicos (bacitracina, polimixina, etc.), das tetraciclínas, das macrólidas e dos polienos. Em consequência a produção industrial destes antibióticos deve ser feita a concentrações limitantes de fosfato [5]; O aminoácido triptofano é indutor da biossíntese de alcalóides do ergot por fungos do género Claviceps, o aminoácido metionina e análogos estruturais induzem a síntese do antibiótico cefalosporina.

O progresso da biologia molecular e o desenvolvimento da engenharia genética permitiram um enfoque mais racional na obtenção de mutantes "superprodutoras". Assim é possível introduzir material genético externo na célula microbiana e desenhar os passos metabólicos que devem ser alterados para sintetizar uma determinada substância de interesse industrial.

O exemplo mais notável dos possíveis benefícios das aplicações industriais destas técnicas é a preparação de fármacos, proteínas, polipeptídeos de importância médica tais como anticorpos e hormônios.

Neste processo de descobrir novos fármacos, muitas substâncias químicas são submetidas a ensaios biológicos para encontrar o que apresente atividade biológica benéfica para o homem.

## 1.2 Fármacos

Durante séculos a humanidade usou em muitos casos com excelentes resultados, extratos vegetais ou de órgãos de animais para o tratamento de diversas doenças. Isto levou aos pesquisadores a se interessar e a explorar a medicina popular. Diversos medicamentos utilizados na atualidade (alcalóides, antibióticos, vitaminas e hormônios) resultaram da purificação destes extratos ou seja isolamento e identificação de seus princípios ativos [8].

Sendo que este estudo foi realizado com um derivado indólico, produzido por um microorganismo, serão introduzidos alguns conceitos básicos de estrutura e atividade biológica.

O indol e alguns de seus derivados são conhecidos desde há muito [9], sua estrutura e nomenclatura foi proposta por Bayer [10] e mais tarde por Fischer [11]. O núcleo indólico é formado se da fusão de um anel benzênico nas posições 2 e 3 do pirrol [12], ver figura 1.

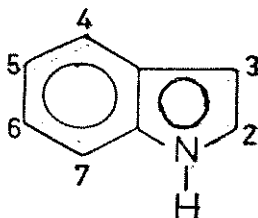


FIG.1. Estrutura híbrida do indol

O indol têm caráter aromático; apresenta estrutura planar e 10 eletrons ressonantes com energia de ressonância de 47 kcal/mol. Cristaliza-se em água quente, funde entre 52-54 °C e entra em ebulição a 254 °C. Possui um momento dipolar igual a 2,38 D em

dioxano e 2,11 D em benzeno (25 °C). É solúvel em solventes orgânicos comuns como éter de petróleo, benzeno, cloroformio, álcool e água quente.

Os indóis são altamente reativos frente a ácidos e agentes oxidantes devido à alta concentração da densidade eletrônica sobre o C-3, sendo esta a posição mais reativa do núcleo, (ver figura 2).

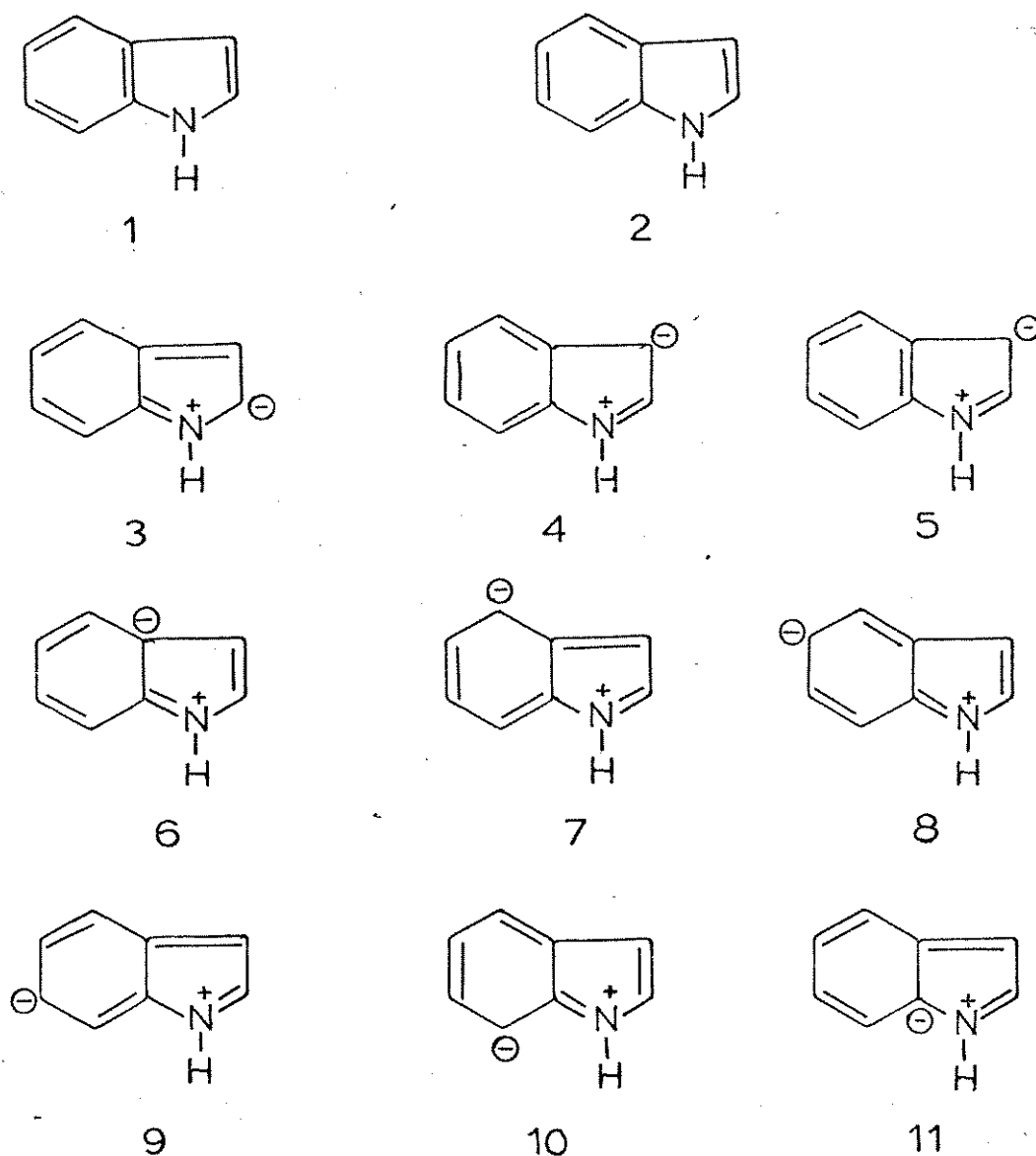


FIG.2. Estruturas ressonantes contribuintes da estrutura híbrida do indol

Essas propriedades variam conforme se substitui os hidrogê-

nios do núcleo por grupos diferentes. As propriedades espectroscópicas permitem uma rápida caracterização, diferenciação e identificação dos derivados, principalmente as absorções em UV e espectrometria de massa.

A presença do núcleo indólico em muitos alcalóides biologicamente ativos é espectável, já que compostos simples construídos ao redor deste núcleo poderiam ter, ou não, atividade biológica. Embora que muitos deste mostrarem atividade, de fato, relativamente poucos são usados clinicamente. Isto é possível observar devido a que o núcleo indólico não confere sobre a molécula um único tipo de propriedades biológicas, a atividade depende mais da natureza dos substituintes [5-8,13-17]. O efeito produzido é atribuído à interação com uma substância receptora específica [18-23], formando um complexo com o componente celular [24].

As funções fisiológicas que envolvem compostos indólicos podem distribuir-se em constituintes de proteínas (triptofano), alcalóides (reserpina), alucinógenos (serotonina, ácido lisérgico, psilocibina, etc.) [25], antibióticos (indolmicina, telomicina, tirocidina B) [26-28], agentes anti-inflamatórios, analgésicos, anti-piréticos (indometacina) [29].

Um microorganismo interessante para ser analisado sob estes aspectos, é aquele que produz um antibiótico indólico que é a bactéria Chromobacterium violaceum, o tema de estudo deste trabalho.

Esta bactéria têm, ao menos, tripla importância no Brasil, uma que é produzida normalmente em grande escala no Rio Negro na Amazônia, segundo, que aparentemente têm uma função ecológica nas águas do rio e terceiro, não apresenta patogenicidade aparente.

### 1.3 Chromobacterium violaceum

C. violaceum é isolada normalmente de amostras de solo pelo método de Corpe [30]. Recentemente, no Brasil, foi encontrada nas margens do Rio Negro na Amazônia [31]. A posição taxonômica têm sido investigada por Sneath [32] e outros pesquisadores [33-47].

A literatura médica contém informações do isolamento de C. violaceum de tecidos animais, em infecções fatais de mamíferos incluindo 16 casos no homem [38-41], embora relações etiológicas definitivas não foram rigorosamente estabelecidas. Sneath reportou que as cepas de C. violaceum testadas foram sensíveis a estreptomicina, cloranfenicol, aureomicina e terramicina [32]. Algumas destas cepas produzem ácido cianídrico como parte de seu metabolismo normal [42-47], a produção de hemolisina também têm sido informada [48]. A presença desta bactéria foi observada em sementes de milho, provocando um aumento do peso seco da planta [49]. Um extrato desta bactéria impede o crescimento de amebas no solo [50], melhora a agregação hidráulica da argila arenosa [51].

Estudos preliminares de requerimentos nutricionais e fisiológicos para o crescimento da bactéria e síntese de alguns metabólitos têm sido reportados [52-55], ela metaboliza N-carbobenzoxil-L-triptofano em um derivado 2',3'-diidro e ácido indol-3-propionico em indol-3-acrílico [56]. Estes produtos de biotransformação têm sido encontrados como componentes estruturais em vários antibióticos peptídicos [57,58].

Chromobacterium violaceum produz o pigmento roxo 3-[1,2-diidro-5-(5-hidróxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno]-1,3-diidro-2H-indol-2-ona, pigmento I, conhecido como violaceína, extraído em bom rendimento e também o deoxi-pigmento I. O pigmento I foi descoberto por Boisbaudran em 1882 [59], pesquisas poste-

riores [60-75] mostraram o isolamento com diferentes graus de pureza, ver figura 3.

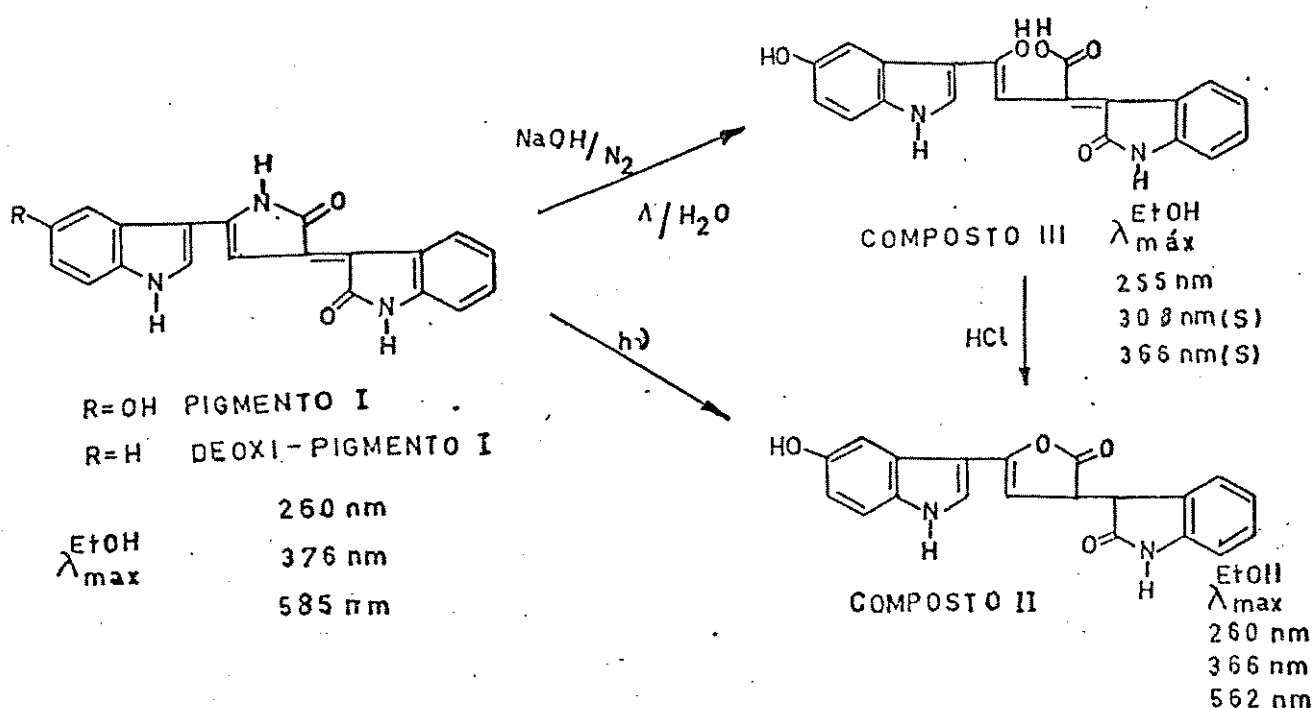


FIG.3. Produtos de fotólise do pigmento I, irradiado em solução de acetona-água com lâmpada de mercúrio a 400 watt por 45 minutos a 35 cm de distância da lâmpada, [88].

Estudos de determinação estrutural foram por muito tempo infrutíferas até que uma série de observações experimentais apareceram no período de 1949 a 1960 [76-83]. A estrutura foi então deduzida por estudos de degradações e confirmada por síntese. As propriedades espectrais têm sido reportadas [67, 69, 70, 76, 84]. Durán e colaboradores [85], avaliaram o potencial fototerápico do pigmento comparando suas propriedades espectrais e fotodinâmicas com conhecidos compostos fototerápicos, como eosina, cristal violeto;



leta, hematoporfirina e azul de metileno, sugerindo seu uso como droga fotoquimioterápica [85, 86]. Quando o pigmento I foi fotolizado, dois produtos foram obtidos [87] o 4-[1,2-diidro-5-(5-hidróxi-1H-indol-3-il)-4-hidróxi-2-(1,3-diidro-2H-indol-2-)] but-3-enóico lactona( II) e seu ácido correspondente (III), a figura 3 mostra os produtos de fotólise do pigmento I. Posteriormente Durán e colaboradores também informaram atividade contra microorganismo Gram positivo e Gram negativo do pigmento I e seus fotoprodutos. A tabela III mostra o efeito antimicrobial, do pigmento I, deoxi-pigmento I e seus fotoprodutos (composto II). Embora este

TAB. III. Atividade Antimicrobial de Pigmento I, Deoxi-pigmento I e seus Fotoprodutos \*

Microorganismo	Control #	Pigmento I		Deoxi-pigmento I	
		Control	Irrad.	Control	Irrad.
Enterobacter aerogenes ATCC 10006	-	++	-	-	-
Escherichia coli ATCC 25922	-	++	+	+	+
Providencia sp.	-	+++	+++	+++	++
Klebsiella pneumoniae ATCC 3383	-	++	+	+++	++
Salmonella typhi	-	+++	++	++	++
Staphylococcus aureus	-	+++	+	++	+
Bacillus subtilis	-	+++	++	++	+

x) +=10 mm; ++=>10 mm; +++=>15 mm (halo de inibição).

#) em acetona.

composto II tenha menor atividade que o pigmento I, apresenta maior solubilidade em água o que torna importante na ação anti-biótica *in vivo* [88].

A baixa concentração de microorganismos encontrados nas águas do Rio Negro e a ausência de doenças endêmicas entre a população que consome água do rio, foi explicada pela presença deste pigmento I e outros fotoprodutos derivados [31, 89, 90].

Outras cepas de *C. violaceum*, distinta da cepa brasileira, tem sintetizado compostos com atividade biológica e os de maior interesse apresentam núcleo peptídico ou um núcleo  $\beta$ -lactâmico; que representam um dos maiores meios quimioterápicos para o controle de infecções bacteriais [91-94].

#### 1.4 Objetivos

A doença de Chagas é causada pelo flagelado *Trypanosoma cruzi* e constitui um importante problema sanitário em toda América Latina e sua área de difusão abrange uma boa parte do território brasileiro, sendo endêmica nas regiões do norte.

Existem poucos compostos com atividade antitripanossomal com baixa toxicidade. Na atualidade só se conta com três agentes quimioterápicos capazes de curar a doença durante sua fase aguda, Megazol e os nitroderivados Lampit (nifurtimox) e Rochagan (benzimidazol), tendo em discussão ainda sua capacidade para produzir verdadeiras curas na fase crônica, ambas drogas são de toxicidade consideráveis [95-98]. Isto se faz necessário procurar novos agentes quimioterápicos efetivos contra *Trypanosoma cruzi*, que resultem inócuos para o homem. Estes antecedentes levaram nosso grupo a pesquisar a atividade antitripanocida do pigmento I e seus derivados químicos, portanto os objetivos foram abordados da

seguinte forma:

-Otimizar a biossíntese do pigmento I, modificando as condições de crescimento da bactéria Chromobacterium violaceum.

-Caracterizar sistematicamente o pigmento I e seus derivados por métodos espectroscópicos.

-Aumentar a solubilidade do pigmento I através da síntese de derivados, mantendo sempre que for possível, sua atividade antibacteriana e contra o Trypanosoma cruzi.

## Experimental

### II.1 Materiais e Métodos

Neste estudo utilizou-se a bactéria Chromobacterium violaceum, que pode ser encontrada no solo e na água de ambientes tropicais [99]. Recentemente foram descobertas grandes quantidades desta bactéria no Rio Negro da Amazônia [100,101].

#### II.1.1-Crescimento Bacterial.

As células foram inicialmente cultivadas em meio sólido de tioglicolato (DIFCO) com 1,2 % de agar (DIFCO) a pH 6,8 (previamente esterilizado a 121 °C por 15 minutos em um autoclave vertical modelo 103 FABBE) e a 32 °C, em garrafas de Roux de 1L, protegidas da luz, por 36 horas de incubação em uma estufa de cultivo modelo 116 FABBE.

Posteriormente, os cultivos foram feitos a 28 °C por 24 horas de incubação em meio líquido de tioglicolato, pH 7,2 com aeração mediante uma bomba peristáltica de velocidade variável, (modelo 1215, Harvard Apparatus), a 180 rpm em erlenmayer de 500 ml contendo 125 ml de meio líquido, em ausência de luz (previamente esterilizado a 121 °C por 15 minutos).

#### II.1.2- Extração da Bactéria.

A extração foi feita com solvente em ordem de polaridade crescente e em um extrator tipo soxhlet de 250 e 500 ml de capacidade e por lavagens sucessivos dos cultivos contidos nas garrafas de Roux.

## 11.2 Análise dos Extratos por Cromatografia

### 11.2.1- Detecção dos Constituintes.

Em cromatografia de camada delgada (c.c.d.) e camada preparativa (c.c.p.) utilizaram-se sílica gel GF<sub>254</sub> e alumina GF<sub>254</sub>, qualidade Merck. As placas de c.c.d. de 0,2 mm foram do tipo G-60 sobre folhas de alumínio, as de 1 mm foram preparadas em um aparelho de Desaga [102] sobre vidro.

Os sistemas cromatográficos utilizados foram :

Sistema a = sílica gel, benzeno:acetona (2:1)

Sistema b = sílica gel, benzeno:acetona (3:1)

Sistema c = alumina , cloroformio:metanol (95:5)

Sistema d = sílica gel, benzeno:éter etílico (3:1)

Sistema e = sílica gel, acetato de etila:éter de petrol.(3:2)

Os cromatogramas secados ao ar foram observadas à luz UV  $\lambda$ 254 nm e revelados com vapores de iodo ou reagente de Dragendorff e/ou solução de ácido sulfúrico ao 10 % (v/v) [103]. As reveladas com solução aquosa de ácido sulfurico foram posteriormente aquecidas a 110 °C por 5 minutos e observadas a luz UV  $\lambda$  360 nm.

### 11.2.2- Separação dos Extratos.

Na separação cromatográfica em coluna utilizaram-se colunas de vidro de 2x40, 1x25 e 4x60 cm respectivamente, a amostra dissolvida em acetona foi misturada com uma quantidade adequada de adsorvente cromatográfico. Após prévia evaporação do solvente, a mistura amostra-adsorvente foi colocada na parte superior da coluna contendo a fase estacionária empacotada a seco e em seguida eluída com o solvente determinado previamente por c.c.d., de forma lenta e contínua mantendo constante sempre uma frente de solvente não maior que um a dois centímetros de altura. A eluição foi efetuada até esgotar a mistura de partida.

### 11.3 Isolamento e Purificação dos Produtos

A análise por c.c.d. das diferentes frações, indicou a reunião de frações da mesma conduta cromatográfica e separar os produtos para serem purificados utilizando c.c.p. ou coluna. A purificação do componente levou-se a cabo por cristalizações sucessivas até que o comportamento do produto mostrou-se cromatograficamente puro.

### 11.4 Caracterização dos Compostos Obtidos

Os pontos de fusão foram obtidos em uma placa Kofler e não sofreram correção. Os espectros de infravermelho (IV) foram registrados em um espectrofotômetro Perkin Elmer modelo 180 em pastilha de KBr ou em filme com fluorolube. As frequências das absorções são informadas em cm<sup>-1</sup>.

Os espectros de ressonância magnética nuclear protônica (RMNH) foram registrados em um espectrômetro Varian modelo T-60, utili-

zando solventes deuterados, conforme indicado em cada caso e tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os deslocamentos químicos dos prótons são informados em  $\delta$  e a multiplicidade é indicada como singlete (s), dubleto (d), tripleto (t), quarteto (q), múltiplo (m) e as constantes de acoplamentos de spin-spin são indicadas como J (Hz), se não é mencionada não foi resolvida.

Os espectros de massa (EM) foram registrados em um espectrômetro de massa Varian modelo MAT 311 A a um potencial de ionização de 70 eV, a temperatura é indicada em cada caso. Os espectros foram graficados em termos da intensidade de cada sinal relativa à mais intensa designado como 100 % e indicando-se só aquelas, cuja intensidade relativa foi maior que 5 %

As atribuições funcionais nos espectros IV foram feitas de acordo com Nakanishi [104] e Bellamy [105] e os deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  de acordo com Bovey [106], Dyer [107] e Jackman [108].

Os espectros de absorção registraram-se em um Espectrofotômetro Karl Zeiss DMR-21.

## 11.5 Tratamentos das Amostras

As cepas de Chromobacterium violaceum do Rio Negro foram fornecidas pelos professores L.R.Caldas e A.C.Leitão da Universidade Federal de Rio de Janeiro e foram mantidas em crescimento em placas de Petri de 10 cm de diâmetro em meio sólido de tioglicolato com 1,2 % de agar a 35 °C e replicada cada 36 horas

### 11.5.1- Fracionamento do Meio Sólido.

A bactéria inoculada nas garrafas de Roux (20 de cada vez) foi extraída exaustivamente por lavagens sucessivas com acetona.

A solução acetônica foi filtrada sobre algodão e concentrada sob vácuo (protegida da luz), obtendo-se 4,50 g de extrato crú. O extrato crú embebido em sílica gel foi fracionado por extração contínua num soxhlet, com clorofórmio, éter etílico e acetona durante 6 horas para cada solvente, tempo que foi mais que suficiente para lograr uma extração total.

As respectivas soluções orgânicas foram secadas sobre  $MgSO_4$  anidro e concentradas separadamente produzindo os resíduos denominados como Ext.  $CHCl_3$  (2,1 g), Ext.  $Et_2O$  (1,3 g) e Ext.  $Me_2CO$  (70 mg).

As análises cromatográficas de camada delgada nos sistemas a e e (vide seção II.2.1 pag 15) indicaram que os extratos clorofórmicos e etéreo apresentam muitos componentes. Com a finalidade de obter extratos mais limpos a solução acetônica original foi concentrada até suspensão (aproximadamente 100 ml) e extraída por várias vezes com volumes iguais de uma mistura composta de acetato de etila-água (2:1) até obter a fase orgânica incolor. As soluções de acetato de etila foram reunidas e secadas sobre  $MgSO_4$  anidro, em seguida concentradas em um evaporador rotatório e o extrato crú assim obtido pesou 4,2 g. Este extrato crú foi tratado da mesma forma que o anterior, fornecendo um Ext.  $CHCl_3$  (2,05 g), um Ext.  $Et_2O$  (1,07 g) e um Ext.  $Me_2CO$  (30 mg).

O extrato clorofórmico e a solução aquosa não foram trabalhadas

#### II.5.1.1- Fracionamento do Extrato Etéreo

As análises cromatográficas nos diferentes sistemas mostraram a presença de dois compostos majoritários entre vários componentes menores.

2 g de Ext.  $Et_2O$  misturados com adsorvente cromatográfico foi



colocado na parte superior de uma coluna (2x40 cm) de  $\text{SiO}_2$  (atividade 1) e eluído com benzeno-acetona (3:1), o que permitiu separar 8 frações.

Das frações 6 e 7 recromatografadas no sistema b (vide seção II.2.1 pag.15) foi isolado um composto denominado como CV-3 (27 mg).

Da fração 3 isolou-se um composto que se apresentou amorfo de cor roxo. Não foi possível cristalizar (3 mg) e foi denominado como CV-2.

As outras frações não foram trabalhadas.

#### II.5.1.2- Fracionamento do Extrato Acetônico.

100 mg de extrato acetônico foram submetidas a separação em c.c.p. mediante eluições contínuas utilizando o sistema b (vide seção II.2.1 pag.15). Uma faixa de cor azul intenso foi separada desta placa cromatográfica e o constituinte aderido na fase estacionária foi extraído com metanol e filtrado em funil de vidro sinterizado. Obteve-se 8 mg de um composto puro que apresentou uma coloração azul intenso que cristalizou em benzeno-acetona e foi denominado como pigmento-I

#### II.5.2- Fracionamento do Meio Líquido.

Chromobacterium violaceum contida no meio líquido foi extraída pelo seguinte procedimento: O meio de cultura foi separado da cepa por filtração sobre algodão. As células foram lavadas várias vezes com água destilada até eliminação total de tioglicolato, ficando prontas para uma extração com acetato de etila. Esta extração foi feita por simples lavagens das bactérias, obtendo-se uma solução de cor azul intenso que foi secada sobre  $\text{MgSO}_4$  anidro e logo concentrada em evaporador rotatório. Foram obtidos 2,1 g

de extrato cru, o qual foi fracionado por cromatografia de coluna (4x60 cm), utilizando S10 atividade I (250 g) e benzeno-acetona (3:1) como eluente. Das frações 5-7, obtiveram-se 14 mg de pigmento I.

Os dados espectroscópicos do pigmento I estão resumidos abaixo:

UV  $\lambda$  max / nm (log  $\epsilon$ ): 260 (4,29), 296 (3,96), 376 (3,83), 577 (4,39)

IV  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 3250, 3100, 1680, 1655, 1610.

RMN  $^1\text{H}$ ,  $\delta$ : 12,1 (s,1H), 8,1 (s,1H), 7,35 (s,1H), 7,40 (s,1H), 6,82 (d,1H) J=4 Hz, 10,82 (s,1H), 7,6 (s,1H), 11,0 (s,1H), 8,90 (s,1H), 7,1 (t,1H) J=4 Hz, 7,25 (d,1H) J=4 Hz, 6,90 (d,1H) J=4 Hz.

EM m/e (%) : M+ 343 (27,5), 327 (9,15), 315 (5), 134 (12,4), 133 (100), 132 (10), 105 (40), 104 (81), 98 (17), 84 (46), 78 (29).

### 11.5.3- Fracionamento das Frações 6-7.

110 mg das frações 6-7 foram submetidas a separação em c.c.p sistema b (vide seção 11.2.1 pag.15), uma faixa fluorescente de Rf 0,76 foi separada da placa, o composto adsorvido sobre a sílica gel foi extraído por lavagens sucessivas com clorofórmio e filtrado. A solução clorofórmica foi concentrada em evaporador rotatório e obteve-se 37 mg de um óleo fluorescente esverdeado que não foi possível cristalizar. Este composto foi denominado como CV-3 e as características espectroscópicas são as seguintes:

UV  $\lambda$  max /nm (log  $\epsilon$ ): 226 (5,11), 274 (4,64), 284 (4,59), 396 (4,40).

IV  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 3450, 1730, 1600, 1580, 1280.

RMN<sup>1</sup>H,  $\delta$ : 0,62 (s,9H), 0,90 (t,18H) J=7 Hz., 1,1-1,6 (m,36H), 2,1 (s,OH), 4,2 (d,4H) J=5 Hz., 7,4 (d,2H) J=6 Hz., 7,6 (d,2H) J=6Hz.

EM m/e (%) : M+,644 (72), 626 (8), 601 (12), 561 (58), 517 (11) 487 (26), 445 (60), 420 (56), 390 (64), 373 (67), 375 (59), 361 (7), 345 (23), 149 (100).

## II.6 Reações de Transformação do Pigmento I

### II.6.1- Síntese do Acetato.

50 mg de pigmento I misturaram-se intimamente com 50 mg de acetato de sódio e 1,5 ml de anidrido acético [109]. A solução assim obtida foi refluxada a 80 °C com agitação magnética. O transcurso da reação foi acompanhado por c.c.d. no sistema a (vide seção II.2.1 pag.15) e quando esta mostrou o consumo total de pigmento I, a reação foi vertida sobre água com gelo e extraída com benzeno. A fração benzênica foi purificada por c.c.p. no sistema e (vide seção II.2.1 pag.15). Isolou-se um composto puro (36 mg) que cristalizou em benzeno-acetona em forma de agulhas escuras e funde a uma temperatura acima que 300 °C. O composto foi denominado como pigmento-I Acetilado. Seus dados espectroscópicos são os seguintes:

UV  $\lambda$  max /nm (log  $\epsilon$ ): 235 (4,43), 265 (4,33), 300 (4,00), 560 (4,21).

IV  $\nu$  cm<sup>-1</sup>: 1780, 1740, 1650, 1550.

RMN<sup>1</sup>H,  $\delta$ : 7,75 (s,1H), 7,25 (d,1H), 7,0-7,2 (sinal largo,3H), 7,80 (s,1H), 8,30 (t,1H), 8,4 (d,1H), 9,05 (d,1H) J=7 Hz, 2,30 (s,3H), 2,35 (s,3H), 2,50 (s,3H), 2,55 (s,3H).

EM m/e (%) : 511 (48,25), 496 (23), 469 (52,6), 468 (75), 426 (31), 425 (60), 343 (100), 174 (47), 175 (8), 176 (92), 132 (84)

### II.6.2- Síntese do Sal Sódico.

Foi preparado de acordo ao método descrito na referência [109] 50 mg de hidreto de sódio (2,17 mmol) foram lavadas com n-pentano em um balão tritubulado, equipado com termômetro e funil de adição sob atmosfera de nitrogênio e adicionados 10 ml de THF anidro. Uma solução de 130 mg (0,3790 mmol) de pigmento I em THF (5 ml) foi adicionada a través do funil ao balão de reação. A mistura de reação foi agitada magnéticamente a 0°C. O transcurso da reação foi seguido por c.c.d. no sistema b (vide seção II.2.1 pag.15), sendo que o desaparecimento do pigmento I foi observado a poucos minutos do início desta. Após 30 minutos de agitação, a mistura de reação foi vertida sobre um excesso de diclorometano e o precipitado formado foi separado por filtração.

Obteve-se 147,5 mg de um composto que recristalizado em acetona-água fundiu a acima de 400 °C.

O número de equivalentes de sódio por equivalente de pigmento I foi calculado a partir dos resultados das seguintes experiências:

a) Uma titulação ácido-base, utilizando um pH-metro modelo E 512 Metrohm Herisau. 60,1 mg de pigmento I-sódico que foram dissolvidos em água destilada e completado a 5 ml em balão volumétrico (o pH da solução é 10,5), foram adicionados 5 ml de solução de ácido clorídrico 0,1 N que mudou o pH para 3,2. O excesso de ácido foi então titulado com solução de hidróxido de sódio 0,0816 N.

b) 16,94 mg de pigmento I-sódico foram dissolvidos em 1 ml de

uma solução de 0,05 M de ácido sulfúrico e se agitou a temperatura ambiente por alguns minutos. Logo depois foi extraída por sucessivas vezes com volumes iguais de acetato de etila. A solução de acetato de etila foi secada sobre sulfato de sódio anidro e concentrada em um evaporador rotatório. O extrato obtido foi redissolvido em acetato de etila completando 1 ml em um balão volumétrico. A solução de acetato de etila foi colocada em uma cela de quartzo e sua absorvância foi lida a  $\lambda$  577 nm, a concentração final do pigmento I foi calculada através de uma curva de calibração.

A informação espectroscópica da sal sódica obtida é a seguinte:

UV  $\lambda_{\text{max}}$  /nm (log  $\epsilon$ ): 247 (4,53), 280 (4,49), 302 (4,37), 378 (4,22)

IV  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  : 3030, 1680, 1610, 1550

RMN  $^1\text{H}$   $\delta$ : 6,90 (d, 1H), 7,00 (t, 2H), 7,05 (d, 1H), 7,15 (d, 1H), 7,20 (d, 1H), 7,25-7,45 (m, 2H), 7,55 (d, 1H), 7,60 (d, 1H), 7,70 (d, 1H).

### II.6.3- Síntese de Metilol:

Foi preparado seguindo o procedimento indicado na referência [110]; A 80 mg (0,23 mm) de pigmento-I, dissolvidos em 5 ml de THF (procedência Aldrich), foram adicionados 2 ml de ácido perclórico aquoso a 5% e 1 ml de solução aquosa de formaldeído a 37% (Fischer). O transcurso da reação foi seguida por c.c.d. no sistema  $\alpha$  (vide seção II.2. 1 pag.15) e após 1 hora de agitação a mistura de reação foi neutralizada com solução saturada de bicarbonato de sódio e filtrada. O filtrado foi diluído com acetato de etila e lavado com solução saturada de bicarbonato de sódio (2 x 15 ml). A solução de acetato de etila foi secada sobre sulfato de sódio

anidro e concentrada em evaporador rotatório, obtendo-se um sólido de cor azul claro (65 mg), que induzido a cristalizar em acetato de etila/n-hexano forneceu 48 mg de um composto cristalino de cor azulado que fundiu com decomposição a temperatura acima de 290 °C.

Os dados espectroscópicos são apresentados a continuação:

UV  $\lambda$  max. /nm (log  $\epsilon$ ) : 232 (3,78), 2,60 (3,63), 275 (3,54), 390 (3,53), 530 (3,68).

IV  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$  : 3250, 2950, 1680, 1650.

RMN  $^1\text{H}$   $\delta$ : 9,78 (s, 1H), 9,10 (d, 1H), 8,25 (s, 1H), 7,62 (s, 1H), 7,40 (s, 1H), 7,35 (s, 1H), 7,00-7,30 (m, 2H), 6,90 (d, 1H), 6,80 (m, 1H), 4,95 (s, 6H).

EM m/e (%) : M+, 433 (100), 432 (61), 405 (11), 404 (57), 402 (49), 164 (14), 163 (77), 161 (32), 105 (41), 104 (19), 78 (30)

#### II.6.4- Síntese de Pigmento I-Br.

Foi preparado de acordo com o método utilizado por Erickson e colaboradores [111]. 40 mg de pigmento I foram dissolvidos em dois ml de piridina resfriada em um banho de gelo e foi adicionado gota a gota uma quantidade equivalente de perbrometo de piridínio. O consumo de substrato foi monitorizado por c.c.d. no sistema a (vide seção II.2.1 pag.15) e 5 minutos após de completada a reação, foi adicionado  $\text{NaHCO}_3$  (10 %) e extraído com éter etílico. A solução etérea foi lavada com bicarbonato aquoso saturado de  $\text{NaCl}$ , a fase etérea foi secada com  $\text{MgSO}_4$  anidro e cromatografado sobre c.c.p. no sistema d (vide seção II.2.1 pag.15), (por duas vezes). Obtiveram-se 32 mg de composto puro ( $R_f$  0,61) que cristalizou em éter-metanol e fundiu a temperatura acima que 300 °C com decomposição.

UV  $\lambda$  max /nm (log  $\epsilon$ ): 263 (4,19), 310 (3,72), 495 (4,42), 570 (449)

IV  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ : 3450, 3200, 1730, 1750.

RMN  $^1\text{H}$   $\delta$ : 10,90 (s, 1H), 10,80 (s, 1H), 9,55 (s, 1H), 8,90 (s, 1H), 8,25 (s, 1H), 7,55 (d, 1H), 7,40 (m, 1H), 7,25 (d, 1H), 7,20 (d, 1H), 7,10 (s, 1H), 6,95 (d, 1H)

EM m/e (%) : 503 (7,6), 501 (M+, 17), 499 (8,2), 475 (3,6), 473 (8), 471 (4), 213 (100), 211 (98), 132 (50), 131 (37), 105 (27), 105 (27), 104 (12), 78 (48).

#### II.6.5- Tentativa de Oxidação com Reagente de Jones.

40 mg de CV-3 (vide seção II.5.3 pag. 20), foram dissolvidos em 5 ml de acetona e agregou-se 2 ml de reagente de Jones [112].

A mistura da reação foi mantida durante um dia a temperatura ambiente. O excesso de oxidante foi destruído com gotas de metanol, diluiu-se com água e extraiu-se com clorofórmio. Depois de secar a solução clorofórmica sobre sulfato de sódio anidro foi evaporado obtendo-se uma substância oleosa.

Por análise de c.c.d. no sistema a (vide seção II.2.1 pag. 15) no transcurso da reação se verificou que o produto CV-3 é inerte ao reagente de Jones. Foram recuperados por c.c.p. no sistema a 33 mg (82,5 %) de CV-3

#### II.6.6- Tentativa de Acetilação de CV-3.

A uma solução de CV-3 (30mg) em  $\text{Ac}_2\text{O}$  (3ml) foram adicionadas 3 gotas de piridina e foi guardada a temperatura ambiente por 24 horas [112]. Ao término deste tempo a mistura de reação foi analisada por c.c.d. no sistema a (vide seção II.2.1 pag. 15) o que se verificou a ausência de qualquer produto. Seguidamente, foi refluxada por 6 horas e depois de analisada por c.c.d. foi obser-

vado que CV-3 é inerte à acetilação. Por c.c.p. sistema a (vide seção II.2.1 pag. 15 ) foram recuperados 17 mg (56,7 %).

## II.7- Otimização do Crescimento Celular

### II.7.1- Velocidade de Crescimento.

Células de 36 horas de crescimento de Chromobacterium violaceum foram inoculados em uma garrafa de Roux (que continha um meio sólido de cultivo, cuja composição era de 3% de tioglicolato e 1,5 % de agar) e incubadas a 30 °C em ausência de luz. As células foram removidas da garrafa em intervalos de tempo de crescimento diferente e levadas a secagem a 70 °C por 12 horas.

Quantidades de células secas e pigmentadas entre 2,5 e 3,5 mg foram pesadas em um balão volumétrico, completando o volume de 5 ml com etanol e após 10 minutos agitação, uma alíquota de 1 ml foi retirada e lida a absorvância a  $\lambda$  577 nm em um espectrofotômetro Micronal (modelo B-382). As concentrações de pigmento I foram calculadas utilizando o valor de  $\epsilon$  ( $2,5 \times 10^4$ ) a um caminho óptico de 1 cm..

### II.7.2-Efeito da Temperatura.

200  $\mu$ L de uma suspensão de células pigmentadas, de 36 horas de crescimento, foram agregadas a cada um dos 5 matrizes Monod contendo 10 ml de meio líquido de tioglicolato e incubados a diferentes temperaturas selecionadas. Depois de 14 horas de incubação, cada amostra recebeu 1 ml de etanol adicional e depois de cinco minutos de agitação foi lida a sua absorvância em um espectrofotômetro Micronal (modelo B-382) a  $\lambda$  577 nm, a concentração do pigmento foi calculada em função do valor de  $\epsilon$  ( $2,5 \times 10^4$ ) e caminho óptico de 1,0 cm.



### 11.7.3-Efeito de Aminoácidos Sobre o Crescimento

200  $\mu$ L de inóculo foram transferidos a um matraz Monod contendo como meio de cultivo (previamente esterilizado), 15 ml de uma composição de aminoácidos como fonte de N, C e sais minerais contendo por 100 ml de meio: 0,5 mg de  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 100 mg de  $\text{MgCl}_2$ ; 600 mg de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 50 mg de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ; 147,33 mg de DL-alanina, 20,66 mg de DL-triptofano, 8 mg de treonina, 12 mg de L-lisina, 106,6 mg de DL-metionina, 6,6 mg de DL-fenilalanina, 8,6 mg de L-leucina 6,6 mg de tirosina, 6,6 mg de DL-valina, 9,3mg de arginina (todos de procedencia Sigma) ajustada a pH 7,2 e incubadas a 30  $^{\circ}\text{C}$  sem luz. Após 16 horas de crescimento foi agregada à amostra de meio de cultura 2 ml de etanol a 95%, agitada por alguns minutos e a absorvância da suspensão foi lida a  $\lambda$  720 nm.

Neste experimento para crescimento bacterial, o meio padrão corresponde àquele que contem todos os aminoácidos e sais minerais, exceto de um aminoácido na composição do meio o que corresponde à amostra em estudo.

### 11.7.4-Efeito da Concentração de Triptofano

Foram inoculados, com 200  $\mu$ L de suspensão estoque de células com 36 horas de crescimento de Chromobacterium violaceum, 25 erlenmeyers contendo 15 ml de solução aquosa de tioglicolato a 1,5% aquoso como meio padrão. Os frascos foram distribuídos em 4 séries de 6 erlenmeyers, contendo adicionalmente quantidades diversas de soluções de (20 mg/100 ml) de L-triptofano ou D-triptofano ou DL-triptofano ou DL-politriptofano (de procedência Sigma).

O meio de cultura foi incubado a 30  $^{\circ}\text{C}$  sem luz e depois de 4 horas o crescimento foi interrompido com 2 ml de etanol e agitação. Uma alíquota de 3 ml da mistura de reação foi lida a absorvância

cia do pigmento I a  $\lambda$  577 nm, com um caminho óptico de 1 cm. Sua concentração foi calculada com o valor de  $\epsilon$  ( $2,5 \times 10^4$ ).

#### 11.7.5-Efeito da Concentração de Metionina e Vitamina B-12.

Seis erlenmeyers de 100 ml foram inoculados com 100  $\mu$ L de cepa fresca de Chromobacterium violaceum, contendo como meio de cultivo, 15 ml de uma solução cuja composição por 100 ml de meio é 1,5 g de tioglicolato (Bio-Bras). Foi adicionado para cada matraz (total 5) somente um dos seguintes nutrientes: 3 mg de D-metionina, 3 mg de L-metionina, 3 mg de DL-metionina (de procedência Sigma) 3 mg de N-acetil,L-metionina e 0,5  $\mu$ g de vitamina B-12 (de procedência Merck).

O meio foi mantido por 16 horas com agitação a 28 °C. Depois de adicionar 2 ml de etanol a cada erlenmayer, a absorbância foi lida a  $\lambda$  577 nm.

#### 11.7.6-Consumo de Oxigênio em Diferentes pH

Utilizou-se um oxígrafo termostaticado com agitação magnética YSI modelo 59.

Como amostra estoque de inóculo, foi utilizada uma suspensão de 0,6 mg de células de 36 horas de incubação de Chromobacterium violaceum por ml de água destilada em um balão volumétrico de 5 ml. Uma série de 16 erlenmeyers de 50 ml contendo 5 ml de meio tioglicolato na faixa de pH entre 3,0 e 8,2 (com uma diferença de 0,3 unidades de pH entre cada erlenmayer da série) foram inoculados com 100  $\mu$ L da suspensão estoque. Após uma hora de incubação a 28 °C, 4 ml de amostra de cada erlenmayer foram colocados no reservatório do eletrodo específico de oxigênio e individualmente medido o consumo de oxigênio. A velocidade do registrador foi de 20 cm/h.

As soluções tampões foram preparadas a partir de HAc 0,3 M; NaAc 0,3 M e NaCl 0,5 M [112].

#### 11.7.7-Crescimento Celular e Síntese de Pigmento I em Diferentes pH

Uma amostra estoque composta por 5 ml de uma suspensão que contém 0,8 mg de células de 36 horas de crescimento de Chromobacterium violaceum por ml de água destilada, foi utilizada.

De uma série de 19 erlenmeyers de 125 ml contendo 10 ml de meio líquido tioglicolato, 18 foram inoculados com 100  $\mu$ L de suspensão estoque e incubadas a 28 °C com agitação, protegidos da luz; O erlenmeyer não inoculado permaneceu como controle do meio.

A determinação do pigmento I foi feita lendo a absorbância a  $\lambda$  577 nm em um espectrofotômetro Micronal em diferentes tempos de incubação até completar 14 horas de crescimento. Para isto foi necessário adicionar na cela 200  $\mu$ L de etanol à 95 %.

As leituras de turbidez da suspensão celular foram feitas a 720 nm. Este experimento foi feito a pH 6,4; 6,8; 7,2; 7,5 e 7,8 respectivamente.

#### 11.7.8- Efeito do pH Sobre o Crescimento Celular em Presença de Metionina e Vitamina B-12.

Doze matrizes Monod que continham como meio de cultivo, 15 ml de solução de tioglicolato aquoso (1,5 %, previamente esterilizado) enriquecido com 1  $\mu$ g/ml de DL-metionina e 0,5 ng/ml de vitamina B-12, onze foram inoculados com 100  $\mu$ L de células de 36 horas de crescimento de Chromobacterium violaceum, permanecendo um em branco.

Os meios de cultivos tamponados entre a faixa de pH 2,5 e 8,2 foram preparados por dissolução do tioglicolato, sobre as solu-

ções tampões previamente escolhidos e preparados por quantidades apropriadas de soluções de ácido fosfórico e sais de potássio (mantendo constante a concentração de fosfato 0,3 M), correspondendo um pH diferente para cada matraz. Após de 6 horas de incubação a 28 °C o crescimento foi detido com 500 uL de etanol 95 % e foram lidas as absorbâncias a  $\lambda$  720 nm e a  $\lambda$  577nm .

#### 11.7.9- Mutação Fotoquímica.

A irradiação da cepa foi efetuada com uma lâmpada de Mercúrio OSRAM HQL ( $\lambda > 254$  nm) a diferentes velocidades de fluência.

A fluência da lâmpada foi determinada com um radiômetro YSI-Kettering modelo 55 A nos comprimentos de onda  $\lambda > 254$  nm (108,0 w/m<sup>2</sup>) e  $\lambda > 300$  nm (68,4 w/m<sup>2</sup>).

A irradiação da cepa de Chromobacterium violaceum, de 12 horas de incubação em meio tioglicolato (3%)-agar (1,2%) em placa de Petri, foi realizada recobríndo-se a placa com papel de alumínio com uma abertura retangular de 1x8 cm a uma distância entre 15-20 cm. Imediatamente após o término da fotólise, a bactéria foi replicada em placa de Petri com igual nutriente e incubada a 28 °C.

Colônias vermelhas selecionadas, onde as placas ressemeadas, foram inoculadas em garrafas de Roux e após de 6 dias de incubação a 28 °C, foram extraídas por lavagens sucessivas com clorofórmio. Por análises de c.c.d. sistema a (vide seção II.2.1 pag. 15), o extrato clorofórmico mostrou a presença de dois compostos majoritários de Rf 0,37 e 0,81 respectivamente.

#### II.8 Ensaio Biológicos .

Foram enviadas amostras do pigmento I e de pigmento I-Br ao Doutor Victoriano Campos da Faculdade de Ciências da Universida-

de Católica de Valparaíso-Chile, para serem submetidas a testes de atividade anti-tripanosomais.

Os trabalhos experimentais foram realizados pelo grupo do Dr. Campos, e os resultados aqui apresentados são ensaios preliminares *in vitro*.

As formas de cultivos de Trypanosoma cruzi, cepa Tulahuen, foi mantida em meio de Senekjic para estoque e em meio Phillip para crescimentos e ensaios.

#### II.8.1- Curva de População.

De uma série de 18 matraz Monod contendo cada um 20 ml de meio Phillip, 17 foram inoculados (um permanece como controle) com 500  $\mu$ L de cultura de Trypanosoma cruzi e incubados durante 12 dias a 28 °C alcançando uma concentração de  $2 \times 10^6$  protozoos por ml de meio, instante que se separam em dois grupos: O primeiro formado por três séries de 3 Monod mais um controle, ao que adicionou-se pigmento I e pigmento I-Br dissolvidos em acetona e metanol a uma concentração de 10, 50 e 100  $\mu$ g/ml de meio; O segundo grupo está formado por duas séries de 3 Monod mais um controle, aos que adicionou-se os solventes em razão de 10, 50 e 100  $\mu$ g/ml de meio.

O estudo do efeito dos compostos e seus solventes foi realizado após 1, 6, 8, 9 e 20 horas de sua inoculação, correlacionando os seguintes parâmetros:

- a.-Leitura de absorbância a  $\lambda$  540 nm do meio Phillip.
- b.-Contagem de protozoos em câmara Hemacitômetro de Neubauer.
- c.-Mobilidade e formas flageladas percentuais
- d.-Morfologia e afinidade de se-tingir para estudo microfotográfico

### II.8.2- Curva de Crescimento.

A distribuição dos 18 Monod foi feita como foi indicado no item anterior. As séries de Monod contendo: meio Phillip-compostos e meio Phillip-solventes foram aquecidos a 50 °C em banho Maria termoregulável durante 15 minutos.

Uma vez resfriado procedeu-se a inocular os protozoos e incubá-los a 28 °C por 28 dias, correlacionando os mesmos parâmetros do item II.8.1 exceto a morfologia e afinidade de se-tingir.

#### Composição do meio Senekjiek

Bacto Beef extract	50 gr
Neopeptona (BBI)	20 gr
NaCl	5 gr
Bacto agar	20 gr
Água destilada	1000 ml
Sangue desfibrinado de coelho	10 % de meio

#### Composição do meio Phillip#

Triplicase (BBI)	2,0 gr
NaCl	0,7 gr
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,03 gr
Dextrosa	0,5 gr
Água destilada	100 ml
Soro de cavalo	4,0 ml

\*Amer. J. Trop. Med. 23, 523, (1943).

#Amer. J. Trop. Med. 31, 290, (1951).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síntese química do pigmento I, foi reportada por Ballantine e colaboradores [82] e a formação biológica e sua biosíntese, foi sugerida considerando os resíduos que formam parte da estrutura: 5-hidroxiindol, oxindol e hidroxipirrol [113]. Requerimentos nutricionais, em outras cepas de Chromobacterium violaceum e certos fatores fisiológicos envolvidos no crescimento do microorganismo, foram descritos por De Moss e Happel [73].

Os requerimentos nutricionais para a biosíntese do pigmento I são desconhecidos e, observações pouco precisas à respeito tem sido reportadas por Corpe e Gilman [114,115].

Nosso estudo de velocidade de crescimento celular e produção de pigmento I, mostrou que a síntese do pigmento foi evidente depois de 15 horas de incubação da bactéria quando foi utilizado tioglicolato como meio a 30 °C

Na figura 4 pode-se observar que a velocidade de síntese do pigmento I é diretamente proporcional à concentração de células. Uma relação linear entre atividade celular e concentração das células, foi encontrada aoredor das 20 horas de incubação. Os valores experimentais resumidos na tabela IV, representam os valores medios e foram correlacionados com o valor de  $\epsilon (2,5 \times 10^6)$  a  $\lambda$  577 nm e daí calculadas as concentrações do pigmento I. Pode-se observar que a velocidade de síntese vai-se tornando mais lenta à medida que o tempo de incubação aumenta, indicando que o crescimento celular deixa de ser logarítmico, ou seja, o aumento da concentração do pigmento I, já não é observável, embora exista um aumento considerável de concentração celular.

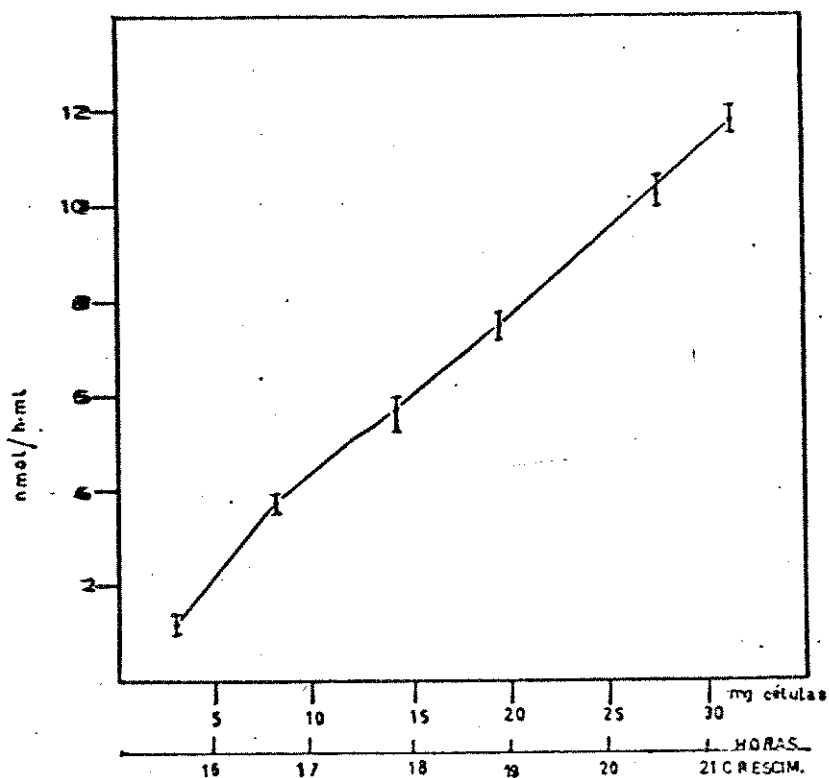


FIG. 4. A velocidade de síntese do pigmento I é função linear do crescimento celular entre 16-21 horas (coef. de correlação é 0,9970) (vide seção II.7.1 pag.26).

TAB. IV. Velocidades Médias de Síntese de Pigmento I

Crescim. Hrs	celulas em peso seco(mg)	Absorbância (λ 577 nm)	Pigmento I (nmol/hora)
16	2,8	0,057	0,14
17	8,3	0,188	0,44
18	14,0	0,285	0,63
19	19,5	0,375	0,79
20	25,2	0,510	1,02
21	31,7	0,594	1,13

O efeito da temperatura no crescimento celular e na activida-



de do microorganismo em sintetizar o pigmento I é apresentado na tabela V (vide seção II.7.2 pag.26). O crescimento celular à 28 °C apresenta maior atividade que as células crescidas a 37, 30, 27 e 23 °C. Isto significa que a velocidade de síntese a 28 °C está sendo favorecida em dez vezes mais do que o crescimento feito a 37 °C. Também pode-se sugerir que a atividade celular para sintetizar o pigmento I a 37 °C é de 10 %, relativo à atividade apresentada com 28 °C. A solubilização do pigmento I na mistura de reação foi facilitada pela adição de um ml de etanol 95 %.

TAB.V.Efeito da Temperatura Sobre a Síntese do Pigmento I.  
(os valores de absorbância apresentam um erro de  $\pm 1,5\%$ )

Temp. (°C)	Absorbância ( $\lambda$ 577 nm)	Vel. de sínteses	
		(nmol/h)	(%)
23	0,276	5,52	84
27	0,296	5,92	90
28	0,329	6,58	100
30	0,240	4,80	72
37	0,042	0,84	10

Dos requerimentos nutricionais ensaiados da tabela VI (vide seção II.7.3 pag.27), só metionina é absolutamente requerido para o crescimento. Alanina, arginina e triptofano estimulam o crescimento somente em presença de todos os outros amino ácidos. A menor percentagem de crescimento obtido para a ausência de metionina, indica provavelmente, que este nutriente poderia estar presente no caminho metabólico da síntese do pigmento I. O tratamento com etanol não afeta a turbidez se a leitura é feita antes

de cinco minutos. Foi observado que após dez minutos a absorvância diminui e isto é explicado pelo aparecimento de precipitado que deve ser C. violaceum.

Quando este experimento foi repetido nas mesmas condições, os valores da absorvância mostraram que o crescimento relativo é reprodutível em aproximadamente 96 %.

TAB.VI.Efeito de Amino ácidos Sobre o Crescimento.

Amino ácido Omitido ( $\mu\text{g}/15\text{ml}$ )	Crescimento (Abs. $\lambda$ 720 nm)	Crescimento Relativo (%)
Nenhum	0,410	100,00
Alanina (22,1)	0,187	45,60 $\pm$ 1,7
Triptofano (3,1)	0,281	68,53 $\pm$ 1,3
Treonina (1,2)	0,342	83,41 $\pm$ 2,7
Lisina (1,8)	0,331	80,73 $\pm$ 3,1
Metionina (16)	0,058	14,14 $\pm$ 1,0
Fenilalanina (1,0)	0,395	96,48 $\pm$ 0,3
Leucina (1,3)	0,360	87,80 $\pm$ 2,9
Valina (1,0)	0,389	94,87 $\pm$ 3,7
Arginina (1,4)	0,299	72,92 $\pm$ 2,8
Tirosina (1,0)	0,427	104,14 $\pm$ 1,0

A capacidade do microorganismo em preferir alguns destes substratos, foi verificada em experimentos separados.

O efeito da concentração de triptofano na síntese do pigmento I pode ser observado na figura 5 (vide seção II.7.4 pag.27), onde a absorvância do composto sintetizado é função linear da concentração de L-triptofano. A proporcionalidade demonstrada pelas concentrações do racemato triptofano foi devido a atividade indu-

zida pelo isômero L-triptofano, já que foi observado que o D-triptofano não produz efeito sobre o crescimento bacterial.

Uma concentração de 120  $\mu\text{g}/15\text{ml}$  do L-triptofano apresentou uma absorvância de 0,283 e de 240  $\mu\text{g}/15\text{ml}$  do racemato DL-triptofano apresentou uma absorvância igual a 0,296 a  $\lambda$  577 nm.. A proximidade destes dois valores demonstram que, aproximadamente o mesmo efeito na atividade celular é provocado confirmando que só L-triptofano (50 % do racemato apresenta atividade) é requerido na síntese do pigmento I

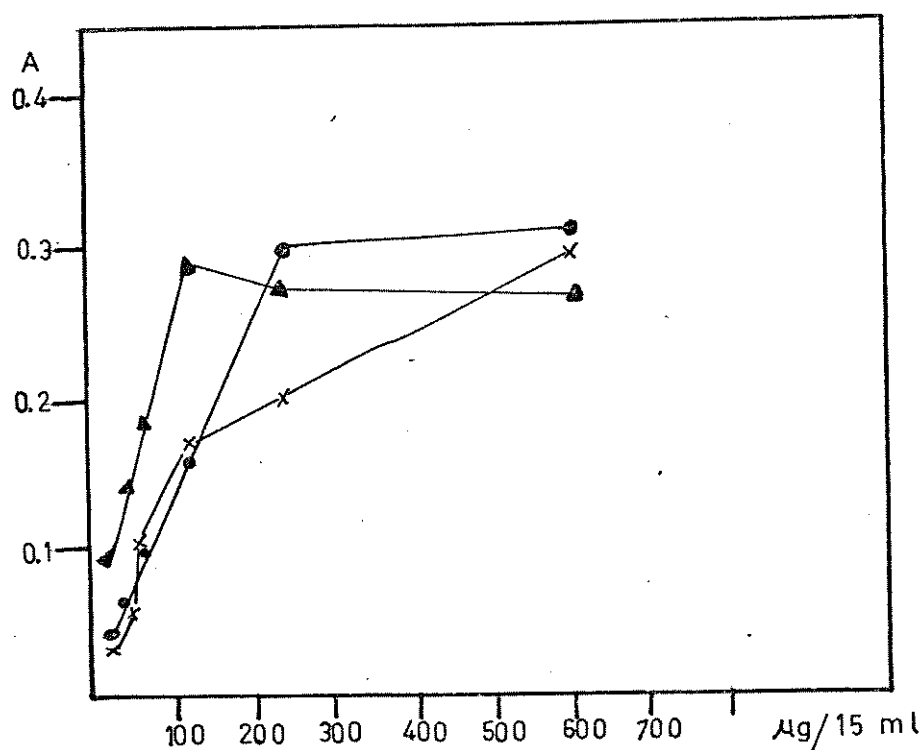


FIG.5.Efeito de triptofano na síntese do pigmento I. A absorvância do pigmento I não é observada quando se utiliza no meio de cultura do microrganismo, o D-triptofano como nutriente -▲-L-triptofano, -●-DL-triptofano, -x- politriptofano (vide seção II.7.4 pag.27 ).

Concentrações limites de L-triptofano também são requeridas.

Concentrações elevadas de L-triptofano apresentam um efeito inibidor no crescimento celular e este fenômeno recebe o nome de retroinibição [116].

e está presente em muitos microorganismos produtores de metabólitos [5].

Na tabela VII observa-se o crescimento relativo do microorganismo induzido pela presença da metionina e da vitamina B-12 (vide seção II.7.5 pag.28). A atividade celular é promovida pela presença de: racemato DL-metionina, D-metionina e L-metionina. Esta não estereoespecificidade da bactéria, foi também observada por De Moss e Happel [52] em outra cepa, a *Chromobacterium violaceum* strain ATCC 553. Devido ao fato que D- ou L-metionina favorece a atividade celular na síntese do pigmento, sugere-se que a mistura racêmica DL-metionina esta presente no metabolismo do microorganismo. Quando o crescimento é realizado em presença de vitamina B-12 e N-acetil-L-metionina, pode-se sugerir que existe a possibilidade de substituir parcialmente a presença de metionina.

TAB.VII .Requerimento de Metionina e Vitamina B-12 no Crescimento

Nutriente adicionado ( $\mu\text{g}/15\text{ml}$ )	Crescimento Abs. ( $\lambda$ 720 nm)	Cresc. Relativo (%)
Nenhum	0,038	5,35 $\pm$ 2,0
DL-Metionina (450)	0,710	100,00
D-Metionina (450)	0,603	84,92 $\pm$ 1,7
L-Metionina (450)	0,755	106,33 $\pm$ 2,0
N-acetil,L-Metionina (450)	0,720	101,48 $\pm$ 1,0
Vitamina B-12 (0,75)	0,410	57,74 $\pm$ 3,4

A quantidade de pigmento I não aumenta consideravelmente quando metionina e vitamina B-12 são incorporados como nutriente ao meio, a maior produção de pigmento I é alcançada em um período de tempo menor que quando metionina e vitamina B-12 são omitidos. A velocidade de crescimento e a atividade celular na produção biossintética é evidente após 4 horas de incubação na presença de metionina e vitamina B-12, em contra de 16 horas, na ausência destes dois nutrientes, comparar figuras 4 e 6.

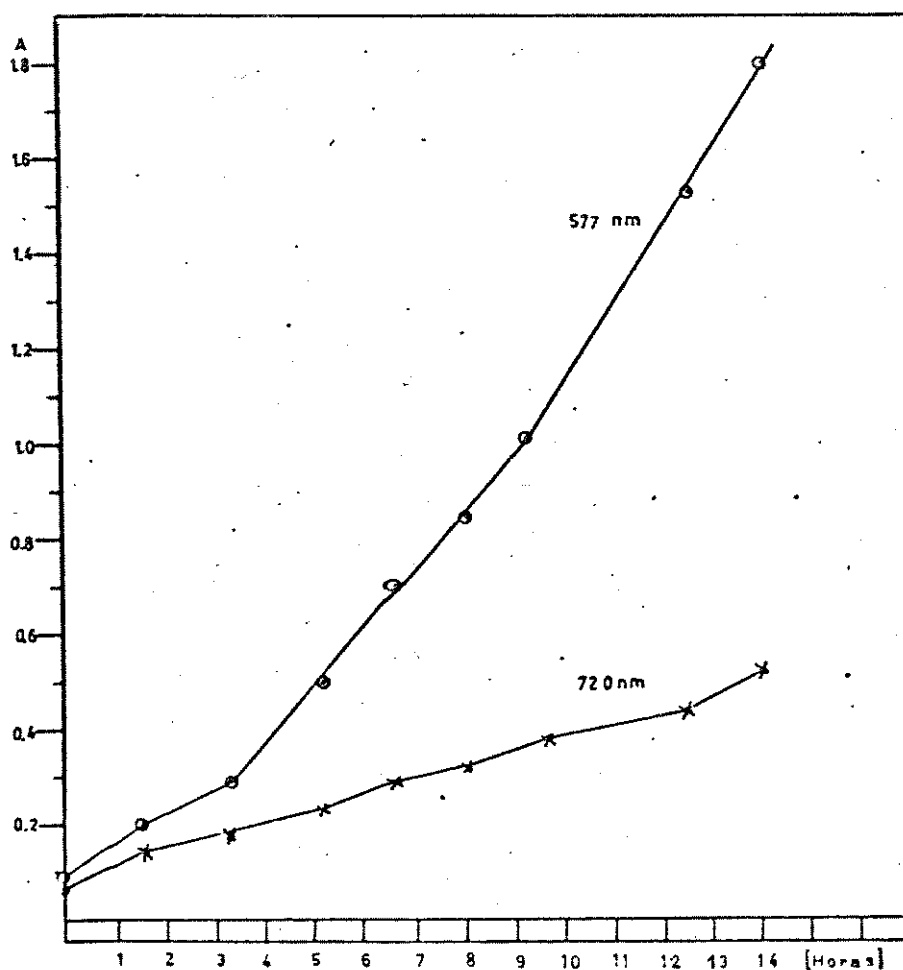


FIG.6. Crescimento celular (720 nm) e produção do pigmento I (577 nm) na presença de metionina (30  $\mu\text{g/ml}$ ) e vitamina B-12 (0,05  $\mu\text{g/ml}$ ) (vide seção 11.7.5 pag.28).

Um meio de cultura com mais de 48 horas de incubação produz células mutantes de uma cor branca que não sintetizam o pigmento. Depois de várias repicadas começam a reverter, originando células iguais às nativas. Quando cepas de oito dias de incubação são re-semeadas, a probabilidade de ressuscitar as células para obter bactérias jovens, é muito baixa, porém si o nutriente é enriquecido com metionina e/ou vitamina B-12, a probabilidade de obter bactérias jovens é muito alta.

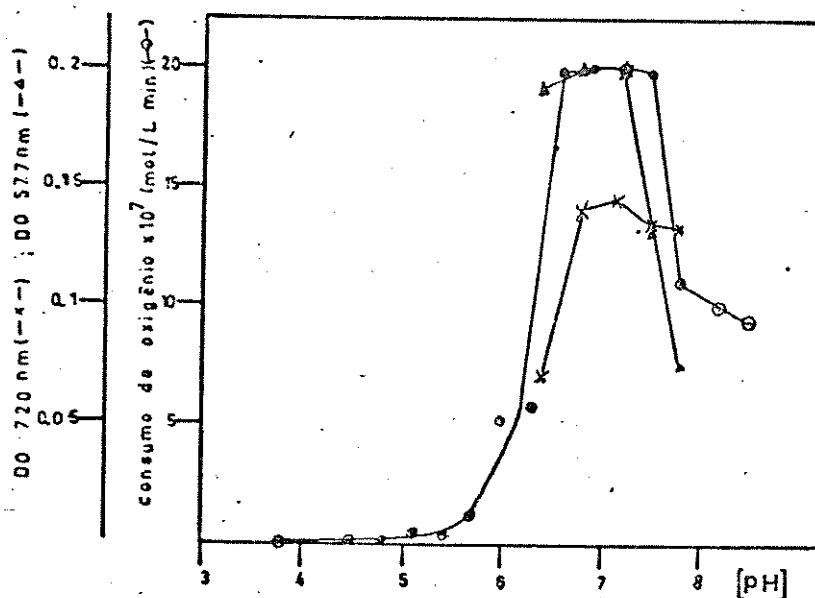


FIG.7. Crescimento celular como consumo de oxigênio (••) entre pH 3,0-8,2. Crescimento celular (x) e produção do pigmento I (▲) como absorvância, depois de 1,5 hora de incubação entre pH 6,4 e 7,8 (vide seção II.7.6 pag. 28).

O efeito do pH no crescimento foi seguido medindo o consumo de oxigênio. A figura 7 (vide seção II.7.6 pag 28 ) mostra os resultados obtidos neste experimento. Sabe-se que em um sistema celular aeróbico, um maior consumo de oxigênio significa uma maior

reprodução celular ou quando a população celular alcança seu maior crescimento.

A faixa de pH entre 6,6 e 7,5 corresponde ao maior consumo de oxigênio ( $19,9 \times 10^7$  mol /l min), portanto deveria ser a faixa de pH onde o microorganismo alcançaria sua maior velocidade de crescimento; Também pode-se observar que o crescimento não é favorecido nas regiões de pH ácido, em valores de pH superior a 5 o crescimento celular é debilmente favorecido até que em pH 7,2 o microorganismo alcança sua máxima velocidade de reprodução e logo após pH 8.2 começa a decair lentamente.

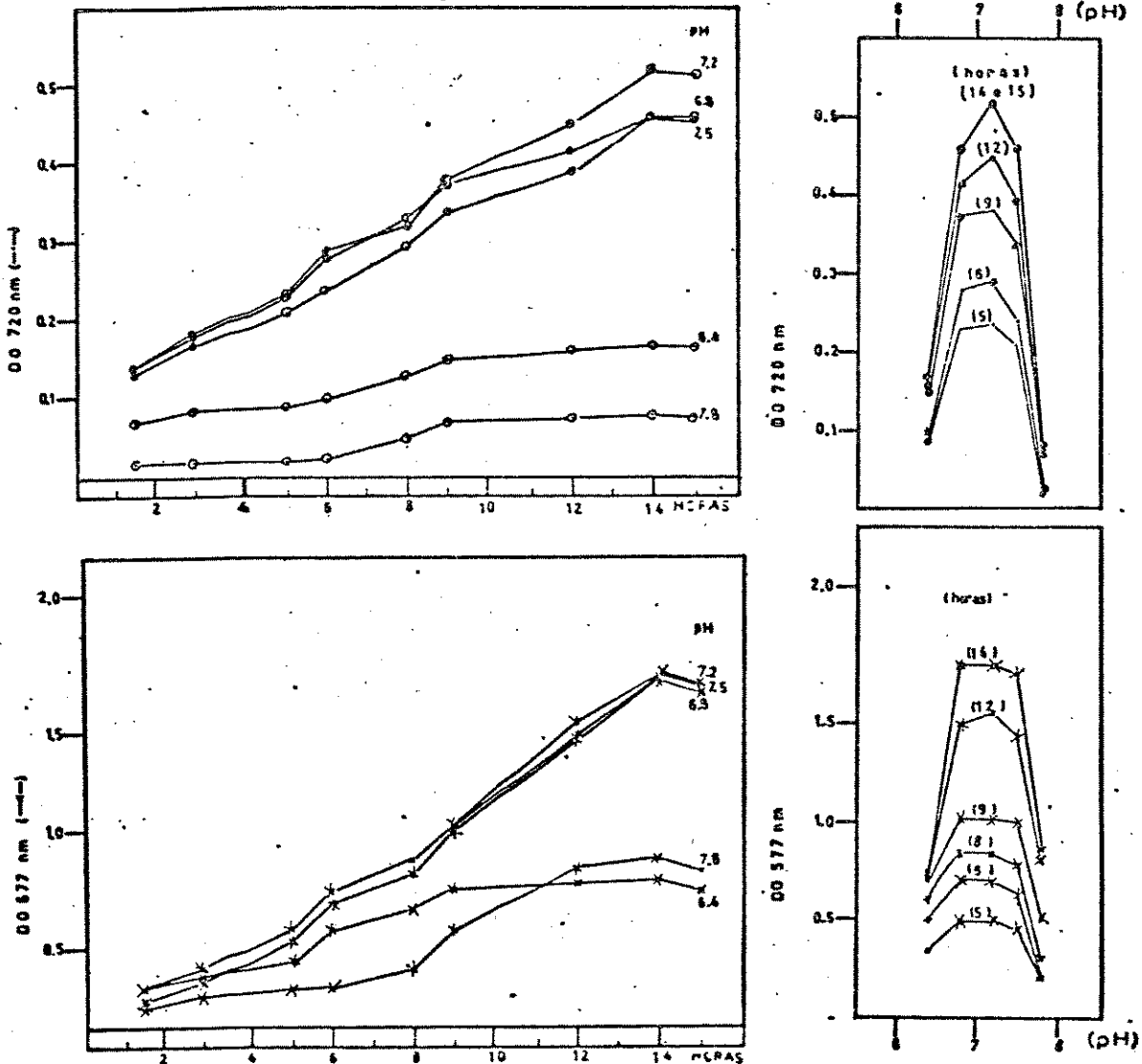


FIG.8. Crescimento celular (••) e síntese do pigmento I (-x-) como absorvância entre 1,5 e 14 horas de incubação entre pH 6,4 e 7,8

Este comportamento de dependência do pH no crescimento foi concordante com os resultados obtidos quando foi medido o crescimento celular e a produção de pigmento como a absorbância na faixa de pH entre 6,4 e 7,8 depois de 1,5 horas de incubação.

Quando as leituras foram feitas entre 1,5 e 14 horas, em intervalos de uma hora, observou-se que o comportamento celular é estimulado linearmente em função do tempo e que a velocidade máxima de crescimento é alcançada em 14 horas a pH 7,2. Após 15 horas de incubação não se observa um aumento na atividade celular (figura 8) (vide seção II.7.7 pag. 29 ). Foi observado que todos os meios de cultivos de diferentes pH no tempo de máxima velocidade de crescimento tendem a pH 7,0.

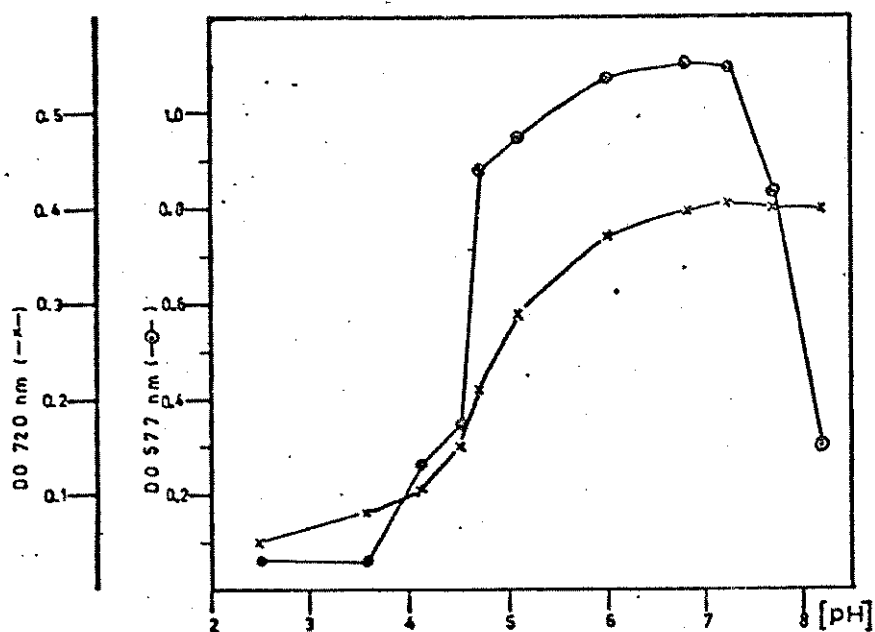


FIG.9. Crescimento celular (-x-) e produção do pigmento I (-o-) como a absorbância, depois de 6 horas de incubação em um meio que continha metionina (1  $\mu\text{g/ml}$ ) e vitamina B-12 (0,005  $\mu\text{g/ml}$ )



A figura 9 (vide seção II.7.8 pag.29 ) mostra nitidamente o efeito de requerimento nutricional de metionina e de vitamina B-12 por parte do microorganismo, permitindo-lhe ampliar a faixa de pH onde pode alcançar sua máxima velocidade de crescimento. Pode-se sugerir que no processo de síntese do pigmento I, metionina e vitamina B-12 estimulam a atividade enzimática das sintetases, os complexos enzimáticos que levam ao final a sínteses. A espécie reguladora do metabolismo de *Chromobacterium violaceum*, ainda é desconhecido.

A cepa mutante branca; é induzida por células de 48 horas de incubação e apresenta um mecanismo de reparo, favorecendo a síntese do pigmento I depois de quinze ou vinte gerações da bactéria. Já foi dito anteriormente que, em presença de metionina e vitamina B-12 o mecanismo de reparo pode ser observado depois da quarta ou quinta geração.

EXTRATO ETÉREO (2,37 g)

|

|

C.C. SiO<sub>2</sub> Atividade I

benzeno:acetona (3:1)

|

1	2	3	4	5	6	7	8

-----|-----  
ICV-2 (3mg)|

c.c.p.s|st.bl|-----

ICV-3 (37mg)|

Quando a cepa mutante foi extraído com  $\text{CHCl}_3$ , obteve-se com bom rendimento (0,81%) um composto que foi purificado por c.c.p. utilizando o sistema  $b$  (Rf 0,76) (vide seção II.2.1 pag.15 ). Este composto, denominado CV-3 encontra-se também presente, com menor rendimento (0,42 %), no Extrato Etereo da cepa nativa (ver esquema I).

Os resultados preliminares dos ensaios biológicos são apresentados nas figuras 10, 11 e 12 (vide seção II.8. pag.30)

A figura 10 mostra a curva de população da cultura de *Trypanosoma cruzi* em presença de 50  $\mu\text{g/ml}$  de meio de pigmento I, onde um pequeno efeito de solvente é observado. Quando a cultura foi incubada com 10  $\mu\text{g/ml}$  de meio do pigmento I, (figura 11), observou-se menor mobilidade no protozoó. Incubada com 50  $\mu\text{g/ml}$  de meio de pigmento I, o efeito foi mínimo após uma hora de contato com o pigmento I.

A figura 12 mostra um estudo comparativo da atividade do pigmento I e do pigmento I-Br com respeito a mortalidade de *Trypanosoma cruzi*. A mortalidade no caso do pigmento I-Br é total em 8 dias de contato. Uma análise microscópica mostrou que após 8 horas, o protozoó perdeu totalmente a mobilidade com alteração da membrana e perda da cauda

As análises espectroscópicas, do composto majoritário (Rf 0,37) (induzido por mutagênese da bactéria com luz UV) e sua comparação com a amostra autêntica, indicou ser isatina, que apresenta um núcleo comum com uma parte da estrutura do pigmento I, isto confirma que a luz UV produz uma alteração no caminho metabólico normal da bactéria. Um resultado importante que pode ajudar a esclarecer a biossíntese do pigmento I. Este estudo mostra claramente que os compostos sintetizados possuem uma razoável atividade antitripanosomal. A atividade dos outros compostos esta sen-

do estudada por uma forma mais detalhada e será em parte considerada para tese de doutoramento. Nesta parte foi alcançada um dos objetivos de nossa tese.

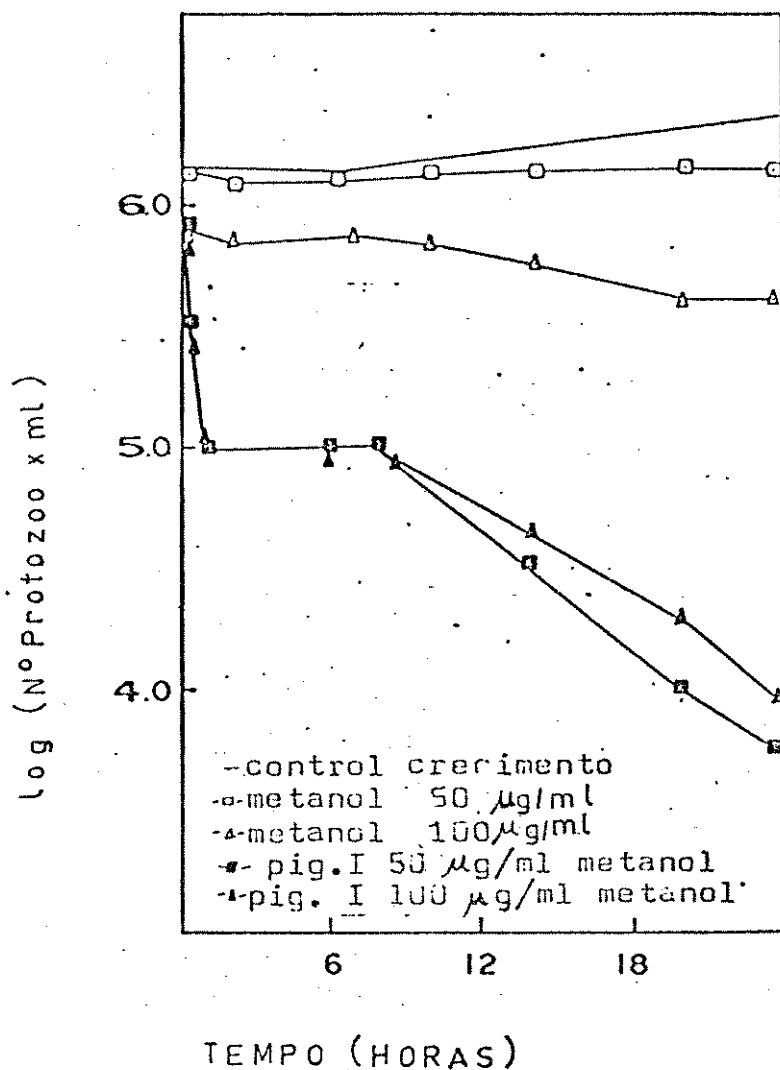


FIG.10. Curva de população da cultura de *Trypanosoma cruzi* (vide seção II.8.2 pag.31 ).

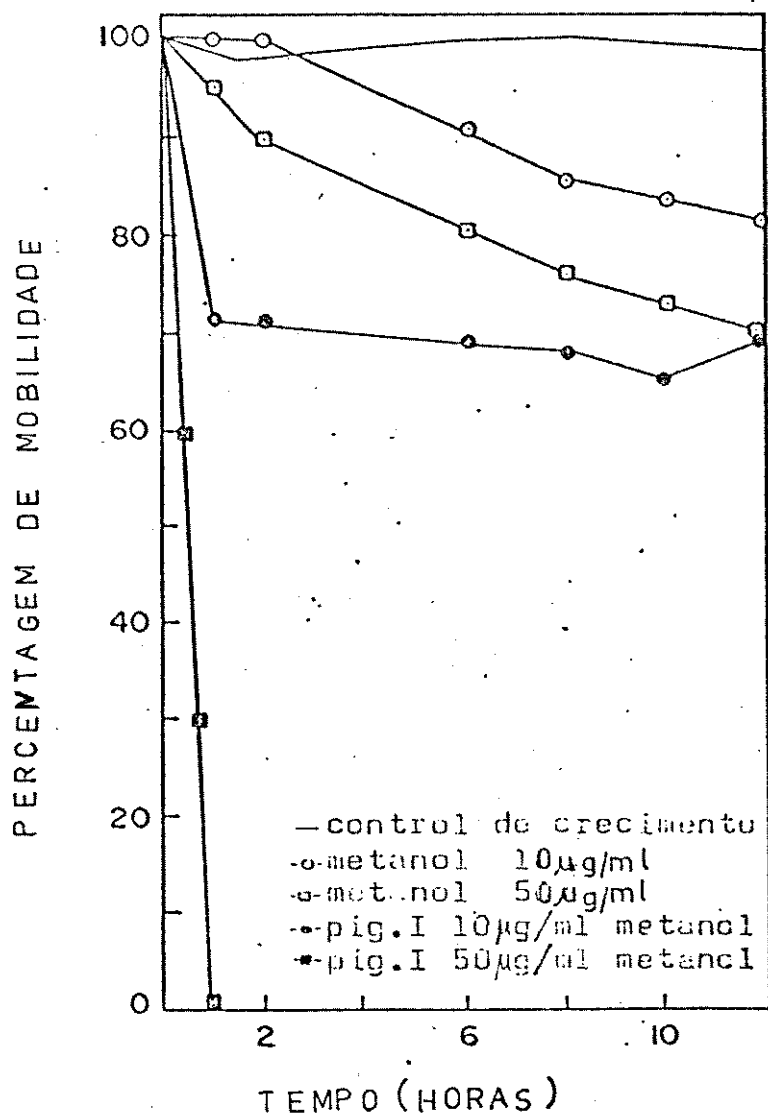


FIG.11. Percentagem de mobilidade de *Trypanosoma cruzi* (vide seção II.8.1 pag.31 )

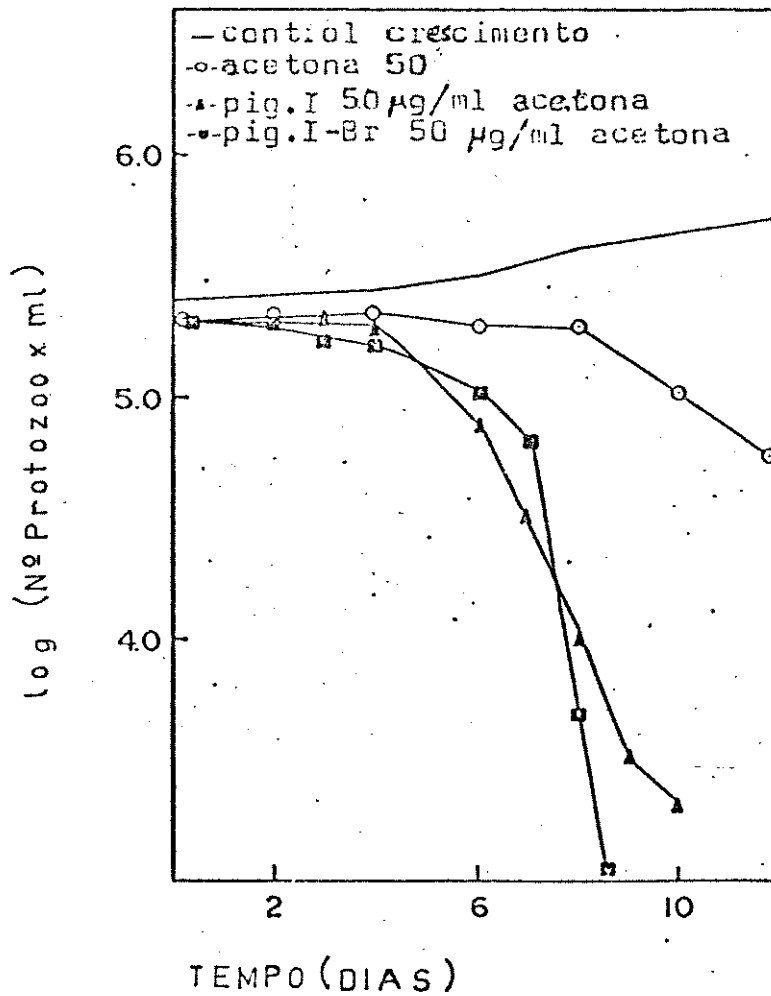


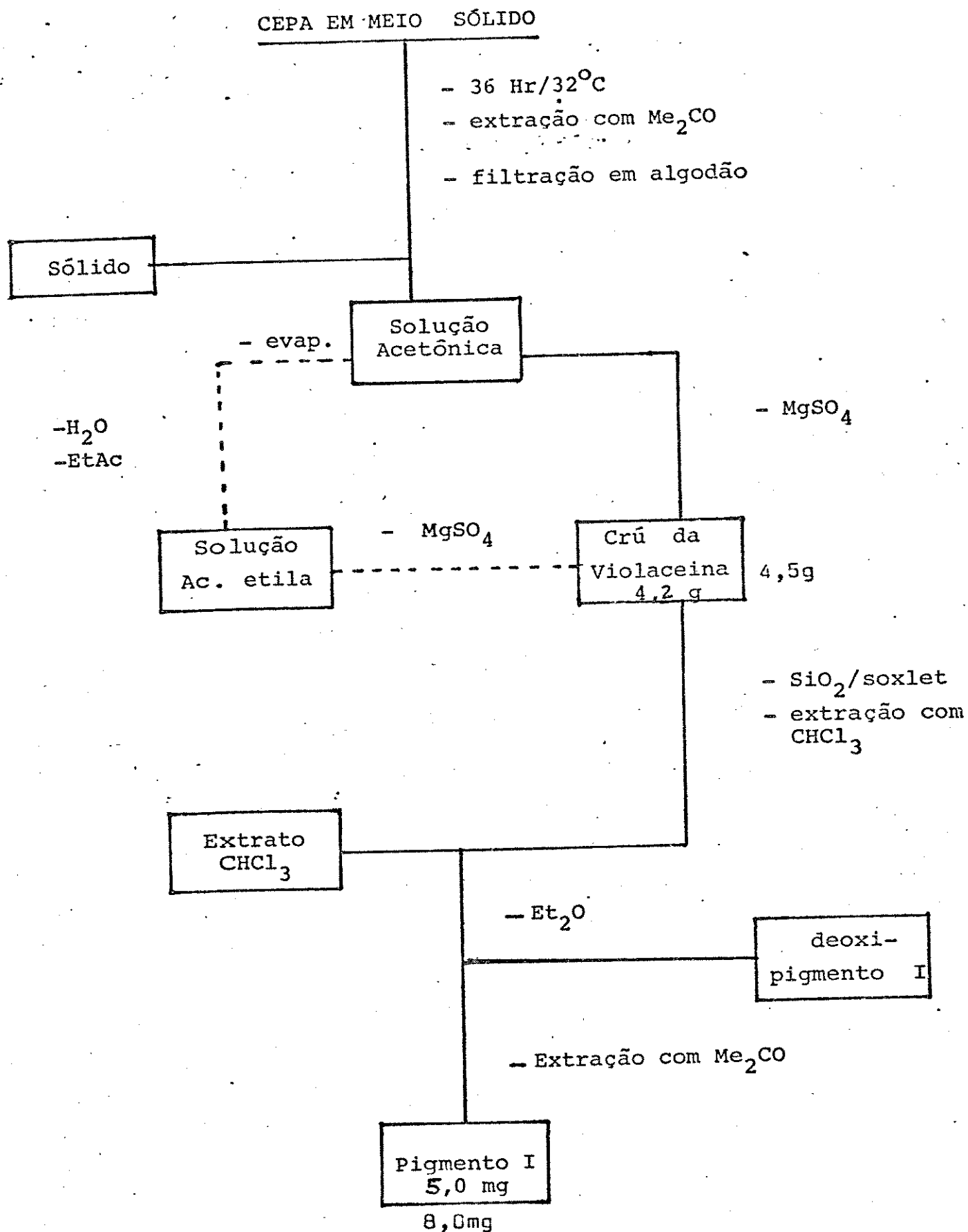
FIG.12. Estudo comparativo da atividade do pigmento I e pigmento I-Br com respeito à população de *Trypanosoma cruzi* (vide seção II.8.1 pag.31 )

Os aspectos relacionados com a síntese dos outros derivados serão discutidos a seguir.

Quando o extrato cru (4,50 g), obtido da solução acetônica proveniente do meio sólido de cultivo de Chromobacterium violaceum, foi fracionado pelo procedimento indicado na parte experimental e que em forma resumida está demonstrado no esquema II. Foram obtidos 46,7 % de extrato clorofórmico, 28,9 % de extrato etéreo e 1,6 % de extrato acetônico, rendimentos relativos ao peso total do extrato cru.

As análises cromatográficas por c.c.d. indicaram que os três extratos eram mistura de grande quantidade de componentes e em baixas concentrações (determinadas qualitativamente pelas áreas dos constituintes observados sob U.V. 254 nm), distribuídos ao longo de toda a placa cromatográfica, permanecendo os constituintes majoritários no ponto aplicação. Estes componentes não mostraram reações coloridas com  $H_2SO_4$  à 10% nem com reagente de Dragendorff ou de Earlich, exceto alguns constituintes no extrato etéreo e outro no extrato acetônico. Visto que a presença de produtos artefatos não pode ser descartada, o meio de cultivo sólido, após ser autoclavado, foi extraído de forma idêntica como se tivesse inóculo, este tratamento forneceu um extrato acetônico de baixíssimo peso, onde acredita-se que os componentes não solubilizaram devido a presença de água no meio, visto que através de c.c.d. não foi possível eluir o extrato, ou seja, o extrato não saiu do ponto de aplicação.

A fração etérea obtida desde a extração no soxhlet se apresenta com coloração roxa, devido a um constituinte que possui um  $R_f$  0.85 no sistema a, (vide seção II.2.1 pag 15) este componente denominado CV-2 foi separado por uma cromatografia em coluna, como indicado na tabela-VIII, e esquema-I.



Esquema 11. Fracionamento da cepa incubada em meio sólido

O rendimento deste componente é muito baixo com respeito ao extrato etéreo e mais ainda com o do extrato cru. Pelas características espectroscópicas de UV e IV, deveria ser deoxi-pigmento 1, um constituinte muito solúvel em éter, acetona e metanol o qual foi descrito por Ballantine [82], cuja concentração é aproximadamente 100 vezes menor que a do pigmento 1.

TAB. VII I. Cromatografia em Coluna do Extrato Etéreo\*

Fração Nº	massa (mg)
1	18
2	78
3	4
4	507
5	400
6	103
7	7
8	130

\*sobre sílica gel, eluída com benzeno/acetona 3:1

#### COMPOSTO CV-3

As frações 6-7 (vide seção II.5.3 pag.20 ), obtidas a partir da coluna cromatográfica indicada no esquema II, contém entre outros constituintes, um composto que foi denominado CV-3. Este composto não foi possível cristalizar e ele se apresenta como um óleo transparente, solúvel em clorofórmio e éter etílico, porém menos solúvel em acetona e metanol. Em c.c.d. no sistema b, (vide seção II.2.1 pag.15 ) apresenta um Rf 0.76 e é fortemente fluo-



rescente a luz UV (254 e 360 nm). Purificado por c.c.d. no sistema b (vide seção II.2.1 pag.15 ) obteve-se 37 mg de composto puro (rendimento 1,9 % relativo ao extrato etéreo e 0,4 % relativo ao extrato acetônico original).

Seu espectro de UV (Figura E-1) apresenta bandas de absorção em 226, 274, 282, e 394 nm, indicativo da presença do anel aromático. Os picos no espectro de IV (Figura E-2) em  $1730\text{ cm}^{-1}$ , fina e intensa e em  $1600$ ,  $1580$  e  $1280\text{ cm}^{-1}$  em conjunto com as sinais do espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  (Figura E-3) a  $\delta 7,40$  (d, 2H,  $J=6\text{ Hz}$ ),  $\delta 7,60$  (d, 2H,  $J=6\text{ Hz}$ ) indicam a presença de anel aromático orto substituído e o pico em  $m/z$  149, sugerem especificamente um éster de ácido ftálico [117, 118].

O composto CV-3 também mostra uma banda a  $3450\text{ cm}^{-1}$  em seu espectro de IV, no espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  ainda observamos sinais a  $\delta 2,10$  (s, 1H) indicativo da presença de um grupo hidroxila, a  $\delta 4,50$  (d, 4H,  $J=5\text{ Hz}$ ), atribuídos aos protons do  $-\text{OCH}_2\text{CH}-$ , na zona alifática a  $\delta 1,10-1,60$  (m, 36H) há superposição de sinais observando-se só um pico largo, para protons metilênicos, a  $\delta 0,90$  (dd, 18H,  $J=7\text{ Hz}$ ) atribui-se a metilas secundarias e a  $\delta 0,62$  (s, 9H) correspondente a outros três grupos metilos que pela multiplicidade e a integração deveria corresponder a um grupo ter-butílico, mas este grupo aparece no espectro normalmente a  $\delta 0,85-0,95$ .

No espectro de massa (Figura E-4) se observa um pico em  $m/z$  644 correspondente a ion molecular, e correlacionando o com  $m+1$ ,  $m+2$  e  $m+3$  pode-se deduzir uma composição elementar. Esta fórmula de  $\text{C}_{41}\text{H}_{72}\text{O}_5$  apresenta 6 insaturações distribuídas em duas carbonilas e um anel aromático. No espectro de massa os fragmentos de 644 ( $M^+$ ), 626 ( $M - \text{H}_2\text{O}$ ), 601 ( $M - \text{C}_3\text{H}_7$ ) 561 ( $M - \text{CH}_2=\text{C}-\text{C}_4\text{H}_9$ ), 517 ( $M - \text{C}_6\text{H}_{12}\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 487 ( $M - \text{C}_6\text{H}_{11}(\text{CH}_3)_3(\text{OH})$ ), 445 ( $M - \text{CH}_2=\text{C}-\text{C}_7\text{H}_{13}$

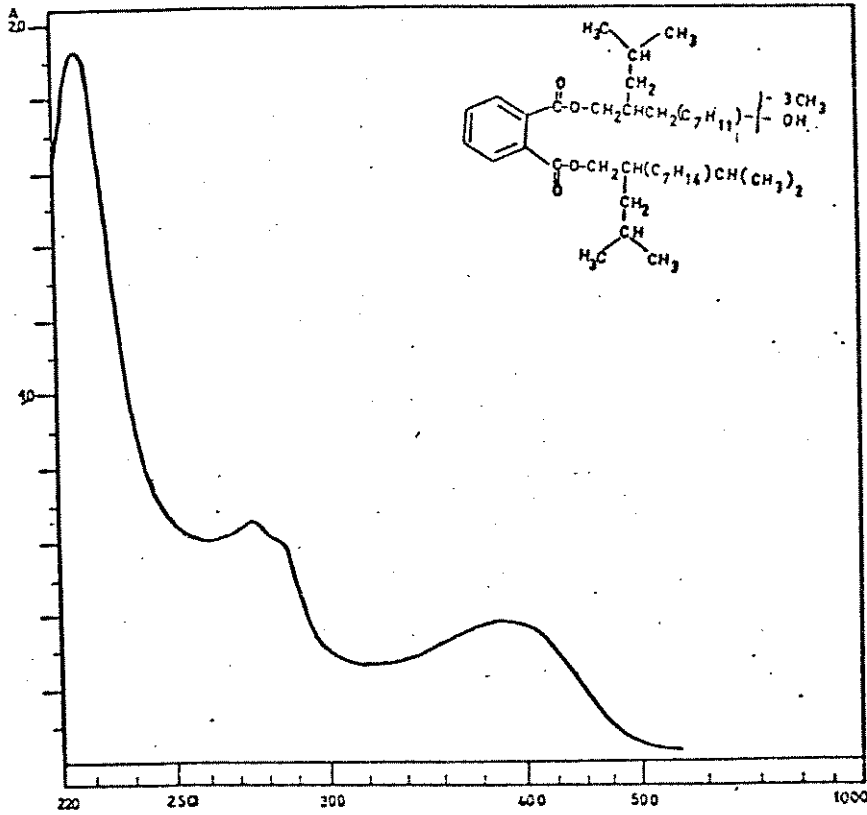


Figura E-1: Espectro UV do composto CV-3 (etanol)

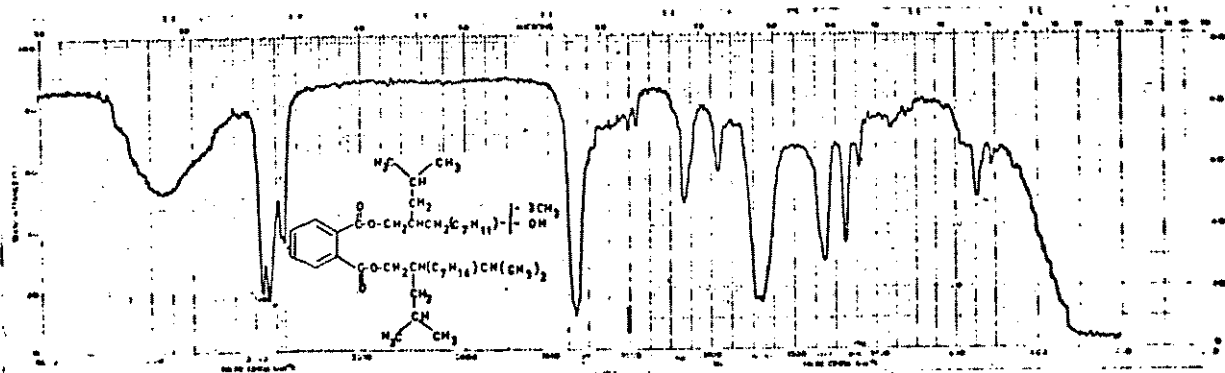


Figura E-2: Espectro IV do composto CV-3 (KBr)

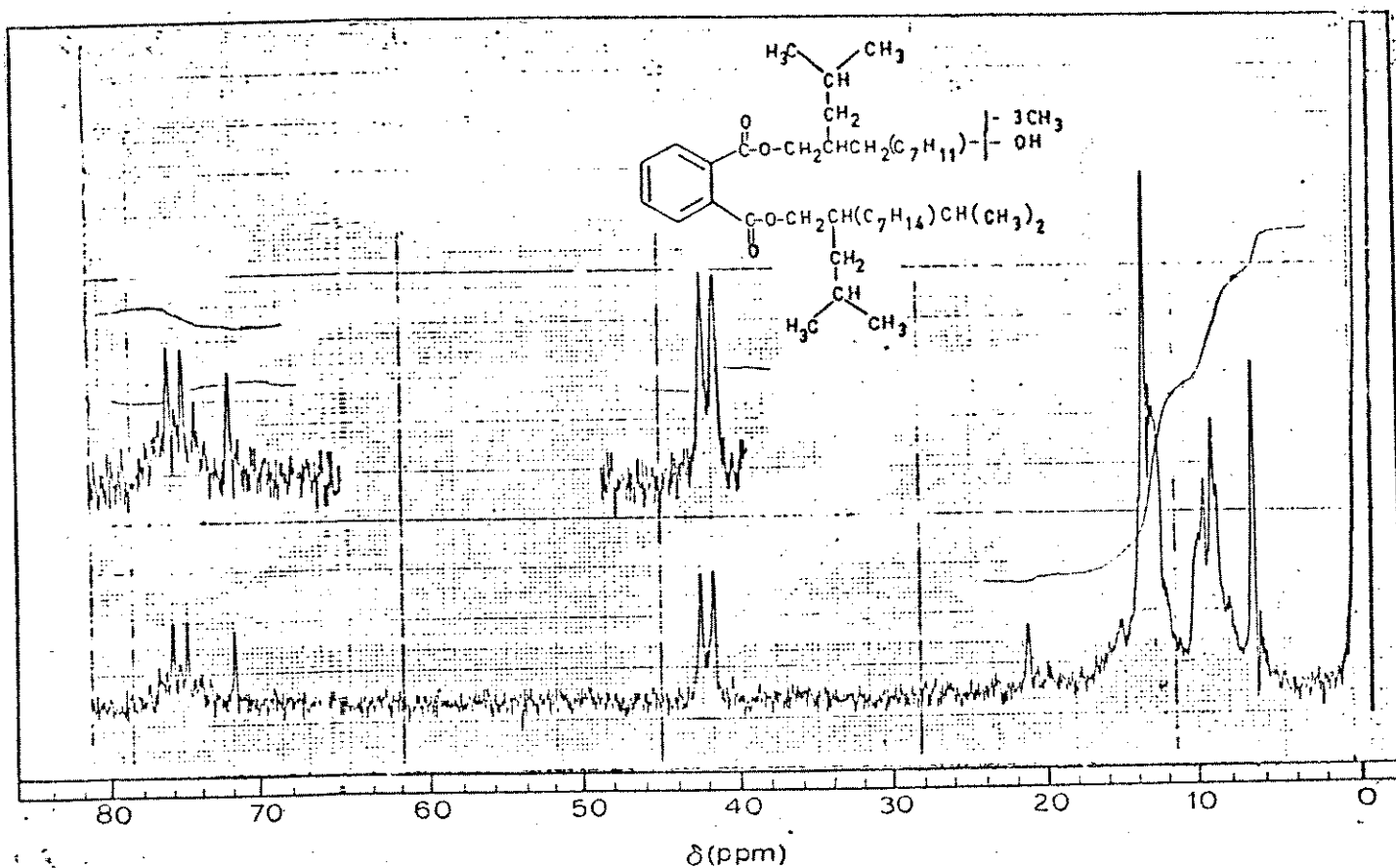


Figura E-3: Espectro RMN  $^1\text{H}$  do composto CV-3 ( $\text{CDCl}_3$ )

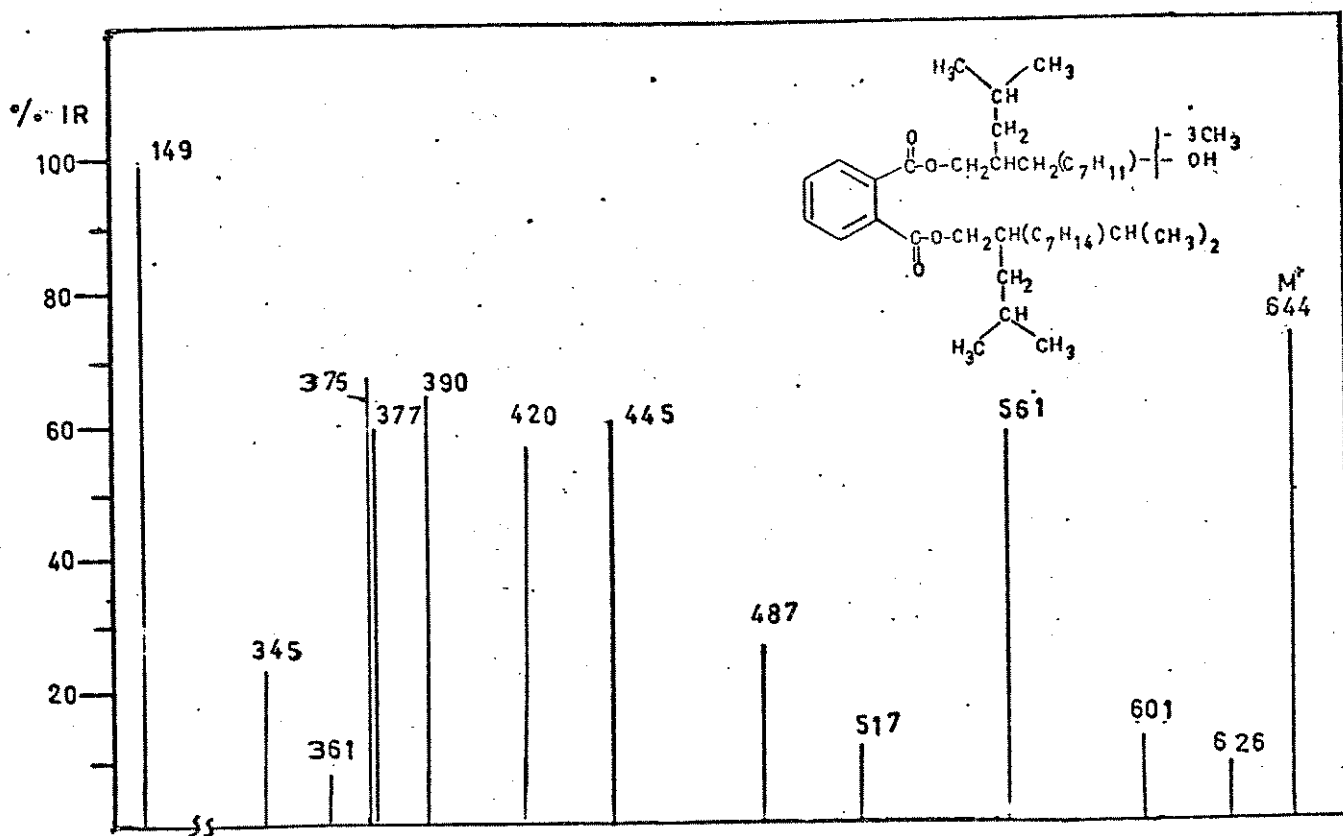
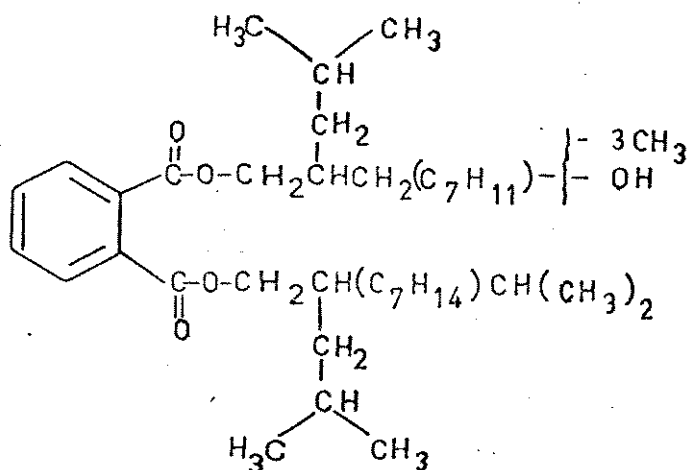


Figura E-4: Espectro de massa do composto CV-3

(OH)C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, 420 (M - C<sub>16</sub>H<sub>32</sub>), 390 (M - C<sub>17</sub>H<sub>34</sub>O), 373 (M - C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>O<sub>2</sub>), 375 (M - C<sub>16</sub>H<sub>37</sub>), 361 (M - C<sub>18</sub>H<sub>35</sub>O<sub>2</sub>), 345 (M - C<sub>18</sub>H<sub>35</sub>O<sub>3</sub>), 149 (M - C<sub>33</sub>H<sub>68</sub>O), são explicados no esquema III, correlacionando todos estes dados espectroscópicos a estrutura parcialmente proposta é

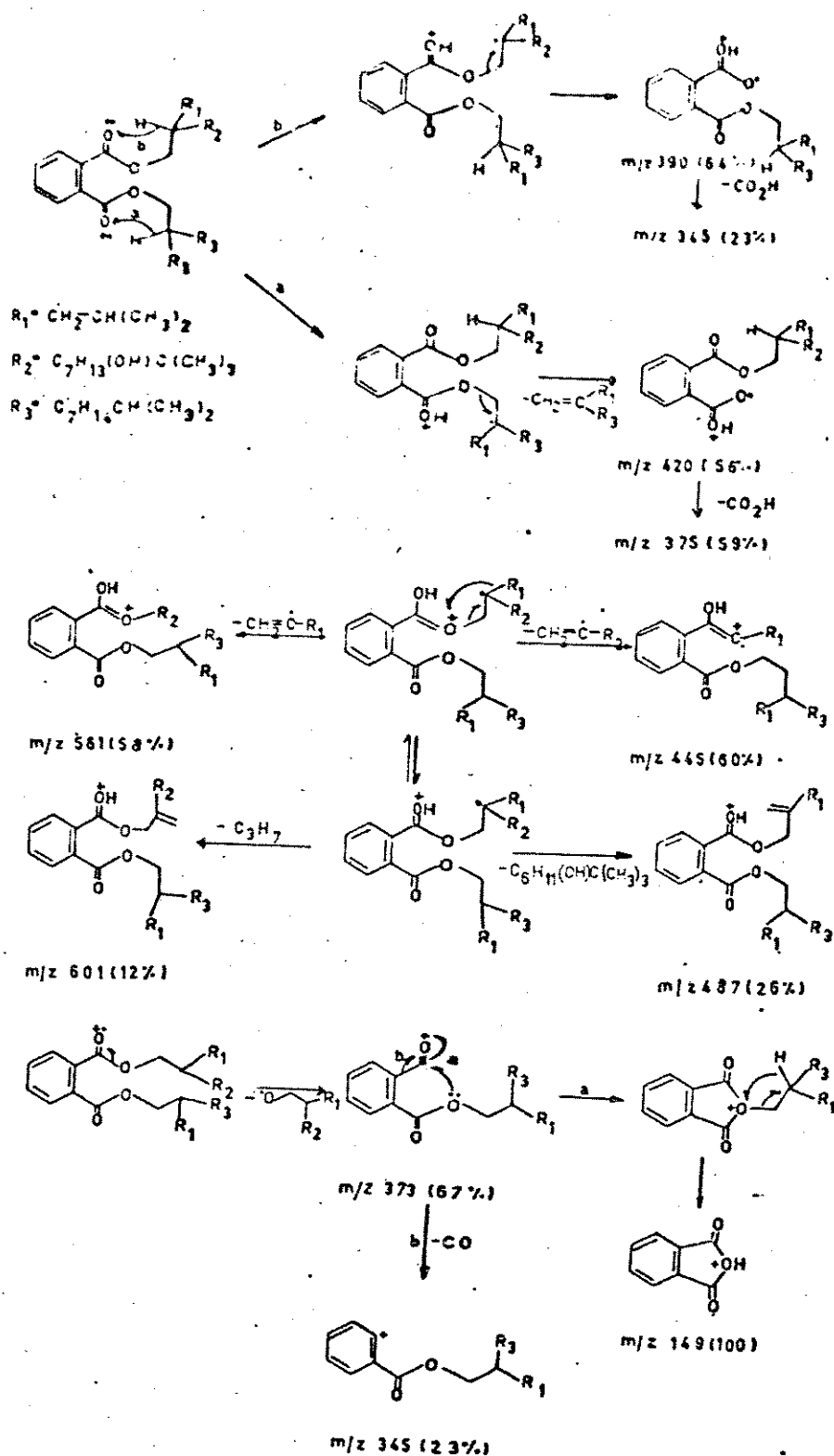


Apesar da informação espectroscópica disponível, apenas foi possível determinar a cadeia carbônica em que está o grupo hidroxila, e as três metilas, mas não foi possível determinar as posições exatas das ligações.

O caráter inerte do grupo hidroxila à acetilação com piridina anidrido acético e à resistência a oxidação com reagente de Jones sugerem firmemente um grupo hidroxila terciário.

#### PIGMENTO I.

A cor azul intenso mostrado pelo extrato acetônico (vide seção II.5.2 pag.19) é devido a um componente que apresenta em c.c.d. um Rf de 0,46 no sistema a, (vide seção II.2.1 pag.15) este produto denominado como pigmento I, foi isolado com 5% de rendimento relativo ao extrato acetônico e 0,1 % relativo ao extrato cru,



Esquema III. Fragmentação do EM do composto CV-3

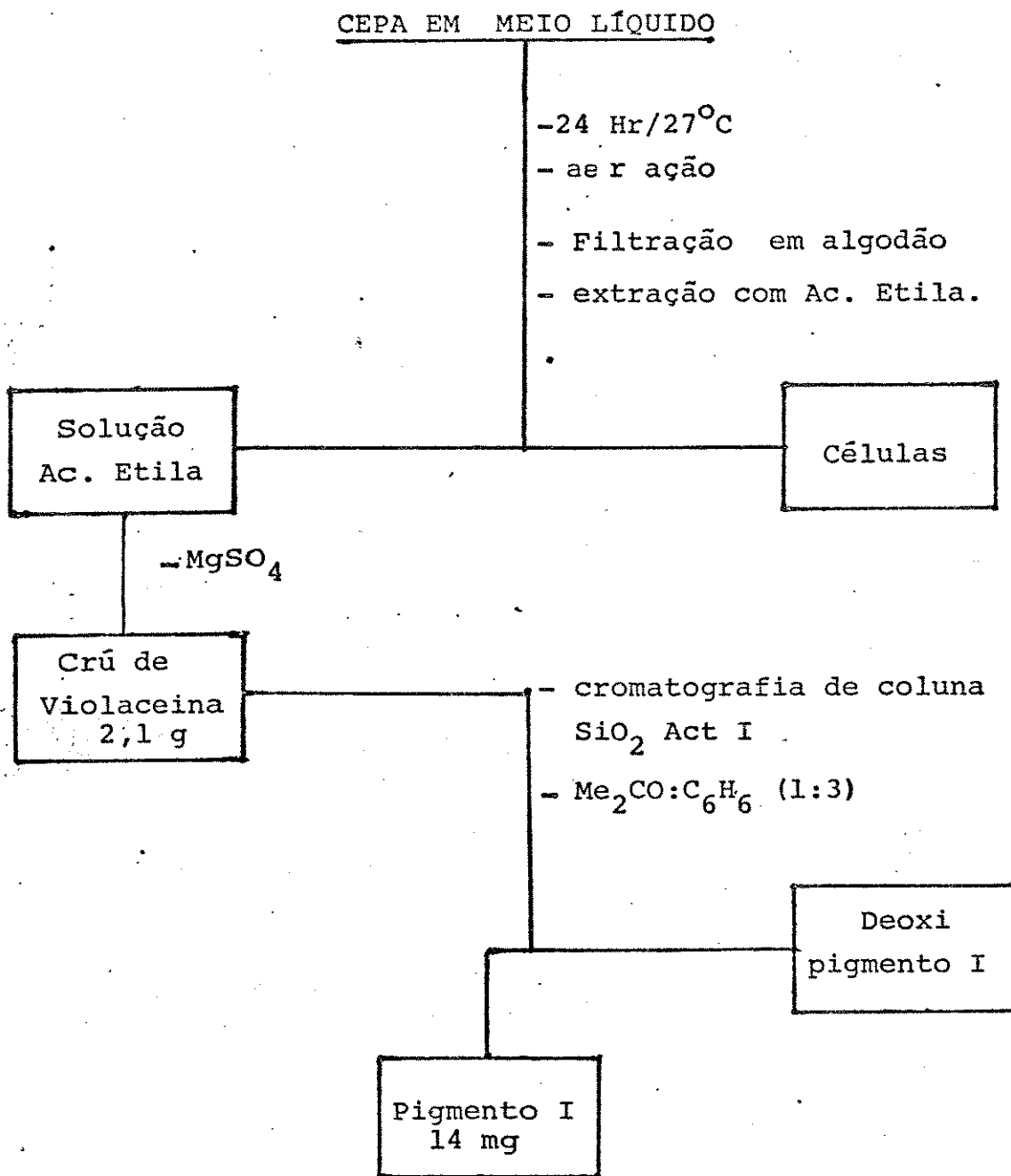
quantidade esta que pode ser considerada de rendimento bom. As maiores dificuldades se apresentam no manuseio deste extrato, já que o pigmento I decompõe-se com muita rapidez na presença de umidade e de luz. A rapidez de decomposição do pigmento I pode ser observada facilmente porque a solução azul muda para uma cor verde escura, e os produtos de degradação podem ser removidos em clorofórmio.

Quando a suspensão aquosa da solução acetônica foi extraída com a mistura acetato de etila-água (2:1) obteve-se 4,2 g de extrato cru, uma quantidade levemente inferior ao obtido diretamente. Após a extração fracionada em um soxhlet o extrato cru forneceu 48,8 % de extrato clorofórmico, 25,5 % de extrato etéreo e 0,7 % de extrato acetônico. A análise cromatográfica não mostrou ser diferente dos extratos anteriores. Este método de extração com acetato de etila favoreceu só o rendimento do pigmento I (8% para o extrato acetônico e 0,2 % para o extrato cru, estes valores representam quase o dobro, comparados com os obtidos a partir da extração da solução acetônica.

Provavelmente componentes muito polares que foram solubilizados em acetona-água, são pouco solúveis em acetato de etila preferindo ficar na fase aquosa, do que forneceu um maior rendimento do pigmento I.

A quantidade de células no meio sólido está limitada pela área de meio de cultivo, isto significa que uma vez que a cepa cobre uma determinada área, os nutrientes esgotados não são renovados e a reprodução celular torna-se mais lenta.

Se a biosíntese do pigmento I é proporcional ao crescimento celular, com um aumento de reprodução da cepa, deveria obter-se um maior rendimento do pigmento I. Tendo presente esta observação a cepa foi induzida a se reproduzir em meio líquido, já que a



Esquema IV. Fracionamento da cepa incubada em meio líquido.

possibilidade de renovação de nutriente nestas condições é maior e o crescimento celular favorecido.

A obtenção de 0,7 % de rendimento de pigmento I a partir do extrato cru proveniente do meio líquido (esquema IV) mostra que é a melhor condição para o cultivo de *C. violaceum*. A facilidade de separar por cromatografia de coluna o pigmento I diretamente do extrato cru sem ter previamente fracionado em extrato clorofórmico e etéreo, evita sua degradação por excesso de manuseio.

O pigmento I apresenta-se como um sólido de cor azul escuro que cristaliza em acetona-benzeno e funde a uma temperatura acima de 290 °C com decomposição. Nos sistemas cromatográficos a, d, e, (vide seção II.2.1 pag.15.) o composto mostra Rf de 0,46, 0,30 e 0,56 respectivamente.

O espectro de UV (Figura E-5) apresenta quatro máximos 577, 376, 296, e 260 nm o qual corresponde a um cromóforo indólico.

Através do pico M+1 (6,5%) e M+2 (0,8%), (M+3 é muito pouco intenso) no espectro de massa (Figura E-6), e com a massa do íon molecular ímpar, 343(27,5%), obtém-se uma fórmula molecular com um número ímpar de átomos de nitrogênios que incrementam isotópicamente o pico M+1, e só a abundância isotópica de oxigênio incrementa o pico M+2.

m/z	% de M	Norm.	C <sub>20</sub>	N	2xN	O	2xO	3xO
343 (M)	27,5±2,8	100	100	100	100	100	100	100
344 (M +1)	6,5±0,7	23,6±2,5	22	0,37	1,11	0,04	0,08	0,12
345 (M +2)	0,8±0,2	2,9±0,3	2,3	-	-	0,2	0,4	0,6
346 (M +3)	<0,1±0,2	0,4±0,2	0,2	-	-	-	-	-

A correlação da fórmula C<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub> concorda plenamente com os dados experimentais



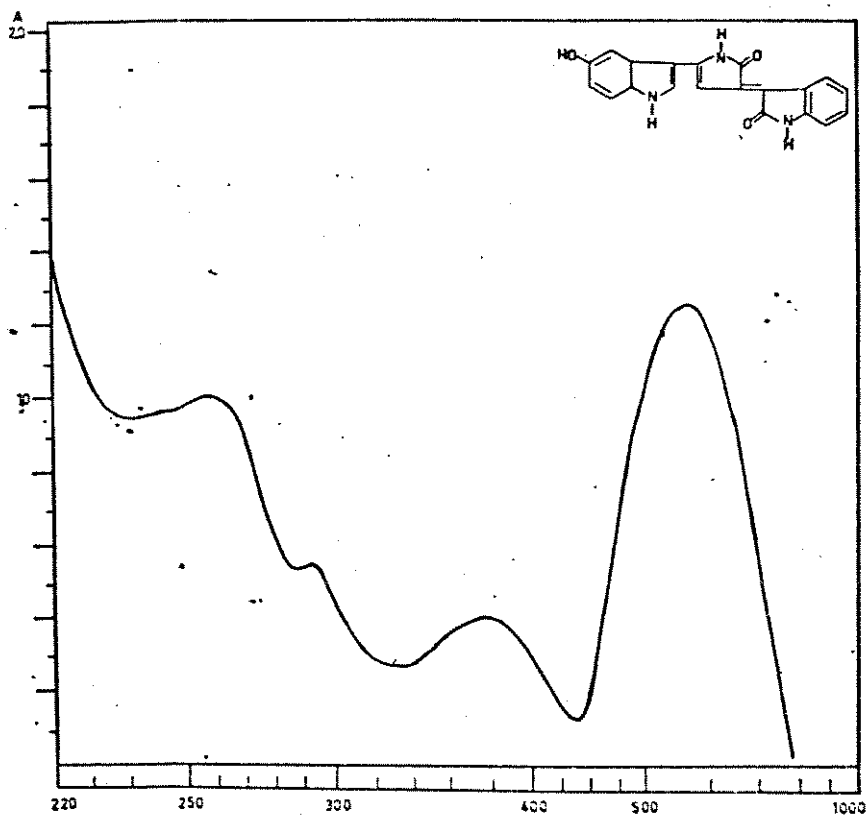


Figura E-5: Espectro UV do Pigmento-I (etanol)

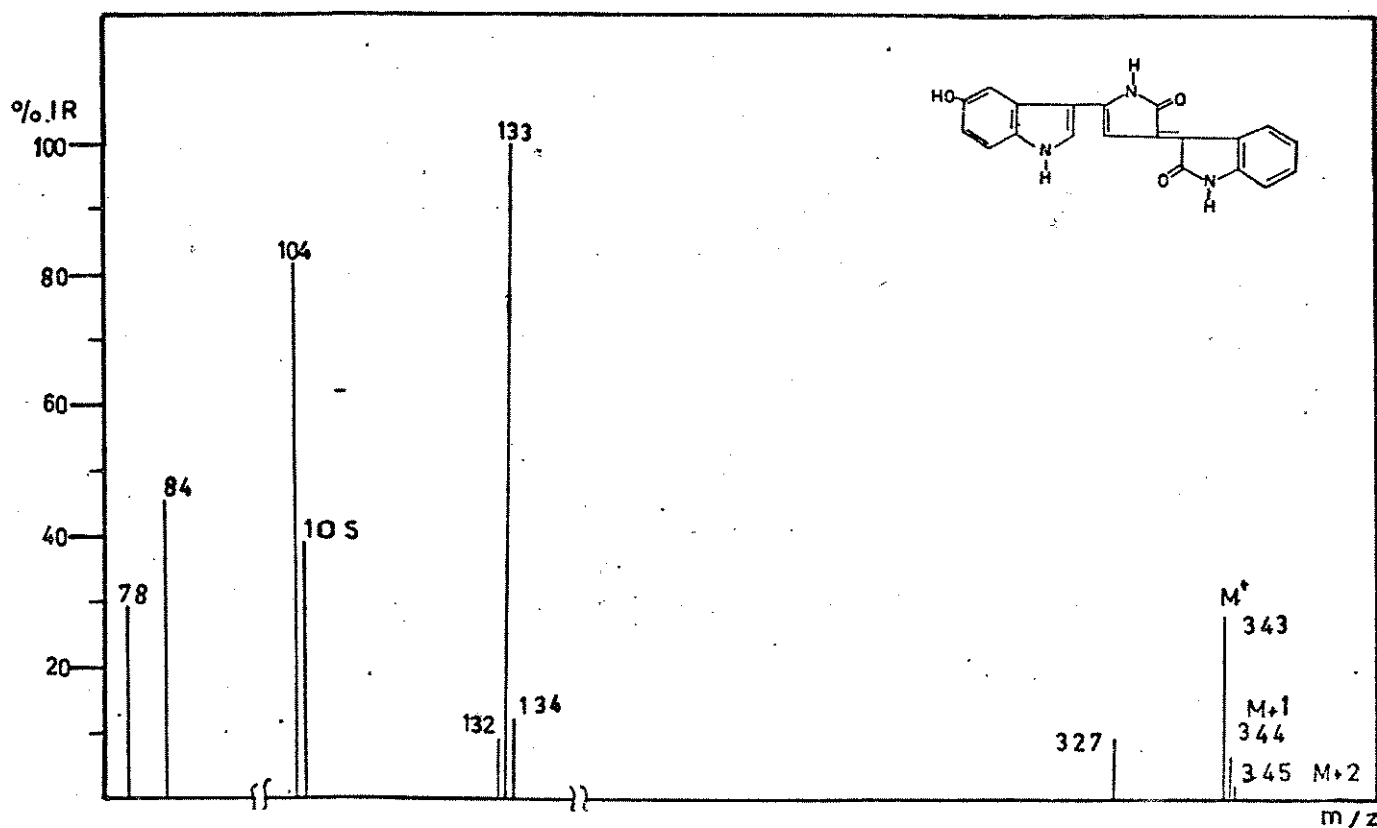


Figura E-6: Espectro de massa do Pigmento-I

	C <sub>20</sub>	N <sub>3</sub>	O <sub>3</sub>	Calculado	Experimental
M	100	100	100	100	100
M+1	22	1,11	0,12	23,23	23,64
M+2	2,3	-	0,6	2,9	2,91
M+3	0,2	-	-	0,2	0,36

Assim pode-se propor a fórmula  $C_{20}H_{13}N_3O_3$ , os fragmentos do espectro de massa estão explicados no esquema V.

O espectro de IV (figura E-7) exibe bandas de absorção na região de  $1610\text{ cm}^{-1}$  fina que pode ser atribuída a  $-C=C-$  e as bandas largas de absorção em  $1655$  e  $1680\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas a  $C=O$ . Absorções em  $1550\text{ cm}^{-1}$  e entre  $3100-3300\text{ cm}^{-1}$  podem ser atribuídas a  $-NH$  e  $-OH$  respectivamente

O espectro de  $RMN^1H$  (Figura E-8) não apresenta sinais de prótons alifáticos e a totalidade deles aparecem como sinais largos na região de campo baixo.

As propriedades físicas e a fórmula molecular do pigmento I concordam com os dados já informados por Ballantine [83] e mais recentemente no transcurso deste trabalho, Thomson e colaboradores [84] fizeram as atribuições de sinais  $RMN^1H$  por comparação com compostos modelos; indicando que a estrutura do composto deve ser à mostrada na figura 13

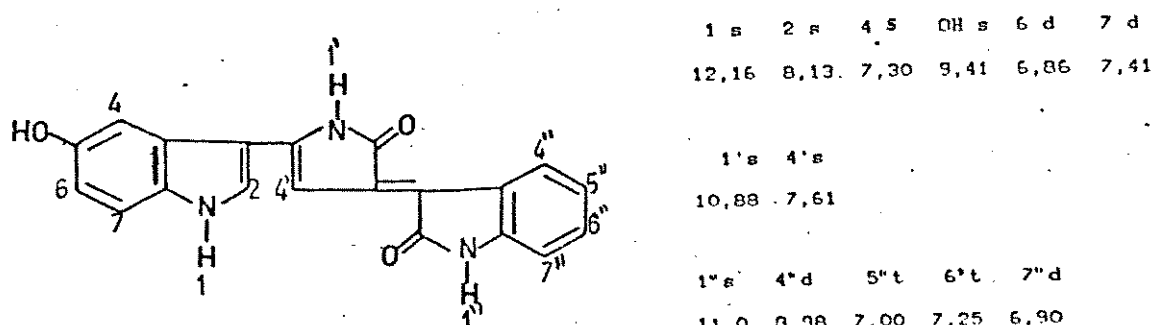
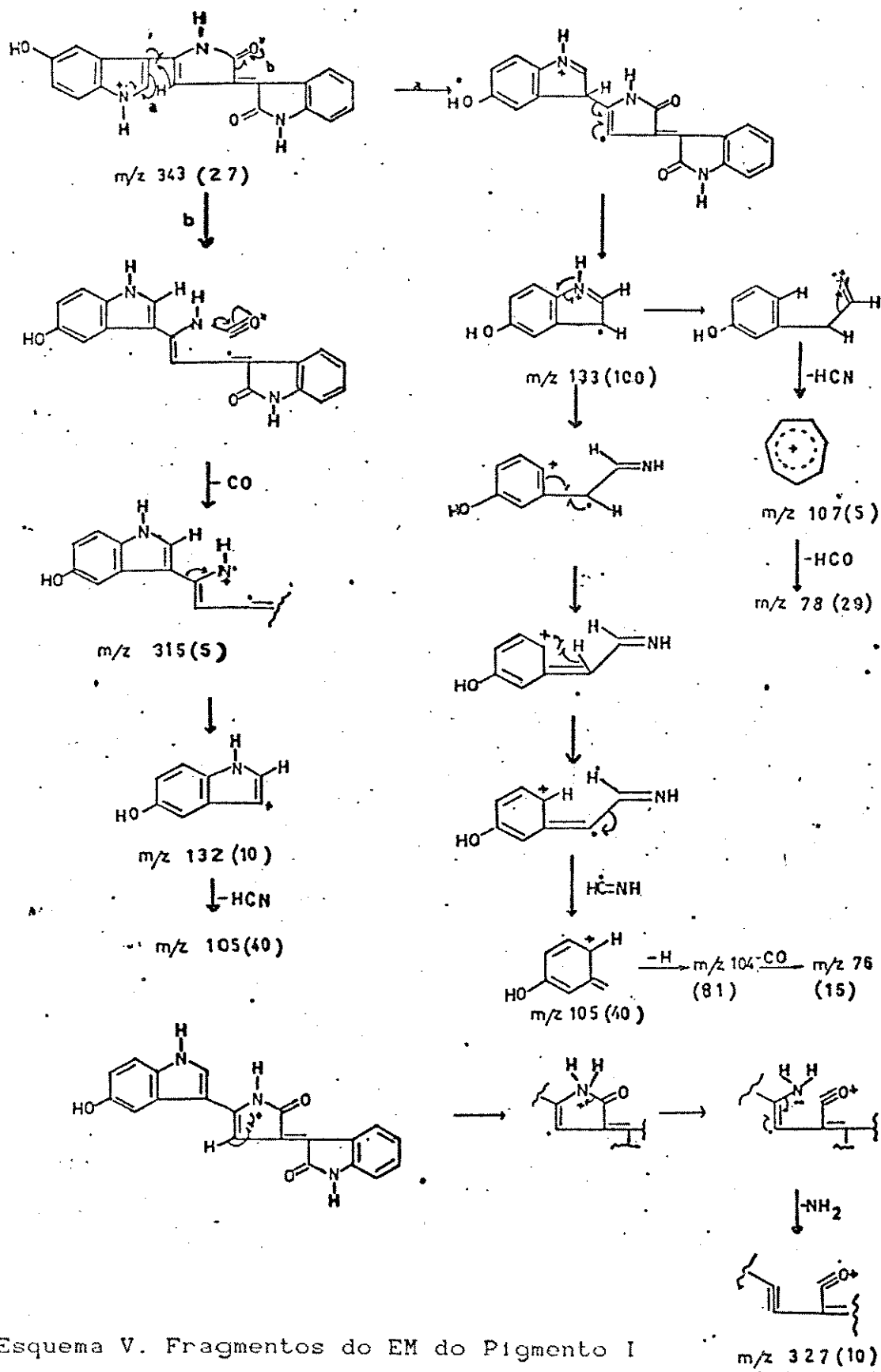


FIG.13. Pigmento I e seus deslocamentos químicos de  $RMN^1H$  em 220 MHz [84]



Esquema V. Fragmentos do EM do Pigmento I

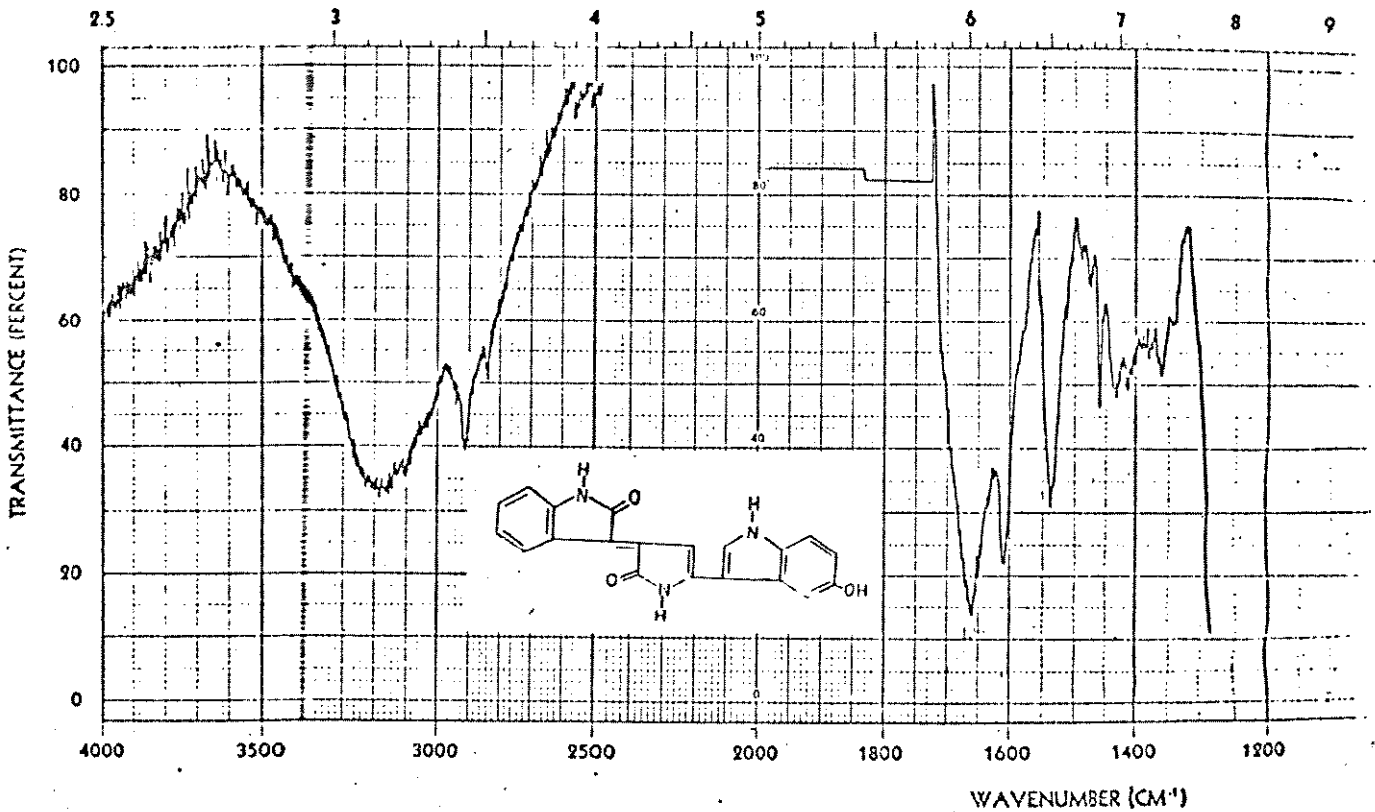


Figure E-7: Espectro IV do Pigmento-I (fluorolube)

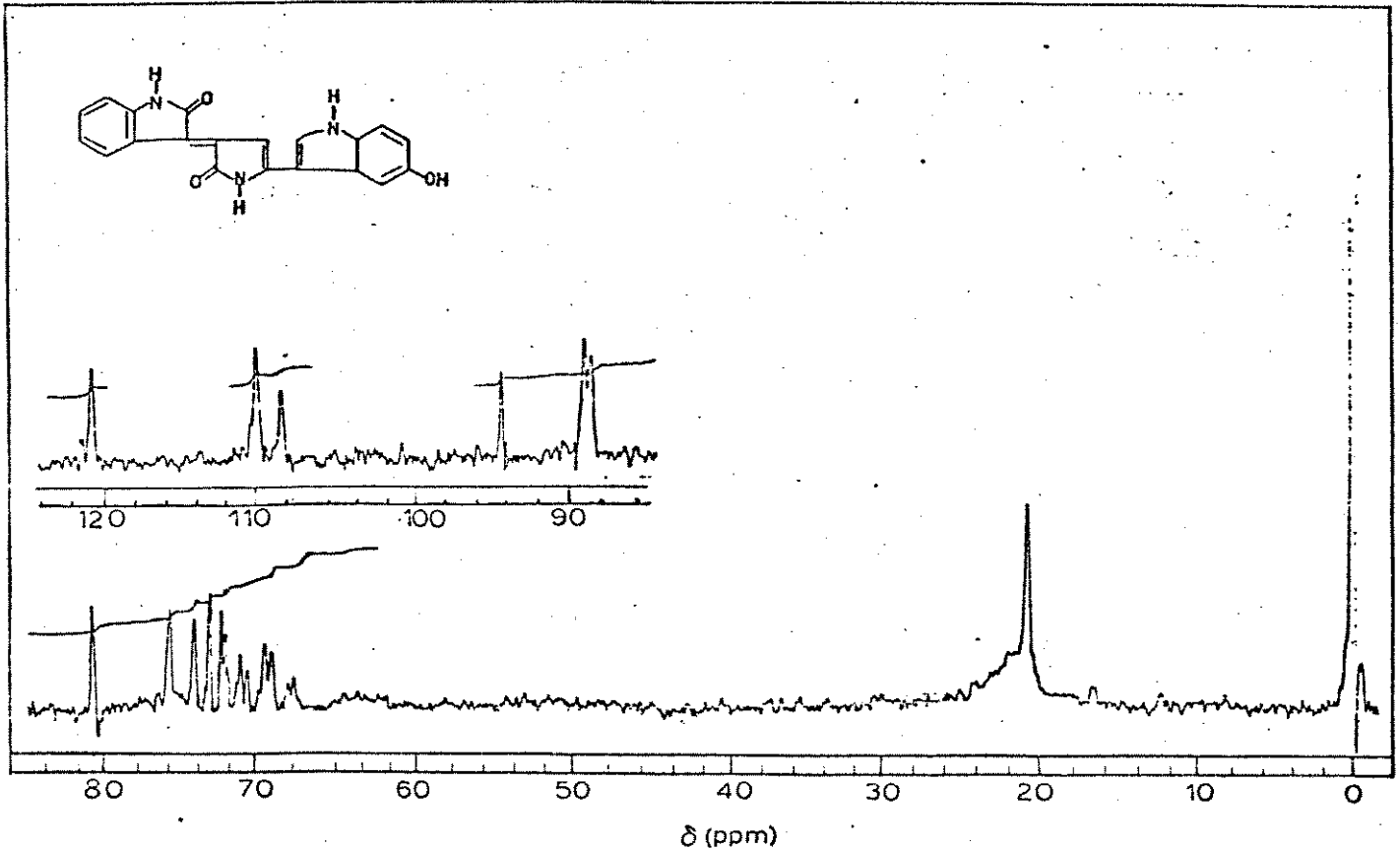


Figure E-8: Espectro RMN<sup>1</sup>H do Pigmento I (C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>CO)

O pigmento I mostra em RMN<sup>1</sup>H de 60 MHz, (Figura E-8) sinais em  $\delta$  6,82 (d, 1H, J=4 Hz),  $\delta$  7,35 (s, 1H),  $\delta$  7,40 (s, 1H) largo  $\delta$  8,10 (s, 1H), que podem ser atribuídos a prótons característicos de indol, também observamos sinais a  $\delta$  7,60 (s, 1H) para prótons olefínicos do anel pirrólico e a  $\delta$  8,90 (d, 1H, J=4 Hz),  $\delta$  7,2 (t, 1H, J=4 Hz),  $\delta$  7,25 (d largo, 1H, J=4Hz),  $\delta$  6,90 (d, 1H, J=4 Hz), que são atribuídas ao anel do fragmento isatin. Os deslocamentos químicos observados em 60 MHz concordam com os obtidos em 220 MHz, embora as multiplicidades não sejam iguais

O sinal de NH indólico é observado a  $\delta$  12,10, o de NH lactâmico a  $\delta$  10,82 e o de NH isatin a  $\delta$  11,0 sinal que de acordo a literatura geralmente não é observada.

O próton de OH fenólico aparece em  $\delta$  9,40 esta atribuição foi confirmada quando se observou o espectro de RMN<sup>1</sup>H do metilol.

#### PIGMENTO I ACETILADO

O composto acetilado (vide seção 11.6.1 pag.21) obtido com 72% de rendimento apresenta um espectro de UV (Figura E-9) bastante similar ao do pigmento I, a banda que absorve no visível sofre um efeito hipsocrômico em 17 nm além de um efeito hipocrômico quase de 50% em todo o espectro, a banda em  $\lambda$  265nm característica do cromóforo indólico é claramente observável.

O espectro de IV (Figura E-10) apresenta os sinais típicos de carbonilas de éster, 1740, 1650  $\text{cm}^{-1}$  e o sinal a 1550  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída a -C=C-, na região acima de 3000  $\text{cm}^{-1}$  observa-se uma sinal fino que pode ser atribuída a impureza ou a algum equilíbrio do tipo ceto-enólico entre os prótons do grupo acetil e as carbonilas do núcleo isatin ou pirrólico

O espectro de RMN<sup>1</sup>H (Figura E-11) não apresenta diferenças

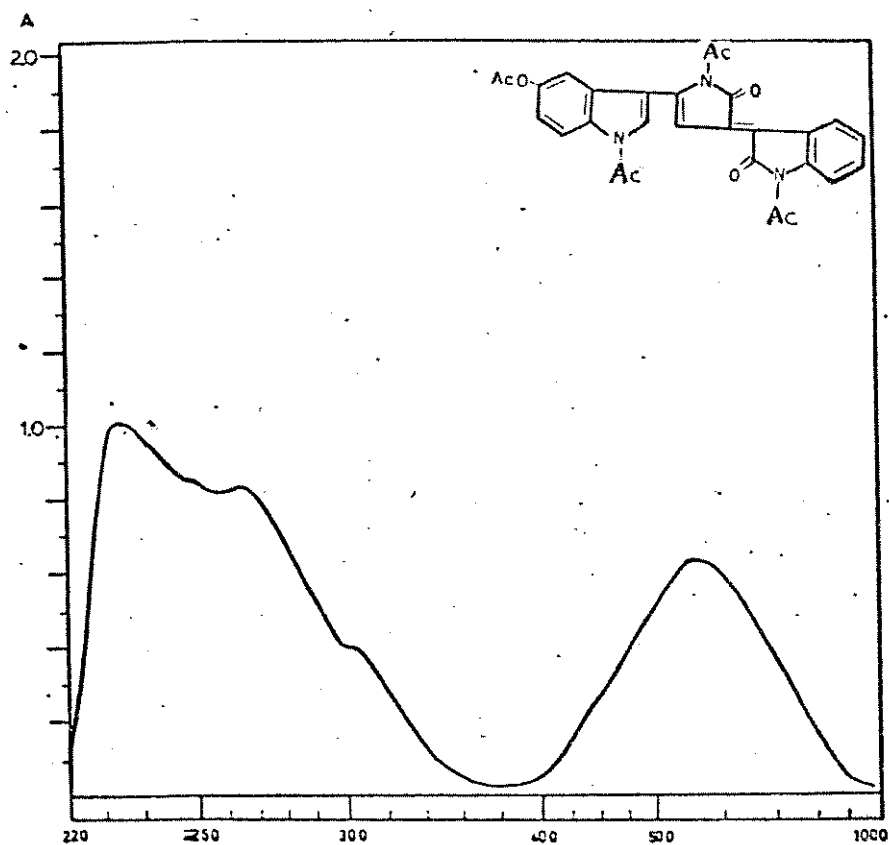


Figura E-9: Espectro UV do Pigmento I-acetilado (etanol)

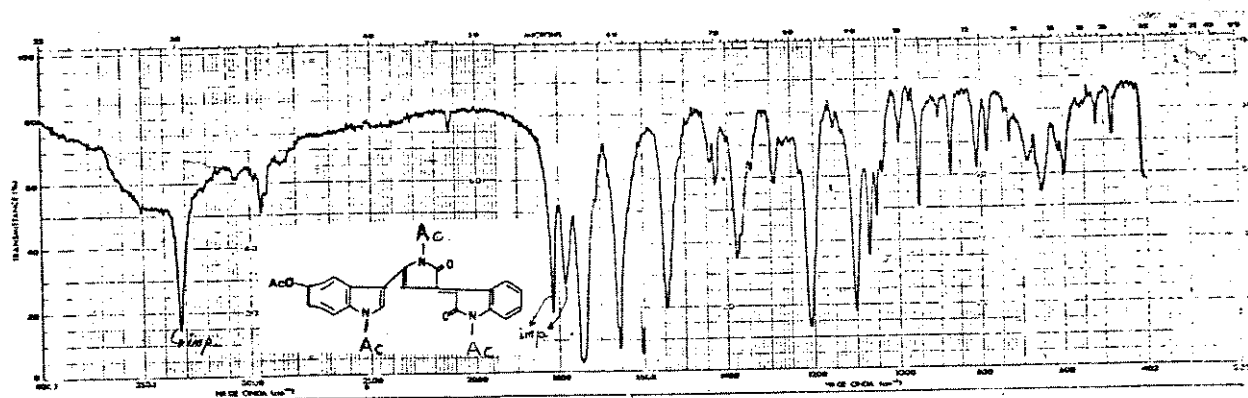


Figura E-10: Espectro IV do Pigmento I-acetilado (KBr)

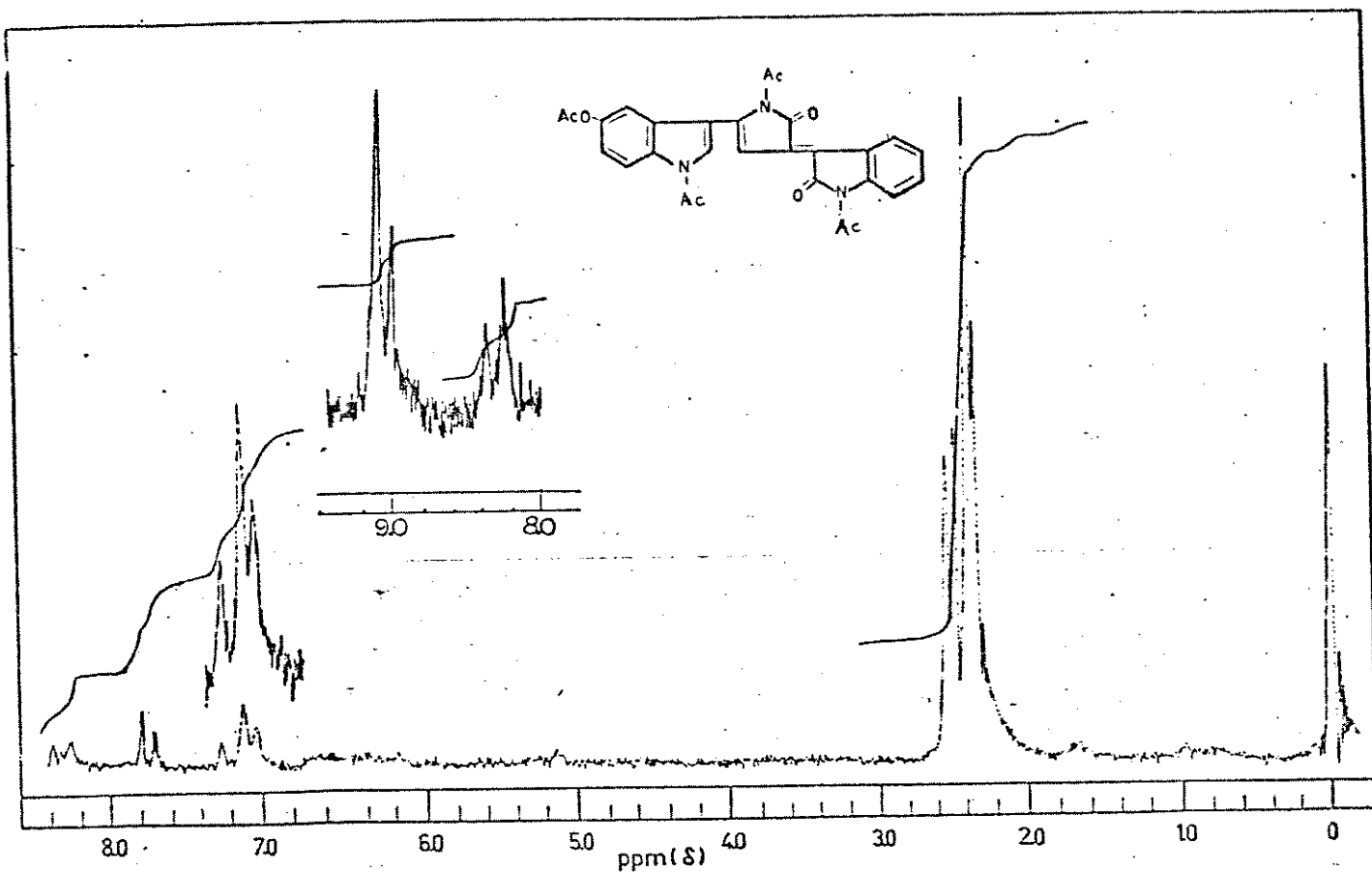


Figura E-11: Espectro RMN<sup>1</sup>H do Pigmento I-acetilado (CDCl<sub>3</sub>)

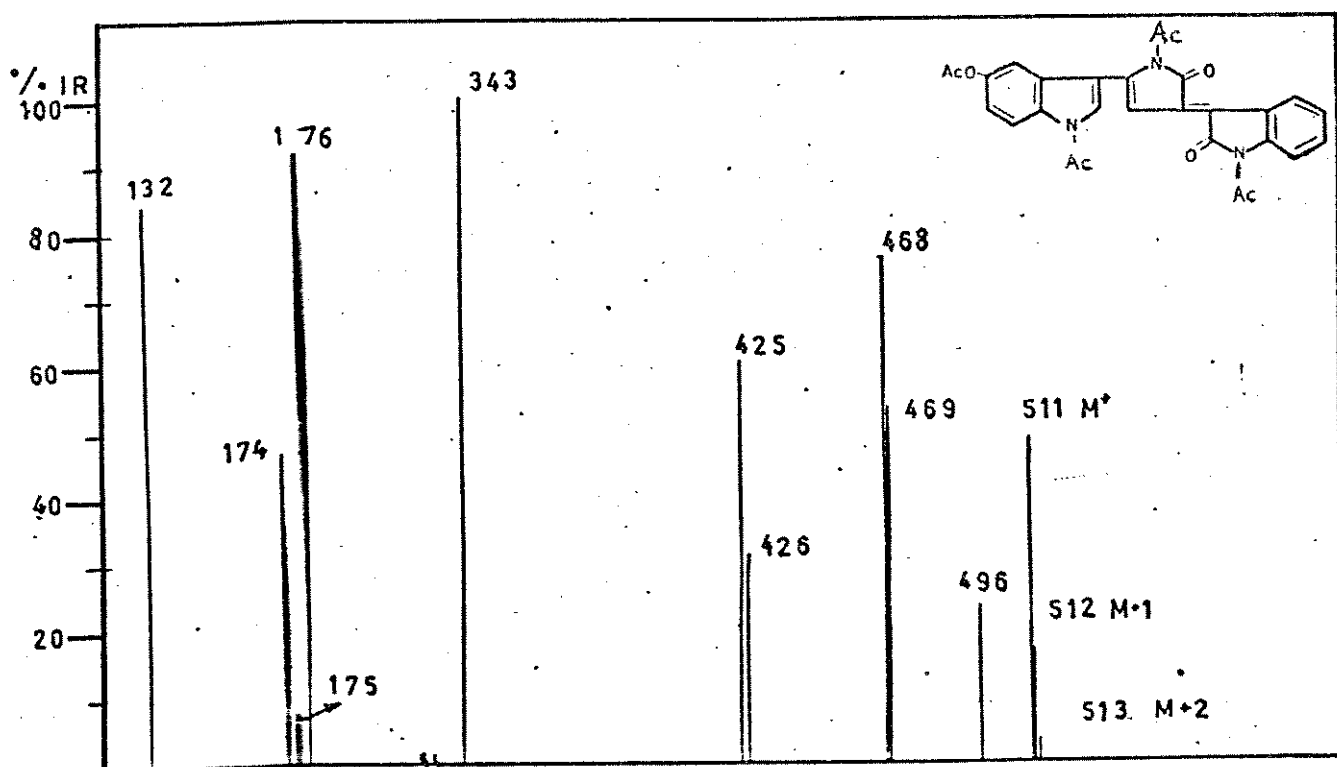


Figura E-12: Espectro de massa do Pigmento I-acetilado

drásticas comparado ao espectro de RMN<sup>1</sup>H do pigmento I. A análise de seu espectro indica que os sinais a  $\delta$  2,30-2,50 característico de grupos metil ligados a C=O são quatro singletes que integram em total de 12 prótons indicando a presença de 4 grupos -CO-CH<sub>3</sub>.

A região característica de anel aromático apresenta uma sinal largo entre  $\delta$  7,00-7,20 que integra para 3H, provavelmente podem corresponder aos prótons que apresentam maior multiplicidade ou seja os prótons 4 e 5 do núcleo isatina e ao próton 6 do núcleo indólico. A presença de dois grupos acetilas no sistema aromático indólico produz um deslocamento para campo maior do próton 2 do núcleo indólico, porém o próton 4 do anel pirrólico não sofre deslocamentos drástico.

O espectro de massa (Figura E-12) apresenta o íons molecular a m/z 511 (48,25%), M+1 512 (16%) e M+3 513 (2,9%), a distribuição das intensidades isotópicas mostraram o seguinte.

m/z	%M	Nor	C <sub>28</sub>	N <sub>3</sub>	O <sub>7</sub>
511(M)	48,25 ± 4,8	100	100	100	100
512(M+1)	16 ± 1,6	33,1 ± 3,3	31	1,18	0,28
513(M+2)	2,9 ± 0,3	6,0 ± 0,6	4,5	-	1,4

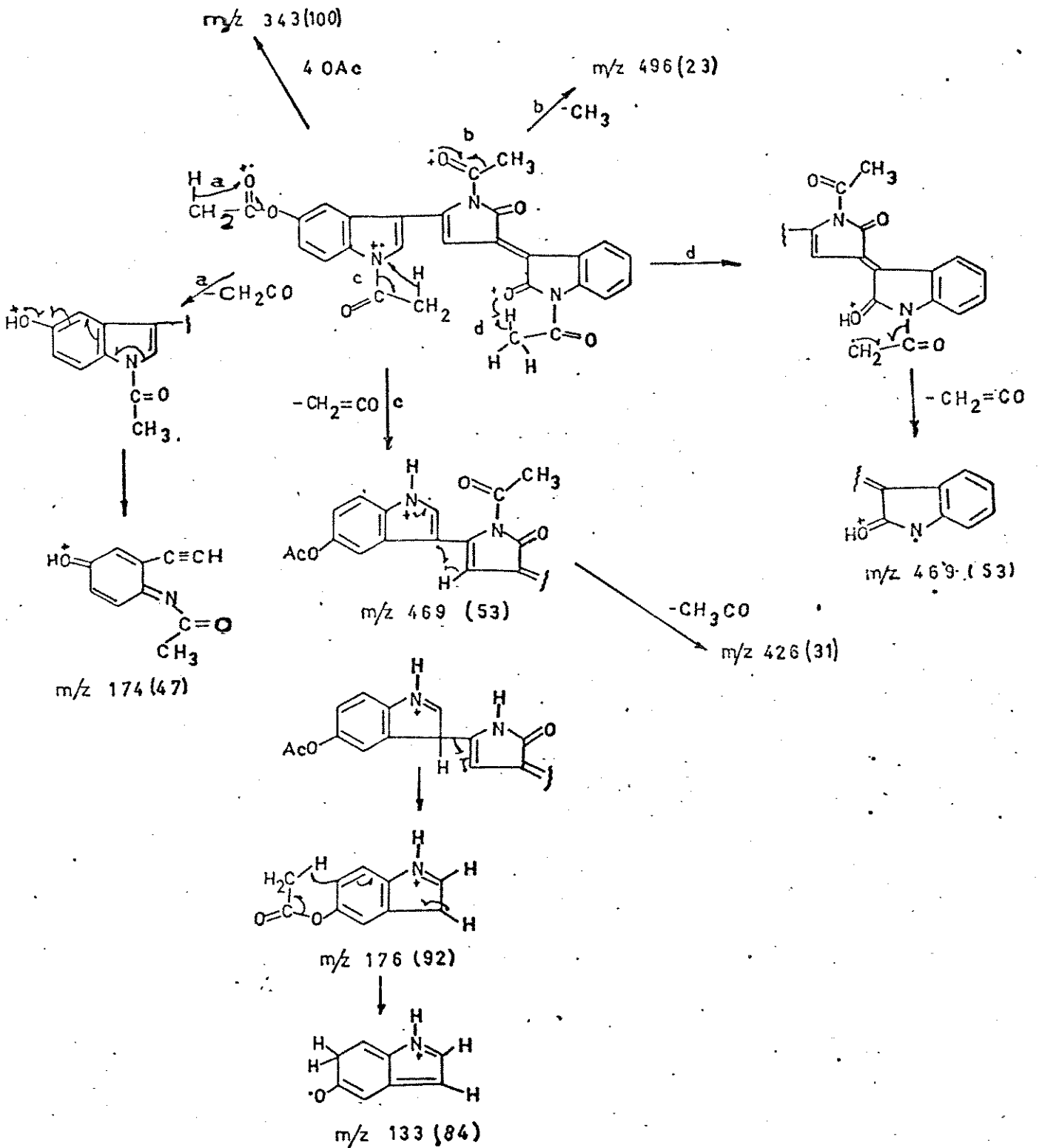
A correlação dos dados de abundância isotópica indica a seguinte fórmula molecular C<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>.

	calculado			experimental	
	C <sub>28</sub>	N <sub>3</sub>	O <sub>7</sub>		
M	100	100	100	100	100
M+1	31	1,18	0,28	32,46	33,1
M+2	4,5	-	1,4	5,9	6,0

Assim a fórmula encontrada é C<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>H<sub>21</sub>.

Os fragmentos mais importantes de seu espectro de massa estão mostrados no esquema VI.





Esquema VI. Fragmentos do EM do Pigmento I-acetilado

## PIGMENTO I SÓDICO

O composto pigmento I-sódico (vide seção 11.6.2 pag.22) foi obtido com 89,2% de rendimento, seu espectro de UV (Figura E-13) apresenta bandas características de aromático e indol em 290, 260 e 380 nm, na região do visível não apresenta absorção.

O espectro de IV (Figura E-14) apresenta sinais em  $3030\text{ cm}^{-1}$  característico de H ligado a dupla ligação, a  $1610\text{ cm}^{-1}$  absorção característica de C=C e em  $1680\text{ cm}^{-1}$  de carbonila.

O espectro de RMN<sup>1</sup>H em 90 MHz (Figura E-15) apresenta sinais na região aromática que integra para nove prótons e por comparação com o espectro de RMN<sup>1</sup>H do pigmento-I se pode dizer que os prótons aparecem a campo maior, devido a que o nitrogênio produz blindagem nos prótons, esta explicação satisfaz em parte os deslocamentos químicos porém não a multiplicidade.

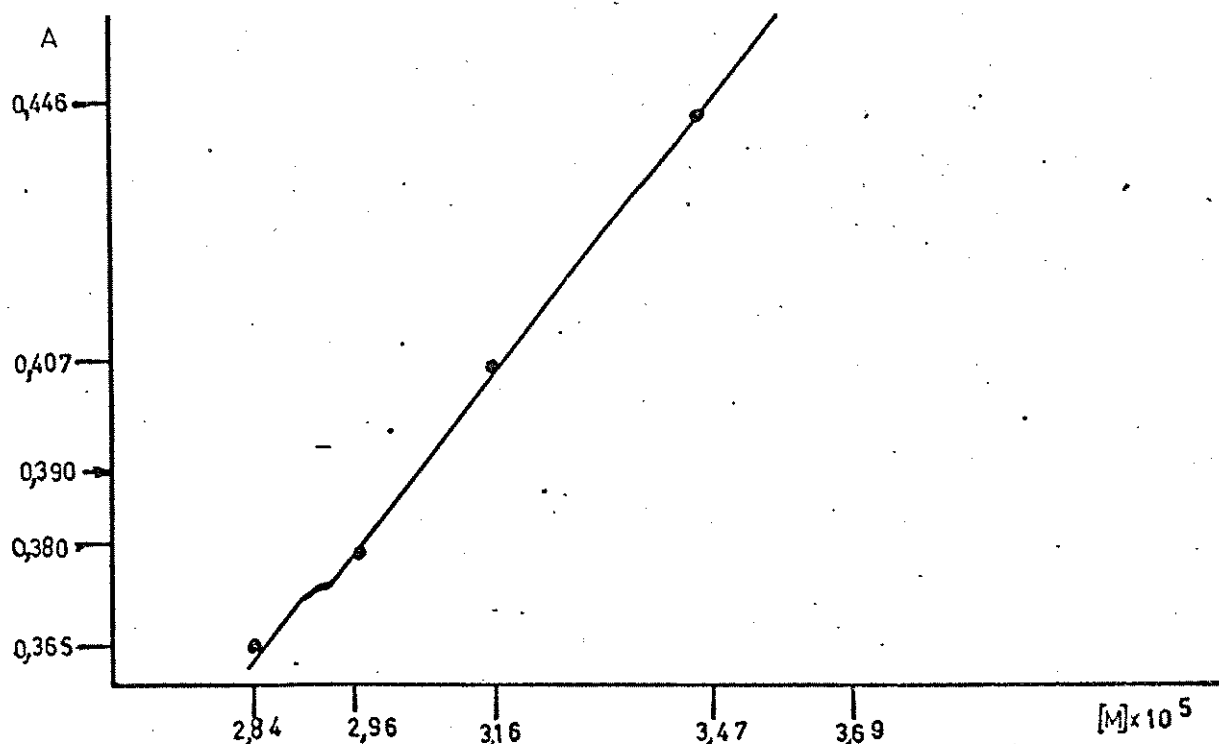


FIG.14. Curva padrão de pigmento I, os dados graficados apresentam um erro de  $\pm 0,008 \times 10^{-5} \text{ M}$  o que corresponde a um 2% de erro.

Aos prótons do núcleo isatin podem atribuir-se os seguintes

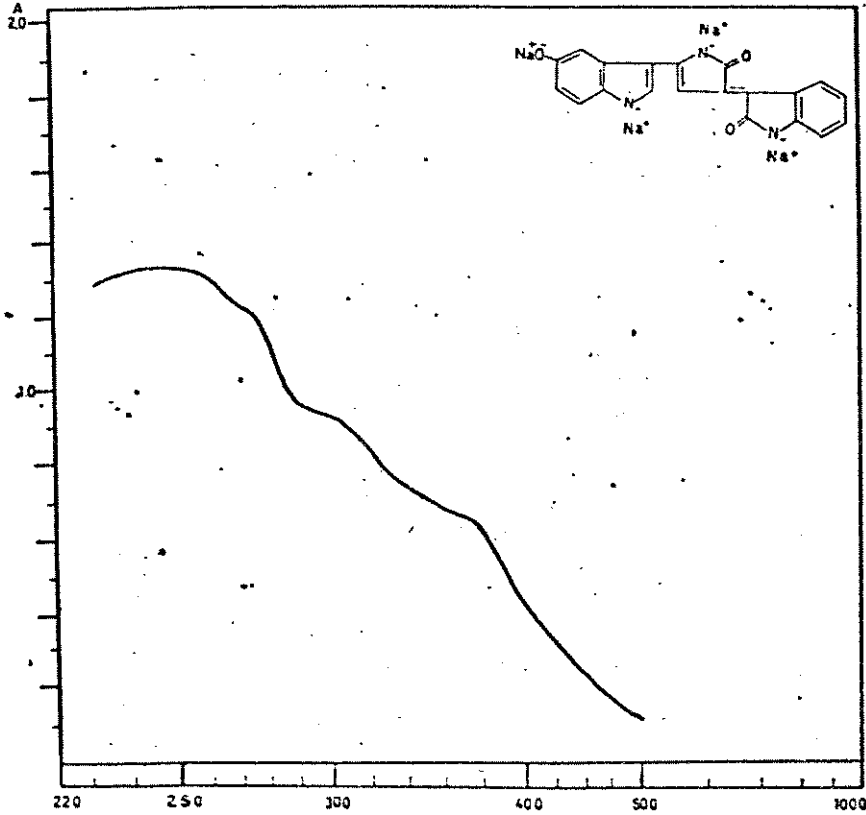


Figura E-13: Espectro de UV do Pigmento I-sódico (etanol)

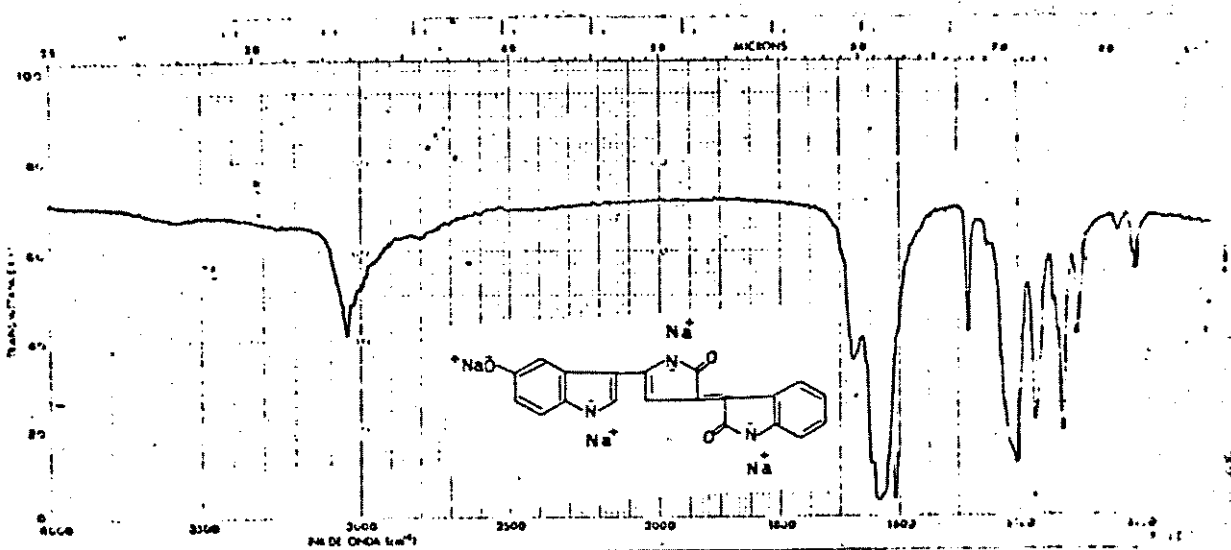


Figura E-14: Espectro de IV do Pigmento I-sódico (KBr)

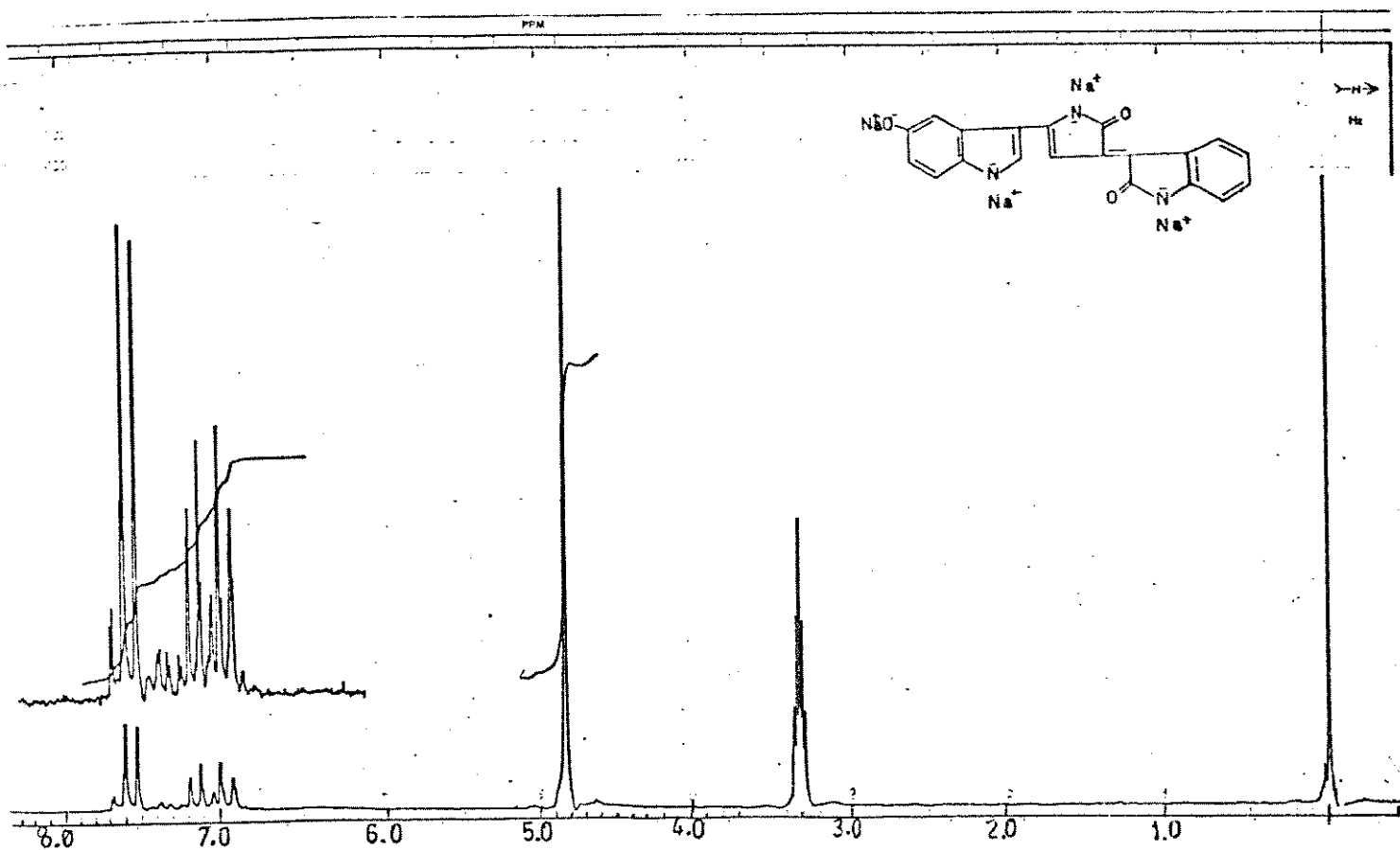


Figura E-15: Espectro  $\text{RMN}^1\text{H}$  do Pigmento I-sódico ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

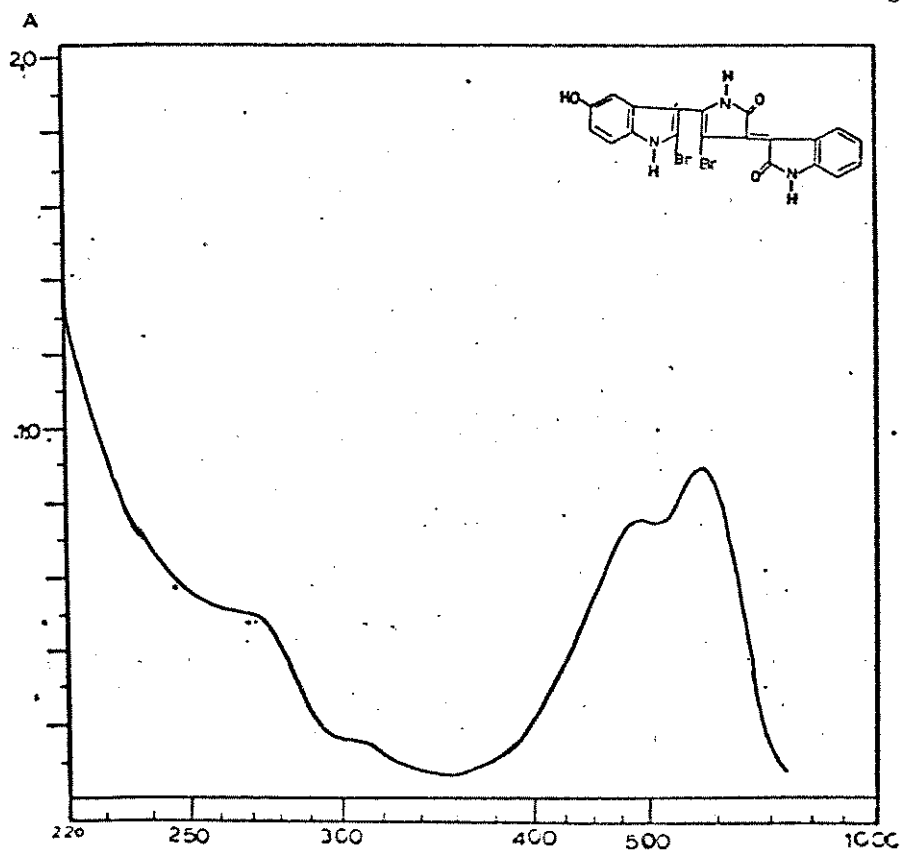


Figura E-16: Espectro UV do Pigmento I-Br (etanol)

sinais, 7H ( $\delta$ 6,90), 6H ( $\delta$ 7,25), 5H ( $\delta$ 7,00) e 4H ( $\delta$ 7,70), o próton lactâmico aparece como duplete a  $\delta$ 7,60.

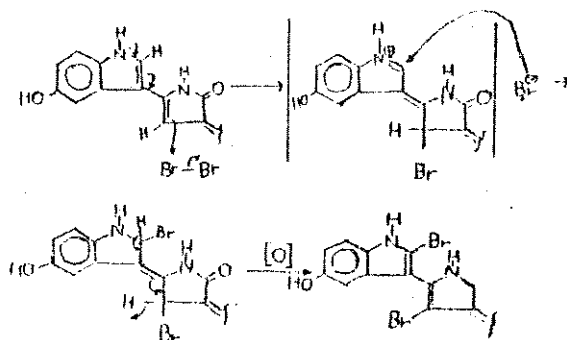
Os equivalentes de sódio foram calculados mediante uma curva de valoração construída com pigmento I (figura-13) (vide seção II.6.2 pag.22 ).

A absorbância da amostra problema foi de 0,390 unidades de absorbância e a intersecção da curva corresponde  $3,06 \times 10^{-5} M$  que representam 13,18 mg. de pigmento I ou 3,66 mg de sódio.

A quantidade de pigmento I sódico encontrado (16,76 mg) apresenta uma diferença de 0,08 mg (0,5%).

Este tratamento indicou a presença de 4 equivalentes de sódio por equivalente de pigmento I.

#### PIGMENTO I-BROMADO



O composto bromado (vide seção II.6.4 pag.24 ) mostra no espectro UV (Figura E-16) absorções a 270 e 310 nm característico de aromático e indol e na região do visível apresenta dois máximos a 490 e 580 nm.

O espectro de IV (Figura E-17) apresenta um sinal largo típico de OH e outro de NH em  $3450$  e  $3200 \text{ cm}^{-1}$  e na região de  $1730$  e  $1750 \text{ cm}^{-1}$  se observam absorções de carbonilas típicas de lactamas.

No espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  (Figura E-18) se observam sinais de NH

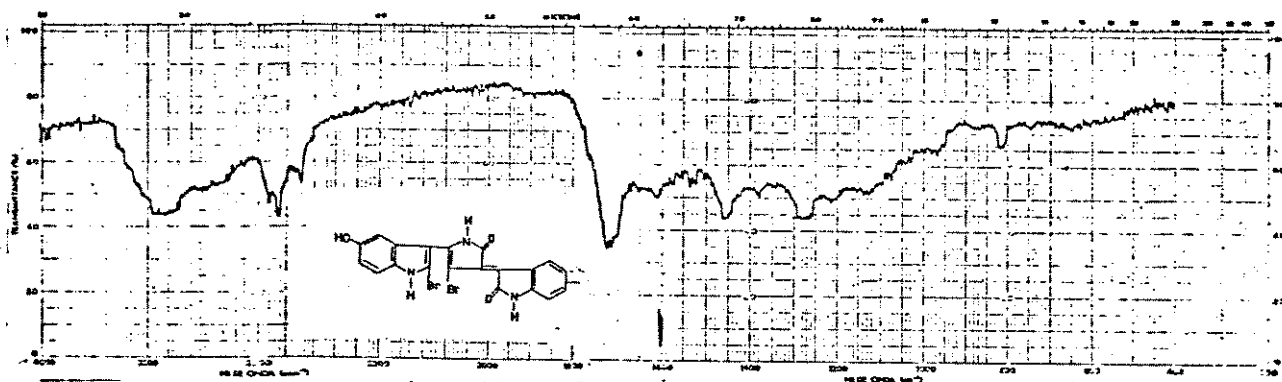


Figura E-17: Espectro IV do Pigmento-I bromado (KBr)

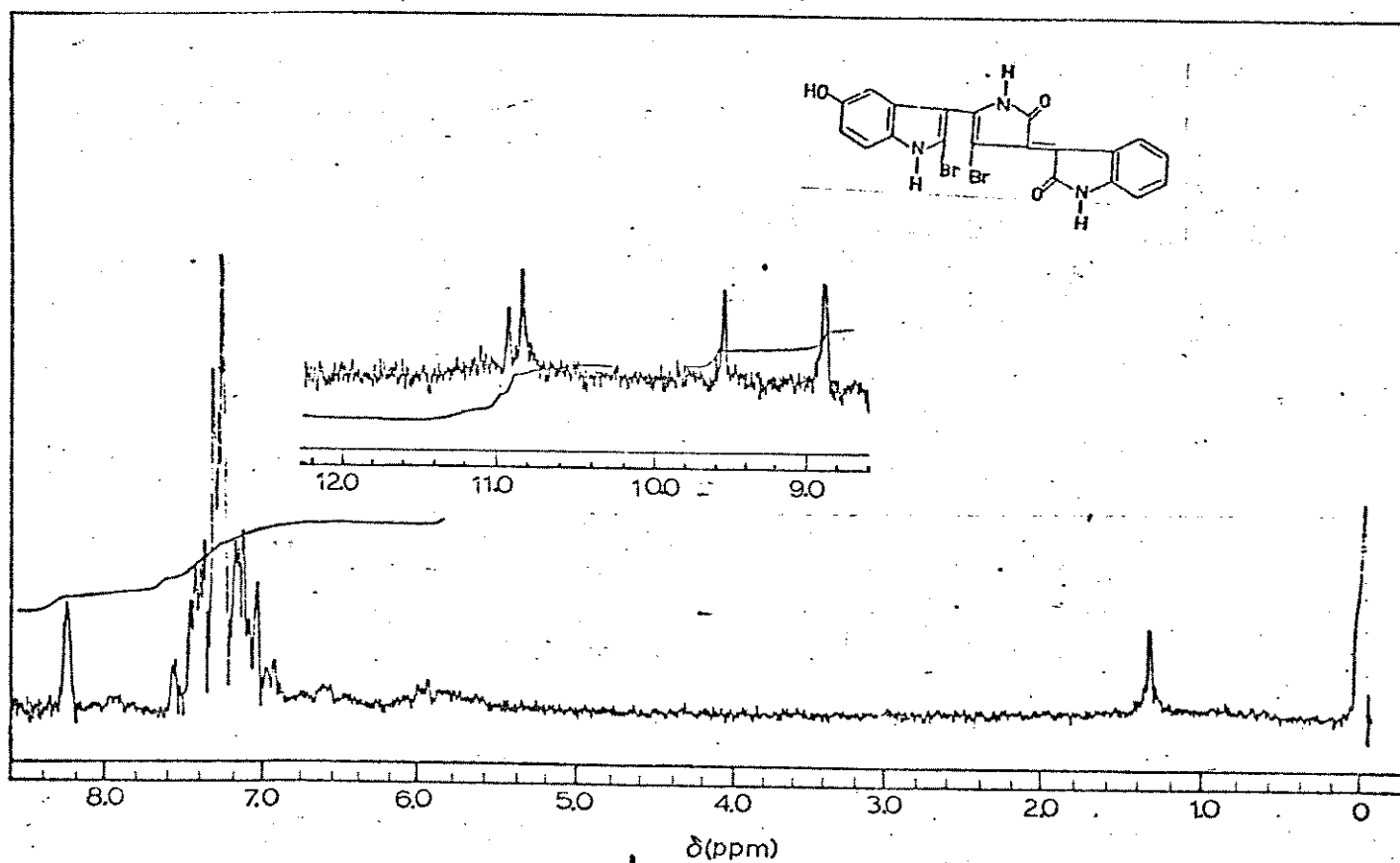
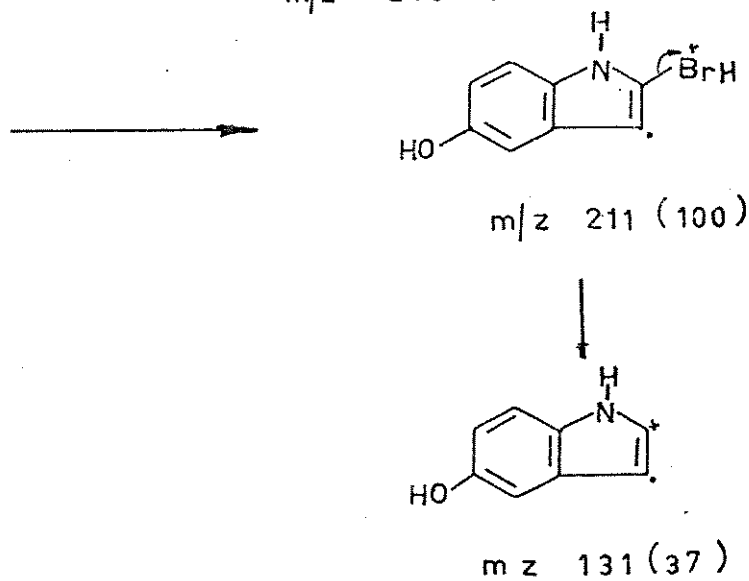
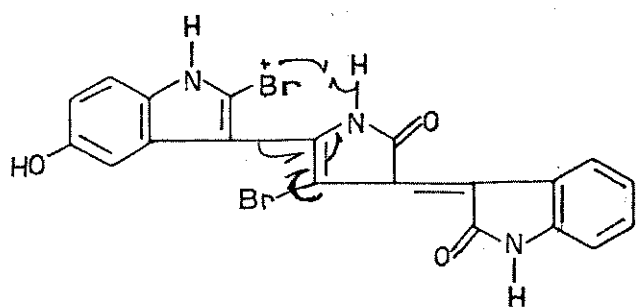
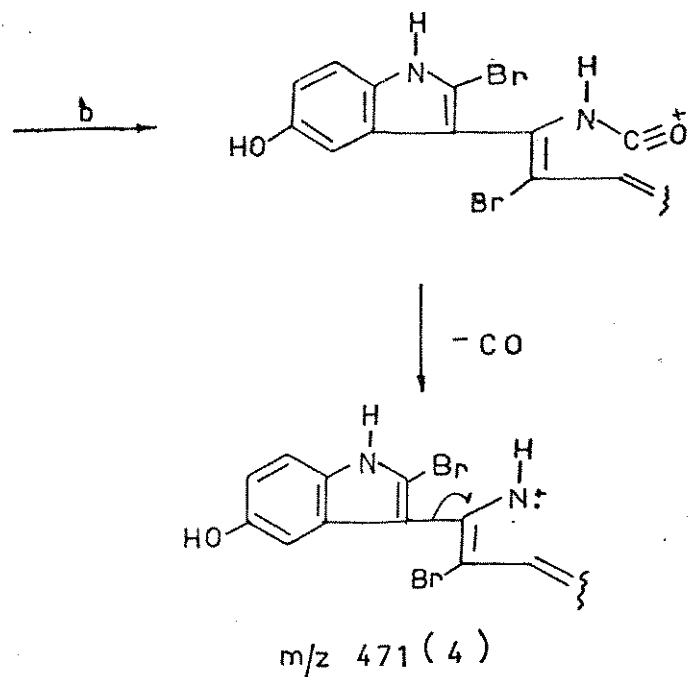
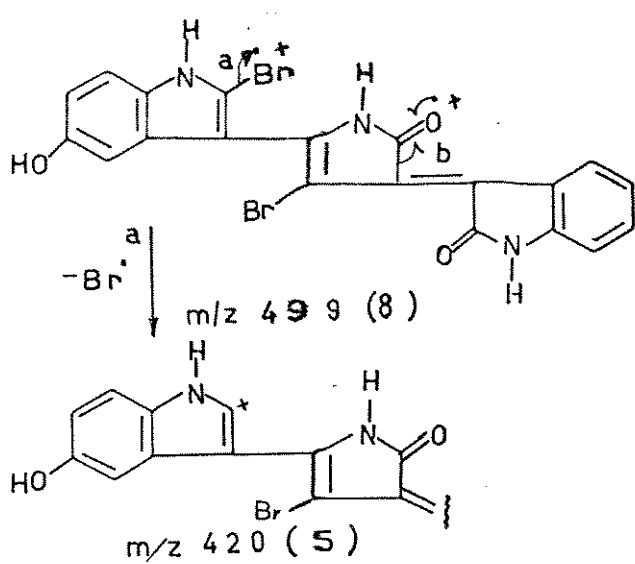


Figura E-18: Espectro RMN<sup>1</sup>H do Pigmento I-Br (C<sub>2</sub>D<sub>6</sub>CO)



Esquema VII. Fragmentos do EM do Pigmento I-bromado

indol em  $\delta$  10,90 (1H), para NH lactâmico em  $\delta$  10,80 (1H), e os singletes a  $\delta$  9,55 e 8,90 podem atribuir-se a NH do núcleo isatina e OH fenólico, estas atribuições podem ser trocadas. A  $\delta$  6,95 se observa um duplete (1H) que corresponde ao próton 7, H-6 (d) a  $\delta$  7,20, H-5 (d) a  $\delta$  7,25, H-4 (d) a  $\delta$  7,55 todos do núcleo isatina.

Os prótons do núcleo indólico se observam a  $\delta$  8,25 para o H-4 para o H-6 (d) a  $\delta$  7,10 e a  $\delta$  7,40 para o próton 7.

No espectro de massa (Figura E-19) pode-se ver o tripleto de picos na região do íon molecular, a relação das intensidades isotópicas dos íons  $M^+$ ,  $M+1$ ,  $M+2$  (1:2:1), indicam a presença de dois bromos, o pico base esta presente em  $m/z$  211 (100%) e  $m/z$  213 (98%) esta existência de duplete de picos indica que o pico base esta formado por só um bromo ( $m/z$  79) mais o núcleo hidroxil-indólico ( $m/z$  132) um íon de intensidade mediana. As fragmentações mais importantes é mostrado no esquema VII

#### PIGMENTO I-FORMILADO

O composto formilado (metilol) (vide seção II.6.3 pag.23) apresenta um espectro de UV (Figura E-20) muito similar ao do pigmento I-bromado e pigmento I com um marcado efeito hipocrômico.

O espectro de IV (Figura E-21) mostra sinais largas na região de  $3250\text{ cm}^{-1}$  característica de OH, o sinais em  $1680$  e  $1650\text{ cm}^{-1}$  se atribuem a carbonilas.

O espectro de RMN<sup>1</sup>H (Figura E-22) apresenta um sinal largo e intenso que integra para 4 prótons a  $\delta$  4,95 característico de C-O-N-CH<sub>2</sub>- [119]. A  $\delta$  5,80 se observa um singlete largo que integra para dois prótons que podem ser associados a N-CH<sub>2</sub> ligada a



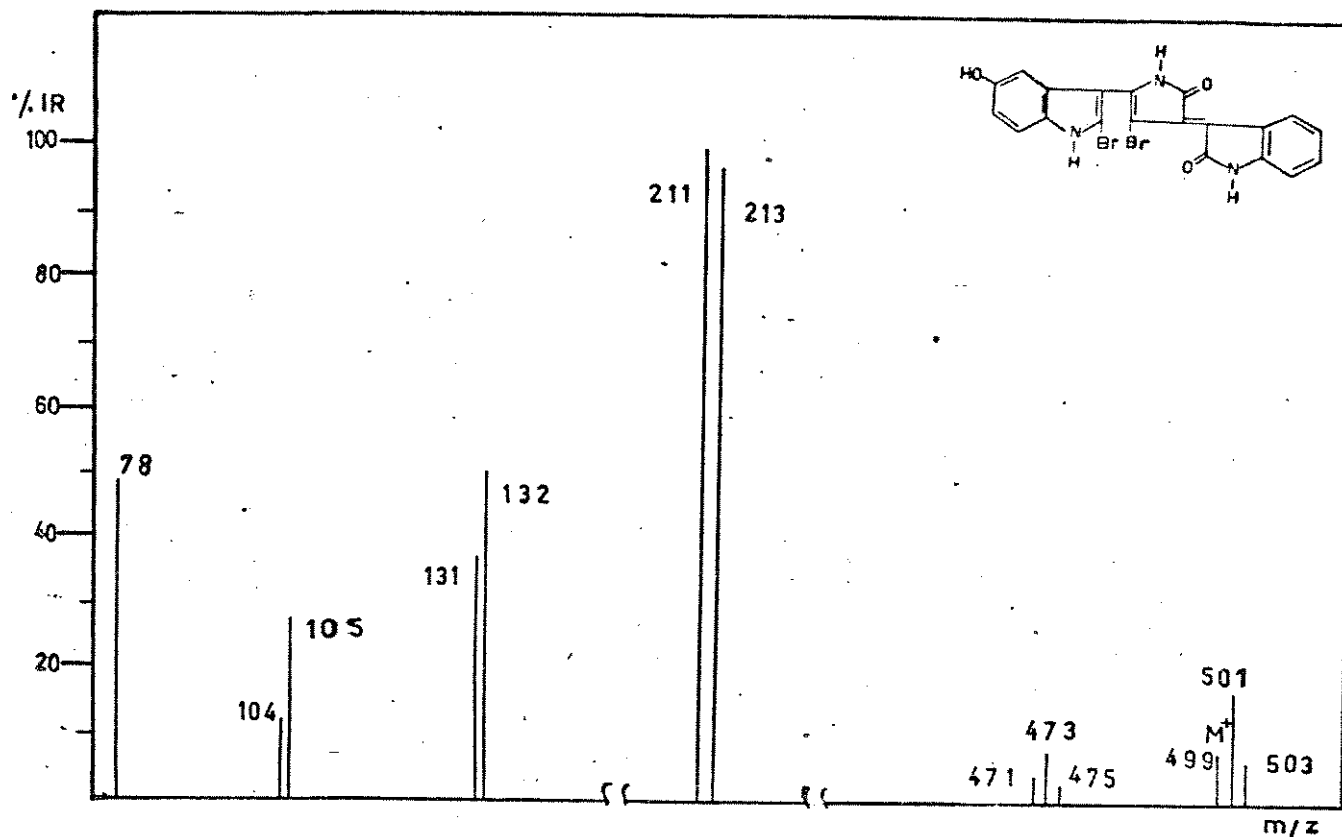


Figura E-19: Espectro massa do Pigmento-I bromado

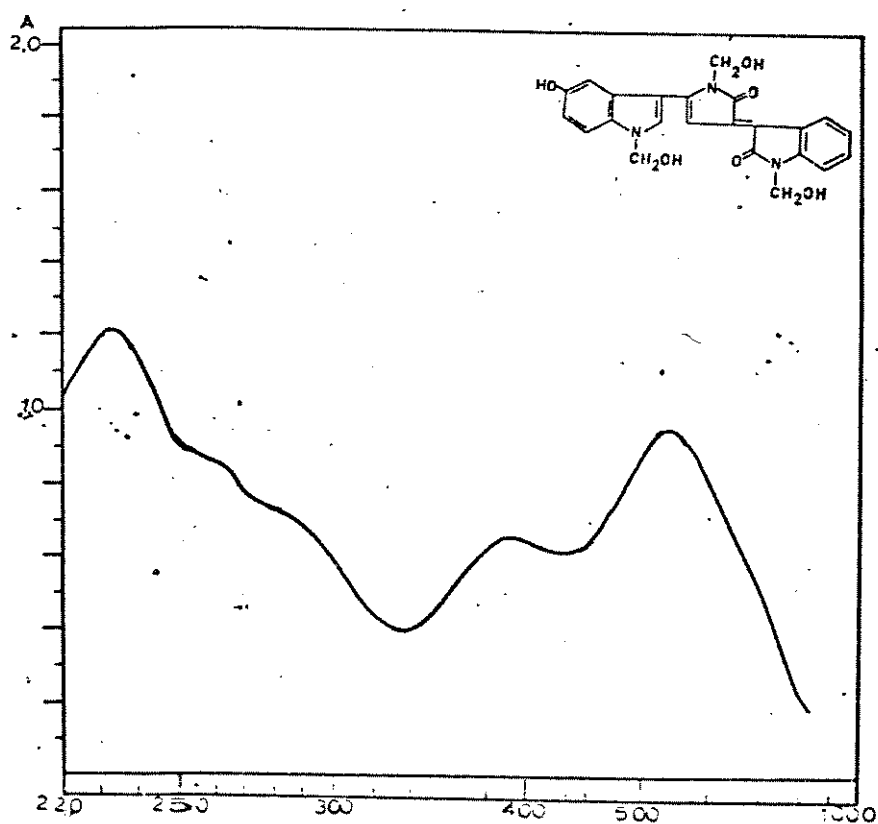


Figura E-20: Espectro UV do Pigmento-I formilado (etanol)

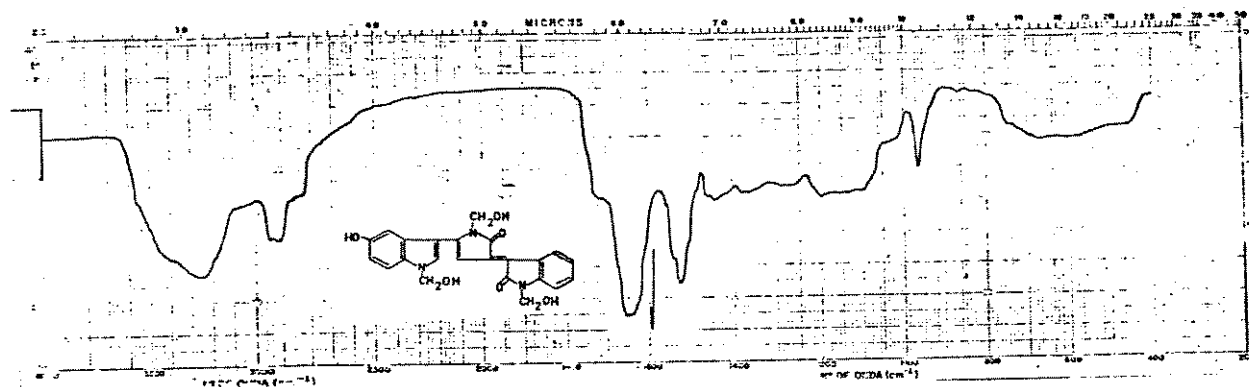


Figura E-21: Espectro IV do Pigmento-I formilado (KBr)

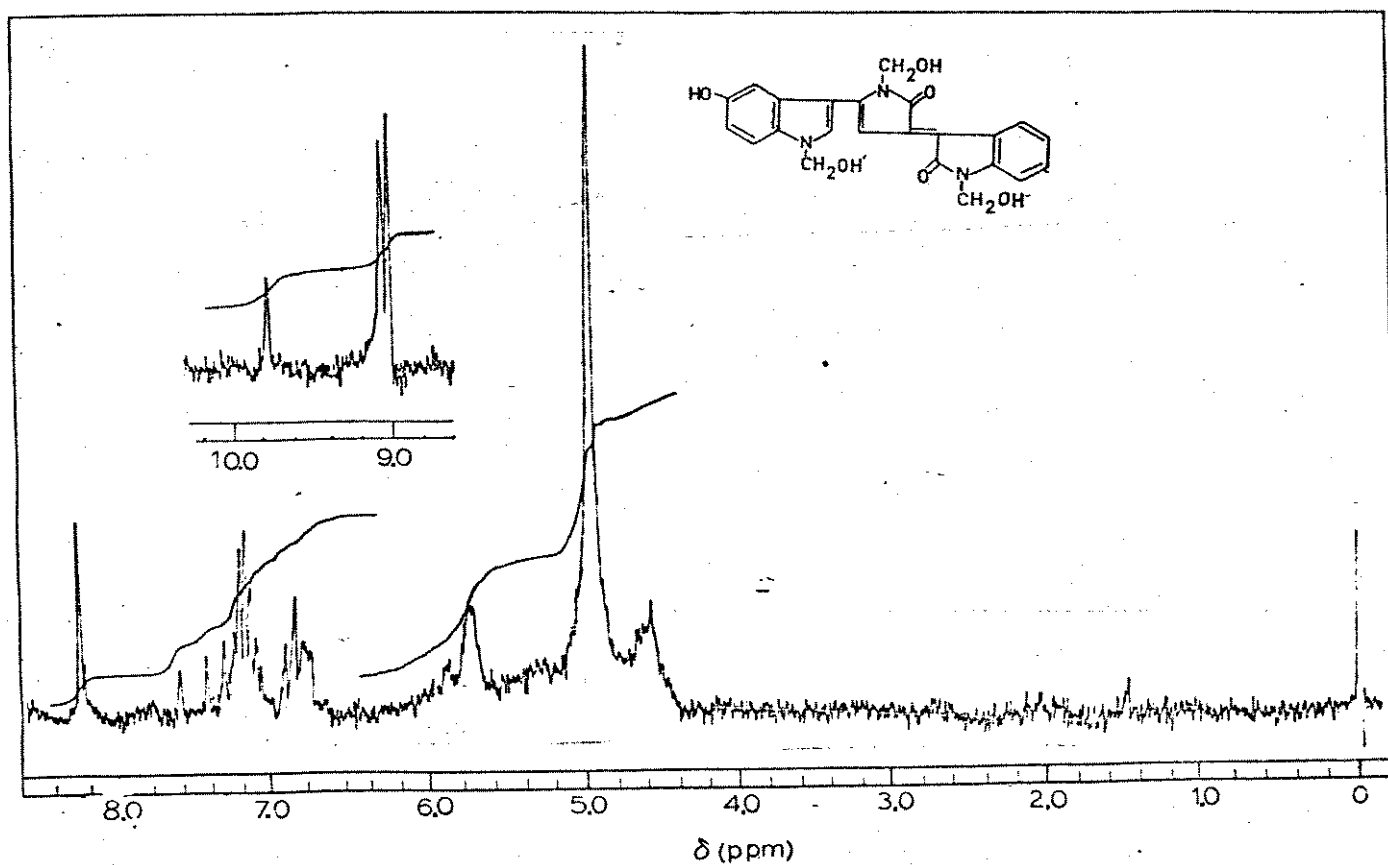


Figura E-22: Espectro RMN<sup>1</sup>H do Pigmento-I formilado (D<sub>2</sub>O)

nitrogênio indólico, os prótons de OH não são observáveis devido a trocas com o solvente ( $D_2O$ ).

O resto do espectro não sofre alterações importantes. Ao grupo hidroxila fenólico se atribui o sinal a  $\delta$  9,78, que também troca com  $D_2O$  embora muito mais lenta que OH do metilol.

Aos prótons do núcleo isatina podem atribuir-se as seguintes sinais: 4-H (d) a  $\delta$  9,10, 5-H, 6-H (m) a  $\delta$  7,00-7,30 e 7-H (d) a  $\delta$  6,90.

O proton 4 do anel pirrólico a  $\delta$  7,62 (s), no núcleo indólico o 4-H a  $\delta$  7,40 (s), 6-H a  $\delta$  6,80 (m), 7-H a  $\delta$  7,35 (s), 2-H a  $\delta$  8,25 (s).

O espectro de massa  $M^+$  433 apresenta uma abundância isotópica de  $m+1$  e  $m+2$  que concorda para 23 átomos de Carbono e 6 oxigênios. O esquema VIII apresenta os fragmentos mais importantes.

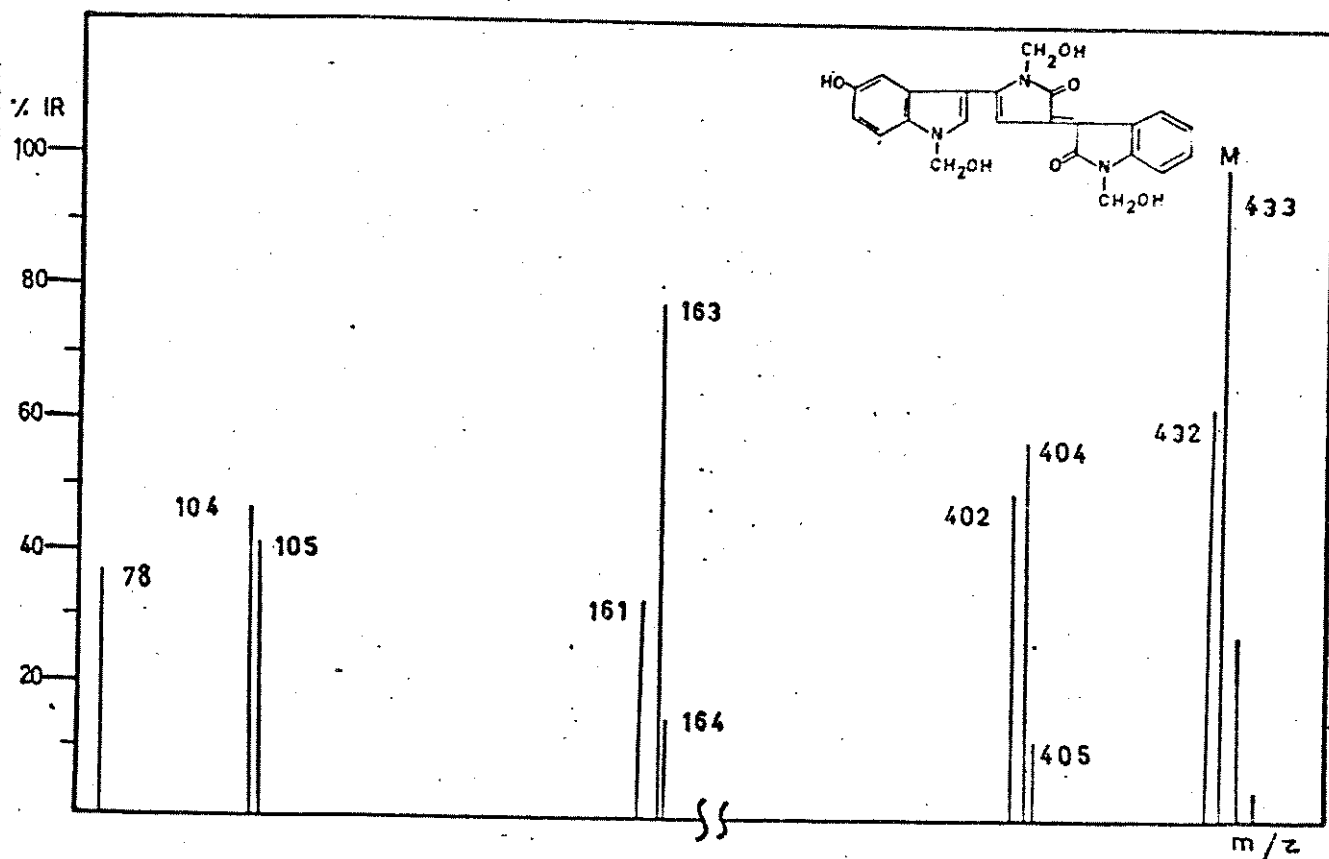
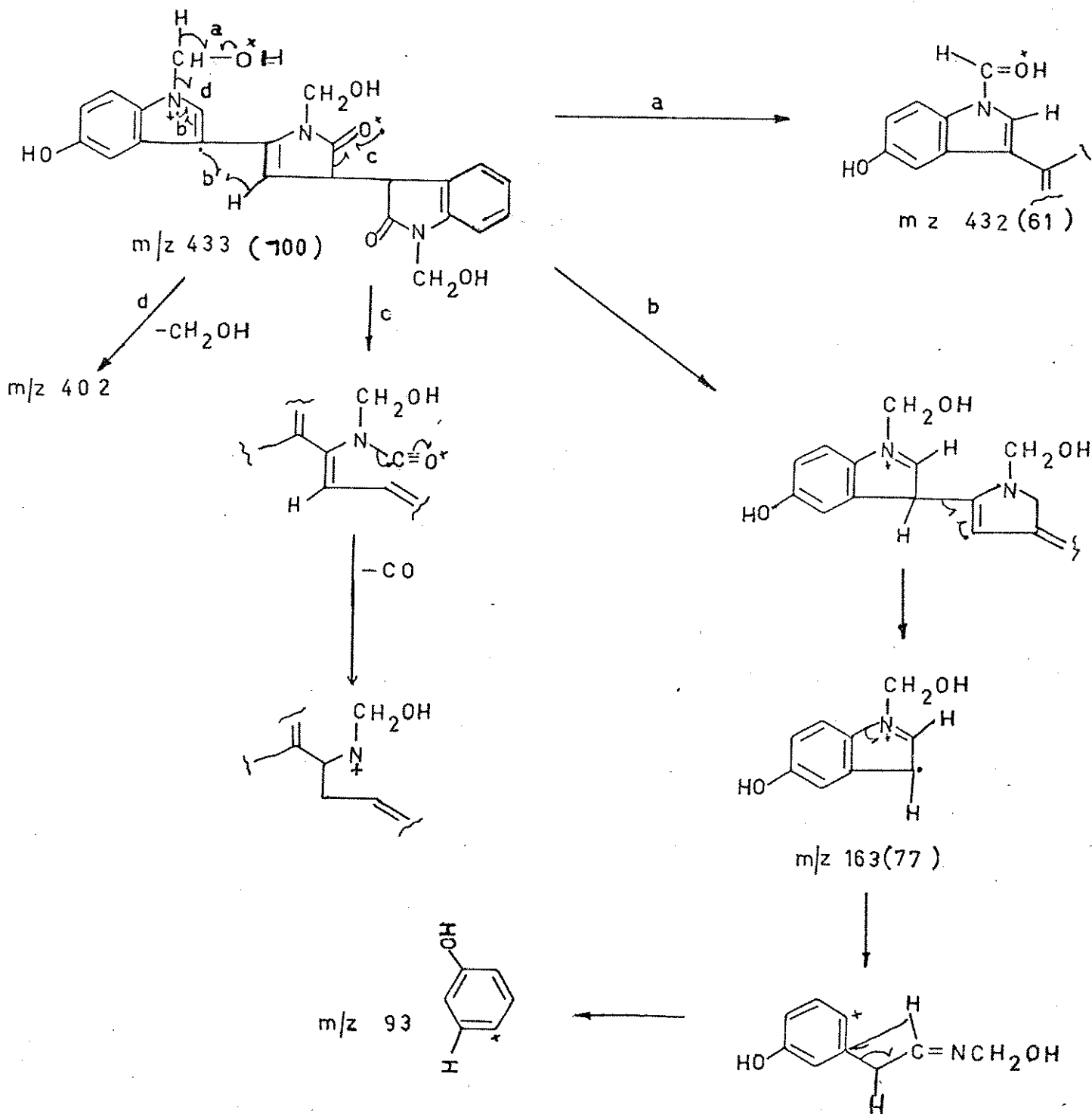


Figura E-23: Espectro de massa do Pigmento I-formilado.



Esquema VIII. Fragmentos do EM do Pigmento I-formilado

## CONCLUSÕES

Como podemos ver temos chegado a cobrir plenamente nossos objetivos colocados na pag.

- Otimizar a biosíntese do pigmento I: por exemplo, as condições de temperatura de 28 °C a pH 7,0 em um nutriente enriquecido com metionina e vitamina B-12, obtivemos rendimentos de aproximadamente 1% em peso seco da bactéria, considerando que a produção usual de outros antibióticos [5] não alcançam valores maiores que 0,5%, este fato é bastante promissor para iniciar uma produção em escala semipiloto.

- Caracterizar sistematicamente o pigmento I e seus derivados: Embora o pigmento I fosse conhecido há vários anos, não existia na literatura uma caracterização espectroscópica. Nosso trabalho mostra uma caracterização por UV, IV, EM, RMN<sup>1</sup>H e compara sua estrutura com dos derivados.

- Aumentar a solubilidade do pigmento I: Tanto o sal de sódio como o metilol são totalmente solúveis em água o que permite fazer testes biológicos sem interferência de solventes orgânicos.

Uma vez que estes objetivos foram alcançados, estamos agora interessados em aspectos biossintéticos do pigmento I.

Uma vez que se conheça perfeitamente o mecanismo biogenico da biossíntese do pigmento I, estaremos em condições de alterar esses passos e obter uma grande produção de material biológico.

Este sera um dos grandes desafios que tentaremos desvendar na continuação do nosso trabalho. O segundo aspecto que deixa intrigado neste trabalho é: qual é a ação da droga a nível de bactéria e de tripanossoma. Tentaremos assim, estudar a ação do pigmento I e sua atividade como antibiótico e como antitripanossomal.

Acredita-se que uma visão química de um problema biológico em

certa medida garante um exito neste tipo de problema.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 A. Salle, "Fundamental Principles of Bacteriology" 4<sup>o</sup> Ed. Mc. Graw Hill, London, pg 137 (1954).
- 2 S. Fukui, A. Tanaka, em Advan. Biochem. Eng., 17, 1 (1980)
- 3 S. Waksman, "Microbiol. Antagonisms and Antibiotic Substances", New York, (1974).
- 4 A. Fernandes, "Farmacognosia", Ed. Fundação Calouste Gulbenkian/Lisboa, vol 2, pg 755 (1967).
- 5 J. Martin, Am. Scientist. 68, 64, (1980).
- 6 J. Torrey, Am. Scientist. 73, 354, (1985).
- 7 K. Yamada, Biotech. Bioeng. 19, 1563 (1977).
- 8 A. Korolkovas, J. Burckholter, "Química Farmaceutica", Cap 2, Editorial Guanabara, Rio de Janeiro (1982).
- 9 A. Bayer, C. Knop, J. Liebigs, Ann. Chem. 40, 1, (1866).
- 10 A. Bayer, E. Emmerling, Chem. Ber. 2, 679, (1869).
- 11 E. Fisher, J. Liebigs, Ann. Chem. 736, 116, (1866)
- 12 W. Remers, R. Brown, Heterocycle. Compounds Indole I, Ed. W. Houlikan, Wiley Interscience, New York (1972).
- 13 D. Lednicer, L. Nistcher, "The Organic Chemistry of Drug Synthesis" Vol 1, pag 316, Ed. J. Willey & Sons, N.Y. (1977).
- 14 L. Rice, E. Hertz and M. Freed, J. Med. Chem., 7, 313 (1964).
- 15 T. Shen, R. Lellis, T. Windolz, A. Matzuk, J. Amer. Chem. Soc. 85, 488, (1963).
- 16 U. Horlein, Chem. Ber., 87, 1163, (1954).
- 17 R. Woodward, F. Bader, H. Bickel, A. Frey R. Kierstead, J. Amer. Chem. Soc., 78, 2033, 2653 (1956). Tetrahedron, 2, 1 (1958).
- 18 S. Ehrenpreis, Progr. Drug. Res., 14, 59 (1970).
- 19 S. Ehrenpreis, Pharmacol. Rev., 131 (1969).

- 20 R. Furchgott, Annu. Rev. Pharmacol., 4, 21 (1964).
- 21 H. Mautner, Pharmacol. Rev., 19, 107 (1967):
- 22 H. Mautner, Annu. Rep. Med. Chem., 1968, 230 (1969)
- 23 D. Waud, Pharmacol. Rev., 20, 49 (1968).
- 24 R. Rice, J. Chem. Educ., 44, 565 (1967).
- 25 M. Calvin M. Jorgensen, "Biorganic Chemistry Reading from Scientific American", Ed., W. H. Freeman Co, San Francisco, USA (1968)
- 26 M. Van Wittenan H. Els, J. Amer. Chem. Soc., 85, 3429 (1963).
- 27 J. Shehan, D. Mania, S. Nakamura, J. Amer. Chem. Soc., 87, 2338, (1965).
- 28 T. King, L. Craig, J. Amer. Chem. Soc., 77, 6624 (1955).
- 29 Merck U.S. Patent. Chem. Abst., 31.61684 (1964).
- 30 W. Corke, J. Bacteriol., 62, 5515 (1951).
- 31 L. Caldas, Photochem. Photobiol., 26, 1 (1977).
- 32 P. Sneath, Iowa. State. Coll. Sci. 34, 243 (1960).
- 33 M. Black, J. Shahan, J. Am. Med. Assoc., 110, 1270 (1938).
- 34 M. Soule, Amer. J. Pathol., 15, 592 (1939).
- 35 H. Schattenberg, W. Harris, J. Bacteriol., 44, 509 (1942).
- 36 H. Darrasse, R. Mazand, P. Gindiali, R. Camain, Bull. Soc. Pathol. Exotique, 48, 704 (1955).
- 37 J. Brison, Rev. Pathol. Gén. Comparée., 58, 211 (1968).
- 38 R. Dauphinais, G. Robben, Am. J. Chim. Pathol., 50, 592 (1968).
- 39 A. Ognibene, E. Thomas, Am. J. Chim. Pathol., 54, 607 (1970).
- 40 W. Johnson, A. Disalvo, R. Stener, Am. J. Chim. Pathol., 56, 400 (1971).
- 41 R. Sivendra, K. Lim, Am. J. Chim. Pathol., 64, 421 (1975).
- 42 C. Knowles, Bacteriol. Rev., 40, 652 (1976).
- 43 P. Collins, P. Rodgers, C. Knowles, J. Gen. Microbiol., 117,



- 73 (1980).
- 44 P. Sneath, J. Whelan, R. Singh, D. Edwards, Lancet., 276, (1953).
- 45 P. Michaels, W. Corpe, J. Bacteriol., 89, 106, (1965).
- 46 A. Macadam, K. Nowles, Biochim. Biophys. Act., 786, 123, (1984).
- 47 A. Smith, R. Hunt, J. Chem. Tech. Biotechnol., 35 B, 110, (1985).
- 48 E. Han, J. King, Am. J. Clin. Pathol., 31, 133, (1959).
- 49 R. De Moss, N. Evans, Bacteriol. Proc., 117, (1957).
- 50 C. Mitoma, H. Weissbach, S. Udenfriend, Arch. Biochem. Biophys., 63, 122, (1956).
- 51 C. Letendre, G. Dickens, G. Guroff, J. Biol. Chem., 249, 7188, (1974).
- 52 R. De Moss, M. Happel, J. Bacteriol., 77, 137, (1959).
- 53 R. De Moss, N. Evans, J. Bacteriol., 79, 729, (1960).
- 54 E. Friedheim, Compt. Rend. Soc. Biol., 110, 352, (1932).
- 55 J. Hoch, R. De Moss, J. Bacteriol., 91, 667, (1966).
- 56 H. Nakazawa, H. Enel, S. Okurmura, H. Yashida, H. Yamada, FEBS. Lett., 25, 43, (1972)
- 57 M. Gustafson, D. Miller, P. Davis, J. Rosazza, C. Chang, H. Floss, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 842, (1977).
- 58 C. Letendre, G. Dickens, G. Guroff, J. Biol. Chem. 249, 133, (1974).
- 59 L. Boisbaudran, Compt. Rend. Soc. Biol., 94, 562, (1882)
- 60 W. Hartley, Sci. Proc. Roy. Dublin Soc., 144, 63, (1913)
- 61 J. Reilly, G. Pyne, Biochem. J., 21, 1059, (1927)
- 62 W. Tobie, J. Bacteriol., 35, 11, (1935)
- 63 W. Tobie, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 34, 620, (1936)
- 64 W. Tobie, J. Bacteriol., 38, 11 (1938)
- 65 W. Tobie, Bull. Assoc. Diplomas. Microbiol. Fac. Pharm.

- Nancy, 18, 7, (1936)
- 66 F. Wude, A. Rothaas, Z. Hoppe-Seyler's, Physiol. Chem., 223, 113, (1934)
- 67 O. Ehrismaran, W. Noethling, Biochem. Z., 284, 376, (1936)
- 68 F. Wude, Swane. Arch. Explt. Pathol. Pharmacol., 186, 532, (1937)
- 69 A. Sartorg. J. Meyer, J. Waeldel , Compt. Rend. Soc. Biol., 206, 950, (1938)
- 70 A. Sartory, J. Meyer, J. Waeldel , Bull. Sci. Pharmacol, 45, 302, (1938)
- 71 F. Strong, Science, 100, 287, (1944)
- 72 J. Marchal, Trav. Lab. Microbiol. Fac. Pharm. Nancy, 18, 15, (1956)
- 73 P. Sneath, J. Gen. Microbiol., 15, 70, (1956)
- 74 K. Kimmel, S. Maber, Can. J. Microbiol., 15, 111, (1969)
- 75 G. Whitnaek, G. Soli, J. Electroanal. Chem., 12, 60, (1966)
- 76 R. De Moss, M. Evans, J. Bacteriol., 78, 583, (1959)
- 77 R. Beer, R. Clark, H. Khorana, A. Robertson, J. Chem. Soc., 885, (1945)
- 78 R. Beer, B. Jennings, A. Robertson, J. Chem. Soc., 2679, (1954)
- 79 J. Ballantine, C. Barret, R. Beer, B. Boggians, K. Clark, S. Earldley, B. Jennings, A. Robertson, J. Chem. Soc., 2222, (1957)
- 80 J. Ballantine, C. Barret, R. Beer, S. Earldley, A. Robertson, B. Show, T. Simpson, J. Chem. Soc., 755, (1957)
- 81 C. Barret, R. Beer, G. Dodd, A. Robertson, J. Chem. Soc., 4810, (1957)
- 82 J. Ballantine, R. Beer, D. Crutchley, G. Dodd, D. Palmer, Proc. Chem. Soc., 232, (1958)

- 83 J. Ballantine, R. Beer, D. Crutchley, G. Dodd, D. Palmer, J. Chem. Soc., 2292, (1960)
- 84 H. Laatsch, R. Thomson, P. Cox, J. Chem. Soc. Perkin Trans., II, 1331, (1984)
- 85 N. Durán, A. Faljoni-Alario, An. Acad. Brasil. Ciênc., 52, 297, (1980)
- 86 V. Campos, S. Erazo, N. Durán, Arq. Biol. Tecnol., 25, 147, (1982)
- 87 N. Durán, A. Faljoni-Alario, Ciência e Cultura, 30, 609, (1978)
- 88 N. Durán, S. Erazo, V. Campos, An. Acad. Brasil. Ciênc., 55, 231, (1983)
- 89 L. Caldas, A. Leitão, S. Santos, R. Tyrrell, Internat. Symp. Curr. Topics in Radiobiology and Photobiology Acad. Brasil. Ciênc. R.J., 121, (1978)
- 90 B. Muel, M. Santos, Internat. Symp. Curr. Topics Radiobiology and Photobiology, Acad. brasil. Ciênc. R.J., 127, (1978)
- 91 J. Scott Walls, W. Trejo, P. Principe, R. Bush, M. Georgopapadakou, D. Banner, R. Sykes, J. Antibiotics, 35, 1182, (1982)
- 92 W. Parker, W. Koster, C. Cimarusti, D. Floyd, Wen-Chih Liu, M. Rathnum, J. Antibiotics, 35, 187, (1982)
- 93 J. Scott Wells, J. Hunter, G. Astle, J. Sherwood, C. Ricca, W. Trejo, D. Bonner, R. Sykes, J. Antibiotics, 35, 814, (1982)
- 94 Y. Iitaka, J. Antibiotics, 36, 4, (1983)
- 95 S. Moreno, R. Docampo, R. Mason, W. Leon, A. Stappani, Arch. Biochem. Biophys., 218, 585, (1982)
- 96 T. Ohnishi, Y. Ohashi, K. Nozu, S. Inoki, Mutation. Res., 77, 241, (1980)

- 97 T. Ohnishi, Y. Ohoshi, K. Nozu, S. Inoki, Jpn. J. Genet., 58, 505, (1983)
- 98 R. Café-Ferreira, L. Ferreira, Ciência e Cultura, 38, 696, (1986)
- 99 W. Corpe, J. Bacteriol., 62, 515, (1951)
- 100 L. Caldas, Photochem. Photobiol., 26, 1, (1977)
- 101 L. Caldas, A. Leitão, S. Santos, R. Tyrrell, Symp. Curr. Topics in Radiology and Photobiology, Acad. bras. Ciências, R.J., 121, (1978)
- 102 E. Merck, "Reactivos de Coloracion para cromatografia em capa fina y en papel", Darmstadt, Alemania (1972)
- 103 K. Randerath, "Thin-layer Chromatography", Academic Press, New York, 2<sup>o</sup> Ed. (1968)
- 104 K. Nakaniishi, "Infrared Absortion Spectroscopy of Organic Compounds", Prentice-Hall, Inc. Eglewood Cliff, (1965)
- 105 L. Bellamy, "The Infrared Spectra of Complex Molecules", Methuen and Co. Ltd, London (1966)
- 106 F. Bovey, "NMR Date Tables for Organic Compounds", Vol., Interscience Publisher. John Wiley and Sons, Inc., New York (1967)
- 107 J. Dyer, "Applications of Absortion Spectroscopy of Organic Compounds", Prentice-Hall Inc. New York (1965)
- 108 L. Jackman, S. Steinhell, "Applications of Nuclear Magnetic Resonance in Organic Chemistry", Pergamon Press, Oxford (1969)
- 109 B. Cardillo, G. Casnoti, H. Pochini, A. Rielan, Tetrahedron, 23, 3771, (1967)
- 110 W. Wierenga, A. Harrison, B. Evans, C. Chidester, J. Org. Chem. 49, 438, (1984)
- 111 K. Erickson, M. Brennan, P. Namnum, Synth. Commun.,

- 11, 253, (1981)
- 112 L. Fieser, M. Fieser, "Reagents for Organic Synthesis", John Wiley and Sons, Inc. New York, London, Sidney, (1967)
- 113 J. Ballantine, C. Barrett, R. Beer, S. Eardley, A. Robertson, R. Shom, T. Simpson, Proc. Chem. Soc., 340, (1957)
- 114 J. Gilmar, J. Bacteriol., 65, 48, (1953)
- 115 W. Corpe, J. Bacteriol., 66, 470, (1953)
- 116 G. Gomori, Method. Enzymol., 1, 967, (1975)
- 117 M. Sato, T. Adochi, A. Tanaka, T. Yamaha, Drug. Metabolism and Disposition, 12 517, (1984).
- 118 D. Judas, A. Frodet, E. Maréchal, Macromol. Chem. 184, 1129, (1983).

## ATIVIDADES

### Participação em congressos

- 1 R. Riveros, V. Campos, S. Erazo, N. Durán, "Síntese e Atividade de novo Antibiótico de Chromobacterium violaceum"  
VIII Reunião Anual da Soc. Bras. de Biofísica, Dezembro, 1983  
Rio de Janeiro, RJ. Brasil
- 2 R. Riveros, N. Durán, "Química de Bactérias : Caracterização de antibióticos de Chromobacterium violaceum por EM e RMN H, 36ª Reunião Anual da Soc. Bras. Prog. Ciên., Julho, 1984, São Paulo SP., Brasil
- 3 R. Riveros, V. Campos, A. Joyas, S. Erazo, N. Durán, Bacterial Chemistry: Studies on Trypanosomal Activities of 1,3-Hydro-2H-indol-3-one Derivatives , XIV Reunião Anual da Soc. Bras. de Bioquim., Caxambú ,Abril, 1985, MG. Brasil
- 4 R. Riveros, V. Campos, N. Durán, "A New Antitrypanosomal Drug", XII Reunião Anual Sobre Pesquisa Básica da Doença de Chagas Novembro, 1985, Caxambú MG. Brasil
- 5 R. Riveros, N. Durán, "Isatin Production by Photochemical Treatment of Chromobacterium violaceum", XV Reunião Anual da Soc. Bras. de Bioquim, Maio , 1986 , Caxambú MG. Brasil.

### Publicações como resumos

- 1 R. Riveros, N. Duran, Ciência e Cultura 36, 466, 1984
- 2 R. Riveros, V. Campos, A. Joyas, S. Erazo, N. Durán  
Arg. Biol. Tecnol. 28, 61 (1985)
- 3 R. Riveros, N. Durán, Arg. Biol. Tecnol., 29, 73, (1986)
- 4 N. Duran, V. Campos, R. Riveros, A. Joyas, S. Erazo, An. Acad. Bras. de Ciên. Submetido