

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Departamento de Química Orgânica

Dissertação de Mestrado

**Produção, extração e purificação da violaceína: um antibiótico
produzido pela *Chromobacterium violaceum***



Autor: Daniel Rettori
Orientador: Prof. Dr. Nelson Durán



Campinas, agosto de 1996.



| | | |
|--------------|--------------------------|---------------------------------------|
| UNIDADE | IQ | |
| N.º CHAMADA: | T/UNICAMP | |
| | R316p | |
| V. Ex. | | |
| T. MSO BC/ | 28.562 | |
| PROC. | 667/96 | |
| C | <input type="checkbox"/> | D <input checked="" type="checkbox"/> |
| PREÇO | R\$ 11,00 | |
| DATA | 12/09/96 | |
| N.º CPD | | |

CM-00091613-5

Bettori, Daniel

Produção, extração e purificação da violaceína um antibiótico produzido pela *Chromobacterium* T/UNICAMP/R316p
DEVOLVER NOHE LEIT. (28562/96)

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP

R316p Rettori, Daniel
Produção, extração e purificação da violaceína :
um antibiótico produzido pela *Chromobacterium*
violaceum / Daniel Rettori. -- Campinas, [SP : s.n.], 1996.

Orientador: Nelson Eduardo Duran Caballero.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química.

Antibióticos.
1. *Violaceína.* 2. *Chromobacterium violaceum.* 3.
Bioreactors. 4. *Bactérias.* I. Duran Caballero, Nelson
Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Insti-
tuto de Química. III. Título.

Produção, extração e purificação da violaceína: um antibiótico produzido pela *Chromobacterium violaceum*

Autor: Daniel Rettori

Orientador: Prof. Dr. Nelson E. Durán Caballero
Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas
CEP 13.083-970 - C.P.6154, Campinas, SP, Brasil

Palavras chave: Violaceína, *Chromobacterium violaceum*, Biorreator, Bactérias.

Resumo

Neste trabalho, desenvolveu-se um procedimento detalhado de produção, extração e purificação da violaceína, partindo do cultivo de *Chromobacterium violaceum* CCT 3496.

Para a etapa de produção, foram adaptadas garrafas de Roux de 1 litro e construído um biorreator tipo “BPS” (biorreator de prateleiras para superfícies). Na extração, empregou-se etanol comercial e na purificação, utilizaram-se as técnicas de filtração, extração em Soxhlet, recristalização e HPLC.

A violaceína obtida foi então analisada e caracterizada por RMN-¹H, RMN-¹³C, espectrometria de massa, cromatografia gasosa, TGA, espectrofotometria no IV, espectrofotometria no UV-VIS e espectrofotometria de fluorescência.

Obteve-se violaceína pura, de acordo com as técnicas de caracterização e análise utilizadas.

Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic produced by *Chromobacterium violaceum*

By: Daniel Rettori

Advisor: Prof. Nelson E. Durán Caballero
Chemistry Institute - Campinas State University
CEP 13.083-970, C.P.6154, Campinas, SP, Brazil

Key words: **Violacein, *Chromobacterium violaceum*, Bioreactor, Bacteria.**

Abstract

A detailed procedure for the production, extraction and purification of violacein was developed. The production was attained by cultivation of *Chromobacterium violaceum* CCT 3496.

In the production step, Roux bottles of 1 litre were modified, and a bioreactor type "STB" (surface tray bioreactor) was constructed. In the extraction step, commercial ethanol was used. Violacein purification was achieved by filtration, Soxhlet extraction, recrystallization and HPLC techniques.

Violacein was analyzed and characterized by: NMR-¹H; NMR-¹³C; mass spectrometry; TGA; gaseous chromatography; IR, UV-VIS and fluorescence spectroscopies.

According to the characterization and analysis techniques employed, pure violacein was obtained.

Currículo

◆ **nome: Daniel Rettori**

data de nascimento: 15-abril-1968

nacionalidade: argentina

◆ **Iniciação científica** realizada no período de março/1991 - março/1993, no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Bioquímica (Instituto de Biologia - Unicamp), sob orientação da professora doutora Maria Edwirges Hoffmann. Tema de trabalho:

“Papel do cálcio no mecanismo de lesão celular associada ao estresse oxidativo”

Bolsa de Iniciação Científica concedida pelo CNPq.

◆ **Participação no Congresso da SBBq** (Sociedade brasileira de bioquímica) de 1992 (maio) com o trabalho “Tetrahydroxy-1,4-Benzoquinone (THQ) induced cytotoxicity to V79 cells is calcium dependent”.

◆ **Conclusão do Curso de Química** (modalidade - bacharelado), do Inst. de Química da Unicamp, em dezembro de 1993.

◆ **Mestrado** no período de março/1994 - julho/1996, no Lab. de Química Biológica do Departamento de Química Orgânica (Instituto de Química - Unicamp), sob a orientação do prof. doutor Nelson Durán. Tema de trabalho:

“Produção, extração e purificação da violaceína: um antibiótico produzido pela *Chromobacterium violaceum*”

Bolsa de Mestrado concedida pela CAPES.

◆ **Participação no Congresso da SBBq** de 1995 (maio) com o trabalho “A new procedure for the production of violacein from *Chromobacterium violaceum*”.

À Susana e Carlos, meus pais

*à Yolanda Andreucci de Praticò,
Julda Mangold de Rettori,
Salvador Carmelo Praticò e
Santiago Rettori,
meus avós*

Agradecimentos

- ◆ Ao Nelson, pelo seu inesgotável apoio.

- ◆ Aos amigos do grupo, pois existe um pedacinho de cada um dentro deste trabalho.

- ◆ Ao corpo técnico do Instituto de Química, sem o qual, não seria possível chegar aonde chegamos.

- ◆ À CAPES pelo apoio financeiro.

- ◆ À Carolina, porque nas nossas discussões, análises, reflexões e, na sua perseverança e cristalinidade, encontro inspiração e forças para continuar; meu respeito, admiração e amor.

*Los hermanos sean unidos,
porque esa es la ley primera;
tengan unión verdadera
en cualquier tiempo que sea,
porque si entre ellos pelean
los devoran los de ajuera.*

*(Martín Fierro)
de José Hernández*

*Finalmente solo Dios y la naturaleza es duradera
En cambio: La Vida
con ser linda, dulce y amarga es pasajera....
Leucayo Retlori*

ÍNDICE

| | Página |
|--|-----------|
| 1 Introdução | 1 |
| 1.1 As primeiras descobertas e classificações | 1 |
| 1.2 À procura da estrutura química do pigmento violeta | 2 |
| 1.3 Alguns casos de infecções fatais devido à <i>Chromobacterium violaceum</i> | 3 |
| 1.4 A violaceína como antibiótico | 3 |
| 1.5 <i>Chromobacterium violaceum</i> no Brasil | 4 |
| 1.6 Um pouco sobre a bioquímica da <i>Chromobacterium violaceum</i> | 5 |
| 1.7 Objetivos do trabalho | 7 |
| | |
| 2 Parte Experimental | 8 |
| 2.1 O biorreator e as garrafas de Roux | 8 |
| 2.2 Curva de crescimento celular | 9 |
| 2.3 Procedimento de produção e purificação da violaceína | 9 |
| 2.4 Caracterização e análise da violaceína (VP) obtida | 11 |
| 2.5 MEV da <i>Chromobacterium violaceum</i> | 13 |
| | |
| 3 Resultados e Discussão | 14 |
| 3.1 O biorreator, as garrafas de Roux (modificadas) e o algodão | 14 |
| 3.2 Curva de crescimento celular | 16 |
| 3.3 Extração e pré-purificação | 17 |
| 3.4 Purificação por HPLC | 18 |
| 3.5 Caracterização por RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C | 22 |
| 3.6 Análise termogravimétrica | 27 |
| 3.7 Análise cromatográfica gasosa | 28 |
| 3.8 Análise por espectrometria de massa | 29 |
| 3.9 Caracterização por IV | 31 |
| 3.10 Caracterização por UV-VIS | 32 |
| 3.11 Curva de absorbância <i>versus</i> concentração de VP | 32 |
| 3.12 Curva de λ (de absorção máxima) <i>versus</i> temperatura | 34 |
| 3.13 Estudo de fluorescência | 35 |
| 3.14 MEV da <i>Chromobacterium violaceum</i> | 37 |
| | |
| 4 Conclusões | 40 |
| | |
| 5 Referências | 41 |

1- Introdução

1.1- As primeiras descobertas e classificações

Em 1882 surgiu um artigo na *Comptes Rendus Hebdomadaires des seances de L'Academie des Sciences* com o seguinte título: “Material colorido se forma sobre a cola de farinha” (*Matière colorante se formant dans la colle de farine*) (Boisbaudran, 1882). O autor observou a formação de uma coloração violeta sobre um preparado à base de farinha e atribuiu a coloração a um “pequeno organismo”. Certamente com “pequeno organismo”, Boisbaudran estava se referindo a um microorganismo.

Esta observação foi feita 15 anos antes da publicação do artigo, portanto aproximadamente em 1867. Foi provavelmente devido à comunicação de M. Gessard (Boisbaudran, 1882), sobre a extração de um material azul de certos líquidos patológicos, que Boisbaudran encontrou motivação para publicar as suas observações.

De forma independente, no ano de 1880, um cientista italiano fez uma descoberta acidental enquanto trabalhava na Universidade de Modena. Curzio Bergonzini havia preparado, no final de março de 1880, muitas soluções de albumina de ovo para os seus experimentos sobre “O mecanismo de ação das causas que retardam a putrefação”. Após os experimentos, ele esqueceu de descartar uma das soluções que serviu de controle e no dia 26 de abril quando se deu conta do esquecimento ao encontrar a solução, ele descreveu ter ficado maravilhado pela singularidade do aspecto da mesma. Bergonzini reduziu o volume até um pouco menos da metade, por evaporação, obtendo assim uma solução coberta por uma película muito densa de intensa coloração violeta. A princípio ele suspeitou da *Cromococcus violaceus*, que era a única bactéria conhecida que apresentava tal coloração, mas quando ele não conseguiu solubilizar um fragmento da película violeta em água, percebeu que não se tratava de tal bactéria. Após alguns testes e experimentos, concluiu que se tratava de uma nova bactéria que ele chamou de *Cromobacterium violaceum*. Bergonzini publica a descoberta “Sobre uma nova bactéria colorida” (Bergonzini, 1881) no *Annuario della Societa dei Naturalisti in Modena* em 1881.

O pequeno organismo e o pigmento aos quais se referiu Boisbaudran, de acordo com De Moss (De Moss, 1967), eram provavelmente a *Chromobacterium violaceum* e a violaceína respectivamente, por causa do espectro de absorção no visível registrado pelo próprio Boisbaudran.

Em 1881, Zimmerman corrige a grafia da palavra *Cromobacterium* dada por Bergonzini, para *Chromobacterium* (Zimmerman, 1881; Buchanan, 1918).

Num estudo sobre a nomenclatura e classificação de bactérias, publicado em 1918, Buchanan redefine o gênero *Chromobacterium* (Buchanan, 1918; Balows *et al.*, 1992).

Hoje, a descrição do gênero *Chromobacterium*, feita por Sneath, é a que se encontra no “Manual de Bacteriologia Sistemática Bergey’s” (Holt, 1984).

1.2- À procura da estrutura química do pigmento violeta

Reilly e Pyne foram os primeiros a estudar mais detalhadamente a estrutura química do pigmento violeta, conforme artigo de 1927 (Reilly e Pyne, 1927). Eles seguiram um procedimento de extração e purificação e sugeriram a fórmula molecular $C_{50}H_{59}O_{15}N_5$.

No início da década de 30 começa-se a chamar o pigmento violeta de violaceína.

A partir de então surgiram várias sugestões de diversos autores para a fórmula molecular e a estrutura química da violaceína, todas sem sucesso. Mas foi na Universidade de Liverpool em 1958 que se deduziu, através de estudos de degradação e comprovada por síntese, a estrutura correta da violaceína (Ballantine *et al.*, 1958; Ballantine *et al.*, 1960).

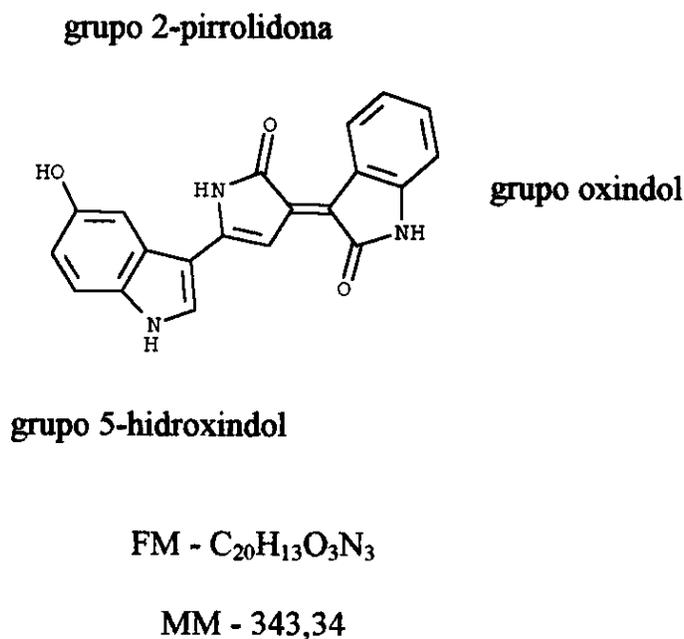


Figura 1.2.1 - Estrutura química da violaceína

Ballantine e colaboradores também propuseram corretamente a estrutura do pigmento produzido em menor proporção pela *C. violaceum*: a deoxiviolaceína. A única diferença entre esse pigmento e a violaceína é que a deoxiviolaceína não possui o grupo hidroxila (Ballantine *et al.*, 1958).

1.3- Alguns casos de infecções fatais devido à *Chromobacterium violaceum*

A *Chromobacterium violaceum* é considerada uma bactéria saprófita não patogênica, que se encontra em amostras de solo e água de regiões tropicais e subtropicais. Ela é Gram negativa e aeróbica facultativa. O potencial patogênico deste organismo foi descrito pela primeira vez por Wooley, em 1905, ao identificar a *C. violaceum* como a responsável pela morte de “búfalos d’água” por septicemia, nas Filipinas (Wooley, 1905; Holt, 1984; Ponte e Jenkins, 1992).

O primeiro caso reportado de infecção em humanos ocorreu na Malásia em 1927 e, desde então, houve aproximadamente 30 casos reportados em todo o mundo (Hassan *et al.*, 1993).

Alguns dos casos ocorreram em Cuba, Taiwan, Estados Unidos, Vietnam, Nigéria, Brasil, Argentina e Austrália. Na maioria dos casos, os indivíduos morrem de forma rápida e de septicemia (Ballows *et al.*, 1992).

Suspeita-se que a contaminação com a *Chromobacterium violaceum* se dê, geralmente, através de feridas expostas à lama, areia, barro, águas de rios e lagos, enfim, a ambientes que contenham a bactéria.

Petrillo chama a atenção ao fato da *C. violaceum* ser encontrada com tanta frequência na natureza, causando tão poucas infecções humanas, que na maioria das vezes, são de grande severidade. Após uma análise de indivíduos infectados e diagnosticados nos E.U.A., concluiu-se que a *C. violaceum* é um agente patogênico de baixo grau, capaz de causar infecções severas à pacientes imunodeprimidos (Petrillo *et al.*, 1984).

1.4- A violaceína como antibiótico

Os cientistas Kidder e Stuart, em 1939, e Burbank, em 1942, reportaram, de acordo com De Moss (De Moss, 1967), suas observações sobre protozoários ciliados, que eram rapidamente mortos quando expostos à culturas de *C. violaceum*. A princípio, a suspeita foi de que a violaceína era a responsável, mas depois passou-se a suspeitar do cianeto, que é um metabólito normalmente formado pela *C. violaceum* em meio de cultura ordinário.

Segundo Lichstein e Van de Sand (Lichstein e Van de Sand, 1945), o cientista Singh reportou em 1942 que ao adicionar extrato bruto de violaceína à suspensões de bactérias, estas não mais eram ingeridas por amebas terrestres.

Mas foram os cientistas Lichstein e Van de Sand que fizeram o primeiro estudo abrangente das propriedades antibióticas da violaceína, num artigo publicado no *Journal of Infectious Diseases*, em 1945. Até aquela data haviam sido reportadas a morte por septicemia, devido à *C. violaceum*, de 3 pessoas nos E.U.A.. O que chamou a atenção de Lichstein e Van de Sand nas lesões de pele das vítimas era a ausência de microorganismos contaminantes, levando-os a suspeitar da possível atividade antibiótica da violaceína. Eles fizeram testes em 51 cepas de bactérias, totalizando um número de 21 espécies. Os resultados mostraram que a violaceína possuía marcante efeito inibitório no crescimento de bactérias Gram positivas, e pequeno efeito, nas Gram negativas (Lichstein e Van de Sand, 1945; De Moss, 1967).

A partir de então, além da atividade bactericida, surgiram trabalhos atribuindo à violaceína propriedades tripanocida (Caldas et al., 1978; Durán et al., 1989; Durán e Haun, 1991), anti-viral (May et al., 1991), e até tumoricida (Durán et al., 1996_{a,b}), além de apresentar atividade citotóxica em células de mamíferos (Durán et al., 1989; Haun et al., 1992).

1.5- *Chromobacterium violaceum* no Brasil

Em abril de 1976, na frente da estação de tratamento de água da cidade de Manaus, foi recolhida uma amostra de água proveniente de uma profundidade de 30 metros. O objetivo era o de realizar uma análise bacteriológica desta amostra, e os resultados indicaram a existência de apenas dois tipos diferentes de colônias bacterianas: colônias brancas e colônias violetas. As violetas foram identificadas por Wilson Chagas de Araújo, do Instituto de Microbiologia da UFRJ, como sendo a *Chromobacterium violaceum*. Foi a primeira vez que se isolou e estudou este microorganismo no Brasil (Caldas et al., 1978).

Com esta descoberta, levantou-se mais uma hipótese para explicar o porque da cor negra das águas do rio Negro. A responsável seria a *C. violaceum* por se encontrar em grande quantidade nas águas do rio e por produzir o pigmento escuro conhecido por violaceína (Caldas et al., 1978).

Caldas também comentou a atividade tripanocida da violaceína. Ele descreveu ter observado 100% de morte celular em culturas de *Trypanosoma cruzi* (em fase exponencial de crescimento) quando expostas a concentrações de 75 µg/mL de violaceína. Caldas baseou-se numa comunicação pessoal de F. Steele para descrever os resultados referentes à atividade tripanocida da violaceína (Caldas et al., 1978).

Em meados do século XIX, o naturalista alemão Alexander von Humboldt chamou a atenção para a ausência de insetos hematófagos nas margens do rio Negro, durante a sua viagem ao rio Orinoco através do canal Caciquire (na Venezuela). Ele formulou duas hipóteses para explicar as suas observações: ou a

“água preta” é tóxica ou faltam nutrientes (Walker, 1990). Na mesma época o naturalista inglês Alfred Russel Wallace, enquanto viajava pelo rio Negro (do lado brasileiro), descreveu: “Uma das grandes excelências deste rio era a inexistência de mosquitos” (Wallace, 1979). Hoje sabemos que as águas do rio e amostras das margens contêm a *Chromobacterium violaceum*, podendo então ser esta a chave para responder às indagações dos naturalistas europeus do século passado.

Em Julho de 1981, um rapaz de 13 anos de idade foi admitido num hospital de Porto Alegre com o seguinte quadro: uma lesão ulcerada na pele do maléolo interno direito (desenvolvida já há 3 meses), um peso de 7 kg abaixo do normal, taquicardia, hipertrofia do fígado e hipertrofia de baço. Depois de alguns dias internado, o indivíduo desenvolveu febre alta (40°C) e toxemia, sugerindo um quadro de septicemia, mas repetidas culturas de sangue se apresentaram estéreis. A partir de então o quadro clínico do indivíduo começou a piorar e o submeteram a tratamento quimioterápico. Nesse meio tempo foi isolada e identificada a *Chromobacterium violaceum* de amostras coletadas das lesões de pele do paciente. A quimioterapia foi redirecionada, e após 20 dias de tratamento ele foi curado. Dois anos mais tarde houve uma reincidência da doença, aparentemente devido a uma picada, de algum inseto, no pé direito do indivíduo. A picada foi adquirida enquanto ele pescava no rio dos Sinos. Quimioterapia por 21 dias resultou na sua cura. Foram feitos testes imunológicos no paciente e um deles indicou uma possível disfunção dos leucócitos. Este resultado reforça a conclusão do próprio Petrillo (como já descrito no item 1.3) de que a *C. violaceum* é um agente patogênico capaz de causar infecções severas em pacientes imunocomprometidos. Amostras de água coletadas do rio, próximo ao local aonde o indivíduo foi picado enquanto pescava, revelaram a presença de *C. violaceum* (Petrillo *et al.*, 1984).

1.6- Um pouco sobre a bioquímica da *Chromobacterium violaceum*

O papel da violaceína na fisiologia da *C. violaceum* ainda é desconhecido. Numa revisão feita por De Moss (De Moss, 1967), ele aponta para algumas teorias. Uma delas postula que a concentração intracelular de triptofano deve-se manter baixa (em quantidade não tóxica) e que a violaceína seria um metabólito final da degradação do excesso de triptofano. Outra teoria sugere que a violaceína foi uma forma, encontrada pela bactéria, de armazenar resíduos indólicos. Estes resíduos serviriam como precursores para a biossíntese de triptofano. Uma terceira teoria atribui à violaceína um papel de protetor contra a radiação, prevenindo assim, a *C. violaceum* de efeitos fototóxicos.

Friedheim observou o aumento da atividade respiratória da *C. violaceum* ao adicionar violaceína a uma suspensão de bactérias não pigmentadas. Ele também observou supressão de produção de violaceína por bactérias crescidas sobre glicose (Friedheim, 1932).

Além destas teorias e observações, não podemos esquecer da atividade antibiótica da violaceína, podendo ser esta mais uma teoria a somar-se às anteriores.

Apesar de todas estas incertezas, muitos estudos bioquímicos ajudaram a elucidar importantes dados sobre a biossíntese da violaceína.

Em 1934 o pesquisador Tobie observou que ao oxigenar culturas de *C. violaceum*, o tempo de produção de violaceína era consideravelmente reduzido. Este provavelmente foi o primeiro trabalho a indicar um papel importante do oxigênio molecular na biossíntese da violaceína (Tobie, 1934).

No final da década de 50, De Moss e Evans fizeram duas descobertas importantes. Na primeira eles descobriram que para sintetizar a violaceína a bactéria necessita de oxigênio molecular e de L-triptofano. A *C. violaceum* não consegue sintetizar o pigmento a partir de D-triptofano. A bactéria tampouco consegue sintetizar a violaceína a partir de L-triptofano na ausência de O₂ (De Moss e Evans, 1959). Na segunda descoberta, utilizando L-triptofano marcado (com ¹⁴C) em diferentes posições, De Moss e Evans concluíram que o L-triptofano é incorporado na violaceína, com exceção do carbono carboxílico (C1). Provavelmente este carbono é eliminado por um processo de descarboxilação durante a biossíntese (De Moss e Evans, 1960).

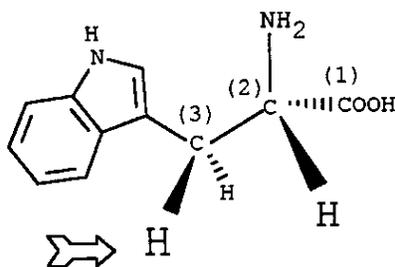


figura 1.6.1- Estrutura do L-triptofano

Em 1986, fazendo uso dos triptofanos [2-¹³C] e [3-¹³C], Hoshino e colaboradores descobriram que os carbonos do grupo 2-pirrolidona da violaceína eram provenientes da cadeia lateral do L-triptofano (C1, C2, C3) (Hoshino *et al.*, 1987a). Alguns meses mais tarde os mesmos pesquisadores descobriram a origem dos átomos de O, N e H do grupo 2-pirrolidona, fazendo uso dos isótopos ¹⁸O, ¹⁵N e ²H. O nitrogênio é proveniente do grupo amino ligado ao carbono α (C2) do L-triptofano, o hidrogênio é proveniente de um dos dois H do carbono β (C3), conforme indicado pela seta na figura 1.6.1, e os três átomos de oxigênio da violaceína são provenientes do oxigênio molecular (Hoshino *et al.*, 1987b).

Trabalhos posteriores revelaram a capacidade da *C. violaceum* de sintetizar compostos parecidos com a violaceína, como por exemplo a oxiviolaceína, o HS-1 e a pseudodeoxiviolaceína, a partir de substratos outros que não o L-triptofano (Hoshino e Ogasawara, 1990; Hoshino *et al.*, 1994 (patente); Hoshino *et al.*, 1994).

Durán e colaboradores, num estudo com radio-isótopos, sugerem que, além do L-triptofano, a *C. violaceum* é capaz de sintetizar a violaceína a partir do indol-3-ácido acético (Durán *et al.*, 1994).

Também já foram isoladas e identificadas algumas enzimas da *C. violaceum*. Por exemplo: a L-triptofano 2', 3'-oxidase, que catalisa a formação de uma dupla ligação entre os carbonos α e β (C2 e C3) do triptofano (Genet *et al.*, 1992); a fenilalanina hidroxilase, que catalisa a conversão de L-fenilalanina a L-tirosina mediante oxigênio molecular (Balasubramanian *et al.*, 1994).

1.7- Objetivos do trabalho

O propósito deste trabalho é o de obter violaceína com pureza conhecida. Isto porque, pretende-se criar uma nova linha de pesquisa no nosso grupo, que tenha por objetivo: a) sintetizar derivados da violaceína; b) realizar testes biológicos com estes derivados e com a própria violaceína. Para tanto, decidiu-se pela:

- 1 Padronização de um procedimento de produção, extração e purificação da violaceína, mediante a construção e utilização de um biorreator tipo "BPS" (Biorreator de prateleiras para superfícies).
- 2 Purificação exaustiva e caracterização completa da violaceína obtida, para ser utilizada como material padrão.

2- Parte Experimental

2.1- O biorreator e as garrafas de Roux

Foi construído um biorreator de alumínio do tipo “BPS” (biorreator de prateleiras para superfícies) de 4 prateleiras, com uma janela de vidro, dobradiças de latão e um tubo de aço-inox, que permite a aeração do sistema (ver fig. 2.1.1).

O biorreator foi projetado para comportar 2 garrafas de Roux (de 1 litro) por prateleira, e suas dimensões foram calculadas para poder ser autoclavado e incubado em estufa.

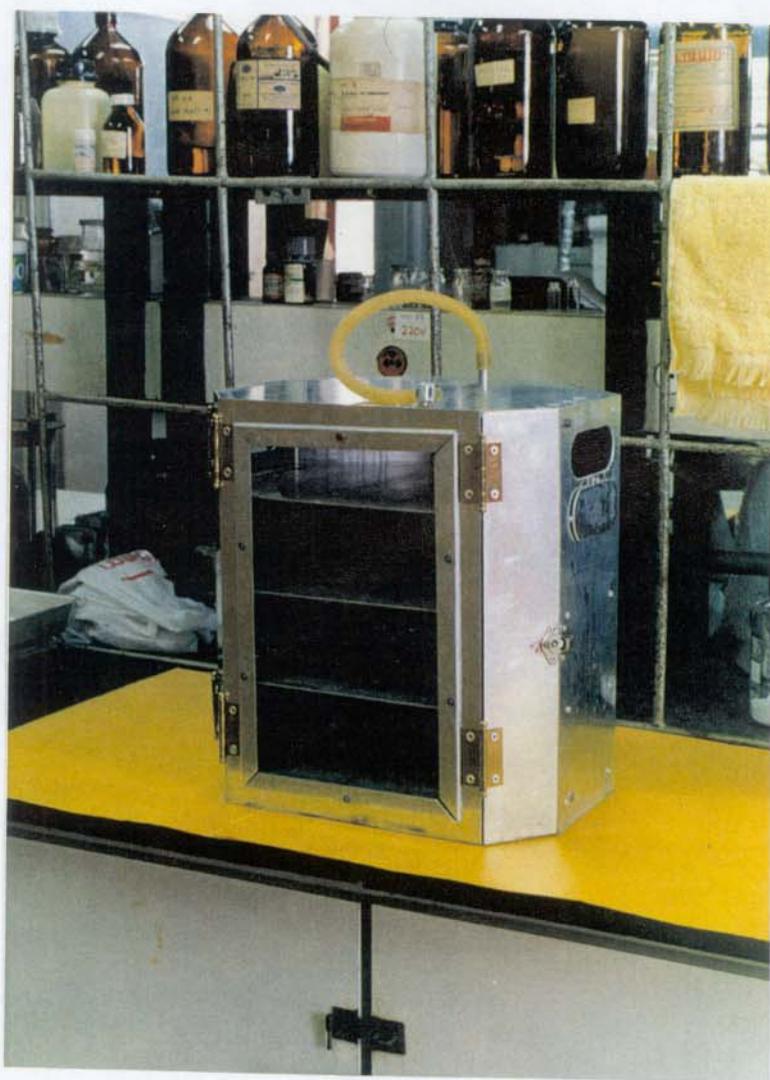


figura 2.1.1- Biorreator “BPS” de 4 prateleiras

As garrafas de Roux foram modificadas para facilitar a manipulação. Na superfície superior de cada uma, foi feito um orifício de ≈ 10 cm de diâmetro, a fim de poder introduzir e retirar material com facilidade. Também foi feita uma tampa de vidro para o orifício, fazendo uso de borracha de silicone para colar as peças da tampa (ver figura 2.3.1).

2.2- Curva de crescimento celular

Foram inoculados 4 mL de uma suspensão de bactérias (*Chromobacterium violaceum* CCT 3496) num Erlenmeyer de 2000 mL, contendo 400 mL de meio de cultura. O Erlenmeyer, contendo o meio, foi previamente esterelizado em autoclave a 1,94 atm e 121°C, por 15 min. O meio continha D-glicose anidra P.A. (Ecibra), peptona bacteriológica (Difco) e extrato de levedura BBL[®] (Becton Dickinson) nas proporções em massa de 0,5%: 0,5%: 0,2%, respectivamente. O Erlenmeyer de 2000 mL foi então incubado num agitador rotatório, a 120 rpm e 30°C. Em diferentes intervalos de tempo, uma alíquota de suspensão de bactérias era retirada do Erlenmeyer e com esta, feita a leitura de absorvância a 720 nm (num espectrofotômetro Beckman, modelo DU-70). Ao graficar a absorvância *versus* o tempo, obteve-se a curva de crescimento celular.

2.3- Procedimento de produção e purificação da violaceína

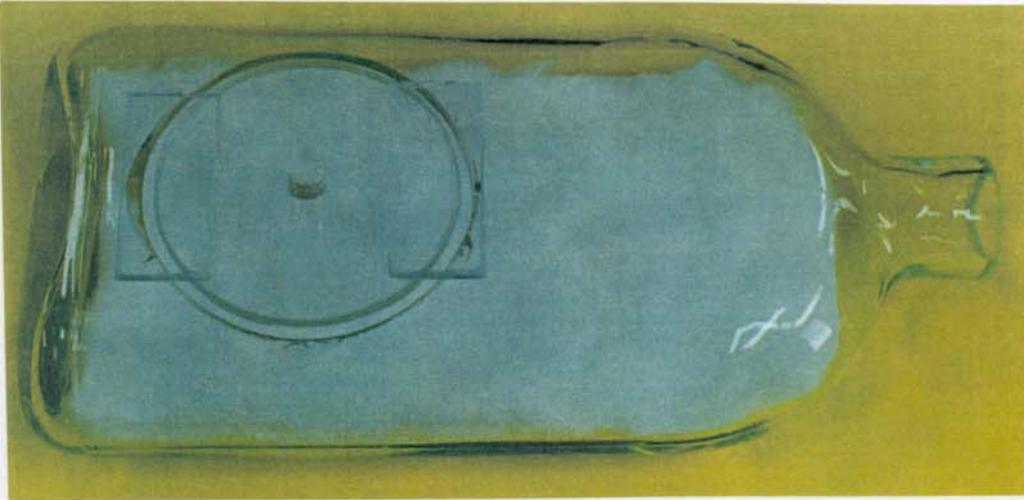
A oito garrafas de Roux de 1 litro (modificadas), cada uma contendo um “tapete” de algodão de aproximadamente 0,5 cm de espessura, 10 cm de largura e 20 cm de comprimento, foram inoculados 90 mL/garrafa de uma suspensão (em fase final de crescimento exponencial) de *Chromobacterium violaceum* CCT 3496 (ver fig. 2.3.1-B).

Para a obtenção de uma suspensão de bactérias em fase final de crescimento exponencial, a um Erlenmeyer de 2000 mL contendo 400 mL de meio de cultura, foram inoculados 4 mL de uma suspensão de bactérias. Dois Erlenmeyers como estes foram então incubados num agitador rotatório a 120 rpm por 12 horas, antes de serem utilizados para inocular as suas respectivas suspensões de bactérias no algodão.

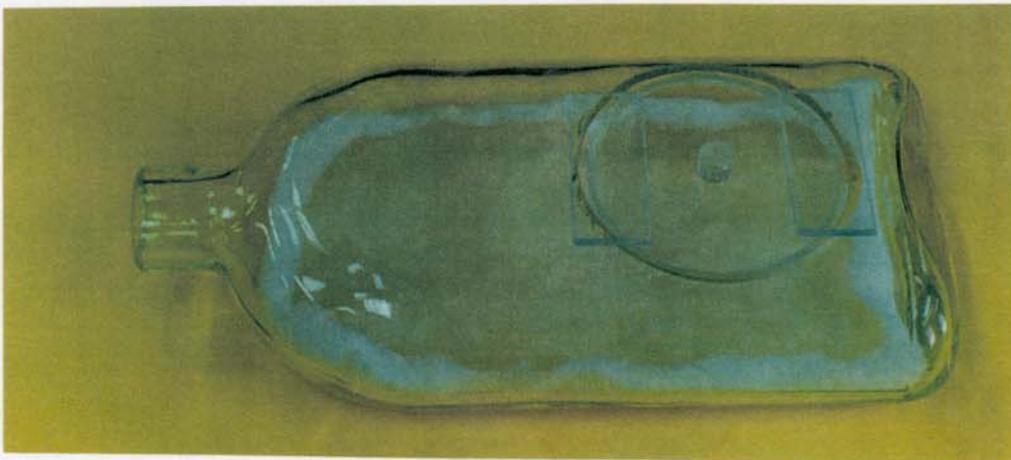
As oito garrafas foram então incubadas a 30°C por 24 horas (sem aeração) no biorreator “BPS” que estava em uma estufa.

Após este tempo, os algodões adquiriram uma intensa coloração violeta e iniciou-se o procedimento de extração (ver fig. 2.3.1-C).

(A)



(B)



(C)

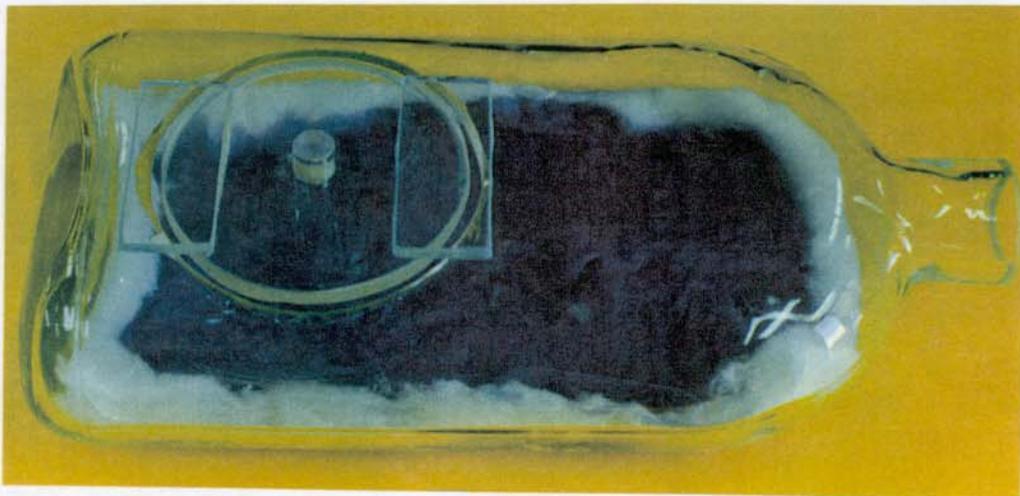


figura 2.3.1- (A) Garrafa de Roux contendo “tapete” de algodão (B) inoculada com 90 mL de suspensão de bactérias (C) 24 horas após o inóculo, com nítida produção de violaceína pela bactéria

Primeiramente, espremeram-se os algodões para retirar o excesso de meio contendo bactérias, e extraiu-se a violaceína (dos 8 “tapetes” juntos) duas vezes com 500 mL de etanol comercial. Esta extração é praticamente quantitativa. Os 1000 mL de solução foram mantidos em repouso até a sedimentação de um material branco. Filtrou-se o sobrenadante, rotaevaporou-se à pressão reduzida e o extrato bruto obtido (≈ 750 mg) foi lavado com água e depois introduzido num cartucho apropriado para proceder à extração em Soxhlet.

A extração em Soxhlet foi feita primeiro com clorofórmio, depois com éter etílico e finalmente com etanol.

Rotaevaporou-se o etanol à pressão reduzida e obteve-se o extrato semipurificado (≈ 40 mg). Este foi purificado por recristalização, dissolvendo parcialmente o extrato em metanol e cristalizando-o com água, na proporção aproximada de 1:2,5, respectivamente. O material sedimentado foi recolhido por centrifugação e seco em estufa a $\approx 100^\circ\text{C}$ por 24 horas. Obteve-se ≈ 10 mg de material que foi rotulado de **ESPR (extrato semi-purificado por recristalização)**.

O material ESPR foi analisado por RMN- ^1H e RMN- ^{13}C (num espectrômetro da Varian, modelo Gemini 300).

Procedeu-se então a mais uma purificação, desta vez por cromatografia. Injetou-se 1,5 mL de solução saturada de ESPR em etanol, previamente filtrado em filtro Millex-SR ($0,5\mu\text{m}$ de diâmetro dos poros), num cromatógrafo HPLC (da Waters, modelo Prep. LC 4000 System). A fração recolhida possuía tempo de eluição inicial de 26 minutos e final de 34 minutos. Foram feitas 4 injeções e das 10 mg de ESPR, obteve-se ≈ 1 mg de **violaceína pura (VP)**. As condições utilizadas para o HPLC foram:

| | | |
|-----------------------------|---|---|
| vazão | = | 7,0 mL/min |
| $\lambda_{\text{detector}}$ | = | 230 nm |
| fase móvel | = | 25% H_2O : 75% metanol (% volume) |
| velocidade do papel | = | 0,5 cm/min |
| atenuação | = | 1024 |
| coluna | = | preparativa DELTA PAK C18, 100 Å (poros), 15 cm (diâmetro da partícula) coluna (30 mm x 30 cm) |

2.4- Caracterização e análise da violaceína (VP) obtida

A violaceína (VP) foi caracterizada por RMN- ^1H e RMN- ^{13}C (num espectrômetro da Varian, modelo Gemini 300); por espectrofotometria no IV (num espectrofotômetro FT-IR da Perkin-Elmer, modelo 16PC); por espectrofotometria no UV-VIS (num espectrofotômetro da Hitachi, modelo U-2000) e por

espectrometria de massa (num espectrômetro da Hewlett Packard, modelo HP 5988A). O espectrômetro de massa foi operado nas seguintes condições: energia dos elétrons = 70 eV; temperatura da sonda = 250°C.

Foi feita também uma análise termogravimétrica (num analisador termogravimétrico da TA Instruments, modelo HI-RES TGA 2950), nas seguintes condições:

taxa de aquecimento = 10°C/min
fluxo de argônio = 100 mL/min
(atmosfera inerte)
massa inicial = 0,9410 mg
faixa de temperatura = (37-1000)°C
varrida

A análise cromatográfica da VP foi feita num cromatógrafo a gás (da Hewlett Packard, modelo HP 5890 série II C6) através de um detector de ionização em chama (DIC), nas seguintes condições:

fase móvel = 20 mL N₂/min
coluna = carbowax 10% sobre CHROMOSORB
WAW, de 3 m com 1/8 polegadas (diâmetro
externo)
injeção = 0,5 µL de solução (1 mg de VP/mL de
etanol grau HPLC)
temperatura do injetor = 250°C
temperatura do detector = 250°C
(DIC)
temperatura do forno = 170°C
(coluna)

Fez-se um estudo aonde variou-se a temperatura (entre 4°C e 65°C) de uma solução de VP em etanol ([VP] = 51,9 µg/mL), monitorando o deslocamento do comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) na região de 575 nm. Utilizou-se para este estudo um espectrofotômetro (da Beckman, modelo DU-70) com acessório de controle de temperatura (Peltier).

Também registraram-se espectros de emissão de fluorescência (com $\lambda_{\text{emissão}}$ entre 600 e 800 nm) de várias soluções de diferentes concentrações de VP (em etanol), excitando sempre em 575 nm. Para este estudo foi utilizado um espectrofotômetro de fluorescência (da Perkin Elmer, modelo MPF-44B).

Por fim, foi construído uma curva de absorvância (em 575 nm) *versus* concentração de VP (com o auxílio de um espectrofotômetro da Hitachi, modelo U-2000). Utilizou-se, nesse experimento, uma cubeta de 1 cm de caminho ótico. As soluções de VP foram preparadas em etanol. Este experimento foi realizado à temperatura ambiente (25°C).

2.5- MEV da *Chromobacterium violaceum*

Foram obtidas micrografias eletrônicas da *Chromobacterium violaceum*, utilizando um microscópio eletrônico de varredura (da JEOL, modelo JSM-T300).

Uma ampola fechada contendo bactérias liofilizadas (*Chromobacterium violaceum* CCT 3496), fornecida pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello” (CCT-Coleção de Culturas Tropical), foi utilizada para a obtenção das micrografias. Um pouco do liofilizado foi colocado no porta-amostras e metalizado com carbono. A ampliação das fotos é de 10.000 vezes.

3- Resultados e Discussão

3.1- O biorreator, as garrafas de Roux (modificadas) e o algodão

A utilização do biorreator e das 8 garrafas de Roux modificadas resultou na simplificação das etapas de produção e extração da violaceína. A metodologia utilizada anteriormente era mais trabalhosa, pois fazia uso de 40 Erlenmeyers de 125 mL.

Aliado ao biorreator, está a descoberta casual do algodão como meio de produção da violaceína. Anteriormente, utilizava-se arroz cozido (Antonio, 1994; Melo, 1996). O dispêndio de tempo no cozimento (na autoclave, com simultânea esterilização) do arroz contido nos 40 Erlenmeyers, é contornado com o algodão, que é simplesmente cortado e introduzido na garrafa de Roux. O algodão, inclusive, dispensa o uso da autoclave para a sua esterilização. Como o volume de inóculo (no algodão) é grande, e o tempo de incubação das bactérias (também no algodão) é curto (24 horas), a probabilidade do crescimento de algum microorganismo estranho é mínima.

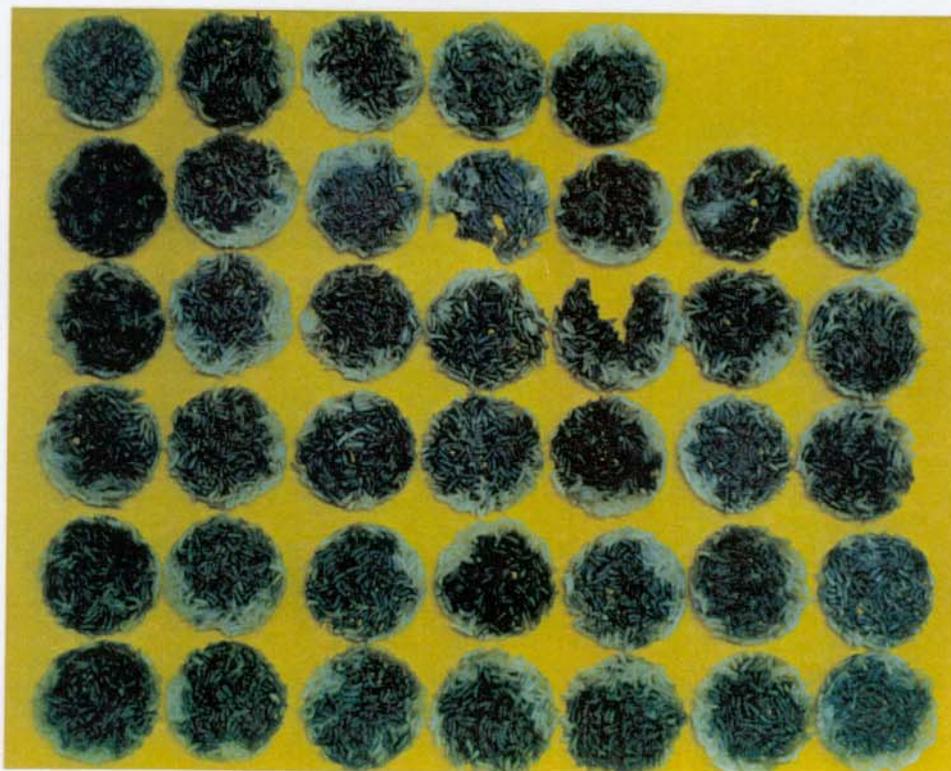
Outra significativa vantagem do algodão surge na etapa da extração com etanol comercial. Ao contrário do arroz, a extração da violaceína (do algodão) é praticamente quantitativa (ver fig. 3.1.1). Existe uma dificuldade muito grande de extrair a violaceína remanescente, que se encontra impregnada no arroz. Se aumentarmos o número de extrações, aumenta também a proporção de impurezas no extrato bruto. Se fosse possível extrair a violaceína (do arroz) com facilidade e de maneira quantitativa, provavelmente obter-se-ia uma quantidade em massa de violaceína, superior à massa obtida pelo método do algodão.

A desvantagem do algodão é que ele requer volumes de inóculo (de suspensão de bactérias) muito maiores, em torno de uma ordem de grandeza.

(A)



(B)



**figura 3.1.1- (A) Algodão após a extração
(B) arroz após a extração**

3.2- Curva de crescimento celular

É importante lembrar que, neste experimento, a absorvância lida não se deve à uma absorção de luz (devido a transições eletrônicas) e sim, ao espalhamento de luz pelas bactérias. Quanto maior a concentração de bactérias, maior é o espalhamento de luz, e menor é a intensidade de luz que chega ao detector, consequentemente, maior é a absorvância lida (Brock *et al.*, 1994).

Na tabela 3.2.1, encontram-se os valores de absorvância e os respectivos tempos nos quais as leituras foram feitas. As curvas 1 e 2 correspondem a experimentos iguais e independentes, isto é, são dois experimentos independentes que foram feitos seguindo o mesmo procedimento experimental (procedimento este que está descrito no item 2.2).

| CURVA 1 | | CURVA 2 | |
|-----------|------|-----------|------|
| Tempo (h) | ABS | Tempo (h) | ABS |
| 0,42 | 0,05 | 0,50 | 0,04 |
| 2,92 | 0,24 | 2,50 | 0,17 |
| 3,87 | 0,50 | 5,00 | 0,62 |
| 5,42 | 0,72 | 6,33 | 0,78 |
| 8,55 | 0,83 | 9,50 | 0,83 |
| 11,33 | 0,89 | 10,83 | 0,84 |
| 25,25 | 0,91 | 33,83 | 0,92 |

tabela 3.2.1- Dados de absorvância e tempo

Com estes dados, graficaram-se as curvas de crescimento celular (fig. 3.2.1).

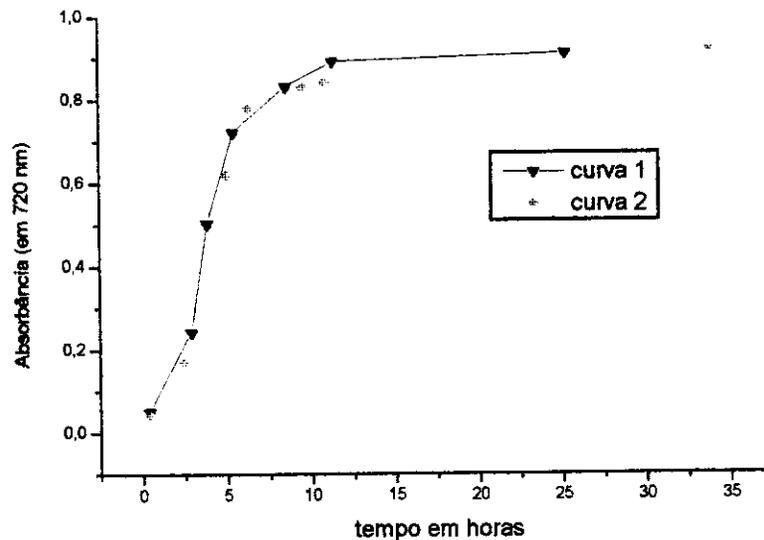


figura- 3.2.1 Curvas de crescimento celular (absorbância versus tempo); as curvas 1 e 2 correspondem a experimentos independentes

Pelo gráfico, podemos ver que a fase final de crescimento exponencial (da *C. violaceum*) se dá aproximadamente em 10 horas. É nesta fase que as bactérias se encontram em máxima atividade para a síntese de violaceína (De Moss e Evans, 1959), e por isso, escolheram-se bactérias desta fase para inocular no algodão.

3.3- Extração e pré-purificação

Após as 24 horas de incubação da *C. violaceum* no biorreator, o algodão havia adquirido uma intensa coloração violeta e ainda se encontrava encharcado com meio de cultura. Ao espremer o algodão, o excesso de meio (que se apresentava bem turvo mas não violeta) foi retirado. A turbidez do meio, por um lado, e a intensa coloração violeta do algodão, por outro, faz acreditar que parte das bactérias se imobilizam nas fibras do algodão e as demais permanecem em suspensão. Ademais, somente as bactérias imobilizadas produzem violaceína. Para certificar esta hipótese, futuros estudos devem ser realizados.

Na primeira etapa da extração utilizou-se o etanol. Sabemos pela literatura que a *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria Gram negativa (Holt, 1984), portanto, que possui uma camada fina de peptidoglicano e uma parede celular rica em lipídeos. Estes dois fatores favorecem a extração da violaceína (que é intracelular). O etanol, ao extrair os lipídeos da membrana externa da parede celular, faz aumentar a permeabilidade da mesma. Por outro lado, a camada de peptidoglicano da parede celular (por ser fina e pouco entrecruzada) não impede a passagem do etanol, permitindo que a membrana citoplasmática (bicamada fosfolipídica) seja atacada, resultando também num aumento da permeabilidade da célula. O etanol também desnatura proteínas, e como a membrana plasmática e a membrana externa da parede celular possuem proteínas, este seria um terceiro fator responsável pelo aumento da porosidade da célula, favorecendo assim, a extração da violaceína (Pelczar *et al.*, 1980; Brock *et al.*, 1994).

A lavagem com água retirou provavelmente restos de meio de cultura porque observou-se a contaminação por fungos, desta água, quando deixada por uma semana em béquer aberto sobre a bancada.

Na purificação em extrator tipo Soxhlet, o clorofôrmio arrastou restos de membrana e parede celular, já que lipídeos são solúveis neste solvente (Melo, 1996). O éter etílico arrastou deoxiviolaceína, alguns produtos não identificados e traços de violaceína (Durán *et al.*, 1983).

Após a recristalização, obteve-se o extrato ESPR. O espectro de RMN-¹H deste ESPR indicou que ele ainda estava impuro, como veremos mais tarde. Por isso, recorreu-se à cromatografia (HPLC-preparativa) a fim de purificar a violaceína.

3.4- Purificação por HPLC

Após extenso trabalho, determinaram-se as condições (descritas na parte experimental) de operação do HPLC, a fim de purificar a violaceína (fig. 3.4.1).

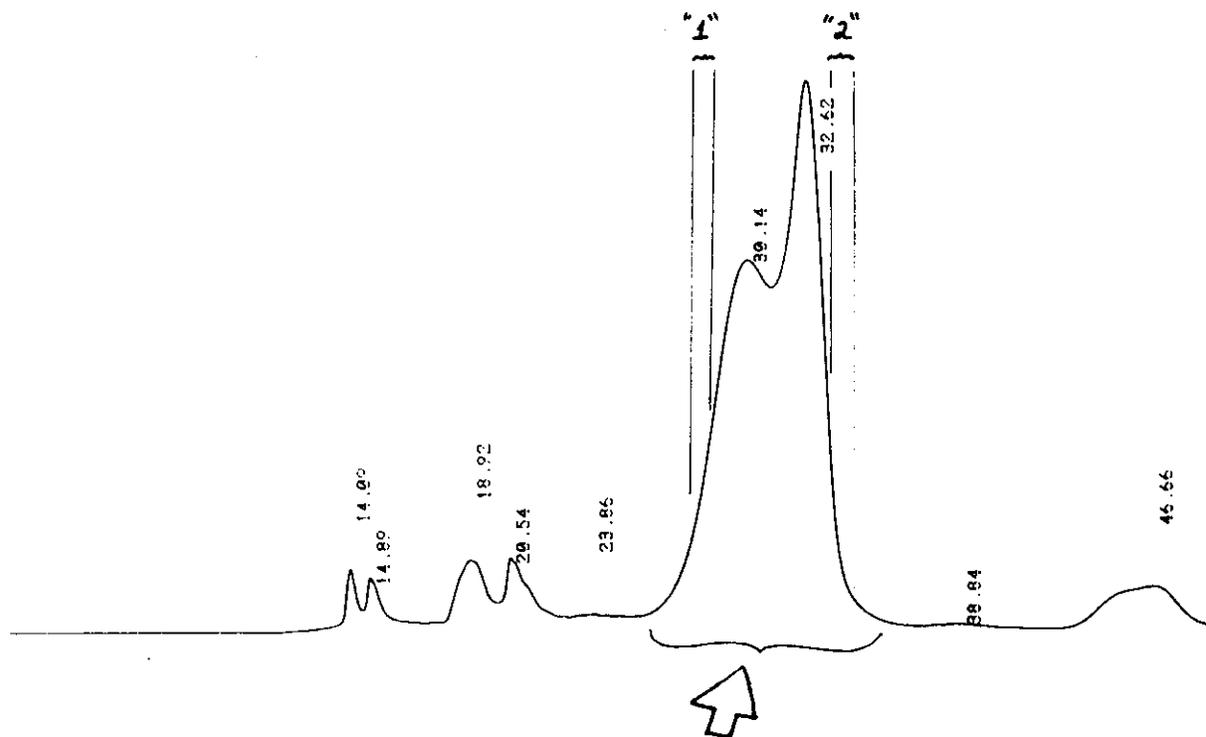


figura 3.4.1- Cromatograma de uma amostra de ESPR dissolvida em etanol

A fração recolhida (de coloração violeta), indicada por uma flexa na fig. 3.4.1, possui tempo de eluição inicial de 26 minutos e final de 34 minutos. É desta fração que obteve-se a violaceína pura (VP). O fato de aparecerem dois picos se deve à dissolução em etanol, pois ao dissolver o ESPR na fase móvel (75% metanol: 25% água), apenas um pico aparece (ver fig. 3.4.2).

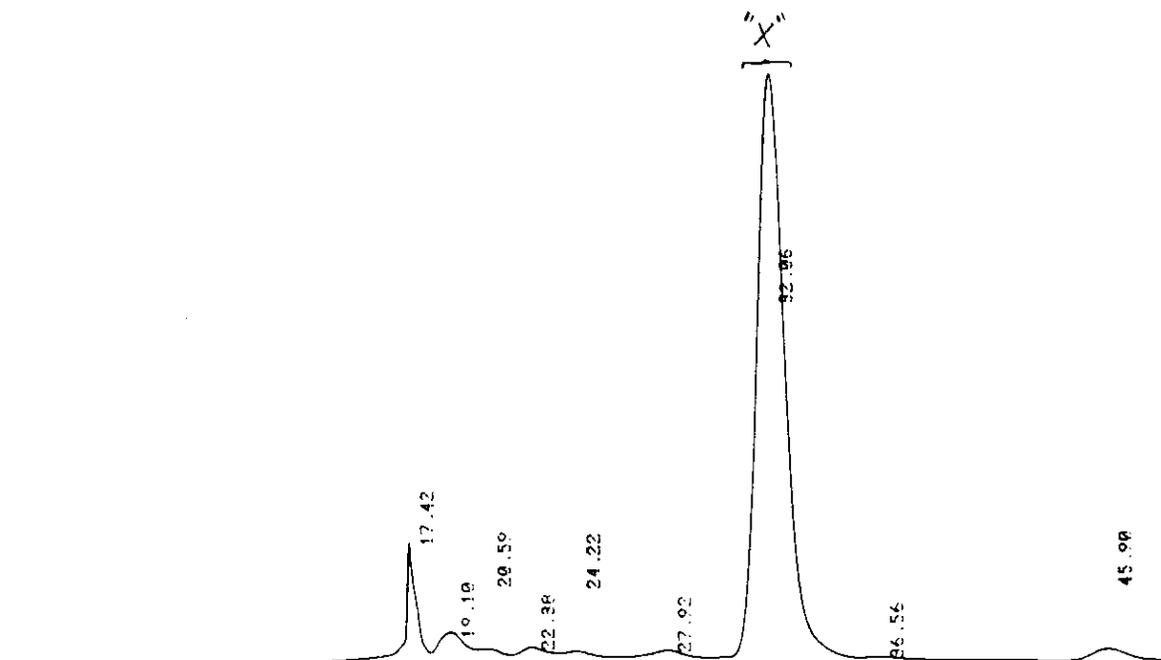


figura 3.4.2- Cromatograma de uma amostra de ESPR dissolvida na fase móvel (atenuação = 512)

A princípio, acreditava-se que os dois picos (da fig. 3.4.1) corresponderem a compostos diferentes, apesar das suas frações possuírem a mesma coloração. Por isso, tentou-se melhorar a resolução do cromatograma, variando as condições do HPLC. Após diversas tentativas, não foi possível separar os dois picos. Decidiu-se então coletar as frações “1” e “2”, indicadas na figura 3.4.1 , e reinjetá-las no HPLC. Obtiveram-se os seguintes cromatogramas:

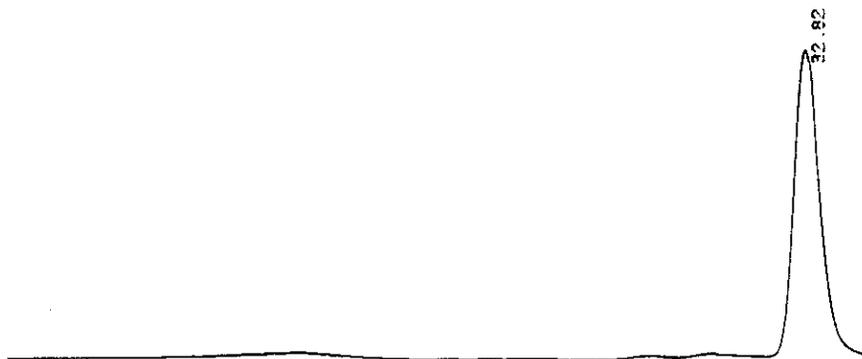


figura 3.4.3- Reinjeção da fração coletada N° “1” (atenuação = 128)



figura 3.4.4- Reinjeção da fração coletada N° "2" (atenuação = 128)

Podemos observar que ambos cromatogramas possuem os mesmos tempos de retenção. Por outro lado, estes tempos são iguais ao tempo de retenção do segundo pico da figura 3.4.1. Foi a partir destes resultados que começou-se a suspeitar de que ambos os picos pudessem corresponder à violaceína. Ao obter o cromatograma da figura 3.4.2, esta ideia foi reforçada.

Foi num artigo, publicado em 1970 (Dimitrov, 1970), que nos baseamos para encontrar uma explicação para o aparecimento dos dois picos. Este artigo discute a existência de uma estrutura monomérica e outra dimérica da prodigiosina, um pigmento produzido pela bactéria *Serratia marcescens*. Esta bactéria foi primeiramente classificada como *Chromobacterium prodigiosum*, isto é, fora considerada do mesmo gênero da *Chromobacterium violaceum*. Mesmo sendo corrigida a classificação, ambas possuem muitas características em comum, como por exemplo: são Gram negativas, possuem forma de bastonete, produzem um pigmento intracelular, se movimentam por meio de flagelos, somente na presença de O₂ é que produzem o pigmento, os pigmentos são antibióticos e insolúveis em água (Melo, 1996; Lichstein e Van de Sand, 1945).

Apesar da estrutura química da prodigiosina (fig. 3.4.5) ser bem diferente da violaceína, as semelhanças descritas anteriormente podem nos sugerir, por analogia, que o mesmo fenômeno (de formação de dímeros e/ou trímeros e/ou até agregados) possa estar ocorrendo com a violaceína.

Foram feitos estudos de fluorescência e absorção no visível, como veremos mais tarde, que comprovam a existência (em solução) destes agregados moleculares de violaceína. Com isto, podemos justificar a existência dos dois picos ($t_r = 30$ min.; $t_r = 32$ min.; no cromatograma da fig. 3.4.1) como sendo, cada pico, violaceína em diferentes estados de agregação. A caracterização por RMN-¹H e ¹³C do sólido (obtido desta fração, entre 26 e 34 minutos, que contém os dois picos) confirmou ser violaceína pura, corroborando assim, a explicação de que os dois picos correspondem à violaceína.

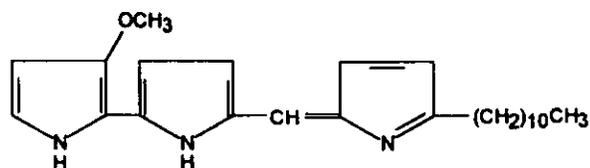


figura 3.4.5- Estrutura da prodigiosina

Na figura 3.4.1, a fração com tempo de retenção em torno de 46 minutos, por apresentar uma coloração violeta-azulada, provavelmente corresponde a um remanescente de deoxiviolaína que não foi arrastado pelo éter na purificação em Soxhlet. Existe também coerência no fato deste tempo de retenção ser maior que o da violaína, porque como a coluna (fase estacionária) é apolar (C18), o composto mais apolar (a deoxiviolaína) vai interagir mais com a coluna e conseqüentemente ter um tempo de retenção maior.

Por fim, para verificar a estabilidade da violaína (dissolvida na fase móvel), coletou-se a fração "X", conforme indicado na figura 3.4.2, estocou-se por 10 dias (protegendo da luz) e reinjetou-se no HPLC.

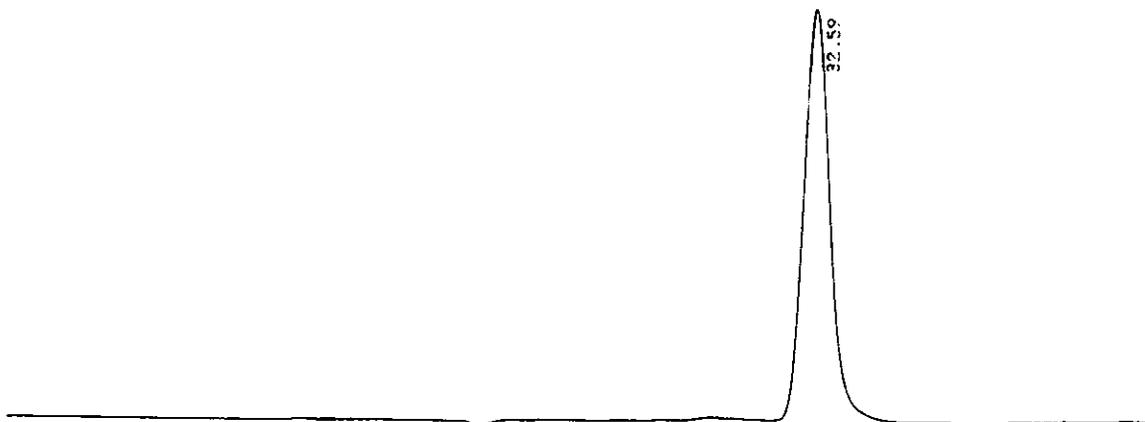


fig. 3.4.6- Reinjeção da fração coletada "X" depois de 10 dias estocada (protegida da luz) (atenuação = 128)

Em princípio, podemos dizer que a violaína não se decompõe.

3.5- Caracterização por RMN-¹H e RMN-¹³C

A seguir, apresentamos os espectros de RMN-¹H e ¹³C (desacoplado) do ESPR e da VP.

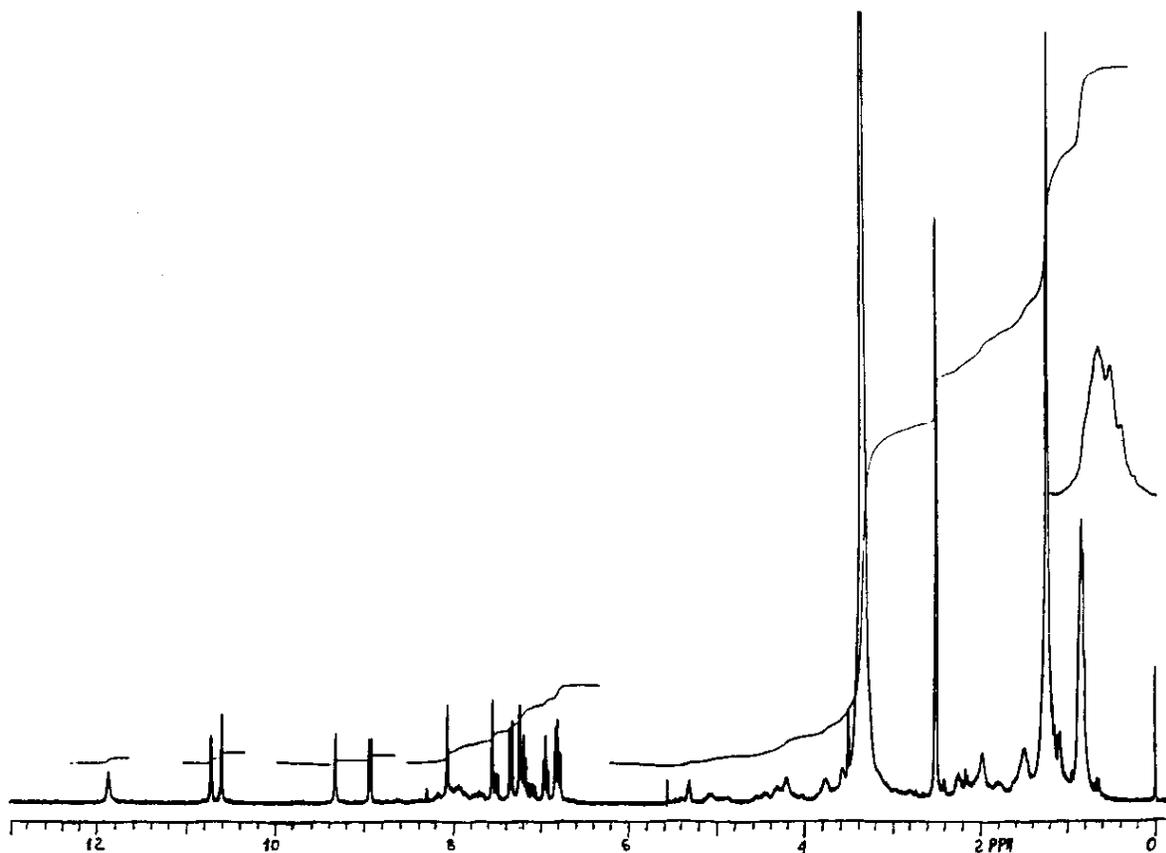


figura 3.5.1- Espectro de RMN-¹H do ESPR dissolvido em DMSO-d₆ contendo uma alíquota de TMS em CDCl₃

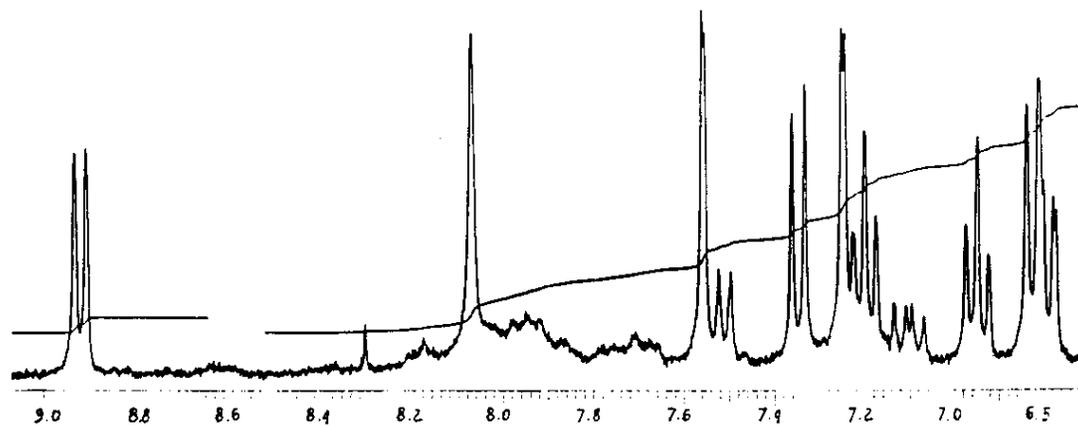


figura 3.5.2- Ampliação da faixa 6,5-9,0 ppm do espectro do ESPR

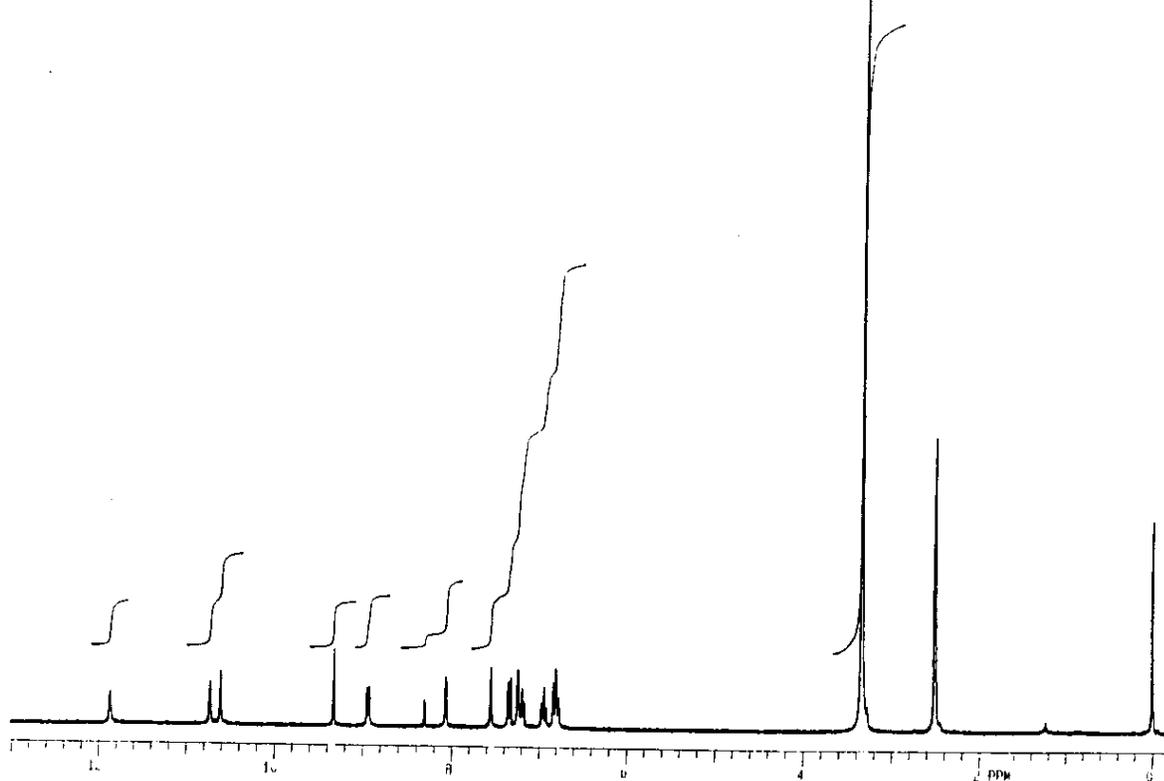


figura 3.5.3- Espectro de RMN-¹H da VP dissolvida em DMSO-d₆ contendo uma alíquota de TMS em CDCl₃

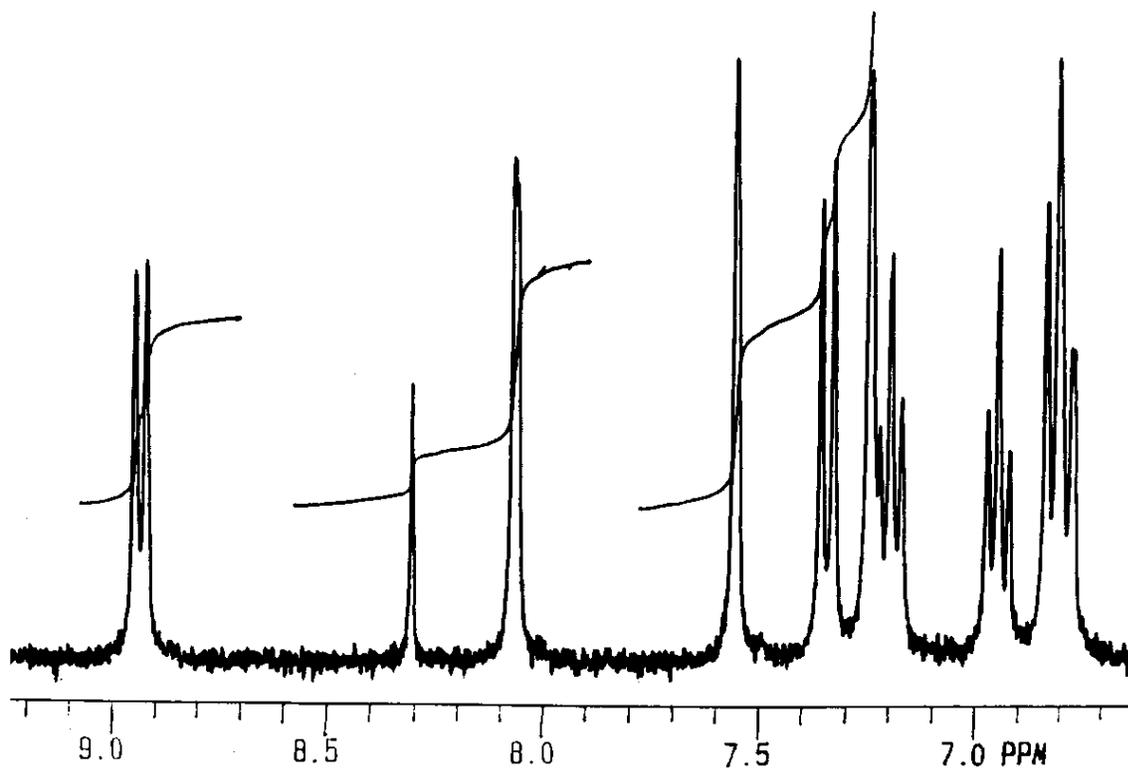


figura 3.5.4- Ampliação da faixa 6,5-9,0 ppm do espectro da VP.

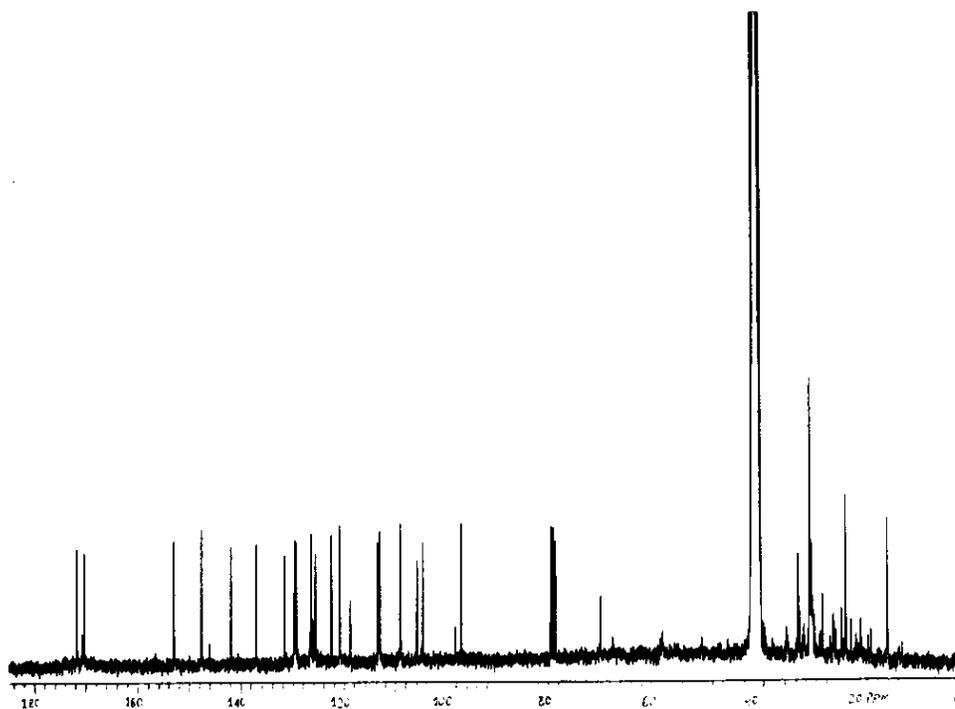


figura 3.5.5- Espectro de RMN-¹³C (desacoplado) do ESPR dissolvido em DMSO-d6 contendo uma alíquota de TMS em CDCl₃

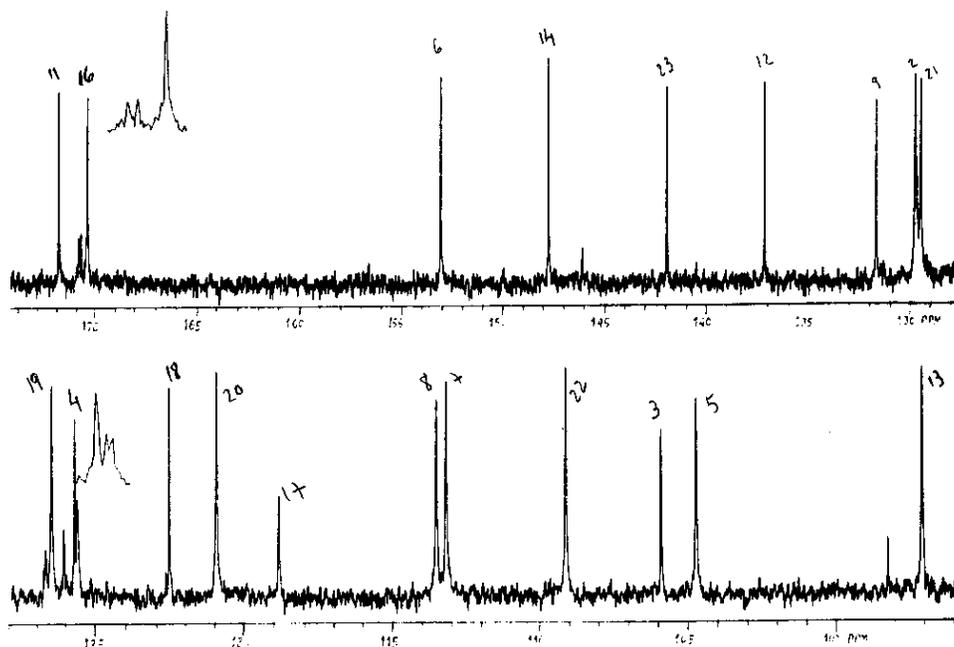


figura 3.5.6- Ampliação da faixa 96-175 ppm do espectro do ESPR

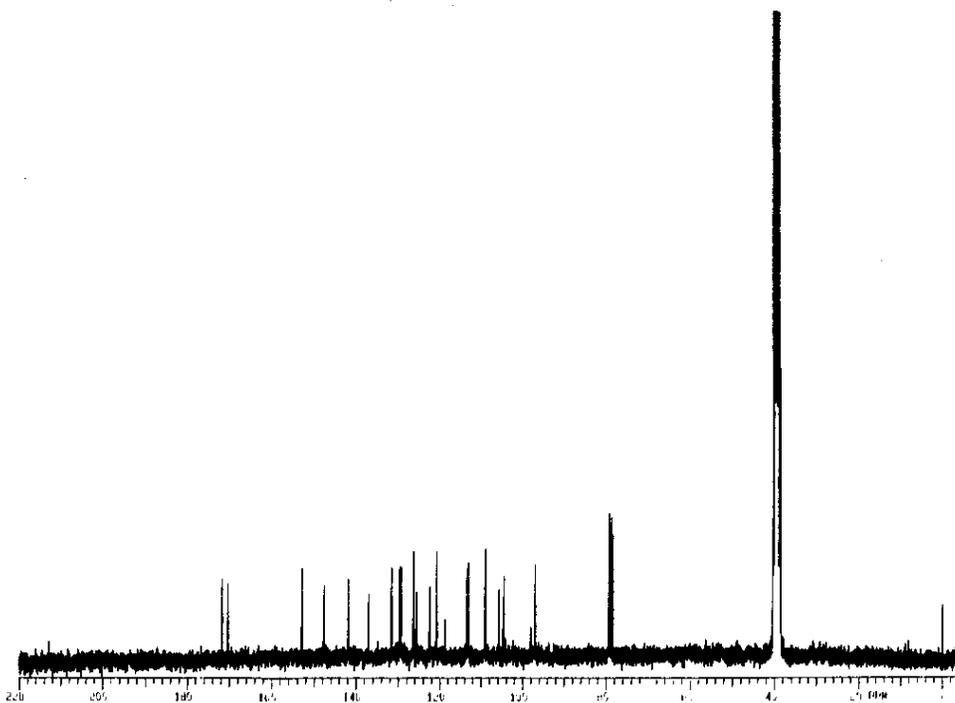


figura 3.5.7- Espectro de RMN-¹³C (desacoplado) da VP dissolvido em DMSO-d₆ contendo uma alíquota de TMS em CDCl₃

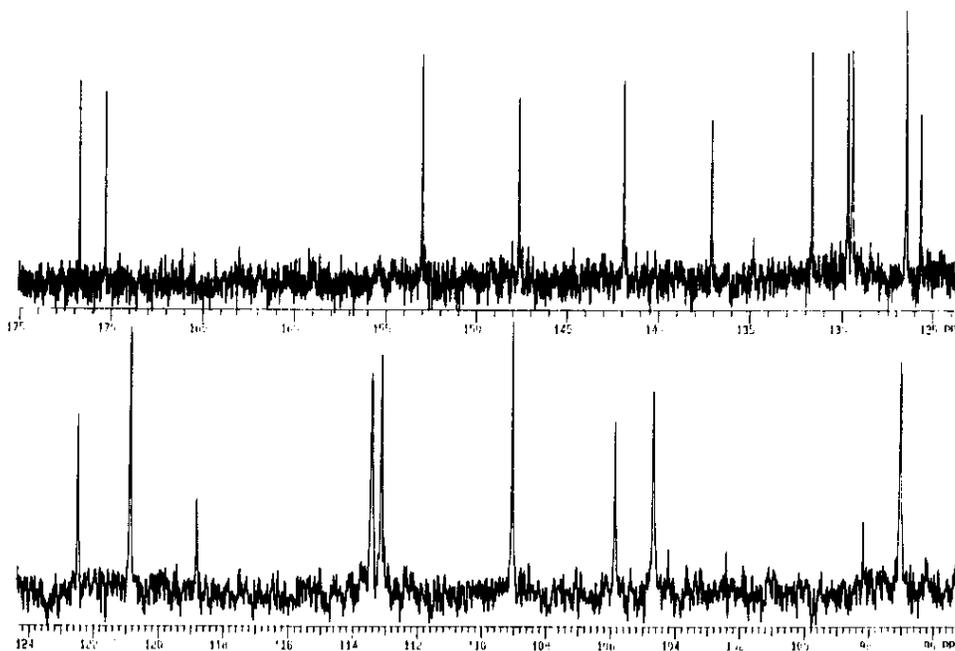
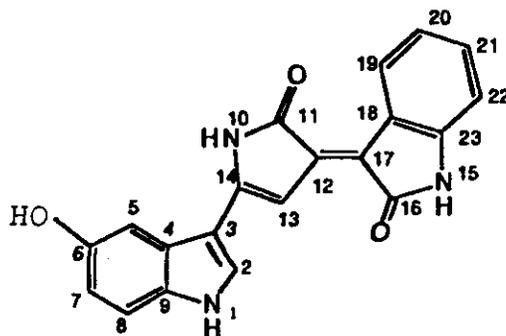


figura 3.5.8- Ampliação da faixa 96-175 ppm do espectro da VP

Ao comparar os dados da literatura, que se encontram na fig. 3.5.9 (Hoshino *et al.*, 1987a), com os espectros do ESPR e da VP, podemos ver claramente que o ESPR está impuro e a VP é violaceína pura. A VP foi obtida, da fração (indicada pela seta na figura 3.4.1) que contém os dois picos, e não se apresentaria pura, nos espectros de RMN, se os picos correspondessem a compostos diferentes.



| Posição | Violaceína | |
|---------|----------------------------|-----------------|
| | ^1H | ^{13}C |
| 1 | 11.89 (br. s) | |
| 2 | 8.07 (d, $J = 2.9$) | 129.5 (d) |
| 3 | | 105.8 (s) |
| 4 | | 125.5 (s) |
| 5 | 7.24 (d, $J = 2.2$) | 104.5 (d) |
| 6 | 9.35 (br. s) | 152.9 (s) |
| 7 | 6.76 (dd, $J = 9.2, 2.2$) | 113.2 (d) |
| 8 | 7.35 (d, $J = 9.2$) | 113.4 (d) |
| 9 | | 131.5 (s) |
| 10 | 10.74 (br. s) | |
| 11 | | 171.5 (s) |
| 12 | | 136.9 (s) |
| 13 | 7.55 (d, $J = 1$) | 96.9 (d) |
| 14 | | 147.5 (s) |
| 15 | 10.64 (br. s) | |
| 16 | | 170.1 (s) |
| 17 | | 118.7 (s) |
| 18 | | 122.3 (s) |
| 19 | 8.93 (dd, $J = 1.8, 7.8$) | 126.3 (d) |
| 20 | 6.95 (dt, $J = 1.8, 7.8$) | 120.6 (d) |
| 21 | 7.20 (dt, $J = 1.8, 7.8$) | 129.3 (d) |
| 22 | 6.82 (dd, $J = 1.8, 7.8$) | 108.9 (d) |
| 23 | | 141.8 (s) |

figura 3.5.9- Dados da literatura referentes ao RMN- ^1H e ^{13}C da violaceína

Os picos que não são da VP e que aparecem no espectro de RMN- ^1H , correspondem a: 0 ppm - TMS; 2,5 ppm - DMSO; 3,3 ppm - H_2O do DMSO; 8,3 ppm - clorofôrmio. Já no espectro de ^{13}C : 0 ppm - TMS; 39 ppm - DMSO; 79 ppm - clorofôrmio.

Existem apenas dois picos, nos espectros de ^1H e ^{13}C (da VP), que não foram identificados. Um deles se encontra no espectro de ^1H , em 1,25 ppm; o outro, no espectro de ^{13}C , em 98,2 ppm. Por aparecer um pico em cada

espectro, e ambos de baixa intensidade, podemos considerar que não se trata de uma impureza em quantidade significativa, presente na violaceína (VP).

O pico da água é intenso porque o DMSO é higroscópico. Mas este dado não nos garante que a VP obtida está isenta de água. Por isso, decidiu-se fazer uma análise termogravimétrica.

3.6- Análise termogravimétrica

Na figura 3.6.1 encontra-se o resultado da análise termogravimétrica, feita com uma amostra de 0,9410 mg de VP.

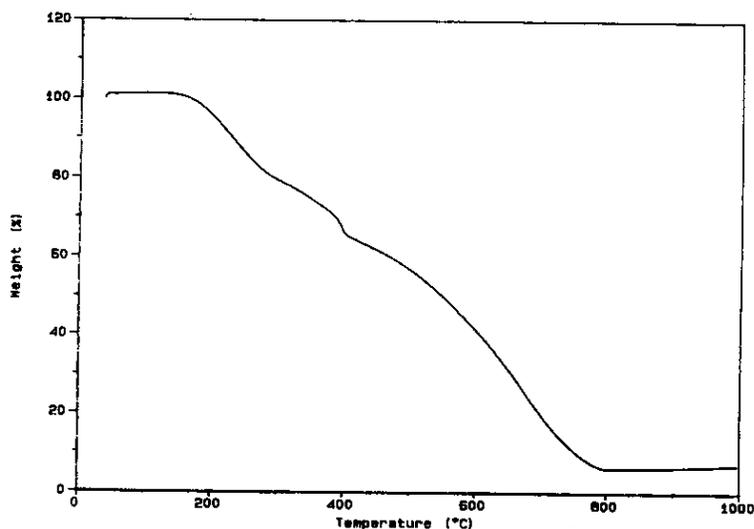


figura 3.6.1- Termograma de uma amostra de VP

Como no termograma observamos perda de massa somente a partir de 170°C, este é um forte indicativo que a VP está isenta de água.

Com respeito ao ponto de fusão da violaceína, a literatura traz os seguintes dados: p.f. > 360°C, com decomposição (Perkampus *et al.*, 1971); p.f. > 350°C, com decomposição (Bycroft, 1988). No termograma da VP observa-se uma transição que tem início em 386°C. Provavelmente esta seja a temperatura de decomposição da violaceína, nas condições em que foi feita a análise. Com relação à transição que tem início em 170°C, esta pode ser devida à sublimação da violaceína. Para determinar estas questões, mais estudos devem ser realizados.

3.7- Análise cromatográfica gasosa

A figura 3.7.1 mostra o cromatograma do solvente utilizado (etanol grau HPLC).



figura 3.7.1- Cromatograma do solvente (etanol grau HPLC)

O cromatograma da VP, dissolvida no etanol (fig. 3.7.2), se mostrou igual ao cromatograma do solvente. A violaceína deve ter ficado retida na coluna ou o seu tempo de retenção é muito grande pois, nos 60 minutos monitorados, não observou-se o aparecimento de nenhum pico.

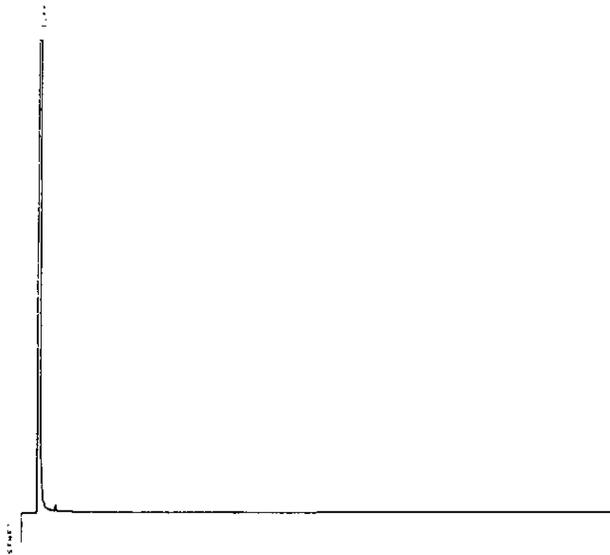


figura 3.7.2- Cromatograma da VP dissolvida no etanol grau HPLC

Uma possível interpretação deste resultado, confirma a idéia da violaceína obtida estar pura. Mesmo não observando o pico referente à violaceína, se ela possuísse impurezas, estas seriam detectadas pelo DIC no caso de considerar por hipótese, que as impurezas não são retidas na coluna cromatográfica. Como não observou-se o aparecimento de nenhum pico, nos 60 min monitorados, concluímos que a violaceína obtida está pura. Mas é importante frisar que esta conclusão somente é válida se a hipótese, das impurezas não ficarem retidas na coluna, for verdadeira.

3.8- Análise por espectrometria de massa.

Obtivemos um espectro de massa, da VP, conforme mostra a figura 3.8.1.

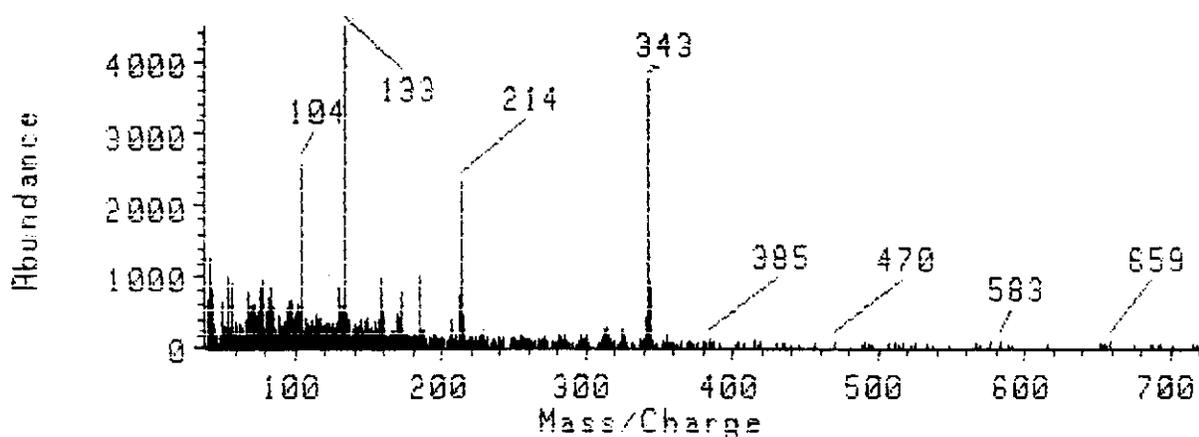


figura 3.8.1- Espectro de massa da VP

Verificamos a presença do íon molecular de $m/z = 343$ e de 3 íons em grande abundância, de seguintes valores: 104, 133 e 214. A literatura (Riveros *et al.*, 1988) atribui o seguinte fragmento ao íon de $m/z = 133$.

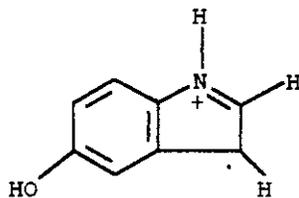


figura 3.8.2- Fragmento de $m/z = 133$

provavelmente formado da seguinte maneira:

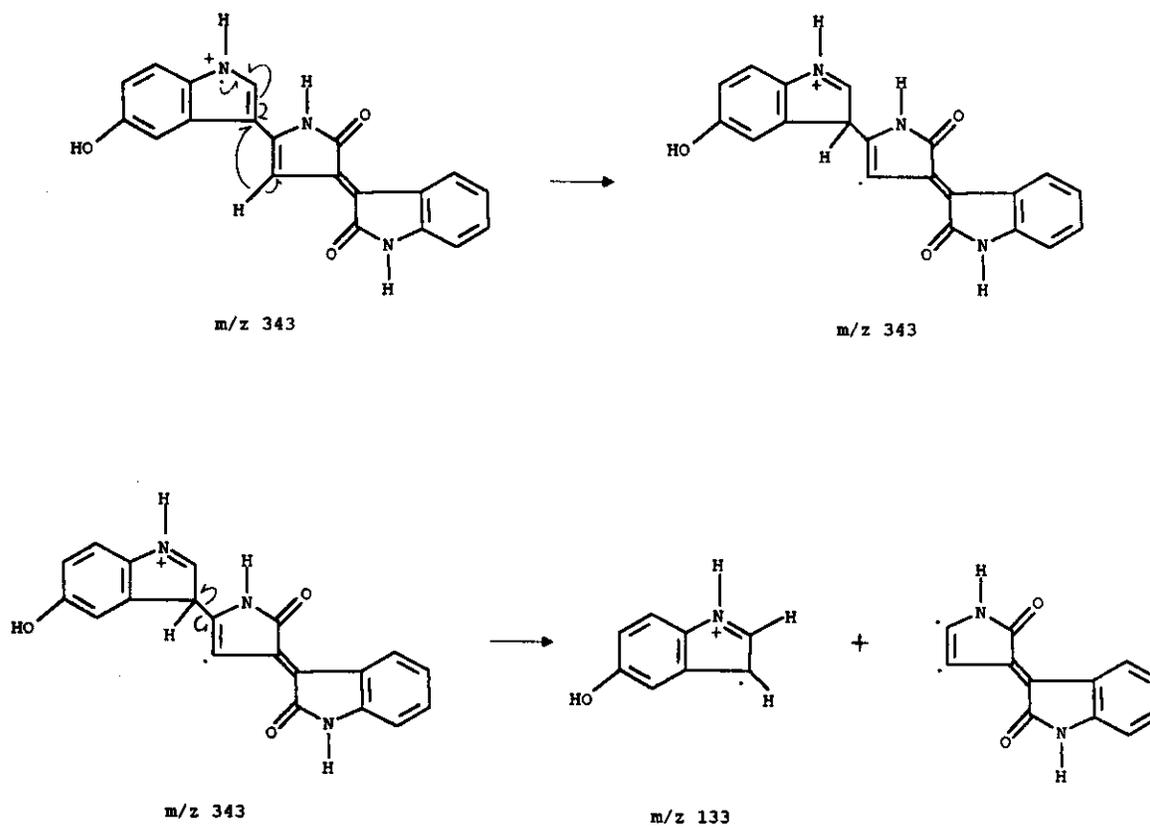


figura 3.8.3- Formação do fragmento de $m/z = 133$

3.9- Caracterização por IV

O espectro no infravermelho da VP se encontra a seguir, na figura 3.9.1.

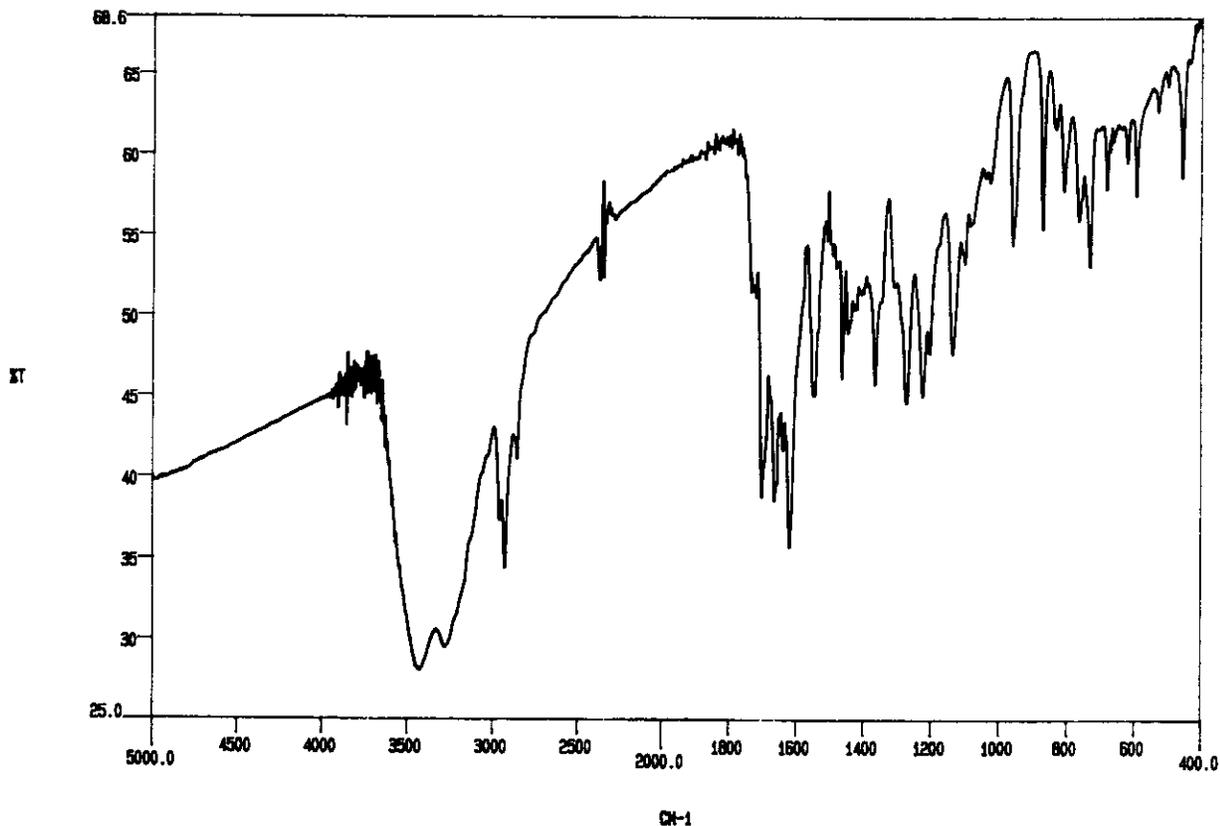


figura 3.9.1- Espectro no IV da VP (pastilha de KBr)

O espectro é idêntico ao da literatura (Antonio, 1994), indicando que foi obtida violaceína pura.

A banda larga entre 3650 e 3000 cm^{-1} corresponde à frequência de deformação axial do N-H e O-H. Em 2930 cm^{-1} temos a vibração de estiramento da ligação C-H.

A banda em 2350 cm^{-1} corresponde ao CO_2 atmosférico (Robinson, 1991).

De acordo com a literatura (Laatsch e Thomson, 1984; Riveros *et al.*, 1988), as bandas em 1680 e 1655 cm^{-1} correspondem ao estiramento C=O, e a banda em 1610 cm^{-1} , ao estiramento C=C.

3.10- Caracterização por UV-VIS

Na figura 3.10.1, apresentamos o espectro no UV-VIS da VP (dissolvida em etanol).

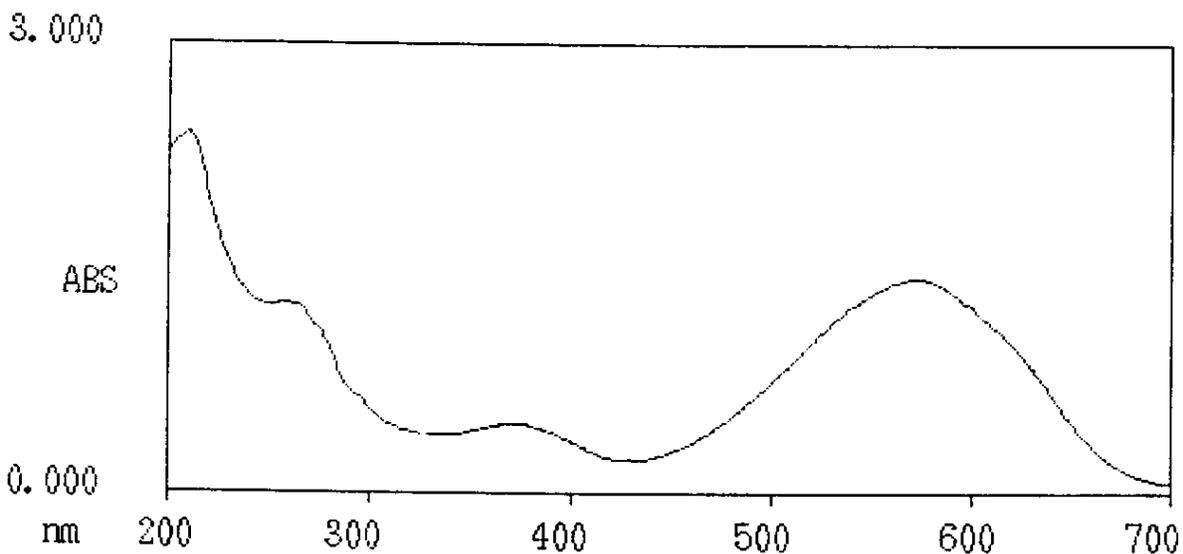


figura 3.10.1- Espectro no UV-VIS da VP (51,9 µg/mL)

O espectro apresenta quatro bandas com máximos em: 210; 258; 372; e 575 nm. Também pode-se observar um ombro em 296 nm. Estes dados são condizentes com os da literatura (Perkampus *et al.*, 1971; Riveros 1986).

3.11- Curva de absorbância *versus* concentração de VP

A curva se encontra na figura 3.11.1.

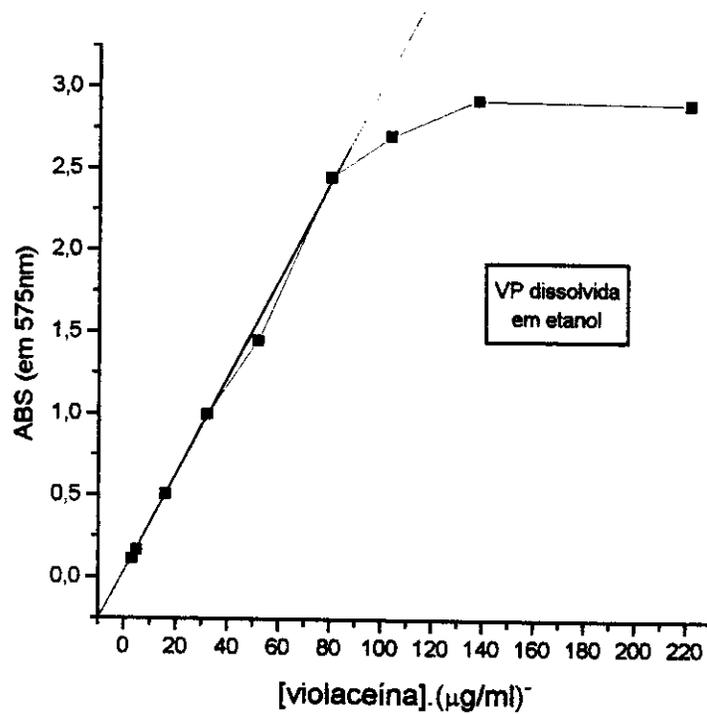


figura 3.11.1- Curva de absorvância *versus* concentração de VP

Os dados utilizados para construir a curva se encontram na tabela 3.11.1.

| Concentração (µg/mL) | Absorbância |
|-----------------------------|--------------------|
| 3,2 | 0,11 |
| 5,1 | 0,165 |
| 16,1 | 0,508 |
| 32,2 | 1 |
| 51,9 | 1,45 |
| 80,5 | 2,45 |
| 103,8 | 2,7 |
| 138,3 | 2,925 |
| 221,8 | 2,9 |

tabela 3.11.1- Dados experimentais utilizados para construir a curva

Podemos observar que o desvio da linearidade (desvio da lei de Beer) começa em $\approx 80 \mu\text{g/mL}$. Por isso, utilizaram-se apenas os 6 primeiros pontos para calcular o coeficiente de extinção (ϵ). Por regressão linear, obtem-se:

$$\epsilon = (2,97 \pm 0,09) 10^{-2} \text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

O valor $0,09 \cdot 10^{-2}$ corresponde à estimativa do erro padrão. O coeficiente de correlação (r), remeteu ao valor de 0,998. Na literatura (De Moss e Evans, 1959; De Moss, 1967), encontra-se o valor $\epsilon_{(\text{lit.})} = 3,13 \cdot 10^{-2} \text{ mL} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Nós construímos a curva monitorando em $\lambda_{\text{máx.}} = 575 \text{ nm}$ e utilizando etanol como solvente, enquanto que a literatura utilizou $\lambda_{\text{máx.}} = 565 \text{ nm}$ e uma mistura contendo acetona como solvente. Apesar destas diferenças, estatisticamente não podemos afirmar que $\epsilon_{(\text{lit.})}$ é diferente do valor obtido experimentalmente por nós, pois o valor da literatura está praticamente contido no nosso intervalo de confiança, que é de apenas 65%.

O principal interesse na construção desta curva, é poder estimar, futuramente, a proporção de violaceína nos extratos que ainda possuem impurezas.

3.12- Curva de $\lambda_{(\text{de absorção máxima})}$ *versus* temperatura

Na figura 3.12.1 temos a curva e na tabela 3.12.1 os respectivos dados experimentais.

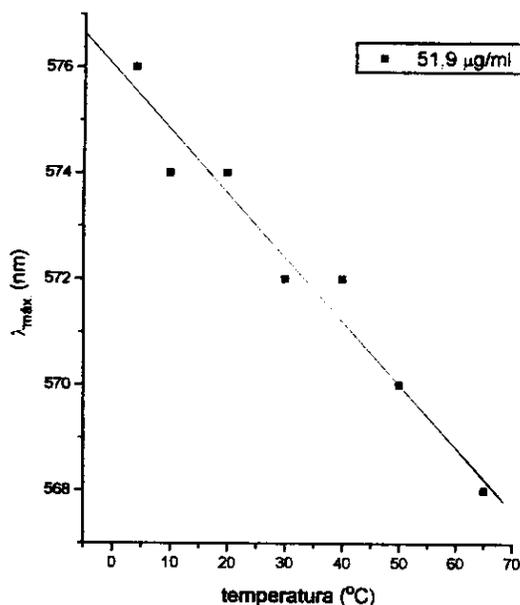


figura 3.12.1- Curva de $\lambda_{(\text{de absorção máxima})}$ *versus* temperatura (de uma solução de VP em etanol)

| Temperatura (°C) | $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) |
|------------------|-----------------------------|
| 4 | 576 |
| 9,9 | 574 |
| 19,9 | 574 |
| 30 | 572 |
| 40,1 | 572 |
| 50,1 | 570 |
| 65,1 | 568 |

tabela 3.12.1- Dados experimentais utilizados para construir a curva

Esta variação, de $\lambda_{\text{máx}}$ em função da temperatura, é um primeiro indicativo de que possivelmente tenhamos equilíbrios entre espécies agregadas (dímeros, trímeros, ...) em solução. A seguir, o estudo de fluorescência nos apresenta evidências para a existência destes equilíbrios.

3.13- Estudo de fluorescência

A figura 3.13.1 apresenta os espectros de fluorescência da VP (dissolvida em etanol) em diferentes concentrações. O comprimento de onda de excitação, em todos os espectros, foi de 575 nm.

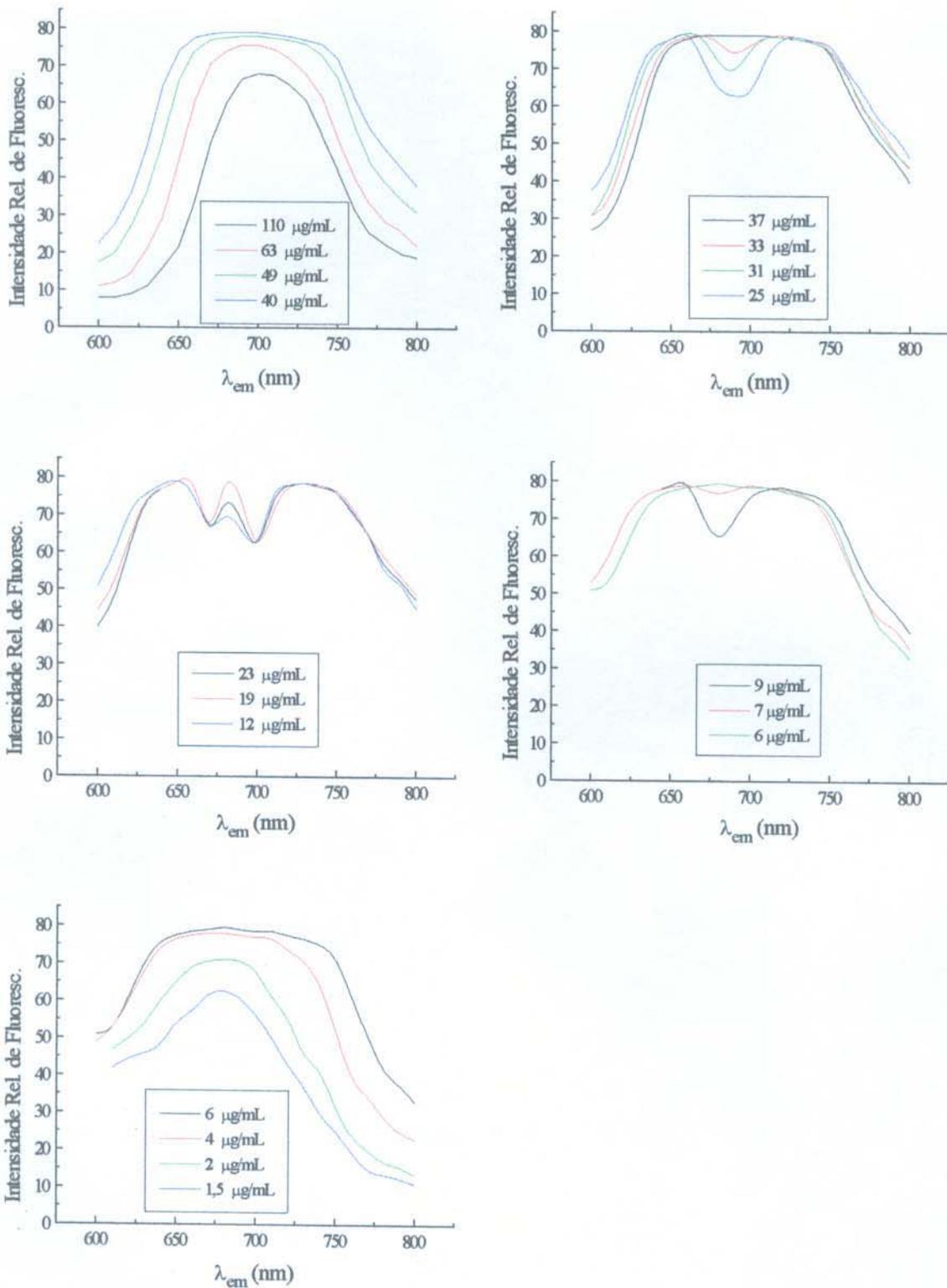


figura 3.13.1- Espectros de fluorescência da VP (solvente: etanol)

Podemos observar um sistema complexo de bandas que se modificam ao simplesmente variar a concentração da VP.

Ao passar de 110 para 40 $\mu\text{g/mL}$, o aumento da intensidade de fluorescência é um forte indicativo de que agregados de violaceína estão se desfazendo. Isto porque, no agregado, a energia emitida por uma molécula (excitada) pode ser facilmente absorvida por outra, do próprio agregado.

Na faixa de 12 a 23 $\mu\text{g/mL}$, observa-se o aparecimento de uma banda em 680 nm, indicando que alguma espécie está sendo formada. Ao diluir ainda mais a solução, esta banda diminui de intensidade e desaparece.

Ao comparar o espectro de 110 $\mu\text{g/mL}$ com o de 1,5 $\mu\text{g/mL}$, pode-se observar um deslocamento no comprimento de onda máximo de emissão. Em 110 $\mu\text{g/mL}$ temos $\lambda_{\text{máx.emiss.}} = 700 \text{ nm}$, e em 1,5 $\mu\text{g/mL}$ temos $\lambda_{\text{máx.emiss.}} = 675 \text{ nm}$. A existência destes valores diferentes de $\lambda_{\text{máx.emiss.}}$ (em diferentes concentrações da VP) provavelmente se deva à existência também, de formas agregadas diferentes, da violaceína, em solução.

Portanto, com este estudo concluímos que a violaceína, em solução, possui equilíbrios entre formas agregadas (dímeros, trímeros, tetrâmeros, ...).

3.14- MEV da *Chromobacterium violaceum*

Para fins ilustrativos, apresentamos duas micrografias eletrônicas da *Chromobacterium violaceum* (CCT 3496), conforme mostra a figura 3.14.1.

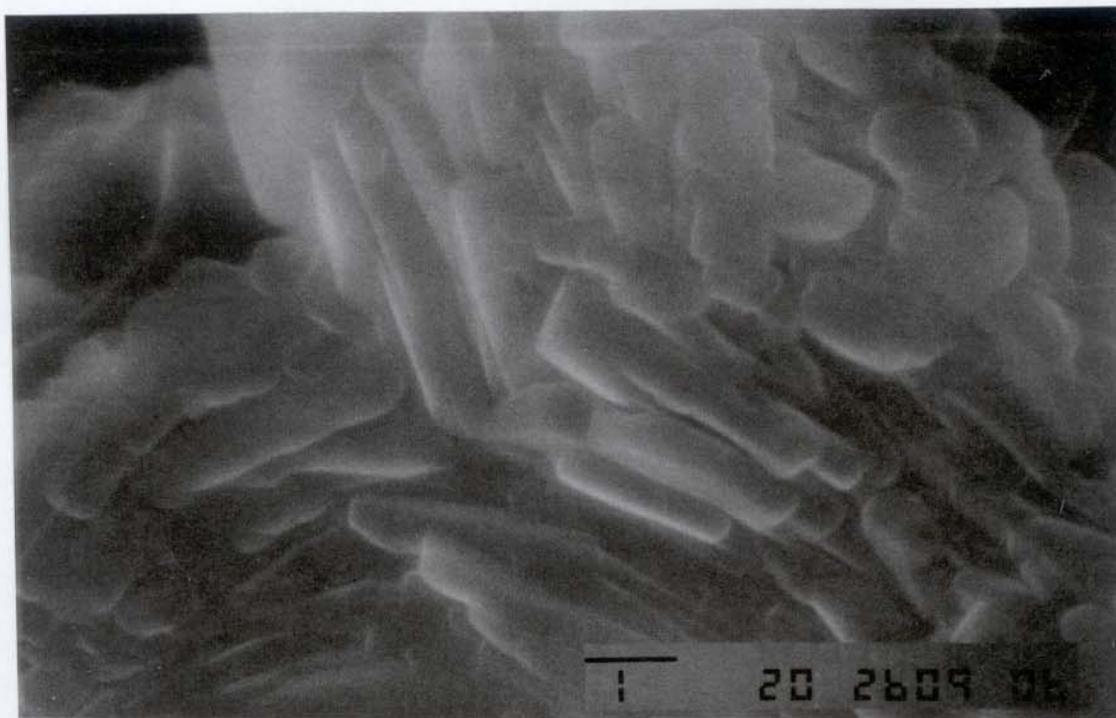
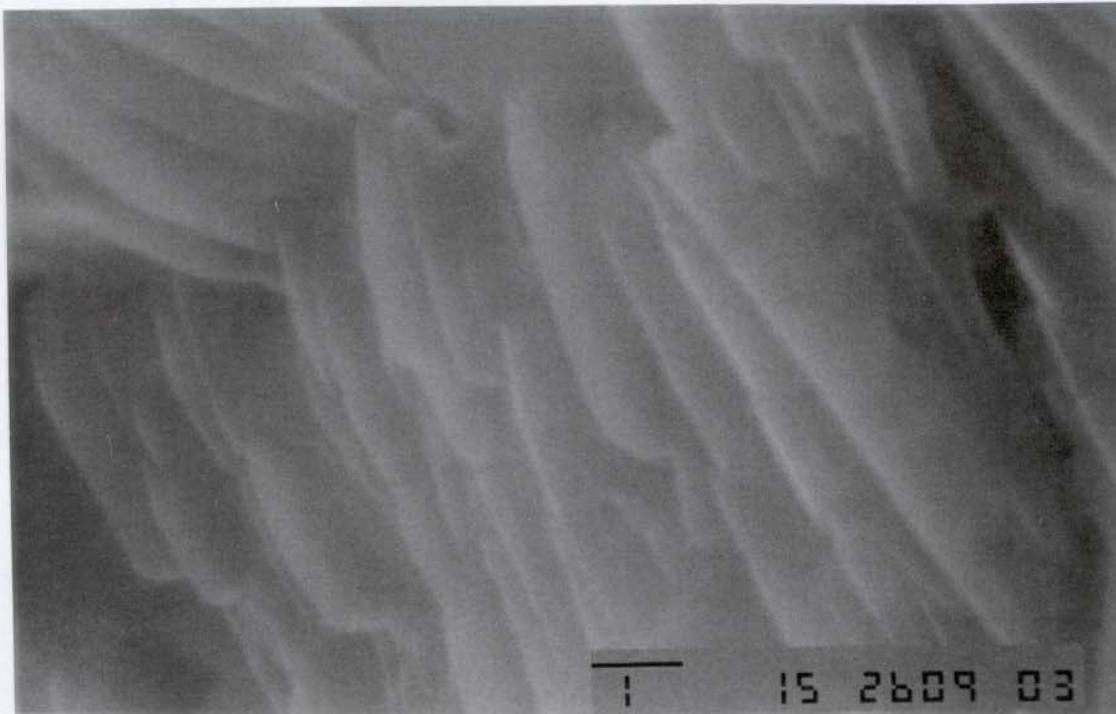


figura 3.14.1- Micrografias eletrônicas da *Chromobacterium violaceum* (CCT 3496)

O procedimento de preparação da amostra para fazer as micrografias foi inadequado. A princípio havíamos descartado os resultados obtidos, mas ao ver algumas micrografias de bacilos e da própria *C. violaceum* (Pelczar *et al.*, 1980; Ueda *et al.*, 1994), decidiu-se por incluir as micrografias no trabalho.

As micrografias da figura 3.14.1, mostram que as bactérias possuem forma de bastonete, por isso, são consideradas bacilos. O comprimento delas varia aproximadamente entre 2 e 3 μm . Estas observações estão de acordo com a literatura (Holt, 1984; Ueda *et al.*, 1994).

Nossas micrografias eletrônicas não mostram os flagelos da *C. violaceum*. Provavelmente isto se deva, por um lado, ao fato de não termos preparado a amostra de forma adequada e, por outro, à morte das bactérias por causa de uma liofilização inadequada, ou de um tempo excessivo de estocagem do liofilizado, ou até de uma estocagem incorreta do liofilizado. Estas três últimas possibilidades foram levantadas porque não conseguiu-se reativar as bactérias liofilizadas, da ampola utilizada para fazer as micrografias.

4- Conclusões

- ◆ Padronizou-se um procedimento de produção, extração e purificação da violaceína.
- ◆ Obteve-se a violaceína pura, de acordo com os métodos de caracterização e análise.
- ◆ Descobriu-se o algodão como meio de produção de violaceína.
- ◆ O algodão mostrou-se um ótimo meio para futuros estudos quantitativos, pois a extração da violaceína (com etanol) é praticamente quantitativa.
- ◆ Projetou-se e construiu-se um biorreator tipo “BPS” (Biorreator de prateleiras para superfícies) que facilita o trabalho do operador nas etapas de produção e extração da violaceína.
- ◆ Mostrou-se que a violaceína, em solução, possui formas agregadas que se encontram em equilíbrio.

5- Referências

- Antonio, R. V. "Biossíntese de Violaceína por *Chromobacterium violaceum*: Síntese e Atividades Biológicas de um Provável Intermediário"; Tese de Doutorado, Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP): Campinas, 1994; p. 19, apêndice I (10).
- Balasubramanian, S.; Carr, R. T.; Bender, C. J.; Peisach, J.; Benkovic, S. J. *Biochemistry* **1994**, 33, 8532.
- Ballantine, J. A.; Beer, R. J. S.; Crutchley, D. J.; Dodd, G. M.; Palmer, D. R. *Proc. Chem. Soc.* **1958**, 232.
- Ballantine, J. A.; Beer, R. J. S.; Crutchley, D. J.; Dodd, G. M.; Palmer, D. R. *J. Chem. Soc.* **1960**, 2292.
- Balows, A.; Trüper, H. G.; Dworkin, M.; Harder, W.; Schleifer, K. H. "The Prokaryots", volume III, second edition; Springer-Verlag New York Inc.: New York, 1992; p. 2591-2600.
- Bergonzini, C. *Ann. Soc. Natural. Modena* **1881**, Ser. 2, 14, 149-158.
- Boisbaudran, L. *Compt. Rend. Acad. Sci.* **1882**, 94, 562.
- Brock, T. D.; Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. "Biology of Microorganisms", seventh edition; Prentice Hall, Inc.: Englewood Cliffs, 1994; p. 51-64, 327.
- Buchanan, R. E. *J. Bacteriol.* **1918**, 3, 27.
- Bycroft, B. W. "Dictionary of Antibiotics and Related Substances"; Chapman and Hall, Ltd: London, 1988; p. 733.
- Caldas, L. R.; Leitão, A. A. C.; Santos, S. M.; Tyrrell, R. M. *Inter. Symp. Curr. Topics Radiol. Photobiol.*, Academia brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, Novembro **1978**, 121.
- DeMoss, R. D.; Evans, N. R. *J. Bacteriol.* **1959**, 78, 583.
- DeMoss, R. D.; Evans, N. R. *J. Bacteriol.* **1960**, 79, 729.

De Moss, R. D. *Antibiotics* **1967**, 2, 77.

Dimitrov, D. P. *Z. Naturforsch*, **1970**, 25b, 762.

Durán, N.; Erazo, S.; Campos, V. *An. Acad. bras. Ciênc.* **1983**, 55, 231.

Durán, N.; Campos V.; Riveros, R.; Joyas, A.; Pereira, M. F.; Haun, M. *An. Acad. bras. Ciênc.* **1989**, 61, 31.

Durán, N.; Haun, M. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1991**, Supl. I, 86, 29.

Durán, N.; Antonio, R. V.; Haun, M.; Pilli, R. A. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1994**, 10, 686.

Durán, N.; Melo, P. S.; Haun, M. *XXV Reunião An. SBBq* **1996a**, Caxambú, M.G. Resumo.

Durán, N.; Melo, P. S.; Haun, M. *XI Reunião An. Fed. Soc. Biol. Exp. (FESBE)* **1996b**, Caxambú, M.G. Resumo.

Friedheim, E. A. H. *Compt. Rend. Soc. Biol.* **1932**, 110, 353.

Genet, R.; Denoyelle, C.; Menez, A. *Indian J. Chem.* **1992**, 31(sec. B), 848.

Hassan, H.; Suntharalingam, S.; Dhillon, K. S. *Singapore Med. J.* **1993**, 34, 456.

Haun, M.; Pereira, M. F.; Hoffmann, M. E.; Joyas, A.; Campos, V.; Filardi, L. D. S.; De Castro, S. L.; Durán, N. *Biol. Res.* **1992**, 25, 21.

Holt, J. G. "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", volume 1; Williams & Wilkins: Baltimore, 1984; p. 580-582.

Hoshino, T.; Kondo, T.; Uchiyama, T.; Ogasawara, N. *Agric. Biol. Chem* **1987a**, 51(3), 965.

Hoshino, T.; Takano, T.; Hori, S.; Ogasawara, N. *Agric. Biol. Chem.* **1987b**, 51(10), 2733.

Hoshino, T.; Ogasawara, N. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, 54(9), 2339.

Hoshino, T.; Hayashi, T.; Uchiyama, T. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1994**, 58(2), 279.

Hoshino, T.; Kimura, K.; Takahashi, H.; Uchiyama, T.; Yoshihama, M. *Eur. Pat. Appl.* EP 612,742 (Cl. CO7D403114), 31 Ago 1994, JP Appl. 93/56,510, 22 Fev 1993; 12 p..

Laatsch, H.; Thomson, R. H. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1984**, ii, 1331.

Lichstein, H. C. e Van de Sand, V. F. *J. Infec. Dis.* **1945**, 76, 47.

May, G.; Brümmer, B.; Ott, H. *Ger. Offen.* DE 3,935,066 (Cl. C12P17/16), 25 Abr 1991, Appl. 20 Out 1989; 5p..

Melo, P. S. "Pigmentos Obtidos de *Chromobacterium violaceum* e *Serratia marcescens*, Propriedade Tripanocida da Prodigiosina e Estudos Toxicológicos", Tese de Mestrado, Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP): Campinas, 1996; p. 11, 12, 19-21.

Pelczar, M.; Reid, R.; Chan, E. C. S. "Microbiologia", volume 1; Editora Mc Graw-Hill do Brasil: São Paulo, 1980; p. 75, 76, 86, 497-499.

Perkampus, H. H.; Sandeman, I.; Timmons, C. J. "UV Atlas of Organic Compounds", volume 5; Butterworth: London, 1971; spectrum nº 5812.

Petrillo, V. F.; Severo, V.; Santos, M. M.; Edelweiss, E. L. *J. Infect.* **1984**, 9, 167.

Ponte, R.; Jenkins, S. G. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **1992**, 11, 583.

Reilly, J.; Pyne, G. *Biochem. J.* **1927**, 21, 1059.

Riveros Gonzalez, R. A. "Química e Atividade Biológica de Derivados de 1,3-diidro-2, H-indol-3-ona"; Tese de Mestrado, Instituto de Química - Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP): Campinas, 1986, p. 58, 59.

Riveros, R.; Haun, M.; Campos, V.; Durán, N. *Arq. Biol. Tecnol.* **1988**, 31, 475.

Robinson, J. W. "Practical Handbook of Spectroscopy"; CRC Press, Inc.: Boca Raton, 1991; p. 519.

Tobie, W. C. *J. Bacteriol.* **1934**, 29(3), 223.



Walker, I. *Ciênc. Hoje* **1990**, 11(64), 44.

Wallace, A. R. "Viagem pelos Rios Amazonas e Negro"; Editora da USP, Editora Itatiaia, Ltda: São Paulo, Belo Horizonte, 1979; p. 130.

\ { Ueda, H.; Nakajima, H.; Hori, Y.; Fujita, T.; Nishimura, M.; Goto, T.; Okuhara, M. *J. Antibiot.* **1994**, 47, 301.

Wooley, P. G. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **1905**, 16, 89.

Zimmerman *Bot. Centralbl.* **1881**, 4, 1528.