

REGINA VASCONCELLOS ANTÔNIO



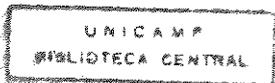
BIOSSÍNTESE DE VIOLACEÍNA POR *CHROMOBACTERIUM VIOLACEUM*: SÍNTESE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE UM PROVÁVEL INTERMEDIÁRIO

TESE APRESENTADA AO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DO DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-ÁREA BIOQUÍMICA.

**ORIENTADORA:
PROF^a. DR^a. NORA MARCELA HAUN QUIRÓS**

Campinas - 1994

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) REGINA VASCONCELLOS ANTÔNIO Haun Quirós
Aprovada para a defesa em 1994



Dedico,

À minha família pelo incentivo e apoio.

E ao Julio também pelo auxílio e paciência.

AGRADECIMENTOS

- . À Dra. Marcela Haun pela orientação.
- . Ao Dr. Nelson Durán pela contribuição e apoio a este trabalho.
- . Aos Drs. Lúcia Pereira da Silva, Ronaldo A. Pilli e Wanderley Dias da Silveira pelas sugestões e análise crítica do manuscrito deste trabalho.
- . À Dra. Solange de Castro da Fundação Oswaldo Cruz -RJ pela realização dos ensaios de atividade tripanocida.
- . Ao corpo de técnicos do Instituto de Química pelo indispensável apoio, e em especial aos Técnicos Chico, Cida e Vanda, também pelo agradável convívio.
- . Aos colegas do Laboratório de Química Biológica pelo incentivo, sugestões e força nos momentos mais difíceis e especialmente àqueles que se tornaram amigos, Adriano, Angela, Aida, Rose e Patrícia.
- . Aos colegas do Laboratório de Química Orgânica pela convivência e boa vontade em dividir seus materiais e equipamentos .
- . À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão de bolsa de estudo.
- . Aos funcionários e professores do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia da UNICAMP.
- . Ao Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina pelo apoio.
- . Aos órgãos financiadores PADCT, FAPESP e CNPq.
- . Enfim à todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

ÍNDICE

SUMÁRIO	i
SUMMARY	ii
I. INTRODUÇÃO	01
I.A. Características do metabolismo secundário de microrganismos	01
I.B. Produção de violaceína pela <i>Chromobacterium violaceum</i>	03
I.C. Efeito da violaceína e seus derivados sobre <i>Trypanosoma cruzi</i> .	09
II. OBJETIVOS	14
III. PARTE EXPERIMENTAL	15
III.A. Cultivo da <i>C. violaceum</i>	15
III.A.1. Meios de cultivo utilizados	15
III.A.1.1. Ágar nutriente	15
III.A.1.2. Caldo nutriente	16
III.A.1.3. Ágar manitol	16
III.A.1.4. Ágar batata dextrose	17
III.A.1.5. Caldo de batata.	17
III.A.1.6. Meio de sais minerais e aminoácidos	18
III.A.1.7. Ágar tioglicolato	19
III.A.1.8. Caldo tioglicolato	19
III.A.1.9. Meio grãos de arroz	19
III.A.2. Cultivo de <i>C. violaceum</i> em minifermentador	20
III.A.3. Avaliação do crescimento microbiano	21
III.A.4. Extração e quantificação de violaceína nos caldos de cultivo	22
III.A.5. Efeito de alguns metabólitos indólicos sobre a biossíntese de violaceína	23
III.A.6. Incorporação de $^{14}\text{C}(1)$ -ácido 3-indol acético à violaceína.	24
III.B. Síntese da carboxiamida-1 (CBX-1)	25
III.C. Síntese da carboxiamida-2 (CBX-2)	26

III.D. Estímulo da biossíntese da violaceína por: ácido 3-indol acético, isatina, triptofano, 5-OH-triptamina (serotonina), CBX-1 e CBX-2	26
III.E. Efeito da CBX-1 sobre <i>T. cruzi</i> .	27
III.F. Citotoxicidade da CBX-1 sobre células V-79	28
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
IV.A. Cultivo da <i>C. violaceum</i>	29
IV.A.1. Efeito da fonte de carbono sobre o crescimento e produção de violaceína por <i>C. violaceum</i>	30
IV.A.2. Produção de violaceína em minifermentador	34
IV.A.3. Crescimento celular e produção de violaceína por <i>C. violaceum</i> em diferentes meios de cultivo	36
IV.B. Biossíntese de violaceína	39
IV.B.1. Incorporação do ácido 3-indol acético à violaceína.	39
IV.B.2. Síntese da carboxiamida-1 (CBX-1)	40
IV.B.3. Síntese da carboxiamida-2 (CBX-2)	44
IV.B.4. Estímulo da biossíntese de violaceína por triptofano, isatina, 5-OH-triptamina, ácido 3-indol acético, CBX-1 e CBX-2	47
IV.B.5. Efeito de metabólitos de <i>C. violaceum</i> como precursores da biossíntese de violaceína	50
IV.B.6. Uma via proposta para a biossíntese de violaceína por <i>C. violaceum</i>	52
IV.C. Efeito de CBX-1 e CBX-2 sobre <i>T. cruzi</i>	56
V. CONCLUSÕES	60
VI. PERSPECTIVAS	62
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
APÊNDICES I	
Espectros de IV, RMN, UV/visível e Massa de CBX-1, CBX-2 e Violaceína	01

APÊNDICE II

Experimentos para determinação das atividades tripanocidas de
CBX-1 e CBX-2.

01

SUMÁRIO

Neste trabalho foram estudadas algumas condições de cultivo da *Chromobacterium violaceum* (cepa BB-78) com o objetivo de aumentar a produção da violaceína, um pigmento produzido pela bactéria, que apresenta atividades tripanocida e antibiótica. Verificou-se que glicose e frutose são fontes de carbono que inibem a produção de violaceína, embora favoreçam a produção de massa celular. Baixas concentrações de glicose e a utilização de fontes de carbono de difícil metabolismo, tais como amido, lactose, manitol e sacarose, favoreceram a produção de violaceína, porém o crescimento celular foi bastante reduzido sob tais condições. Observou-se que a produção de violaceína chega a ser até 36 vezes maior na presença de meios sólidos, quando comparada aos meios líquidos correspondentes, sendo marcadamente maior na presença de grãos de arroz cozido. Metabólitos indólicos, tais como: triptofano, ácido 3-indol acético e 5-hidroxitriptamina, produzidos pela bactéria, aumentaram a eficiência da produção de violaceína, expressa como a razão entre a concentração de violaceína e o peso seco da massa celular, em até 40%, como foi o caso do triptofano. A isatina, também produzida pela bactéria, não teve efeito estimulatório sobre a eficiência da biossíntese de violaceína, embora tenha apresentado um efeito indutor sobre esta via na ausência de outros compostos indólicos no meio de cultura, aumentando a eficiência de produção de violaceína 20 vezes em relação ao controle. Ensaios de incorporação do ácido 3-indol acético (IAA) à molécula de violaceína, mostraram que este é integralmente incorporada ao pigmento. Foram sintetizadas duas carboxiamidas, CBX-1 e CBX-2, sendo a primeira a partir da condensação do IAA à 5-hidroxitriptamina e a segunda a partir da condensação do IAA à triptamina. Enquanto a primeira foi capaz de aumentar a eficiência da biossíntese de violaceína em 42%, indicando que esta seja um importante intermediário desta via, a CBX-2 não teve efeito algum sobre a biossíntese de violaceína. Devido às semelhança estruturais das carboxiamidas com a violaceína, ambas foram testadas quanto à atividade tripanocida. A CBX-2, além de se apresentar bastante efetiva contra formas amastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y), foi também menos tóxica sobre células V79 de hamster chinês que nifurtimox e metilol violaceína, se constituindo num composto promissor a ser melhor testado como quimioterápico. Por outro lado, a CBX-1 foi pouco efetiva contra *T. cruzi*.

SUMMARY

Violacein is a pigment produced by *Chromobacterium violaceum* that has shown trypanocide and antibiotic activity. To improve the violacein biosynthesis, the bacteria growth conditions were studied. Glucose and fructose were shown to inhibit the pigment production although they have stimulated the cellular mass production. Low concentrations of these sugars and other carbon sources slowly metabolized by this bacterium have shown to increase violacein production although cellular mass was reduced in such conditions. Violacein production increased until thirty six fold when *C. violaceum* was grown in solid medium, being much higher in cooked rice grains. Violacein production efficiency (expressed as the ratio of violacein production and cellular mass, dry weight) was increased by indolic compounds such as tryptophan, indole acetic acid and 5-hydroxytryptamine until forty percent, as did tryptophan. Isatin had no stimuli on violacein biosynthesis, but it increased twenty fold its efficiency when no other indole sources were present in the medium. From experiments with labelled 2-¹⁴C and 1-¹⁴C-indole acetic acid (¹⁴C-IAA), it was concluded that these compounds were incorporated into violacein molecule. Two carboxamides were synthesized, N-ethyl-(5-hydroxy-indol-3-yl)-2-indolyethyl amide (CBX-1) and N-ethyl-(indol-3-yl)-2-indoliethylamide (CBX-2). CBX-1 increased the violacein efficiency production in forty two percent, this is indicative that this is an important intermediate in violacein biosynthesis. CBX-2 had no effect on violacein efficiency production. Due the structural's similarities between the CBX-1, CBX-2 and violacein, the carboxiamides were assayed to trypanocide activities. Only CBX-2 has shown significant activity on amastigotes and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* (Y strain). It exhibited lower toxicity than nifurtimox and metilol violacein, on V79 chinese hamster cells being a promissory compound to Chagas disease chemotherapy.

I. INTRODUÇÃO

I.A - Características do metabolismo secundário de microrganismos

O crescimento de microrganismos ocorre às custas do consumo de fontes de carbono simples ou complexas de alto peso molecular. Este processo requer a ação de enzimas catabólicas. Os produtos finais do catabolismo originam intermediários primários, tais como, aminoácidos, nucleotídeos, vitaminas, carboidratos e ácidos graxos. Estes produtos são, através de processos anabólicos, incorporados em compostos essenciais complexos, responsáveis pela estrutura e funções biológicas do organismo. Estas atividades metabólicas interdependentes fazem parte do denominado metabolismo primário. Os compostos e enzimas do metabolismo primário desempenham um papel bem definido e essencial na manutenção do crescimento e reprodução do microrganismo.

Diferente do metabolismo primário, no qual os intermediários estão envolvidos na síntese de estruturas celulares e produção de energia, ocorrem, nos microrganismos, uma série de processos que levam à síntese de uma classe de compostos, não essenciais ao seu crescimento e metabolismo reprodutivo. Estes compostos são denominados de metabólitos secundários e os processos envolvidos nas suas sínteses, de metabolismo secundário.

Os metabólitos secundários têm estruturas químicas diversas. Estes compostos costumam ser produtos característicos de um grupo particular de microrganismos, e às vezes apenas de uma única cepa (Vining, 1990). São sintetizados através de múltiplos passos, a partir de precursores que são usualmente intermediários do metabolismo primário (Drew e Demain, 1977). Os precursores que compõem os metabólitos secundários, costumam ser ativados pela formação de derivados adenilados,

fosforilados ou ligados à coenzima A (CoA), que são finalmente unidos para formar o produto final (Martin e Liras, 1981). Os vários passos da biossíntese dos metabólitos secundários são catalisados por enzimas específicas para cada metabólito. No entanto, algumas das enzimas envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários tem uma especificidade ampla pelo substrato, o que leva à produção de uma família de compostos relacionados. Campbell (1984) analisou várias reações envolvidas no metabolismo secundário e concluiu que estas são semelhantes às do metabolismo primário em seu mecanismo, porém, caracterizam-se por apresentarem maior variedade nos tipos de reações e maior número de etapas. Estas reações não apresentam tendência à economia e simplicidade, como as que caracterizam o metabolismo primário.

Os processos envolvidos no metabolismo secundário, requerem energia, competindo, portanto, com a energia necessária ao crescimento do microorganismo (Zamenhof and Eickhorn, 1967; Luckner, 1980).

A formação de um metabólito secundário está sujeita a um controle fisiológico geral que responde a fatores ambientais (Demain et. al., 1983; Vining, 1986). Quando cultivados em meios artificiais balanceados e ricos em nutrientes, microorganismos selvagens, não sintetizam metabólitos secundários, ou o fazem bem abaixo do seu potencial. Embora a glicose seja frequentemente utilizada como a principal fonte de energia e de carbono para o crescimento microbiano, este carboidrato é pouco utilizado para obtenção de metabólitos secundários. A glicose e outras fontes de carbono facilmente utilizáveis, têm sido consideradas como supressoras da biossíntese de vários metabólitos secundários tais como, neomicina, bacitracina, alcalóides do Ergot, cefalosporinas, penicilina e violaceína (Drew e Demain, 1977).

Em alguns casos, glicose e outras fontes de carbono parecem causar inibição de algumas enzimas envolvidas na biossíntese de metabólitos secundários. A produção dos

antibióticos neomicina e penicilina, por microrganismos, é inibida pela adição de glicose (Demain, 1972; Drew e Demain, 1977). Kennel (1978) estudando a produção de antibióticos β -lactâmicos, (penicilina N e cefalosporina C) por células de *Cephalosporium acremonium*, observou que quando açúcares rapidamente metabolizáveis (glicose, maltose e frutose) eram utilizados, ocorria menor produção de antibióticos β -lactâmicos que no caso de açúcares mais lentamente metabolizáveis (sacarose e galactose). Seus experimentos demonstram que quanto maior a concentração de glicose, menor a produção de antibiótico. Embora não tenha obtido evidências de repressão da síntese de enzimas envolvidas na biossíntese dos antibióticos, pelo carboidrato, ele detectou uma inibição de enzimas pré-formadas, causadas pela presença de glicose e amônio, no meio de cultura (Kennel, 1978).

I.B - Produção de violaceína por *Chromobacterium violaceum*

C. violaceum é uma bactéria flagelada, Gram-negativa, em forma de bastonete, sem estado de repouso ou latência conhecidos e que produz um pigmento violeta, o qual geralmente a caracteriza. Ela pode ser encontrada nos solos e nas águas de ambientes tropicais (Corpe, 1951; Koburger and May, 1982). No Brasil, *C. violaceum* foi encontrada com alta frequência na região Amazônica em solos do leito do Rio Negro (Caldas, 1977; Caldas et al. 1978). Algumas cepas estão relacionadas a infecção em vegetais (Bettelhein et al., 1968) e animais (Johnson et al., 1971).

C. violaceum foi isolada pela primeira vez por Boisbaudran em 1882, a partir de pasta de amido umedecida. Foi este autor também, o primeiro a registrar o espectro de absorção do pigmento produzido pela bactéria, embora tenha sido observado que cepas

pigmentadas da *C. violaceum*, quando cultivadas em meios artificiais, possam produzir variantes incolores (Sivendra e Lo, 1975).

Estudos sobre o metabolismo da bactéria têm revelado que esta apresenta metabolismo respiratório (oxidativo) ou fermentativo, produzindo ácidos orgânicos a partir de glicose e alguns outros carboidratos. É anaeróbica facultativa (Breed et al. 1957) e produz, como metabólito secundário, cianeto a partir de glicina (Knowles, 1976; Bazylnski et al.; 1986).

O isolamento e purificação do pigmento violeta produzido pela bactéria tem sido objeto de estudos desde 1913. Investigadores como Hartley (1913), Reilly e Pyne (1927), Tobie (1934), Wrede e Rothaas (1934), Sartory et al. (1938) Strong (1944), Riveros et al. (1988) e outros foram progressivamente aumentando o grau de pureza do pigmento isolado até sua cristalização.

DeMoss e Evans (1959) ao isolar violaceína produzida por *C. violaceum* observaram a presença de um pigmento análogo minoritário. Enquanto a violaceína apresentava-se de cor violeta o pigmento minoritário era púrpura. A partir dos dados de caracterização, apresentados por Ballantine et al. (1958a), deduziram que o produto majoritário era violaceína (derivado 5-hidroxiindolil) (Fig. 1) e o minoritário desoxiviolaceína (derivado 5-(3-indolil)-3-(3-oxindolilideno)-2-oxopirrolidona) (Fig.2).

A elucidação da estrutura da violaceína (3-[1,2-diidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno]-1,3-diidro-2H-indol-2-ona) (Fig.1) iniciou-se com os estudos de Ballantine et al. (1958b), sendo deduzida a partir de reações de degradação e posterior síntese do composto. Estes estudos foram confirmados por dados espectroscópicos apresentados por Laatsch and Thomson (1984).

As Figuras A9 e A.10 do apêndice I mostram os espectros de ^1H -RMN e de infravermelho da violaceína purificada e extraída pelo método descrito por Strong (1944) produzida pela cepa BB-78 de *C. violaceum*.

A *C. violaceum* produz vários metabólitos derivados do aminoácido L-triptofano (Fig. 3). Entre estes incluem-se, 5-hidroxitriptofano (Mitoma et al. 1956), 6-hidroxitriptofano (Contractor et al.1964), indol (Sebek e Jäger, 1962), produtos do metabolismo do indol, violaceína e índigo (Ballantine et al. 1958a; DeMoss e Evans, 1959; DeMoss e Evans, 1960; Sebek e Jäger, 1962) além de produtos de transaminação como o ácido 3-indol acético e o ácido 3-indol pirúvico (DeMoss e Evans, 1957).

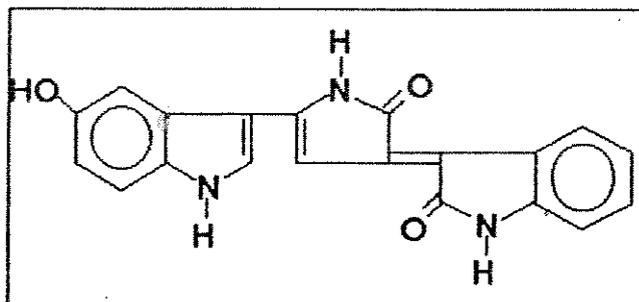


Figura 1 - Estrutura química da violaceína

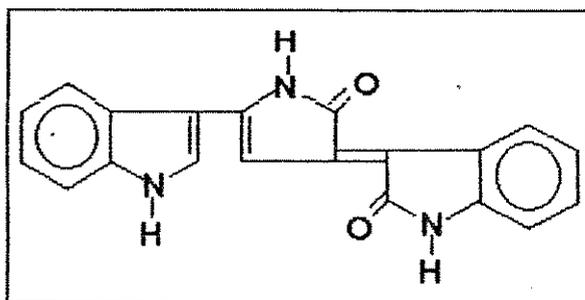


Figura 2 - Estrutura química da desoxiviolaceína

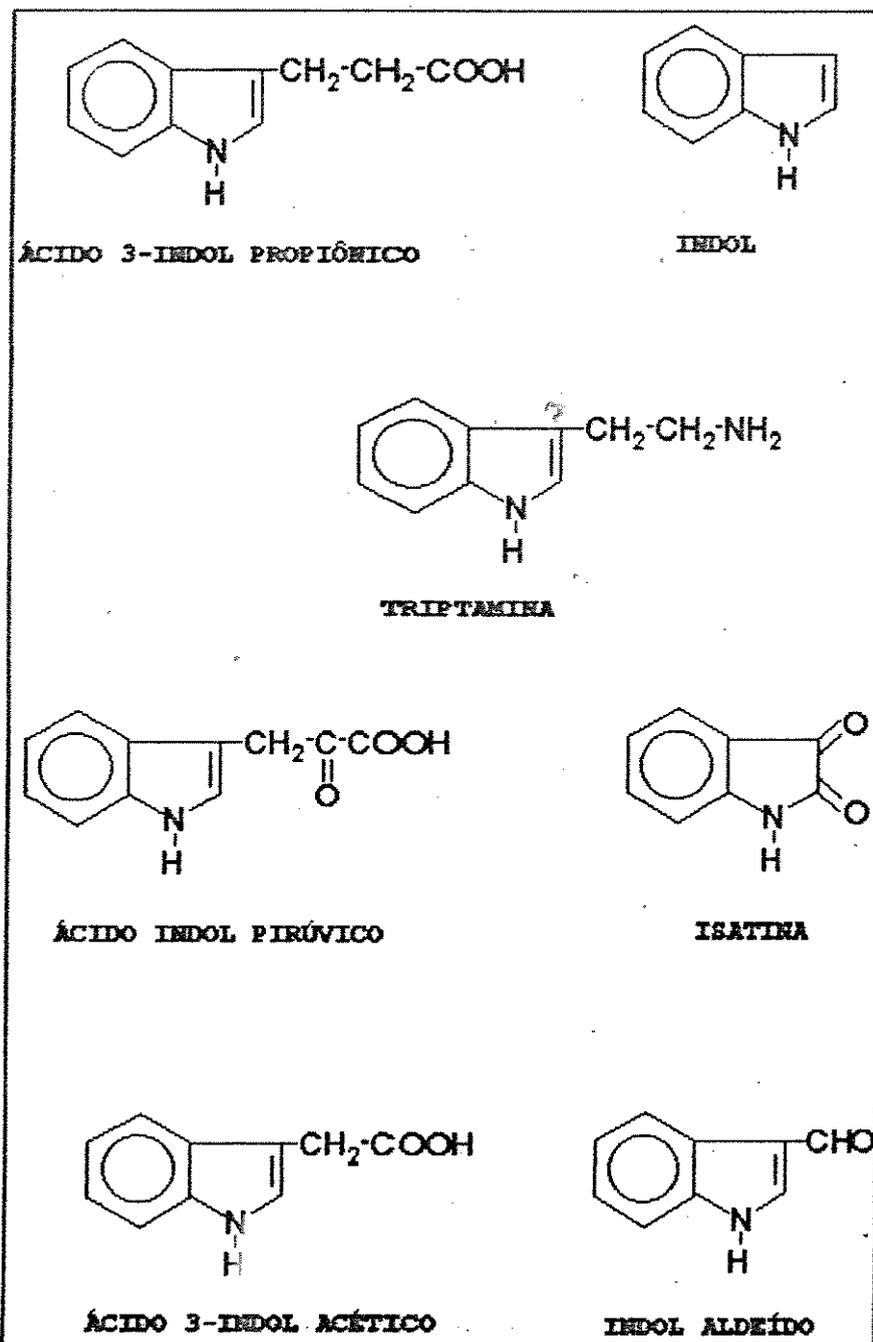


FIGURA 3 - Estruturas químicas de alguns derivados indólicos produzidos pela *C. violaceum*.

A partir de experimentos de incorporação de triptofano radioativamente marcado, DeMoss e Evans (1960), concluíram que, com exceção do grupo carboxílico do L-triptofano, todo o restante da molécula era incorporado intacto à estrutura da violaceína. Estes mesmos autores testaram também a incorporação de metabólitos derivados do indol, supostamente envolvidos na biossíntese do pigmento, incluindo indol e 5-hidroxiindol. Porém não obtiveram resultados concludentes acerca da biossíntese de violaceína a partir de tais metabólitos.

Recentemente a pesquisa sobre a biossíntese de violaceína foi retomada (Hoshino et al., 1987a; Hoshino et al., 1987b; Riveros, 1989; Hoshino e Ogasawara, 1990 e Hoshino et al. 1993). Experimentos usando 2-¹³C e 3-¹³C-triptofano, realizados por Hoshino et al. (1987a), levaram à conclusão de que o esqueleto carbônico da porção pirrolidona da violaceína seria construído pela condensação da cadeia lateral de duas moléculas de triptofano, isto é, a formação de ligações C₃-C₃ e C₂-N-C₂, e que um dos dois anéis indólicos migraria do carbono β para o carbono α (rearranjo 1-2 do anel indólico) do aminoácido (Fig.4).

Em um trabalho posterior, Hoshino et al. (1987b) determinaram, através de análises espectroscópicas de metabólitos isotopicamente marcados (espectroscopias ¹H, ¹³C-RMN e de massa), as origens dos átomos de hidrogênio, nitrogênio e oxigênio, no anel pirrolidona da violaceína. Os experimentos, realizados por estes autores, revelaram que o hidrogênio do anel pirrolidona seria derivado dos prótons metilênicos da posição 3 do triptofano, que o átomo de nitrogênio se originaria do α-amino grupo do triptofano, enquanto todos os átomos de oxigênio desta porção da molécula, se originariam do oxigênio molecular. Desta forma, estes autores deduziram que todos os átomos de

hidrogênio, nitrogênio e carbono da violaceína seriam derivados exclusivamente do triptofano e, os de oxigênio do oxigênio molecular.

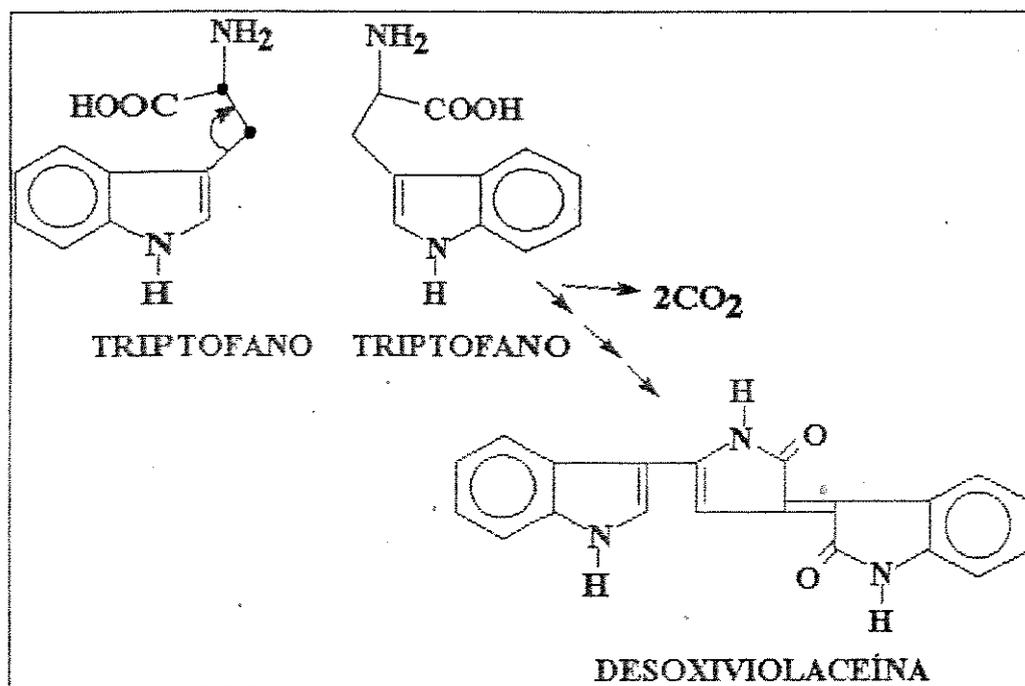


Figura 4 - Esquema para a biossíntese da desoxiviolaceína proposta por Hoshino et al. (1987a), com um rearranjo do tipo 1,2 do grupo indólico da molécula de triptofano.

Mais recentemente, Hoshino e Ogasawara (1990) demonstraram que o primeiro passo na biossíntese de violaceína seria a hidroxilação do triptofano.

Riveros (1989) isolou alguns compostos indólicos do meio de cultivo de *C. violaceum*, entre estes, isatina e ácido 3-indol acético, prováveis precursores da biossíntese de violaceína. Realizou também experimentos de incorporação de $2\text{-}^{13}\text{C}$ -

ácido 3-indol acético à violaceína e estabeleceu uma razão ácido 3-indol acético/violaceína igual a 1. Além disso, Riveros (1989) induziu mutação em *C. violaceum*, por radiação UV, isolando um mutante que apresentava inibição da biossíntese de violaceína e acúmulo de isatina. Estes dados sugeriram que o ácido 3-indol acético poderia ser integralmente incorporado à estrutura da violaceína e que isatina deveria ser um intermediário na biossíntese de violaceína.

O efeito de L-triptofano sobre a biossíntese de violaceína em diferentes cepas de *C. violaceum*, foi estudado por Kimmel e Maier (1969). Estes observaram que para as nove cepas estudadas, em meios de cultura complexos, triptofano estimulava a produção do pigmento e que a adição de glicose ao meio de cultura, contendo este aminoácido, aumentava consideravelmente a produção de pigmento. Além disso, a violaceína podia ser sintetizada em um hidrolizado de caseína, deficiente em triptofano, indicando que outros aminoácidos podem substituir o requerimento de triptofano para a produção do pigmento. Observaram ainda que todas as cepas eram anaeróbicas facultativas para o crescimento celular e aeróbica estrita para a produção de violaceína.

Recentemente Pemberton et al. (1991) realizaram o isolamento e clonagem de um "cluster" de cromossomos de *C. violaceum*, responsável pela biossíntese de violaceína. Este "cluster" foi clonado em *Escherichia coli*, que adquiriu a propriedade de biossintetizar violaceína. Observou-se que assim como na *C. violaceum*, a bactéria clonada não produzia pigmento na ausência de oxigênio.

O papel biológico da violaceína para a fisiologia do microrganismo permanece desconhecido; observou-se, porém, que a adição de violaceína em suspensão de células não pigmentadas estimulava a atividade respiratória (Friedheim, 1936). A partir do conhecimento de que a violaceína possui um alto coeficiente de extinção molar na região visível do espectro ($\epsilon=1,7 \cdot 10^4$ L.mol⁻¹. cm⁻¹, $\lambda=577$ nm, DeMoss, 1967) e baixa

solubilidade em sistemas aquosos, foi sugerido que a produção do pigmento poderia estar relacionada à proteção contra efeitos de radiação sobre o microrganismo (Durán and Faljoni-Alario, 1980). Sugeriu-se também, que o pigmento poderia desempenhar um papel de estoque de resíduos indólicos, ou seja, como uma fonte de precursores de triptofano; ou ainda, uma vez que a concentração de triptofano deve ser mantida em nível relativamente baixo, não tóxico, a produção de violaceína poderia estar envolvida na regulação da concentração de triptofano (DeMoss, 1967).

Tem sido relatado que, em condições de laboratório, ou seja, na presença de meios de cultura complexos, a produção de pigmento não é requerida para a sobrevivência do microrganismo, e o desenvolvimento de variantes incolores é bastante frequente. Sendo assim, a violaceína inclui-se numa classe de compostos produzidos pela bactéria classificados como metabólitos secundários.

I.C - Efeito de violaceína e derivados sobre *Trypanosoma cruzi*

A doença de Chagas é um mal crônico resultante da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Estima-se em 20 milhões o número de pessoas afetadas pela doença, a qual é causa importante de mortalidade nas áreas endêmicas das Américas do Sul e Central (particularmente no Brasil, Venezuela e Argentina). A atual terapia da doença é insatisfatória. As duas drogas em uso corrente, nifurtimox e benznidazol, ajudam a amenizar a parasitemia na fase aguda da doença, porém, são menos efetivas nos estágios crônicos. Além disso, ambas produzem um grande número de efeitos colaterais nas doses terapêuticas usadas (Brener, 1984; Gorla et al., 1989; Teixeira et al., 1990). Os

efeitos agudos colaterais causados pelo uso de nifurtimox são bem conhecidos, tais como, neurotoxicidade e desordens digestivas (Boaiannain, 1979; Cançado et al., 1975; Laplumé et al. 1985). Alguns estudos têm indicado um perigo genotóxico desta droga antichagásica, uma vez que esta apresentou efeito mutagênico sobre *Escherichia coli* (Otmishi et al., 1980) e sobre *Salmonella typhimurium* (Nagel and Nepomnaschy, 1983; Ferreira and Ferreira, 1986). Gorla et al. (1989) verificaram um aumento de treze vezes no número de aberrações cromossômicas em linfócitos do sangue periférico de crianças tratadas com nifurtimox. Estudo semelhante mostrou que benznidazol aumenta em duas vezes o número de aberrações cromossômicas em linfócitos de pacientes tratados com este quimioterápico (Gorla et al., 1988).

O conhecimento da atividade antibiótica da violaceína sobre diversos microrganismos, seu potencial fototerapêutico (Durán and Faljoni-Alario, 1980; Durán et al., 1983) bem como, os dados preliminares de Caldas et al. (1978), mostrando que 75 µg/ml do extrato bruto de violaceína produzida pela cepa BB-78 de *C. violaceum*, isolada do Rio Negro (Brasil) era capaz de induzir 100% de morte de *T. cruzi* (cepa Y), levaram o grupo de Durán e colaboradores a iniciarem o estudo e desenvolvimento de compostos com atividade antichagásica, derivados da violaceína (Durán et al., 1983; Durán et al. 1989). Foram sintetizados alguns derivados da violaceína (sal de sódio, bromo, metilol e acetil violaceína), com o objetivo de torná-la solúvel em sistemas aquosos e menos tóxica (Durán et al. 1989; Riveros, 1989; Durán, 1990). Dentre estes derivados, o metilol foi que se mostrou mais eficiente na imobilização de formas amastigotas da cepa Tulahuén de *T. cruzi* (Durán, 1990). Os testes de atividade tripanocida "in vitro" sobre as formas epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, realizados, com a metilol violaceína, mostraram que uma dose

elevada (750 mM) foi necessária para levar à lise total de tripomastigotas (Durán, 1990).

Os estudos da bioquímica do *T. cruzi*, têm se concentrado na definição de diferenças metabólicas entre o parasita e o hospedeiro mamífero e, a partir destes, têm sido definidos alvos importantes no desenvolvimento de drogas menos tóxicas e específicas contra a doença de Chagas (Stoppani, 1983; Henderson e Fairlamb, 1987; Hunter et al., 1990)

Os compostos nifurtimox e benznidazol (Fig.5A e B) parecem exercer sua ação por produzirem espécies ativas de oxigênio, tais como, peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radical hidroxila (DoCampo & Moreno, 1986).

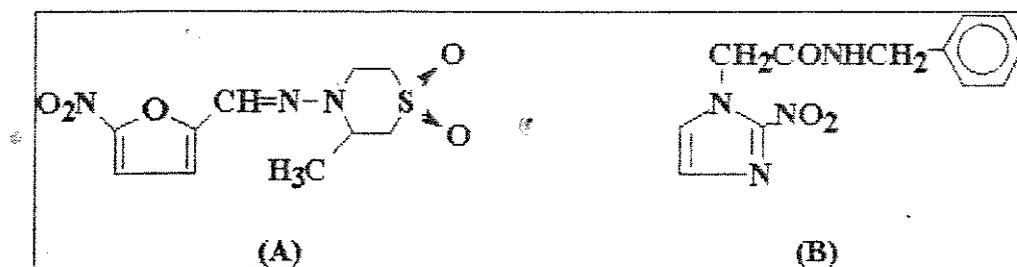


Figura 5 - Estruturas químicas (A) do nifurtimox e (B) do benznidazol

Enquanto nas células de mamíferos, baixos níveis de superóxido e de peróxido de hidrogênio, são mantidos pela ação sequencial das enzimas superóxido dismutase, glutaciona peroxidase e glutaciona redutase, nos tripanosomas, a remoção do peróxido de hidrogênio, processa-se, apenas, pela ação cíclica da tripanotiona peroxidase e tripanotiona redutase. A tripanotiona peroxidase é a enzima responsável pela manutenção da tripanotiona (Fig.6) (N1,N8-bis (glutacionil espermidina)) na forma

reduzida. A tripanotiona foi isolada por Fairlamb et al. (1985). Este conjugado, glutatona-espemidina, substitui o papel da glutatona na resistência celular ao "stress" oxidativo em tripanosomatídeos (Henderson e Fairlamb, 1987; Hunter et al., 1990).

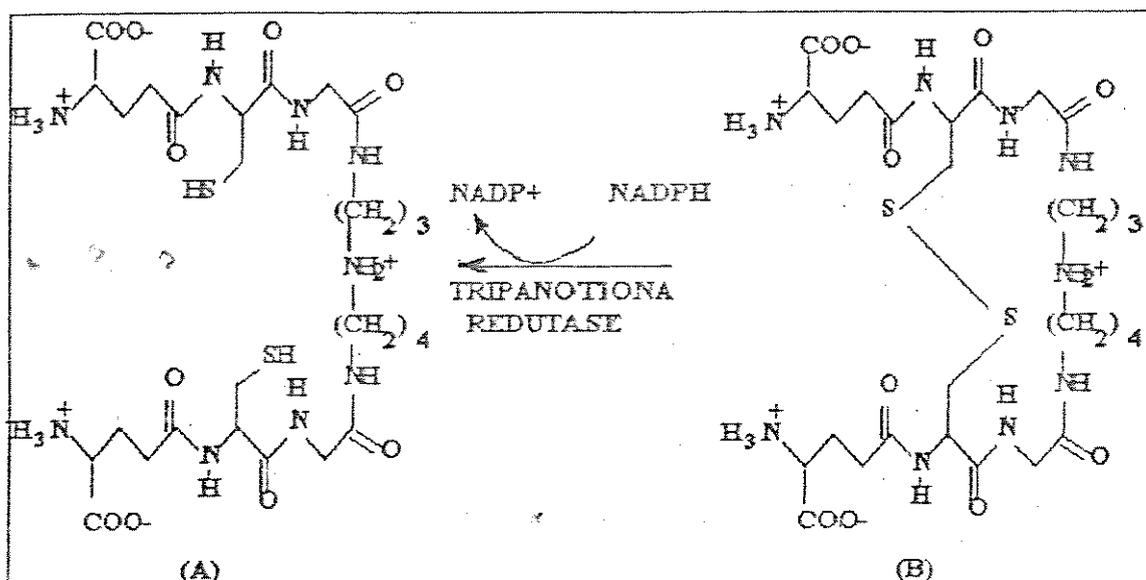


Figura 6 - Estruturas da tripanotiona reduzida (A) e da Tripanotiona oxidada (B) e esquema da reação catalisada pela tripanotiona redutase.

Trabalhos recentes têm mostrado que alguns derivados de nitrofuranos e naftoquinonas são potentes inibidores da tripanotiona redutase e que efeitos semelhantes não são observados sobre a enzima análoga, glutatona redutase de mamíferos (Jockers-Scherubl et al. 1989). Sendo assim, o estudo de inibidores da tripanotiona redutase se constitui um dos mais promissores alvos para o desenvolvimento de quimioterápicos para o tratamento da doença de Chagas.

II. OBJETIVOS

- Estabelecer condições de cultivo para *C. violaceum* em que a produção de violaceína seja máxima, pouco dispendiosa e com baixa incidência de variantes incolores.
- Compreender quais são as condições ambientais que propiciam a produção máxima de violaceína, uma vez que o pigmento é um metabólito secundário, dificilmente produzido em meios complexos e ricos.
- Verificar se os metabólitos encontrados normalmente nos caldos de cultivo de *C. violaceum*, têm um papel importante na indução e estímulo da sua biossíntese.
- Sintetizar um composto intermediário da biossíntese de violaceína a partir de três metabólitos constantemente encontrados nos caldos de cultivo de *C. violaceum*; : serotonina, triptamina e ácido 3-indol acético.
- Testar o papel destes intermediários sobre a biossíntese de violaceína por *C. violaceum*.
- Testar a atividade tripanocida destes novos compostos indólicos quimicamente sintetizados, tendo em vista que suas estruturas se assemelham à da violaceína, a qual possui comprovada atividade tripanocida.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.A. Cultivo da *C. violaceum*

C. violaceum (cepa BB-78) foi obtida originalmente do laboratório de Fotobiologia Molecular do Instituto de Biofísica da UFRJ e mantida sob replicação mensal em tubos inclinados contendo ágar nutriente.

III.A.1. Meios de cultivo utilizados

III.A.1.1. Ágar nutriente

Extrato de levedura (BBL)	0,2g
Peptona (Difco)	0,5g
Glicose (Carlo Erba)	0,5g
Ágar-ágar (Sigma)	1,0g
Água destilada até	100 mL

O pH foi ajustado para 6,8 e o meio de cultura foi distribuído em tubos de ensaio (20x1 cm) esterilizado em autoclave a 1,0 atm e 120 °C por 15 min. Após esterilizados, os tubos foram inclinados e deixados resfriar. Os tubos assim preparados, podem ser guardados em geladeira por 3 a 4 semanas.

III.A.1.2. Caldo nutriente

Extrato de levedura	0,2g
Peptona	0,5g
Glicose	0,5g
Água destilada até,	100mL

Vinte e cinco mililitros de meio foram transferidos para Erlenmeyers de 125 mL e esterilizados em autoclave a 1,0 atm e 120° C por 15 min.

Nos testes de efeito de açúcares sobre a produção de violaceína, a glicose foi substituída pelos diferentes açúcares, cujas concentrações são indicadas nas legendas das figuras ou tabelas.

III.A.1.3. Ágar manitol

Extrato de levedura	0,2g
Peptona	0,5g
Ágar-ágar	1,0g
Manitol (Carlo Erba)	2,0g
Água destilada até	100 mL

O meio foi transferido para Erlenmeyer de 250 mL e esterilizado em autoclave a 1,0 atm. e 120 °C por 15 min. Antes de resfriar-se o suficiente para solidificar, 20 mL foram transferidos para placas de Petri previamente esterilizadas, e deixadas resfriar e solidificar.

III.A.1.4. Ágar batata dextrose

Batata inglesa	200,0g
Peptona	5,0g
Extrato de levedura	3,0g
Ágar-ágar	10,0g
Glicose (Carlo Erba)	5,0g

As batatas foram lavadas, picadas em cubos de 1 cm (sem serem descascadas) e fervidas em um bequer de 1000 mL com 500 mL de água destilada por 30 min. Depois de resfriadas, foram filtradas através de gaze. Ao filtrado foram adicionados peptona, extrato de levedura, glicose e ágar-ágar. O volume da solução foi completado até 1000 mL, o pH ajustado para 6,8. Aliquotas de 100 mL foram distribuídos em garrafas de Roux de 1000 mL e esterilizado em autoclave a 1,0 atm. e 120 °C por 15 min.

III.A1.5. Caldo de batata

O caldo de batata foi preparado de modo semelhante ao descrito acima (III.A.1.4), porém na ausência de ágar-ágar.

Neste caso, alíquotas de 25 mL do meio foram distribuídas em Erlenmeyers de 125 ml e esterilizadas em autoclave a 1,0 atm. e 120 °C por 15 min.

III.A.1.6. Meio de sais e aminoácidos

Solução A:

FeSO ₄ .H ₂ O (Ecibra)	0,5 mg
MgCl ₂ (Carlo Erba)	100 mg
K ₂ HPO ₄ (Carlo Erba)	600 mg
K ₂ SO ₄ (Carlo Erba)	50 mL
Água destilada até	90 mL

Solução B:

DL-alanina (Sigma)	147,3 mg
L-treonina "	8,0 mg
L-lisina "	2,0 mg
DL-metionina "	106,6 mg
L-fenilalanina "	6,6 mg
L-leucina "	8,6 mg
L-tirosina "	6,6 mg
DL-valina "	6,6 mg
L-arginina "	9,3 mg
Glicose "	0,5 g
Água até	10 mL

Em 10 Erlenmeyers de 50 mL, foram distribuídos 9 ml da solução A e esterilizados em autoclave. A solução B foi esterilizada por filtração em filtro Millipore (HVLP 0,47 µ). A cada Erlenmeyer contendo a solução A esterilizada, foram adicionados, em condições estéreis, 1 mL da solução B esterilizada.

III.A.1.7. Ágar Tioglicolato

Meio tioglicolato (Merck)	1,5g
Ágar-ágar (Difco)	1,5g
Água destilada até	100mL

O meio foi esterilizado como descrito anteriormente.

Observação: O meio tioglicolato obtido comercialmente é constituído de peptona 1,5%, extrato de levedura 0,5%, glicose 0,55%, l-cisteína 0,05%, cloreto de sódio 0,25%, tioglicolato de sódio 0,05% e ágar-ágar 0,075%.

III.A.1.8. Caldo tioglicolato

Um grama e meio de meio tioglicolato (Merck) foi dissolvido em 100 mL de água destilada, alíquotas de 25 mL foram distribuídos em Erlenmeyers de 125 mL e esterilizados.

III.A.1.9. Meio grãos de arroz

Em Erlenmeyers de 125 mL foram pesados 2 g de grãos de arroz, aos quais foram adicionados 15 mL de água destilada. Os frascos foram fechados e esterilizados em autoclave a 1,0 atm. e 121 °C por 15 min.

Para o inóculo destes frascos foram utilizados 200 μ L caldo de cultura com 24 horas de incubação a 30 °C e 150 rpm em agitador rotatório.

III.A.2. Cultivo da *C. violaceum* em minifermentador

Para o cultivo da bactéria em minifermentador foi utilizado o sistema esquematizado na Fig. 7.

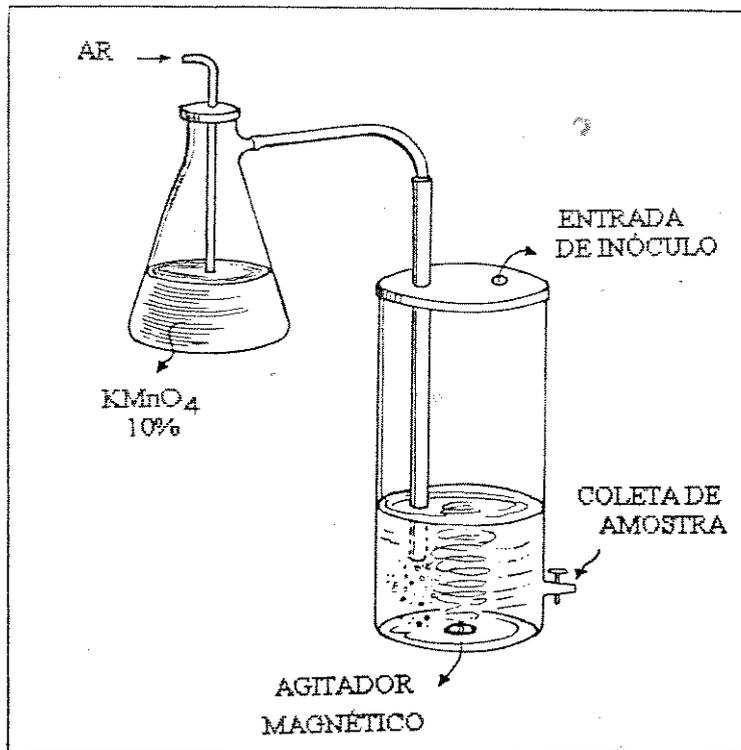


FIGURA 7 - Esquema do minifermentador utilizado para cultivo da *C. violaceum*.

Foram utilizados 500 mL de caldo nutriente contendo glicose 0,25 % (p/v) os quais foram colocados no fermentador, este foi fechado tendo seus orifícios para inóculo e entrada de ar sido fechados com algodão, coberto com gaze e papel alumínio, para evitar contaminação. A agitação foi feita com o auxílio de um agitador magnético.

Foi borbulhado ar continuamente no fermentador com o auxílio de uma bomba de ar de aquário. O ar injetado no sistema era previamente passado através de uma solução de permanganato de potássio 10 % (p/v) para ser esterilizado. Não foi feito controle da vazão de ar.

Foram utilizados 10 mL de inóculo de 24 horas de cultivo para 500 mL de meio. Amostras de 5 mL foram recolhidas a intervalos de tempo de 24 horas, através do orifício de coleta de amostra, para determinação da massa celular e produção de violaceína, como descritos nos itens III.A.3 e III.A.4. respectivamente

III.A.3. Avaliação do crescimento microbiano.

Cinco frascos contendo 25 mL de caldo nutriente esterilizado, foram inoculados com 1 alçada de *C. violaceum* e cultivados a 28 °C e 150 rpm, em agitador rotatório, por 48 horas. Após este período, 10 mL de caldo de cultivo foram recolhidos de cada frasco e filtrados em filtro Millipore (HVLP 0,47 µ) previamente pesados. Estes filtros foram colocados em estufa a 50 °C por 3 dias e pesados. Através deste procedimento estabeleceu-se o valor médio das absorvâncias correspondentes aos pesos secos da massa celular.

O valor médio encontrado foi de $2,9 \pm 0,3$ mg de peso seco/mL de meio correspondendo a uma absorvância $A_{720} = 5,85 \pm 0,63$. Desta forma estabeleceu-se que:

$$\text{Peso seco em} = [2,9 \times A_{720} / 5,85] \text{ mg/mL}$$

Nos experimentos indicados, o crescimento microbiano foi avaliado através da leitura da absorvância dos caldos de cultivo a 720 nm. Da amostra de cada

frasco, foi feita a determinação da absorbância a 720 nm em um espectrofotômetro Beckman DU-70. O aumento da absorbância neste comprimento de onda é diretamente proporcional ao crescimento celular e conseqüente turbidez do meio de cultura. Estes valores foram utilizados para expressão dos resultados, ou transformados através da equação acima em peso seco. Como controle para as leituras, utilizou-se o caldo de cultivo não inoculado. Para este procedimento, um frasco, contendo um meio idêntico e estéril, foi mantido nas mesmas condições dos ensaios e amostras foram recolhidas, nos mesmos intervalos de tempo, para servirem como controle.

III.A.4. Extração e quantificação de violaceína nos caldos de cultivo

Em tempos pré-estabelecidos, 1 mL de caldo de cultivo foi recolhido num tubo de ensaio, ao qual foram adicionados 2 mL de acetato de etila (Merck). Após agitação vigorosa, a suspensão foi deixada decantar. Com auxílio de uma pipeta Pasteur, a fase orgânica foi retirada, transferida para um tubo de ensaio contendo sulfato de sódio anidro e posteriormente filtrada. A absorbância do filtrado foi lida a 577 nm (λ_{max} de absorção da violaceína em acetato de etila), usando como controle acetato de etila. Para calcular a concentração de violaceína, considerou-se o valor de $\epsilon = 1,7 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (DeMoss, 1967).

No caso dos meios de cultura sólidos, estes foram raspados das placas de Petri e adicionado 25 mL de acetato de etila para extração do pigmento, filtrados e feitas as leituras das absorbâncias em 577 nm.

III.A.5. Efeito de alguns metabólitos indólicos sobre a biossíntese de violaceína

Em diferentes Erlenmeyers de 125 mL contendo 10 mL de meio de sais e aminoácidos, foram adicionados, sob condições estéreis, 20 µL de cada uma das seguintes soluções, separadamente: isatina (Fluka) 30 mM, ácido 3-indol acético (Merck) 30 mM, triptofano 30 mM (Sigma), 5-hidroxitriptamina (serotonina) (Sigma) 30 mM e água destilada.

Foram utilizados 200 µL de inóculo, preparado como descrito no item III.A.1, em cada um dos frascos.

Imediatamente após a adição de inóculo, uma alíquota de 1 mL, foi retirada, em condições estéreis, para determinações da massa celular e produção de violaceína, como descrito nos itens III.A.3 e III.A.4., respectivamente. Os frascos foram incubados em agitador orbital (150 rpm), a 28 °C. Novas coletas de amostras foram feitas a cada 24 horas por 72 horas para as mesmas determinações.

Observações:

- 1- As soluções de ácido 3-indol acético e isatina foram preparadas em etanol absoluto (Merck), enquanto triptofano foi preparado em água destilada.
- 2- Os ensaios foram repetidos três vezes e em triplicata.

III.A.6. Incorporação de 1-¹⁴C-ácido 3-indol acético á violaceína

Os ensaios foram realizados em Erlenmeyer de 50 ml contendo 10 µL de 1-¹⁴C-ácido 3-indol acético (com contagens de $5,5 \times 10^5$ cpm/10 mL), 100 µL de ácido 3-indol acético 30 mM e 10 mL do meio de sais e aminoácidos. Foram utilizados 200 µL de inóculo preparado como descrito no item III.A.1. Os frascos foram incubados sob agitação em agitador orbital (150 rpm), a 28 °C, por 96 horas.

Após este período, foram adicionados 4 mL de metanol (Merck) ao caldo de cultivo, aquecido em banho fervente por 5 min., resfriados e centrifugados por 10 min. a 5.000 rpm. Uma alíquota de 200 µL, foi aplicada numa placa de cromatografia de camada delgada, preparada com sílica-gel (10x3 cm - placa de alumínio da Merck). Foi utilizada para eluição uma mistura acetona/benzeno (3:1). A região contendo o pigmento foi raspada e transferida para um tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 1 mL de metanol, filtrada através de papel de filtro (Watman 1). A absorbância desta solução foi lida em comprimento de onda de 577 nm, em espectrofotômetro Beckmann- DU-70. Em seguida, esta solução foi transferida para um frasco de cintilação, contendo 5 mL de líquido de cintilação (Instagel), e a contagem da radioatividade (cpm) foi feita em um aparelho de cintilação líquida LS-1000C Beckmann.

Para a determinação da concentração de ácido 3-indol acético remanescente no meio de cultura, foram recolhidos 200 µL do sobrenadante da centrifugação e cromatografado, no mesmo sistema descrito acima. A mancha correspondente ao

ácido 3-indol acético foi raspada da sílica, transferida para um tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 1 mL de metanol, filtrado e a sua absorbância lida a 280 nm. Esta solução foi transferida para 5 mL de Instagel e realizada a contagem da radioatividade da amostra como descrito acima.

Para os estudos de incorporação de 2-¹⁴C-ácido 3-indol acético, foi seguido o mesmo procedimento.

III.B. Síntese da carboxiamida (CBX-1)

O composto N-etil-(5-hidroxiindol-3-il)-2-indoliletilamida ou CBX-1 (vide Fig.10) foi sintetizado a partir do coloridrato de 5-hidroxitriptamina (serotonina) e ácido 3-indol acético, segundo o método descrito por Huang et al., 1984.

Foram utilizados 4,6 µmol de serotonina (Sigma), 4,6 µmol de ácido 3-indol acético (Merck), 1,2 µmol de trietilamina (Aldrich) e 5,0 µmol de iodeto de 2-cloro-1-metil piridina (Aldrich) em 0,5 ml de acetonitrila (Riedl). A mistura reacional foi mantida sob agitação magnética, por 4 horas sob atmosfera de nitrogênio seco.

O desaparecimento dos reagentes (serotonina e ácido 3-indol acético) foi acompanhado por cromatografia de camada delgada em gel de sílica, utilizando como eluente acetona/hexano (2:1).

Terminada a reação, o solvente foi evaporado e feita uma cromatografia de placa preparativa de gel de sílica, usando como eluente acetona (Merck)/hexano (Merck) (2:1). A fração, cuja migração foi diferente das dos reagentes, foi recolhida e eluída em acetona. O solvente desta fração foi evaporado restando uma massa de 3,8 mg de um produto que cristalizou em forma amorfa de cor clara que escureceu após alguns dias.

III.C. Síntese da carboxiamida-2 (CBX-2)

O composto N-etil-(indol-3-il)-2-indoliletilamida ou CBX-2 (vide Fig. 11), foi sintetizado, também baseado no método descrito por Huang et al. (1984).

A uma solução contendo de 1 mmol de ácido 3-indol acético, 3 mL de acetonitrila e 1,1 mmol de iodeto de 2-cloro 1-metil piridina, foram adicionados uma solução 1 mmol de triptamina (Fukla) e 2,2 mmol de trietilamina em 1 mL de acetonitrila e mantida sob agitação magnética, por 4 horas sob atmosfera de nitrogênio seco.

O consumo dos reagentes (triptamina e ácido 3-indol acético) foi acompanhado por cromatografia de camada delgada em gel de sílica, utilizando como eluente acetona/hexano (2:1).

Terminada a reação, a acetonitrila foi evaporada em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Realizou-se cromatografia de coluna (30 x 1,5 cm) em gel de sílica (Tipo H-60, 70-230 mesh, Merck), sendo eluída em acetona/hexano (3:2). O produto majoritário foi recolhido. O solvente foi evaporado restando de 230 mg do produto majoritário na forma de uma espuma que cristalizou-se posteriormente.

III.D. Estímulo da biossíntese de violaceína por: ácido 3-indol acético, isatina, triptofano, 5-hidroxitriptamina, CBX-1 e CBX-2.

Em Erlenmeyer de 125 mL contendo 10 mL de caldo nutriente, foram adicionados 2 µL de uma das seguintes soluções (30 mM): ácido 3-indol acético, isatina, triptofano, 5-hidroxitriptamina (serotonina), CBX-1, CBX-2, mistura de carboxiamida + isatina, ou apenas água destilada.

Aos frascos contendo os meios descritos acima, foram adicionados 200 μ L do inóculo. Imediatamente após a inoculação, uma alíquota de 1 mL de amostra foi coletada de cada frasco, para determinações da massa celular e produção de violaceína, como descrito nos itens III.A.3 e III.A.4., respectivamente. Os frascos foram, então, incubados sob agitação em agitador orbital (150 rpm), a 28 °C. Novas amostras foram coletadas a 24, 48 e 72 horas de cultivo.

Observações:

- 1- Foi feito um controle utilizando 2 μ L de etanol, em 10 mL de caldo nutriente. A diferença entre este controle e o realizado apenas com água foi desprezível.
- 2- As soluções de isatina, CBX-1 e CBX-2 foram preparadas em etanol absoluto, enquanto a solução de triptofano foi preparada em água destilada.
- 3- Os ensaios foram realizados por três vezes e em triplicata.

III.E. Efeito da CBX-1 sobre *T. cruzi*

Os ensaios das atividades tripanocida das carboxiamidas 1 e 2 foram realizados no Departamento de Ultraestrutura e Biologia Celular da FIOCRUZ pela Dra. Solange de Castro e colaboradores. A metodologia utilizada encontra-se descrita no Apêndice II.

III.F. Citotoxicidade de CBX-1 sobre células V-79.

A citotoxicidade foi determinada através de curvas de proliferação celular de células V-79 de hamster chinês, como descrito por Haun et al. (1992).

Em placas de múltiplos poços, foram colocadas 30.000 células por poço em meio Eagle Modificado por Dulbecco (DME), contendo: 100 U/mL de penicilina, 100µL /ml de estreptomicina, suprida com soro fetal bovino 10% (p/v), e foram cultivadas por 44 horas a 37 °C em atmosfera úmida de CO₂ (5%). Após este período as células foram tratadas com o composto preparado em meio de cultura nas diferentes concentrações por 24 horas. Para determinação da taxa de proliferação, as células foram cuidadosamente lavadas por duas vezes com tampão PBS-Calcio 1 mM, fixadas com ácido tricloroacético (5%) e submetidas a hidrólise alcalina. A absorbância, da suspensão obtida, foi medida em 260 nm para quantificação de ácidos nucleicos. O ID₅₀ foi expresso em pmol/células e significa a concentração da droga necessária para reduzir em 50% a taxa de crescimento celular.

Todos os compostos foram dissolvidos em DMSO (Merck) 99,99%, grau espectroscópico, e diluídos em meio de cultura.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.A. Cultivo da *C. violaceum*

A partir do conhecimento de que a violaceína e seus derivados apresentam importante atividade tripanocida contra a cepa Tulahuén de *T. cruzi*, mas uma atividade pequena sobre a cepa Y (Durán, 1990), um dos objetivos iniciais deste trabalho foi a otimização da produção de violaceína por *C. violaceum*, tendo-se em vista que um bom rendimento do pigmento, permitiria modificá-lo quimicamente para se obter derivados mais eficazes e menos tóxicos para quimioterapia da doença de Chagas.

IV.A.1. Efeito da fonte de carbono sobre o crescimento e produção de violaceína por *C. violaceum*.

Embora a literatura não trate claramente a violaceína como um metabólito secundário, produzido por *C. violaceum*, não são raras as observações de que a produção do pigmento não é essencial à sobrevivência do microrganismo (Sivendra e Lo, 1975). Por esta razão, neste trabalho foram feitos alguns ensaios sobre as condições de cultivo da bactéria visando maximizar sua produção.

Nos trabalhos apresentados na literatura em que se faz o cultivo de *C. violaceum*, é descrita a utilização de uma variedade de fontes de carbono no cultivo da bactéria, entre eles glicose, glicerol (DeMoss, 1967), manitol (Sivendra e Lo, 1975) e lactose (Strong, 1944). Por essa razão foram testados o efeito de alguns açúcares sobre a produção da violaceína.

As curvas de crescimento de *C. violaceum* e produção de violaceína, na presença de diferentes fontes de carbono, todas na concentração de 2% (p/v), são mostradas nas figuras 8A a F. Nestas figuras o crescimento celular é expresso como a absorvância do caldo de cultivo em 720 nm (A_{720}). Neste comprimento de onda é possível avaliar o crescimento celular pelo aumento da turbidez do meio de cultura, sem interferência da mudança de cor provocada pela produção de violaceína. Quanto maior o crescimento celular, maior será a turbidez do meio e conseqüentemente da absorvância em $\lambda = 720$ nm (A_{720}). A produção de violaceína foi avaliada pela leitura da absorvância a $\lambda = 577$ nm (A_{577}), do extrato de acetato de etila, considerando o coeficiente de extinção molar da violaceína, ϵ , igual a $17.000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (DeMoss, 1967).

Observa-se, na Fig. 8, que na presença de frutose (A) e glicose (B), os crescimentos celulares são os maiores dentre os açúcares testados, sendo A_{720} , após 96 horas de cultivo, iguais a 2,20 e 2,65, respectivamente. Nestas condições a produção de violaceína foi bastante reduzida, sendo que na presença de frutose A_{577} foi igual a 0,012 e na de glicose foi de 0,013, correspondendo a $0,71 \mu\text{M}$ e $0,76 \mu\text{M}$, respectivamente, após 96 horas de cultivo.

Na presença de manitol (Fig. 8C), observa-se a maior produção de violaceína (A_{577}), dentre os meios testados. O valor de A_{577} , após 96 horas de cultivo, foi igual a 0,38, o qual corresponde a concentração de violaceína de $22,65 \mu\text{M}$.

Contudo, o crescimento celular na presença de manitol, não ultrapassou um valor de A_{720} igual a 0,60, sendo pelo menos 3,5 vezes menor que o crescimento na presença de glicose.

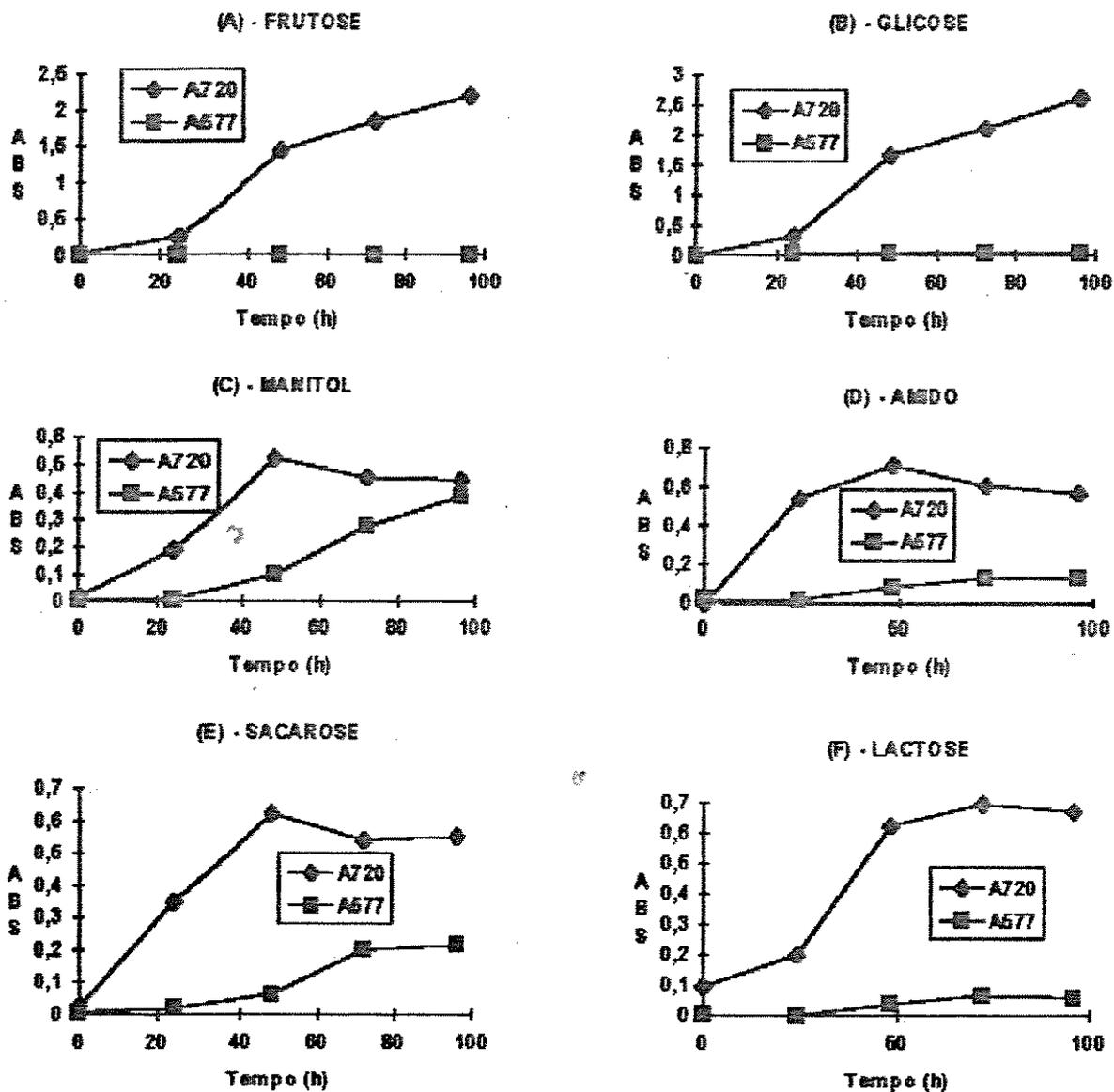


FIGURA 8: Curvas de crescimento e produção de violaceína na presença de: (A) Frutose, (B) Glucose, (C) Manitol, (D) Amido, (E) Sacarose e (F) Lactose.

O meio básico utilizado foi caldo nutriente, na presença de cada um dos açúcares descritos, todos na concentração de 2% (p/v). A massa celular e a produção de violaceína foram determinadas como descrito nos itens III.A.3 e III.A.4 respectivamente.

Observa-se que na presença de amido (Fig.8D), sacarose (Fig.8E) e lactose (Fig.8F) os crescimentos celulares também foram bem inferiores aos observados na presença de glicose ou frutose, sendo A_{720} após 96 horas de cultivo, iguais, respectivamente, a 0,61, 0,56 e 0,49. Estes açúcares propiciaram maior produção do pigmento que frutose ou glicose, sendo que, após 96 horas de cultivo, foram produzidos 7,71, 12,58 e 3,4 μM de violaceína, na presença de amido, sacarose e lactose, respectivamente.

Observa-se que o comportamento da produção de violaceína, na presença de diferentes fontes de carbono, pela cepa de *C.violaceum* (BB-78), a caracteriza como um metabólito secundário, de acordo com as observações da literatura (Kernel, 1978; Drew e Demain,1977). O crescimento celular foi reduzido frente a fontes de carbono de mais difícil metabolismo, como foram os casos de manitol, amido e sacarose (Fig. 8 C, D e E), porém a produção de violaceína foi significativamente maior. Observa-se, por outro lado, que glicose e frutose, embora promovam maior crescimento celular, diminuem a produção do pigmento, além de possibilitar uma maior incidência de variantes incolores. Além disso, verificou-se que, a produção de violaceína ocorre na fase estacionária do crescimento celular, de 48 a 72 horas de cultivo. Estes resultados reforçam a idéia de que a violaceína, como metabólito secundário que é, não está envolvida com o crescimento e metabolismo reprodutivo da bactéria.

Na presença de manitol, sacarose, amido e lactose, o pH do meio de cultura aumentou de 6,6 (no início do cultivo) para 8, 0 (após 96 horas de cultivo) e diminuiu de 6,6 para 6,3, durante o mesmo período, na presença de frutose e glicose (dados não apresentados). Estes resultados indicam que o metabolismo de carboidratos, a partir dos quais são produzidos ácidos orgânicos, o que leva à diminuição do pH do meio de cultura, está direcionado ao crescimento celular e não à produção de violaceína. O aumento do pH do meio de cultura pode estar

relacionado a um desequilíbrio entre o crescimento celular e a morte celular, na qual ocorre hidrólise de proteínas e de aminoácidos. Nesta situação, houve um aumento da produção de violaceína, sugerindo que esta pode ser um mecanismo de proteção contra a morte celular.

O fato de haver uma pequena produção de violaceína na presença de glicose e frutose parece indicar que ocorre repressão de alguma enzima envolvidas na biossíntese de violaceína, uma vez que após o consumo de glicose do meio de cultura, ou na fase estacionária do crescimento celular, o pigmento passa a ser produzido. Por esta razão foi testado o efeito da concentração de glicose sobre a produção de violaceína.

A tabela I mostra o efeito da concentração de glicose sobre a eficiência da produção de violaceína e massa celular, por *C. violaceum* em caldo nutriente, expresso como o peso seco da massa celular. À medida que se aumenta a concentração de glicose, observa-se um aumento da massa celular e uma diminuição na produção de violaceína. A eficiência de produção de violaceína (violaceína/ peso seco da massa celular) diminui drasticamente com o aumento da concentração de glicose. Estes dados concordam com as observações de que glicose inibe a produção de metabólitos secundários (Demain, 1972; Drew e Demain, 1977).

TABELA I: Efeito da concentração de glicose em caldo nutriente sobre a produção de violaceína e massa celular.

Glicose (%)	Violaceína (μM)	Crescimento celular (mg de peso seco/L)	Eficiência ($\mu\text{mol/mg}$ peso seco). 10^3
0,25	10,5	290	36,2
0,50	9,9	570	17,4
1,00	2,1	600	3,5
2,00	0,7	1.130	0,6

C. violaceum foi cultivada a 28°C e 150 rpm, em 25 mL de caldo nutriente contendo glicose nas concentrações descritas. Eficiência é igual a razão entre a concentração de violaceína (μM) e o peso seco da massa celular produzida, como descrito nos itens III.A. e III.A.2, respectivamente, ambos após 96 horas de cultivo. Os desvios médios são menores que 10%.

VI. A.2. Produção de violaceína em minif fermentador

Na tentativa de aumentar a produção de violaceína, utilizou-se um minif fermentador de 1000 mL com caldo nutriente, contendo 0,25% de glicose. Esta concentração foi escolhida porque corresponde àquela em que houve maior produção de violaceína (Tabela I).

Nestas condições, observa-se que, embora a produção de violaceína tenha sido maior (13,96 μM), a produção de massa celular também cresceu (971 mg de peso seco/L). Sendo assim, a eficiência da produção de violaceína foi igual a $14,37 \cdot 10^{-3}$ $\mu\text{mol/mg}$ de peso seco, após 96 horas de cultivo. A eficiência na produção de violaceína foi, neste caso, aproximadamente 60% menor que a obtida em Erlenmeyer (Tabela I). Observou-se também, que a produção de violaceína não ocorre simultaneamente ao crescimento microbiano. O microrganismo apresentou um crescimento exponencial até 48 horas de cultivo, após este período

iniciou-se a fase estacionária. A produção de pigmento ocorre a partir do início da fase estacionária de crescimento microbiano, e foi crescente até 96 horas de cultivo. Estes resultados demonstram a viabilidade da produção de violaceína em maior escala em fermentadores. Porém para tal processo, será necessária a otimização das condições de cultivo, tais como, velocidade de agitação, aeração, tempo de cultivo, ajustes do pH do meio, entre outras.

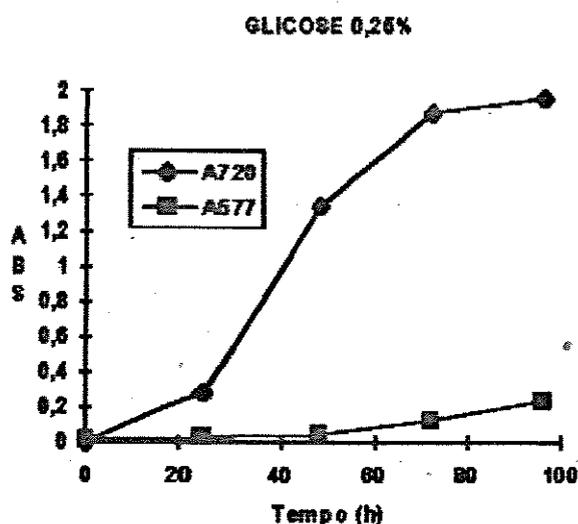


FIGURA 9 - Curva de crescimento e produção de violaceína por *C. violaceum* em minifermentador.

A bactéria foi cultivada a 28°C em minifermentador de 1000 mL (esquemático na Fig. 7, item III.A.2) em caldo nutriente contendo glicose 0,25% (p/v). A cada 24 horas após a inoculação foram recolhidas alíquotas de 5 mL, das quais foram lidas suas A720 e A577 do extrato de acetato de etila para determinação do crescimento celular e produção de violaceína, como descrito nos itens III.A.3 e III.A.4.

IV.A.3. Crescimento celular e produção de violaceína por *C. violaceum* e em diferentes meios de cultivo.

A observação de que *C. violaceum*, quando cultivada em meios artificiais deixava de produzir pigmento, levou ao estudo dos fatores que estimulariam ou inibiriam a biossíntese do pigmento. Com este objetivo, foram testados diferentes meios de cultivo, visando a escolha de um que fosse eficiente em estimular a biossíntese de violaceína e no qual a ocorrência de variantes incolores fosse menos incidente. Neste sentido testamos alguns dos meios descritos na literatura.

Moss et al. (1978) para estimular a pigmentação das cepas de *C. violaceum*, com as quais trabalharam, utilizaram ágar batata dextrose e ágar manitol + extrato de levedura, o que sugeriu a utilização destes meios.

A observação de que *C. violaceum* foi isolada pela primeira vez de uma pasta de amido (Boisbaudran, 1882) e o fato de que Corpe (1951) isolou esta bactéria de amostras de solo utilizando grãos de arroz umedecido, tendo sido identificada através do aparecimento de pontos azuis nos grãos, também conduziram à tentativa de utilização destes substratos.

O meio tioglicolato foi testado, uma vez que este já era utilizado no laboratório em trabalhos prévios do grupo, tendo resultado eficiente para a produção de violaceína (Riveros, 1989).

Além disso, a produção de pigmento parecia estar sempre relacionada à utilização principalmente de meios sólidos e por esta razão foram comparados os efeitos de meios líquidos e os correspondentes meios sólidos (com adição de ágar-ágar) sobre a produção de violaceína.

Na tabela II é apresentada uma relação dos meios de cultura testados e a correspondente produção de violaceína em $\mu\text{mol/L}$. O pigmento foi extraído com acetato de etila, tanto dos meios líquidos quanto dos meios sólidos. A avaliação

da produção de violaceína, foi feita pela leitura de A_{577} do extrato de acetato de etila, após 72 horas de cultivo.

Nos meios de cultura líquidos, caldo nutriente (0,5% de glicose), tioglicolato (0,5% de glicose), caldo manitol (1% de manitol) e caldo de batata dextrose (0,5% de glicose), a produção de violaceína foi de 10,87, 8,73, 6,12 e 2,66 μM , respectivamente. Enquanto nos meios sólidos, ágar nutriente (0,5% glicose), ágar batata (0,5% de glicose), ágar tioglicolato (0,5% de glicose) ágar manitol (2% de manitol) e em grãos de arroz cozido, as produções de violaceína foram de 87,50, 96,21, 189,57, 203,37 e 435,18 μM , respectivamente. Observa-se um aumento do rendimento na produção de violaceína, quando se utiliza meio sólido, que varia de 8 até 36 vezes (para caldo nutriente-ágar nutriente e caldo batata-ágar batata, respectivamente) quando comparado ao correspondente meio líquido.

Em grãos de arroz cozido foi alcançada a maior produção de violaceína. Este meio propiciou uma extração do pigmento bastante simples e rápida utilizando-se apenas acetona ou mesmo etanol como solventes. A formação de violaceína em um meio que contém principalmente amido, confirma o estímulo que fontes de carbono de difícil metabolismo têm sobre a produção de violaceína.

TABELA II: Produção de violaceína em diferentes meios de cultivo

Meio de cultura	Violaceína ($\mu\text{mol/L}$)
Caldo Nutriente	10,87 \pm 1,06
Ágar Nutriente	87,50 \pm 1,64
Caldo Tioglicolato	8,73 \pm 1,23
Ágar tioglicolato	189,57 \pm 2,02
Caldo manitol	6,12 \pm 1,16
Ágar manitol	203,37 \pm 2,02
Caldo de Batata	2,66 \pm 1,02
Ágar Batata	96,21 \pm 1,83
Grãos de arroz	435,18 \pm 2,45

C. violaceum foi cultivada a 28°C por 72 horas, nos meios descritos, preparados como descrito em III. A.1. Após este período foram adicionados 25 ml de acetato de etila aos 25 ml de caldo de cultivo ou ao meio sólido utilizado. A quantificação de violaceína foi feita como descrito no item III.A. 4. Os resultados apresentados são a média de três experimentos \pm o desvio padrão.

Estes resultados sugerem que ocorre uma maior produção de violaceína, em meios sólidos, devido à menor disponibilidade de nutrientes na superfície destes meios comparado com o interior do caldo de cultura. Esta menor disponibilidade de nutrientes, principalmente a de fontes de carbono, favorece a produção do pigmento. Além disso a produção de violaceína requer oxigenação (Hoshino et al., 1987b), a qual é mais favorecida na superfície, do que no interior dos caldos de cultivo.

Embora haja viabilidade para a produção de violaceína em meio líquido, a partir dos resultados obtidos, conclui-se que a produção em meio sólido tem um rendimento muito maior (Tabela II), fato este que justificaria estudos de otimização do processo utilizando este meio de cultivo para produção do pigmento em maior escala. Neste caso, a utilização do meio grão de arroz seria um excelente ponto de partida para estes estudos.

A produção de violaceína mostrou-se independente da presença de pigmento no inóculo, tendo ocorrido tanto a partir de inóculos pigmentados quanto não pigmentados.

IV.B. BIOSÍNTESE DE VIOLACEÍNA

IV.B.1. Incorporação do ácido 3-indol acético à violaceína

A participação do ácido 3-indol acético, como possível precursor da biossíntese de violaceína, foi testada através de ensaios de incorporação deste composto isotopicamente marcado ao pigmento. Através deste experimento, foi possível determinar que a razão violaceína/ ácido 3-indol acético foi aproximadamente 1, tanto para os isótopos no carbono 1, quanto no 2 (Tabela III). Estes resultados confirmam dados prévios de Riveros (1989) mostrando a participação do ácido 3-indol acético na biossíntese de violaceína, sem a descarboxilação do ácido durante neste processo.

Tabela III - Incorporação dos ácidos 2-¹⁴C-3-indol acético e 1-¹⁴C-3-indol acético à violaceína.

Isótopo	Atividade Específica (cpm/ μ mol)		Razão Violaceína/substrato
	Substrato	Violaceína	
2- ¹⁴ C-IAA	446,6 \pm 39,7	474,7 \pm 10,7	1,06
1- ¹⁴ C-IAA	90,1 \pm 5,3	98,8 \pm 4,5	1,10

C. violaceum foi cultivada por 96 horas em 10 mL de meio de sais minerais e aminoácidos como descrito em III.A.1.6, sem glicose e na presença de ácido 3-indol acético 0,3 mM mais 10,4 nmol de 2-¹⁴C-ácido 3-indol acético (2-¹⁴C-IAA) ou 10,4 nmol de 1-¹⁴C-ácido 3-indol acético (1-¹⁴C-IAA), totalizando uma contagem de 55.000 cpm/mL de meio de cultura. A determinação da incorporação do ácido à violaceína, foi feita como descrito em III.A.6. A atividade específica expressa a cpm de 200 μ L de uma solução de violaceína ou IAA isolados do meio de cultivo pela quantidade de violaceína ou IAA (μ mol) presentes nesta solução. O termo substrato refere-se a um dos isótopos. Os resultados apresentados são a média de dois experimentos realizados em triplicata.

IV.B.2. Síntese da carboxiamida-1 (CBX-1)

Uma vez que a partir dos ensaios de incorporação do ácido 3-indol acético marcado (IAA), verificou-se sua incorporação à molécula de violaceína e o conhecimento de que alguns outros compostos indólicos derivados do triptofano foram isolados de caldos do cultivo de *C. violaceum*, entre estes serotonina, foi feita a síntese química de um provável intermediário da biossíntese de violaceína que envolvesse estes dois compostos. Este intermediário, uma carboxiamida [N-

etil-(5-hidroxiindol-3-il)-2-indoliletilenamida (CBX-1)], foi sintetizada a partir da condensação de IAA e 5-hidroxitriptamina (serotonina) utilizando-se como agente de condensação o composto iodeto de 2- cloro metil piridinium , como esquematizado na figura 10.

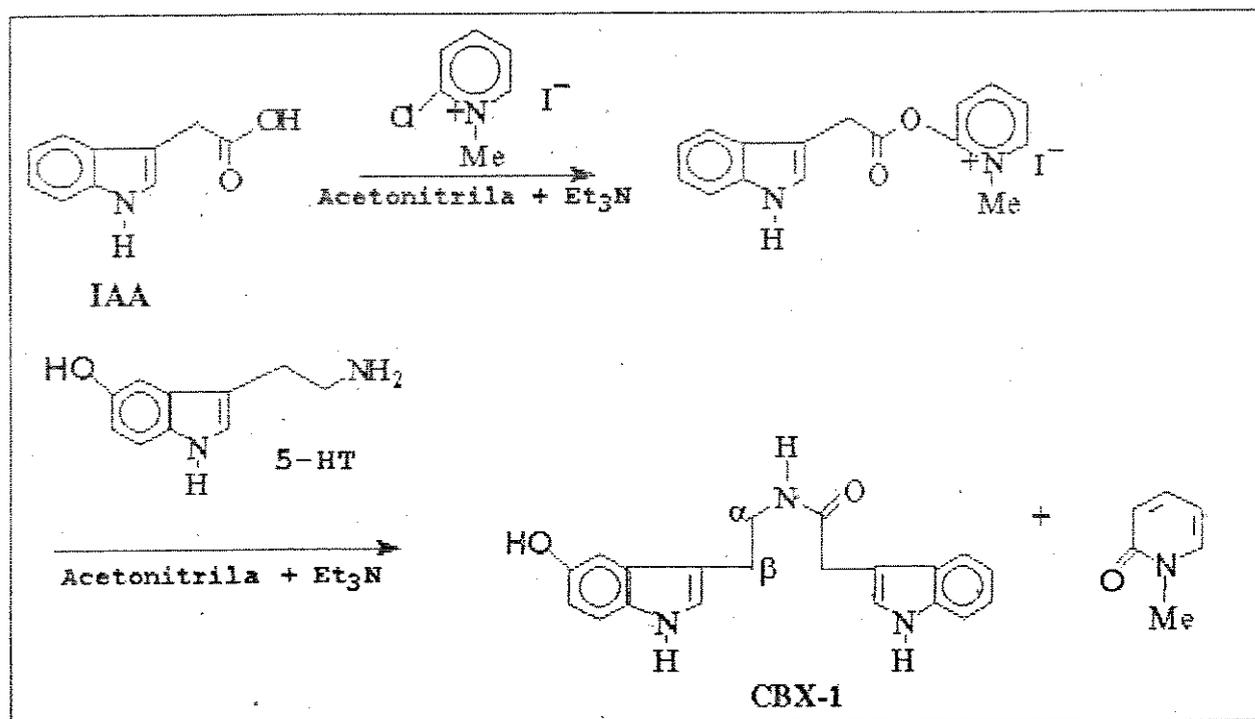


FIGURA 10 - Esquema da síntese da CBX-1 a partir da condensação da serotonina (5-HT) e o ácido 3-indol acético (IAA).

A carboxiamida-1 (CBX-1) sintetizada, como descrito em III.B. (pag. 25), cristalizou-se na forma de cristais finos amarelados, solúveis em acetona, etanol ou dimetil sulfóxido (DMSO), sendo caracterizada através dos espectros de infravermelho (IV), ¹H-RMN, UV/visível e massa, mostrados nos apêndices A.1, A.2, A.3 e A.4 respectivamente.

Na tabela IV estão relacionados os principais dados espectrais da CBX-1. Observa-se, através dos dados da espectroscopia de infravermelho (IV) da CBX-1,

que esta apresenta banda forte a 1627 cm^{-1} devida ao estiramento C=O da carbonila amídica e outra a 1575 cm^{-1} devida a deformação N-H de amidas secundárias.

O espectro de $^1\text{H-RMN}$ da CBX-1 (em $d_6\text{-DMSO}$) apresentou um multiplete que integra para 2 H em $\delta\ 2,75$ ppm, devido aos prótons metilênicos do carbono β ao nitrogênio amídico; outro multiplete que integra para 2 H em $\delta\ 3,3$ ppm, devido aos prótons metilênicos do carbono α ao nitrogênio amídico; um singlete em $\delta\ 3,5$ ppm devido aos prótons metilênicos do carbono adjacente à carbonila amídica; multipletes devidos aos prótons aromáticos em $\delta\ 7,4$ a $\delta\ 6,6$ ppm que integram para 9 H e singletes devidos aos prótons ligados aos nitrogênios indólicos em $\delta\ 10,5$ ppm; em $\delta\ 10,9$ ppm apresenta-se um singlete devido ao nitrogênio amídico e um sinal largo em $\delta\ 8,6$ devido ao próton do grupo hidroxila (Silverstein et al., 1981). Observam-se também sinais em $\delta\ 2,5$ devido a DMSO e outros devidos à umidade e impurezas da amostra.

O espectro de absorvância UV/visível da CBX-1 em etanol absoluto, mostrou um pico de absorção máximo em $\lambda = 282\text{ nm}$.

A espectroscopia de massa apresentou pico em $m/e = 333$, referente ao íon molecular esperado para a carboxiamida.

Apesar da presença de impurezas no composto obtido, detectado pelas análises físico-químicas, não foi possível maior purificação, devido ao baixo rendimento da reação. A comparação entre os espectros dos reagentes utilizados na síntese (ácido 3-indol acético e serotonina) descartam a presença destes como contaminantes da carboxiamida obtida e conseqüentemente o efeito que estes reagentes teriam sobre os ensaios biológicos. As principais contaminações detectadas foram a presença de água e solventes orgânicos, utilizados na reação e na etapa de purificação, os quais foram eliminados por evaporação sob pressão reduzida. Embora os compostos utilizados nos ensaios biológicos apresentam grau

de pureza superior ao dos compostos analisados, seria necessário a eliminação ou a determinação precisa das impurezas para se que se soubesse qual o seu efeito real sobre a biossíntese de violaceína, bem como sobre *T. cruzi*, o qual será discutido posteriormente.

TABELA IV - Dados espectrais da carboxiamida -1 (CBX-1)

Análise Composto	IV (cm ⁻¹)	¹ H-RMN δ (ppm)	Esp. Massa m/z	Absorção UV/visível λ _{max} (log ε)
CBX-1	1627, estiramento C=O (amida)	2,75- H ^β 3,3- H ^α	M ⁺ 333	282 (1,93)
	1575, deformação N-H (amida secundária)	3,5- H(adjacente a carbonila amídica)		
		6,6 a 7,4 H(aromáticos)		
		8,6 (OH)		
		10,5 2H(indólicos)		
		10,9H (amídico)		

O espectro de infravermelho (IV) foi feito em pastilha de KBr. O espectro de ¹H-RMN foi feito em dimetil sulfóxido deuterado (1,5 mg/mL) utilizando como padrão interno tetrametil silano (TMS). Para o espectro de absorvância, a amostra foi dissolvida em etanol absoluto.

Uma outra consideração a fazer é a de que os dados experimentais mostram que apenas compostos indólicos estão diretamente envolvidos na via de biossíntese de violaceína e as análises espectrais não indicam a presença de outros compostos indólicos além da carboxiamida.

Os dados espectroscópicos indicam fortemente que o composto sintetizado apresenta a estrutura mostrada na Fig. 10.

IV.B.3. Síntese da carboxiamida - 2 (CBX-2)

Com o objetivo de saber se durante o processo de biossíntese de violaceína haveria a hidroxilação do suposto intermediário CBX-1, antes ou após a sua formação, foi sintetizada uma carboxiamida de maneira semelhante à primeira, a N-etil-(indol-3-il)-2-indoliletilenamida (CBX-2), a partir da condensação do IAA e triptamina como esquematizados na figura 11.

Os principais dados espectrais da CBX-2 são apresentados na tabela V. Os espectros são apresentados nas figuras A.5, A.6, A.7 e A.8 apresentadas no apêndice.

O espectro de infravermelho da CBX-2 apresentou uma banda forte a 1635 cm^{-1} devida ao estiramento C=O da carbonila amidica e outra a 1540 cm^{-1} devida a deformação N-H de amidas secundárias.

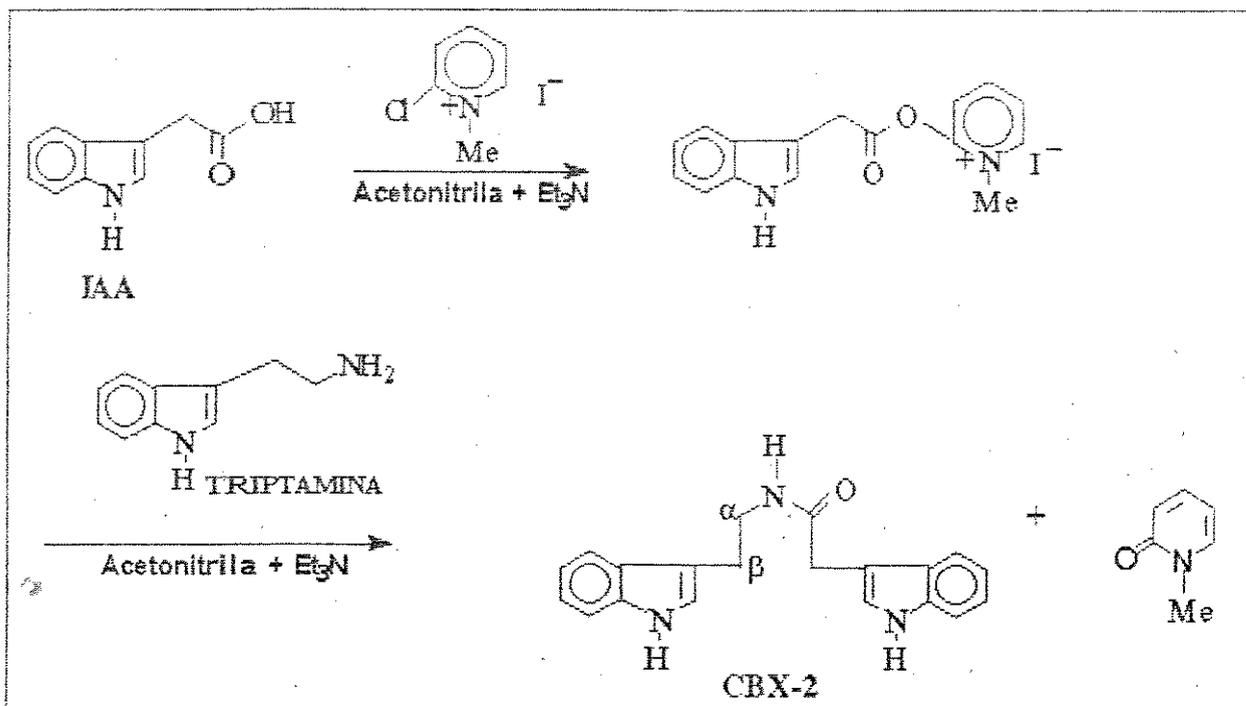


Figura 11 - Esquema da síntese da carboxiamida-2 (CBX-2) a partir da condensação do ácido 3-indol acético (IAA) e triptamina.

No espectro de ¹H-RMN da CBX-2 observa-se um multiplete que integra para 2 H em δ 2,8 ppm, devido aos prótons metilênicos do carbono β ao nitrogênio amídico; um multiplete que integra para 2 H em δ 3,3 ppm, devido aos prótons metilênicos do carbono α ao nitrogênio amídico; um singlete em δ 3,5 ppm devido aos prótons metilênicos do carbono adjacente carbonila; multipletes devidos aos prótons aromáticos em δ 6,9 a δ 7,55 ppm que integram para 10 H aromáticos; singletes devidos aos prótons ligados ao nitrogênio, dos anéis indólicos em δ 10,8 ppm e δ 10,9 ppm e multiplete da amida em δ 8,0 ppm. Os outros sinais observados na espectroscopia são atribuídos à presença de umidade e de solventes na amostra.

A espectroscopia de absorção UV/visível da CBX-2 em etanol apresentou λ_{max} a 280 nm, característicos de compostos indólicos.

A espectroscopia de massa desta carboxiamida mostrou o íon molecular em $m/z=317$. Os dados obtidos indicam que a carboxiamida sintetizada tem a estrutura esperada e mostrada na figura 11.

Tabela V - Dados espectrais da carboxiamida -2 (CBX-2)

Análise Composto	IV ν (cm ⁻¹)	¹ H-RMN δ (ppm)	Espect. Massa (m/z)	Absorção UV/Vis λ_{max} (log ϵ)
CBX-2	1635, estiramento C=O (amida)	2,8- H β 3,3- H α	317 (M ⁺)	280 (2,30)
	1540, deformação N-H(amida secundária)	3,5- H(adjacente á carbonila)		
		6,9 a 7,5 - H(aromáticos)		
		8,0- H(amídico)		
		10,8 e 10,9 H(indólicos)		

O espectro de infravermelho (IV) foi feito em pastilha de KBr. O espectro de ¹H-RMN foi feito em dimetil sulfóxido deuterado (1,5 mg/mL) utilizando como padrão interno tetrametil silano (TMS). Para o espectro de absorbância, a amostra foi dissolvida em etanol absoluto.

IV.B.4. Estímulo da biossíntese de violaceína por triptofano, isatina, 5-hidroxitriptamina, ácido 3-indol acético, CBX-1 e CBX-2

Uma vez que se supunha que as carboxiamidas, CBX-1 e CBX-2, poderiam ser moléculas precursoras na biossíntese de violaceína, o passo seguinte à suas sínteses foi testar seus efeitos sobre a biossíntese de violaceína. Além das CBX-1 e CBX-2, foram testados outros compostos: (i) o triptofano que é, segundo a literatura o principal precursor da biossíntese de violaceína; (ii) o ácido 3-indol acético, que se mostrou capaz de ser incorporado integralmente na molécula de violaceína (dados apresentados em IV.B.1; (iii) isatina, que é acumulada ao invés de violaceína, quando *C. violaceum* foi irradiada com luz ultravioleta (Riveros, 1989) e (iv) 5-hidroxitriptamina (serotonina), que segundo Hoshino et al. (1991) não participa na biossíntese de violaceína, mas que foi identificada em caldos de cultivo de *C. violaceum* (Riveros, 1989). Para tal, foram adicionados ao meio de cultura cada um dos compostos individualmente e a CBX-1 mais isatina, para verificar se o efeito inibidor da isatina sobre a biossíntese de violaceína poderia ser revertido pelo provável intermediário CBX-1.

Na tabela VI, são mostrados os efeitos de triptofano (TRP), isatina (ISA), ácido 3-indol acético (IAA), 5-hidroxitriptamina (5-OH-triptamina), CBX-1 e CBX-2 sobre o crescimento celular e a produção de violaceína.

Quanto ao crescimento celular, observou-se que o ácido 3-indol acético (IAA), triptofano (TRP) e 5-hidroxitriptamina, estimulam o crescimento celular. Porém, a produção de violaceína é estimulada, não apenas por estes compostos, mas também pela CBX-1. A eficiência, que é a razão entre produção de violaceína e crescimento celular, é aumentada na presença de IAA, TRP e CBX-1. A isatina inibiu tanto crescimento celular, quanto a produção de violaceína, mostrando-se o composto menos eficiente no estímulo da produção de violaceína. A associação de

CBX-1 e isatina produziu um efeito inibitório ainda maior no crescimento celular, bem como na produção de violaceína.

Tabela VI- Estímulo da biossíntese de violaceína por alguns compostos indólicos.

Compostos	Crescimento celular (mg peso seco/ mL)	Violaceína ($\mu\text{mol/L}$)	Eficiência ($\mu\text{mol/mg}$ peso seco) $\cdot 10^3$
Controle	0,63	13,53	21,47
IAA	0,68	17,65	25,95
Isatina	0,46	7,65	16,63
TRP	0,66	19,98	30,27
5-OH-triptamina	0,73	16,47	22,56
CBX-1	0,48	17,65	36,77
CBX-2	0,58	10,59	18,25
CBX-1+Isatina	0,40	8,82	22,05

C. violaceum foi cultivada em caldo nutriente, por 72 horas a 28 °C, como descrito em III.A.1.2 na ausência (controle) ou na presença de um dos compostos relacionados na concentração final 6 μM . As determinações do crescimento celular e produção de violaceína foram feitos como descrito em III.A.3 e III.A.4 respectivamente. Os valores apresentam um desvio médio menor que 10%.

Dados anteriores do grupo (Riveros, 1989) mostraram que o efeito de isatina sobre o estímulo da biossíntese de violaceína foi dependente da sua concentração assim como do tempo de cultivo. Quando uma concentração de 6 μM de isatina foi utilizada, observou-se um estímulo máximo de 30 % na biossíntese de violaceína;

porém, observou-se também, que após 24 horas de cultivo, a presença de isatina induziu uma drástica diminuição na produção de violaceína quando comparada ao controle (sem isatina) (Riveros, 1989). Os resultados apresentados neste trabalho (Tabela VI) mostram uma inibição da biossíntese de violaceína de 22% na presença de isatina, após 72 horas de cultivo. A inibição observada pode ser devida a uma retroinibição induzida pela isatina, uma vez que supõe-se que esta participaria numa das últimas etapas de biossíntese da violaceína (vide esquema Fig. 12).

Dos compostos testados, CBX-1 (carboxiamida hidroxilada) foi o mais eficiente, confirmando a suposição de que este pode ser um intermediário importante na biossíntese do pigmento; enquanto CBX-2 (carboxiamida não hidroxilada) não estimulou nem o crescimento nem a produção de violaceína, indicando que a hidroxilação da molécula de violaceína antecede à biossíntese do intermediário CBX-1.

Estes resultados concordam com os dados da literatura com relação ao fato de que triptofano é um intermediário na biossíntese de violaceína. Além disso, demonstra-se que o ácido 3-indol acético pode ser utilizado no processo de biossíntese de violaceína, provavelmente porque pode dar origem ao aminoácido triptofano como ocorre em alguns microrganismos (Allison et al., 1974).

Cabe ressaltar que o meio de cultura utilizado, neste caso, caldo nutriente, contém outros compostos nitrogenados (aminoácidos, inclusive triptofano), que podem servir como fonte de compostos indólicos, ou originarem tais compostos.

IV.B.5. Efeito de metabólitos de *C. violaceum* como precursores da biossíntese de violaceína

Uma vez que o meio de cultura utilizado para testar o estímulo da biossíntese de violaceína continha peptona, fonte de nitrogênio rica em

aminoácidos, e dentre estes triptofano, foi necessário verificar se os compostos indólicos utilizados anteriormente, teriam o mesmo efeito se fossem as únicas fontes de grupos indólicos. Para isso, a bactéria foi cultivada por 72 horas em meio contendo diversos aminoácidos, exceto triptofano, e cada um dos compostos a seguir: ácido 3-indol acético, isatina, 5-hidroxitriptamina, triptofano e CBX-1.

A Tabela VII mostra que, dentre os compostos testados, apenas a isatina não foi capaz de estimular o crescimento celular. Além disso, todos estimularam significativamente a produção de violaceína, sendo que o triptofano foi o mais eficiente. É importante notar que, neste caso, a isatina, foi um bom indutor da biossíntese de violaceína demonstrando assim a possibilidade de sua participação na biossíntese de violaceína. Como mostrado anteriormente, o mesmo não ocorreu quando a bactéria foi cultivada na presença de outras fontes de grupos indólicos (Tabela VI).

Verifica-se que composto CBX-1, apresentou tanto efeito indutor (Tabela VII) quanto estimulante (Tabela VI) na eficiência da biossíntese de violaceína. Com relação ao estímulo da biossíntese do pigmento, a CBX-1 teve um efeito maior que o triptofano. Este resultado sugere que a CBX-1 é um intermediário que participaria de uma etapa posterior à utilização de triptofano, sendo, por esta razão, capaz de promover uma maior produção de violaceína no mesmo intervalo de tempo. Quanto à indução da biossíntese de violaceína por CBX-1, observa-se que sua eficiência é menor que a do triptofano. Isto poderia ocorrer porque, neste caso, a CBX-1 poderia ser desviada para outras vias que não a biossíntese de violaceína. É provável que triptofano não possa ser utilizado nestas mesmas vias, sendo então utilizado apenas para a biossíntese de violaceína.

Uma vez que *C. violaceum* produz também a desoxiviolaceína, pigmento minoritário, que difere da violaceína, pela ausência de um grupo hidroxila na posição 5 do anel indólico, foi feita a síntese química também de uma

carboxiamida sem o grupo hidroxila, através da condensação de triptamina e ácido 3-indol acético, a CBX-2.

Tabela VII- Efeito de compostos indólicos sobre a biossíntese de violaceína.

Composto	Crescimento celular (mg peso seco/mL)	Violaceína ($\mu\text{mol/L}$)	Eficiência ($\mu\text{mol/mg peso seco}$) 10^3
Controle	0,62	0,23	0,37
IAA	0,68	4,53	6,66
TRP	0,73	6,35	8,70
5-OH-Triptamina	0,94	2,70	2,87
ISA	0,52	3,82	7,35
CBX-1	0,73	3,12	4,27

C. violaceum foi cultivada por 72 horas a 28°C, em meio de sais minerais, glicose 0,25% e aminoácidos, na ausência (controle) ou na presença de um dos compostos relacionados, na concentração final de 6 μM , como descrito em (III.A.5). A determinação de violaceína na cultura foi feita como descrito em (III.A.4) e o crescimento celular foi estimado e calculado como descrito em (III.A.3). A eficiência na produção de violaceína é a razão (violaceína/ crescimento celular). Os valores apresentam desvios médios menores que 10%.

Os resultados com a CBX-2, sobre o estímulo da biossíntese de violaceína, mostraram que esta não tem efeito algum sobre a formação do pigmento, o que sugere que o composto desidroxilado não pode ser utilizado pela *C. violaceum* e que a hidroxilação da CBX-2 ou do triptofano é um passo necessário na biossíntese da violaceína. O efeito indutor desta carboxiamida não foi testado, porque sua síntese foi alcançada posteriormente aos ensaios biológicos com os outros compostos; porém é provável que como outros compostos indólicos seja capaz de induzir biossíntese de violaceína.

IV.B.6- Uma via proposta para a biossíntese da violaceína por *C. violaceum*

Experimentos anteriores mostraram que além de violaceína outros compostos indólicos são produzidos nos caldos de cultivo de *C. violaceum* (DeMoss e Evans, 1957). Os dados de incorporação do ácido 3-indol acético isotopicamente marcado no carbono 1 quanto no 2, apresentados na Tabela III e os resultados de Riveros (1989), mostram que a razão ácido 3-indol acético marcado/ violaceína é igual a 1,0. Além disso Riveros (1989) mostrou que quando a bactéria era irradiada com luz ultravioleta a produção de violaceína cessava e que isatina passava a se acumular no meio de cultura, conferindo à bactéria coloração vermelha característica deste composto. O mesmo autor observou que a adição de isatina exógena ao meio de cultura da cepa nativa de *C. violaceum*, estimulava a biossíntese de violaceína, com relação ao controle e que este efeito era dependente da concentração de isatina, sugerindo que esta última pode exercer um efeito retro-inibidor sobre a via. Além destas observações, os dados experimentais deste trabalho, mostrando o efeito estimulatório da CBX-1 e ácido 3-indol acético, sobre a produção de violaceína, bem como a incorporação do ácido 3-indol acético, isotopicamente marcado no carbono 1 na molécula de violaceína, demonstrando que não ocorre descarboxilação desta molécula no processo de biossíntese do pigmento, sugerem um esquema hipotético para a biossíntese de violaceína como descrito a seguir e esquematizado na (Fig. -12).

O ácido 3-indol acético (IV) seria transformado parte em indol (VIII) através do passo A (Yonata e Soda, 1986), e parte em L-triptofano (I) através do passo B. O L-triptofano é subsequentemente convertido a 5-hidroxitriptofano (II), através do passo C (Mitoma et al., 1956). A condensação do 5-hidroxitriptofano (II) e ácido 3-indolacético (IV), através do passo D, é seguida pela descarboxilação do intermediário formado (composto III), levando à CBX-1 (V), através do passo F.

Existe ainda a possibilidade de que através de uma reação semelhante à que ocorre frequentemente em vegetais e bactérias, haja a produção do ácido 3-indol acético, a partir do metabolismo parcial de triptofano, como mostrado no passo G (Davis et al., 1976).

Um intermediário radicalar (VI) seria formado a partir da CBX-1 (V) pela ação de uma peroxidase, que agiria sobre o átomo do carbono α ao nitrogênio (Durán e Faljoni-Alario, 1978), através do passo I, produzindo o composto VI. Este último sofreria um rearranjo do tipo 1,2, como sugerido por Hoshino et al. (1987a), formaria o derivado 1,3-hidroxi-2H-pirrol-2-ona (XI) e o radical indol (VII), através do passo J, o qual por oxigenação, ciclização e quebra do intermediário produziria isatina, através do passo K. Isatina poderia ser produzida também a partir do indol (VIII) através do passo K', o qual produziria didroxindol (IX) (Sebek e Jäger, 1962), através do passo L (Fujioka e Wada, 1968) e finalmente a isatina (X) seria produzida, através do passo M. Sugere-se ainda, que um passo importante na biossíntese de violaceína deva ser a condensação da 1,3-diidro-pirrol-2-ona (XI) com isatina, passo N, de uma maneira similar à que ocorre na síntese química da violaceína realizada por Ballantine et al. (1960).

Existe, ainda, a possibilidade de que o intermediário (VI) sofra uma redução e posteriormente uma ciclização, passo P, produzindo o intermediário (XII) o qual por oxidação pelo oxigênio molecular, resulte na molécula de violaceína, através do passo Q, como sugerido por Hoshino et al. (1987b).

O papel da CBX-1 (V) como um intermediário metabólico fica evidente a partir dos dados da tabela VI, em que é mostrado o estímulo que esta carboxiamida tem sobre a biossíntese de violaceína.

O acúmulo de isatina por *C. violaceum*, quando irradiada por um período curto de tempo em comprimentos de onda maiores que 254 nm, em uma placa de Petri, e cultivadas em meio líquido, ao invés da produção da violaceína, demonstra

a participação deste composto na biossíntese do pigmento. Presume-se que o acúmulo de isatina ocorra porque um dos processos enzimáticos envolvido na biossíntese de violaceína teria sido afetado, o que levaria ao bloqueio do passo N e consequente acúmulo da isatina.

Embora Hoshino et al. (1987b) sugira uma via para a biossíntese de violaceína na qual participam duas moléculas de triptofano, seus resultados não concordam com dados anteriores (DeMoss e Evans, 1957) em que a razão violaceína/ triptofano marcado é de 1. Os resultados obtidos por DeMoss e Evans, sugerem que apenas 1 molécula de triptofano participa na biossíntese de violaceína.

Os resultados obtidos neste trabalho concordam com as observações da participação do triptofano, bem como do ácido 3-indol acético na biossíntese de violaceína, porém não estão de acordo com as observações de Hoshino et al. (1987a) quanto à origem dos átomos de oxigênio da molécula. Estes autores trabalharam na presença de uma atmosfera de O_2^{18} observando marcação na violaceína sintetizada sob estas condições, porém os autores não consideram a possibilidade de trocas entre os átomos de oxigênio da água e desta com os átomos de outros compostos oxigenados. Desta forma tanto o passo N, em que não se observa a participação direta de oxigênio molecular, quanto o passo Q são viáveis. Além disso, a participação essencial do oxigênio para a biossíntese de violaceína, pode estar muito mais relacionada ao metabolismo oxidativo, que ao sua participação direta nas reações de biossíntese desta. É provável que a formação do pigmento esteja associada à proteção contra um "stress" oxidativo induzido pela presença de oxigênio.

As tentativas de isolar o intermediário CBX-1, do meio de cultivo não foram bem sucedidas, provavelmente por causa de sua baixa estabilidade, observada, também, para o composto sintetizado quimicamente.

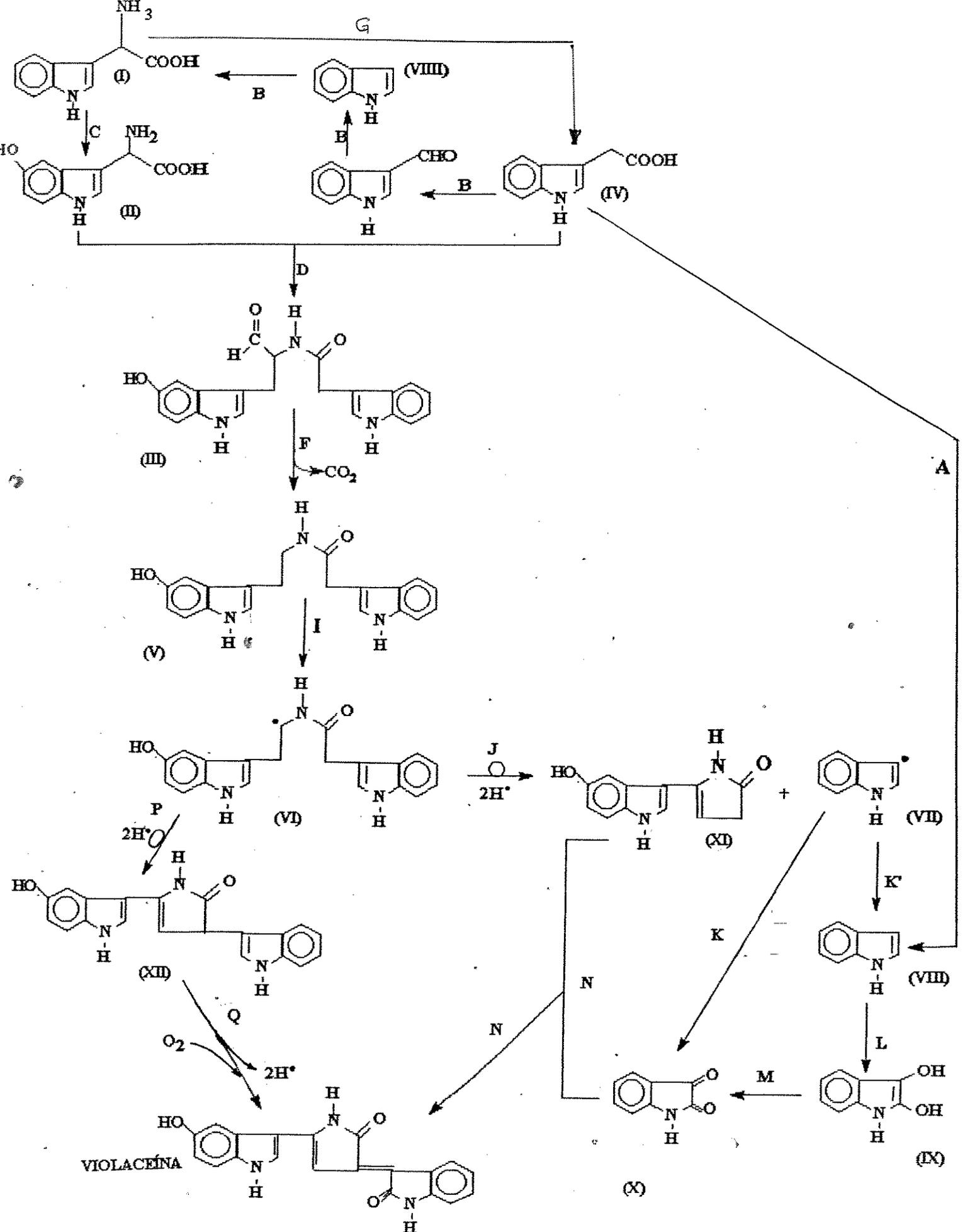


Figura 12 - Esquema proposto para a biossíntese de violaceína

IV.C. Efeito de CBX-1 e CBX-2 sobre *T. cruzi*

Um dos principais interesses na otimização da produção de violaceína por *C. violaceum* é devido ao fato deste composto apresentar atividade tripanocida significativa, frente à cepa Tulahuén de *T. cruzi* (Durán, 1990). Por esta razão compostos derivados da violaceína ou que apresentem grupos estruturais semelhantes aos da violaceína têm sido testados quanto às suas atividades tripanocidas. Além disso, Sofina et al. (1978) demonstraram que compostos indólicos apresentam atividades biológicas interessantes, como antitumorais. Estas observações prévias, e a semelhança estrutural das carboxiamidas 1 e 2 com a violaceína, incentivaram a que se testasse os efeitos biológicos das carboxiamidas sintetizadas, quanto ao seu efeito tripanocida.

A tabela VIII mostra os dados comparativos entre nifurtimox (tripanocida que é utilizado na quimioterapia da doença de Chagas), metilol violaceína (derivado da violaceína com melhor efeito tripanocida e menor citotóxicidade), CBX-1 e CBX-2 (Haun et al. 1992). Estes dados foram fornecidos pela Dra. Solange de Castro da FIO-Cruz -RJ, sendo comentados a seguir.

A CBX-1 mostrou-se pouco eficiente como tripanocida. A presença do grupo hidroxila na molécula, tornando-a mais polar, diminuiu sua atividade; sendo necessárias doses acima de 1,2 mM para obter efeitos semelhantes aos da CBX-2.

Verificou-se que CBX-2 tem atividade tripanocida maior que a metilol violaceína sobre as formas amastigota e tripomastigota, sendo interessante notar que a concentração de CBX-2 necessária para causar 50% de morte de formas amastigotas, igual a 239 μM , foi menor que a metade da concentração de metilol violaceína (500 μM).

Tabela VIII- Atividades tripanocida e de citotoxicidade de CBX-1, CBX-2 e outros compostos.

Composto	Epimastigotas (μM) ^a *	Amastigotas (μM) ^a *	Tripomastigota (μM) ^a *	Células V-79 (pmol/ cél.) ^b
Metilol- violaceína	75	500	750	0,048
CBX-2	325	239	607	7,0
CBX-1	>1200	> 1200	> 1200	N.D.
Nifurtimox	10	100	100	0,12

a: representa a concentração dos compostos necessária para causar 50% da morte dos parasitas em suas diferentes formas, como descrito em (III.E.2).

b: representa a quantidade dos compostos necessária para inibir a taxa de proliferação celular em 50%, como descrito em (III.F).

* Dados fornecidos pela Dra. Solange de castro (FioCruz- RJ).

A figura 13 mostra as curvas de mortalidade de formas amastigotas (Fig.13A), epimastigotas (Fig. 13B) e tripomastigotas (Fig. 13C) em função da concentração de CBX-2. Observa-se que, para causar 50% de mortalidade sobre as formas epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas, foram necessárias concentrações iguais a 325, 239 e 607 μM de CBX-2 respectivamente.

A CBX-2 se apresenta menos efetiva que nifurtimox, frente às diversas formas de *T. cruzi*, porém menos tóxica, o que pode ser observado pelo fato de que foram necessários 7,0 pmol de CBX-2/célula, para inibir 50% da taxa de

proliferação de células V79. A mesma inibição foi alcançada com apenas 0,12 pmol de nifurtimox/célula e apenas 0,048 pmol de metilol violaceína/ célula; confirmando o efeito tóxico de nifurtimox e de metilol violaceína.

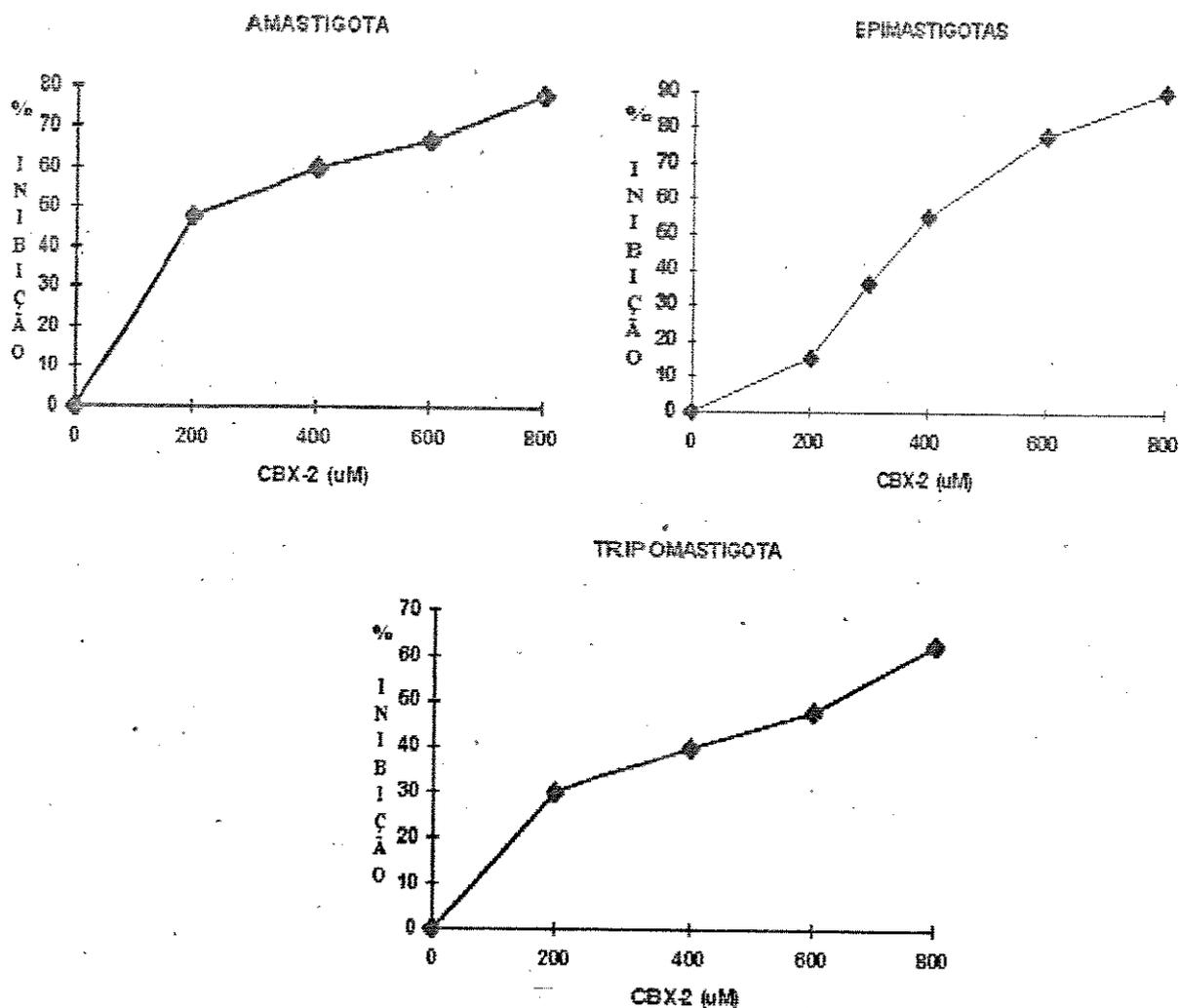


Figura 13- Efeito de CBX-2 sobre a mortalidade das diferentes formas de *T. cruzi*.

Estes experimentos foram realizados no departamento de Ultraestrutura e Biologia Celular da FIOCRUZ - RJ sob a supervisão da Dra. Solange de Castro.

Estes resultados foram interessantes uma vez que determinou-se que a CBX-2 é um composto com atividade tripanocida maior que o derivado, metilol violaceína, sobre as formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, além de ser significativamente menos tóxico. A metilol violaceína havia sido, até então, o mais eficiente dos derivados de violaceína sintetizados.

Os efeitos de CBX-1 e CBX-2 sobre *T. Cruzi*, sugerem que a desoxiviolaceína, por ser um análogo menos polar da violaceína, pode ser um composto com maior atividade tripanocida que esta. Esta suposição pode ser confirmada pela observação de Caldas et al. (1977) de que 75 µg/ml do extrato bruto de violaceína causou 100% de morte em *T. cruzi* e as observações recentes de que aproximadamente 500 µM (217mg/ml) de violaceína é necessário para causar o mesmo efeito (Durán, 1990). Fica evidente que com a purificação perdeu-se parte da atividade tripanocida.

V. CONCLUSÕES:

A violaceína é um metabólito secundário produzido pela *C. violaceum*, sendo por esta razão verificado que sua biossíntese é inibida na presença de açúcares de fácil metabolização, porém estimulada por fontes de carbono de mais difícil metabolização ou ainda por baixas concentrações de glicose.

A biossíntese de violaceína foi favorecida em meios sólidos, nos quais a acessibilidade aos nutrientes do meio é menos favorecida. Uma evidência foi a maior produção de pigmento quando utilizamos o meio grãos de arroz.

- Vários compostos indólicos foram capazes de estimular a biossíntese de violaceína, confirmando a participação de triptofano, ácido 3-indol acético, serotonina e isatina nesta via.

-A carboxiamida-1, sintetizada a partir da condensação da serotonina com o ácido 3-indol acético mostrou-se mais eficiente que o triptofano em estimular a biossíntese da violaceína.

-A carboxiamida-1 parece ser um intermediário importante na biossíntese de violaceína e sua formação envolve a participação do triptofano e ácido 3-indol acético, o qual foi integralmente incorporado à molécula de violaceína como mostrado na tabela III e esquematizado na figura 12.

-A observação de que a carboxiamida-2, sintetizada a partir da triptamina com o ácido 3-índol acético, não estimula a biossíntese de violaceína, indica que o intermediário carboxiamida é hidroxilado previamente à sua formação.

- A carboxiamida-2, menos polar que a CBX-1, mostrou-se um composto mais efetivo na indução da mortalidade de formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) que a metilol violaceína; além de ser menos tóxica que nifurtimox e metilol violaceína. Este composto é bastante promissor para a quimioterapia da doença de Chagas, principalmente pela sua baixa toxicidade.

VI. PERSPECTIVAS

-Os resultados obtidos a partir deste trabalho sugerem uma via para a biossíntese de violaceína à qual não é conhecida até o momento. O conhecimento de um precursor da biossíntese pode favorecer o isolamento deste e/ ou de outros intermediários da suposta via, levando a sua elucidação.

-O conhecimento de vias de biossíntese de metabólitos secundários é importante não apenas para a obtenção de um metabólito específico, mas contribui para a produção de vários outros metabólitos secundários produzidos por microrganismos que apresentem atividades biológicas interessantes, como por exemplo, antibióticos.

-A otimização da biossíntese de violaceína através da seleção de meios de cultivo favoráveis possibilita a obtenção de uma maior quantidade do pigmento, propiciando a maior síntese de outros derivados de violaceína com atividade tripanocida, além de ensaios das atividades citotóxicas e genotóxicas destes compostos. As nitrações da violaceína e do seu derivado metilol serão o passo seguinte deste trabalho, uma vez que a maioria dos compostos utilizados na quimioterapia da doença de Chagas são nitro compostos

-A atividade biológica apresentada pela CBX-2 abre a perspectiva para a síntese de outros derivados ainda mais ativos.

-Além disso foi publicado recentemente que várias cepas de *C. violaceum* são capazes de produzir homo polímeros de ácidos hidroxialcanóicos (PHA), com interesse como plásticos biodegradáveis. O conhecimento do metabolismo da bactéria pode favorecer a obtenção deste outro metabólito interessante produzido por ela.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allison, M.J.; Robson, I.M. and Baetz, A.L.; 1974. Tryptophan biosynthesis from indole-3-acetic acid by anaerobic bacteria from rumen. *J. Bacteriol.*, **117**: 175-180.

Ballantine, J. A.; Beer, R. J.; Crutchley, D. J.; Dodd, G. M. and Palmer, D. R.; 1958a. The synthesis of violacein and related compounds. *Proc. Chem. Soc.* 232-233.

Ballantine, J. A.; Barrett, C. B.; Beer, R. J. S.; Eardley, S.; Robinson, A.; Shaw, B. L. and Simpson, T. B.; 1958b. Chemistry of the bacteria VII. The structure of violacein. *J. Chem. Soc.* **765**: 760-761.

Ballantine, J. A.; Beer, R. J.; Crutchley, D. J.; Dodd, G. M. and Palmer, D. R.; 1960. The chemistry of bacteria part VIII. The synthesis of violacein and related compounds. *J. Chem. Soc.* , 2292.

Bazylnski, D.A.; Palome, E.; Blakemore, N. A. and Blakemore, R. P.; 1986. Denitrification by *Chromobacterium violaceum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**: 696-699.

Bettelheim, K.; Gordon, J. and Taylor, J.; 1968. The detection of a strain of *Chromobacterium lividum* in the tissues of certain leaf-nodulated plants by the immunofluorescence technique. *J. Gen. Microbiol.*, **54**: 177-184.

- Boaiannain, E.; 1979. Tratamento etiológico da doença de Chagas na fase crônica. *Rev. Goiana Med.*, 25: 1-60.
- Boisbaudran, L. D.; 1882. Matière colorante se formant dans la colle de farine. *Comp. Rend.*, 94: 562-565.
- Breed, R. S.; Murray, E. G. D. and Smith, N. R.; 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th ed., p. 294. Baltimore. Williams and Wilkins.
- Brener, Z.; 1984. Recent advances in the chemotherapy of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79: 149-155.
- Caldas, L. R. ; 1977. Photobiology in virgin land. *Photochem. Photobiol.*, 26: 1-2.
- Caldas, L. R.; Leitão, A. A. C.; Santos, S. M. and Tyrrel, A.; 1978. Preliminary experiments on the photobiological properties of violacein. *International Symposia on Current Topics in Radiology and Photobiology. Acad. Brasil. Ci. R.J.*, p. 121-126.
- Camargo, E.P.; 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 6: 93-102.
- Campbell, I. M.; 1984. Secondary metabolism and microbial physiology. *Adv. Microb. Physiol.* 25: 1-60.

Cançado, J.R.; Salgado, A.; Marra, U.D.; Alvares, J.M. and Machado, J.R.; 1975. Ensaio terapêutico clínico na doença de Chagas crônica com o Nifurtimox em três esquemas de duração prolongada. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 17: 111-125.

Contractor, S. F.; Sandler, M. and Weagg, N.; 1964. 6-Hydroxytryptophan formation from *Chromobacterium violaceum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 385: 133-144.

Corpe, W. A.; 1951. A study of the wide spread distribution of *Chromobacterium* species in soil by simple technique. *J. Bacteriol.*, 62: 515-517.

Davis, P. J.; Gustafson, M. E. and Rosazza, J. P.; 1976. Formation of indole-3-carboxylic acid by *Chromobacterium violaceum*. *J. Bacteriol.*, 126: 544-546.

Demain, A.L.; 1972. Cellular and environmental factors affecting the synthesis and excretion of metabolites. *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 22: 345-362.

Demain, A. L.; Aharonowitz, Y. and Martin, J. F.; 1983. Metabolic control of secondary biosynthetic pathways. In *Biochemistry and genetic regulation of commercially important antibiotics*, ed. L.C. Vining, pp. 49-72. Reading, M.A.: Adison-Wesley. 370 pp.

DeMoss, R. D. and Evans, N. R.; 1957. L-Tryptophan metabolism in *Chromobacterium violaceum*. *Bacteriol. Proc.*, 1957: 117-120.

- DeMoss, R. D. and Evans, N. R.; 1959. Physiological aspects of violacein biosynthesis in nonproliferating cells. *J. Bacteriol.*, 78: 583-588.
- DeMoss, R. D. and Evans, N. R.; 1960. Incorporation of C^{14} -labeled substrates into violacein. *J. Bacteriol.*, 79: 729-733.
- DeMoss, R.D.; 1967. Violacein. *Antibiotics*, 2: 77-81.
- DoCampo, R. and Moreno, S. N. J.; 1986. Free radical intermediates in the antiparasitic action of drugs and phagocytic cells. In *Free Radical Biology*, ed. W.A. Pryor, pp. 243; New York Academic, 6th ed.
- Drew, S. W. and Demain, A. L.; 1977. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.*, 31: 343-356.
- Durán, N. and Faljoni-Alario, A.; 1980. Bacterial chemistry-I: Studies of a potential phototherapeutic substance from *Chromobacterium violaceum*. *An. Acad. Brasil. Ci.*, 52: 297-302.
- Durán, N.; Erazo, S. and Campos, V.; 1983. Bacterial chemistry-II: Antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. *An. Acad. Brasil. Ci.*, 55: 231-234.
- Durán, N.; Campos, V.; Riveros, R.; Joyas, A.; Pereira, M. F. and Haun, M.; 1989. Bacterial chemistry-III: Preliminary studies on trypanosomal activities of *Chromobacterium violaceum* products. *An. Acad. Brasil. Ci.*, 61: 31-36.

Daran, N.: 1990. Violaceina: A descoberta de um antibiótico. *Ciência Hoje*, 11: 58-60.

Fairlamb, A.H.; Blackburn, P.; Ulrich, P.; Chait, B. T. and Cerami, A.: 1985. Trypanothione: A novel bis (glutathionyl) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science*, 227: 1485-1487.

Ferreira, R. C. C. and Ferreira, L.C.S.: 1986. Mutagenicity of nifurtimox and benznidazole in the Salmonella microsome assay. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, 19: 19-25.

Friedheim, E. A. H.: 1936. La fonction respiratoire du pigment du *Bacillus violaceus*. *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 110: 352-354.

Fujioka, M. and Wada, H.: 1968. The bacterial oxidation of indole. *Biochim. Biophys. Acta*, 158: 70-78.

Gorla, N.B.; Ledesma, O.S.; Barbieri, G.P. and Larripa, I.B.: 1988. Assessment of cytogenetic damage in chagasic children treated with benznidazole. *Mutation Res.*, 206: 217-220.

Gorla, N.B.; Ledesma, S.O.; Barbieri, P. G. and Larripa, B.I.: 1989. Thirteenfold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox. *Mutation Res.*, 224: 263-267.

Hartley, W. J.: 1913. On a violet colouring-matter and its production by a certain bacterium. *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.*, 14: 63-67.

- Haun, M. Pereira, M.F.; Hoffmann, M.E.; Joyas, A.; Campos, V.; Filard, L.S.D.; Castro, S.L. and Durán, N.; 1992. Bacterial Chemistry VI: Biological activities and cytotoxicity of 1,3-dihydro-2-H-indol-2-one derivatives. *Biol. Res.*, **25**: 21-27.
- Henderson, G.B. and Fairlamb, A.H.; 1987. Trypanothione metabolism: a chemotherapeutic target in trypanosomatids. *Parasitol. Today*, **3**: 312-315.
- Hoshino, T. Kondo, T.; Uchiyama, T. and Ogasawara, N.; 1987a. Biosynthesis of violacein: a novel rearrangement in tryptophan metabolism with a 1,2-shift of the indole ring. *Agric. Biol. Chem.*, **51**: 965-968.
- Hoshino, T.; Takano, T.; Hori, S. and Ogaswara, N.; 1987b. Biosynthesis of violacein: Origins of hydrogen, nitrogen and oxygen atoms in the 2-pyrrolidone nucleus. *Agric. Biol. Chem.*, **51**: 2733-2741.
- Hoshino, T. and Ogasawara, N. ; 1990. Biosynthesis of violacein: evidence for the intermediary of 5-hydroxy-L-tryptophan and the structure of a new pigment, oxyviolacein, produced by the metabolism of 5-hydroxytryptophan. *Agric. Biol. Chem.* **64**: 2339-2346.
- Hoshino, T. ; Kojima, Y.; Hayashi, T.; Uchiyama, T. and Kaneko, K.; 1993. A new metabolite of tryptophan, chromopyrrolic acid, produced by *Chromobacterium violaceum*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**: 775-781.

- Huang, H., Iwasawa, N. and Mukaiyeme, T.: 1984. A convenient method for the construction of β -lactam compounds from β -amino acids using 2-chloro-1-methylpyridinium iodide as a condensing reagent. *Chem. Lett.* 1465-1467.
- Hunter, K.J.; Strobos, C. A.M. and Fairlamb, A. H.; 1990. The interaction of trypanocidal drugs with polyamine and trypanothione metabolism. *Biochem. Soc. Trans.*, **18**: 1094-1096.
- Jockers-Scherubl, M.C.; Schirmer, R.H. and Krauth-Siegel, R.L.; 1989. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. *Eur. J. Biochem.*, **180**: 267-272.
- Johnson, W. M.; DiSalvo, A.F. and Steuer, R.R.; 1971; Fatal *Chromobacterium violaceum* septicemia. *Am. J. Clin. Pathol.*, **56**: 400-406.
- Kennel, Y.M.; 1978. Effect of carbon sources on β -lactam antibiotic formation by *Cephalosporium acremonium*. *Exp. Mycol.*, **2**: 234-242.
- Kimmel, K. E. and Maier, S.; 1969. Effect of cultural conditions on synthesis of violacein in mesophilic and psychrophilic strains of chromobacterium. *Can. J. Microbiol.*, **15**: 111-221.
- Knowles, C. J.; 1976; Microorganisms and cyanide. *Bacteriol. Rev.*, **40**: 652-675.
- Korburger, J. A. and May, S.O.; 1982. Isolation of *Chromobacterium* spp. from foods, soil and water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**: 1463-1467.

- Laatsch, H. and Thomson, R.H.; 1984. Spectroscopic properties of violacein and related compounds: Crystal structure of tetramethylviolacein. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, 1331-1339.
- Laplumé, H.; Barousse, A.P. and Cabrea, H.; 1985. Efectos indeseables de nifurtimox y benzimidazol. *Medicina*, **45**: 223-230.
- Lichstein, H. C. and Van de Sand, V. F.; 1945. Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *J. Infect. Dis.*, **76**: 47-49
- Luckner, M.; 1980. Alkaloid biosynthesis in *Penicillium cyclopium* does it reflect general features of secondary metabolism? *J. Natl. Proc.*, **43**: 21-40.
- Martín, J. F. and Liras, P.; 1981. Biosynthetic pathway of secondary metabolites in industrial microorganisms. In *Biotechnology, Vol. 1, Microbial fundamentals*, ed. H. J. Rehm, G. Reed; pp. 211- 33; Weinheim Fed. Repub. Germany: Verlag. Chemie. 520.
- Mitoma, C. Weissbach, H. and Udenfriend, S.; 1956. 5-Hydroxytryptophan formation and tryptophan metabolism in *Chromobacterium violaceum*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **63**: 122-130.
- Moss, M. O.; Ryall, C. and Logan, N. A.; 1978. The classification and characterization of chromobacteria from a Lowland River. *Gen. Microbiol.*, **105**: 11-15.

- Nagel, R. and Neponnaschy, I.; 1983. Mutagenicity of 2 antichagasic drugs and their metabolic deactivation. *Mutation Res.*, **117**: 237-242.
- Ohnishi, T.; Ohashi, Y.; Nozu, K. and Inoki, S.; 1980. Mutagenicity of nifurtimox in *Escherichia coli*. *Mutation Res.*, **77**: 241-244.
- Pemberton, J.M.; Vincent, K.M. and Penfold, R. J.; 1991. Cloning and herologus expression of the violacein biosynthesis gene cluster from *Chromobacterium violaceum*. *Curr. Microbiol.*, **22**: 355-358.
- Reilly, J. and Pyne, G.; 1927. On the pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *Biochem. J.*, **21**: 1059-1061.
- Riveros, R.; Haun, M.; Campos, V. and Duran, N.; 1988. Bacterial Chemistry-IV. Complete characterization of violacein: an antibiotic and trypanocide pigment from *Chromobacterium violaceum*. *Arq. Biol. Tecnol.*, **31**: 475-487.
- Riveros, R.; 1989. **Química de bactérias: Biossíntese e atividade biológica de metabólitos da *Chromobacterium violaceum* brasiliensis**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas-SP-Brasil.
- Sartory, A. J. Meyer, J. et Wealdele, J.; 1938. Contribution à l'étude d'une violacéine obtenue à l'état cristallisé et provenant d'un bacille violette isolé du pus d'un abcès dentaire. *Comp. Rend Soc. Biol.*, **206**: 950-954.
- Sebek, O.K. and Jäger, H.; 1962. Divergent pathways of indole metabolism in *Chromobacterium violaceum*. *Nature*, **196**: 793-795.

- Silverstein, R.M; Bassler, G.C. and Morrill, T. C.; 1981. *Spectrometric Identification of organic compounds*, 4 th edition; New York; John Wiley & Sons.
- Sivendra, R. and Lo, H. S.; 1975. Identification of *Chromobacterium violaceum*: pigmented and nonpigmented strains. *J. Gen. Microbiol.*, 90: 21-31.
- Sofina, Z. P.; Platonova, G. N.; Lesnaya, N. A.; Peretolchina, N. M.; Smetankina, O.Z.; Syrkir, A. B. and Gzovskaia, O. N.; 1978. Biological properties of nucleosides of indole II. Study of indole nucleosides in animals with grafted tumors. *Pharm. Chem. J.*, 12: 769-771.
- Stoppani, A. O. M., 1983. Bioquímica del *Trypanosoma cruzi*. *Interciencia*, 8: 396-408.
- Strong, F. M.; 1944. Isolation of violacein. *Science*, 100: 287-288.
- Teixeira, A.R.V.; Cordoba, J.C.; Maior, II and Solorzano, E.; 1990. Chagas' deasase: Lymphoma growth in rabbits treted with benznidazole. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 43: 146-158.
- Tobie, W. C.; 1934. The pigment of *Bacillus violaceus*. III. The apparent relation of violacein to indigo. *Soc. Am. Bacteriol.*. 39th General meeting. pp.11-12.

Vining, L. C.; 1986. Secondary metabolism in Biotechnology, Vol. 4, Microbial products II series; Ed. H.-J. Rehm, G. Reed. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft. 20-38.

Vining, L. C.; 1990. Functions of secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbiol.*, **44**: 395-427.

Wrede, F. and Rothaas, A. 1934. Über das violacein dan violetten farbstoff des *Bacillus violaceos*, I. Hoppe - Seyler's *Z. Physiol. Chem.* **223**: 113-115.

Yonaha, K. and Soda, K., 1986. Applications of stereoselectivity of enzymes: Synthesis of optically active amino acids, amines and coenzymes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, **33**: 95-101.

Zamenhof, S. and Eickhorn, H. H.; 1967. Study of microbial evolution through loss of biosynthetic functions: establishment of "defective" mutants. *Nature*, **216**: 456-458.

APÉNDICE I

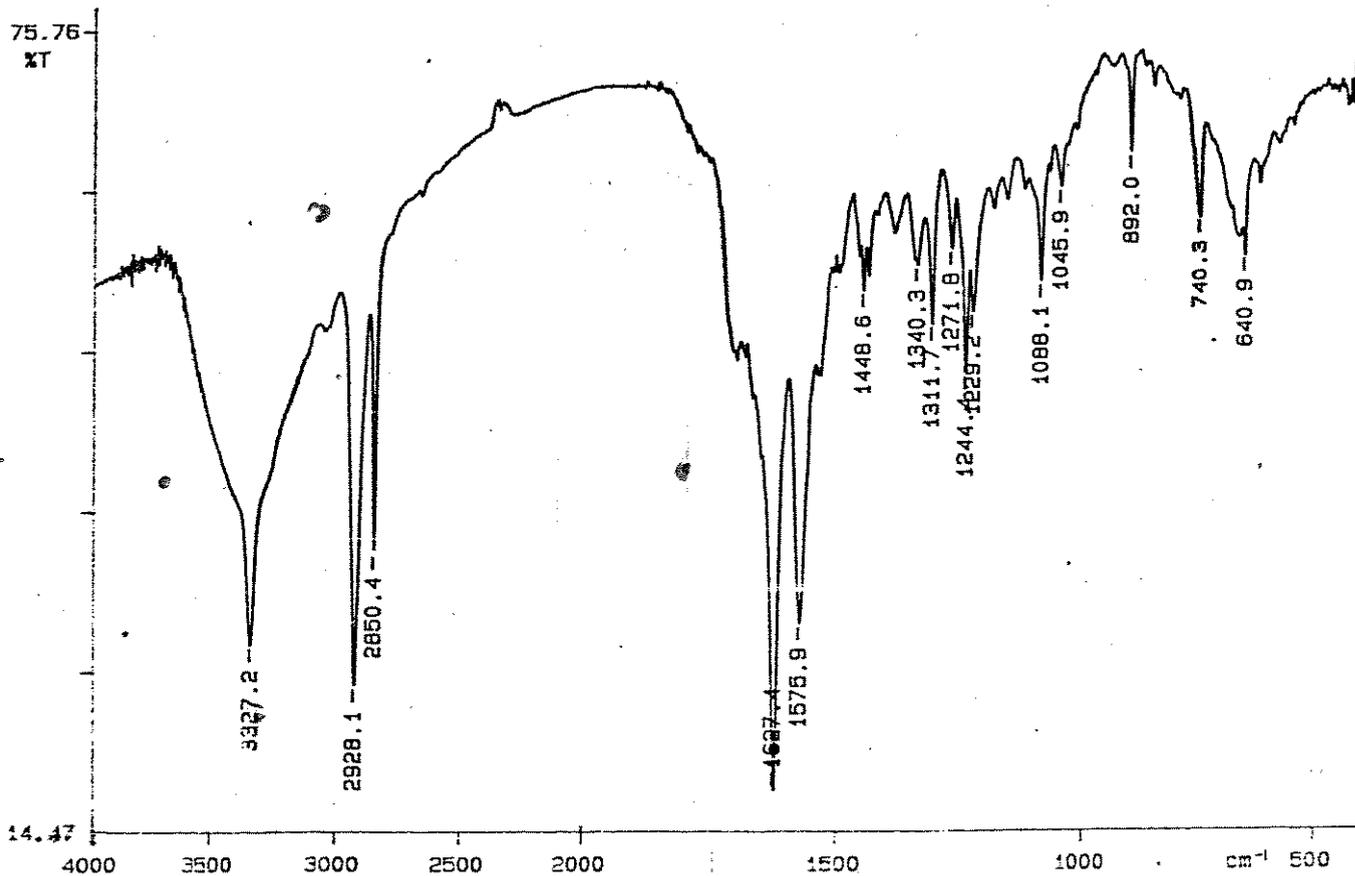


FIGURA A.1 - Espectro de infravermelho da carboxiamida-1 (CBX-1) em pastilha de KBr.

O espectro foi obtido em espectrofotômetro Perkin-Elmer (series 1600 FTIR).

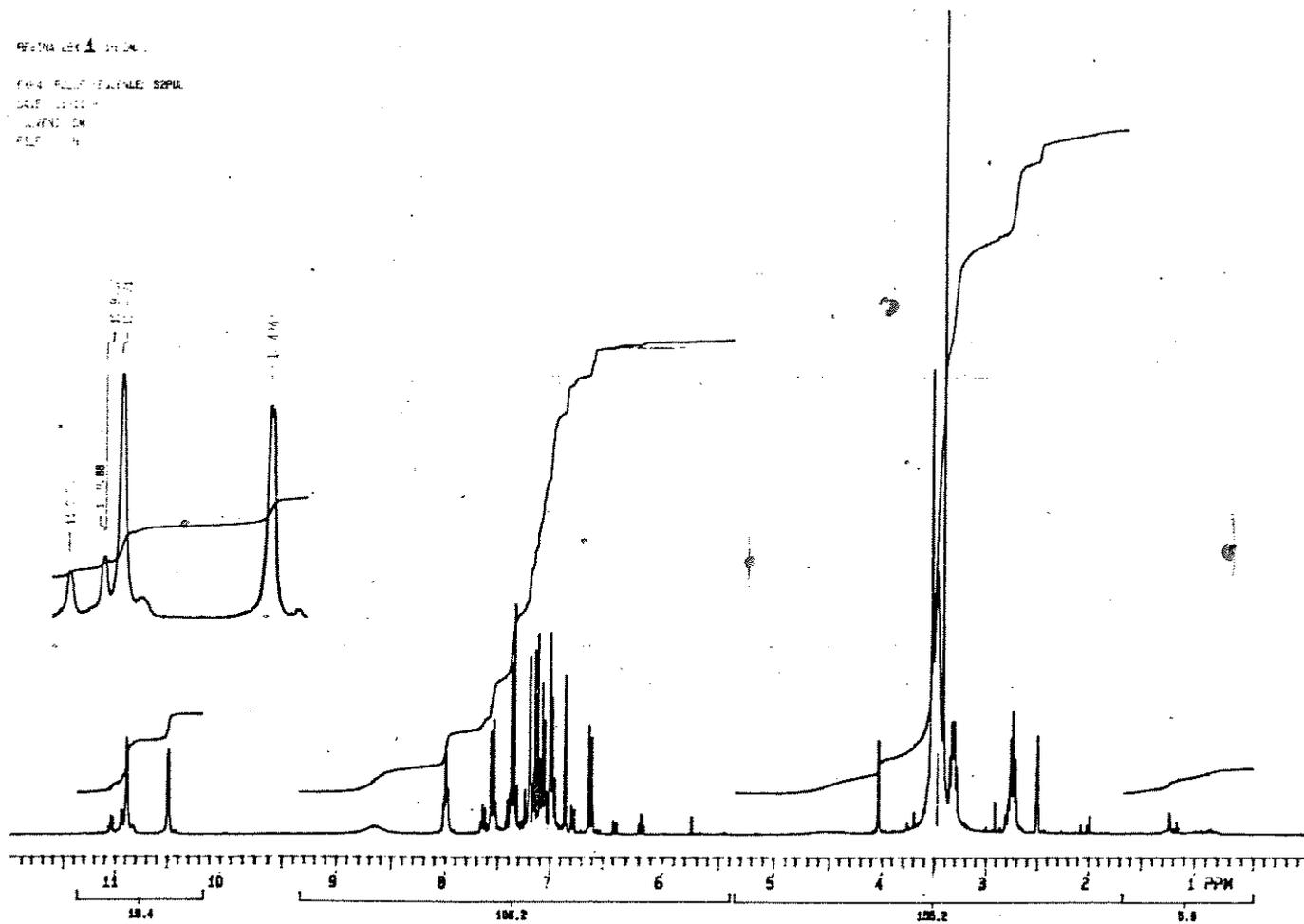
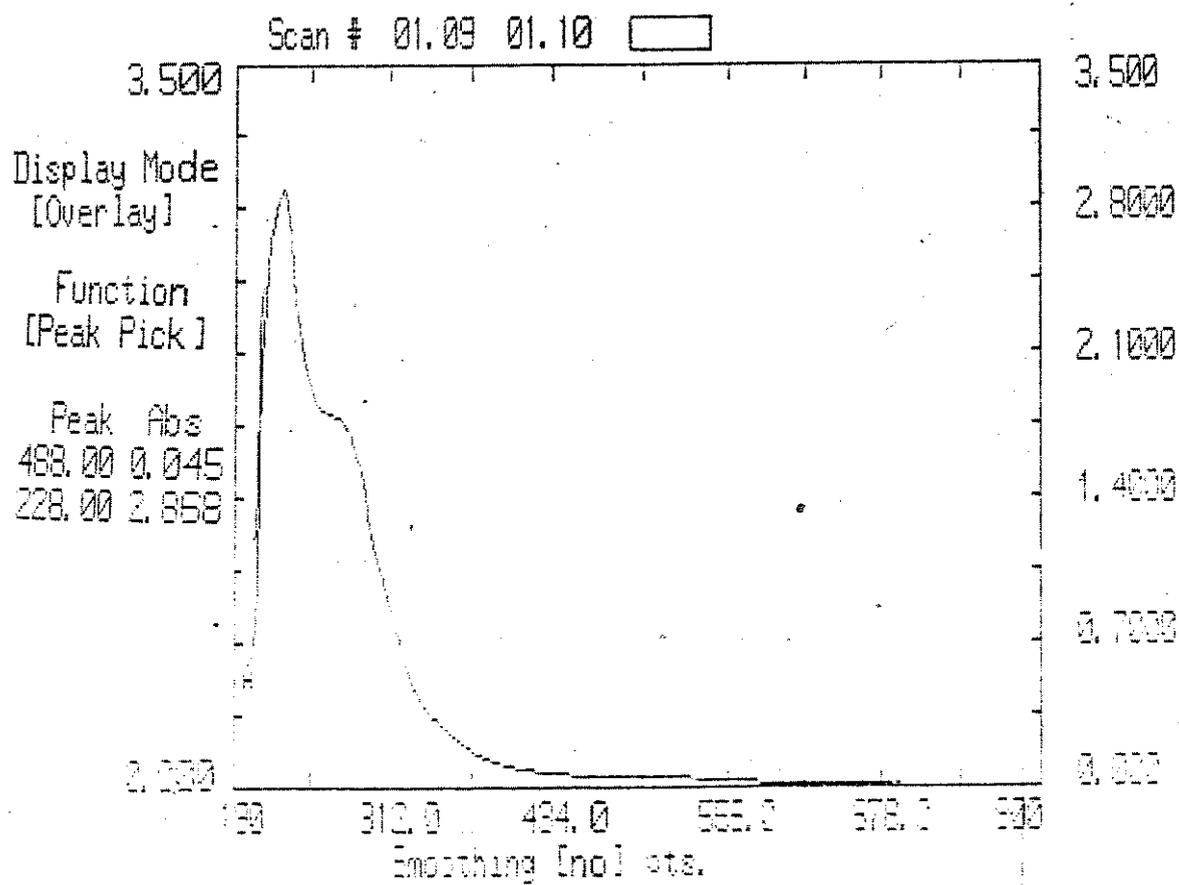


FIGURA A.2 - Espectro de ¹H-RMN da carboxamida-1 (CBX-1 em d₆-DMSO usando como padrão interno tetrametil silano (TMS).

O espectro foi determinado em espectrômetro Varian Gemini (300 MHz), tendo sido utilizado 1,5 mg de amostra.



A 488 SOURCE 12:28
 700.0 0.2755 Vis/UV 28/12/93

FIGURA A.3 - Espectro de absorvância UV/visível da carboxiamida-1 (CBX-1) em etanol absoluto.

O espectro foi feito no espectrofotômetro DU-70 Beckmman. A concentração da amostra não foi determinada.

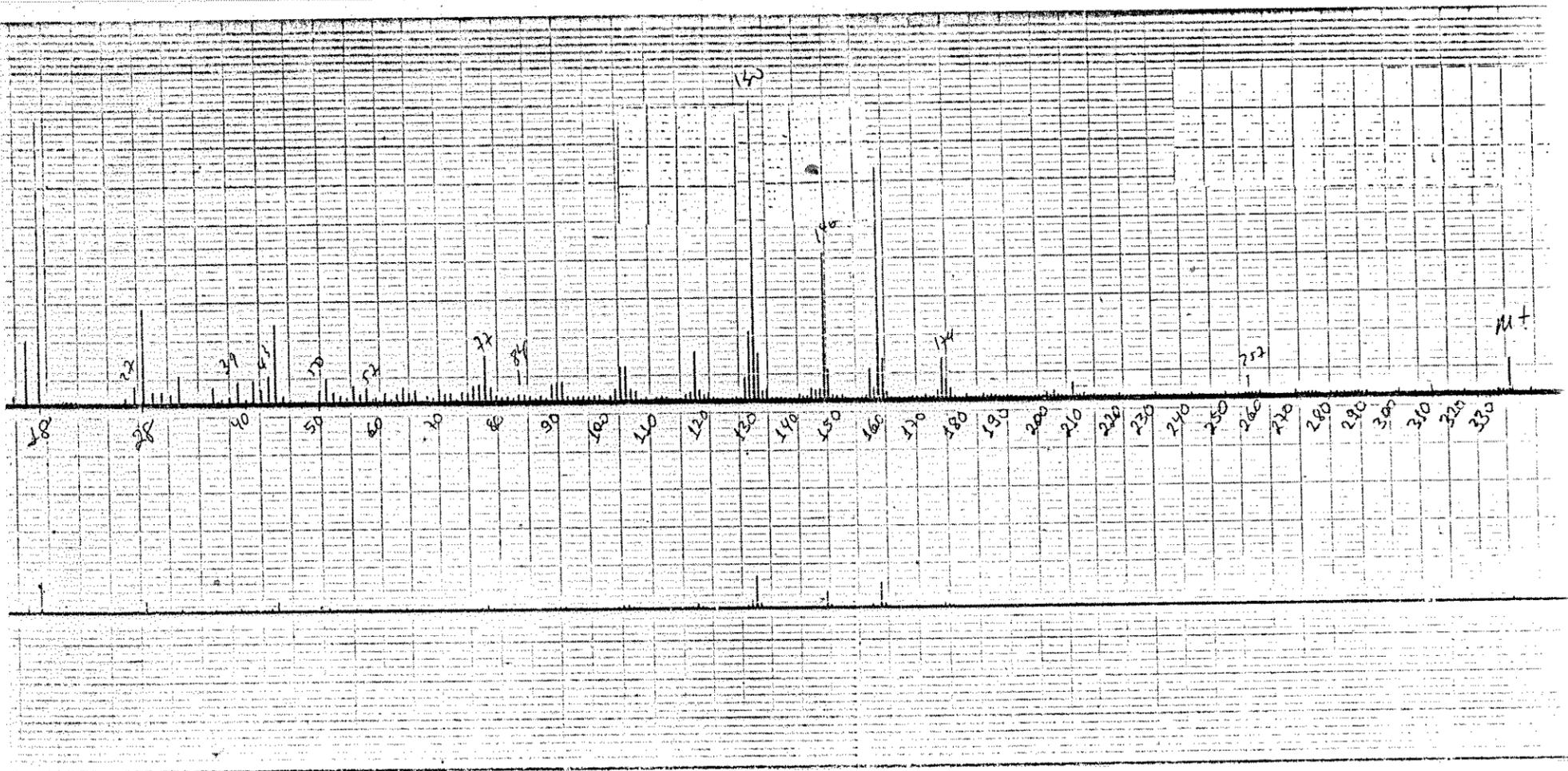


FIGURA A.4 - Espectroscopia de massa da carboxiamida-1 (CBX-1)

O espectro foi obtido em um espectômetro de massa Varian MAT 311A. Energia dos elétrons igual 70 eV, corrente iônica total de 0,3-1,0.

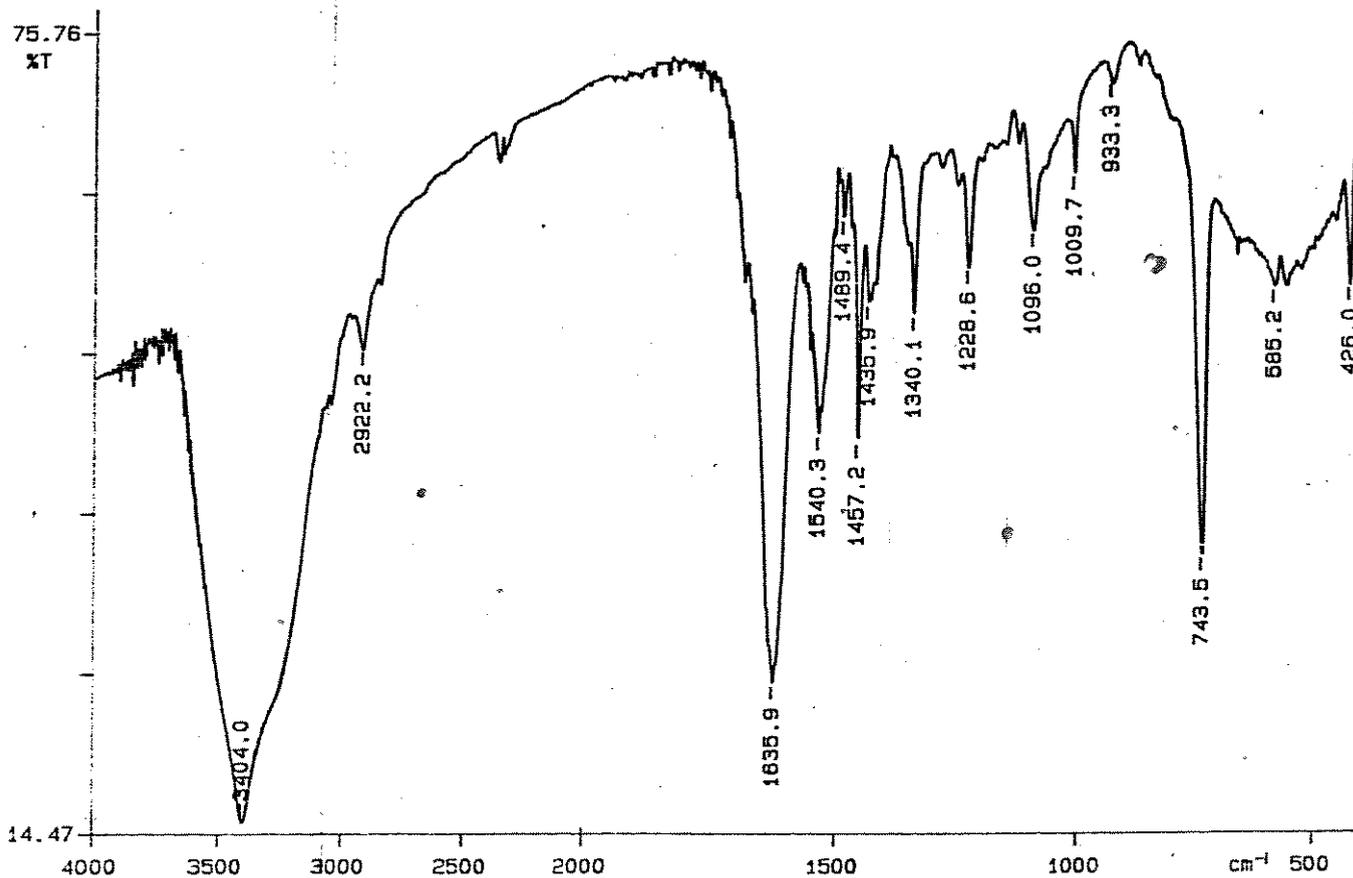


FIGURA A.5 - Espectro de infravermelho da carboxiamida-2 (CBX-2) em pastilha de KBr.

O espectro foi obtido em espectrofotômetro Perkin-Elmer (series 1600 FTIR).

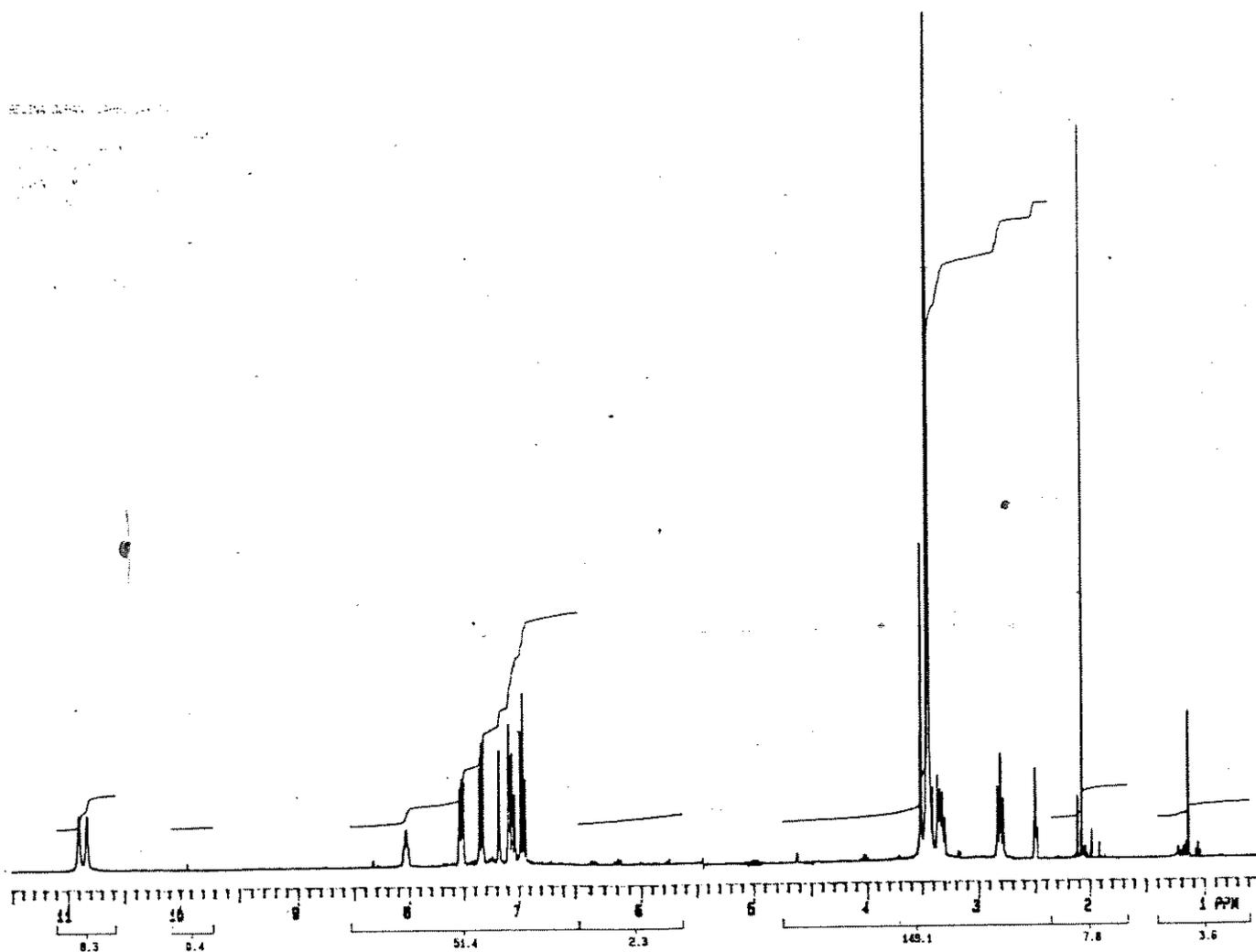


FIGURA A.6 - Espectro de ^1H -RMN da carboxiamida-2 (CBX-2) em d_6 -DMSO usando como padrão interno tetrametil silano (TMS).

O espectro foi determinado em espectrômetro Varian Gemini (300 MHz), tendo sido utilizado 1,5 mg de amostra.

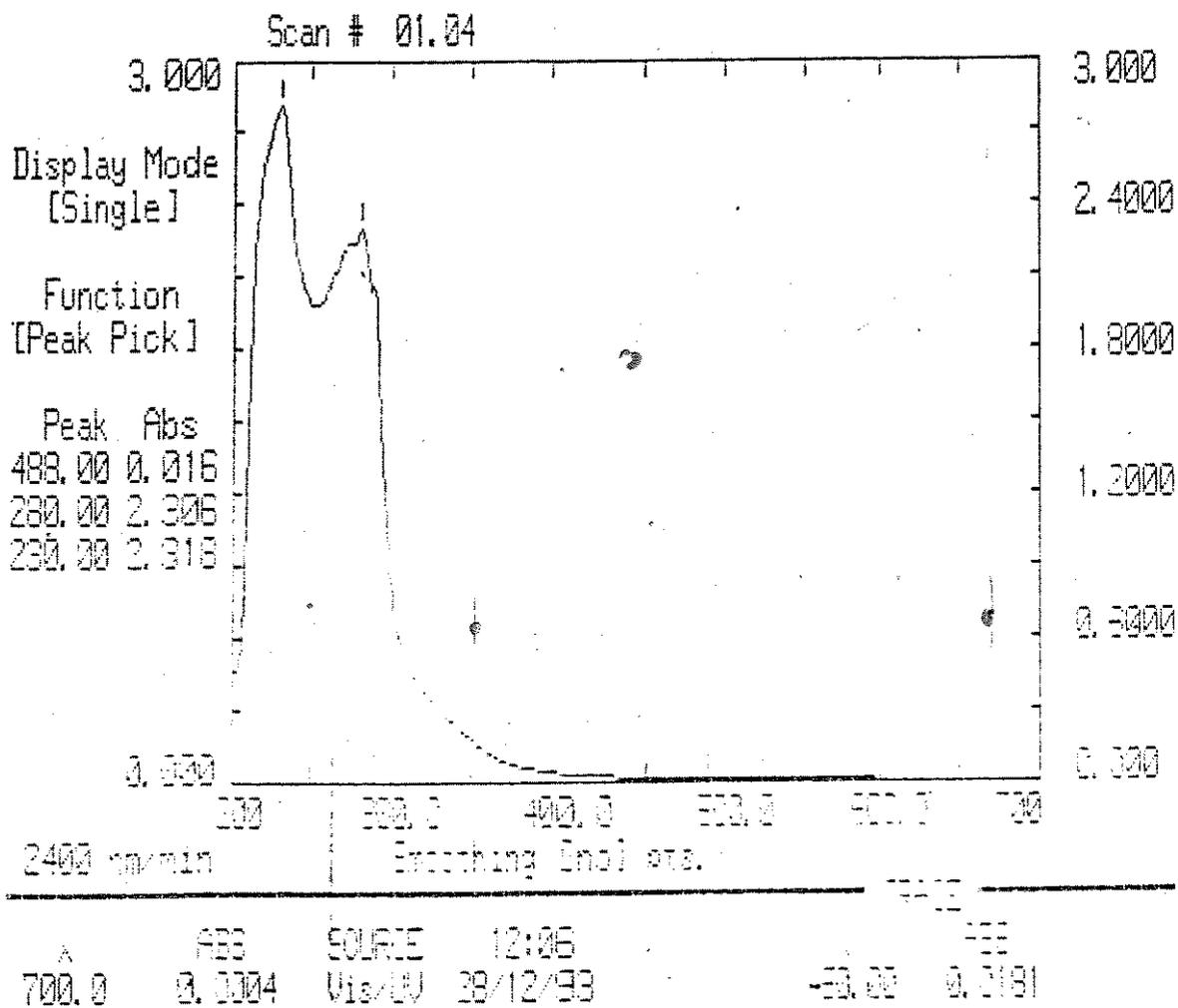


FIGURA A.7 - Espectro de absorvância UV/visível da carboxiamida-2 (CBX-2) em etanol absoluto, (A) na presença e (B) na ausência de NaOH (10 μ L, 1N)

O espectro foi feito no espectrofotômetro DU-70 da Beckmman. A concentração da amostra não foi determinada.

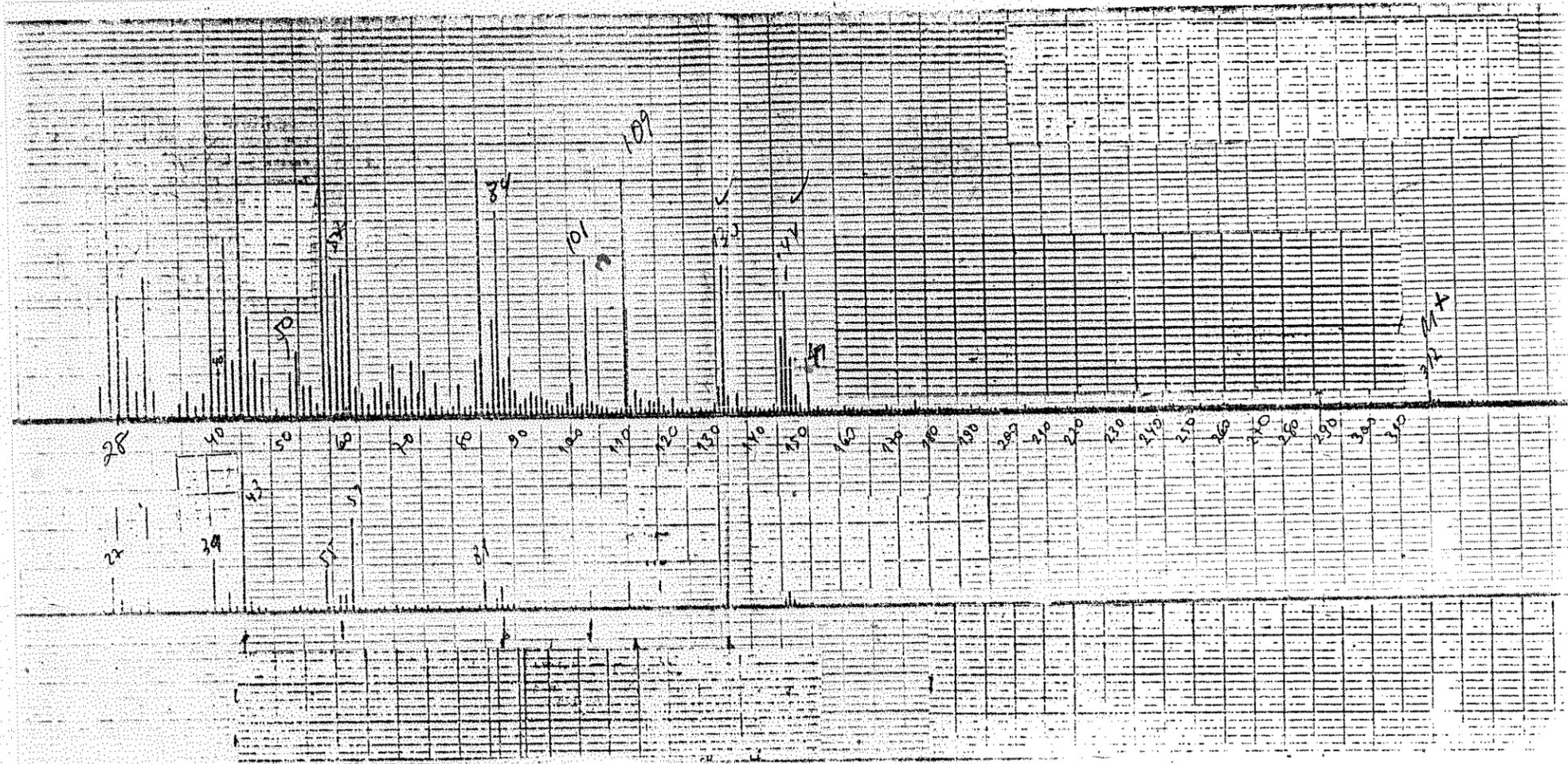


FIGURA A.8 - Espectroscopia de massa da carboxiamida-2 (CBX-2)

O espectro foi obtido em um espectômetro de massa Varian MAT 311A. Energia dos elétrons igual 70 eV, corrente iônica total de 0,3-1,0.

EXPI PULSE SEQUENCE: S2PUL
DATE 04-28-84
SOLVENT DMSO
FILE M

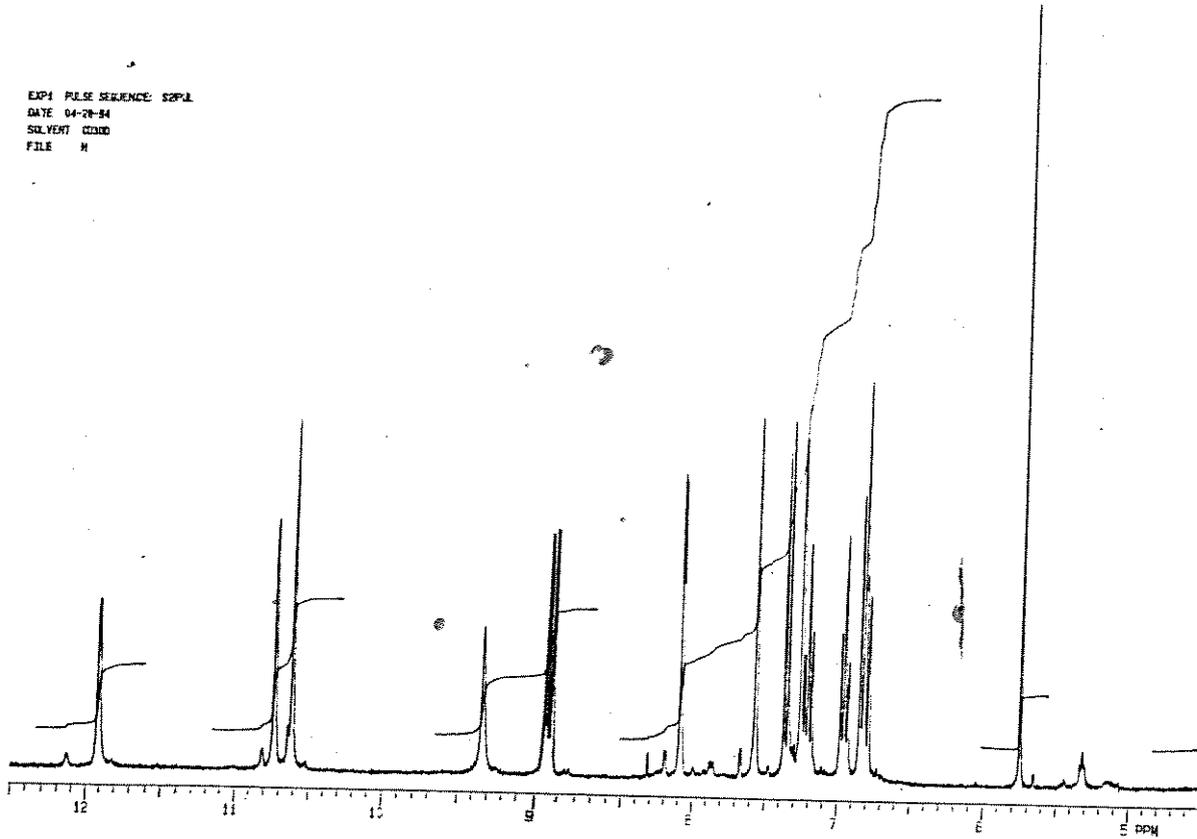


FIGURA A.9 - Espectro de ^1H -RMN da violaceína em d_6 -DMSO usando como padrão interno tetrametil silano (TMS).

O espectro foi determinado em espectrômetro Varian Gemini (300 MHz), tendo sido utilizado 1,5 mg de amostra.

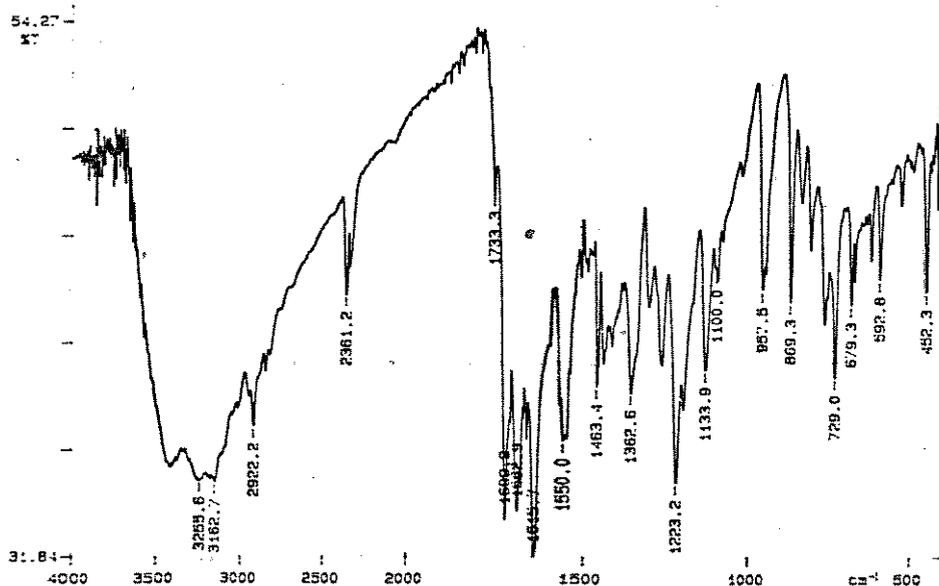


FIGURA A.10 - Espectro de infravermelho da violaceína em pastilha de KBr.

O espectro foi obtido em espectrofotômetro Perkin-Elmer (series 1600 FTIR).

APÉNDICE II

A II. Efeito da CBX-1 sobre *T. cruzi*

Os ensaios das atividades tripanocida das carboxiamidas 1 e 2 foram realizados no Departamento de Ultraestrutura e Biologia Celular da FIOCRUZ pela Dra. Solange de Castro e colaboradores. A metodologia utilizada é descrita a seguir.

A II.1. Obtenção das formas de *T. cruzi*

Foi utilizada a cepa Y de *T. cruzi*. As formas tripomastigotas foram obtidas a partir de camundongos infectados no pico de parasitemia. As formas amastigotas foram obtidas do sobrenadante de macrófagos J774G-8. e as formas epimastigotas recolhidas durante a fase exponencial de crescimento em meio LIT. Segundo a metodologia descrita por Camargo, 1964.

AII.2. Efeito direto da CBX-1 sobre *T. cruzi*

Os parasitas (5×10^6 células/ml) foram incubados a 4°C ou 29 °C em DME (Dulbecco's modified Eagle's medium) mais soro fetal bovino 10% ou em meio LIT na presença ou ausência da droga. A contagem de células foi realizada após 24 horas de exposição à droga em hematocitômetro. A concentração da droga que causa eliminação de 50% dos parasitas foi expressa como ID50.

A. TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS:

- 1- XVIIIª REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA BÁSICA EM DOENÇA DE CHAGAS. Caxambú - MG, 1991.
"Studies on Trypanocide Activity of Violacein"
Antônio, R.V., Haun, M., Pereira, M. F. e Durán, N.
- 2- XVIIIª REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA BÁSICA EM DOENÇA DE CHAGAS. Caxambú - MG, 1991.
"Synthesis and Cytotoxicity of 3-Dimthylaminoprop-1-eno Derivatives (DMP) Efficient Compounds Against *T. cruzi* in Mice"
Haun, M., Antônio, R.V., Pilli, R.A. and Duran, N.
- 3- XVIIIª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR. Caxambú - MG, 1992.
"An approach to violacein biosynthesis by *Chromobacterium violaceum*"
R.V. Antônio, M. Haun, R.A. Pilli and N. Durán
- 4- XIXª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR. Caxambú - MG, 1993.
"Biosynthesis of violacein by *Chromobacterium violaceum*"
R. V. Antônio, M. Haun, R.A. Pilli and N. Durán.

B. TRABALHO PUBLICADO

Durán, N.; Antônio, R.V; Haun, M. and Pilli, R.A ; 1994; New approach to violacein biosynthesis by *Chromobacterium violaceum* (BB-78 strain)" W. J. Microbiol. Biotechnol. accepted .