

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Este exemplar corresponde à
redução final da Tese defendida
por Sr. Raul Riveros e aprovada
pela comissão julgadora.

13/2/90

Nelson Duran

QUÍMICA DE BACTÉRIAS: BIOSÍNTESE E
ATIVIDADE BIOLÓGICA DE METABÓLITOS DA
Chromobacterium violaceum braziliensis.

RAUL ALBERTO RIVEROS GONZALEZ

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR: Prof. Dr. NELSON E. DURÁN CABALLERO

CAMPINAS

1989

AGRADECIMENTOS

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

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

-Ao Dr. V. Campos e Professor A. Joyas, da Facultad de Ciencias de la U. Católica de Valparaíso-Chile, e as Dras. M. Hoffmann e M. Haun do Instituto de Biología da UNICAMP, pelos ensaios biológicos.

-A Instituto de Química da UNICAMP pelo apoio material.

-Aos meus companheiros e funcionarios do Laboratorio.

-A FAPESP pela bolsa concedida.

-A CAPES, CNPq, FAPESP, PADCT e OEA pelo apoio financiero.

RESUMO

Foi estudada a bactéria *Chromobacterium violaceum* que produz o composto 3-[1,2-diidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno]-1,3-diidro-2H-indol-2-ona, composto 1.

Realizou-se um estudo da capacidade biossintética na produção de compostos com interesse biológico na cepa nativa (BB-78), a cepa incolor e a cepa aparentemente mutante obtida por irradiação da cepa nativa com luz UV.

Melhorou-se a produção biossintética do composto 1, induzindo o crescimento celular com uma carboxamida sintética e por metabólitos biossintetizados tanto pela cepa nativa, como pela cepa irradiada. Estes estudos e a incorporação de 3-indol acético ^{14}C -2 permitiu propor uma rota biogênica do composto 1.

Resultados preliminares de atividade biológica dos derivados do composto 1 (bromado, acetilados, sal de sódio e metilol), mostraram-se tripanomicidas sendo de maior atividade o derivado metilol.

No estudo de toxicidade e citotoxicidade destes mesmos derivados, um valor similar para nifurtimox e metilol (450 μM) foram encontrados para inibir 50 % da síntese de DNA (D_{50}).

Da cepa nativa foram isolados produtos do catabolismo de triptofano, pirrol-2-carboxílico e um composto identificado como 5-hidroxi-2-metil-3-carboetoxi benzofurano.

Da cepa irradiada foram isolados p-aminofenol, ácido

antranílico e isatina .

Todos os compostos isolados foram purificados por cromatografia de camada preparativa e identificados por UV, IV, RMN¹H e EM.

ABSTRACT

The bacterium *Chromobacterium violaceum* which yields 3-[1,2-dihydro-5-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)-2-oxo-3-ylidene]-1,3-dihydro-2H-indol-2-one (compound 1) was studied.

A study of the biosynthetic capacity in the production of components with biological interest between native strain (BB-78), uncoloured strain and apparently mutant strain obtained by irradiation of the native strain with light UV was realized.

The biosynthetic production of compound 1 was increased by inducing cellular growth with synthetic carboxamides and bio-synthesized metabolites both in the native strain, as well as the irradiated strain. These studies as with the incorporation of IAA ^{14}C -2 the biogenesis of the compound 1 is proposed.

Preliminary results of the biological activity of the bromo, acetyl, sodium salts and methylol derivatives of compound 1 have shown that they are antitrypanosomal, with the latter having the largest activity.

In the toxicity and cytotoxicity studies of these derivatives a similar value of nifurtimox and methylol (at 450 μM) which to inhibits 50% of the synthese the DNA (D_{50}) has been found.

From the native strain catabolic products of the tryptophane pyrrol-2-carboxylic acid and a compound identified as

5-hydroxy-2-methyl-3-carboethoxy benzofurane were obtained.

From irradiated strain p-aminophenol, antranilic acid and isatine were isolated.

All isolated compounds were purified by PLC and identified by UV, IR and NMR¹H spectroscopies and Mass spectrometry.

INDICE

I.	Introdução	01
I.A.	Aspectos Gerais	01
I.B.	Dados Previos	07
I.C.	Objetivos	14
II.	Experimental	16
II.A.	Materiais e Métodos	16
II.B.	Tratamentos das Amostras	19
II.B.1.	Extração do Meio Sólido	19
II.B.3.	Extração do Meio Líquido.	20
II.C.	Tratamento fotoquímico	22
II.D.	Cultivos em Biorreator	24
II.D.1.	Extração Meio Ácido	24
II.D.2.	Tratamento Básico do Meio de Cultivo	26
II.D.3.	Fracionamento das Frações 1-6	27
II.E.	Estudos Exploratorios da Biossíntese	27
II.E.1.	Efeito da Concentração de Isatina Sobre o Crescimento Celular.	27
II.E.2	Efeito da Isatina Sobre a Biossíntese do Composto <u>1</u>	30
II.E.3.	Catabolismo de L-triptofano.	30
II.E.4.	Incorporação de IAA 2- ¹⁴ C	32
II.E.5.	Preparação do Composto <u>34</u> .	33
II.E.6.	Efeito da Carboxamida Sobre a Biossíntese do comp. <u>34</u>	34
II.E.7.	Efeito Comparativo dos Precursores	35

II.E.8. Biossíntese do Composto <u>1</u> em Diferentes Nutrientes	36
II.F. Ensaios Biológicos	36
II.F.1. Obtenção dos Derivados	37
II.F.2. Atividade Biológica	38
III. Resultados e Discussão	41
III.A. Síntese de Derivados do composto <u>1</u>	41
III.B. Atividade Biológica	44
III.C. Estudo de Metabólitos	48
III.D. Biossíntese do composto <u>1</u>	77
IV. Referências	99

INTRODUÇÃO

I. A-ASPECTOS GERAIS.

Os microorganismos são capazes de efetuar uma grande diversidade de reações bioquímicas que se manifestam pela produção ou transformação de substâncias orgânicas. Para desenvolver ou para produzir metabólitos, os microorganismos necessitam de energia. Na maioria dos microorganismos estudados, esta energia é obtida no decorrer do catabolismo de substâncias orgânicas. Em certos casos, a degradação dessas substâncias é completa e toda a energia serve para assegurar o crescimento, em outros a degradação é incompleta e, além da energia necessária para o crescimento, haverá formação de metabólitos, que são às vezes chamados metabólitos primários. O termo metabólito secundário é, em contra partida, utilizado para definir substâncias cujo aparecimento ou acúmulo é devido a um desenvolvimento limitado ou perturbado, às vezes artificialmente, ou por substâncias muito específicas [1].

Poucas preparações biocatalíticas de uma etapa são amplamente usadas na indústria para a geração de produtos químicos, e estas cobrem determinados tipos de reações tabela 1 [2]

Reações biocatalíticas de etapas múltiplas têm sido utilizadas por muitos anos pela indústria de fermentações [3]. Caminhos metabólicos parciais ou totais são utilizados para a síntese de um produto químico em particular, a partir de nutrientes baratos e abundantes tais como amido e melaço [4].

Tab.1-Reações de uma Etapa de Importância Comercial.

Tipo de Reação	Reação catalisada	Catalisador.	Uso
Isomerização	D-glicose =>D-frutose	Glicose isomerase.	Produção de xarope rico em frutose
Hidrólise	Amido =>glicose+ maltose.	α -amilase.	Produção de xarope rico em espessantes
Hidrólise	Lactose =>glicose +galactose.	Lactase.	Purificação do soro da leite
Hidrólise	Lípideo =>ácido graxo+ +glicerol.	Lipase.	Melhoramento da qualidade dos alimentos
Hidrólise	Clivagem cadeia lateral	Penicilinacilase.	Produção de penicilina semi-sintética
Condensação	Fumarato+amônia =>aspartato	Aspartase.	Produção de aminoácidos
Hidroxilação	Tirosina+ O ₂ =>L-DOPA+oxig.	Tirosinase.	Produção de antiipertensivos
Oxigenação	Hidroxilação Estereoespecífica de Esteróides	Sistema enzimático. indefinido.	Transformação de esteróides
Peroxidação	Caroteno+ác.linolêico+oxig. =>ác.perlinolêico.	Lipoxigenase.	Peroxidação de oleos usados em aromas
Óxido/redução	Oxidações e reduções estereo e regioespecíficas	Sistema enzimático. indefinido.	Transformação de esteróides

Dois tipos de vias metabólicas são envolvidas na produção química :

- Caminhos anabólicos, que são usados para converter um simples substrato, tal como glicose, em produtos químicos muito mais complexos como antibióticos, vitaminas, terpenos e biopolímeros.
- Caminhos catabólicos que, quebram o nutriente em compostos químicos muito mais simples, tais como etanol, acetona e butanol.

A produção química desejada resulta, finalmente, de uma associação entre o crescimento do microorganismo e um substrato em particular, tabela 2, [5-7].

Tab.2- Reações de Múltiplas Etapas de Importância Comercial.

Categoria	Exemplo
Anabólico	Antibióticos
	Carotenóides
	Vitaminas
	Biopolímeros
Catabólico	Solventes de fermentação
	: Etanol
	: Acetona/Butanol
	: Butanodiol/Glicerol
	Ácidos orgânicos
	: Cítrico
	: Acético
	: Glucônico

Usualmente uma reação sob catálise biológica ocorre em condições extremamente brandas em comparação às condições requeridas para uma conversão química equivalente. A reação catalisada pode ser: rápida, eficiente, estereo e regio-específica, e produzir com alto rendimento um produto desejado [8].

O aproveitamento da técnica de fermentação tem dado origem a novos processos de obtenção de agentes quimioterápicos, como antibióticos e outros fármacos. Por exemplo, uma particular enzima pode converter a clássica penicilina em um intermediário para a fabricação da penicilina semi-sintética mais amplamente consumida fig.1. Isto é possível, devido à imobilização da enzima que

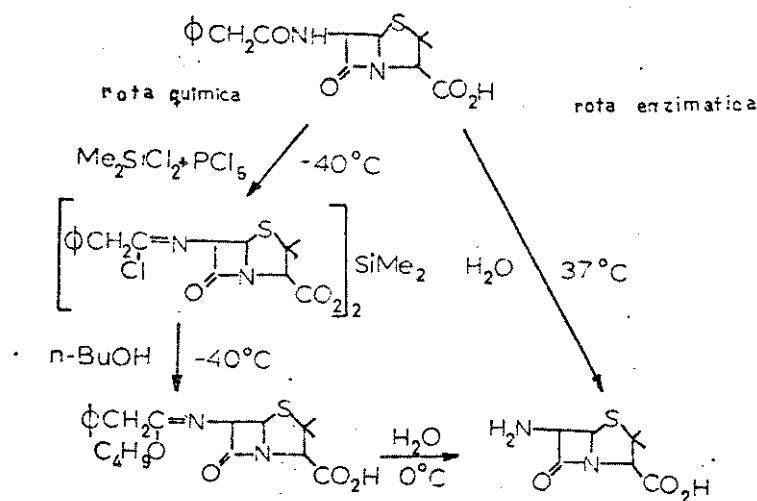


Fig.1- A enzima imobilizada catalisa a rota desde benzil penicilina até o intermediário semi-sintético (direita), na esquerda sua conversão química equivalente.

cataliza diretamente a conversão de benzil penicilina ao intermediário, em "preferência ao antigo e mais complexo procedimento químico" [9].

Os antibióticos são substâncias de origem microbiana, sendo capazes de inibir o crescimento de outros microorganismos e atuam sempre em baixa concentração. Segundo definição proposta por Waksman em 1942 [10], podem ser descritos como agentes antitumorais, fungicidas, antivirais e bactericidas, sendo que sua atividade deve ter sido demonstrada.

Como consequência da natureza polifuncional dos antibióticos, estudos de vários mecanismos químicos (substituição eletrofílica, formação de complexos, reações radicalares, etc.) são importantes na manifestação dos efeitos biológicos [11].

Um antibiótico pode ser obtido da seguinte forma:

- Como um produto natural (sintetizado por um microorganismo).
- Semi-sintético (a partir de um intermediário natural).
- Planejado teoricamente (considerando o consumo redox nos processos de biotransformação) [12, 13].
- Enzimaticamente *in vitro* (enzima imobilizada).

Apesar de os antibióticos serem os produtos mais pesquisados, outros compostos também são obtidos por fermentação microbiana [14, 15].

Até 1980 foram descobertos mais de 4200 antibióticos e cobrem a mais variada faixa estrutural, que compreende desde moléculas

muito simples até compostos de extrema complexidade.

A relação entre a estrutura e as propriedades biológicas de uma substância torna possível o desenvolvimento de princípios fundamentais para a criação de um novo antibiótico. Uma importante etapa no desenvolvimento deste princípio é classificar estes antibióticos em termos do tipo de atividade biológica que apresentam. O estudo químico, neste campo tem sido dirigido para a síntese de derivados de antibióticos, geralmente conhecidos por suas modificações químicas, e para a síntese de estruturas análogas [16-18].

Recentes observações indicam que a descoberta de novos produtos de origem microbiana levou a um notável incremento na aplicação da quimioterapia, em doenças malignas (tabela 3).

Tab.3-Novos Produtos Microbiais Reportados em J. Antibiotics.

	1981-1985				
Atividade biológica	1981	1982	1983	1984	1985
Antimicrobial	34	41	54	43	41
Antitumoral	20	15	13	8	22
Farmacológico	5	3	9	18	17
Imuno regulador	0	1	0	0	0
Agroquímico	1	0	1	2	0

O problema da quimioterapia tem se agravado com o aparecimento de microorganismos resistentes aos quimioterápicos,

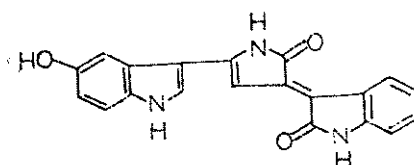
fenômeno que vem sendo intensamente estudado. A estratégia da quimioterapia consiste em explorar as diferenças morfológicas e bioquímicas porventura existentes entre o parasito e o hospedeiro [19]. Um bom exemplo deste fato pode ser observado no estudo metabólico de vários tripanossomatídeos, em que se tenta bloquear com inibidores seletivos, o metabolismo da glicose para a não produção de succinato, e o metabolismo do L-glutamato [20-22].

A gran incidência de novos antibióticos isolados de actinomicetos, fungos ou bactérias não indica que um grupo particular destes microorganismos tenha alta possibilidade de produzir só um tipo de composto [23, 24]. Uma bactéria que existe em grandes quantidades no Rio Negro (Brasil), tem sido indicada como excelente produtora de monobactamas [25], mas também produz compostos que apresentam um núcleo indólico em seu esqueleto. Esta bactéria é a *Chromobacterium violaceum* e tem merecido atenção devido à ausência de doenças endêmicas nesta região [26]. Esta bactéria além de biossintetizar outros compostos [27-29], produz majoritariamente um pigmento azul escuro, 3-[1,2-diidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilidene]-1,3-diidro-2H-indol-2-ona, conhecido há muito tempo como violaceína, 1, de particular interesse neste trabalho.

I.B-DADOS PRÉVIOS

As primeiras observações da formação de violaceína, 1, por bactérias (*Chromobacterium violaceum* e *Alteromonas luteoviolaceas*)

foram dadas há mais de cem anos [30, 31]. Até em torno de 1960, pesquisas ocasionais na produção e química deste pigmento



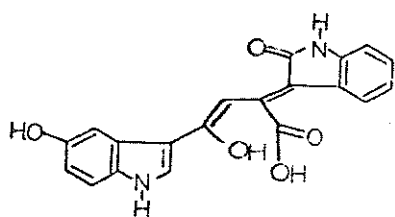
1

foram feitas, mas sem revelar muita informação da sua natureza. Foram Ballantine e col. em 1957, que deram um significativo aporte quando elucidaram sua estrutura, confirmando-a por síntese química. Seus resultados indicaram que a estrutura consiste nas unidades 5-hidroxiindol, α -pirrolidona e uma unidade oxiindol, provavelmente derivada de triptofano [32-34]. As propriedades espectroscópicas foram completadas só nesta década e os deslocamentos químicos de RMN¹H foram feitos por comparação de compostos modelos [35]. Por experimentos com compostos marcados, utilizando-se ¹³C e ¹⁴C foi possível obter os deslocamentos dos espectros de RMN¹³C [36, 37]. Por apresentar baixa toxicidade e propriedades espectroscópicas e fotodinâmicas parecidas com as de outros fototerápicos conhecidos [39], sugeriu-se seu uso como droga fotoquimioterápica [38].

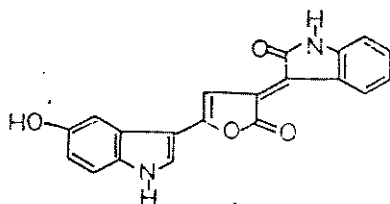
A baixa concentração de microorganismos encontrada nas águas do Rio Negro e a ausência de doenças endêmicas entre a população que consome sua água foi explicada pela presença deste pigmento e seus fotoderivados, 2, 3, devido a apresentarem atividade contra

microorganismos gram positivos e gram negativos [26, 40-43].

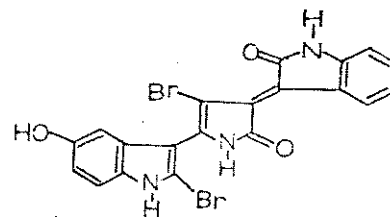
Em um estudo preliminar, a violaceína e seu derivado bromado, 4, frente a *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuen), em meio Phillips, mostraram-se razoavelmente ativos [44, 45].



2



3



4

As cepas de *Chromobacterium violaceum* podem ser encontradas no solo e na água de ambientes tropicais [46, 47] e algumas espécies têm sido associadas a animais, plantas [48, 49] e parasitas virulentos [50], por provocarem infecções podendo levar até à morte. Relativamente pouco se sabe sobre sua função ecológica no ecossistema natural, e não existe até agora um conhecimento intenso da fisiologia desta bactéria, particularmente do seu metabolismo do nitrogênio e potencial desnitrificante [51].

Estudos sobre cianogênese [52, 53] têm revelado que a glicina é o precursor do cianeto, quando este é produzido como um metabólito secundário. A solubilização de ouro por *Chromobacterium violaceum* tem sido estabelecida e está relacionada à produção extracelular de cianeto durante o crescimento da bactéria. O ouro é solubilizado como o complexo iônico $[\text{Au}(\text{CN})_2]^-$ [54-56].

A produção de 1 foi otimizada correlacionando-se variações de nutrientes, temperatura e pH do meio com o crescimento celular. Os

cultivos feitos a 28 °C, durante 24 horas de incubação a pH 7, em meio líquido, na ausência de luz, apresentaram os melhores rendimentos na produção do composto 1 [44].

Este estudo nutricional indicou que o crescimento celular é proporcional à biossíntese do composto 1 até 16 a 20 horas de cultivo [44]. Também foi observado que a atividade da bactéria na síntese de 1 é dependente da presença de L-triptofano [57]. A velocidade de crescimento e a atividade celular na produção de 1 é evidente após 4 horas de incubação na presença de metionina e vitamina B₁₂ contra 16 horas na ausência deste dois nutrientes [44].

O caminho biossintético para a obtenção de 1 ainda não foi elucidado. A primeira proposta surgiu em 1960, onde superficialmente mostrou-se a presença de indol como intermediário, segundo indicado na figura 2 [57-59].

Como parte deste estudo, compreende aportar informação original referente ao caminho metabólico que utiliza *Chromobacterium violaceum* na biossíntese do composto 1, serão introduzidos alguns conceitos de compostos indólicos. Os compostos indólicos são produtos naturais amplamente distribuídos nas plantas, quase todos produzem efeitos fisiológicos marcantes [60] e apresentam uma diversidade estrutural muito grande. São produtos de biossíntese da infinidade de organismos que os contêm [61, 62]. Apesar da diversidade, a grande maioria dos compostos indólicos é derivada do triptofano/triptamina, apresentando uma

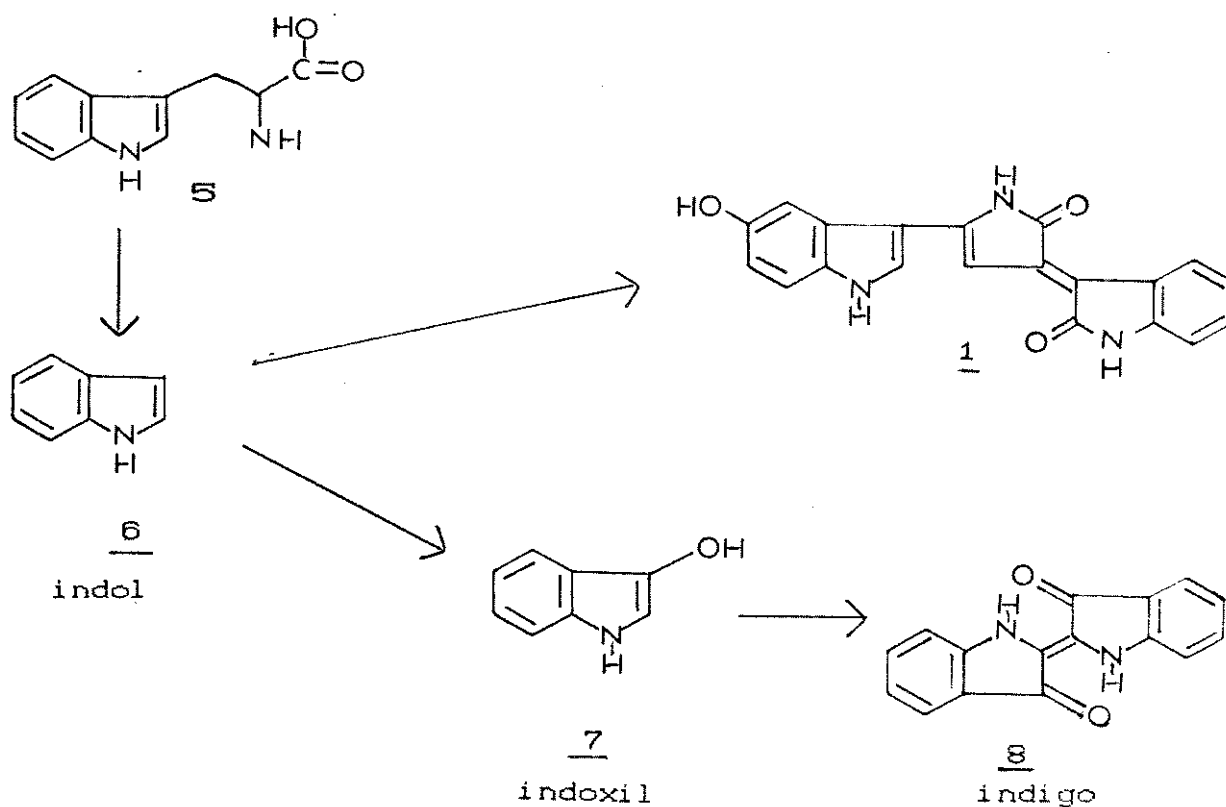


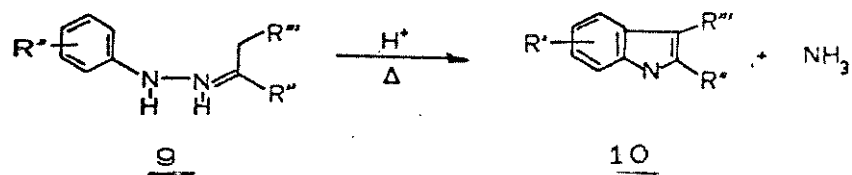
Fig.2- Metabolismo proposto para L-triptofano (5) e indol (6) em *Chromobacterium violaceum*

unidade de 9 a 10 carbonos de origem monoterpênica, que geram a complexidade do esqueleto carbônico total [61]. As origens biossintéticas dessas duas unidades (triptamínica e terpênica) da molécula indólica têm sido desvendadas através de ensaios que utilizam a técnica de incorporação de compostos marcados isotopicamente pelas espécies em crescimento [64].

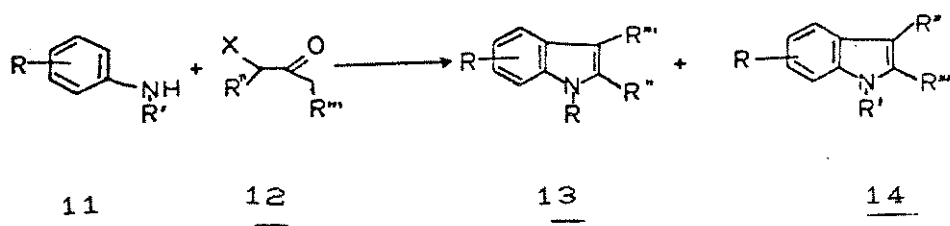
Na biossíntese de um composto indólico, a porção triptamínica tem origem no triptofano [65, 66] e/ou triptamina [67, 68], que são originados a partir dos ácidos xiquímico e antranílico [69].

Vários métodos para a síntese química de indóis foram desenvolvidos e estão descritos na literatura [70]. Alguns métodos clássicos mais comuns são mostrados a seguir:

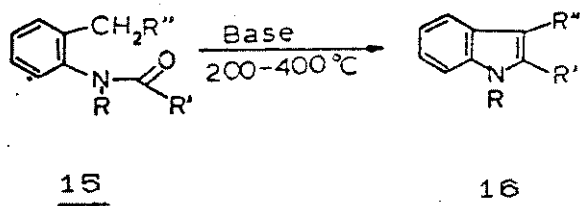
-Síntese de Fisher. É um dos métodos mais utilizados devido a sua versatilidade. Baseia-se no aquecimento de aril-hidrazonas (9) em meio ácido [71, 72].



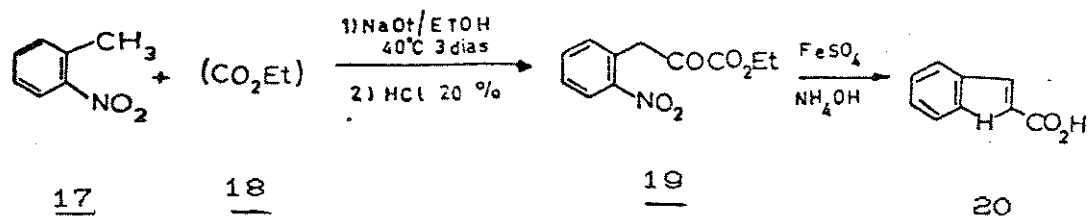
-Síntese de Bischler. Baseia-se na reação de aril-aminas (11) com cetonas α -halogenadas (12), α -hidroxiladas ou α -aneladas [73, 74].



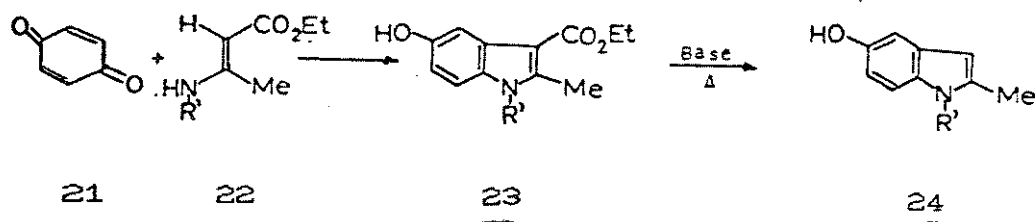
-Síntese de Madelung. Baseia-se na ciclização intramolecular de n-acil-orto-alquilaminas (15) na presença de uma base forte e temperatura elevada [75, 76].



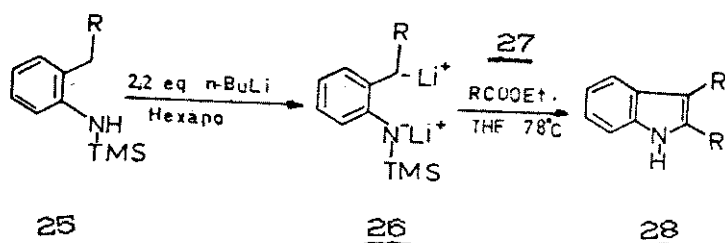
-Síntese de Reissert. Baseia-se na ciclização do produto de redução do ácido o-nitrofenil pirúvico (19) [77, 78].



-Síntese de Nenitzescu. Baseia-se na condensação de p-benzoquinona (21) com α -amino crotonato de etila (22) [79-81].



-Síntese de Corriu. Baseia-se na condensação de um ester de ácido carboxílico (27) com reagente organodilítio, derivados de N-trimetilsilil-o-toluidina (25, 26) ou N-trimetilsilil-o-etil anilina [82-84].



Vários outros processos sintéticos que conduzem ao núcleo indólico ou derivados são conhecidos, como a oxidação da β -hidroxifeniletilamina [85], a redução do 2, β -dinitroestireno [86], do ciano o-nitrobenzil [87] e de compostos o-nitrobenzil

carbonílicos [88] e outros.

I.C-OBJETIVOS.

Recentes artigos sobre a quimioterapia da doença de Chagas e algumas infecções cutâneas têm dado ênfase à deficiência de agentes quimioterápicos correntemente úteis e à necessidade de alguns outros novos [90].

A doença de Chagas está amplamente distribuída em áreas rurais em muitos países de América do Sul e América Central [91]. Não existe uma droga ativa que seja específica contra *Trypanosoma cruzi*. A OMS menciona um único composto [90], um derivado de nitrofurilidona, Nifurtimox (Lampit). Esta droga é efetiva só na etapa aguda da doença, ocorrendo riscos de alta toxicidade pelo prolongado tempo de tratamento [92, 93].

As novas drogas propostas no tratamento da doença são os derivados da guanina e guanosina, que reagem com o DNA do protozoário [94-96].

Considerando o potencial que representaria o composto 1 e seus derivados na cura desta doença endêmica, os objetivos foram direcionados da seguinte forma:

Propõe-se o estudo da capacidade biossintética da cepa brasileira de *Chromobacterium violaceum* na produção de compostos químicos de interesse biológico, testando-se os produtos biossintetizados pelas células incolores e pela cepa aparentemente mutante obtida pela irradiação com luz UV.

Melhorar a produção biológica do composto 1 em cepas de

Chromobacterium violaceum através de estudos de precursores desta biomolécula.

Estudar as propriedades tripanocidas *in vitro* frente a *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuen) em meio LIT em concentrações diferentes dos derivados.

II

EXPERIMENTAL

II.A-Materiais e Métodos.

Neste trabalho foi estudada a bactéria *Chromobacterium violaceum*, obtida originalmente do Rio Negro como se indica na referência [44].

As bactérias de estoque foram mantidas em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, com um meio de cultivo sólido de tioglicolato a 3 % (DIFCO)-1,2 % de agar (DIFCO) a pH 7,2 esterilizadas previamente a 121 °C por 15 minutos em uma autoclave vertical modelo 103, FABBE, e incubadas a 27°C, protegidas da luz em uma estufa de cultivo modelo 116, FABBE, e plaqueadas cada 36 horas.

As células cultivadas, de interesse neste estudo, foram separadas dos nutrientes (por filtração sobre algodão e enxaguadas com água destilada), e extraídas com solventes de polaridade crescente (clorofórmio, acetona, metanol).

Foram utilizados reagentes e solventes procedentes da Aldrich, Carlo Erba e Merck, sendo para análises (p.a.). Outros reagentes foram tratados conforme descrito na literatura [97].

A análise dos extratos foi feita por cromatografia de camada delgada (c.c.d.) utilizando cromatofolhas de alumínio cobertas com sílica gel GF₂₅₄ (Merck) do tipo G 60

Os sistemas cromatográficos utilizados foram:

a: sílica gel, benzeno/acetona (4:1).

- b: sílica gel, benzeno /acetona (2:1).
- c: sílica gel, clorofórmio.
- d: sílica gel, isopropanol/acet. de etila/amônia aq.(25 %) (35:45:20).
- e: sílica gel, isopropanol/acetato de etila/água/dietilamina (35:45:20:20).
- f: sílica gel, clorofórmio/metanol (90:10).
- g: sílica gel, isopropanol/amônia aq.(25 %)/água (13:1:1).
- h: sílica gel, benzeno/acetona (3:1).
- i: sílica gel, benzeno.
- j: sílica gel, isopropanol/amônia aq.(7:3).
- k: sílica gel, clorofórmio/etanol (98:2).
- l: sílica gel, benzeno/metanol (15:85).

Os cromatogramas secos ao ar foram observados na luz UV em λ_{254} ou a λ_{366} nm e revelados com vapores de iodo. Alternativamente, após se observar as placas na luz UV, elas foram borrifadas com agente cromogênico, como o reagente de Ehrlich ou uma solução etanólica de ácido sulfúrico a 10 %, e posteriormente aquecidas a 110 °C por 5 minutos [98, 99].

Os constituintes dos extratos foram isolados utilizando cromatografia de camada preparativa (c.c.p.), de sílica gel PF₂₅₄ (Merck) de 2 mm de espessura, preparadas com 15 g de sílica gel e 30 ml de água por cada placa de vidro de 20x20 cm.

A cromatografia de coluna foi feita em colunas de vidro com diâmetros variáveis, e utilizando-se sílica gel do tipo H 60 (70-230 mesh, Merck), como adsorvente. Os eluentes empregados foram determinados previamente por c.c.d.. O controle das frações coletadas durante a eluição foi feito por c.c.d..

Na cromatografia de troca aniônica utilizou-se resina BIO-RAD A G1-X8 (50-100 mesh) da forma OH^- , tipo estireno-amônia quaternária e na troca catiônica, BAKER DOWEX 50W-X8 (50-100 mesh), da forma H^+ , tipo estireno-ácido sulfônico.

Os pontos de fusão foram obtidos em um aparelho Mettler FP 52 e não foram corrigidos.

Os espectros de ultravioleta (UV) foram registrados em um espectrofotômetro DMS 100 Intralab, usando-se metanol ou etanol como solvente.

Os espectros de infravermelho (IV) foram registrados em um Perkin Elmer 399 com pastilha de KBr e as absorções são informadas em número de onda, ν (cm^{-1}) [100].

Os espectros de ressonância magnética nuclear protônica (RMN^1H), foram obtidos em um espectrômetro Varian T 60 de 60 MHz, usando-se solventes deuturados e tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os deslocamentos químicos são informados em δ [101].

O espectro de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN^{13}C) foram obtidos em um espectrômetro XL-100 de 25,2 MHz.

Os espectros de massa foram obtidos em um espectrômetro de

massa Varian modelo 311 a 70 eV.

II.B-Tratamento das Amostras.

Para o crescimento bacteriano foi utilizada a metodologia desenvolvida na referência 44. A amostra padrão é composta por uma suspensão que contém 0.8 g/ml de água de células úmidas de *Chromobacterium violaceum* de 12 horas de crescimento. O método consiste em inocular com 200 µL de suspensão padrão de bactéria em água esterilizada sobre o meio nutricional sólido, e de 500 µL de suspensão de bactéria sobre o meio nutricional líquido, previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos.

II.B.1-Extração da cultura feita no Meio Sólido.

200 µL de inóculo de *Chromobacterium violaceum* são ressemeados por cada garrafa de Roux, com meio sólido de nutriente que contém 3 % de meio tioglicolato (Merck), e 1,2 % de agar (Bio-Bras) em pH final 7,1 previamente esterilizado.

Após incubar por 36 horas 12 garrafas de Roux (um total de 1 L de meio) extraiu-se exaustivamente com acetona este meio de cultura e as bactérias. A solução obtida foi filtrada sobre uma camada de algodão e concentrada sob vácuo (protegida da luz), até ficar uma suspensão azul escura, que foi filtrada após 24 horas de resfriamento. O sólido escuro obtido foi denominado extrato acetônico (123 mg).

II.B.2-Fracionamento do Extrato Acetônico.

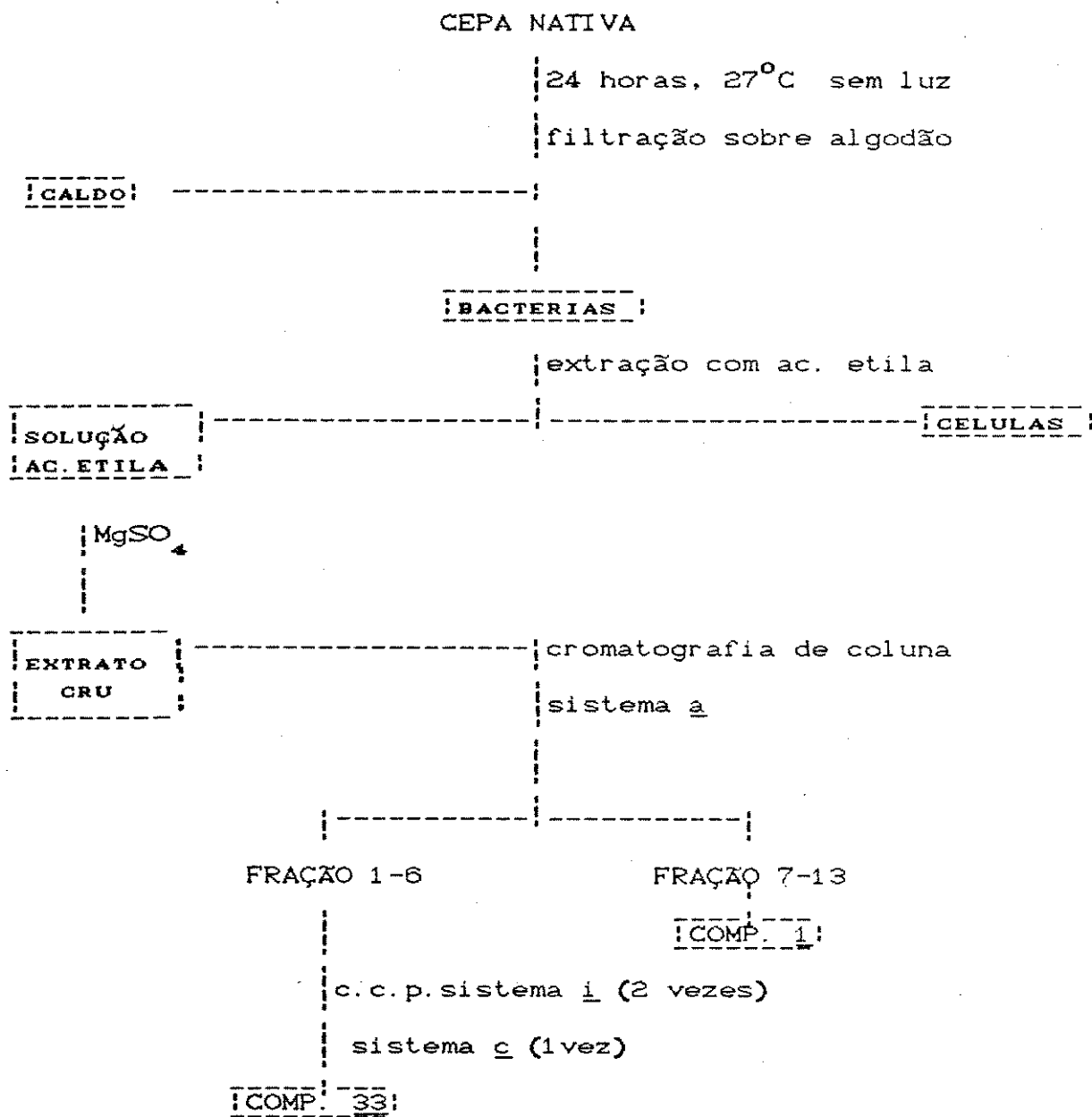
Este extrato foi redissolvido em quantidade mínima de acetona. Esta solução concentrada de extrato foi impregnada em adsorvente cromatográfico e após eliminado o solvente foi colocada na parte superior de uma coluna (2x40 cm), já preparada com sílica gel 130-270 mesh, 60 A^o (atividade I). Eluiu-se continuamente utilizando-se o sistema a (benzeno/acetona 4:1), recolhendo-se frações de 10 ml. Das frações 5-8 obteve-se 63 mg de composto 1.

II.B.3-Extração da cultura feita no Meio Líquido.

1 L de meio líquido contendo 3 % de tioglicolato (Merck) e 0,2 % de agar (Bio-Bras) foi repartido em 4 erlenmeyers (previamente esterilizados) e inoculados com 500 µL de suspensão padrão de cultura de *Chromobacterium violaceum* e incubado a 150 rpm a 30 °C por 15 horas em um Incubator Shaker Series 25, New Brunswick Scientific Co., Inc..

As células foram separadas do meio de cultura por filtração em algodão e lavadas sucessivamente com água, até eliminação total do meio tioglicolato (vide Esquema I).

As bactérias livres de nutrientes, foram extraídas por lavagens com acetato de etila, originando uma solução de cor azul intensa, que foi seca com sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada num evaporador rotatório, fornecendo 87 mg de resíduo, o qual foi fracionado pelo mesmo procedimento cromatográfico anterior (vide item II.B.2- pg 20). Recolhem-se frações de 10 ml e



Esquema. I Fracionamento da cepa nativa em meio líquido (vide item II.D.1-pag 24 e II.D.3-pag 28).

das frações 5-8, foi separada 51 mg de composto 1, cuja identificação foi feita por comparação direta de suas propriedades cromatográfica e espectroscópicas com as da amostra autêntica.

A caracterização e os dados espectroscópicos do composto 1 estão descritos na referência 44.

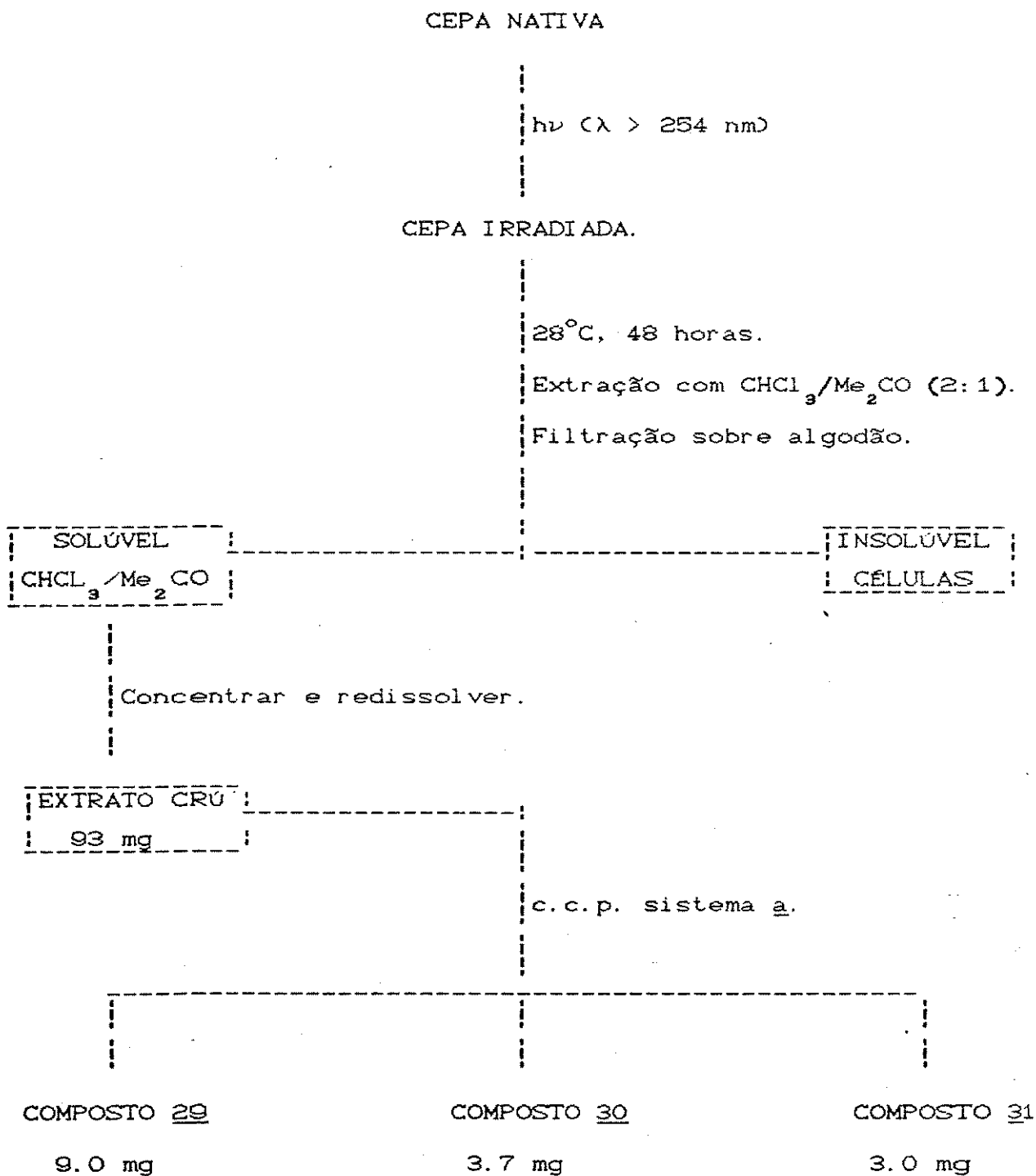
II.C-Tratamento Fotoquímico.

II.C.1-Efeito da Irradiação Sobre a Cepa Nativa.(Esquema II)

A irradiação da cepa foi efetuada com uma lâmpada de Mercúrio Osram HQL (λ_{254} nm) a diferentes velocidades de fluências. A fluência da lâmpada foi determinada com um radiômetro YSI-Kettering modelo 65 A nos comprimentos de onda λ_{254} nm ($108,4 \text{ w/m}^2$) e $\lambda > 300 \text{ nm}$ ($68,4 \text{ w/m}^2$).

A cepa nativa (de 12 horas de incubação com meio tioglicolato (3%)-agar (1,2 %) em placa de Petri), foi colocada em uma placa de Petri e recoberta com papel de alumínio contendo uma abertura retangular de 1x8 cm. Para irradiação desta cepa a lâmpada foi colocada a uma distância entre 15-20 cm. Imediatamente após o término da fotólise, a bactéria foi replicada em placa de Petri com igual nutriente e incubada a 28 °C. Após de 48 horas foram observadas abundantes colônias vermelhas.

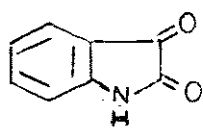
As colônias vermelhas foram selecionadas (500 mg) e suspensas em 12 ml de água esterilizada. Com esta suspensão de bactérias foram inoculadas 12 garrafas de Roux (1 ml para cada



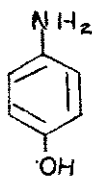
Esquema.II Fracionamento da cepa irradiada.

(vide item II.C.1-pag 22).

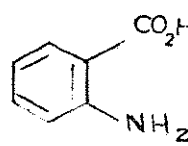
garrafa), e incubadas por 48 horas. A seguir foram extraídas por lavagens sucessivas com clorofórmio/acetona (2:1) e a solução foi filtrada sobre algodão e concentrada. Obteve-se 93 mg de resíduo que após analisado por c.c.d. sistema a, benzeno/acetona(4:1), mostrou a presença de 3 constituintes majoritários, denominados como: composto 29 ($R_f = 0,37$), composto 30 ($R_f = 0,65$), composto 31 ($R_f = 0,80$).



29



30

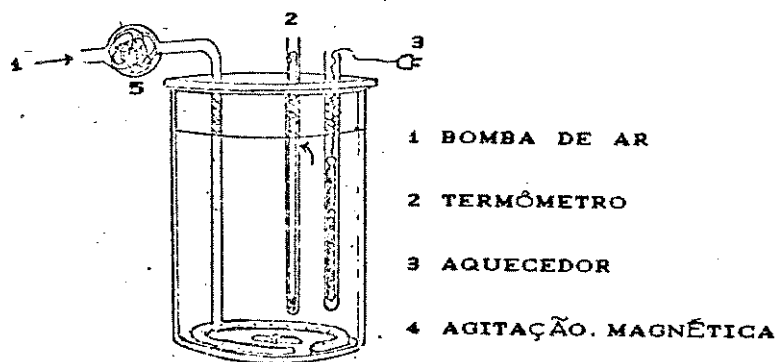


31

II.D- Cultivos em "Biorreator"

II.D.1-Extração Meio Ácido.

500 μ L de inóculo de suspensão padrão de *Chromobacterium violaceum* foram ressemeadas em um "Biorreator", equipado com agitação magnética, termômetro, aquecedor e bomba de ar de aquário (figura 3, contendo 800 mL de meio líquido de tioglicolato ao 3 % (Merck) e 0,2 % de agar (Bio-Bras). Foi feita esterilização prévia do sistema com ar filtrado sobre lâ de vidro, borbulhando sobre o caldo fervente por 15 minutos. O pH final do meio foi de 7,1 a 28 °C.



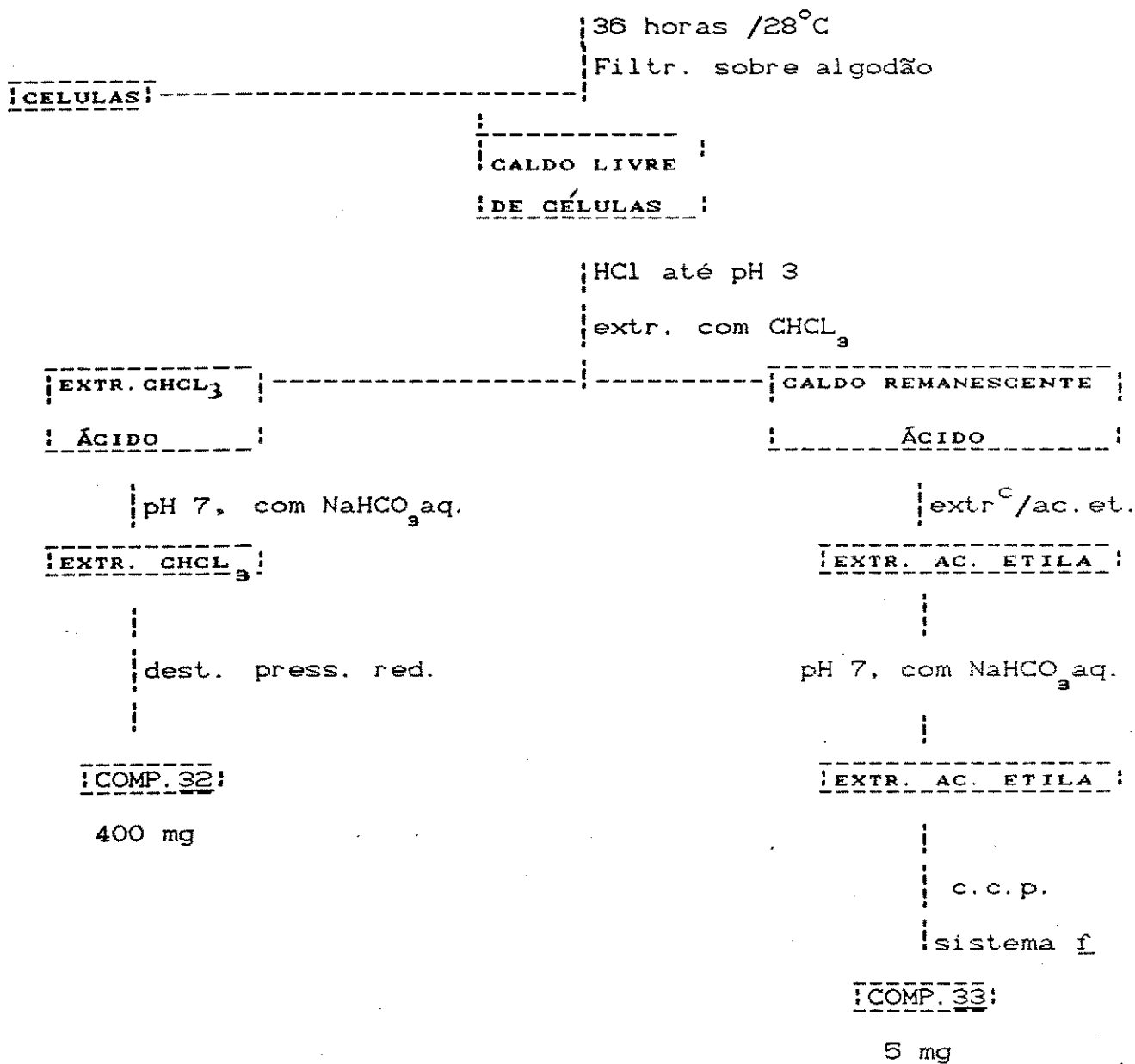
Após 36 horas de incubação da bactéria no biorreator, as células foram separadas do meio nutricional por filtração sobre algodão. A massa celular foi extraída exaustivamente com acetato de etila, obtendo-se uma solução de azulada intensa que foi concentrado sob vácuo. Obteve-se 230 mg de extrato bruto que foi fracionado por cromatografia de coluna de sílica gel, utilizando-se benzeno/acetona (4:1), (sistema a) seguindo a metodologia da página 19 (vide item II.B.2-). Foram recolhidas frações de 5 ml e as frações 7-13 forneceram 157 mg do composto 1 (vide Esquema I).

O caldo remanescente livre de bactérias, foi acidificado até pH 3 e logo extraído em extrator contínuo líquido-líquido por 24 horas com clorofórmio, e em seguida por mais 24 horas com acetato de etila. A solução clorofórmica foi concentrada, obtendo-se um óleo amarelo (3,01 g) que destilado a vácuo forneceu 400 mg de um composto que cristalizou em éter etílico-metanol, sendo este denominado composto 32 (vide esquema III). Alguns ensaios para sua caracterização foram realizados.

A 100 μ L de uma diluição apropriada do extrato clorofórmico ácido, dentro de um tubo de ensaio, adicionou-se 900 μ L de reagente de Ehrlich o que foi colocado em um banho de água fervente por 2 minutos. A solução adquiriu uma cor vermelha intensa que apresentou um λ_{max} 557 nm.

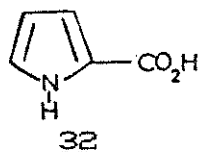
O experimento de espectrofotometria de UV-Visível do comportamento químico do composto 32 com reagente de Ehrlich,

CEPA NATIVA EM MEIO LÍQUIDO.



Esquema III Fracionamento do caldo livre de bactérias em meio ácido (vide item II.D.1-pag 24).

permitiu sua identificação como ácido 2-pirrol-carboxílico [102].



O extrato de acetato de etila (41 mg), foi lavado com solução de NaHCO_3 (aq) 0,1 M, seco sobre Na_2SO_4 anidro e concentrado em evaporador rotatório. Recromatografado em c.c.p. utilizando-se sistema f (sílica gel, clorofórmio/metanol (90:10)) foi isolado 5 mg de um composto de $R_f=0.77$, que funde a 141°C com decomposição. Este composto foi denominado composto 33. Devido a pouca quantidade deste, o mesmo foi procurado em outras frações.

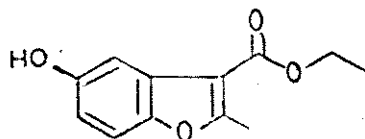
II.D.2-Tratamento Básico do Meio Desde o "Biorreator".

Após extração do composto 1 da forma descrita anteriormente o caldo remanescente foi alcalinizado com NaOH 0,1 M até pH 8,5, adsorvido sobre resina aniônica na forma OH^- . Após lavada com água deionizada até obter pH 7,0 foi eluída com ácido acético aquoso à 2 %. Em seguida uma coluna contendo resina ácida foi eluída com esta solução acética e o material retido foi eluído com 10 % de solução aquosa de piridina. Após de submeter esta solução aquosa de piridina a troca catiónica (K^+), Dowex 50 (K^+) (50-100 Mesh), obteve-se um precipitado branco amorfo (248 mg), solúvel em água que por c.c.d. (sistema 1), benzeno/metanol (15:85), (vide item II.A-pg.17) mostrou ser uma mistura complexa, apresentando alguns

constituintes, com reação positiva ao reagente de Ehrlich [103].

II.D.3-Fracionamento das Frações 1-6 do "Biorreator".

212 mg das frações 1-6 obtidas no fracionamento dos extratos crú anteriores do "Biorreator" (pag24) foram submetidas a separação em c.c.p. eluída consecutiva mente nos sistemas i, (sílica gel, benzeno) (duas vezes) e c, (sílica gel, clorofórmio) (uma vez) (vide item II.A-pg.17). Uma faixa de $R_f = 0,35$ sistema c e 0,77 sistema f, (sílica gel, clorofórmio/metanol (90:10)) foi separada da placa e o composto adsorvido sobre a sílica foi extraído por lavagens sucessivas com acetona e filtrado. A solução acetônica foi concentrada em evaporador rotatório e foram obtidos 131 mg de um composto que foi cristalizado em acetona-éter de petróleo o qual fundiu a 141-142°C com decomposição. Este composto foi denominado composto 33 (o mesmo obtido em baixa concentração ao extrair com acetato de etila, pg 25).



33

II.E. Estudos Exploratório da Biossíntese.

II.E.1-Efeito da Concentração de Isatina Sobre o Crescimento Celular.

500 μ L (correspondente a 20 mg de células úmidas de *C. violaceum* por erlenmeyer) de inóculo foram transferidos a 8 erlenmeyers contendo como meio de cultivo, 10 mL de uma solução cuja composição em aminoácidos (como fonte de carbono e nitrogênio) e sais minerais por 100 mL de meio foi: 0,5 mg de $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 100 mg de MgCl_2 ; 600 mg de K_2HPO_4 ; 50 mg de K_2SO_4 ; 147,3 mg de DL-alanina; 8 mg de L-treonina; 12 mg de L-lisina; 106,6 mg de DL-metionina; 6,6 mg de L-fenilalanina; 8,6 mg de L-leucina; 6,6 mg L-tirosina; 6,6 mg de DL-valina; 9,3 mg de L-arginina, todos de procedencia Sigma, a um pH final de 7,1.

Os erlenmeyers foram distribuídos em duas séries de 2 e 6 contendo cada um da série de seis, adicionalmente concentrações diferentes de isatina (2,1 mg/mL), 100, 200, 300, 300, 400, 500, 600, 700, 800, μ L respectivamente, os outros dois erlenmeyers permanecem como controle.

O meio de cultura foi incubado a 27 °C, sem luz e depois de 36 horas o crescimento bacterial foi interrompido com 5 mL de metanol quente e centrifugado por 5 minutos. Em uma alíquota de 1 mL da mistura de reação foi lida absorbância do composto 1 a λ 577 nm em um espectrofotômetro Micronal (modelo B-382). A concentração foi calculada utilizando o valor de $\epsilon = 2,5 \times 10^4$, a um caminho óptico de 1 cm.

Utilizando-se esta mesma metodologia experimental, foi estudado o efeito da concentração de : serotonina, ácido indol-3-acético e L-triptofano.

II.E.2-Efeito de Isatina Sobre a Biossíntese do Composto 1.

Foram inoculados, com 500 μ L de uma suspensão estoque de células de 12 horas de crescimento (0,8 mg de células/ml de água) 30 erlenmeyers, contendo como meio nutritivo 10 mL de uma solução cuja composição em aminoácidos e sais minerais está descrita no experimento anterior (vide item II.E.1- pg.28). Os erlenmeyers foram distribuídos em duas séries de 15, contendo adicionalmente em uma das séries, 200 μ L de solução padrão de isatina (0,3 mM), e a outra série utilizada como controle. O meio de cultura foi incubado a 27 °C sem luz nem aeração. A determinação da concentração do composto 1, foi feita lendo a absorbância a λ 577 nm em diferentes tempos de incubação (cada duas horas), até alcançar 30 horas de crescimento. Para esta determinação foi preciso adicionar ao meio de cultivo 2 mL de metanol quente e logo centrifugar (Centrifugadora Excelsou-2 FANEM a 2500 rpm por 5 min.).

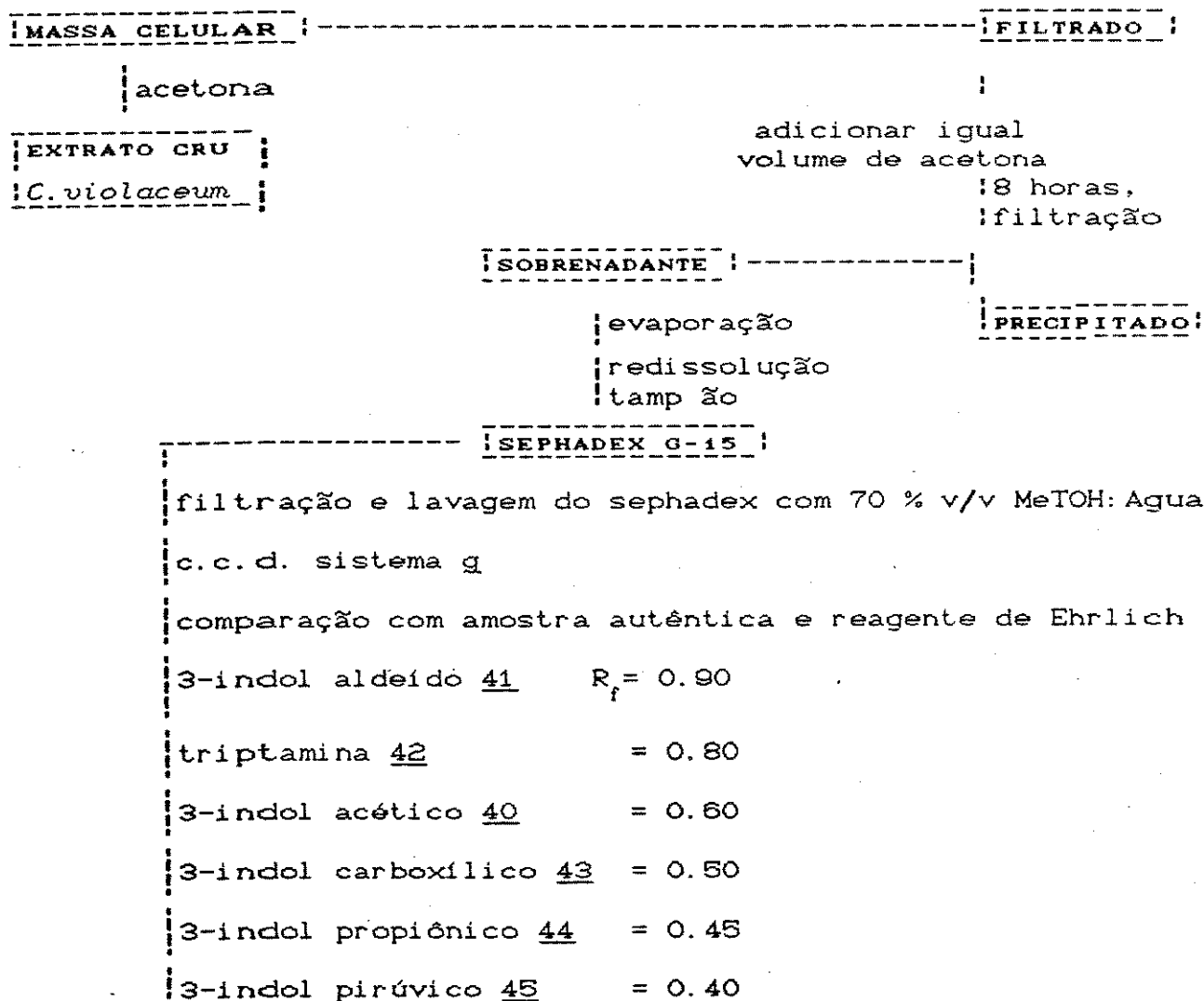
Este experimento foi repetido reemplazando a isatina, 29, por L-triptofano, 5, por serotonina, 39, e por ácido indol-3-acético 40, em concentrações similares as descritas acima, para cada reagente.

II.E.3-Catabolismo de L-Triptofano. (Esquema IV)

1 L de meio tioglicolato esterilizado no mesmo "Biorreator", que adicionalmente contem 0,2 mg/mL de L-triptofano, foi inoculado com 5 mL de suspensão de bactéria (contendo 0,4 g de células

1 L MEIO TIOGLICOLATO.

inoculado com bactéria de 12 h.
48 h , 27°C sem luz nem aeração
filtr. sobre algodão
lav. das células com água dest.



Esquema. IV Produtos do catabolismo de triptofano (vide item
II.E.3-pag 30)

umidas/ml), de 12 horas de crescimento e foram incubadas a 27 °C com agitação e protegidas da luz. Depois de 48 horas de crescimento, as células foram separadas do meio por filtração sobre algodão e lavagens sucessivas, até eliminação total dos nutrientes. A solução obtida foi precipitada com igual volume de acetona, resfriada 8 horas em geladeira e filtrada. A solução sobrenadante foi evaporada a vácuo e redissolvida em tampão pH 4,2 (o tampão foi preparado com 6 mL de ácido acético, 1,15 mL de etilendiamina e completar até 1 L de solução) e misturada em um bequer com Sephadex G-15 (Sigma) durante duas horas com agitação. As frações retidas pelo Sephadex foram extraídas com 70 % v/v de metanol-água que analisadas por c.c.d. sistema g (sílica gel, isopropanol/amônia aq. (25 %)/água (13:1:1), (vide item II.A-pg.17), mostraram a presença de 6 constituintes, R_f : 0,90; 0,80; 0,60; 0,50; 0,45; 0,40 (vide Esquema IV).

II.E.4-Incorporação de Ácido Indol-3-acético Marcado 2-¹⁴C.

200 µL de cepa fresca de (0,8 g de células/ ml de água) *Chromobacterium violaceum* foram inoculadas em 4 erlenmeyers, que continham como meio, 5 mL de uma solução de aminoácidos e sais minerais. A composição está descrita no item II.E.1- pg.26. Foi adicionado em dois erlenmeyers 500 µL de solução de ácido indol-3-acético 2-¹⁴C (IAA 2-¹⁴C), 446,6 ±39.7 cpm/nM de IAA 2-¹⁴C, Amersham, UK.

A mistura de crescimento com IAA 2-¹⁴C foi incubada por 72

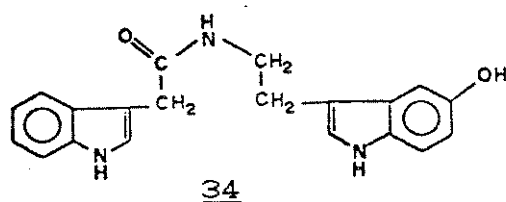
horas a 27 °C sem aeração e protegida da luz.

O crescimento da cultura foi interrompido por adição de 2 mL de metanol e aquecido em banho maria por 5 minutos. Centrifugou-se por mais 10 minutos (Centrifugadora Excelso-2 FANEM, 2500 rpm) e uma alíquota de 100 µL do sobrenadante foi analisada por c.c.d. sistema b (silica gel, benzeno/acetona (2:1)). A região contendo ao composto 1 foi retirada da placa e extraída por lavagens com metanol quente e lida a absorbância a λ 577 nm ($\epsilon = 2,5 \times 10^4$). Esta mesma solução foi misturada com 5 mL de coquetel de cintilação Insta-Gel (United Technologies Packards), e lida a incorporação de ^{14}C em um Cintilador Beckman modelo LS-700 obtendo-se $474,4 \pm 10,7$ cpm/nM de composto 1.

II.E.5-Preparação do Composto 34

O novo composto N-etil-(5-hidroxiindol-3-il)-2-indolil_ etilenamina (carboxamida), 34, foi preparada de acordo com o método descrito por Huang e col. [117], o procedimento é o seguinte : No Iodeto de 1-metil-2-cloro piridinium, 46, (1,2 mmol) foi adicionada uma mistura de serotonina, 39, (1,0 mmol), ácido indol-3-acético, 40, (1,0 mmol) e trietilamina (2,4 mmol) em diclorometano (10 mL). Depois de refluxada por 1 hora com agitação magnética em atmosfera de argônio, adicionou-se 20 mL de éter etílico e a mistura de reação foi lavada várias vezes com água. A camada etérea foi seca sobre sulfato de sódio anidro e concentrada à pressão reduzida, fracionada por c.c.p. sistema k, (sílica gel,

clorofórmio/etanol (98:2)) obtiveram-se 231 mg de composto 34 (70 % de rendimento).



II.E.6-Efeito da Carboxamida 34 Sobre a Biossíntese do Composto 1.

Foram inoculados, com 500 μ L de uma suspensão estoque de células de 12 horas de crescimento (0,8 mg de células/ml de água), 16 erlenmeyers (contendo como meio nutritivo 10 mL de uma solução cuja composição em aminoácidos e sais minerais está descrita no item II.E.1- pg28) dos quais 8 continham 200 μ L de uma solução padrão 0,3mM de carboxamida, 34.

O meio contido nestes 16 erlenmeyers foi incubado a 27°C sem luz nem aeração. A determinação da concentração do composto 1 foi feita lendo a absorbância a λ 577 nm ($\epsilon = 2,5 \times 10^4$) em diferentes tempos de incubação (cada 5 horas) até alcançar 30 horas de crescimento. Para a análise do composto 1, foi preciso adicionar ao meio de cultivo 2 mL de metanol, esquentar em banho maria e logo centrifugar (Centrifugadora Excelso-2 FANEM, 2500 rpm/10 min.).

Este experimento foi repetido substituindo a concentração da carboxamida, 34, por 200 μ L (solução padrão 0,3mM) (0,6 μ M final) de L-triptofano, 5, isatina, 29, serotonina, 42, ácido

indol-3-acético, 40,.

II.E.7-Efeito Comparativo dos Precursores.

Foram inoculados com 500 μ L de uma suspensão de estoque (20 mg/mL) de células frescas de *Chromobacterium violaceum*, 30 erlenmeyers que tinham como meio nutritivo 10 ml de uma solução de sais minerais (sem aminoácidos) cuja composição está descrita no item II.E.1- pg.28, que adicionalmente contem 0,1 % de glicose. Os erlenmeyers foram distribuídos em 5 series de 6, sendo que para cada uma adicionaram-se respectivamente os seguintes reagentes :

-200 μ L (solução padrão, 0,3 mM) de L-trp, 5, + 1 mL de meio tioglicolato (solução padrão, 1,2 %).

-200 μ L (solução padrão, 0,3 mM) da carboxamida, 34, + 1 ml de meio tioglicolato (solução padrão, 1,2 %).

-200 μ L (solução padrão, 0,3 mM) da carboxamida, 34, + 200 μ L (solução padrão, 0,3 mM) de isatina, 29, + 800 μ L de água esterilizada.

-200 μ L de água esterilizada + 1 mL de meio tioglicolato (solução padrão, 1,2 %).

-200 μ L (solução padrão, 0,3 mM) da carboxamida 34 + 1 mL de água esterilizada.

O meio de cultura foi incubado a 27 °C sem luz nem aeração. A determinação da concentração do composto 1, foi feita lendo a

absorbância a λ 577 nm ($\xi = 2,5 \times 10^4$) nos tempos de 0, 5, 8, 10, 12 e 15 horas de crescimento. A interrupção do crescimento bacterial foi provocado por adição de metanol quente e logo centrifugado, (centrifugadora Excelso-2 FANEM, 2500 rpm/por 10 min.), tomando alíquotas de 1 mL desta solução para leitura no espectrofotômetro UV-Visível.

II.E.8-Biossíntese do Composto 1 em diferentes Meios Nutricionais.

Meio N^o 1.

500 μ L de inóculo (20 mg de células/mL de água) de *Chromobacterium violaceum*, foram ressemeados no "Biorreator" contendo como nutriente uma suspensão preparada com 15 g de farelo de arroz e 800 mL de água potável. O meio foi esterilizado por aeração através de lã de vidro com agitação magnética vigorosa e em ebulição até se tornar viscoso (aparência de "mingau"). O pH final do meio foi ajustado a 7,1 com HCl ou com NaOH 0,1 M.

Após 36 horas de incubação a 27 °C, protegidas da luz, as células foram separadas e extraídas segundo a metodologia descrita no item II.D.1-pag 24, Obtiveram-se 312 mg de um extrato cru e 87 mg de composto 1.

Este experimento foi repetido em concentrações diferentes de farelo de arroz enriquecido com L-metionina e meio tioglicolato.

II.F-Ensaio Biológicos.

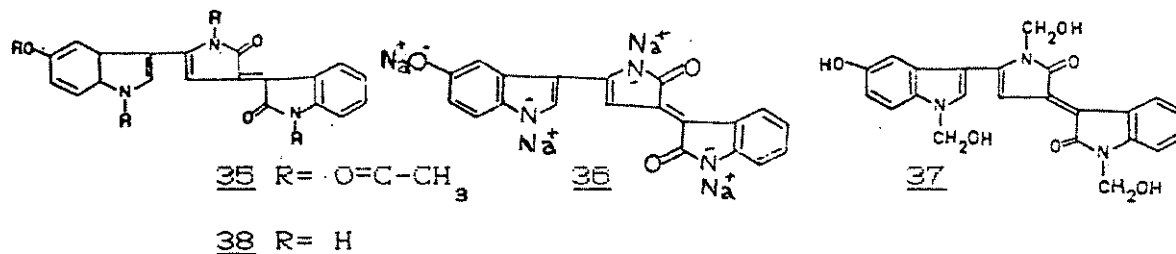
II.F.1-Obtenção dos Derivados.

Os derivados do composto 1, bromado 4, acetilados 35 e sal de sódio, 36, foram obtidos seguindo a metodologia descrita na referência 44. Estes derivados foram purificados por métodos cromatográficos e identificados por comparação de suas propriedades espectroscópicas com amostras autênticas. O derivado metilol, 37, foi preparado incluindo algumas modificações e o procedimento foi o seguinte:

200 mg (0.58 mmol) de composto 1, foram colocados em um balão esmerilhado de 50 mL. Sob agitação adicionou-se 4 mL de formaldeído aq (36.5 %) fresco com 1 mL de metanol. Depois de 5 minutos juntou-se 0,5 mL de HClO_4 0,1 M e logo aqueceu-se em banho de água de 50 °C por 4 horas. A mistura reacional passa de azul a vermelho escuro (o curso da reação foi seguida por c.c.d. sistema a, sílica gel, benzeno/acetona (4:1)). Após de resfriada em banho de gelo a solução foi neutralizada com NaHCO_3 aq., 0,1 M. Em seguida acrescentou-se um excesso de metanol e um precipitado branco amorfo foi separado por filtração. O filtrado foi seco com CaO e concentrado à vácuo, obtendo-se 235 mg de cristais marron escuros de metilol, 37.

Foram enviadas amostras do composto 1 e seus derivados, bromado, 4, acetilados, 35, metilol, 37, sal de sódio, 36, ao Dr Victoriano Campos da Faculdade de Ciências, da Universidade Católica de Valparaíso-Chile para serem submetidas a testes de

atividade tripanomicida.



Os testes de genotoxicidade e citotoxicidade foram realizados no Instituto de Biología (Laboratório de Bioquímica) da UNICAMP, pela Dra Marcela Haun.

II.F.2-Atividade Biológica.

A forma de cultura de *Trypanosoma cruzi* (epimastigotas, cepa Tulahuen), foi em meio LIT para estoque e crescimento. A composição do meio LIT é a seguinte:

Cloreto de Sodio	4.0 g
Cloreto de Potassio	0.4 g
Fosfato di-sodico	8.0 g
Glicose	2.0 g
Triptose	5.0 g
Infusão Caldo de Fígado	5.0 g
Hemina	25.0 mg
Soro Bovino	100.0 mL
Água Bidestilada	1000.0 mL

Trypanosoma cruzi (cepa Tulahuen) [104], foi cultivada em meio LIT (Liver Infusion Tryptose) [105, 106], a 28 °C. A solução salina foi cuidadosamente homogenizada e imediatamente levada para Coulter Electronic Counter (Modelo A com orifícios de 100 μ) de 5 entradas, para a determinação do número total de organismos presentes. Os compostos em estudo foram aplicados aos meio de cultura quando tinham uma contagens inicial de 5×10^6 flagelos por mL de meio e quando a fase de crescimento alcançava um período de 72 horas. A percentagens de mobilidade dos flagelos, foram medidas diretamente por observação microscópica.

Através de curvas de sobrevivência (ID_{50}), foi estudada a citotoxicidade, e com testes de inibição de síntese de DNA (D_{50}), estudou-se a genotoxicidade. Estes experimentos foram realizados utilizando células de Hamster Chines V-79. Esta metodologia está descrita na referência 107 e consiste, resumidamente de : Fribroblastos V-79 de Hamster chines derivados de pulmão, porém obtidas da American Type Cultura Collection (ATCC) e mantidas em meio Modificado Eagle (Dubecco), contendo 10.% (v/v) de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 100 μ g/ml de streptomycin. Células na fase exponencial de crescimento foram triptinizadas, contadas e plaqueadas em placa de Petri de 5 cm de diâmetro, com uma densidade de 2×10^4 células por placa mantendo 5 % de CO_2 úmido a 37 °C por 72 horas antes de tratá-las com compostos. Em seguida as culturas foram expostas por 30 minutos a 37 °C com 1 ml de solução dos compostos. Após a exposição, a solução teste foi

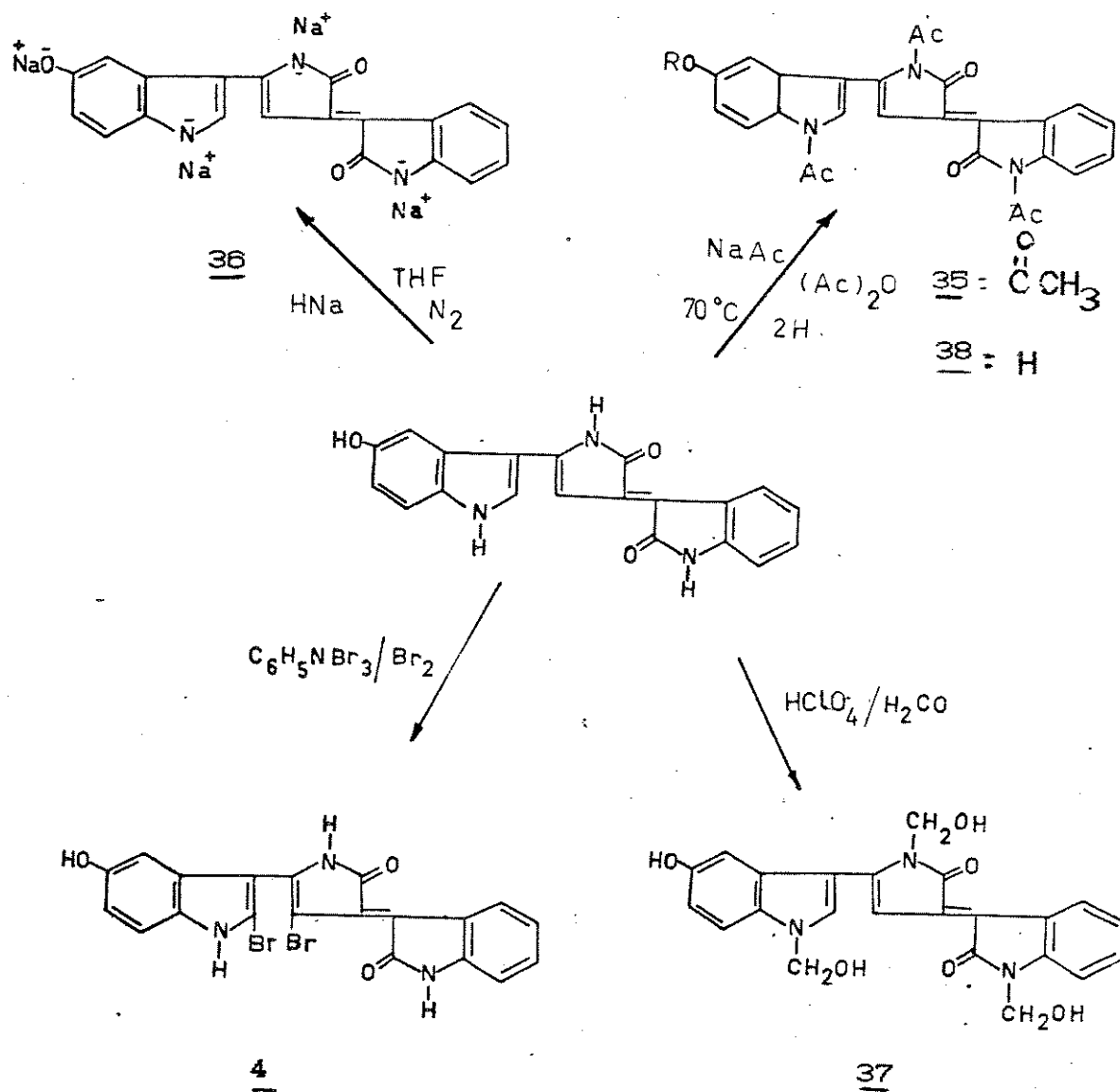
substituída por meio de cultura fresco e as placas foram incubadas 48 horas a 37 °C. As células são fixadas com 10 % de tricloro acético, lavadas e secas. Finalmente todas as células foram lisadas com 0,3 M de NaOH e absorvância do lisado foi medida a 260 nm, parâmetro que correlacionou com o número de células.

Os crescimento relativo de cada amostra foi expressa em percentagem da cultura controle nas mesmas condições, onde 100 % do crescimento corresponde ao aumento da absorvância a 260 nm do controle após o tempo de incubação.

III.A. Síntese de Derivados do Composto 1

No curso de nosso estudo, foi necessário manter a bactéria de estoque em placa de Petri contendo meio sólido de tioglicolato sendo submetida à repicagem a cada 48 horas. Os experimentos foram feitos em um "Biorreator caseiro" de 1 L de capacidade ou em erlenmeyers de 50 ml de capacidade com 5, 10 ou 15 ml de meio líquido, cuja composição variava de acordo com o objetivo de cada experimento. O composto 1 isolado destes extratos foi utilizado na preparação dos derivados bromado, 4, acetilados, 35, metilol, 37 e sal de sódio, 36. Estas reações de transformação foram feitas de acordo com a metodologia desenvolvida em trabalho prévio [44]. Para o derivado metilol, as modificações efetuadas, além de facilitarem a purificação permitiram melhorar o rendimento, de 47 % para 90 % (vide item II.F.1-pag.37). Esse aumento pode ser devido à otimização do tempo e temperatura de reação da ref. 44. Também é possível que o formaldeído, adicionado à mistura de reação, tenha polimerizado em ausência de metanol e o composto 1 sem reagir tenha-se decomposto pela presença do ácido perclórico. Esta reação foi repetida até com 12 horas de agitação obtendo rendimentos na faixa de 90 % [108].

Um resumo da síntese destes derivados é mostrado no esquema V da página 42. Na fig.E-1 são apresentados os espectros de UV



Esquema.V- Síntese dos derivados do composto 1

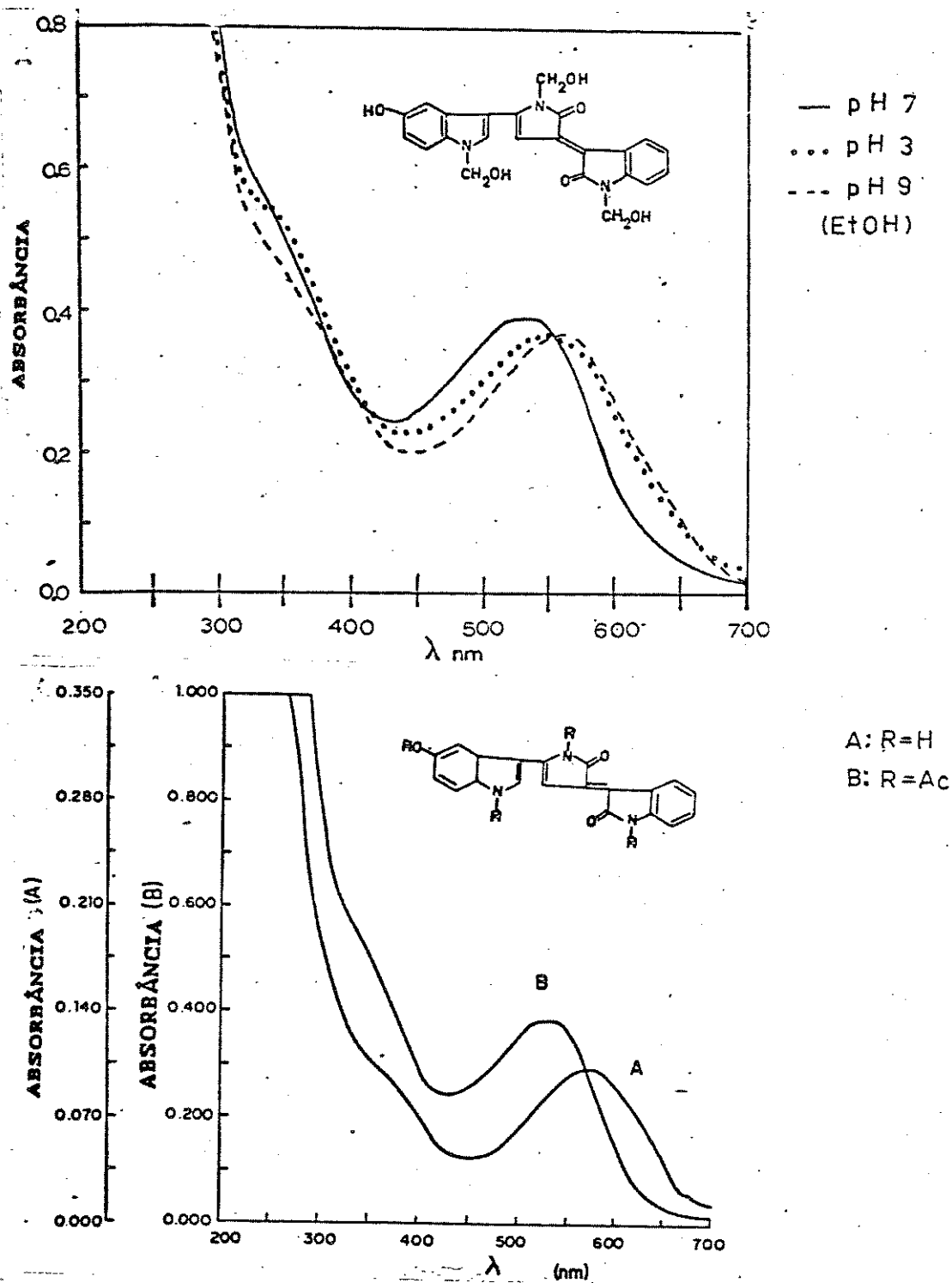


Fig.E-1. Espectros de UV dos derivados do composto 1.

III.B .Atividade Biológica.

Pelos resultados preliminares dos ensaios biológicos, o composto 1 e o derivado bromado, 4, [44, 45] mostraram-se razoavelmente ativos frente a *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuen, Chile). A atividade foi medida em meio Phillips, sendo observado crescimento da cepa de tripanossoma 100 vezes menor que no meio LIT (iguais ou menores que 1×10^6), prejudicando a avaliação experimental. *Trypanosoma cruzi* em meio LIT tem um crescimento exuberante (1×10^8 flagelos). Para se verificar a inibição do crescimento, deve-se acrescentar as drogas (em diferentes concentrações), em culturas que estejam em fase logarítmica (5×10^6 /ml) e acompanhar o crescimento dos flagelos a partir desse ponto [105, 106]. Uma cultura de *Trypanosoma cruzi* (epimastigotas, cepa Tulahuen) com 5×10^6 flagelos por ml de meio LIT, alcança uma fase estacionária do crescimento num período de 72 horas, atingindo uma densidade de população de 20×10^8 parasitas por ml.

As figuras 3, 4 e 5 mostram um estudo comparativo de população de *Trypanosoma cruzi* em presença de 10, 20 e 40 $\mu\text{g/ml}$ de composto 1 respectivamente além de seus derivados bromado, 4, acetilados, 35, metilol 37, e sal de sódio, 36, dissolvidos em solução aquosa de NaCl.

Quando a cultura (5×10^6 flagelos) foi incubada com 10 $\mu\text{g/ml}$, se observou nenhumm efeito marcante sobre a população de tripanossoma. Após 16 horas em contato com 20 $\mu\text{g/ml}$ (46 μM final)

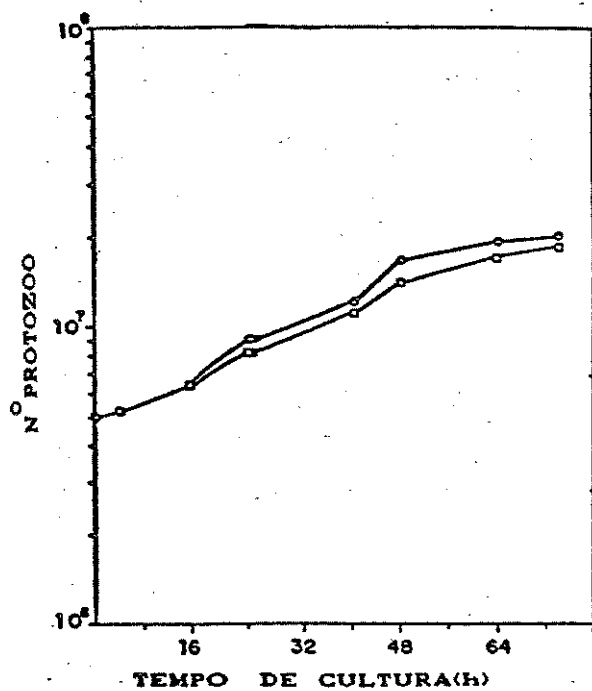


Fig. 3- 10 µg/ml

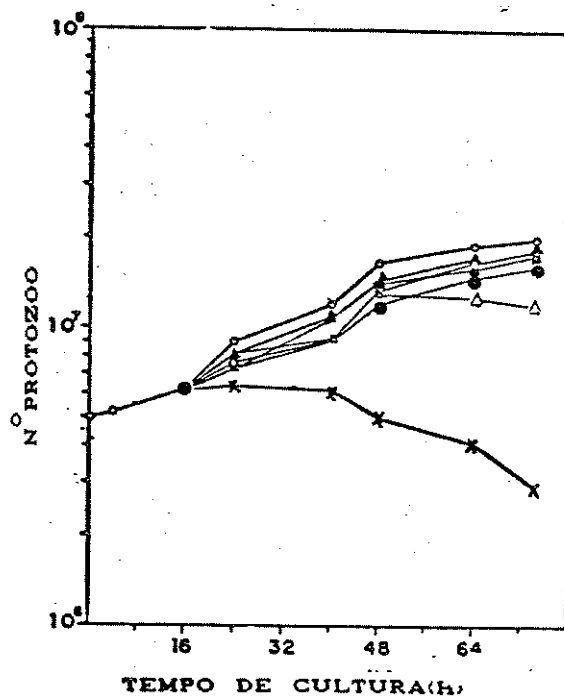


Fig. 4- 20 µg/ml

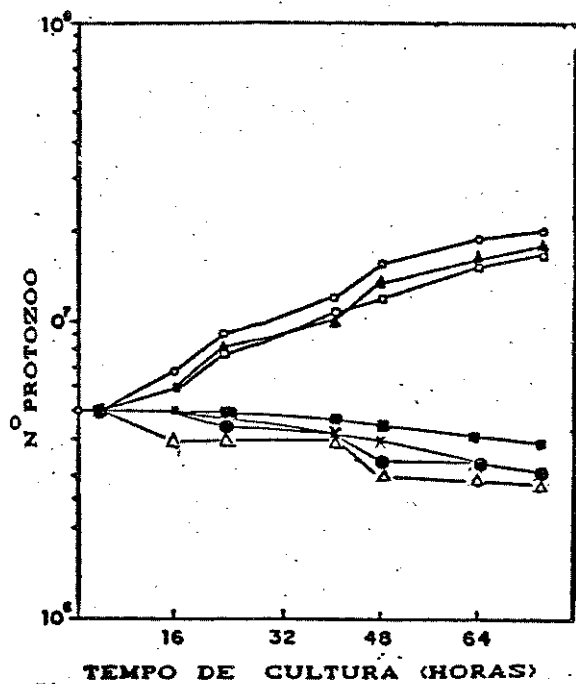


Fig. 5- 40 µg/ml

Estudo comparativo da atividade do composto 1 e seus derivados com respeito à população de *T. cruzi* (vide item II.F.1-pag 34)

- controle
- comp. 1
- ▲- comp. 36, sal de sódio
- △- comp. 4, bromado
- comp. 35, tetraacetilado
- comp. 38, triacetilado
- x- comp. 37, metilol

de composto, 35, a inibição do crescimento do protozoo alcança valores significativos. O mesmo efeito foi observado com 40 µg/ml do composto, 4, e do composto, 35. Após 80 horas de contato o nível de população do flagelo alcança valores mínimos indicando uma maior inibição de seu crescimento. Com 20 µg/ml de composto, 37, observa-se uma faixa de atividade entre a do Nifurtimox e do Benznidazol, duas das drogas mais utilizadas no tratamento da Doença de Chagas [90].

Nas figuras 6, 7 e 8 é observada a mobilidade do protozoário em presença de 10, 20 e 40 µg/ml de composto 1 e seus derivados 4, 35, 37 e 36 respectivamente.

Após 48 horas de contato, com 10 µg/ml de composto 1 e seus derivados, os tripanossomas, em meio LIT, apresentam ao redor de 70 % de mobilidade (figura 6). Nesse período, com 20 µg/ml (figura 7), o composto, 37 inibe totalmente a mobilidade (100 % de imobilidade). O efeito com os outros derivados é menor. 50 % de imobilidade foi observada com 40 µg/ml das drogas (figura 8). Os maiores efeitos de imobilidade foram provocados pelos derivados metilol (composto, 37), bromado (composto 4) e triacetil (composto, 38).

Verificou-se, então que o comportamento de cada composto foi aproximadamente similar, tanto no estudo de mobilidade como no estudo de inibição de crescimento, permitindo inferir um certo grau de atividade tripanocida. Observou-se que o sal de sódio apresentou a menor atividade de todos os derivados, inclusive

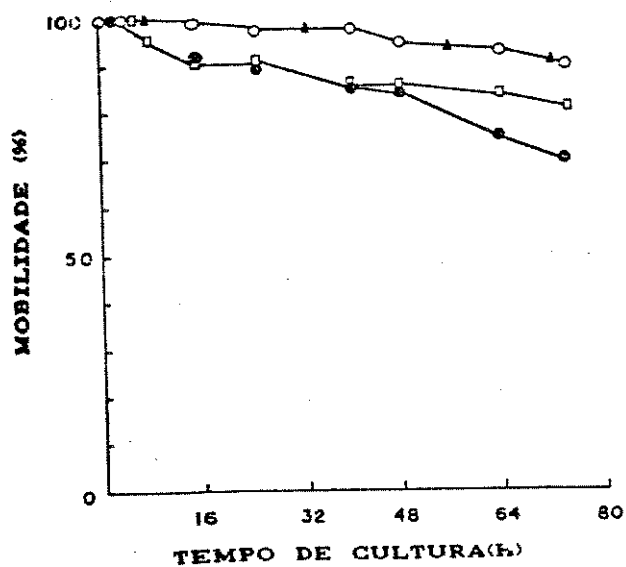


Fig. 6- 10 µg/ml

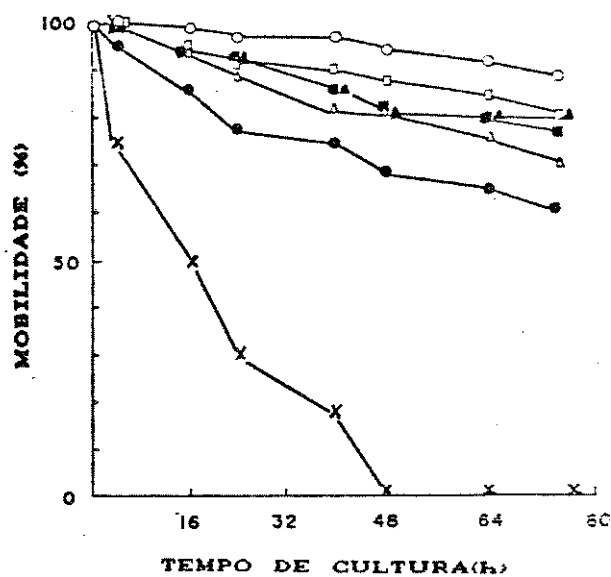


Fig. 7- 20 µg/ml

Mobilidade protozoária em presença de composto 1 e seus derivados (vide item II.F.1-pg. 33)

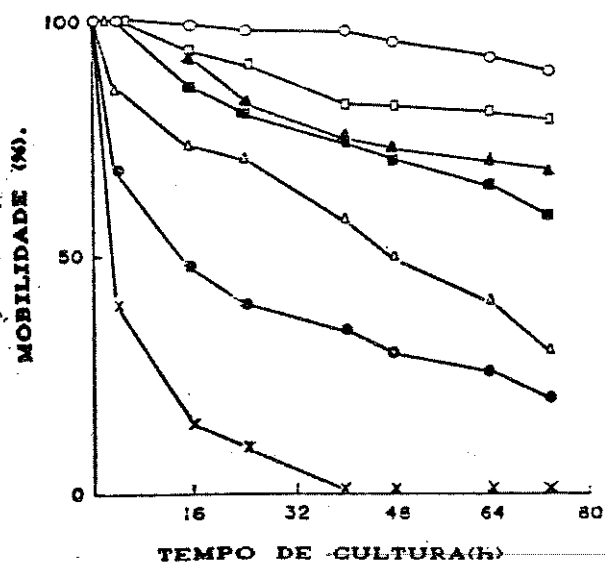


Fig. 8- 40 µg/ml

- O- controle
- comp. 1
- ▲- comp. 36, sal sodio
- Δ- comp. 4, bromado
- comp. 35, tetraacetil
- comp. 38, triacetil
- x- comp. 37, metilol

menor que o próprio composto 1. Um exame microscópico das amostras de culturas do protozoário permitiram acompanhar as transformações morfológicas durante a ação destas drogas. Em poucas horas foi observado perda do flagelo e uma transformação estrutural.

A concentração relativamente alta do composto 1 no Rio Negro, na região amazônica, não tem afetado a ecologia regional; ao contrário, acredita-se que a ausência de doenças endêmicas está relacionada à presença de *Chromobacterium violaceum* [26]. Este fato é indicativo de uma baixa toxicidade do composto 1, *in vivo*. Entre tanto, estudos de citotoxicidade (curva de sobrevivência) e genotoxicidade (síntese de DNA), dos compostos 1 e 4, executados com células de hamster chinês (linagem V-79) tem mostrado que ambas as drogas poderiam ser classificadas como altamente tóxicas (figura 9 e figura 10). Para os compostos 1 e 37 foram obtidos ID de 12 μM e de 20 μM , respectivamente. Valores similares para nifurtimox e metilol (450 μM) foram encontrados, inibindo 50 % de síntese de DNA (D_{50}).

III.C. Estudo de Metabólitos.

Sabe-se que células expostas a períodos curtos de irradiação com luz UV (faixas de 5 a 30 segundos) sofrem mutações ($\lambda > 300 \text{ nm}$), que alteram as vias biossintéticas e os mecanismos reguladores das cepas nativas de microorganismos. Para baixas fluências de radiação UV a frequência de mutação pode ser aumentada de 10^3 a

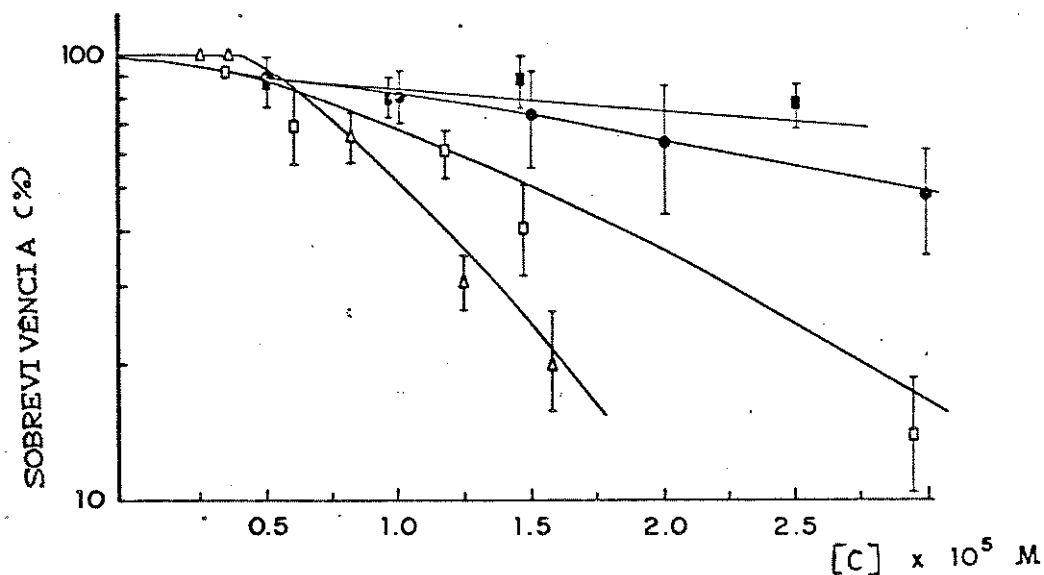


Fig.9-Curva de sobrevivência de células de fibroblasto de hamster chinês tratadas com (-□-) comp. 1, (-Δ-) comp. 4, (-●-) comp. 37, e (-■-) nifurtimox.

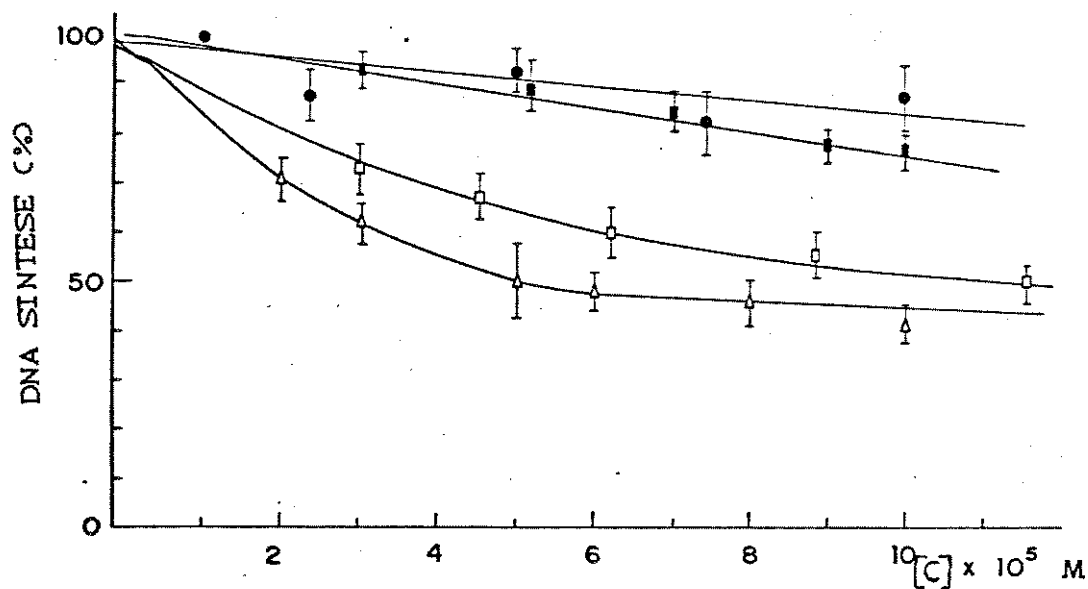


Fig.10-Inibição da síntese de DNA de células de fibroblastos de hamster chinês, tratadas com (-□-) comp. 1, (-Δ-) comp. 4, (-●-) comp. 37 e nifurtimox.(-■-)

10^6 vezes sob o nível de mutação espontânea na bactéria [109, 110]. Aproveitando esta característica de algumas células, iniciamos o estudo exploratório da biossíntese do composto 1, procurando relacionar os produtos sintetizados tanto pela cepa nativa como pela cepa irradiada (aparentemente mutante).

No estudo de transformação da cepa nativa de *Chromobacterium violaceum*, (vide item II.C.1-pg 22) a bactéria irradiada foi extraída com clorofórmio/acetona (2:1). Obteve-se um extrato cru que quando fracionado, segundo indicado no esquema II, foram obtidos 9.6 % de composto 29, 3.2 % de composto 30 e 3.9 % de composto 31, rendimentos relativos ao peso total do extrato cru. O estudo da caracterização destes compostos é discutido a seguir:

Composto 29.

UV, $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) : 211.0 (6.15), 292.2 (6.15), 413.7 (5.80)

IV, ν cm^{-1} /KBr : 3200, 1730, 1745, 1620.

RMN¹H, DMSO D_6 , δ : 3.2 (s, 1H), 6.9 (m, 2H), 7.4 (d, 2H).

EM m/e (%) : M^+ 147 (10), 119 (20), 110 (100), 92 (14), 82, (16),
81 (33).

Solúvel em dimetil sulfoxido, acetona e pouco solúvel em éter etílico. De cor vermelha, cristaliza em acetona/éter etílico e funde a 203 °C. (pf 204°C) [89]

Seu espectro de UV (Fig. E-2) apresenta bandas em 211, 292.2

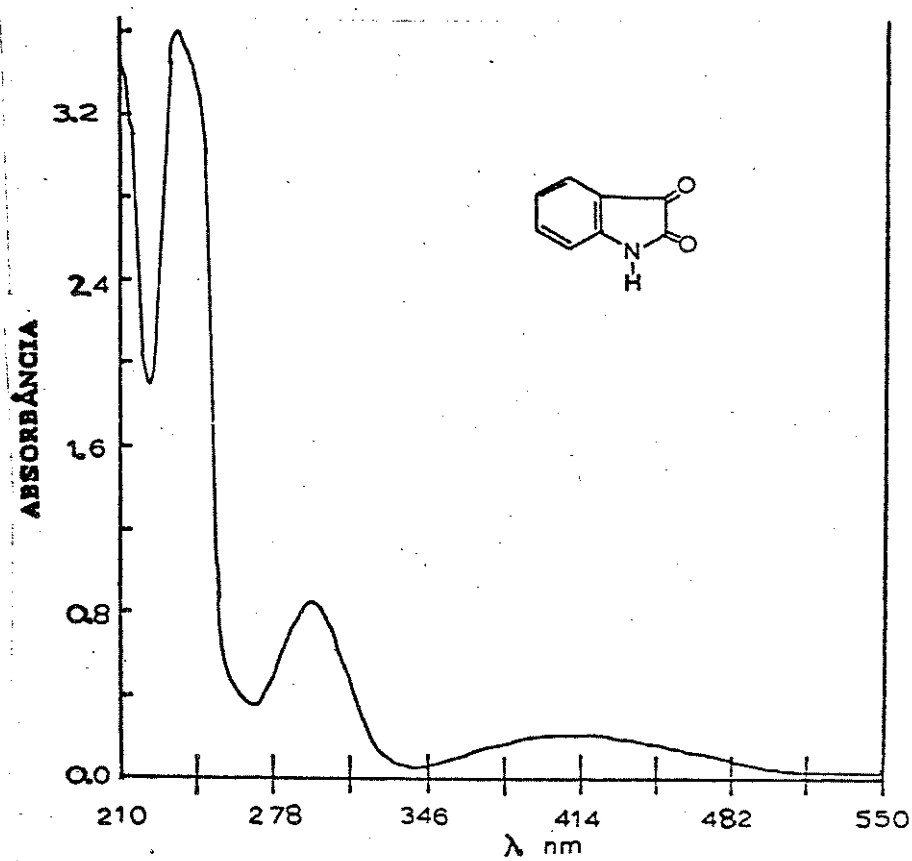


Fig. E-2: Espectro de UV do composto 29

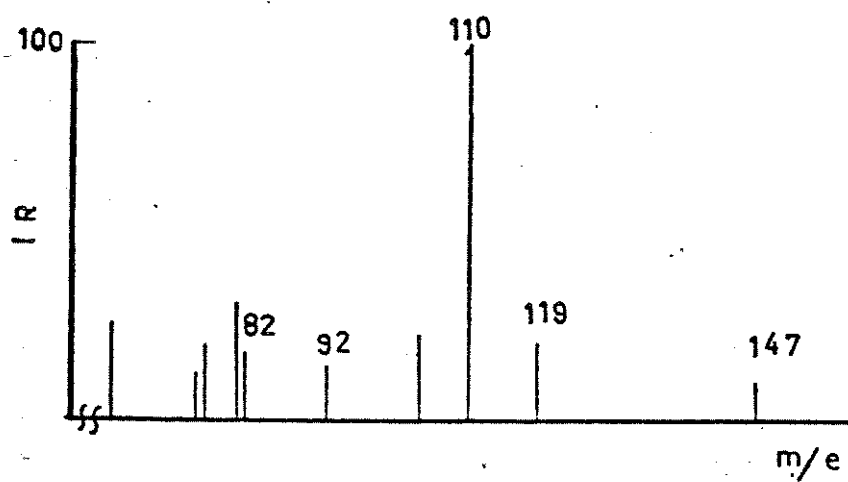


Fig. E-3: Espectro de massa do composto 29

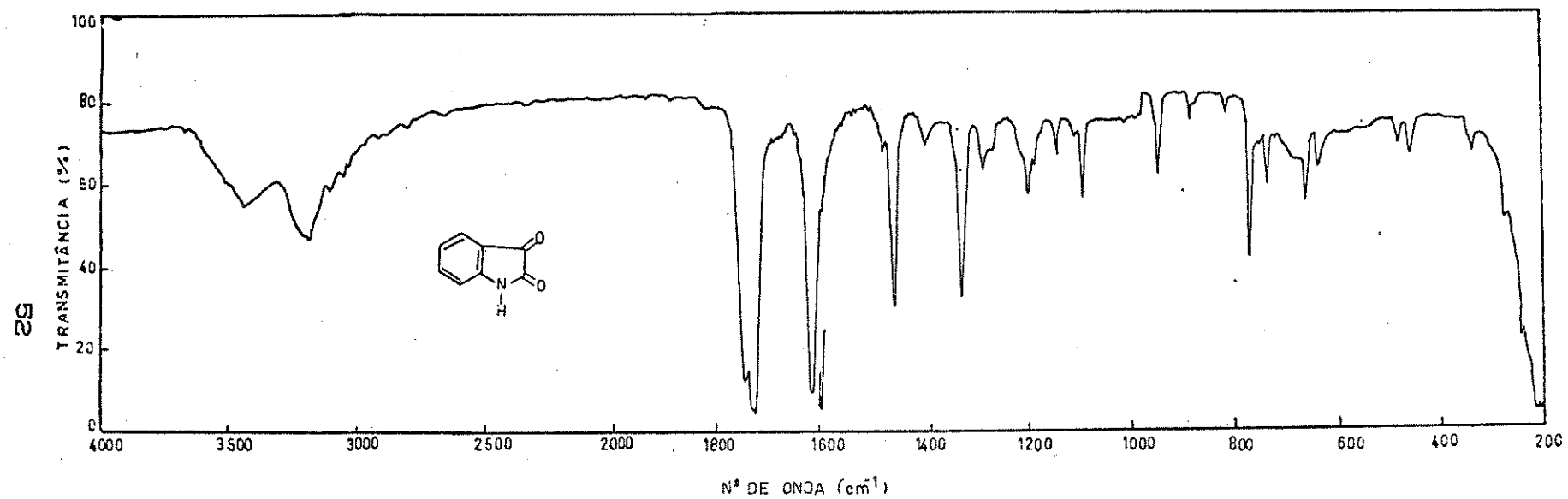


Fig. E-4.. Espectro de IV do composto 29 em pastilha de KBr.

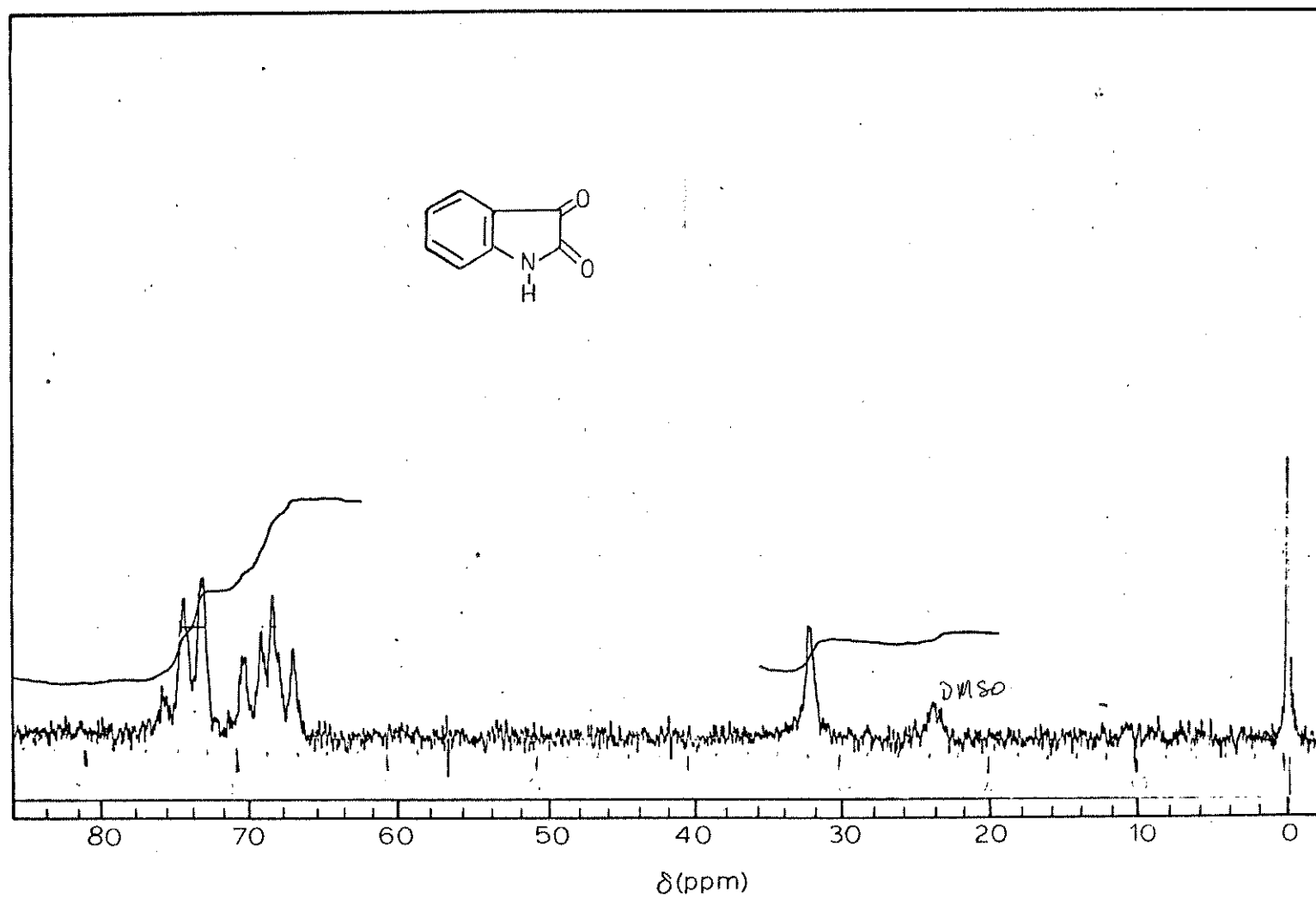


Fig. E-5. Espectro de RMN^1H do composto 29 em DMSO, D_6 .

e 413.7 nm, características de anéis aromáticos. O IV Fig. E-4 apresenta uma banda fina e pouco intensa na região de N-H, 3200 cm^{-1} . As bandas em 1730 e 1745 cm^{-1} , são sinais típicos de carboníla de lactama.

O espectro de RMN ^1H Fig. E-5 mostra sinais em δ 6.9 (m, 2H) e em δ 7.4 (d, 2H), relativos a próton de anel aromático orto-sustituído. O deslocamento químico do próton N-H apresenta um δ de 3.2 (s, 1H). O espectro de massa Fig. E-3 tem o íon molecular em 147 unidades $^m/e$, que corresponde à fórmula molecular $\text{C}_8\text{H}_5\text{NO}_2$ (sete insaturações). A comparação de suas propriedades espectroscópicas com as da literatura [89] confirmou que o composto 29 é a isatina.

Composto 30.

UV, $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ξ): 232.7 (5.60), 277.6 (5.63).

IV ν $\text{cm}^{-1}/\text{KBr}$: 3200, 1520 1470.

RMN¹H, TFA, δ : 7.2 (d, 2H), 7.5 (d, 2H), 8.8 (s, 3H).

EM m/e (%) : M^+ 109 (100), 82 (12), 81 (28).

Solúvel em acetona, metanol e menos solúvel em clorofórmio. Cristaliza em clorofórmio como agulhas brancas e funde a 186-187 °C com decomposição.

O espectro de UV (Fig. E-6) apresenta absorções em 232.7 e 277.6 nm, indicando a presença de um sistema aromático e -NH ligado ao anel. O espectro de IV, (Fig E-8) tem uma banda larga em 3200 cm^{-1} , típica de OH. Em 1650 cm^{-1} aparece uma série de sinais de baixa intensidade que são associados à aromaticidade. Em 1520 cm^{-1} uma banda fina, de intensidade média, é associada a C-N.

O RMN ¹H, (Fig E-9) mostra claramente os sinais de prótons aromáticos, deslocados em δ 7.2 e δ 6.7 cuja integração forneceu a proporção relativa de 1:3.

O espectro de massa, (Fig. E-7) confirma as informações obtidas nos espectros anteriores. Apresenta um M^+ em m/e 109 e uma abundância isotópica correspondente à fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}$ (grau de insaturação = 4). O composto isolado foi caracterizado como p-amino fenol, conforme verificado pela comparação destes dados com os obtidos na literatura (pf 187 °C) [89] , e por

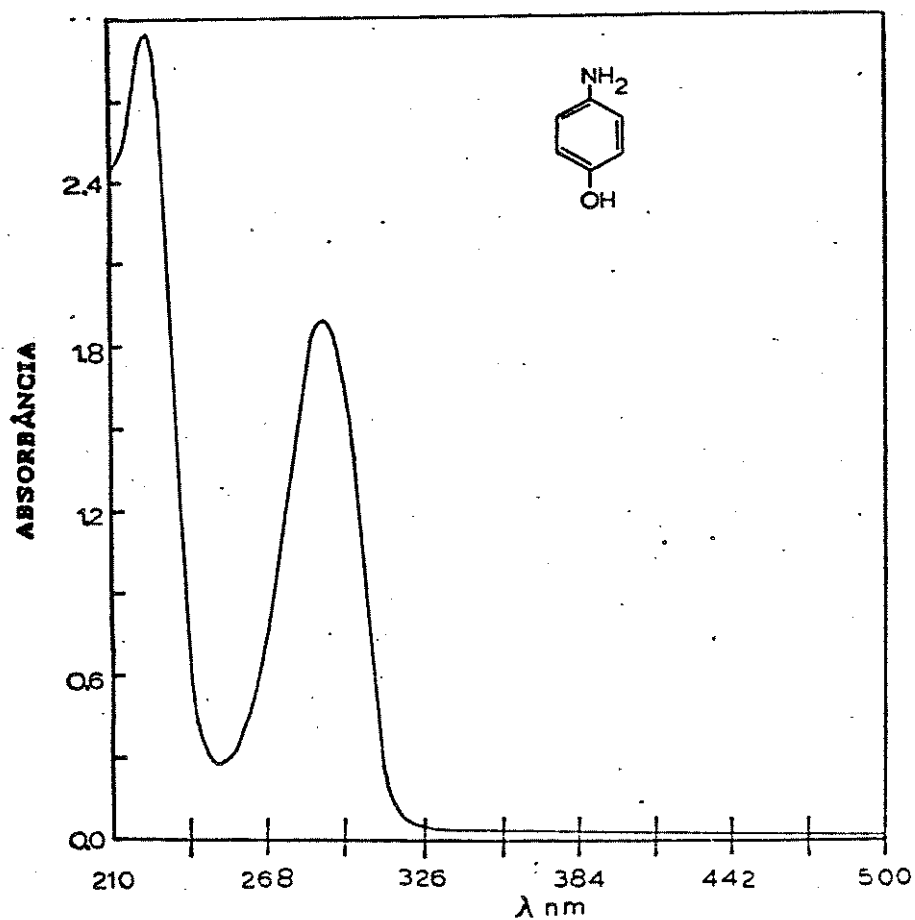


Fig. E-6: Espectro de UV do composto 30

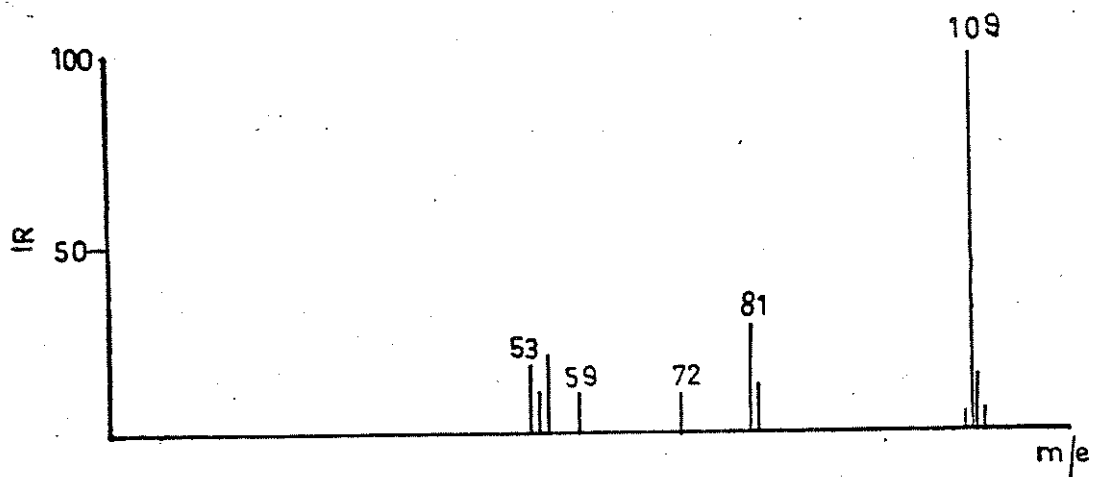


Fig. E-7: Espectro de massa do composto 30

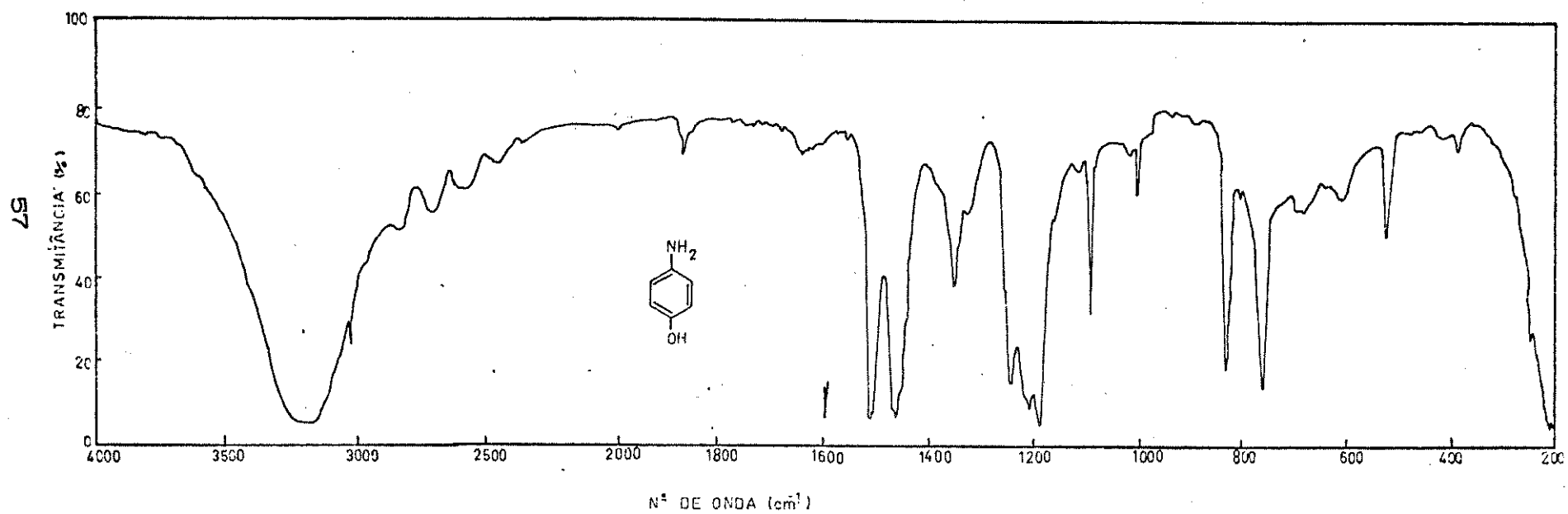


Fig. E-8. Espectro de IV do composto 30 em pastilha de KBr.

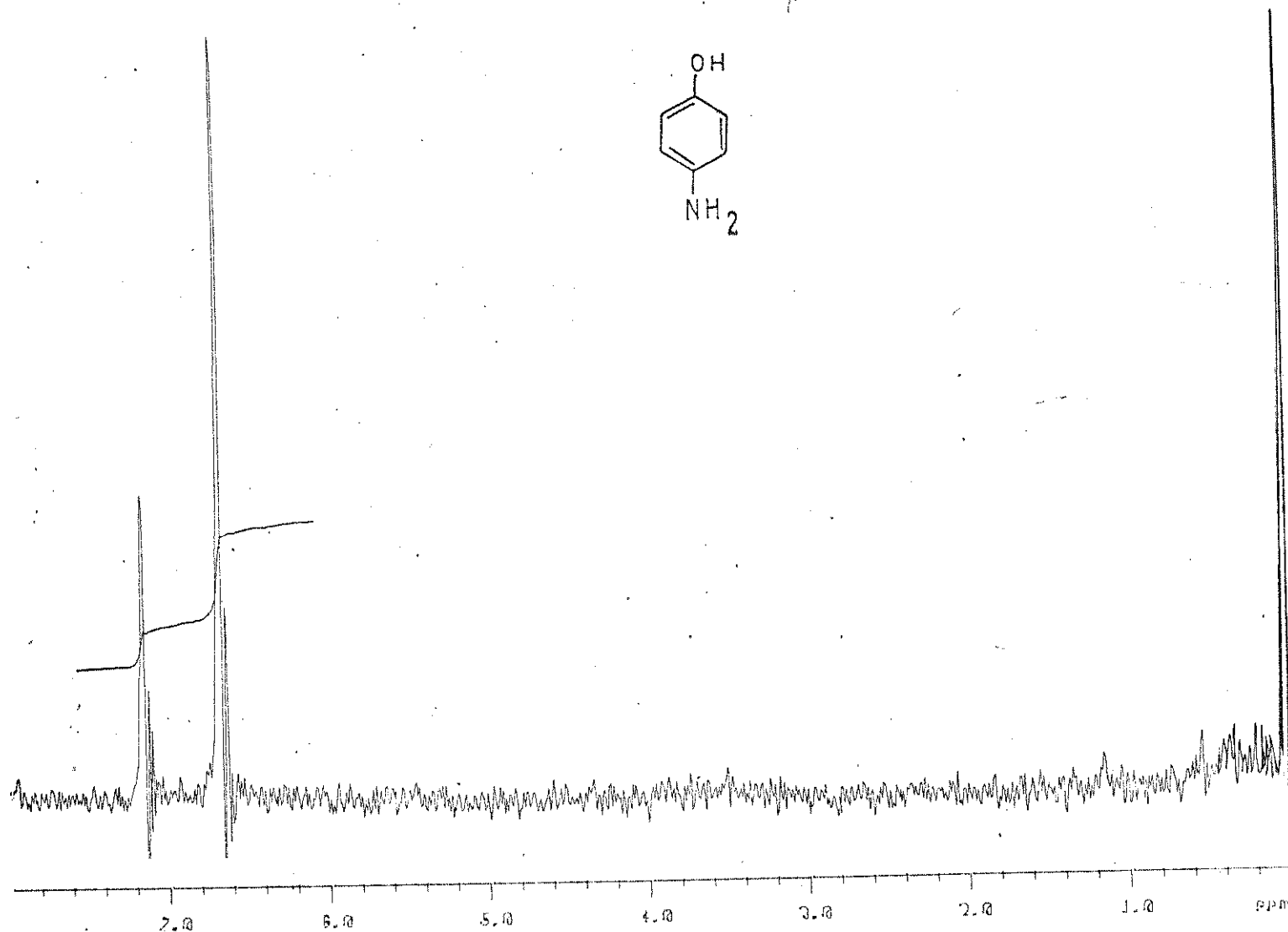


Fig. E-9. Espectro de RMN^1H do composto 30 em TFA. (80 MHz)

comparação das propriedades espectroscópicas e de c.c.d. com a amostra autêntica de qualidade Merck.

Composto 31.

UV, $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm (log ϵ) : 253.1 (5.65), 302.7 (5.64), 314.8 (5.17),
356.0 (5.63).

IV, ν $\text{cm}^{-1}/\text{KBr}$: 3320, 3240, 3000-2500, 1670.

RMN¹H, DMSO D_6 , δ : 7.2 (t, 2H), 6.6 (d, 1H), 7.8 (d, 1H), 6.4 (s,
1H), 6.8 (s, 1H), 7.8 (s, 1H).

EM m/e (%) : M^+ 137 (66), 119 (100), 82 (60), 81 (15).

Solúvel em acetona, dimetil sulfoxido, éter etílico e clorofórmio, cristalizando em etanol a quente em forma de placas amarelas que fundem a 145 °C.

O espectro de UV, (Fig.E-10) apresenta absorções a 253.1, 302.7, 314.8 e 356.0 nm, características de anel aromático. O IV, (Fig. E-12) apresenta 2 bandas finas, de pouca intensidade, na região de 3320 e 3240 cm^{-1} , indicando a presença de N-H primário; A banda larga em 3000-2500 cm^{-1} , corresponde a -OH de ácido carboxílico sendo confirmada a atribuição devido ao sinal, referente à carbonila do ácido em 1670 cm^{-1} .

O total dos prótons, (no RMN¹H, Fig.E-13) se encontram na região dos aromáticos e podem ser relacionados da seguinte forma: a δ 7.8 (d, 1H), próton α à carboníla, δ 7.2 (t, 2H) e δ 6.6 (d.

1H) para próton α à amino.

Estas características sugerem um anel aromático orto substituído. Atribuição aos sinais do resto do espectro é muito difícil, δ 6.4 (s, 1H), δ 6.8 (s, 1H), δ 7.7-7.9 (s, 1H).

No espectro de massa, (Fig. E-11) pode-se observar o íon molecular (M^+) a 137 unidades de m/e , o que corresponde a uma fórmula molecular de C_7H_7NO (cinco insaturações). Estas informações indicaram que o composto é o ácido antranílico (pf 146 °C) [89] , o que foi confirmado por comparação do produto isolado com amostra autêntica de qualidade Aldrich.

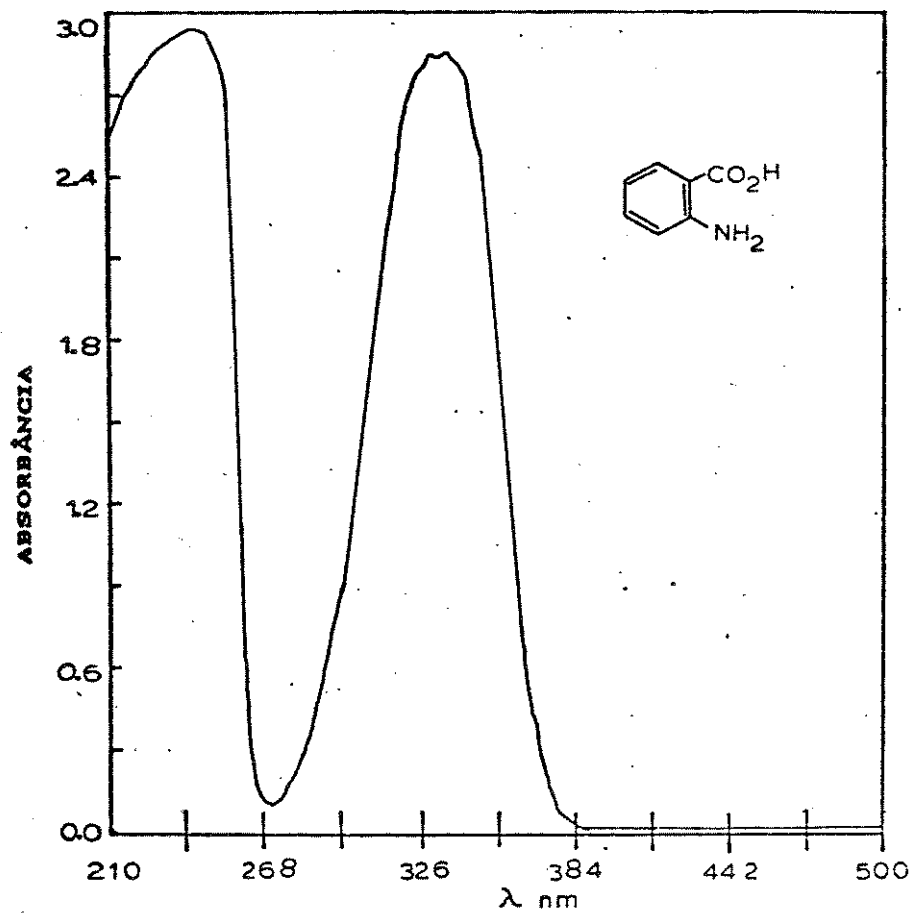


Fig. E-10: Espectro de UV do composto 31

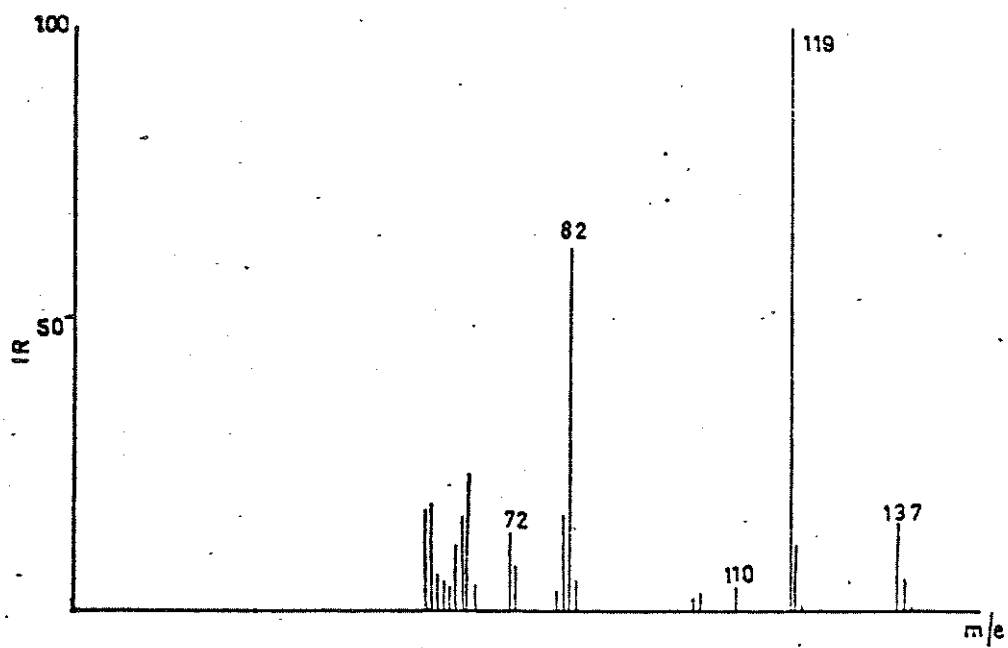


Fig. E-11: Espectro de massa do composto 31

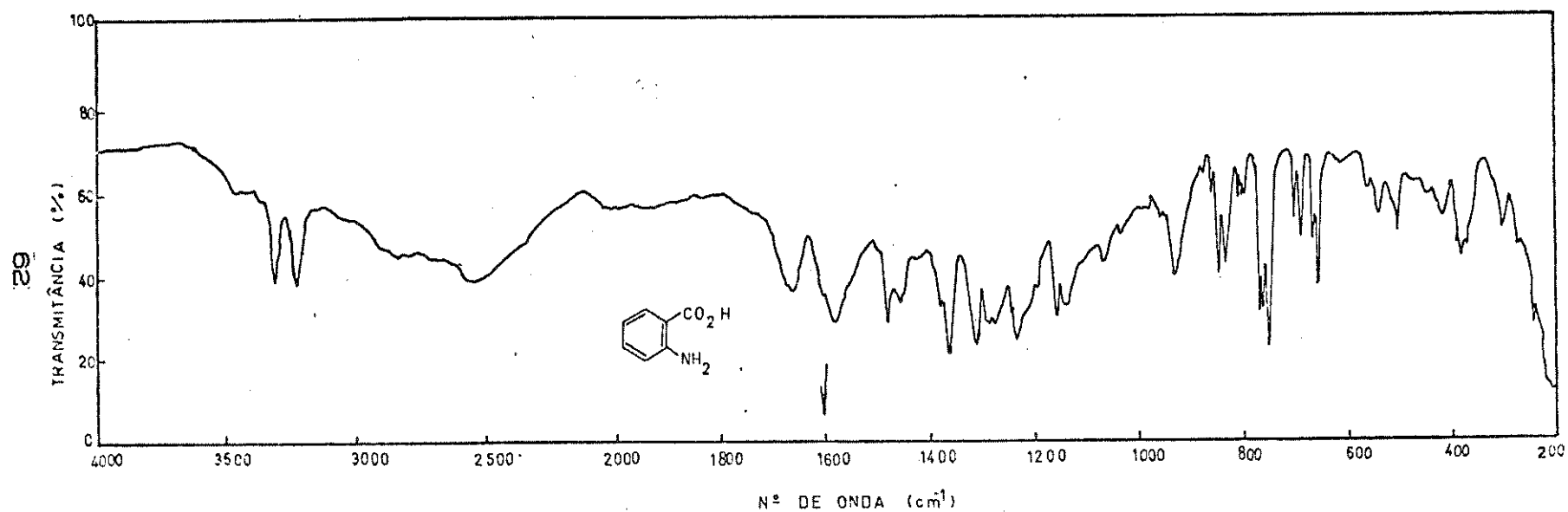


Fig. E-12. Espectro de IV do composto 31 em pastilha de KBr.

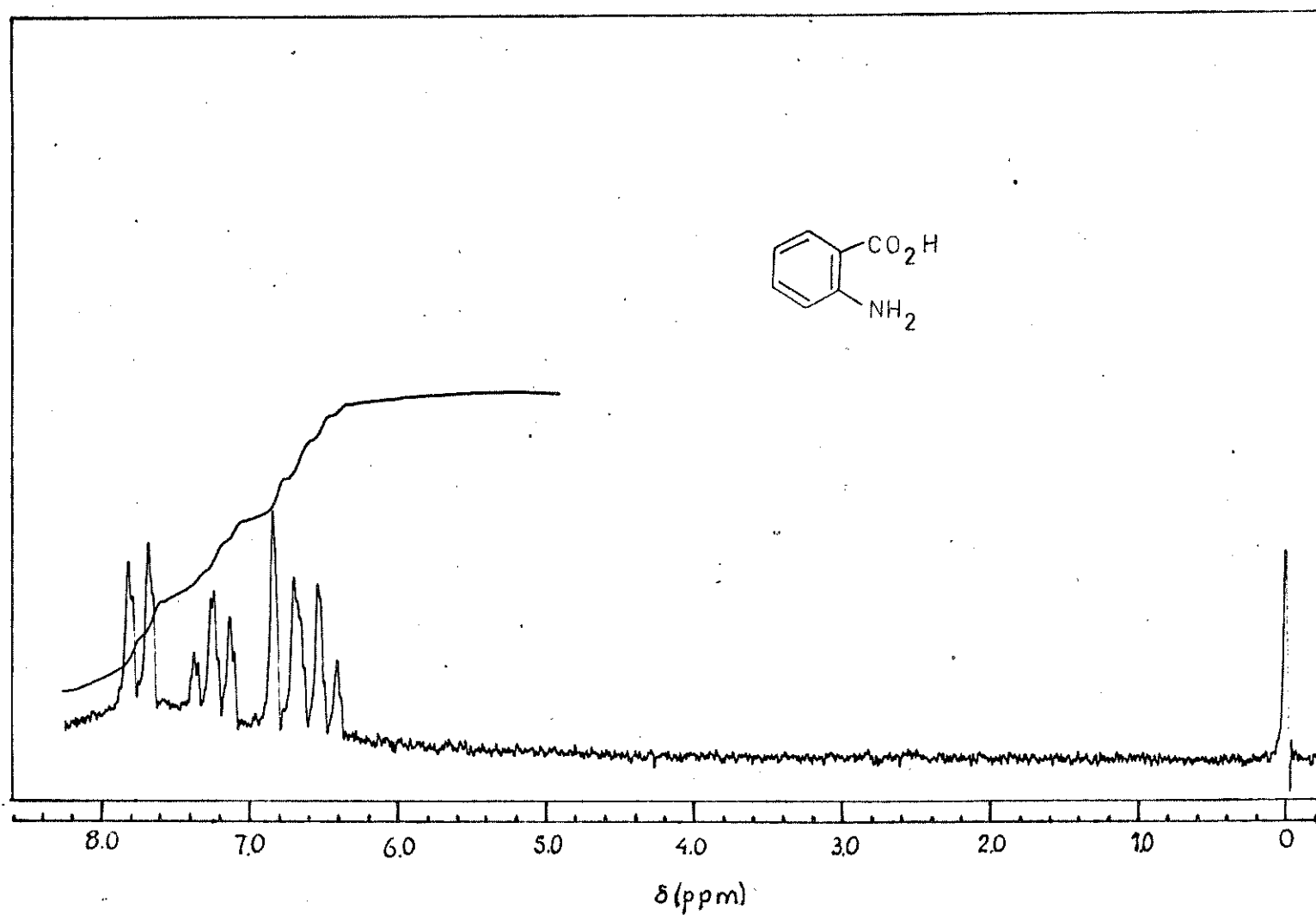


Fig. E-13. Espectro de RMN^1H do composto **31** em CDCl_3 .

Tanto a isatina como o p-aminofenol e o ácido antranílico são, na verdade, compostos muito conhecidos. Nosso objetivo, não é só procurar novos compostos biossintetizados pela cepa nativa ou a cepa irradiada, mas também é dirigir o estudo ao sistema enzimático que biossintetiza o composto 1, o que tem uma especial relevância, já que a presença de ácido antranílico sugere fortemente que a luz UV inibe o sistema enzimático da síntese de indol ou de algum outro núcleo derivado de violaceína e por tanto, desviando por tanto, o caminho metabólico normal da bactéria na biossíntese do composto 1. Um outro antecedente observado, é quando a bactéria é irradiada em meio líquido; a cepa aparentemente mutante obtida é separada do meio e após a 7^a ou 8^a repicada o sistema enzimático desta bactéria aparentemente mutante regenera-se, voltando a sintetizar o composto 1. Quando a 10 ml do caldo remanescente, livre de bactérias, foram adicionados 100 µL de solução padrão (0.3 mM) de isatina em luz visível (por 24 horas), quantidades observáveis de composto 1 foram sintetizadas. Um resultado adverso foi obtido na ausência de luz.

Os cultivos da cepa nativa foram feitos em meio tioglicolato sólido (vide item II.B.1-pg 19) e em meio tioglicolato líquido (vide item II.B.3-pg 20 e vide item II.D.1-pg 24) e uma comparação destes meios é apresentada na tabela 4.

Tabela 4. - Produção do Composto 1 em Diferentes Meios

meio	extrato crú(mg)	comp. <u>33</u> (mg)*	comp. <u>1</u> (mg)	rendimento (%)	extrato de caldo (g)#
sólido	122	desprezível	63	51.2	não tem
líquido shaker	87	16	51	58.6	H ⁺ , 1.9
líquido biorreator	230	52	157	68.2	H ⁺ , 3.0
líquido biorreator	197	50	124	62,9	OH ⁻ , 2.4

* obtido por c.c.d. sistema a (II.D.3-pg.25) # caldo ácido ou básico e extraído

Com uma média de 65 % de rendimento do composto 1, a partir dos extratos crú provenientes dos meios líquidos dos biorreatores (esquema III), demonstrou-se que esta é a melhor condição para o cultivo de *Chromobacterium violaceum*. Aproximadamente o dobro de composto 1 é obtido em comparação ao obtido em outros meios, isto porque a probabilidade de renovação de nutrientes nas condições líquidas é maior e o crescimento celular favorecido.

Quando o extrato clorofórmico ácido, livre de bactéria, foi destilado a pressão reduzida, obteve-se um composto de odor forte (composto 32) cujo comportamento no espectro UV de solução

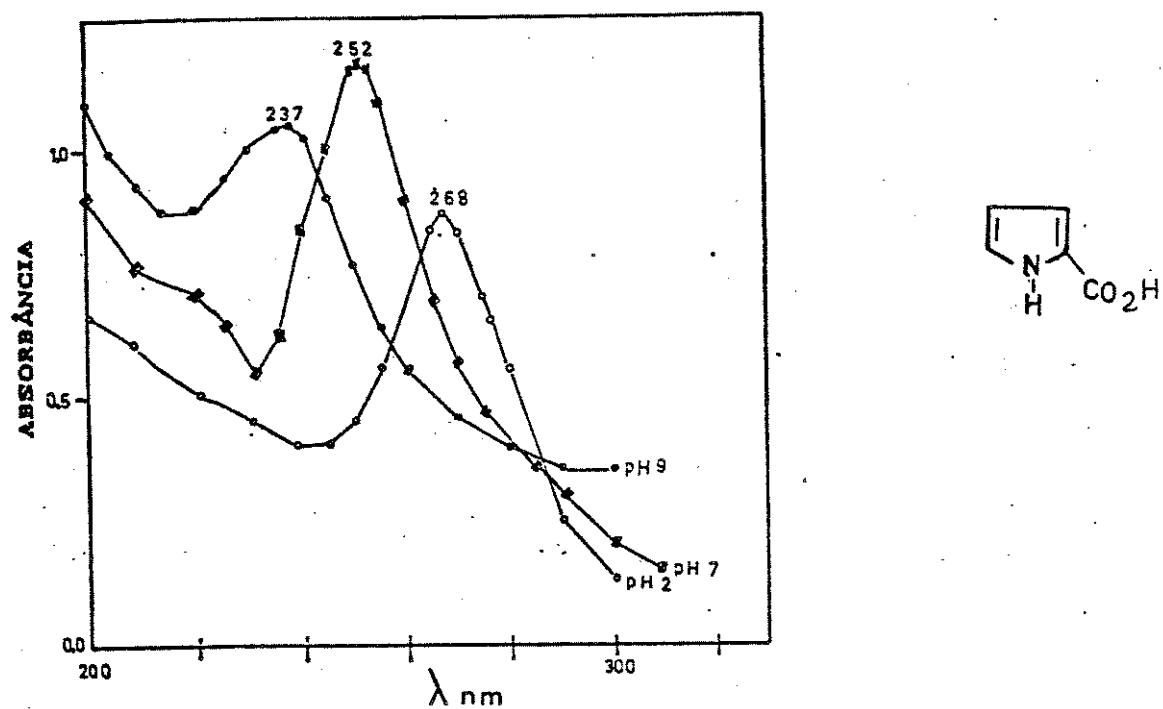


Fig. E-14: Espectro de UV do composto 32 a diferentes pH.

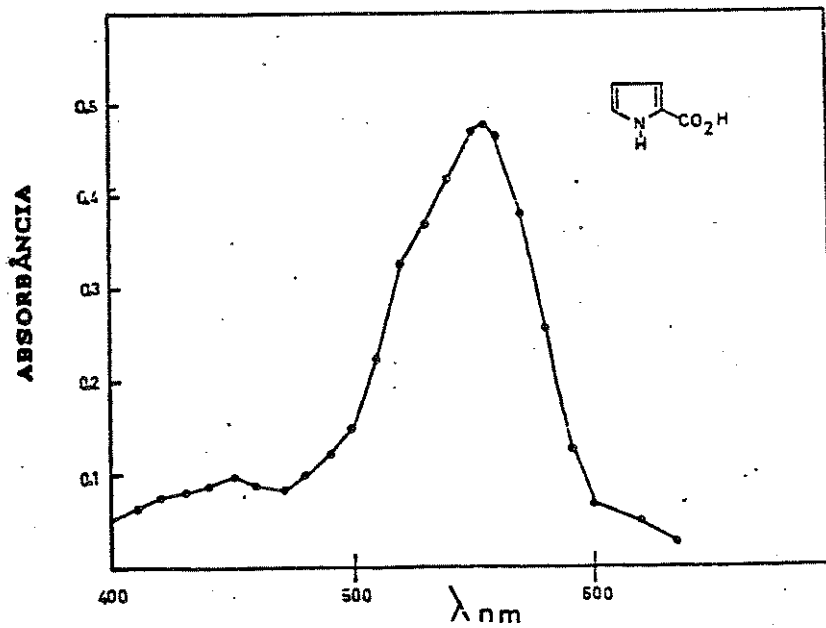


Fig. E-15: Espectro visível do produto da reação do composto 32 com reagente de Ehrlich.

etanólica em meio ácido e/ou básico, (Fig.E-14) segundo foi descrito por Corpe [102] deve corresponder ao ácido pirrol-2-carboxílico. A confirmação foi feita por comparação do espectro visível (cor vermelha intensa) do produto formado na reação entre uma solução etanólica do composto 32 com reagente de Ehrlich (vide item II.D-1 pg.24) (Fig. E-15).

Durante a purificação do composto 1 (por cromatografia de coluna sistema a) (vide item II.A-pg 16) foi obtido um produto minoritário nas primeiras 6 frações eluídas (cada uma com um volume de 10 ml de eluente). Quando o extrato acetato de etila ácido, livre de bactérias, é recromatografado em c.c.p. sistema f (sílica gel, cloroformio/etanol (90:10)), (ver esquema I pg 21) obteve-se o mesmo produto, denominado composto 33.

Dos 212 mg obtidos desta fração 1-6, obtiveram-se 57 % do composto 33, após terem sido recromatografados por c.c.p. sistema i (sílica gel, benzeno) (2 vezes) e sistema c (sílica gel, clorofórmio (1 vez). Esta substância se apresenta como um sólido amarelo que cristaliza a partir de acetona/éter de petróleo e funde a 141-142 °C com decomposição.

Composto 33.

UV, $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ξ) : 233 (3.77), 251.5 (3.75), 297.5 (3.56).

IV, ν cm⁻¹/KBr : 3340, 2980, 1675, 1625-1610, 1480, 1420.

RMN¹H, CDCl₃, δ : 1.40 (t, 3H), 2.75 (s, 3H), 4.40 (q, 2H), 6.75

(dd, 1H), 7.30 (d, 1H), 7.50 (d, 1H).

EM m/e (%) : M^{+2} (1.69), M^{+1} (12.5), M^{+} 220 (94.5), 205 (12), 192 (32), 191 (100), 176 (11) 175 (75), 174 (29), 163 (3), 148 (12), 147 (20), 146 (18), 119 (10), 118 (11), 107 (6), 91 (16), 90 (5), 89 (10), 77 (12), 65 (32).

RMN ^{13}C , $CHCl_3$, TMS, δ : 14.3 (q), 14.7 (q), 60.4 (t), 106.7 (s), 111.2 (d), 112.6 (d), 127.2 (s), 148.4 (s), 152.4 (s), 164.3 (s), 1164.5 (s).

O espectro de UV, (Fig.E-16) apresenta absorção em 233 nm, que pode ser associada à carbonila. A absorção em 255.7 nm indica a presença de um sistema altamente conjugado (transição $\pi \Rightarrow \pi^*$). A absorção em 297.5 nm corresponde a uma absorção característica de um sistema aromático ligado a heteroátomo (transição $n \Rightarrow \pi^*$).

O IV, (Fig.E-18) apresenta bandas de -OH fenólico em 3340 cm^{-1} , de carbonila em 1675 cm^{-1} e na região de 1620 a 1590 cm^{-1} sinais de C=C e C-O. A presença de um sistema alifático é observada na região de 1480 e 1420 cm^{-1} respectivamente.

O espectro de RMN 1H , (Fig.E-19) mostra um triplete em δ 1,45 ($j=7$ Hz) cuja integração corresponde a 3 H de metila alifática, ligada a um metileno α a um heteroátomo (oxigênio), o qual se apresenta como um quarteto em δ 4,48 ($j=7$ Hz). Em δ 2,78 apresenta um singlete, que integrado para 3 H, que corresponde ou a uma metila ligada a sistema aromático ou a dupla ligação. Os sinais na região aromática sugerem um anel tri-substituído, apresentando um

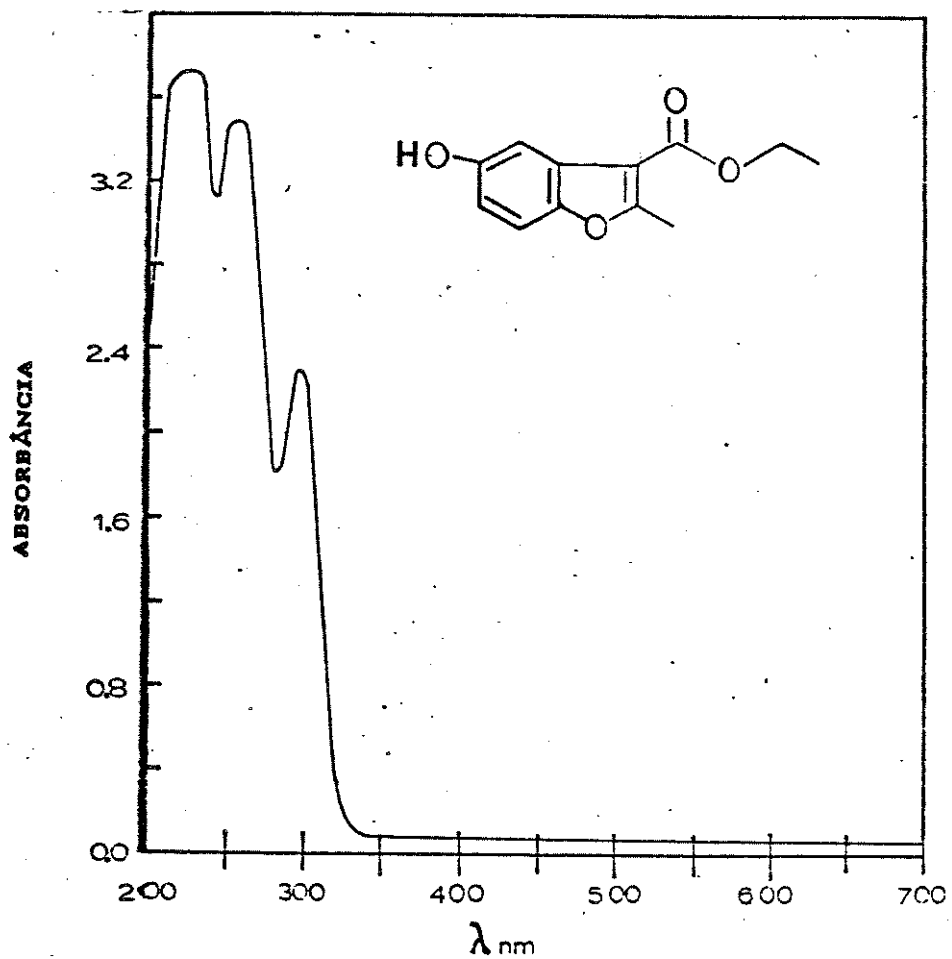


Fig. E-16: Espectro de UV do composto 33

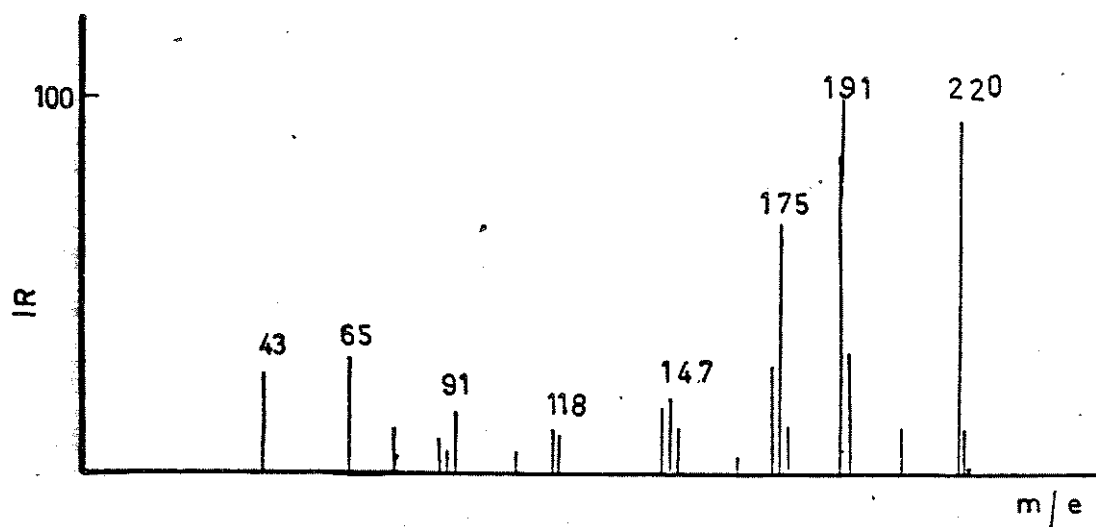


Fig. E-17: Espectro de massa do composto 33

duplo dublete com $j_o = 9$ Hz e $j_m = 2$ Hz em δ 6,85, que corresponde a 1 H, pela integração. Deslocamentos químicos correspondentes aos dubletes em δ 7.30, para 1 H ($j_o = 9$ Hz) e em δ 7.55 ($j_m = 2$ Hz), para 1 H, também são característicos..

No espectro de massa (Fig. E-17 e na tabela 5) o íon molecular m/e 220 (100) e os picos M^{+1} (13.22) e M^{+2} (1.78) indicam, após da eliminação das possibilidades de fórmulas tendo um número ímpar de átomos de nitrogênio, que devemos considerar fórmulas contendo C, H, O, e número par de átomos de nitrogênio. O pico M^{+2} é muito pequeno para considerar halogênios, mas não para oxigênio. Vê-se que não mais estamos com um composto contendo 4 oxigênios(esquema VI)

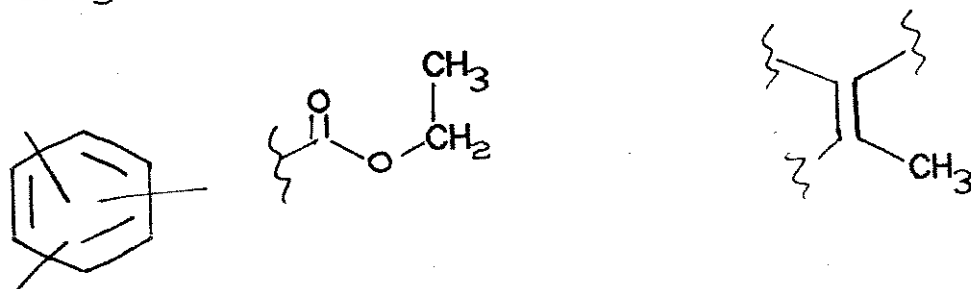
Subtraindo-se de 220 a massa dos 4 oxigênios obtem-se m/e 156 e considerando-se M^{+1} (13.22), indica que temos 12 átomos de carbono fato que elimina a possibilidade da presença de 2 nitrogênios. De acordo com os dados experimentais e os calculados indicam certamente a formula como $C_{12}H_{12}O_4$ (6 insaturações).

Tabela 5. -Correlação Isotópica do Composto 33

m/e	Abundancia relativa	Normalização (experim.)	12xC	1xO	4xO	calculado
220	94.5 $\pm$ 9.5	100	100	100	100	100
221	12.5 $\pm$ 1.3	13.22 $\pm$ 1.7	13.2	0.04	0.16	13.36
222	1.69 $\pm$ 0.2	1.78 $\pm$ 0.2	0.80	0.2	0.80	1.60
223	0.1 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.2	---	---	---	0.2.

Com os dados entregados até agora pode-se sugerir os

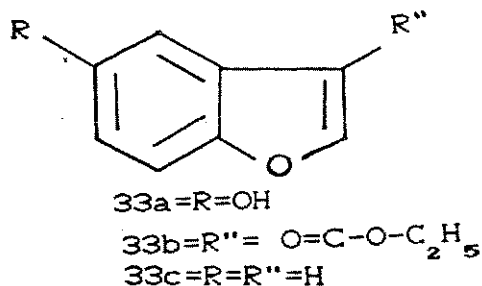
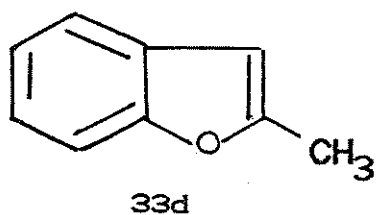
seguintes fragmentos:



O espectro de RMN¹³C apresenta dois quartetos (2 CH₃-) um triplete (-CH₂-O-), tres dubletes (=CH- de anel aromático) e sete singuletes (uma carbonila de ester, dois carbonos quaternarios de dupla ligação e tres carbonos quaternarios do anel aromático).

Correlação destes dados permitiu identificar o composto como um derivado de benzofurano. Uma pesquisa bibliográfica permitiu comparar seu espectro infravermelho e por comparação identificar o composto como 5-hidroxi-2-metil-3-carboetoxi benzofurano [125,126]

Seu espectro de ¹³C não esta informado na literatura e neste trabalho as atribuições dos sinais do ¹³C são sugeridas em base aos efeitos mesomericos e blindagem, para atribuir corretamente são necessários modelos como 5-hidroxi benzofurano 33a, 3-carboxietil benzofurano 33b, tais espectros de ¹³C não foram descritos na literatura. Os modelos disponiveis como benzofurano 33c e 2-metil benzofurano 33d não satisfacem . um fracionamento do espectro de massas e mostrado no esquema VI



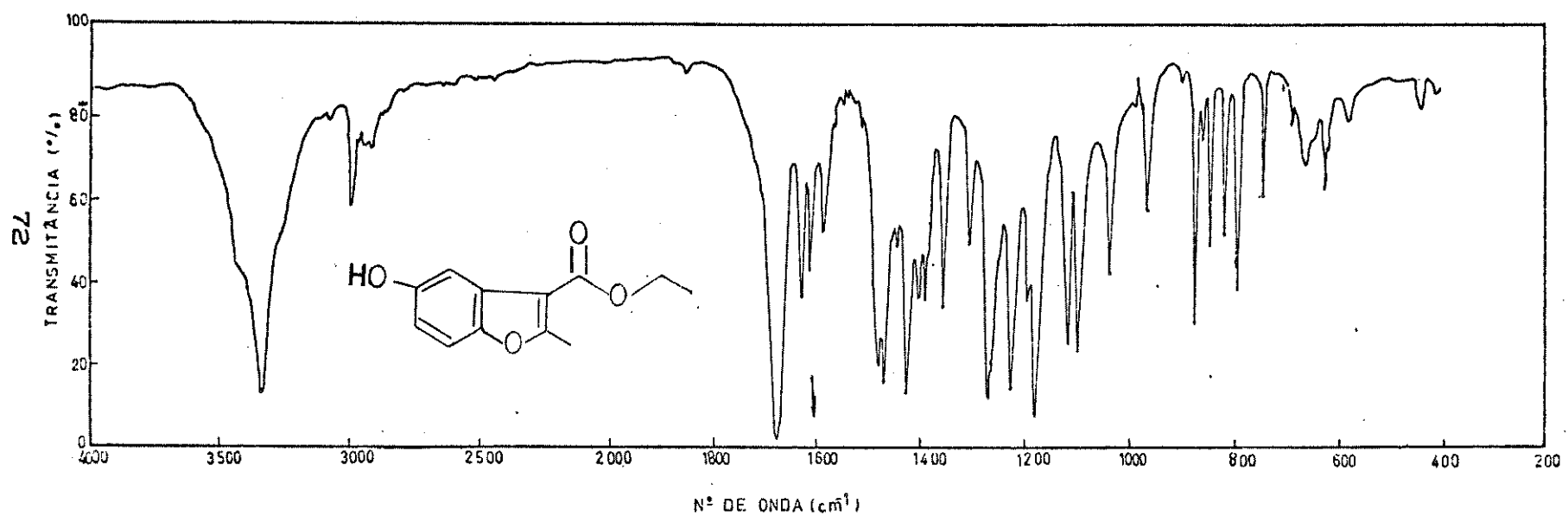


Fig. E-18. Espectro de IV do composto 33 em pastilha de KBr.

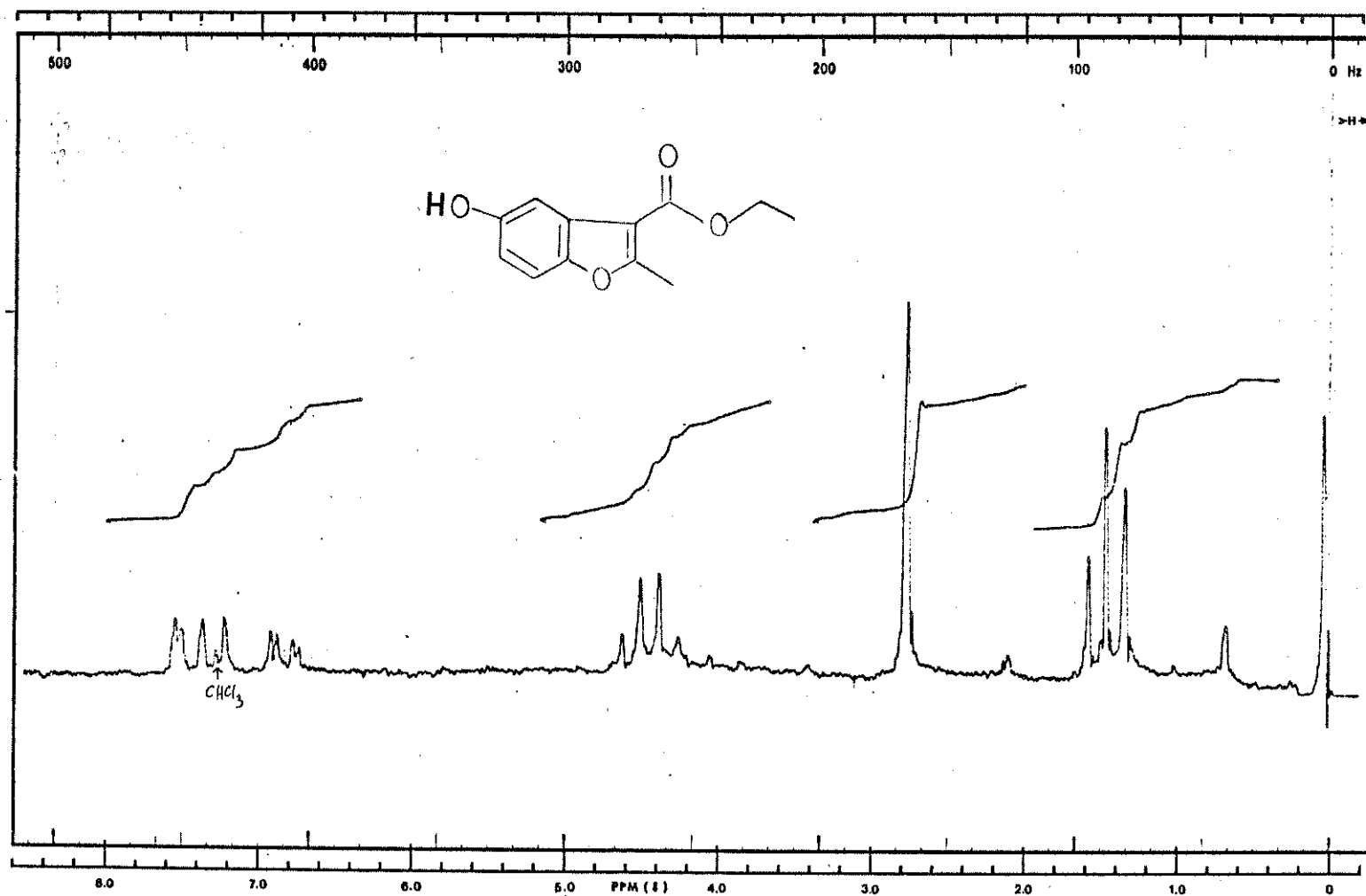
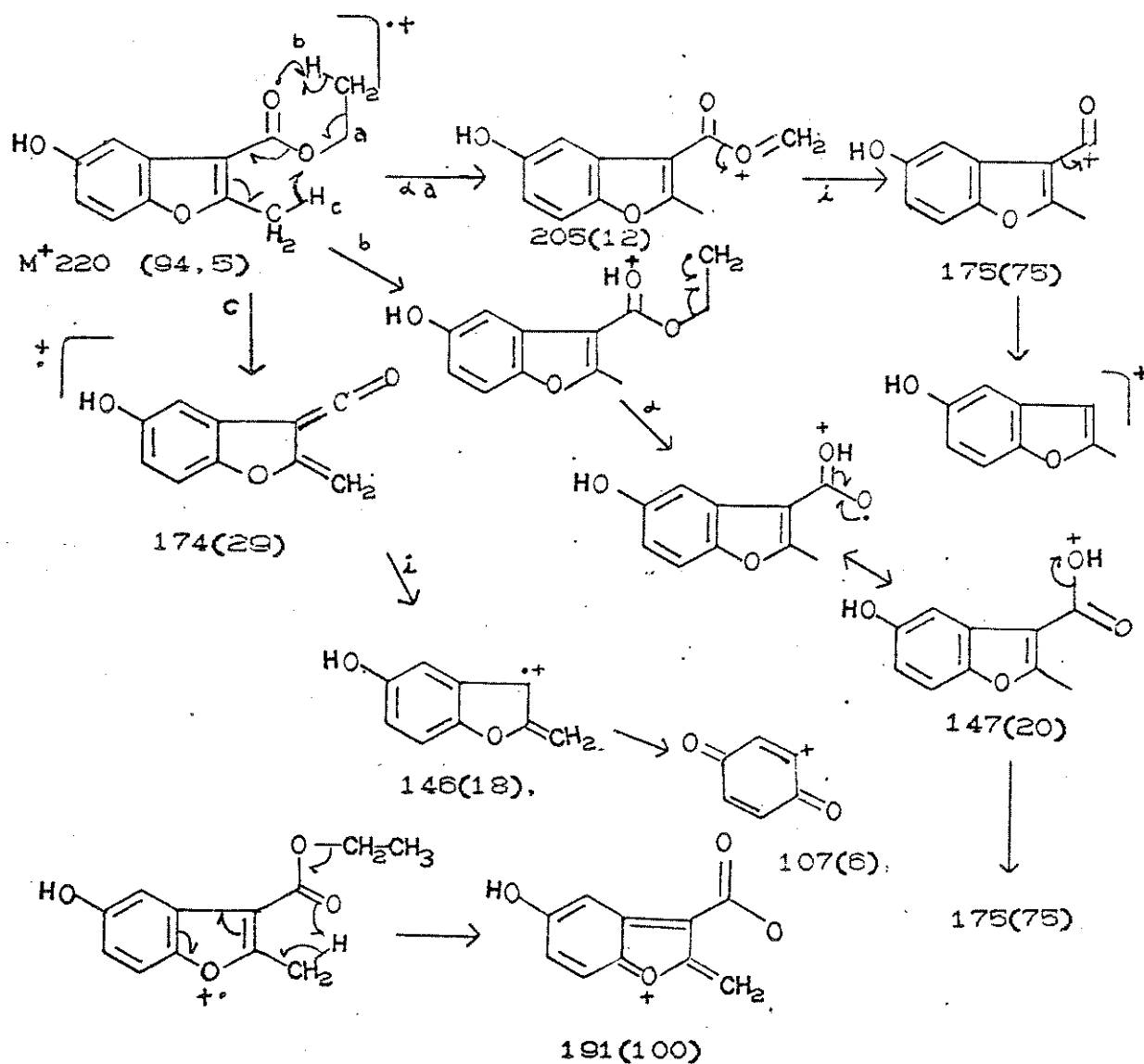


Fig. E-19. Espectro de RMN ^1H do composto **33** em CDCl_3 .



Esquema VI-Fracionamento do espectro de massa do composto 33.

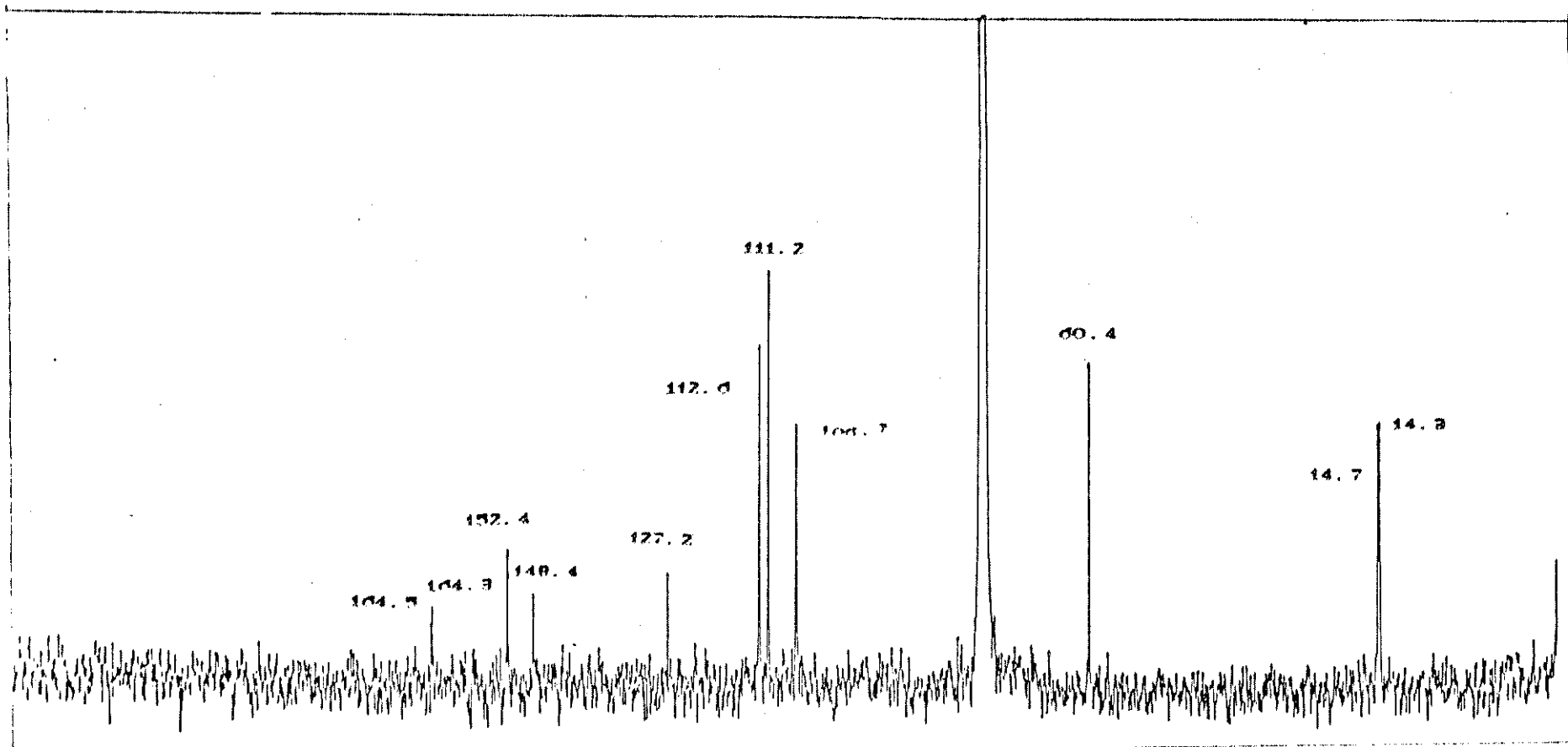
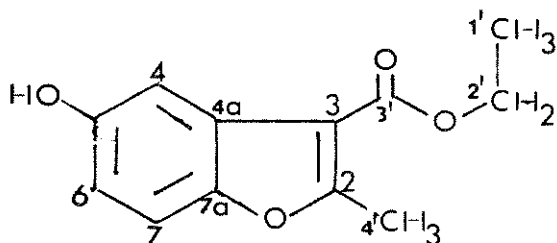


Fig.20. -Espectro de RMN^{13}C do composto 33 em CHCl_3 (XL-100, 25,2 MHz)

3-CARBOETOXI-5-HIDROXI-2-METIL, BENZOFURANO



C	RMN ¹ H δ (J cps)m	RMN ¹³ C δ
2		164.3
3		106.7
4a		127.2
4	7.4 (2) d	111.2
5		152.4
6	6.8 (9 e 2)dd	112.6
7	7.3 (9) d	111.2
7a		148.4
4'	2.7 s	14.3
3'		164.5
2'	4.4 q	60.4
1'	1.4 t	14.7

III.D. Biossíntese do Composto 1

Nosso estudo de velocidade de crescimento celular e produção do composto 1 mostrou que sua síntese foi evidente após 15 horas de incubação da bactéria, e que a velocidade da biossíntese é diretamente proporcional à concentração celular [44]. De Moss e Evans [34], e Hoshino e colaboradores [36] mostraram que L-triptofano é um precursor do composto 1. Corpe informou que outras cepas de *Chromobacterium violaceum* distintas da cepa brasileira produzem indol, pirrol e outros derivados extracelulares [102, 111].

Levando em consideração essas observações e com o intuito de induzir a biossíntese do composto 1, fizemos cultivos da bactéria utilizando compostos (modelos) que apresentam características estruturais ou partes da sua estrutura, tais como triptofano, derivados de triptofano e isatina.

Na figura 11 pode-se observar que o crescimento celular em 36 horas de incubação é inibido a concentrações finais maiores de 18 μM de isatina (vide item II.E.1, pg. 28).

Com 6 μM (200 μL de solução padrão 0,3mM) de isatina, crescimento é favorecido, mas não a concentrações menores. Sugere-se que a presença de uma concentração de isatina maior do que o limite afeta tanto o crescimento celular como a biossíntese de 1. Isso pode ser explicado considerando que para a biossíntese de 1, a velocidade de formação de isatina é tão ou mais rápida

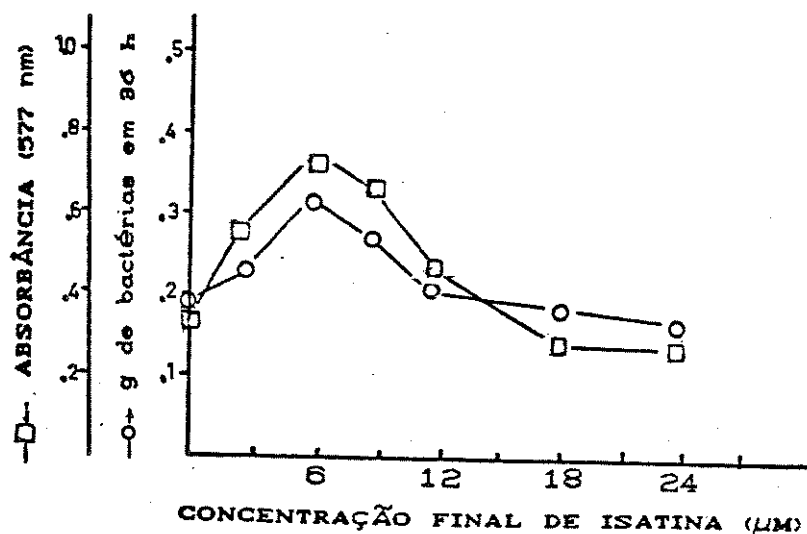


Fig. 11-Efeito de isatina 29, no crescimento celular
(volume final 10 ml)

que a velocidade de desaparecimento, fato que pode inibir o sistema enzimático de uma etapa seguinte.

O efeito de isatina (29) na velocidade de biossíntese do composto 1 pode ser verificada na figura 12 (vide item II.E.2-pg. 30).

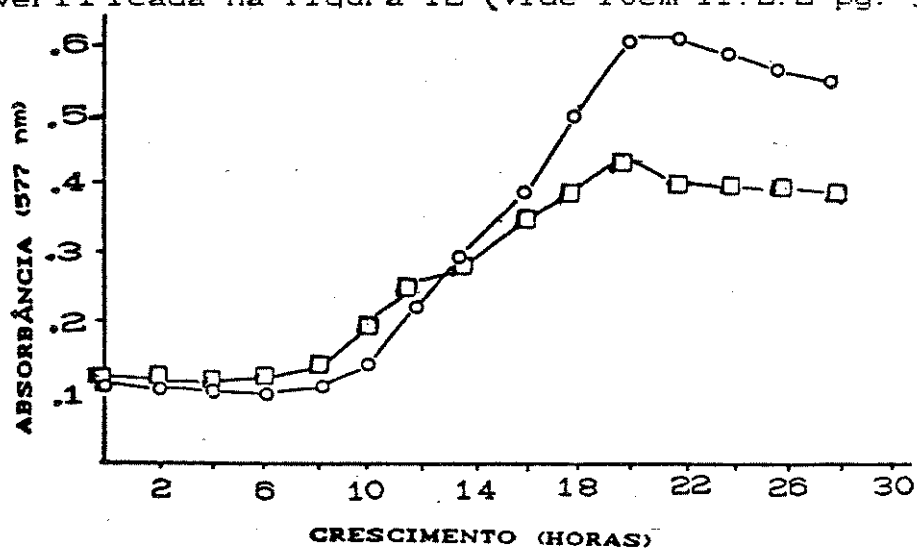


Fig.12-Efeito de isatina na biossíntese do composto 1, na presença de 6 μM (-o-) e na sua ausência (-□-).

Após 15 horas pode-se observar mudanças na velocidade de síntese, favorecendo quase 30 % a bactéria que é incubada por 20 horas com isatina. Com esses resultados pode-se supor que a isatina, realmente, é um metabólito no caminho da biossíntese do composto 1.

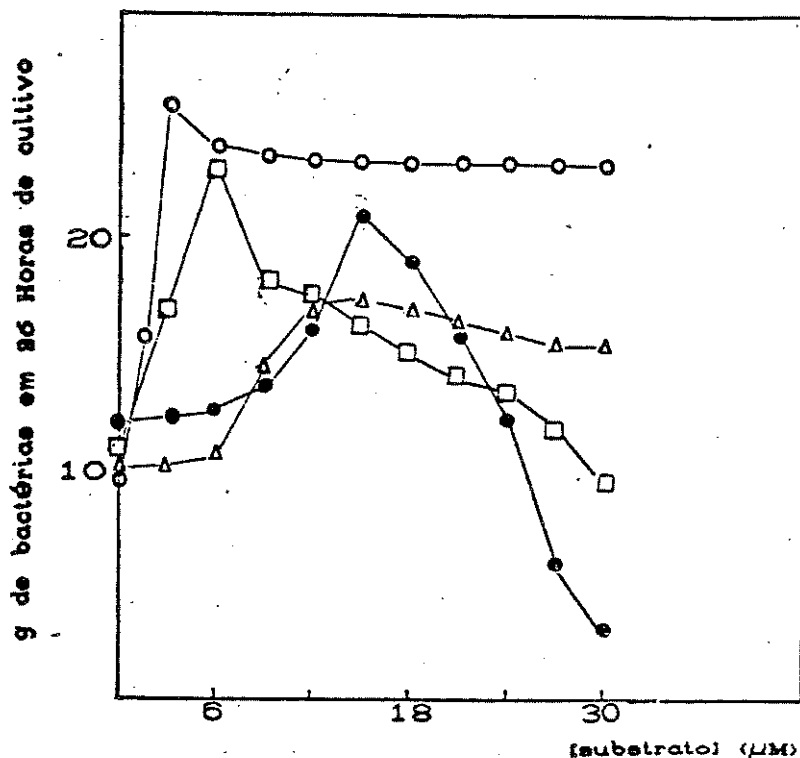


Fig.13- Efeito da concentração de (-o-) L-triptofano 5, (-Δ-) serotonina 39, (-□-) isatina 29, (-●-) ácido indolacético

Na figura 13 comparam-se os efeitos provocados por outros prováveis intermediários no crescimento celular (vide item II.E.2-pg. 30). Existe uma ligeira aproximação no efeito produzido por isatina e L-triptofano. A mesma aproximação é observada entre

serotonina e ácido indolacético. Isso poderia significar que aqueles que apresentam concentrações de efeito aproximado participem em uma mesma etapa de biossíntese, fato muito difícil de provar. Não há dúvida de que L-triptofano é o principal precursor de 1.

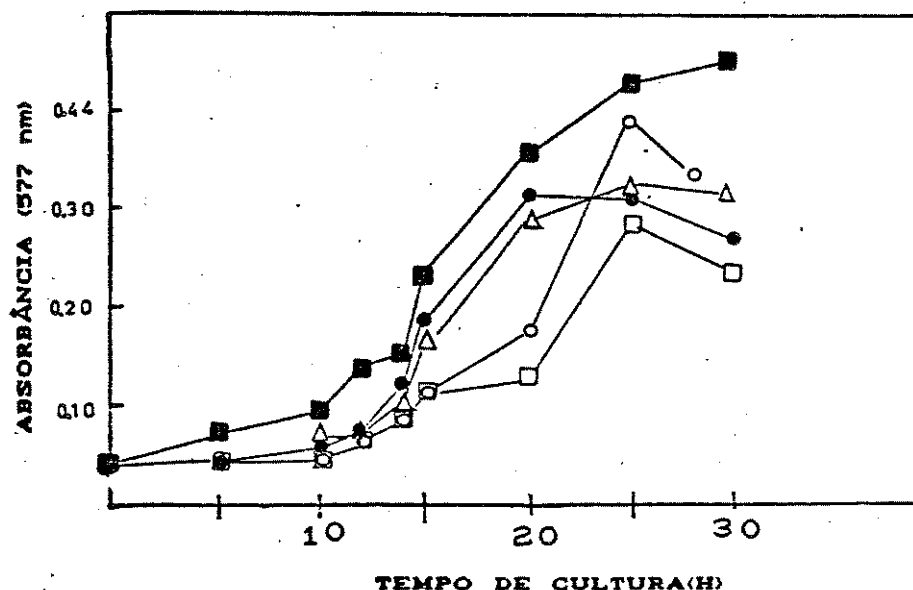


Fig.14-Efeito de (-■-) L-triptofano 5, (-Δ-) serotonina 39, (-○-) isatina 29, (-●-) ácido indolacético 40, (-□-) controle, sobre a velocidade de biossíntese do composto 1. A concentração dos substratos foi de 6 μ M (vide item II.E.2-pg. 30).

A velocidade de biossíntese do composto 1 é mostrada na figura 14. O estudo comparativo entre L-triptofano, serotonina, ácido indolacético e isatina é muito similar ao que se observou na figura 13. O controle é bem menos favorecido na velocidade em

comparação com L-triptofano e isatina, na qual o microorganismo apresenta os melhores rendimentos em crescimento celular e biossíntese do composto 1.

Os resultados obtidos com ácido indolacético-2¹⁴C, confirmaram plenamente que este metabólito é um dos intermediários da biossíntese de 1. Com um substrato marcado inicialmente com 448.6±39.7 cpm/nM de IAA (1.98×10⁻⁶ mM/mL), obteve-se 474.4±10.7 cpm/nM de composto 1 (2.7×10⁻⁶ mM/mL). Isto significa que no mecanismo de biossíntese incorpora-se apenas 1 mol de ácido indolacético, concordando com o valor dado por De Moss quando utilizou L-triptofano marcado [34], (vide item II.E.4-pg. 28).

Tab.6-Incorporação de DL-triptofano. e ácido indol-3-acético em composto 1.

	Substrato	Composto <u>1</u>	Razão.	Ref.
	cpm/μmol	cpm/μmol	comp. <u>1</u> /subs.	
DL-2- ¹⁴ C-triptofano <u>5</u>	1038	1427	1.39.	[34]
DL-3- ¹⁴ C-triptofano <u>5</u>	487	629	1.29.	[34]
2- ¹⁴ C-IAA <u>40</u> .	448.6±39.7	474.4±10.1	1.06.	Nossa

Na experiência de catabolismo de L-triptofano (vide item II.E.3-pg.30). o meio de cultivo foi feito em biorreator com dois litros de capacidade. Um grande número de derivados indólicos obtidos por catabolismo de triptofano estão descritos na literatura, [112-114]. A ideia do experimento era a de obter

alguns derivados indólicos a partir do catabolismo de L-triptofano por *Chromobacterium violaceum*, com a intenção de pesquisar novos metabólitos que provavelmente participem na biossíntese do composto 1 [115, 116].

Quando a fração retida no Sephadex G-15 foi extraída por lavagens com 70 % v/v de metanol-água, e a solução analisada por c.c.d. sistema g (isopropanol/amônia aq (25 %)/água (13:1:1)) (vide item II.E.3-pg.30), foram identificados, por comparação com amostras autênticas (qualidade Sigma), ao revelar com reagente de Ehrlich os seguintes derivados indólicos : indol aldeído 41, triptamina 42, indol-3-acético 40, indol-3-carboxílico 43, indol-3-propiónico 44 e indol-3-pirúvico 45. O esquema VI da página 73 mostra o fracionamento total.

Até agora, tentando-se entender a biossíntese do composto 1, estudamos o efeito dos vários derivados indólicos produzidos por esta bactéria. Recentemente, Hoshino e colaboradores [36] propuseram um rearranjo com deslocamento 1,2, (figura 16) onde previamente deveria participar, provavelmente, uma amida. A síntese e estrutura desta amida serão discutidas a seguir.

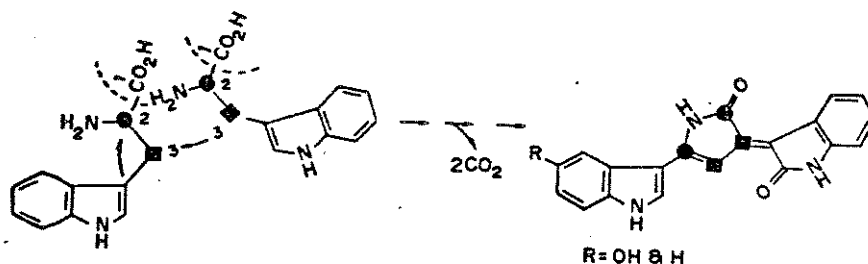


Fig.16-Mecanismo de biossíntese do composto 1 proposto por Hoshino e colaboradores [36].

O novo composto 34, sintetizado segundo a metodologia descrita por Huang e colaboradores [117, e de Durán e colaboradores [118], corresponde a N-etil-(5-hidroxiindol-3-il)-2-indoliletilen-amina (carboxamida ou simplesmente amida), solúvel em dimetil sulfóxido e éter etílico. Cristais muito finos são obtidos por recristalização com éter etílico-éter de petróleo. Seus antecedentes espectroscópicos são os seguintes :

UV, $\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}}$ nm (log ξ) : 284 (3.89), 295 (3.45).

IV, ν cm^{-1} /KBr : 2.90 (s, 2H), 3.00 (s, 2H), 4.10 (s, 2H), 6.5 (s, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.8-7.2 (OH), 9.0 (NH).

EM m/e (%) : M^{+2} (2.7), M^{+1} (22.8), M^{+} 333 (100), 146 (45), 130 (72).

O espectro de UV (Fig. E-21) apresenta sinais típicos de indol (λ 284 nm, log ξ =3.89) e de amidas aromáticas (λ 295 nm, log ξ =3.45). O espectro de IV, (Fig. E-23) apresenta banda larga e pouco intensa de N-H em 3300 cm^{-1} e em 3550 cm^{-1} , superposta pela -OH. A absorção de carboníla de amida aparece em 1675 cm^{-1} . Estes dados indicam que temos uma amida de caráter indólico, confirmada por reação positiva com o reagente de Ehrlich.

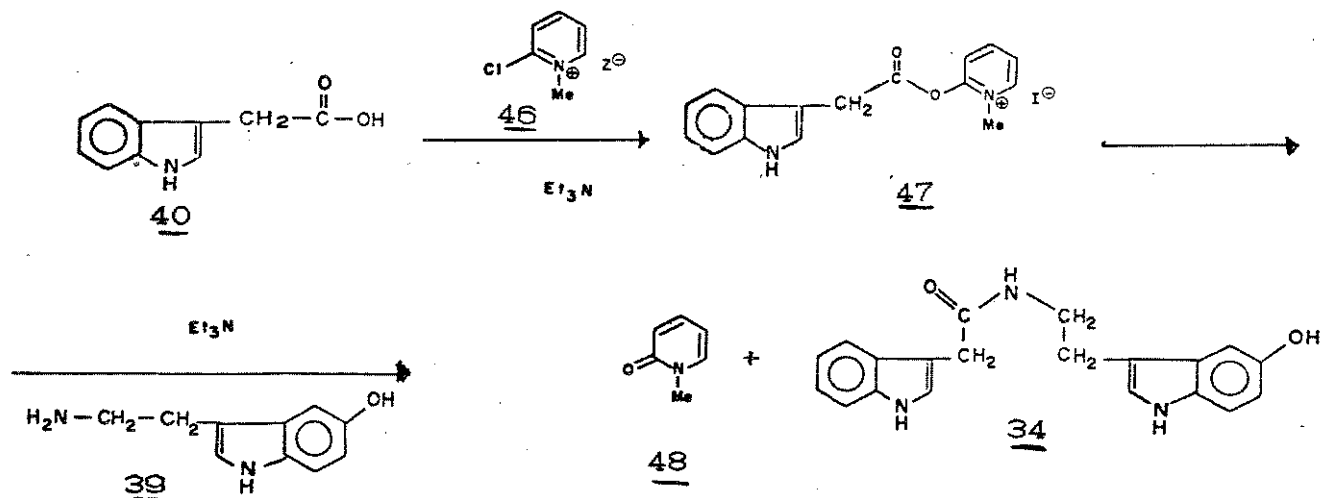
O espectro de RMN ^1H (Fig. E-24) mostra claramente os dois singletes correspondendo aos hidrogênios α e β ao nitrogênio amídico δ 3.0 e δ 2,90 ($\frac{\Delta\nu}{J}$ = muito pequeno). O singlete em δ 4,10 que corresponde ao metileno α a carboníla amídica.

A correlação isotópica de M^{+1} e M^{+2} (Fig. E-21) para o íon ímpar (m/e 333) corresponde a uma fórmula molecular com um número ímpar de átomos de nitrogênio que incrementam o pico M^{+1} , sendo que o pico M^{+2} é exclusivamente incrementado por oxigênio. Estes dados permitem indicar a fórmula $C_{20}H_{19}NO_2$, concordando plenamente com os dados experimentais, ver tabela 7.

Tabela 7. - Cálculo da Fórmula Molecular para o Composto 34

m/e	Abundância relativa	20 x C	N	3 x N	O	2 x O	Calculado
333	100	100	100	100	100	100	100
334	22.8 $\pm$ 2.3	22	0.37	1.1	0.04	0.16	23.26
335	2.7 $\pm$ 0.3	2.3	---	---	0.2	0.4	2.7
336	0.4 $\pm$ 0.2	0.2	---	---	---	---	0.2

Um mecanismo de síntese é mostrado no esquema VII



Esquema VII Mecanismo da síntese da nova carboxamida, composto 34
(vide item II.E.5-pg 33)

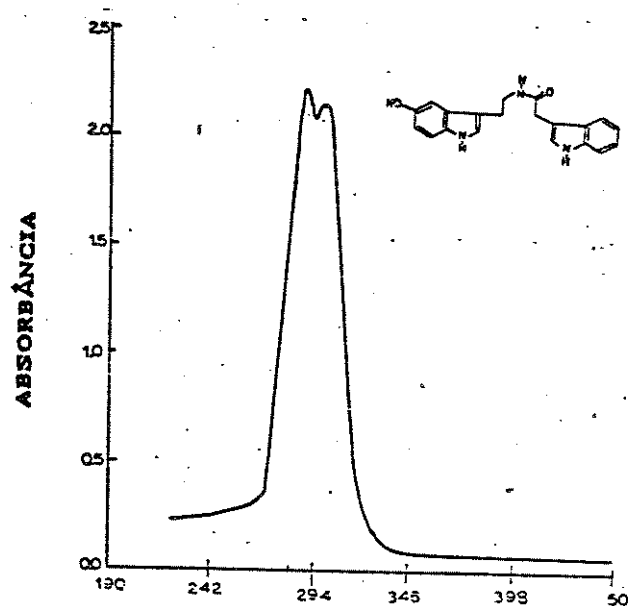


Fig. E-21: Espectro de UV do composto 34

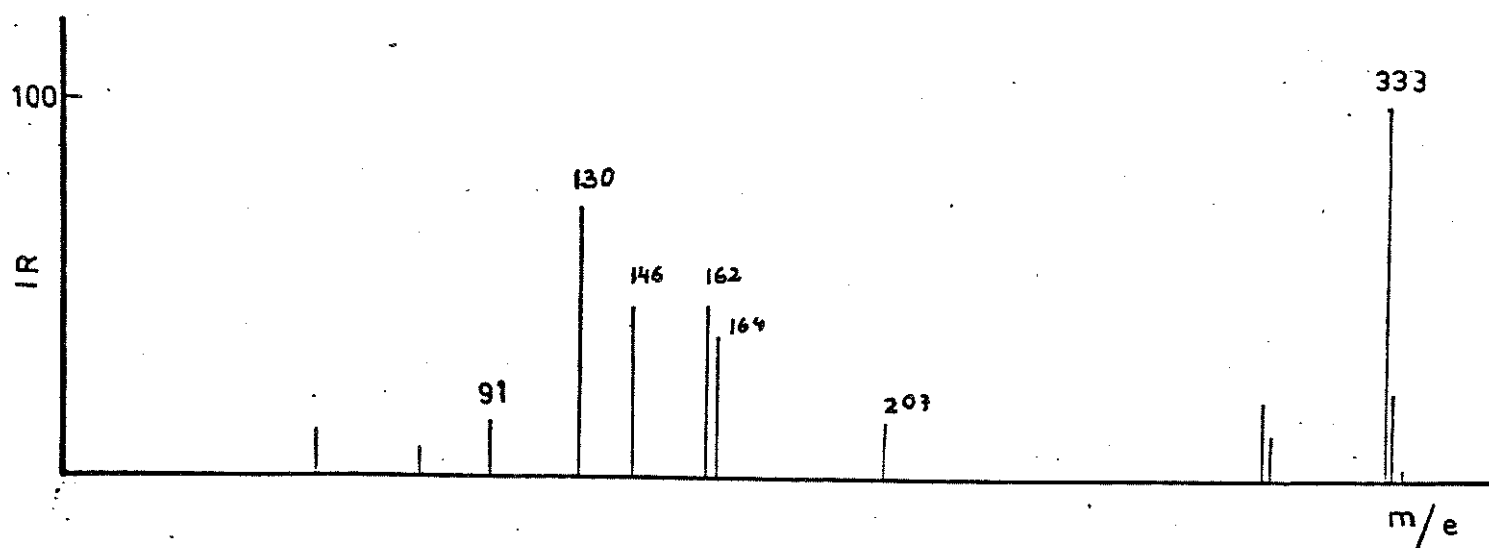


Fig. E-22 Espectro de massa do composto 34

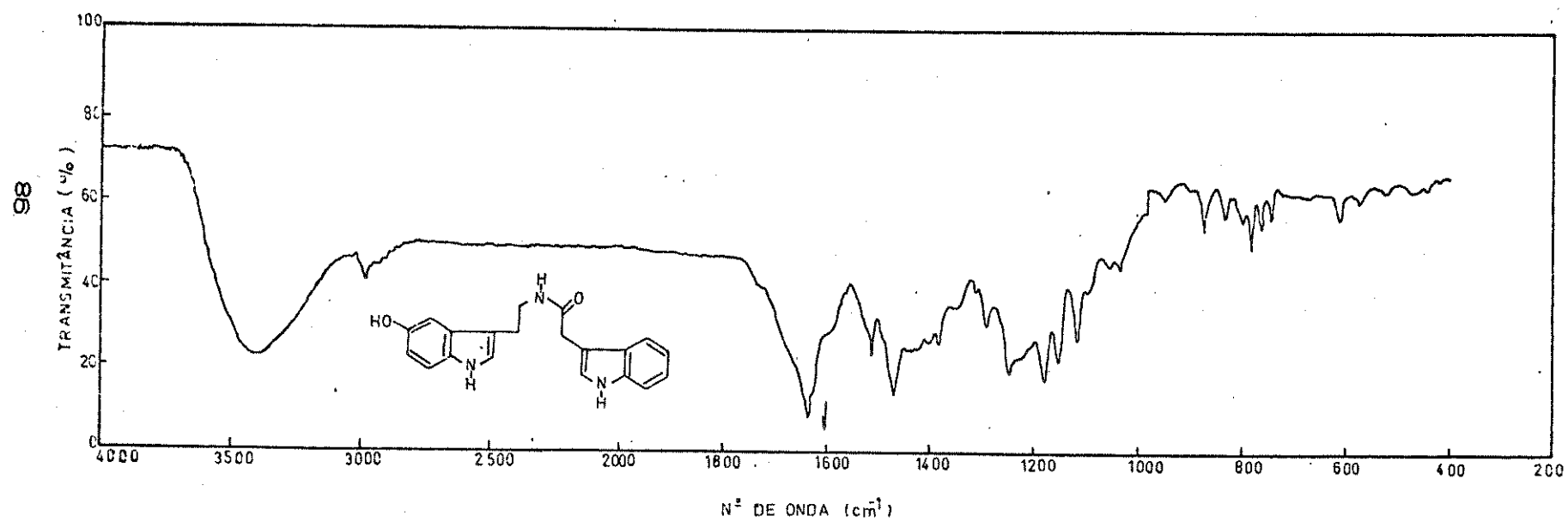


Fig. E-23. Espectro de IV do composto 34 em pastilha de KBr.

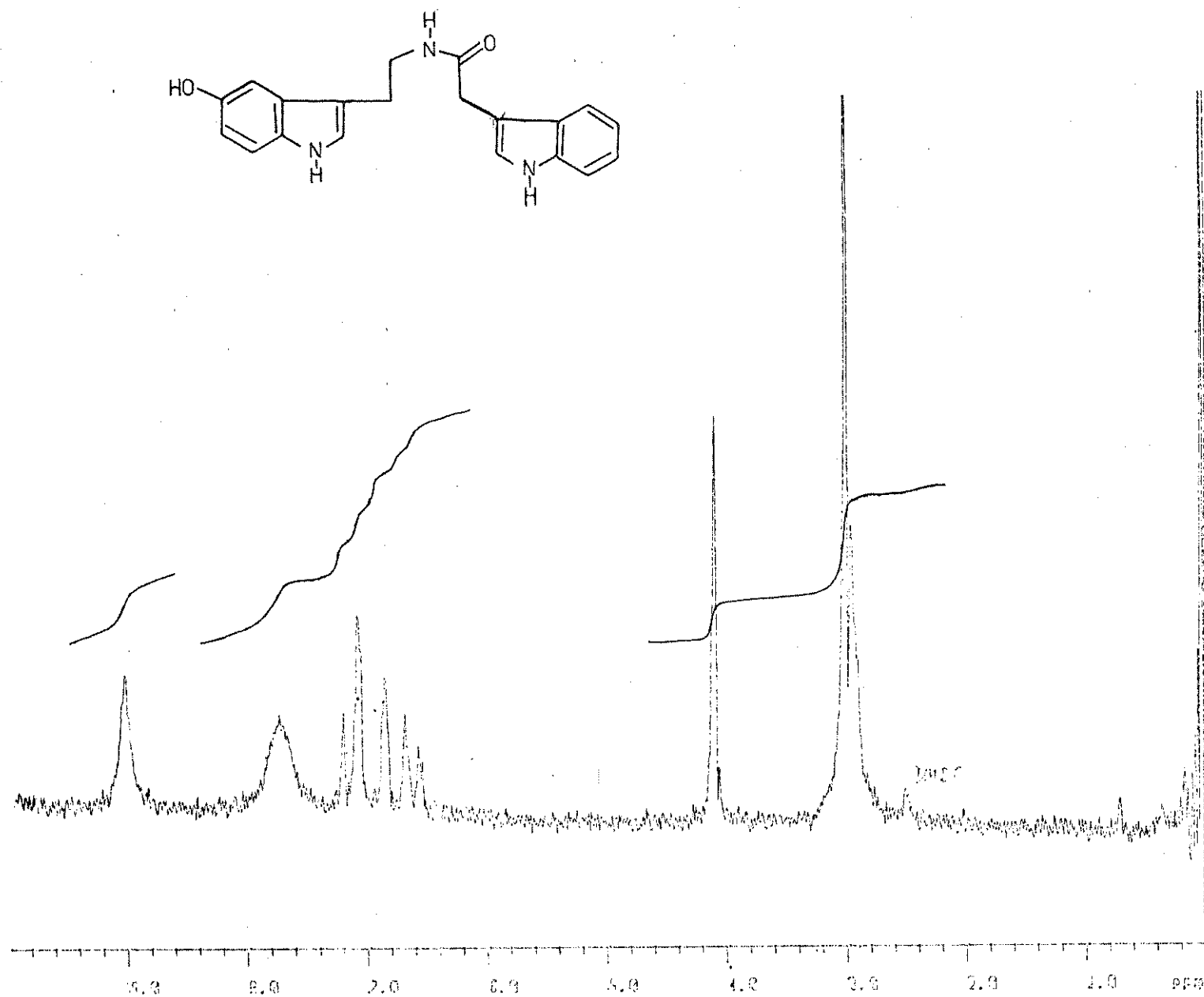


Fig. E-24. Espectro de RMN^1H do composto **34** em DMSO, D_6 (80 MHz).

A figura 16 (vide item II.E.6-pg. 34) mostra o efeito dos metabólitos sobre a produção do composto 1, expressado como razão metabólito/composto 1 em presença de L-triptofano, isatina, serotonina, ácido indol-3-acético e carboxamida. Estas razões exibem valores de 1.0, 0.75, 0.70, 0.60 e 0.32 respectivamente, indicando que os quatro últimos compostos apresentam menor efeito sobre a produção de 1, mas não necessariamente sejam menos importantes, pelo fato de que se poderia pensar que a participação destes metabólitos começa em etapas diferentes.

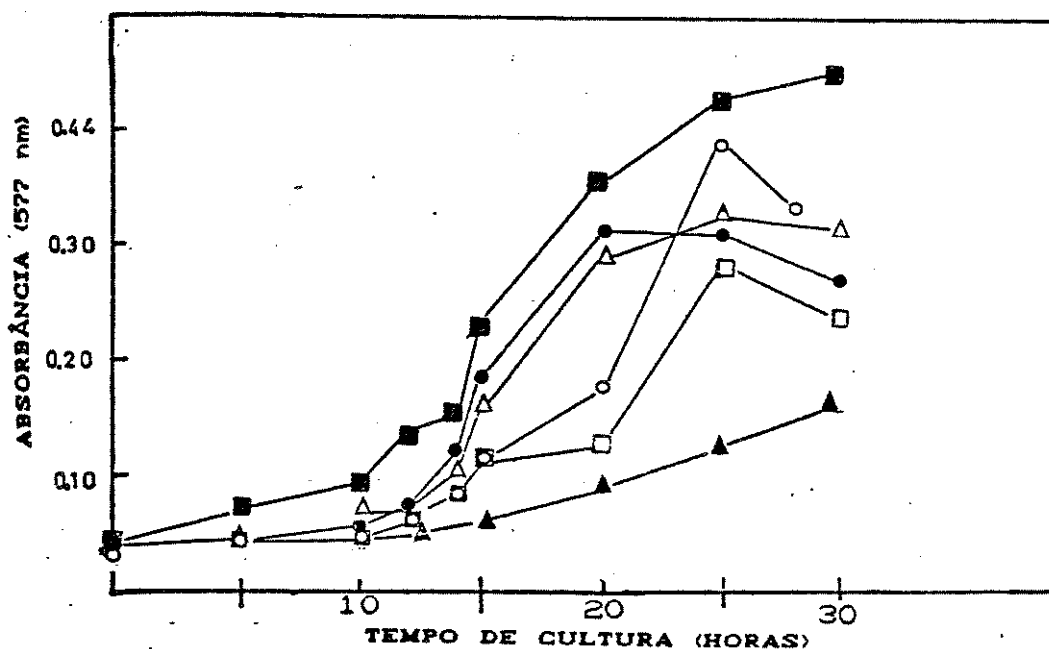


Fig.16-Efeito da carboxiamida 34, sobre a biossíntese do composto 1, L-triptofano 5 (-■-), isatina 29 (-○-), serotonina 39 (-△-), ácido indol-3-acético 40 (-●-), carboxiamida 34 (-▲-) e controle (-□-). As concentrações finais dos substratos foram 6 μ M.

A carboxiamida, 34, sintética apresenta menor efeito, provavelmente porque a amida não participa desde o começo do caminho metabólico, e só depois de um tempo de cultivo a bactéria cria o sistema enzimático apropriado para o metabolismo.

Após 30 horas de cultivo a quantidade do composto 1 aumentou 3 vezes, mesmo sendo a produção a maior com os outros metabólitos, que alcançam o máximo em 25 horas de crescimento, a amida não revela presença de platô na curva de crescimento, pode ser uma etapa de latencia muito maior, em comparação com os outros metabólitos.

A possibilidade de que o composto 34 necessite de outros metabólitos de etapas anteriores na biossíntese (que prepare um meio enzimático apropriado) foi estudada comparativamente na figura 17 (vide item II.E.7-pag 35).

Considerando o meio tioglicolato como controle, podemos observar um acréscimo do composto 1 quando a amida é adicionada junto a isatina e tioglicolato. Este comportamento de favorável pode ser explicado pelo fato de provavelmente que o meio tioglicolato, rico em nutrientes apresente um sistema enzimático mais apropriado para metabolizar a carboxiamida 34.

O fato de que isatina seja produzida também a partir deste composto na presença de *Chromobacterium violaceum* e a razão de ácido indol-3-acético 2-¹⁴C e composto 1 tenha um valor próximo de 1.0 nos levou a pensar no seguinte esquema hipotético para a biossíntese de 1 (esquema VIII), na qual se propõe a síntese

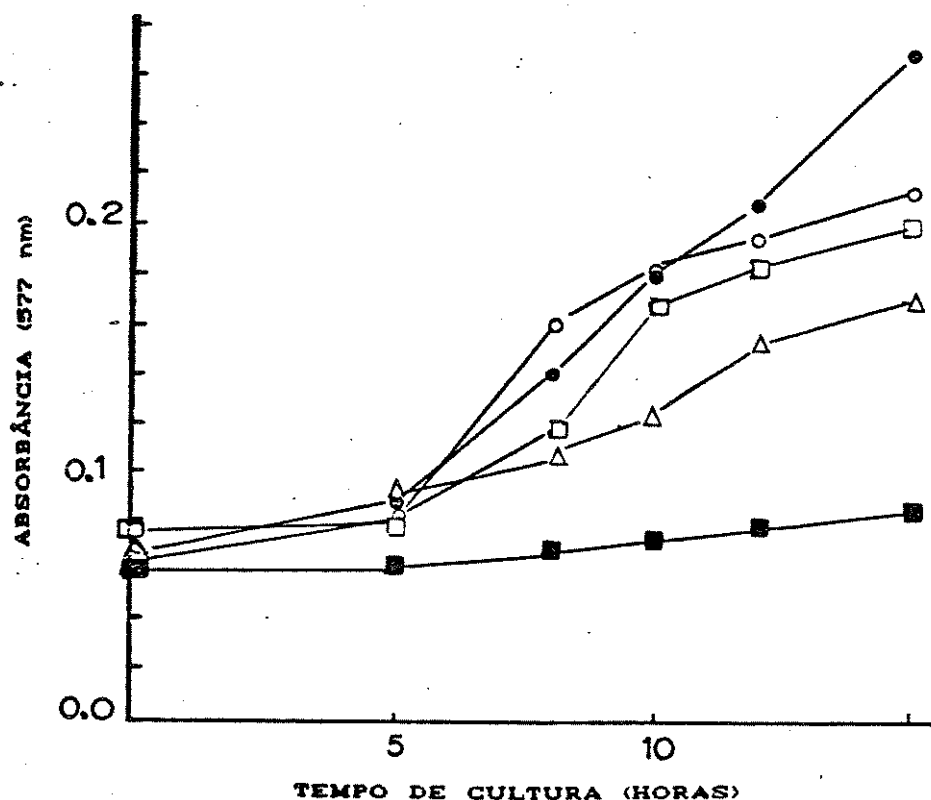


Fig.17- Efeito comparativo dos prováveis precursores do composto 1, L-triptofano 5 + tioglicolato (-●-), carboxiamida 34 + tioglicolato (-○-), carboxiamida 34 + isatina 29 (-□-), tioglicolato (-△-), carboxiamida 34 (-■-). A concentração final de todos os precursores foi de 6 μ M.

biológica do composto 34 e sua participação como intermediário (estrutura V no esquema), para se chegar enzimaticamente a XI. A partir de isatina (X) e do composto XI (via passo j) formaria



91

finalmente composto desejado. No esquema VIII passo (A), o ácido indol-3-acético em parte é transformado em indol [119]. Triptofano (I), a seguir, é convertido em 5-hidroxitriptofano (II), caminho (B) [66,120], e posteriormente a 5-hidroxitriptamina (III) passo (C) [34, 36]. Todos processos enzimáticos são conhecidos. Triptofano produz ácido indol-3-acético (IV) já demonstrado na literatura [115, 121]. Uma reação entre (IV) e (III) produz o composto (V). O passo (D) é possível mediante o deslocamento 1, 2, como foi sugerido por Hoshino e colaboradores [36, 37] formando um radical intermediário, a partir da atuação da peroxidase sobre o carbono α ao nitrogênio como um derivado de amina alifática [122]. Rearranjando-se este carbono radicalar formara um derivado de 1,3 diidro-2H-pirrol-2-ona (XI) e o carbono radical ficara no indol (VII). Este último pode derivar (VIII) [57] pelo caminho (E) e o dihidroxiindol IX por (F), [113, 123, 124]. Posteriormente a isatina (X) via (G) ou diretamente desde o indol com o carbono radical (VII) por oxigenação, ciclização e clivagem do intermediário isatin (H). A participação da amida V como um importante intermediário na biossíntese do composto 1 é evidente se são considerados os resultados da figura 17. Cabe indicar que todos os outros metabólitos do esquema tem existência comprovada na literatura, como produtos enzimáticos provenientes de diferentes meios biológicos. O estudo de induzir a biossíntese do composto 1 é importante porque nos permite enriquecer o meio de cultivo com nutrientes específicos, aumentando a sua produção em

um tempo menor.

Na natureza existem muitos detritos orgânicos provenientes da manufatura de produtos industriais de consumo que não são aproveitáveis. Entretanto, o conteúdo protéico medio pode ser útil como nutriente. Devido ao alto custo do meio tioglicolato utilizado em nosso estudo e da variação da qualidade deste nutriente de fabricante em fabricante, começamos a pesquisar nutrientes mais baratos e de fácil acesso. Os resultados mais alentadores foram obtidos com farelo de arroz enriquecido com L-metionina, um aminoácido que favorece a velocidade de síntese do composto 1 [44] e participa no processo de cianogénese da bactéria [53, 116]. Os dados experimentais obtidos (vide item II.E.8-pg 36) são mostrados na tabela 6.

Tabela 6. Resultados do Meio de Cultura Utilizando Farelo de Arroz e L-metionina como Nutrientes.

800 mL de meio	farelo arroz(g)	L-met. mg/mL	tiogl. (g)	ext crú(mg)	comp. 1 (mg)	comp. 1.* % relat.
1	15	1	15	219	87	84.
2	20	1	10	372	81	78.
3	23	1	7	418	102	98.
4	30	1	-	681	117	113.
5	45	1	-	887	112	108.
controle	-	-	30	147	104	100.

* $\pm$ 3 % aproximadamente.

Estes resultados podem ser interpretados convenientemente do ponto de vista da quantidade total do composto 1 obtido desde o extrato cru e não em razão das percentagens de rendimento. Portanto, o farelo de arroz representa um meio viável e de fácil acesso transformando-se em uma alternativa provável para um de nossos objetivos. Com isto pode-se garantir uma produção do composto 1 a um custo mais baixo, deixando um farelo e caldo que podem ser reaproveitados para outros fins, como, por exemplo uma fonte de proteínas ou aminoácidos para enriquecer alimentos de consumo animal.

III.D Comentários Gerais.

Dentro dos objetivos da tese esteve a análise de metabólitos no crescimento de *Chromobacterium violaceum*, foram caracterizado por diversos métodos, isatina 29, p-aminofenol 30, ácido antranílico 31, 5-Hidroxi-2-metil-3-carboetoxi, benzofurano 33, ácido pirrol-2-carboxílico 32, indol-3-aldeído 41, triptamina 42, ácido indol-3-acético 40, ácido indol-3-carboxílico 43, ácido indol-3-propiónico 44, e ácido indol-3-pirúvico 45. Outro objetivo importante era melhorar a produção de composto 1, e para isso estudaram-se os possíveis precursores deste, como por exemplo L-triptofano 5, serotonina 39, isatina 29, ácido indol-3-acético. Para a compreensão do mecanismo biossintético foi necessário sintetizar um produto novo, um intermediário do composto 1, a carboxamida 34. Visando esta mesma proposta de esclarecimento da biossíntese, realizou-se pela primeira vez a síntese do composto 1 marcado isotópicamente a partir de ácido indol-3-acético-2 ¹⁴C. Este estudo permitiu propor um esquema biossintético para o composto 1.

Um novo produto (não isolado em outras cepas de *Chromobacterium violaceum*), foi caracterizado. O composto é um derivado de benzofurano 33 e apresenta propriedades biológicas similares ao ácido indol-3-acético e a tiroxina [127 128].

Estudar propriedades tripanocidas *in vitro* frente a *T. cruzi* (cepa Tulahuen) em Meio LIT foi outro de nossos objetivos.

O aumento da produção do composto 1 através dos estudos feitos neste trabalho permitiu a síntese de vários derivados como o bromado 4, tetraacetilado 35, triacetilado 38, sal de sódio 36 e metilol 37. Sendo que este último mostrou-se altamente eficiente contra *T. cruzi*, *in vitro*, e com citotoxicidade e genotoxicidade similares a do nifurtimox, droga amplamente utilizada na Doença de Chagas.

CONCLUSÕES

- 1.-*Chromobacterium violaceum* mostrou-se altamente sensível à luz UV tendo sua cor modificada, indicando a não produção do pigmento (composto 1), sem alterar visivelmente o crescimento bacterial.
- 2.-Com os compostos biossintetizados nesta condições e com os resultados obtidos na incorporação de IAA 2-¹⁴C foi proposta uma biogênese do composto 1.
- 3.-Induziu-se a síntese do composto 1 e composto 1 isotópicamente marcado com metabólitos produzido pela mesma bactéria, como isatina, 29 e os produtos de catabolismo de L-triptofano, 5. Atingiu-se o objetivo de melhorar o rendimento de violaceína, fato promissor para iniciar uma produção de derivados (bromado 4, acetilados 35, 38 e metilol 37) para se ter uma fonte potencial de drogas com atividade bactericida e tripanocida.
- 4.-Caracterizamos sistematicamente os produtos isolados desde a bactéria irradiada (isatina 29, ácido antranílico 31 e p-aminofenol 30), embora sejam conhecidos. Não existe na literatura informação de que foram isolados em cultivos de *Chromobacterium violaceum*.
- 5.-Desde a cepa nativa foi isolado um derivado de benzofurano, 33, cujo esqueleto, pertence a um grupo de compostos que tem propriedades antioxidante e similar as propriedades de ácido indol-3-acético.

6.-Melhorou-se a produção de violaceína (composto, 1) com nutrientes baratos visando sua produção industrial.

REFERÊNCIAS

- 1 Bioquímica Microbiana, Alain Arnaud-Piere Guirand, em "Biotecnologia", ed. René Scriban, Editora Manole, São Paulo (1985) cap. II.
- 2 D. Best, Spect Publications R. Soc. Chem. 54, 228, (1985).
- 3 H. Rehm and G. Reed, eds. "Biotechnology", Verlag. Chemie. Weinheim. (1983), vol 5.
- 4 A. Pugsley, Microbiol. 3, 11 (1986).
- 5 M. Kitsumi, J. Kato, S. Komatsubara, I. Chibata, Appl. Env. Microbiol. 21, 569, (1970).
- 6 S. Udaka, S. Kinoshita, J. Gen. Appl. Microbiol. 13, 303, (1958).
- 7 M. Schell, J. Bact., 153, 822, (1983).
- 8 P. Cheetham, Principles of Industrial Enzimology: Basis of Utilization of Soluble and Immobilized Enzymes in Industrial processes, em "Handbook of Enzyme Biotechnology", 2^a Ed., ed. Alan Wiseman, J. Wiley. (1983), chap. III.
- 9 P. Dunnill, Chem. Eng. Res. Des., 65, 211, (1987).
- 10 A. Burger, "A Guide to the Chemical Basis of Drug Design, J. Wiley, (1983), pg. 183.
- 11 H. Emanuel, Pure Appl. Chem. 52, 11, (1980).
- 12 P. Knight, Biol/Technology, 6, 826, (1988).
- 13 G. Richards, Pure Appl. Chem. 60, 277, (1988).
- 14 S. Fukui, A. Tanaka, Advan. Biochem. Eng. 17, 187, (1980).

- 15 J. Martin, Am. Scientist.(Espanhol), 68, 64, (1980).
- 16 E. Hamanaka, M. Kellog, Ann. Rep. Med. Chem., 19, 107 (1984).
- 17 J. Baldwin, Guest ed. Tetraedron, 39, 2445, (1983).
- 18 T. Nagahara, T. Kametani, Heterocycles, 25, (1987).
- 19 A. Korolkovas. "Fundamentos de Farmacologia Molecular", J. Wiley, São Paulo, (1974), pg. 405.
- 20 W. Fish, D. Looker, J. Marr, R. Berens, Biochem. Biophys. Acta, 719, 223, (1982).
- 21 R. Berens, J. Marr, S. Laffon, D. Nelson, Mol. Biochem. Parasitol., 3, 187, (1981).
- 22 J. Ávila, Interciencia, 8, 405, (1983).
- 23 M. Gravestack, J. Ryley, Ann. Rep. Med. Chem., 19, 187, (1987).
- 24 L. Nisbet, J. Westhey, Ann. Rep. Med. Chem., 21, 149, (1986).
- 25 R. Sykes, D. Bonner, E. Swab, Pharmac. Ther., 29, 321 (1985).
- 26 L. Caldas, Photochem. Photobiol., 26, 1, (1977).
- 27 J. Scott, W. Trejo, P. Principe, R. Bush, N. Georgopapadakou, D. Bonner, R. Sykes, J. Antibiotics, 35, 184, (1982).
- 28 P. Singh, W. Liu, J. Gougoutas, M. Malley, M. Porubcan, W. Trejo, J. Scott, R. Sykes, J. Antibiotics, 41, 446, (1988).
- 29 W. Parker, M. Ratnham, J. Johnson, J. Scott, P. Principe, R. Sykes, J. Antibiotics, 41, 454, (1988).
- 30 L. Boisbaudran, Compt. Rend. Soc. Biol. 94, 562, (1882).
- 31 S. McCarthy, T. Sakata, D. Kakimoto, R. Johnson, Nippon Suisan Gakkaishi, 51, 479, (1985), Chem. Abstracts 103:19496

- 32 J. Ballantine, C. Barret, R. Beer, S. Eardley, S. Robertson, B. Shaw, T. Simpson, J. Chem. Soc., 755, (1957).
- 33 J. Ballantine, R. Beer, D. Crutchley, G. Dodd, D. Palmer, Proc. Chem. Soc., 232, (1958).
- 34 R. DeMoss, N. Evans, J. Bact., 79, 729, (1960).
- 35 H. Laatsch, R. Thomson, P. Cox, J. Chem. Soc. Perkin Trans. II 1331, (1984).
- 36 T. Hoshino, T. Kondo, T. Uchiyama, N. Ogasawara, Agric. Biol. Chem., 51, 965, (1987).
- 37 T. Hoshino, T. Takano, S. Hori, N. Ogasawara, Agric. Biol. Chem., 51, 2733, (1987).
- 38 V. Campos, S. Erazo, N. Durán, Arq. Biol. Technol. 25, 147, (1982).
- 39 N. Durán, S. Erazo, V. Campos, An. Acad. brasil. Ciênc., 55, 231, (1983).
- 40 N. Durán, A. Faljoni-Alario, An. Acad. brasil. Ciênc., 52, 297, (1980).
- 41 L. Caldas, A. Leitão, S. Santos, R. Tyrrell, Internat. Symp. Curr. Topics. in Radiobiology and Photobiology, An. Acad. brasil. Ciênc., RJ, 121, (1978).
- 42 B. Muel, M. Santos, Internat. Symp. Curr. Topics. in Radiobiology and Photobiology, An. Acad. brasil. Ciênc., RJ, 127, (1978).
- 43 R. DeMoss, Antibiotics. 2, 77, (1967).
- 44 R. Riveros, Tese de Mestrado, 1986, UNICAMP.

- 45 R. Riveros, V. Campos, A. Joyas, E. Erazo, N. Durán, *Arq. Biol. Technol.*, 28, 61, (1985).
- 46 W. Corpe, *J. Bacteriol.*, 62, 5515, (1951).
- 47 J. Koburger, S. May, *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1463, (1982).
- 48 K. Bettelheim, J. Gordon, J. Taylor, *J. Gen. Microbiol.*, 54, 177, (1968).
- 49 D. Wooldridge, C. Wooldridge, *Environ. Entomol.*, 1, 522, (1972).
- 50 W. Johnson, A. Disolvo, R. Stewer, *Am. J. Clin. Pathol.*, 56, 400, (1971).
- 51 R. Michaels, L. Hanks, N. Corpe, *Arch. Biochem. Biophys.*, 111, 121, (1965).
- 52 D. Bazyliniski, E. Palome, N. Blakemore, R. Blakemore, *Appl. Environ. Microbiol.*, 52, 696, (1986).
- 53 C. Knowles, A. Bunch, "Microbial Cyanide Metabolism" em *Advances in Microbial Physiology*, Ed. by A. Rose, D. Tempest Academic Press, 27, 73, (1986).
- 54 A. Smith, R. Hunt, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 35 B, 110, (1985).
- 55 A. Macadam, C. Knowles, *Biochem. Biophys. Acta.* 786, 123, (1984).
- 56 P. Rodger, C. Knowles, *J. Gen. Microbiol.*, 108, 261, (1978).
- 57 O. Sebek, H. Jäger, *Nature*, 196, 793, (1962).
- 58 S. Matsumoto, *Nippon Suisan Gakkaishi*, 27, 102, (1961). *Chem. Abstracts*, 51:95201h

- 59 B. Ensley, B. Ratzkin, T. Osshund, M. Simon, L. Wackett, T. Gibson, *Science*, 222, 167, (1983).
- 60 R. Herbert in "Indoles, Part Four", Ed. J. Saxton, Wiley-Interscience, NY, 1983, vol 5, cap. I.
- 61 D. Lednices, L. Nistchen, "The organic chemistry of drug synthesis", ed. Wiley&Sons, NY, 1977, vol.I, pg.316.
- 62 P. Wender, A. White, *Tetrahedron Lett.*, 22, 1475, (1981).
- 63 P. Dewick, *Nat. Prod. Rep.*, 5, 73, (1988).
- 64 J. Vederas, *Nat. Prod. Rep.*, 4, 277, (1987).
- 65 G. Cardell, *Lloydia*, 37, 219, (1974).
- 66 B. Sloley, *J. Chromatogr*, 363, 418, (1986).
- 67 A. Battersby, A. Burnett, P. Parsns, *J. Chem. Commun.* 1282 (1968).
- 68 J. Saxton, *Nat. Prod. Rep.* 4, 591, (1987).
- 69 G. Wenkert, *Experientia* 15, 165, (1959).
- 70 W. Remers, R. Brown, *Heterocyclic Compunds in "Indoles I"* ed. W. Houlihan, Wiley-Interscience, NY, 1972.
- 71 *ibid.* ref. 70 pg. 232.
- 72 G. Robinson, *Chem. Rev.*, 63, 373, (1963).
- 73 *ibid.* ref. 70 pg. 350.
- 74 Govindachari, *Org. Reactions*, 6, 74, (1951).
- 75 *ibid.* ref. 70 pg. 385.
- 76 W. Houlihan, V. Parrino, Y. Uike, *J. Org. Chem.*, 46, 4511, (1981)
- 77 *ibid.* ref. 70 pg. 393.

- 78 J. Powers in *Indoles Part Two*, W Houlihan, ed., J. Wiley, 1972, vol 25 pg. 127.
- 79 G. Domschke, *J. prakt. Chem.* 311, 806, (1969).
- 80 S. Monti, *J. Org. Chem.*, 31, 2669, (1966).
- 81 G. Allen Jr., in *Organic Reaction*, W. Dauben, editor, J. Wiley, 1973, vol 20, pg. 337.
- 82 A. Smith III, M. Visnick, *Tetrahedron*, 26, 3757, (1985).
- 83 A. Smith III, M. Visnick, J. Haseltine, P. Sprengeler., *Tetrahedron*, 42, 2957, (1986).
- 84 P. Wender, A. White, *Tetrahedron Lett.* 22, 1475, (1981).
- 85 *ibid.* ref. 70 pg. 436.
- 86 *ibid.* ref. 70 pg. 479.
- 87 *ibid.* ref. 70 pg. 484.
- 88 *ibid.* ref. 70 pg. 492.
- 89 C.R.C. *Handbook of Chemistry and Physics*, Ed. R. Weast (1980).
- 90 O. Moncaya, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 81, 181, (1986)
- 91 H. van den Bossche, *Nature*, 273, 626, (1978).
- 92 D. McCalla, *Environ. Mutagen.*, 5, 745, (1983).
- 93 R. Ferreira, L. Ferreira, *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 19, 19, (1986).
- 94 J. Albright, J. Albright, *Infect. Immunol.*, 56, 831, (1988).
- 95 W. Fish, J. Marr, R. Berens, D. Looker, D. Nelson, S. La Fon, A. Balber, *Antimicrob. Agent. Chemother.*, 27, 33, (1985).
- 96 C. Bacchi, R. Berens, H. Nathan, R. Klein, I. Elegbe, K. Rao, P. McCann, J. Marr, *Antimicrob. Agent. Chemother.*, 31, 1406, (1987).

- 97 "Solvents and Reagents Textbook of Practical Organic Chemistry", Loggman Group Ltda., 1978.
- 98 "Thin Layer Chromatography a Laboratory Handbook", Trad. M. Ashworth, Egon Stohl, 1969, pag 8873.
- 99 E. Merck, Reactivos de coloracion para cromatografia em capa fina y en papel ,Darmstadt, Alemania, 1972.
- 100 K. Nakanishi, Infrared Absortion Spectroscopy of Organic Compound, Prentice- Hall, Inc. Eglewood Cliff, 1965.
- 101 L. Jackman, S. Steinhell, Aplicacions of NMR in Organic Chemistry, Pergamon Press, Oxford, (1969).
- 102 W. Corpe, Appl. Microbiol. 11, 145, (1962).
- 103 R. Cooper, J. Scott, R. Sykes, J. Antibiotics, 35, 449, (1985).
- 104 O. Badinez, Biologia (Chile), 3, 3, (1945).
- 105 E. Camargo, Rev. Inst. Med. Tropic. São Paulo, 6,93, (1964).
- 106 E. Chiari, E. Camargo, Genes and Antigenes of Parasites (C. Morel, ed.) UNDP/WORLD, BANK/WHO. Symp., RJ, Brazil, pag 23, (1983).
- 107 M Hoffmann, R. Meneghini, Photochem. Photobiol. 30, 151, (1978).
- 108 W. Wierenga, A. Harrison, B. Evans, C. Chidester, J. Org. Chem., 49, 438, (1984).
- 109 K. Smith in The Science of Photobiology, K. Smith ed. Plenum/Rosetta, NY, 1977, pag 137.
- 110 Experiments in Molecular Genetic, J. Miller, cold

Spring-Habor Lab., NY. 1977, pg. 121.

- 111 W. Corpe, Nature, 190, 191, (1961).
- 112 W. Frankenberger Jr., M. Poth, Anal. Biochem., 165, 300, (1987).
- 113 M. Fujioka, H. Wada, Biochem. Biophys. Acta., 158, 70, (1968)
- 114 V. Magnus, M. Soskic, S. Iskric, S. Kveder, Anal. Biochem., 103, 419, (1980).
- 115 P. Davis, Gustafson, J. Rosazza, J. Bacterial, 126, 544, (1976).
- 116 P. Collins, P. Rodgers, C. Knowles, J. Gen. Microbiol., 117, 73, (1980).
- 117 H. Huang, N. Iwasawa, T. Mukaiyame, Chem. Lett. 1465, (1984).
- 118 H. Durán, E. Durán, M. Ben Bakkar, L. Gorrichou, C. Grand, Bull. Soc. Chem. Fr. 4, 672, (1987).
- 119 K. Yomate, K. Soda, Advan. Biochem. Eng. Biotechnol., 33, 95, (1986).
- 120 C. Mitoma, H. Weissbach, S. Udenfriend, Arch. Biochem. Biophys. 63, 122, (1966).
- 121 F. Garcia-Tabares, Appl. Microbiol. Biotechnol., 25, 502, (1987).
- 122 N. Durán, A. Faljoni-Alario, Biochem. Biophys. Res. Commun., 83, 287, (1978).
- 123 D. Berry, E. Madsen, J. Bollag, Appl. Environ. Microbiol., 53, 180, (1988).
- 124 E. Madsen, A. Francis, J. Bollag, Appl. Environ. Microbiol.,

54, (1988).

125 The Aldrich Library of Infrared Espectros, 1978, pg. 929-B.

126 Topics in Carbon-13 NMR Spectroscopy, Ed. G. Levy, 1975, vol
2, pg 81.

127 H. McPherson, B. Ponder, J. Heterocyclic Chem. 15, 43 (1978).

128 C. Giza, R. Hinman, J. Org. Chem. 29, 1453, (1964).