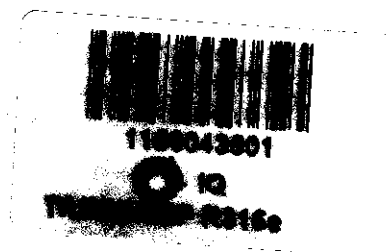


Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Departamento de Físico-Química



Estudos Físico-Químicos e Biológicos da violaceína: Um pigmento produzido pela *Chromobacterium violaceum*

Autor

Daniel Rettori

Orientador

Prof. Dr. Nelson Durán

Tese de Doutorado

Campinas, outubro de 2000



À Susana e Carlos, meus pais.

À Carolina, minha namorada.

*Mergulharemos juntos na grande “sopa” de partículas elementares prevista pela
cosmologia e pela termodinâmica: a Segunda Lei.*

Agradecimentos

Ao meu orientador Nelson Durán, por ter contribuído de forma ampla na formação como cientista que acredito ser.

Aos amigos do grupo de química biológica pelos anos de intenso convívio.

Ao Lauro, por sempre ter-me ajudado a entender melhor os capítulos de fotofísica e química computacional.

Ao pessoal da Física - Nelson, Ricardo, Ana Lúcia e Carlos (meu pai) - pelo apoio na parte de ressonância paramagnética eletrônica.

Aos alunos de iniciação científica – Rodrigo, Rogério e Jerryson – que me ajudaram com as fermentações e a purificação da violaceína.

Por fim, à FAPESP pelo apoio financeiro.

“Com o saber cresce a dívida”

Goethe

“Onde há dívida, há liberdade”

Provérbio latino

Estudos Físico-Químicos e Biológicos da violaceína: Um pigmento produzido pela *Chromobacterium violaceum*

Autor: Daniel Rettori

Orientador: Prof. Dr. Nelson E. Durán Caballero

Palavras chave: violaceína, fermentações, RPE, fotofísica.

RESUMO

Neste trabalho foram estudadas propriedades físico-químicas e biológicas de um pigmento bacteriano. O composto, denominado violaceína, possui massa molar de 343,34 g mol⁻¹ e é produzido pela bactéria *Chromobacterium violaceum*.

Fermentações realizadas com a *C. violaceum* mostraram que a produção de violaceína é maior na presença de uma concentração mais elevada de O₂. A adição de catalase, no início da fase exponencial de crescimento, induz a uma queda na produção do pigmento. Estes resultados indicam que a violaceína poderia ser uma molécula produzida pela célula com a “finalidade” de protegê-la do estresse oxidativo (*i. e.*, o pigmento seria um antioxidante).

Experimentos de RPE (ressonância paramagnética eletrônica) do pigmento puro no estado sólido mostraram que o primeiro estado excitado triplete encontra-se 0,71 kcal mol⁻¹ acima do estado fundamental singlete. Este valor muito baixo - para o dirradical no estado excitado - indica que o pigmento possui uma forma radicalar estável. Desta forma, este resultado corrobora a hipótese da violaceína ser um antioxidante.

Por último, foram realizados estudos de absorção e emissão eletrônica da violaceína. Em solução, ela apresenta duas bandas de fluorescência. A fluorescência normal foi atribuída à transição S₁ → S₀ e, a anômala, a um exciplexo formado entre a violaceína e o solvente.

Physico-Chemical and Biological studies of violacein: A pigment produced by *Chromobacterium violaceum*

Author: Daniel Rettori

Advisor: Prof. Nelson E. Durán Caballero

Key words: violacein, fermentations, EPR, photophysics.

ABSTRACT

In this work we studied physico-chemical and biological properties of a bacterial pigment. The compound, named violacein, has a molar mass of $343.34 \text{ g mol}^{-1}$ and is produced by *Chromobacterium violaceum*.

Fermentations done with *C. violaceum* showed that the production of violacein is increased in the presence of a higher concentration of O_2 . Addition of catalase, at the beginning of the exponential growth phase, induced a decrease of the production of the pigment. These results indicate that violacein could be a compound produced to protect the cell from oxidative stress (*i. e.*, the pigment would be an antioxidant).

EPR (electron paramagnetic resonance) experiments done with the pigment in the solid state showed that the first excited triplet state is $0.71 \text{ kcal mol}^{-1}$ above the singlet ground state. This very low value – for the excited diradical – indicates that the pigment possesses a stable radical form. So, this result is in agreement with our hypothesis that violacein should be a molecule produced to “work” as an antioxidant for the bacterium.

At last, electronic absorption and emission studies were performed with violacein. In solution, the pigment presents two fluorescence bands. The normal one is associated to the $S_1 \rightarrow S_0$ transition and, the anomalous fluorescence, to an exciplex formed between violacein and the solvent.

CURRICULUM

Títulos Acadêmicos

- ⇒ **Bacharelado em Química** – Instituto de Química – UNICAMP (novembro 1993).
- ⇒ **Mestrado em Química** - Instituto de Química – UNICAMP (agosto 1996) (*bolsa CAPES*).
- ⇒ **Doutorado em Química** - Instituto de Química – UNICAMP (em andamento) (*bolsa FAPESP*).

Experiência Acadêmica

- ⇒ **Iniciação científica** – Instituto de Biologia – UNICAMP (março 1991 - março 1993) (*bolsa CNPq*).
- ⇒ **Auxiliar didático** – Instituto de Química - UNICAMP (primeiro semestre 1998).
- ⇒ **Co-orientação** de um projeto de iniciação científica – Instituto de Química – UNICAMP (agosto 1998 – março 1999) (*bolsa SAE*).
- ⇒ **Curso** - International Training Course on Plant Polyphenol Antioxidants in the Biology and Pathology of Free Radicals (Santiago, Chile) (19-28 de julho de 1999).

Seminários proferidos

- ⇒ **“Energética Celular”** (agosto 1997) (convite feito pelo Prof. Dr. Pedro L. O. Volpe do Instituto de Química - UNICAMP).
- ⇒ **“Células, Radicais Livres & RPE”** (novembro 1999) (convite feito pelo Prof. Dr. Carlos Rettori do Instituto de Física “Gleb Wataghin” - UNICAMP).

Encontros, Conferências, Simpósios e Congressos (nacionais e internacionais)

- (1) Pinto, N. C. S.; Rettori, D.; Vercesi, A. E.; Hoffmann, M. E. Tetrahydroxy-1,4-Benzoquinone (THQ) induced cytotoxicity to V79 cells is calcium dependent *em Resumos do XXI Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular* (Caxambu, Brasil) 1992, 39.
- (2) Rettori, D.; Melo, P. S.; Haun, M.; Durán, N. A new procedure for the production of violacein from *Chromobacterium violaceum* *em Resumos do XXIV Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular* (Caxambu, Brasil) 1995, 93.

- (3) Rettori, D.; Durán, N. Absorption and fluorescence spectra of violacein indicate the formation of excimers *em Resumos do XXVI Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular* (Caxambu, Brasil) 1997, 51.
- (4) Rettori, D.; Dias Jr, L. C.; Alderete, J. B.; Azevedo, M. B. M.; Pessine, F. B. T.; Durán, N. Photophysical studies of violacein, a pigment produced by *Chromobacterium violaceum* *em Resumos do XXVII Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular* (Caxambu, Brasil) 1998, 61.
- (5) Rettori, D.; Rodrigues, R. A.; Durán, N. Violacein production, at the exponential growth phase, by *Chromobacterium violaceum* *em Resumos do XXVII Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular* (Caxambu, Brasil) 1998, 61.
- (6) Rettori, D.; Dias Jr, L. C.; Alderete, J. B.; Azevedo, M. B. M.; Pessine, F. B. T.; Durán, N. Photophysical studies of 5-hydroxyindol and violacein *em Resumos do 14th International Conference on Physical Organic Chemistry* (Florianópolis, Brasil) (APRESENTAÇÃO ORAL) 1998, 41.
- (7) Rettori, D.; Rodrigues, R. A.; Durán, N. *Chromobacterium violaceum* produces violacein under oxidative stress *em Resumos do IX Biennial Meeting of the International Society for Free Radical Research* (São Paulo, Brasil) - *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo* 1998, 34 (supl. 1), 169.
- (8) Faljoni-Alario, A.; Azevedo, M. B. M.; Rettori, D.; Torsoni, M. A.; Durán, N. Antioxidant activity of a violacein/cyclodextrin (β -CD) inclusion complex: oxidative stress protection in erythrocytes and in bacteria *em Resumos do IX Biennial Meeting of the International Society for Free Radical Research* (São Paulo, Brasil) - *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo* 1998, 34 (supl. 1), 167.
- (9) Rettori, D.; Moreno, N. O.; Urbano, R. R.; Durán, N. Electron paramagnetic resonance (EPR) studies of a microbial pigment *em Resumos do XXVIII Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular* (Caxambu, Brasil) 1999, 172.
- (10) Santiago, M. F.; Rettori, D.; Moreno, N. O.; Schmidt, F.; Durán, N. Mimetic phenoloxidase activity with the ferrioxamine B complex acting in the o-dianisidine and black liquor *em Resumos do XXVIII Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular* (Caxambu, Brasil) 1999, 172.
- (11) Rettori, D.; Dias Jr, L. C.; Waldman, W. R.; Moreno, N. O.; Urbano, R. R.; Durán, N. Conversion of violacein into a stable diradical by thermal treatment *em Resumos do International Symposium on the Biology and Pathology of Free Radicals: Plant & Wine Polyphenol Antioxidants* (Santiago, Chile) 1999, 54.
- (12) Rettori, D.; Costa, J. R.; Dias Jr, L. C.; Urbano, R. R.; Brandl, A. L.; Moreno, N. O.; Durán, N. Violacein, a pigment produced by *Chromobacterium violaceum*, possesses,

in the solid state, a low lying excited triplet state *em Resumos do XXIX Encontro Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular* (Caxambu, Brasil) **2000**, 184.

- (13) Dias Jr, L. C.; Da Motta Neto, J. D.; Rettori, D.; Durán, N. Espectroscopia de absorção da violaceína *em Resumos do XXVI Congresso dos Químicos Teóricos de Expressão Latina* (Caxambu, Brasil) **2000**, A-11.

Publicações

- (1) Rettori, D.; Durán, N. Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum* *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **1998**, *14*, 685-688.
- (2) Rettori, D.; Volpe, P. L. O. Microcalorimetria: uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da *Saccharomyces cerevisiae* *Química Nova* **2000**, *23*, 257-261.
- (3) De Azevedo, M. B. M.; Alderete, J.; Rodriguez, J. A.; Souza, A. O.; Rettori, D.; Torsoni, M. A.; Faljoni-Alario, A.; Haun, M.; Durán, N. Biological activities of violacein, a new antitumoral indole derivative, in an inclusion complex with β -cyclodextrin *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry* **2000**, *37*, 93-101.
- (4) Dias Jr, L. C.; Da Motta Neto, J. D.; Rettori, D.; Durán, N. Absorption Spectrum of Violacein *Journal of Molecular Structure (Theochem)* **2000**, submetido.
- (5) Rettori, D.; Dias Jr, L. C.; Costa, J. R.; Urbano, R. R.; Brandl, A. L.; Moreno, N. O.; Durán, N. Violacein possesses in the solid state a low lying excited triplet state *Journal of the American Chemical Society* **2000**, a ser submetido.

Patentes

- (1) Rettori, D.; Durán, N. Um biorreator de prateleiras para superfícies (BPS) para a produção de um metabólito bacteriano *Patente Brasileira INPI-São Paulo* **1997**, PI9702986-6.

Lista de abreviaturas

ABS - absorvância
ABS_(ap) – absorvância aparente
AcEt – acetato de etila
ADN – ácido desoxiribonucleico
AIF – análise de injeção em fluxo
ATP – adenosina trifosfato
bac – bactéria(s)
CC – concentração de células
CC₀ – concentração de células no tempo zero
CCT – coleção de culturas tropical
d.e. – diâmetro externo
deoxi - deoxiviolaceína
DMSO - dimetilsulfóxido
DNS – ácido-3,5-dinitrosalicílico
EROs – espécies reativas de oxigênio
EtOH - etanol
Glc – glicose
HOMO – *highest occupied molecular orbital*
I_{máx} – intensidade máxima
kb - quilobases
L-Trp – L-triptofano
LUMO – *lowest unoccupied molecular orbital*
MCL – meio de cultura líquido
MCS – meio de cultura sólido
MM – massa molar

MS – metabólito secundário
 Oe – oersted
 OX - oxindol
 RPE – ressonância paramagnética eletrônica
 S_0 – estado fundamental singlete
 S_1 – primeiro estado excitado singlete
 S_2 – segundo estado excitado singlete
 SOD – superóxido dismutase
 t_g – tempo de geração
 T_1 – primeiro estado excitado triplete
 TOD – tensão de oxigênio dissolvido
 u. a. – unidades arbitrárias
 UQ – ubiquinona
 UQH• - ubisemiquinona
 UQH₂ - ubiquinol
 $V_{(ar)}$ – vazão de ar
 $V_{(O_2)}$ – vazão de O₂
 viol – violaceína
 [viol_{bac}] – mols de violaceína por bactéria
 wp – *weak pitch*
 2PY – 2-pirrolidona
 5HI – 5-hidroxindol
 ΔH – largura de linha
 ΔH_{DQ} – largura de linha da *double quantum*
 ΔH_M – largura de linha dos monoradicais
 λ_{emi} – comprimento de onda de emissão
 λ_{exc} – comprimento de onda de excitação
 $\lambda_{m\acute{a}x}$ – comprimento de onda de máxima intensidade

Sumário

	Página
1- Introdução.....	1
1.1- <i>Geral.....</i>	1
1.2- <i>Objetivo.....</i>	5
1.3- <i>A Hipótese.....</i>	5
1.4- <i>Ressonância paramagnética eletrônica.....</i>	7
1.5- <i>RPE de dirradicais triplete.....</i>	11
1.6- <i>Referências e notas.....</i>	15
 2- Parte experimental.....	 21
2.1- <i>Curvas de calibração.....</i>	21
2.1.1- <i>Concentração de células.....</i>	21
2.1.2- <i>Concentração de violaceína.....</i>	23
2.1.3- <i>Concentração de glicose.....</i>	24
2.1.4- <i>Concentração de CO₂.....</i>	25
2.2- <i>Fermentações.....</i>	28
2.2.1- <i>Fermentações exploratórias.....</i>	28
2.2.1-A- <i>Fermentação exploratórias A.....</i>	28
2.2.1-B- <i>Fermentação exploratórias B.....</i>	28
2.2.2- <i>Fermentações a TOD constante.....</i>	29
2.2.2-A- <i>Fermentação a TOD = 50 %.....</i>	29
2.2.2-B- <i>Fermentação a TOD = 10 %.....</i>	30
2.2.3- <i>Fermentações com catalase.....</i>	31
2.2.3-A- <i>Fermentação controle A.....</i>	31
2.2.3-B- <i>Fermentação controle B (duplicata da controle A).....</i>	31

2.2.3-C- Fermentação com adição de 0,15 g de catalase.....	32
2.2.3-D- Fermentação com adição de 0,40 g de catalase.....	32
2.2.3-E- Fermentação com adição tardia de 0,40 g de catalase.....	33
2.2.3-F- Fermentação na presença de 0,40 g de catalase desativada.....	33
2.3- <i>Estudos de ressonância paramagnética eletrônica</i>	34
2.3.1- Estudos em função da temperatura.....	34
2.3.2- Estudos quantitativos.....	34
2.3.3- Estudo qualitativo.....	35
2.4- <i>Estudos de fotofísica</i>	35
2.5- <i>Obtenção da violaceína</i>	36
2.6- <i>Referências e notas</i>	38
 3- Resultados e discussão	 41
3.1- <i>Fermentações</i>	41
3.1.1- Fermentações exploratórias.....	41
3.1.2- Fermentações a TOD constante.....	45
3.1.3- Fermentações com catalase.....	50
3.2- <i>Estudos de ressonância paramagnética eletrônica</i>	53
3.2.1- Espectros da violaceína.....	53
3.2.2- RPE quantitativo da violaceína.....	58
3.2.3- Conclusões parciais.....	60
3.2.4- Monorrádicaís.....	61
3.2.5- Proposta de uma estrutura para o dirradical.....	67
3.2.6- Espectro de massa da violaceína.....	71
3.3- <i>Estudos de fotofísica</i>	77
3.4- <i>Referências e notas</i>	93
 4- Conclusões	 99

ANEXO 1.....	101
ANEXO 2.....	107
ANEXO 3.....	119

1- Introdução

1.1- Geral

Microrganismos sintetizam compostos químicos de baixa massa molar. Denominam-se de metabólitos secundários (MSs) àqueles que são biossintetizados na fase estacionária do crescimento celular. A função destes MSs na fisiologia dos microrganismos é, de acordo com a literatura, uma questão ainda de intenso debate.¹

A *Chromobacterium violaceum* é uma bactéria quimiorganotrófica, Gram-negativa e anaeróbia facultativa. Normalmente é considerada não-patogênica para os humanos; possui formato de bastonete com dimensões de aproximadamente 0,5-1 x 2-3 μm ; se locomove por meio de um flagelo polar e de um a quatro flagelos laterais. Ela é saprófita e se encontra em amostras de solo e água de regiões temperadas, mas principalmente de regiões tropicais e subtropicais do planeta.²

A *Chromobacterium violaceum* produz um pigmento intracelular chamado de violaceína. Reilly e Pyne foram os primeiros a estudar mais detalhadamente a estrutura química deste pigmento.³ Eles seguiram um procedimento de extração e purificação e sugeriram a fórmula molecular $\text{C}_{50}\text{H}_{59}\text{O}_{15}\text{N}_5$.

A partir de então surgiram várias sugestões de diversos autores para a fórmula molecular e a estrutura química da violaceína, todas sem sucesso. Ballantine e colaboradores foram os que deduziram, em 1958, através de estudos de degradação e síntese, a estrutura correta da violaceína (Figura 1.1).⁴

Estes pesquisadores 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.

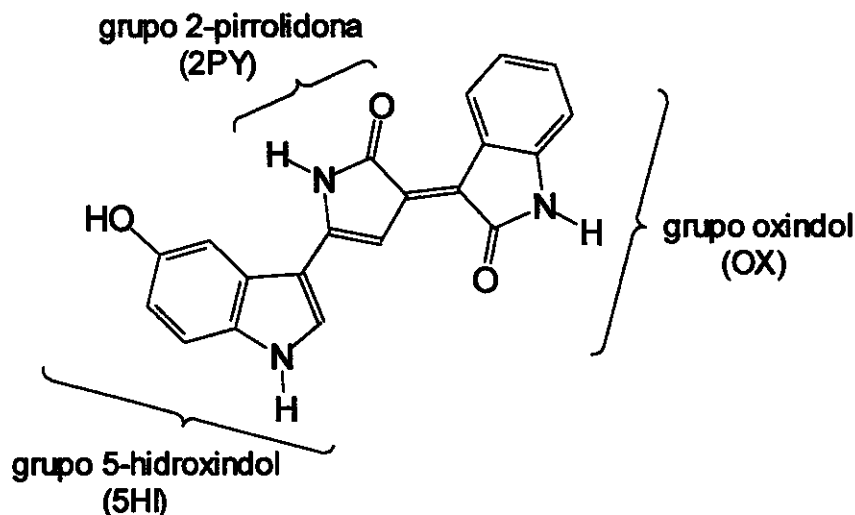


Figura 1.1 – Estrutura química da violaceína ($C_{20}H_{13}O_3N_3$).

Os cientistas Lichstein e Van de Sand foram os primeiros a fazer um estudo abrangente das propriedades antibióticas da violaceína. Este estudo encontra-se relatado num artigo publicado em 1945 no *Journal of Infectious Diseases*.⁵ 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 microrganismos 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.

A partir de então, além da atividade bactericida, surgiram trabalhos atribuindo à violaceína propriedades tripanocida,⁶ anti-viral,⁷ e até tumoricida.⁸ A violaceína também apresenta atividade citotóxica em células de mamíferos.⁹

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 microrganismo no Brasil.^{6(a)}

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.^{6(a)}

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 Caciquiare (na Venezuela). Ele formulou duas hipóteses para explicar as suas observações: ou a “água preta” é tóxica ou faltam nutrientes.¹⁰ 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”.¹¹ 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.

A violaceína é classificada como um MS¹² e a sua função na fisiologia da *C. violaceum* ainda permanece desconhecida.¹³ Numa revisão feita por De Moss, ele aponta para algumas hipóteses.¹⁴ 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 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 hipótese atribui à violaceína um papel de protetor contra a radiação, prevenindo assim, a *C. violaceum* de efeitos fototóxicos.

Além destas hipóteses, 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.¹⁵

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 O₂.¹⁶ Na segunda descoberta, utilizando L-triptofano marcado (com ¹⁴C) em diferentes posições, De Moss e Evans concluíram que, com exceção do carbono carboxílico (C1), o L-triptofano é incorporado na violaceína. Provavelmente este carbono é eliminado por um processo de descarboxilação durante a biossíntese.¹⁷

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).¹⁸ Alguns meses mais tarde os mesmos pesquisadores descobriram a origem dos átomos de O e N do grupo 2-pirrolidona, fazendo uso dos isótopos ¹⁸O e ¹⁵N. O nitrogênio é proveniente do grupo amino ligado ao carbono α (C2) do L-triptofano e os três átomos de oxigênio da violaceína são provenientes do oxigênio molecular.¹⁹

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.²⁰

Durán e colaboradores, num estudo com radio-isótopos, sugeriram que, além do L-triptofano, a *C. violaceum* é capaz de sintetizar a violaceína a partir do indol-3-ácido acético.²¹

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;²² a fenilalanina hidroxilase, que catalisa a conversão de L-fenilalanina a L-tirosina mediante oxigênio molecular.²³

1.2- Objetivo

O nosso propósito, neste trabalho, foi o de investigar uma possível função da violaceína na fisiologia da *Chromobacterium violaceum* e, para tal, duas abordagens foram adotadas: 1) a microbiológica, mediante a realização de fermentações; 2) a molecular, através de estudos físico-químicos da violaceína fazendo uso das técnicas de ressonância paramagnética eletrônica (RPE), espectroscopia de absorção eletrônica e espectroscopia de emissão eletrônica.

1.3- A Hipótese

Dados da literatura²⁴ e resultados que obtivemos²⁵, nos levam a crer que a violaceína possui uma função equivalente à dos carotenóides (*i.e.*, a de possuir uma função antioxidante). A principal função dos carotenóides para as células que os produzem, é a de protegê-las dos danos oxidativos provocados pelas EROs (*e.g.*, $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{HO}_2\cdot$, $^1\text{O}_2$, H_2O_2) geradas nas próprias células. Algumas destas reações geradoras de EROs encontram-se na Figura 1.3.1.²⁶

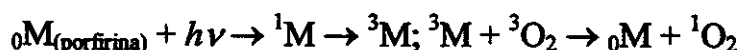
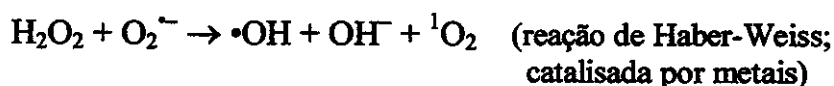
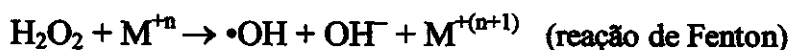
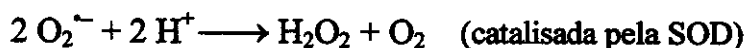


Figura 1.3.1 – Reações mostrando a formação de EROs.

A seguir, encontram-se alguns exemplos de EROs que danificam biomoléculas oxidativamente.

Proteínas, por exemplo, são danificadas pelo ataque a seus grupos laterais e pela abstração de hidrogênios ligados a carbonos- α (Figura 1.3.2).²⁷

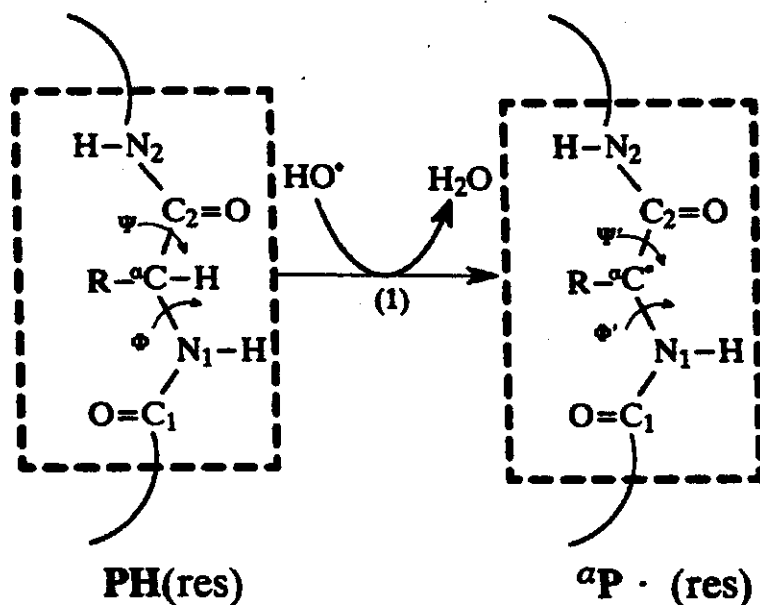


Figura 1.3.2 – Proteína sofrendo abstração de hidrogênio.

Membranas biológicas podem sofrer peroxidação lipídica (Figura 1.3.3).²⁸

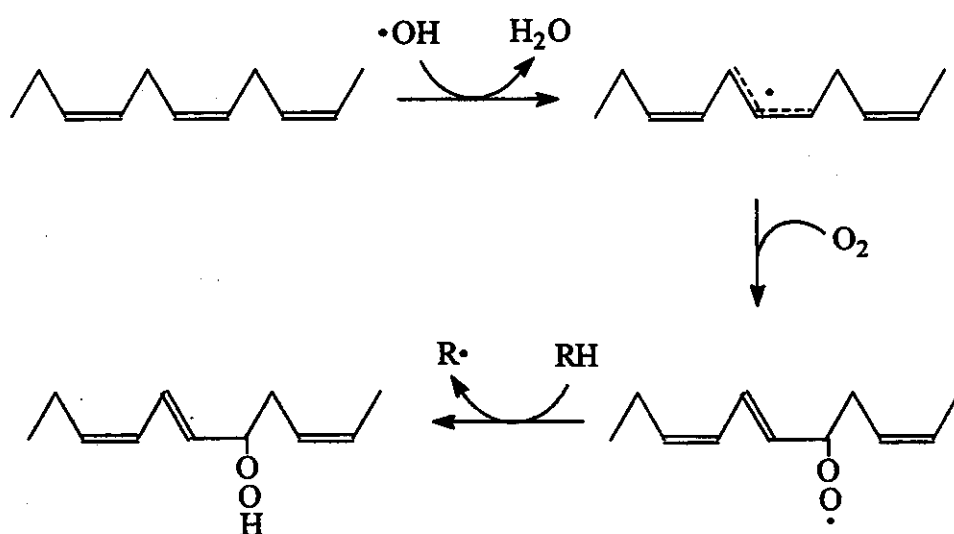


Figura 1.3.3 – Mecanismo de peroxidação lipídica.

Bases nitrogenadas do ADN podem ser oxidadas pelo oxigênio singlete causando mutação (Figura 1.3.4).²⁹

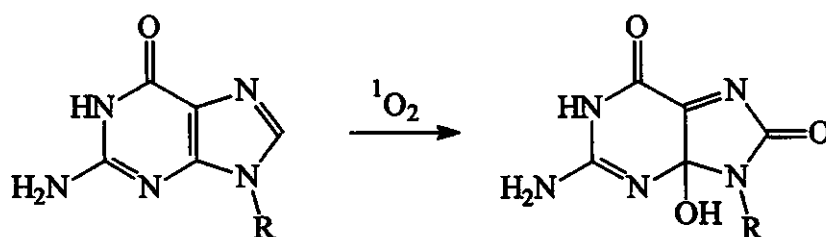


Figura 1.3.4 – Oxidação da guanina pelo oxigênio singlete.

Existem dois principais mecanismos pelos quais os carotenóides protegem as células das EROs: 1) sequestrando radicais livres (*i.e.*, reagindo com os radicais)³⁰; 2) desativando o oxigênio singlete e moléculas fotossensibilizadoras (*e.g.*, clorofilas, citocromos, flavinas) através de transferência de energia (*quenching*)³¹. Um terceiro mecanismo é a absorção direta de luz pelos pigmentos, impedindo que: a) a luz UV promova quebras homolíticas de ligações químicas que resultariam na destruição de biomoléculas³²; b) que a luz UV-vis excite biomoléculas fotossensibilizadoras³³.

1.4- Ressonância paramagnética eletrônica

O elétron pode ser considerado uma partícula que possui rotação em torno de seu eixo. Desta forma, pode-se atribuir à partícula um momento angular. De acordo com os princípios da mecânica quântica, o vetor momento angular possui um número finito de orientações, *i.e.*, é uma grandeza quantizada. O número de orientações é dado por $2S + 1$, onde S é o número quântico de spin do sistema (para o elétron $S = \frac{1}{2}$). Portanto, pode-se ver que o elétron possui duas orientações possíveis para a seu momento angular. Ambas apresentam ângulos de aproximadamente 35° e 145° entre o vetor momento angular e o eixo z .

Uma vez que o elétron possui carga, o seu vetor momento angular ($\vec{S}\hbar$) está necessariamente associado a um momento magnético ($\vec{\mu}$). A expressão que relaciona ambas quantidades encontra-se a seguir:³⁴

$$\vec{\mu} = -g \frac{e}{2mc} \vec{S}\hbar \quad (\text{I})$$

g é o fator de separação espectroscópico; e a carga do elétron; m a massa do elétron; c a velocidade da luz; $\hbar = h/2\pi$ (h = constante de Planck).

Na presença de um campo magnético externo, momentos magnéticos tendem a se alinhar ao campo buscando atingir um estado de mínima energia. A energia de um sistema em função dos diferentes ângulos (θ) entre μ e o campo magnético externo (H) é dada por:³⁵

$$E = -\mu H \cos \theta \quad (\text{II})$$

Na presença de um campo externo, o eixo z do elétron se alinha ao campo externo, e assim, o momento magnético do elétron forma ângulos de 35° ou 145° com o campo H . Podemos rescrever (II) em função da componente do momento magnético na direção z ($\mu_z = \mu \cos \theta$):

$$E = -\mu_z H \quad (\text{III})$$

Para obter μ_z de (I), utiliza-se a projeção do momento angular $S\hbar$ no eixo z , *i.e.*, $M_s \hbar$ ($M_s = +\frac{1}{2}$ e $M_s = -\frac{1}{2}$ são os números quânticos de spin das componentes no eixo z). Logo:

$$\mu_z = -g \frac{e}{2mc} M_s \hbar \quad (\text{IV})$$

O magneton de Bohr (β) é dado por:

$$\beta = \frac{e}{2mc} \hbar \quad (\text{V})$$

Substituindo (V) em (IV), obtém-se:

$$\mu_z = -g \beta M_s \quad (\text{VI})$$

Ao substituir (VI) em (III) obtém-se:

$$E = g \beta H M_s \quad (\text{VII})$$

Os valores de M_s para o elétron são $M_s = +\frac{1}{2}$ e $M_s = -\frac{1}{2}$. Cada um destes valores corresponde à cada uma das duas orientações do elétron. Portanto, de acordo com (VII), a energia de cada um destes estados de spin será:

$$E_+ = +\frac{1}{2} g \beta H$$

$$E_- = -\frac{1}{2} g \beta H$$

e a diferença de energia entre os estados,

$$\Delta E = E_+ - E_- = g \beta H \quad (\text{VIII})$$

Este tipo de separação dos níveis de energia dos estados de spin, mediante a aplicação de um campo magnético, é chamado de Efeito Zeeman.

A condição de ressonância se dá quando H e $\Delta E = h\nu =$ energia do fóton da radiação eletromagnética, satisfazem a equação (VIII). Ocorre assim a absorção de energia e obtém-se o espectro de ressonância paramagnética eletrônica.

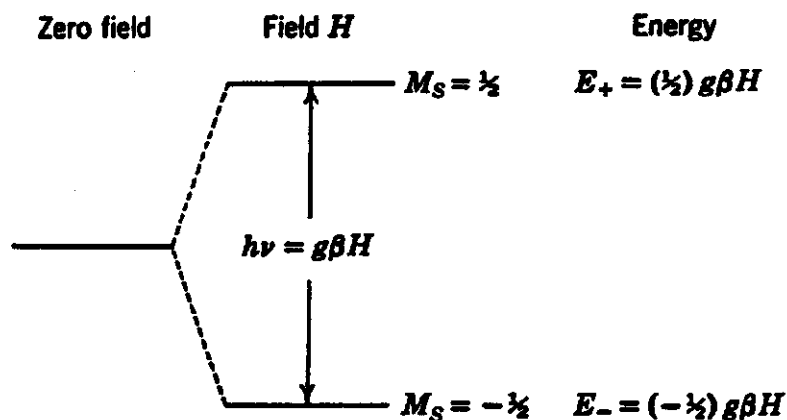


Figura 1.4- Desdobramento Zeeman dos estados de spin devido à aplicação de um campo externo H .

Substituindo ΔE por $h\nu$ e, os valores das constantes, em (VIII), obtém-se, após reorganizar a expressão:

$$g = 714,48 \cdot 10^{-9} \text{ Oe Hz}^{-1} \left(\frac{\nu \text{ (em GHz)}}{H \text{ (em Oe)}} \right)$$

Expressão para a obtenção do fator-g.

1.5- RPE de dirradicais triplete³⁶

Uma espécie contendo dois elétrons desemparelhados possui $S = 1$. O número de orientações possíveis para o momento magnético desta espécie é $2S + 1 = 3$. Portanto, os 3 estados de spin caracterizados por $M_s = 1$, $M_s = 0$ e $M_s = -1$, na presença de um campo externo, serão separados conforme mostrado na Figura 1.5.1.

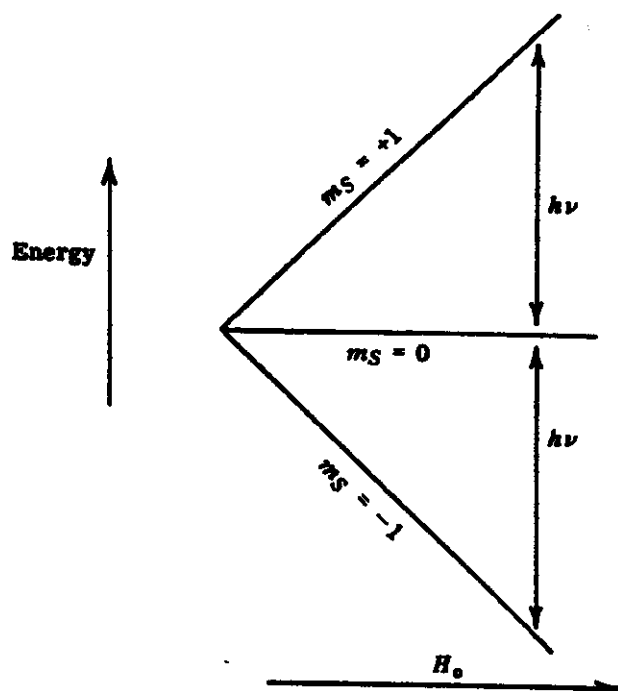


Figura 1.5.1- Desdobramento Zeeman dos estados de spin - de uma espécie que possui dois elétrons desemparelhados que não interagem entre si – com o aumento do campo magnético externo.

Esta abordagem não leva em consideração a chamada interação dipolar entre os dois elétrons desemparelhados. Na interação dipolar – caracterizada pelos *zero field splitting parameters* D e E (ver item 3.2.5) – cada elétron sente o campo magnético gerado pelo spin do outro e, em consequência, o campo sentido pelo elétron passa a ser uma resultante entre o campo externo e o gerado pelo elétron vizinho. Uma vez que a energia da interação

dipolar é da mesma ordem de grandeza da interação do momento magnético da molécula e o campo externo, obtêm-se espectros de RPE que apresentam absorções muito separadas entre si. No exemplo da Figura 1.5.2 (naftaleno triplete) pode-se observar uma separação de mais de 2000 gauss entre as ressonâncias.

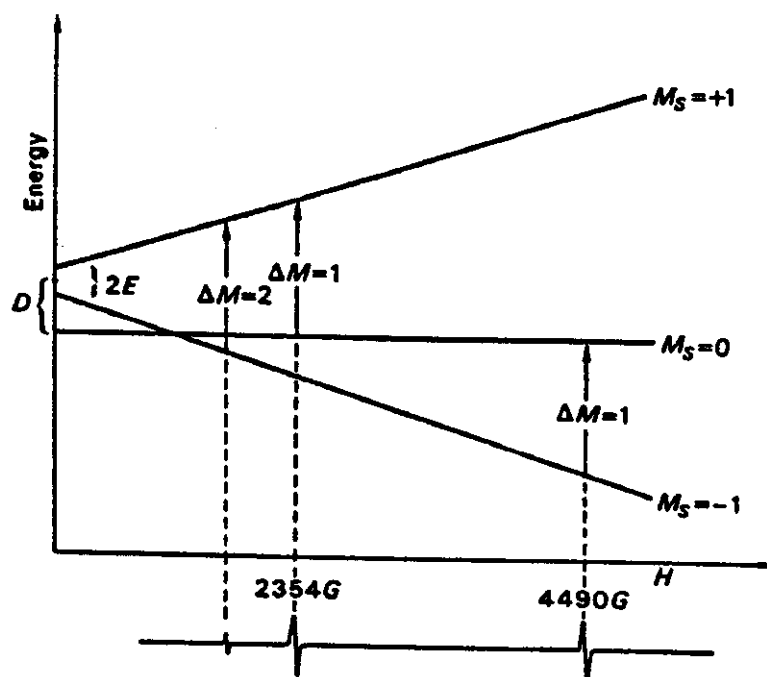


Figura 1.5.2- Desdobramento Zeeman dos estados de spin - de uma espécie triplete que apresenta interação dipolar entre os elétrons - com o aumento do campo magnético externo. O espectro apresentado corresponde ao de moléculas igualmente orientadas de naftaleno triplete com eixo molecular z paralelo ao campo H (espectro obtido utilizando banda-X).

Além disto, a interação dipolar é anisotrópica, o que significa que o espectro de RPE de uma amostra contendo espécies dirradicalares diluídas orientadas randomicamente, apresentará absorção em campos diferentes. A Figura 1.5.3 apresenta o espectro teórico de RPE de moléculas de naftaleno triplete orientadas randomicamente.³⁷

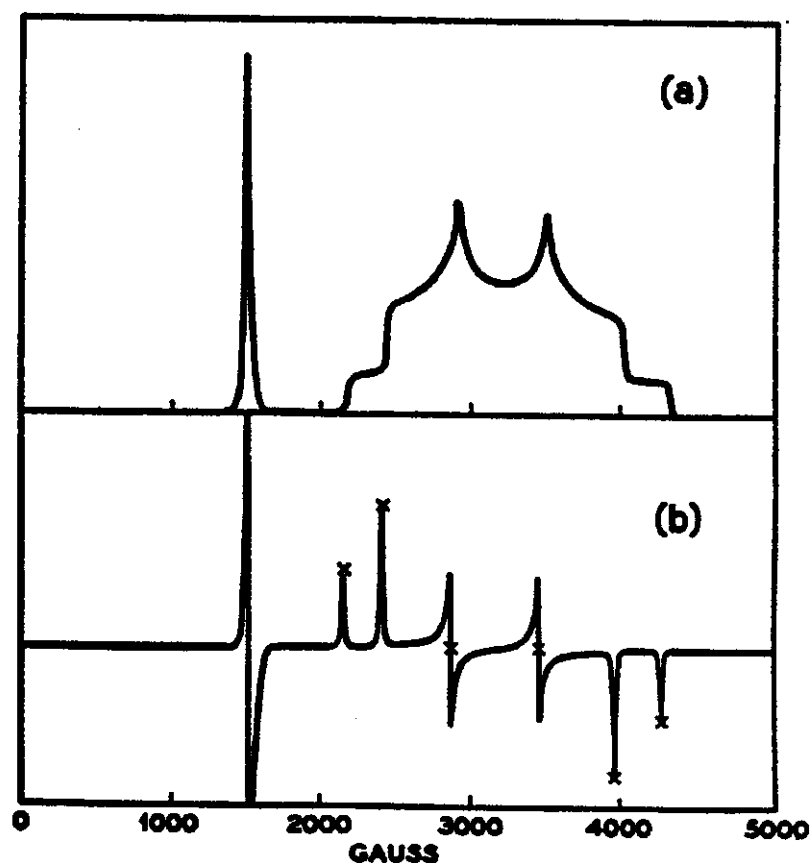


Figura 1.5.3- Espectros teóricos de RPE de moléculas de naftaleno triplete orientadas aleatoriamente ($D = 0,10046$ e $E = 0,01536 \text{ cm}^{-1}$); (a) espectro de absorção; (b) derivada da absorção.

É importante atentar para o fato de que somente as moléculas que possuem um eixo molecular aproximadamente paralelo ao campo é que vão apresentar sinais (da transição $\Delta M_s = 1$) de significativa intensidade.³⁸

Agora, se tivermos uma amostra não diluída contendo as espécies dirradicalares orientadas de forma randômica – como é o caso de uma amostra policristalina – teremos um aumento na largura das bandas devido às interações entre as moléculas. A Figura 1.5.4 apresenta o espectro de RPE do cátion fenalenílio ($\Delta H \cong 700 \text{ gauss}$).³⁹

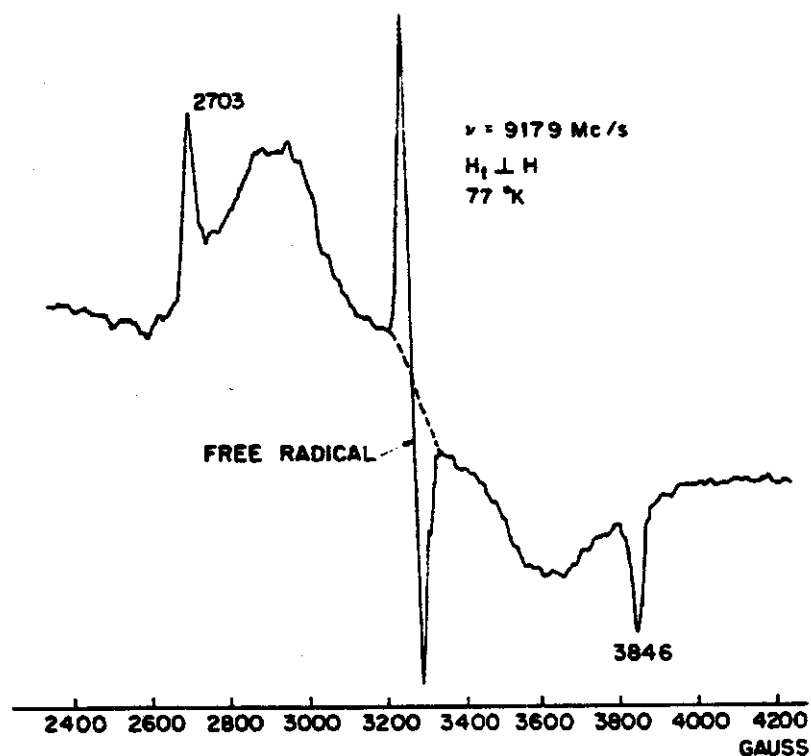
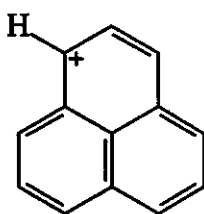


Figura 1.5.4- Espectro de RPE do estado triplete do cátion fenalenílio.



Cátion fenalenílio

Assim como o naftaleno, o cátion fenalenílio possui um estado fundamental singlete. Para obter o espectro de RPE, irradia-se - a baixa temperatura (*e.g.*, 77 K) - um vidro orgânico contendo o cátion. Desta forma, a espécie é promovida para o primeiro estado excitado singlete que por cruzamento intersistema decai para o estado triplete.

1.6- Referências e notas

- 1/ (a) Weinberg, E. D. *Adv. in Microbial Physiol.* **1970**, 4, 1. (b) Williams, R. P. *Appl. Microbiol.* **1973**, 25, 396. (c) Campbell, I. M. *Adv. in Microbial Physiol.* **1984**, 25, 1. (d) Margalith, P. Z. *Pigment Microbiology*; Chapman & Hall: London, 1992.
- 2/ (a) Sivendra, R.; Lo, H. S. *J. Gen. Microbiol.* **1975**, 90, 21. (b) Sneath, P. H. A. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, volume 1; Krieg, N. R.; Holt, J. G. (eds.); Williams & Wilkins: Baltimore, 1984; pp. 580-582. (c) Gillis, M.; De Ley, J. *The Prokaryotes*, volume 3, segunda edição; Balows, A.; Trüper, H. G.; Dworkin, M.; Harder, W.; Schleifer, K. H. (eds.); Springer-Verlag: New York, 1992; capítulo 133. (d) Ponte, R.; Jenkins, S. G. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **1992**, 11, 583. (e) Rettori, D., Tese de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1996. (f) Rettori, D.; Durán, N. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, 14, 685 (ANEXO 1).
- 3/ Reilly, J.; Pyne, G. *Biochem. J.* **1927**, 21, 1059.
- 4/ (a) Ballantine, J. A.; Beer, R. J. S.; Crutchley, D. J.; Dodd, G. M.; Palmer, D. R. *Proc. Chem. Soc.* **1958**, 232. (b) Ballantine, J. A.; Beer, R. J. S.; Crutchley, D. J.; Dodd, G. M.; Palmer, D. R. *J. Chem. Soc.* **1960**, 2292.
- 5/ Lichstein, H. C.; Van de Sand, V. F. *J. Infec. Dis.* **1945**, 76, 47.
- 6/ (a) 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. (b) Durán, N.; Campos V.; Riveros, R.; Joyas, A.; Pereira, M. F.; Haun, M. *An. Acad. bras. Ciênc.* **1989**, 61, 31. (c) Durán, N.; Haun, M. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **1991**, Supl. I, 86, 29.

-
- 7 May, G.; Brümmer, B.; Ott, H. *Ger. Offen.* DE 3,935,066 (Cl. C12P17/16), 25 Abr 1991, Appl. 20 Out 1989; 5p..
- 8 Melo, P. S.; Maria, S. S.; Vidal, B. C.; Haun, M.; Durán, N. *In vitro Cell. Develop. Biol.* 2000, no prelo.
- 9 (a) Ibidem ref. 6(b). (b) 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.
- 10 Walker, I. *Ciênc. Hoje* 1990, 11(64), 44.
- 11 Wallace, A. R. *Viagem pelos Rios Amazonas e Negro*; Editora da USP, Editora Itatiaia: São Paulo, Belo Horizonte, 1979; p. 130.
- 12 Drew, S. W.; Demain, A. L. *Ann. Rev. Microbiol.* 1977, 31, 343.
- 13 (a) De Moss, R. D. *Antibiotics* 1967, 2, 77. (b) Pemberton, J. M.; Vincent, K. M.; Penfold, R. J. *Curr. Microbiol.* 1991, 22, 355.
- 14 Ibidem ref. 13(a).
- 15 Tobie, W. C. *J. Bacteriol.* 1934, 29, 223.
- 16 DeMoss, R. D.; Evans, N. R. *J. Bacteriol.* 1959, 78, 583.
- 17 DeMoss, R. D.; Evans, N. R. *J. Bacteriol.* 1960, 79, 729.
- 18 Hoshino, T.; Kondo, T.; Uchiyama, T.; Ogasawara, N. *Agric. Biol. Chem* 1987, 51, 965.

-
- ¹⁹ Hoshino, T.; Takano, T.; Hori, S.; Ogasawara, N. *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 2733.
- ²⁰ (a) Hoshino, T.; Ogasawara, N. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 2339. (b) Hoshino, T.; Hayashi, T.; Uchiyama, T. *Biosci. Biotech. Biochem.* **1994**, *58*, 279. (c) 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 Feb 1993; 12 p..
- ²¹ Durán, N.; Antonio, R. V.; Haun, M.; Pilli, R. A. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1994**, *10*, 686.
- ²² Genet, R.; Denoyelle, C.; Menez, A. *Indian J. Chem.* **1992**, *31*(sec. B), 848.
- ²³ Balasubramanian, S.; Carr, R. T.; Bender, C. J.; Peisach, J.; Benkovic, S. J. *Biochemistry* **1994**, *33*, 8532.
- ²⁴ (a) Mcmillan, J. D.; Maxwell, W. A.; Chichester, C. O. *Photochem. Photobiol.* **1966**, *5*, 555. (b) Ibidem ref. 13_(a).
- ²⁵ (a) Rettori, D.; Rodrigues, R. A.; Durán, N. *Rev. Farm. Bioquim. Univer. São Paulo (Brazil)* **1998**, *34* (Suppl. 1), 169. (b) De Azevedo, M. B. M.; Alderete, J.; Rodriguez, J. A.; Souza, A. O.; Rettori, D.; Torsoni, M. A.; Faljoni-Alario, A.; Haun, M.; Durán, N. *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.* **2000**, *37*, 93 (ANEXO 2).
- ²⁶ (a) Smith, M. T.; Evans, C. G.; Thor, H.; Orrenius, S. *Oxidative Stress*; Sies, H. (ed.); Academic Press: Orlando, 1985; pp. 91-95. (b) Balasubramanian, D. *Biological Oxidation Systems*, volume 2; Reddy, C. C.; Hamilton, G. A.; Madyastha, K. M. (eds.); Academic Press: San Diego, 1990; p. 957. (c) Roundhill, D. M. *Modern Inorganic Chemistry – Photochemistry and Photophysics of Metal Complexes*; Fackler Jr, J. P.

(ed.); Plenum Press: New York, 1994; p. 326. (d) White, D. *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes*; Oxford University Press: New York, 1995; pp. 132, 272-273. (e) Punchard, N. A.; Kelly, F. J. *Free Radicals - A Practical Approach*; Punchard, N. A.; Kelly, F. J. (eds.); IRL Press: Oxford, 1996; p. 3. (f) Boveris, A. *Medicina* (Buenos Aires) **1998**, 58, 350.

²⁷ Rauk, A.; Yu, D.; Armstrong, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 208.

²⁸ (a) Brown, R. K.; Kelly, F. J. *Free Radicals - A Practical Approach*; Punchard, N. A.; Kelly, F. J. (eds.); IRL Press: Oxford, 1996; p. 120. (b) Babior, B. M. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1997**, 30, 141.

²⁹ Piette, J. J. *Photochem. Photobiol. B* **1991**, 11, 241.

³⁰ (a) Edge, R.; Mc Garvey, D. J.; Truscott, T. G. *J. Photochem. Photobiol. B* **1997**, 41, 189. (b) Cardoso, S. L. *Química Nova* **1997**, 20, 535.

³¹ (a) Foote, C. S.; Denny, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 6233. (b) Ibidem ref. 1(d). (c) Ibidem ref. 30.

³² (a) Roberts, J. D.; Caserio, M. C. *Modern Organic Chemistry*; W. A. Benjamin: New York, 1967; pp. 694-695. (b) Ibidem ref. 13(a).

³³ Ibidem ref. 13(a).

³⁴ Higasi, K.; Baba, H.; Rembaum, A. *Quantum Organic Chemistry*; Interscience Publishers - John Wiley & Sons: New York, 1965; p. 216.

-
- ³⁵ Bersohn, M.; Baird, J. C. *An Introduction to Electron Paramagnetic Resonance*; W. A. Benjamin: New York, 1966; p. 2.
- ³⁶ (a) Ibidem ref. 35; pp. 108-126. (b) Huang, R. L.; Goh, S. H.; Ong, S. H. *The Chemistry of Free Radicals*; Edward Arnold: London, 1974; pp. 13-14.
- ³⁷ Wasserman, E.; Snyder, L. C.; Yager, W. A. *J. Chem. Phys.* **1964**, *41*, 1763.
- ³⁸ Yager, W. A.; Wasserman, E.; Cramer, R. M. R. *J. Chem. Phys.* **1962**, *37*, 1148.
- ³⁹ De Groot, M. S.; Hesselmann, I. A. M.; Van der Waals, J. H. *Mol. Phys.* **1965**, *10*, 241.

2- Parte experimental

2.1- Curvas de calibração

2.1.1- Concentração de células

Foram construídas duas curvas de calibração seguindo dois procedimentos distintos. Ambos procedimentos foram elaborados com base na referência de Díaz *et al.*¹ O microrganismo utilizado foi a *Chromobacterium violaceum* (linhagem CCT 4857) obtida na Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”.

PROCEDIMENTO A

Foram inoculados 100 µL de uma suspensão de *C. violaceum*² num Erlenmeyer de 500 mL que continha 200 mL de MCL³ estéril. O Erlenmeyer foi posto num agitador orbital selecionado em 120 rpm e 30 °C. Em tempos diferentes mediu-se a $ABS_{(ap)} 720\text{ nm}$ da suspensão de bactérias num espectrofotômetro DU-640B (Beckman), fazendo uso de uma cubeta de 3 mL e 1,000 cm de caminho óptico. O branco das leituras era água destilada. Nos mesmos tempos foram retiradas do Erlenmeyer amostras de 0,1 mL e realizadas diluições apropriadas. Da suspensão mais diluída, era retirada uma alíquota de 0,1 mL e esparramada - mediante espátula de Drigalski - numa placa de Petri de 10 cm de diâmetro contendo MCS⁴ estéril. Após aproximadamente 24 h, contava-se o número de colônias formadas em cada placa de Petri.

PROCEDIMENTO B

Foi inoculado 1 mL de uma suspensão de *C. violaceum*² num fermentador BIOFLO III (New Brunswick) que continha 3 L - a 30 °C - de MCL estéril. Sob agitação de 120 rpm, o meio havia sido previamente aerado ($V_{(ar)} = 1,5\text{ L min}^{-1}$) pelo tempo necessário (1-3 h) até a obtenção de uma leitura estável de TOD. Logo após o inóculo, a agitação foi mudada para 190 rpm e a vazão de ar cessada. Após 11,5 h, iniciou-se o borbulhamento de

O₂ com vazão de 2 L min⁻¹ e, em tempos diferentes, mediu-se a ABS_(ap) 720 nm da suspensão de bactérias num espectrofotômetro DU-640B (Beckman), fazendo uso de uma cubeta de 3 mL e 1,000 cm de caminho óptico. O branco das leituras era água destilada. Nos mesmos tempos foram retiradas do fermentador amostras de 0,1 mL e realizadas diluições apropriadas. Da suspensão mais diluída, era retirada uma alíquota de 0,1 mL e esparramada - mediante espátula de Drigalski - numa placa de Petri de 10 cm de diâmetro contendo MCS estéril. Após aproximadamente 24 h, contava-se o número de colônias formadas em cada placa de Petri.

CURVAS OBTIDAS

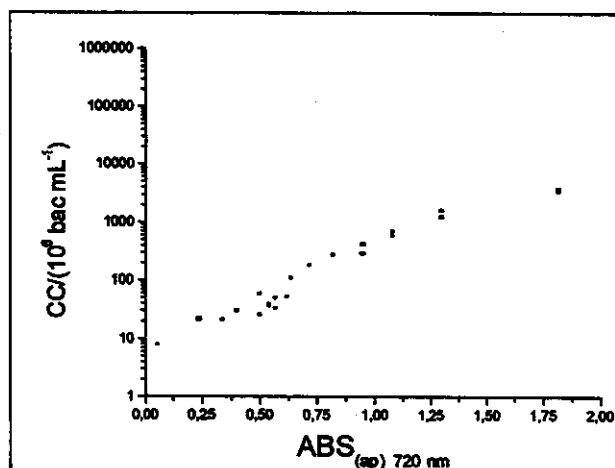


Figura 2.1.1-1- Concentração de células *versus* absorvância aparente (lida a 720 nm num espectrofotômetro DU-640B) - dados obtidos pelo PROCEDIMENTO A.

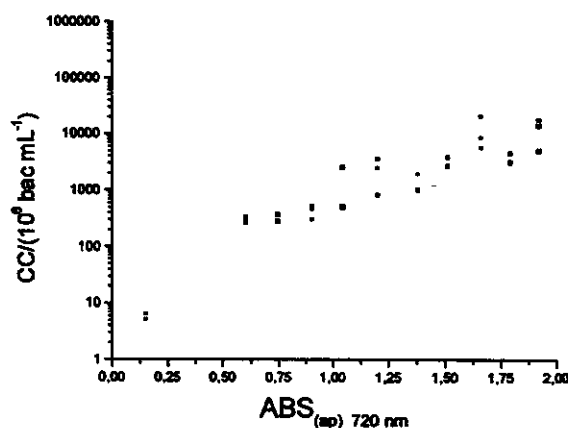


Figura 2.1.1-2- Concentração de células *versus* absorvância aparente (lida a 720 nm num espectrofotômetro DU-640B) - dados obtidos pelo PROCEDIMENTO B.

Com exceção das fermentações exploratórias (item 2.2.1), em todas as demais a ABS_(ap) foi lida (a fim de determinar a CC) num espectrofotômetro DU-70 (Beckman). Portanto, os valores de ABS_(ap) das figuras 2.1.1-1 e 2.1.1-2 foram corrigidos, conforme mostrado na Figura 2.1.1-3, e graficados na Figura 2.1.1-4.

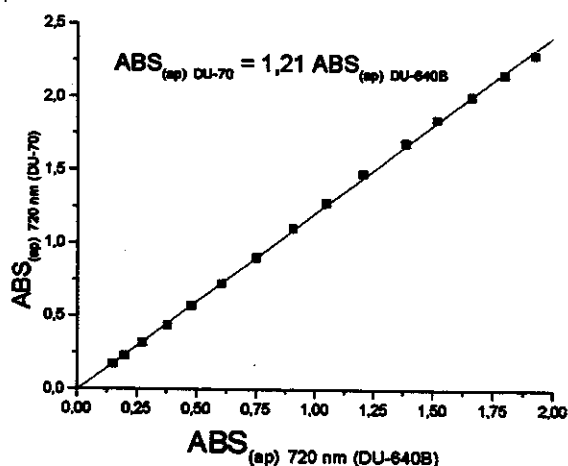


Figura 2.1.1-3- Transformação de leituras (de absorvância aparente) feitas no espectrofotômetro DU-640B para o DU-70. Também é mostrada a função (obtida por regressão linear) que converte as leituras.

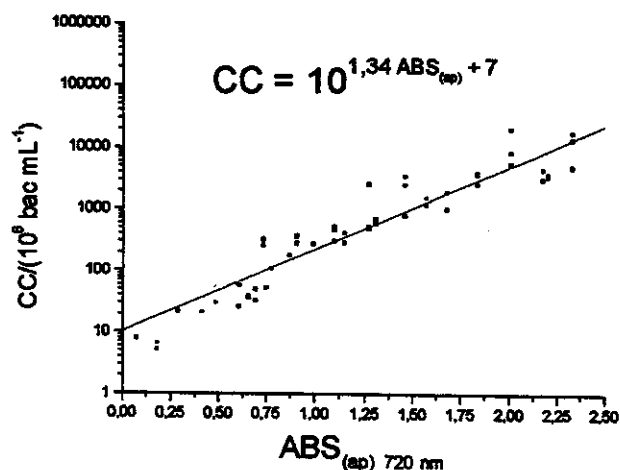


Figura 2.1.1-4- Concentração de células *versus* absorvância aparente (lida a 720 nm num espectrofotômetro DU-70). Na figura encontram-se sobrepostos todos os pontos (corrigidos) das figuras 2.1.1-1 e 2.1.1-2. Também é mostrada a função (obtida por regressão linear) que relaciona a $ABS_{(ap)}$ à CC.

2.1.2- Concentração de violaceína

A violaceína utilizada para a construção da curva de calibração da Figura 2.1.2 foi obtida de acordo com o método descrito na literatura.⁵ Foram preparadas 11 soluções de violaceína (de 4,6 a 144 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em etanol. A $ABS_{575 \text{ nm}}$ de cada solução foi medida num espectrofotômetro DU-70 (Beckman) fazendo uso de uma cubeta de 3 mL com 1,000 cm de caminho óptico. O branco das leituras era etanol.

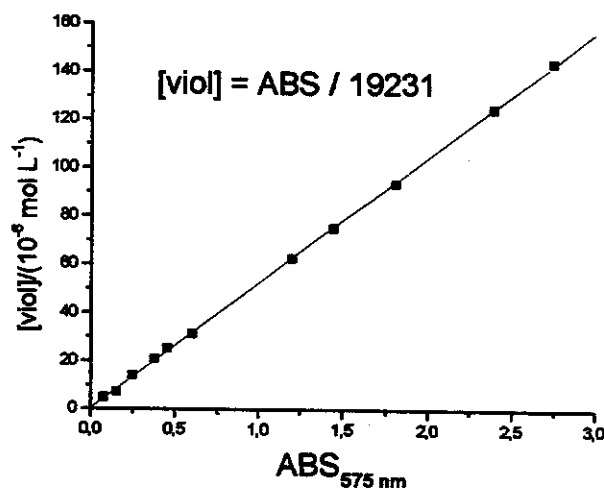


Figura 2.1.2- Concentração de violaceína (dissolvida em etanol) *versus* absorvância (lida a 575 nm num espectrofotômetro DU-70). Também é mostrada a função (obtida por regressão linear) que relaciona a ABS à $[viol]$.

2.1.3- Concentração de glicose⁶

Foram preparadas 12 soluções de D-glicose (de 0,56 a 8,49 mmol L⁻¹) em água destilada. Uma solução por vez era deoxigenada com N₂ por 15 minutos e, a 3,0 mL eram adicionados outros 3,0 mL de uma solução de DNS⁷. Imediatamente o tubo de ensaio contendo os 6 mL era colocado por 15 minutos num banho a 98 °C; após este tempo, retirava-se o tubo do banho e adicionava-se 1 mL de solução de Rochell⁸ e agitava-se num agitador de tubos. Deixava-se esfriar até 25 °C e fazia-se, no máximo em 1 hora, a leitura de ABS_{575 nm} num espectrofotômetro DU-640B (Beckman), fazendo uso de uma cubeta de 3 mL e 1,000 cm de caminho óptico. O branco das leituras era água destilada.

Com exceção das fermentações exploratórias (item 2.2.1), nas de TOD = 50 e 10 % (item 2.2.2) a ABS foi lida (a fim de determinar a [Glc]) num espectrofotômetro DU-70 (Beckman). Portanto, os valores de ABS da Figura 2.1.3-1 foram corrigidos e graficados conforme mostrado nas figuras 2.1.3-2 e 2.1.3-3 respectivamente.

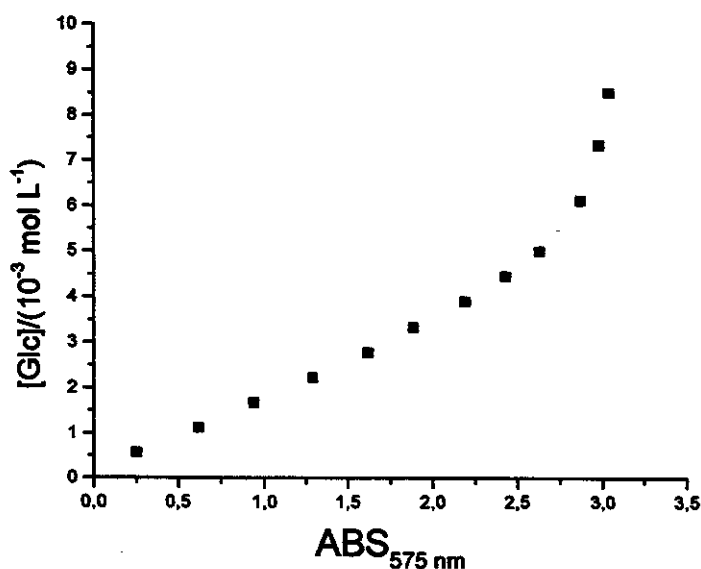


Figura 2.1.3-1- Concentração de glicose versus absorvância (lida a 575 nm num espectrofotômetro DU-640B).

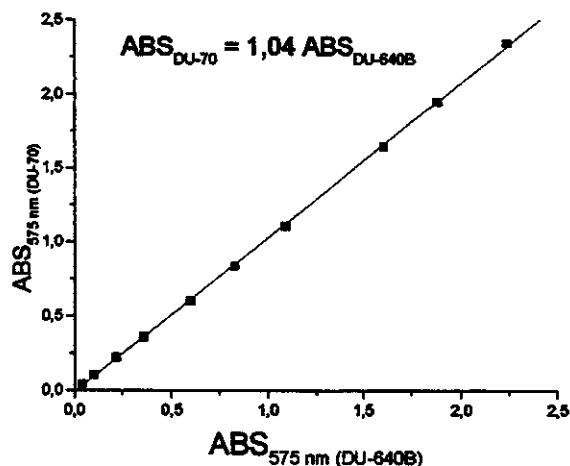


Figura 2.1.3-2- Transformação de leituras (de absorvância) feitas no espectrofotômetro DU-640B para o DU-70. Também é mostrada a função (obtida por regressão linear) que converte as leituras.

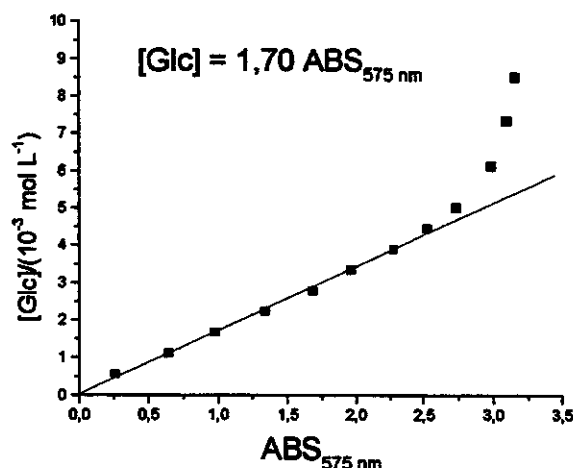


Figura 2.1.3-3- Concentração de glicose versus absorvância (lida a 575 nm num espectrofotômetro DU-70). Na figura encontram-se todos os pontos (corrigidos) da Figuras 2.1.3-1. Também é mostrada a função (obtida por regressão linear) que relaciona a ABS à [Glc].

2.1.4- Concentração de CO₂

Foi montado, conforme descrito na literatura⁹, o sistema esquematizado abaixo:

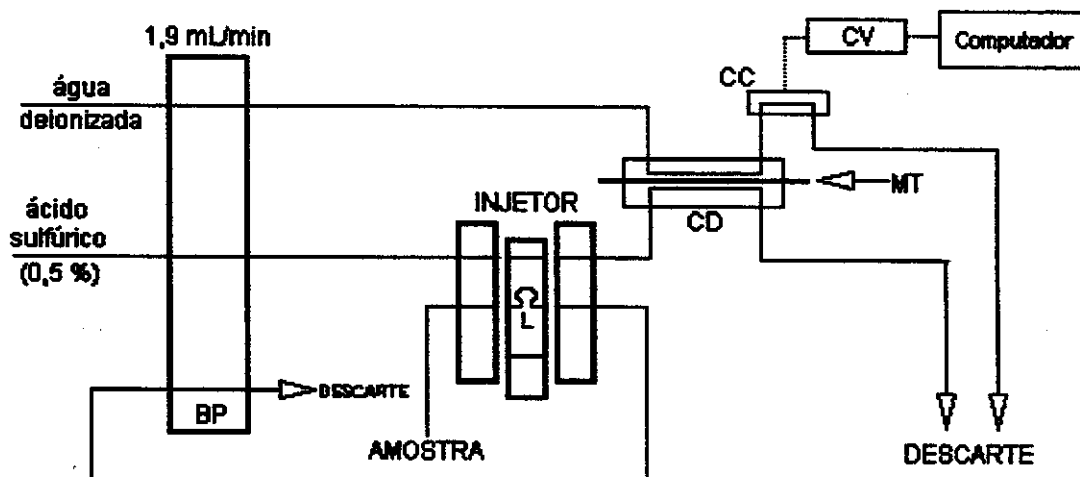
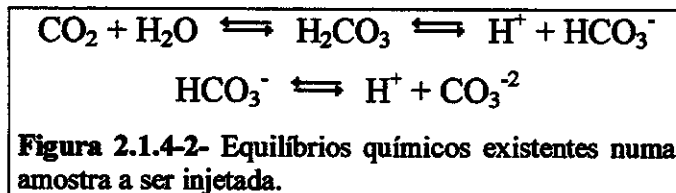


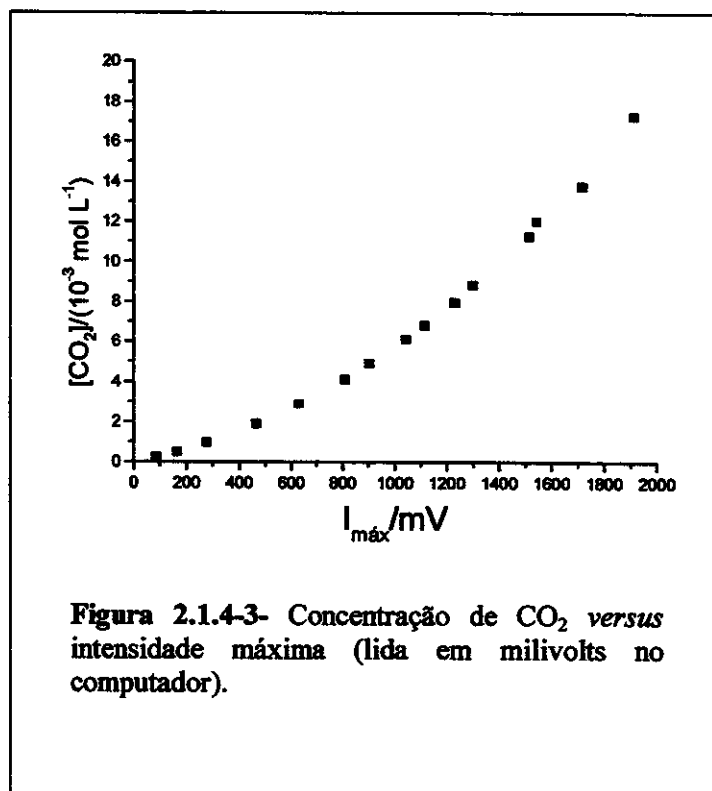
Figura 2.1.4-1- Sistema para a quantificação de CO₂ por AIF-condutométrico interfaceado. BP - bomba peristáltica; CC - cela condutométrica; CD - cela de difusão; CV - condutivímetro; L - loop (contendo 135 µL de amostra); MT - membrana de teflon.

O sistema funciona da seguinte maneira: ao injetar na via ácida uma amostra de 135 μL que contém dissolvidas as espécies carbônicas CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- e CO_3^{2-} , deslocam-se, no sentido da formação de CO_2 , os equilíbrios químicos mostrados na Figura 2.1.4-2.



Ao passar pela cela de difusão, o CO_2 da amostra permeia a membrana de teflon e dissolve-se na água deionizada-degaseificada (que percorre a outra face da membrana) formando novamente as espécies iônicas carbônicas. Estas espécies são as responsáveis pelo aumento da condutividade da água deionizada-degaseificada. Portanto, a concentração de CO_2 , na amostra, é diretamente proporcional à condutividade (em miliSiemens) detectada no condutivímetro. Os dados registrados no computador (em milivolts) são diretamente proporcionais à condutividade detectada no condutivímetro.

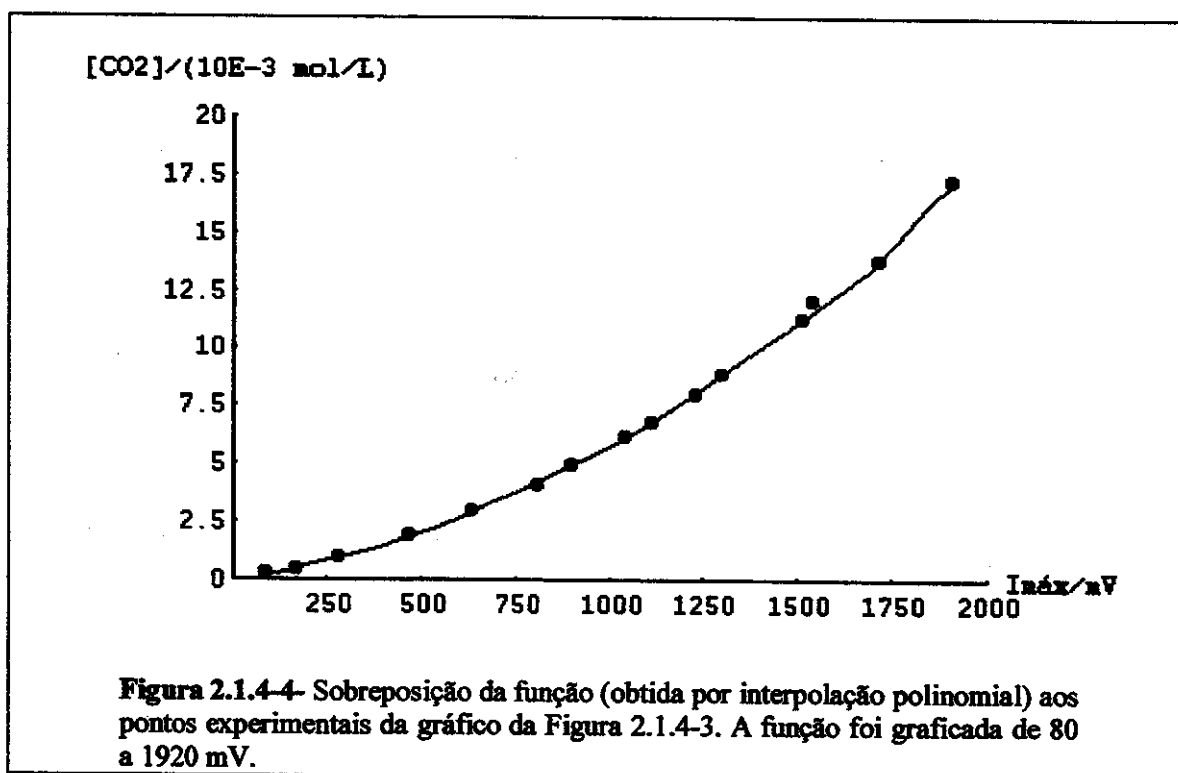
Para construir a curva de calibração de CO_2 (Figura 2.1.4-3), prepararam-se 15 soluções de Na_2CO_3 anidro (de 0,24 a 17,3 mmol L^{-1}) em água deionizada-degaseificada. Injetava-se uma amostra de 135 μL - de uma solução - no sistema AIF-condutométrico e registrava-se o sinal (em milivolts) de máxima intensidade. Ao todo foram realizadas 15 injeções.



Dos 15 pontos do gráfico da Figura 2.1.4-3, foram selecionados 10 para fazer a interpolação polinomial. Utilizou-se o programa Mathematica¹⁰ e obteve-se a seguinte função:

$$[CO_2] = 0,24 + (0,00307692 + (5,89213 \cdot 10^{-6} + (-5,54405 \cdot 10^{-9} + (6,92437 \cdot 10^{-12} + (-6,68355 \cdot 10^{-15} + (8,06361 \cdot 10^{-18} + (-1,46699 \cdot 10^{-20} + (2,5675 \cdot 10^{-23} - 3,2144 \cdot 10^{-26} (-1716 + I_{m\acute{a}x})) (-1515 + I_{m\acute{a}x})) (-1299 + I_{m\acute{a}x})) (-1115 + I_{m\acute{a}x})) (-903 + I_{m\acute{a}x})) (-632 + I_{m\acute{a}x})) (-278 + I_{m\acute{a}x})) (-166 + I_{m\acute{a}x})) (-88 + I_{m\acute{a}x}))$$

Na Figura 2.1.4-4 encontra-se graficada a função (de 80 a 1920 mV) sobreposta aos pontos experimentais.



2.2- Fermentações¹¹

2.2.1- Fermentações exploratórias

2.2.1-A- Fermentação exploratória A

No tempo 0 h inoculou-se 1 mL de uma suspensão de *C. violaceum*² num fermentador que continha 3 L de MCL³ estéril. O meio havia sido previamente equilibrado - sob agitação de 60 rpm e temperatura de 30 °C - com ar (intenso borbulhamento) pelo tempo necessário (1-3 h) até a obtenção de uma leitura estável de TOD. Esta leitura foi ajustada para 100 %.

O experimento, a partir do tempo zero, foi realizado sob agitação de 60 rpm e temperatura de 30 °C. Em função do tempo foram medidos: CC, [Glc], TOD e pH. A CC foi obtida da leitura de $ABS_{(ap) 720\text{ nm}}$ de amostras retiradas - do fermentador - em diferentes tempos. Para a determinação da [Glc], amostras de 1 mL - coletadas em diferentes tempos - foram diluídas (diluição 1/10) em água deoxigenada. Três mL de cada solução diluída foram submetidas exatamente ao procedimento descrito no item 2.1.3. A TOD foi lida com um eletrodo de oxigênio (eletrodo de Clark) e o pH, com um eletrodo de vidro.

Do tempo zero até 6,5 h não aerou-se o sistema (*i.e.*, $V_{(ar)} = 0\text{ L min}^{-1}$). De 6,5 a 6,75 h manteve-se $V_{(ar)} = 3,5\text{ L min}^{-1}$. De 6,75 a 7,7 h $V_{(ar)} = 0,5\text{ L min}^{-1}$. De 7,7 a 9,5 h $V_{(ar)} = 0\text{ L min}^{-1}$. A partir de 9,5 h $V_{(ar)} = 3,5\text{ L min}^{-1}$, mas esta vazão foi caindo e no fim do experimento ($t = 11,0\text{ h}$) a vazão de ar havia caído para $2,5\text{ L min}^{-1}$.

2.2.1-B- Fermentação exploratória B

No tempo 0 h inoculou-se 1 mL de uma suspensão de *C. violaceum*² num fermentador que continha 3 L de MCL estéril. O meio havia sido previamente equilibrado - sob agitação de 60 rpm e temperatura de 30 °C - com O₂ (intenso borbulhamento) pelo tempo necessário (1-3 h) até a obtenção de uma leitura estável de TOD. Esta leitura foi ajustada para 100 %. Logo após o ajuste, e antes do inóculo, foi borbulhado ar até TOD = 25 %. Em seguida cessou-se a $V_{(ar)}$ e fez-se o inóculo.

O experimento, a partir do tempo zero, foi realizado sob agitação de 60 rpm e $T = 30$ °C. Em função do tempo, a partir de $t = 9,75$ h, foram medidos: CC, [Glc], TOD, pH e $[CO_2]$. Exceto a $[CO_2]$, os demais parâmetros foram medidos conforme descrito no item 2.2.1-A.. Para a obtenção da $[CO_2]$, amostras de 135 μ L - retiradas do fermentador em diferentes tempos - foram injetados no sistema AIF-condutométrico e os valores de $I_{m\acute{a}x}$ registrados.

Do tempo zero até 10 h, $V_{(O_2)} = 0$ L min^{-1} . Nos tempos 10 h, 12 h e 13,2 h, foi borbulhado O_2 por 20 min, 25 min e 20 min respectivamente.

2.2.2- Fermentações a TOD constante

2.2.2-A- Fermentação a TOD = 50 %

No tempo -13,9 h inoculou-se 1 mL de uma suspensão de *C. violaceum*² num fermentador que continha 3 L de MCL estéril. O meio havia sido previamente equilibrado - sob agitação de 120 rpm e temperatura de 30 °C - com ar ($V_{(ar)} = 1,5$ L min^{-1}) pelo tempo necessário (1-3 h) até a obtenção de uma leitura estável de TOD. Esta leitura foi ajustada para 20,9 %. Do tempo -13,9 até -2,9 h, o meio foi mantido sob agitação de 120 rpm com $V_{(O_2)} = 0$ L min^{-1} . No tempo -2,9 h iniciou-se o borbulhamento de O_2 e no tempo -2,7 h iniciaram-se as leituras de: CC, [viol], [Glc], TOD e pH, todas em função do tempo. O experimento foi realizado a 30,0 °C com agitação e vazão de O_2 variadas entre 50-250 rpm e 0,5-2,5 L min^{-1} respectivamente, a fim de manter a TOD constante em aproximadamente 50 %.

A glicose era quantificada de amostras - de 4 mL - retiradas do biorreator em diferentes tempos. Centrifugava-se uma amostra a ≈ 6000 rpm (por 10 minutos) e filtrava-se o sobrenadante. Utilizava-se na filtração uma membrana - para sistemas aquosos - de 25 mm de diâmetro e 0,2 μ m de diâmetro de poros. O filtrado era congelado (≈ -5 °C) para que a leitura fosse feita num outro dia. Ao descongelar a amostra, fazia-se uma diluição 1/10 com água deoxigenada e adicionava-se, a 3 mL da solução diluída, 3 mL de solução

de DNS⁷. Deixava-se a mistura a 98 °C por 15 minutos, retirava-se o tubo do banho e adicionava-se 1 mL de solução de Rochell⁸. Resfriava-se até temperatura ambiente e fazia-se, no máximo em 1 h, a leitura de $ABS_{575\text{ nm}}$.

A violaceína era quantificada do material sedimentado proveniente da centrifugação da mesma amostra de 4 mL retirada para a determinação de glicose. Das células sedimentadas extraía-se quantitativamente a violaceína com 3,5 mL de etanol. Filtrava-se a suspensão (com membrana - para etanol - de 25 mm de diâmetro e 0,2 µm de diâmetro de poros) e utilizava-se o filtrado para fazer a leitura de $ABS_{575\text{ nm}}$.

O pH era medido com eletrodo de vidro e a TOD com eletrodo de Clark. Para a determinação da CC, retirava-se uma amostra de 2 mL do fermentador e fazia-se a leitura de $ABS_{(ap)\ 720\text{ nm}}$.

2.2.2-B- Fermentação a TOD = 10 %

No tempo -14,3 h inoculou-se 1 mL de uma suspensão de *C. violaceum*² num fermentador que continha 3 L de MCL estéril. O meio havia sido previamente equilibrado - sob agitação de 120 rpm e temperatura de 30 °C - com ar ($V_{(ar)} = 1,5\text{ L min}^{-1}$) pelo tempo necessário (1-3 h) até a obtenção de uma leitura estável de TOD. Esta leitura foi ajustada para 20,9 %. Do tempo -14,3 até -2,8 h, o meio foi mantido sob agitação de 120 rpm com $V_{(O_2)} = 0\text{ L min}^{-1}$. No tempo -2,8 h iniciou-se o borbulhamento de O₂ e no tempo -2,6 h iniciaram-se as leituras de: CC, [viol], [Glc], TOD e pH, todas em função do tempo. O experimento foi realizado a 30,0 °C com agitação e vazão de O₂ variadas entre 50-250 rpm e 0,5-2,5 L min⁻¹ respectivamente, a fim de manter a TOD constante em aproximadamente 10 %.

As leituras em função do tempo foram realizadas da mesma forma que no experimento com TOD = 50 % (item 2.2.2-A).

2.2.3- Fermentações com catalase

2.2.3-A- Fermentação controle A

No tempo -14,8 h inoculou-se 1 mL de uma suspensão de *C. violaceum*² num fermentador que continha 3 L de MCL estéril. O meio havia sido previamente equilibrado - sob agitação de 120 rpm e temperatura de 30 °C - com ar ($V_{(ar)} = 1,5 \text{ L min}^{-1}$) pelo tempo necessário (1-3 h) até a obtenção de uma leitura estável de TOD. Esta leitura foi ajustada para 20,9 %. Do tempo -14,8 até -2,3 h, o meio foi mantido sob agitação de 190 rpm com $V_{(O_2)} = 0 \text{ L min}^{-1}$. No tempo -2,3 h iniciou-se o borbulhamento de O₂ e no tempo -2,1 h iniciaram-se as leituras de CC e [viol] em função do tempo. O experimento foi realizado a 30,0 °C com agitação e vazão de O₂ fixas em 190 rpm e 2 L min⁻¹ respectivamente.

Adicionou-se no fermentador, no tempo -0,3 h, 50 mL de MCL (previamente termostatizados a 30 °C).

As leituras de CC e [viol] foram feitas conforme descrito no item 2.2.2-A.

2.2.3-B- Fermentação controle B (duplicata da controle A)

No tempo -14,7 h inoculou-se 1 mL de uma suspensão de *C. violaceum*² num fermentador que continha 3 L de MCL estéril. O meio havia sido previamente equilibrado - sob agitação de 120 rpm e temperatura de 30 °C - com ar ($V_{(ar)} = 1,5 \text{ L min}^{-1}$) pelo tempo necessário (1-3 h) até a obtenção de uma leitura estável de TOD. Esta leitura foi ajustada para 20,9 %. Do tempo -14,7 até -2,4 h, o meio foi mantido sob agitação de 190 rpm com $V_{(O_2)} = 0 \text{ L min}^{-1}$. No tempo -2,4 h iniciou-se o borbulhamento de O₂ e no tempo -2,2 h iniciaram-se as leituras de CC e [viol] em função do tempo. O experimento foi realizado a 30,0 °C com agitação e vazão de O₂ fixas em 190 rpm e 2 L min⁻¹ respectivamente.

Adicionou-se no fermentador, no tempo -0,4 h, 50 mL de MCL (previamente termostatizados a 30 °C).

As leituras de CC e [viol] foram feitas conforme descrito no item 2.2.2-A.

2.2.3-C- Fermentação com adição de 0,15 g de catalase

No tempo -14,7 h inoculou-se 1 mL de uma suspensão de *C. violaceum*² num fermentador que continha 3 L de MCL estéril. O meio havia sido previamente equilibrado - sob agitação de 120 rpm e temperatura de 30 °C - com ar ($V_{(ar)} = 1,5 \text{ L min}^{-1}$) pelo tempo necessário (1-3 h) até a obtenção de uma leitura estável de TOD. Esta leitura foi ajustada para 20,9 %. Do tempo -14,7 até -2,4 h, o meio foi mantido sob agitação de 190 rpm com $V_{(O_2)} = 0 \text{ L min}^{-1}$. No tempo -2,4 h iniciou-se o borbulhamento de O₂ e no tempo -2,2 h iniciaram-se as leituras de CC e [viol] em função do tempo. O experimento foi realizado a 30,0 °C com agitação e vazão de O₂ fixas em 190 rpm e 2 L min⁻¹ respectivamente.

Adicionou-se no fermentador, no tempo -0,4 h, 50 mL de MCL (previamente termostatizados a 30 °C) contendo 0,15 g de catalase (Sigma - 2100 unidades mg⁻¹) dissolvido.

As leituras de CC e [viol] foram feitas conforme descrito no item 2.2.2-A.

2.2.3-D- Fermentação com adição de 0,40 g de catalase

No tempo -14,9 h inoculou-se 1 mL de uma suspensão de *C. violaceum*² num fermentador que continha 3 L de MCL estéril. O meio havia sido previamente equilibrado - sob agitação de 120 rpm e temperatura de 30 °C - com ar ($V_{(ar)} = 1,5 \text{ L min}^{-1}$) pelo tempo necessário (1-3 h) até a obtenção de uma leitura estável de TOD. Esta leitura foi ajustada para 20,9 %. Do tempo -14,9 até -2,4 h, o meio foi mantido sob agitação de 190 rpm com $V_{(O_2)} = 0 \text{ L min}^{-1}$. No tempo -2,4 h iniciou-se o borbulhamento de O₂ e no tempo -2,2 h iniciaram-se as leituras de CC e [viol] em função do tempo. O experimento foi realizado a 30,0 °C com agitação e vazão de O₂ fixas em 190 rpm e 2 L min⁻¹ respectivamente.

Adicionou-se no fermentador, no tempo -0,4 h, 50 mL de MCL (previamente termostatizados a 30 °C) contendo 0,40 g de catalase (Sigma - 2100 unidades mg⁻¹) dissolvido.

As leituras de CC e [viol] foram feitas conforme descrito no item 2.2.2-A.

2.2.3-E- Fermentação com adição tardia de 0,40 g de catalase

No tempo -14,6 h inoculou-se 1 mL de uma suspensão de *C. violaceum*² num fermentador que continha 3 L de MCL estéril. O meio havia sido previamente equilibrado - sob agitação de 120 rpm e temperatura de 30 °C - com ar ($V_{(ar)} = 1,5 \text{ L min}^{-1}$) pelo tempo necessário (1-3 h) até a obtenção de uma leitura estável de TOD. Esta leitura foi ajustada para 20,9 %. Do tempo -14,6 até -2,6 h, o meio foi mantido sob agitação de 190 rpm com $V_{(O_2)} = 0 \text{ L min}^{-1}$. No tempo -2,6 h iniciou-se o borbulhamento de O₂ e no tempo -2,3 h iniciaram-se as leituras de CC e [viol] em função do tempo. O experimento foi realizado a 30,0 °C com agitação e vazão de O₂ fixas em 190 rpm e 2 L min⁻¹ respectivamente.

Adicionou-se no fermentador, no tempo 1,9 h, 50 mL de MCL (previamente termostatizados a 30 °C) contendo 0,40 g de catalase (Sigma - 2100 unidades mg⁻¹) dissolvido.

As leituras de CC e [viol] foram feitas conforme descrito no item 2.2.2-A.

2.2.3-F- Fermentação na presença de 0,40 g de catalase desativada

No tempo -15,75 h inoculou-se 1 mL de uma suspensão de *C. violaceum*² num fermentador que continha 3 L de MCL-catalase¹² estéril. O meio havia sido previamente equilibrado - sob agitação de 120 rpm e temperatura de 30 °C - com ar ($V_{(ar)} = 1,5 \text{ L min}^{-1}$) pelo tempo necessário (1-3 h) até a obtenção de uma leitura estável de TOD. Esta leitura foi ajustada para 20,9 %. Do tempo -15,75 até -3 h, o meio foi mantido sob agitação de 190 rpm com $V_{(O_2)} = 0 \text{ L min}^{-1}$. No tempo -3 h iniciou-se o borbulhamento de O₂ e no tempo -2,75 h iniciou-se a leitura de [viol] em função do tempo. O experimento foi realizado a 30,0 °C com agitação e vazão de O₂ fixas em 190 rpm e 2 L min⁻¹ respectivamente.

A leitura de [viol] foi feita conforme descrito no item 2.2.2-A.

2.3- Estudos de ressonância paramagnética eletrônica¹³

2.3.1- Estudos em função da temperatura

Foram obtidos espectros de RPE em diferentes temperaturas - de 292 a 12 K - de uma amostra de 3,1 mg de violaceína em tubo de RPE de quartzo com d.e. ≈ 4 mm. Utilizou-se um espectrômetro ELEXSYS (Bruker) operando em banda-X (9,4 GHz). O espectrômetro estava equipado com sistema de fluxo de hélio para resfriamento.

Também foram obtidos espectros de RPE de uma amostra de violaceína (1,84 mg) - em tubo de RPE de quartzo com d.e. ≈ 4 mm - submetida a tratamentos térmicos por 5 minutos em cada uma das seguintes temperaturas: 318, 338, 358, 378, 408 e 433 K. Após os 5 minutos em uma dada temperatura, a amostra era resfriada de volta à temperatura ambiente para depois registrar o espectro (*i.e.*, todos os espectros foram registrados a 298 K). Utilizou-se um espectrômetro ELEXSYS (Bruker) operando em banda-X. O espectrômetro estava equipado com sistema de fluxo de nitrogênio para aquecimento.

2.3.2- Estudos quantitativos

Foram obtidos 2 espectros de RPE, ambos a temperatura ambiente, de duas amostras diferentes. Os espectros foram obtidos no mesmo dia e as condições do espectrômetro foram as mesmas para ambas amostras. A primeira era de 1,84 mg de violaceína em tubo de RPE de quartzo com d.e. ≈ 4 mm. Para esta, varreu-se o campo de 1300 a 5300 Oe. A segunda era um padrão (*weak pitch* - 0,0003 % de *pitch* em KCl) em tubo de RPE de quartzo com d.e. ≈ 4 mm. Varreu-se o campo desta de 3363 a 3400 Oe. Utilizou-se um espectrômetro ELEXSYS (Bruker) operando em banda-X.

Também foram obtidos outros 2 espectros de RPE, ambos a temperatura ambiente, de duas amostras diferentes. Os espectros foram obtidos no mesmo dia e as condições do espectrômetro foram as mesmas para ambas amostras. A primeira era de 2,0 mg de violaceína em tubo de RPE de quartzo com d.e. ≈ 4 mm. A segunda era um padrão (*weak pitch* - 0,0003 % de *pitch* em KCl) em tubo de RPE de quartzo com d.e. ≈ 4 mm. Para ambas amostras varreu-se o campo de 3265 a 3303 Oe. Utilizou-se um espectrômetro E-LINE (Varian) operando em banda-X.

2.3.3- Estudo qualitativo

Foi obtido um espectro de RPE de uma amostra de ≈ 1 mg de violaceína em tubo de RPE de quartzo com d.e. ≈ 1 mm. Utilizou-se um espectrômetro ELEXSYS (Bruker) operando em banda-Q (34,3 GHz).

2.4- Estudos de fotofísica¹³

Foram obtidos espectros de absorção e emissão de soluções de violaceína em etanol nas concentrações de: 3,75; 7,5; 11,25 e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os espectros de emissão foram obtidos utilizando dois comprimentos de onda de excitação ($\lambda_{\text{exc}} = 575$ e 350 nm). Variou-se o λ_{exc} da solução de 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a fim de certificar as fluorescências observadas. Também registraram-se espectros de emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 575$ e 350 nm) a 77 K da solução de 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Foram obtidos espectros de absorção e emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 575$ e 350 nm) de soluções de mesma concentração de violaceína ($[\text{viol}] = 45 \mu\text{mol L}^{-1}$) e diferentes concentrações de HCl (0-40 mmol L^{-1}). O solvente utilizado era composto de (70:30)% em volume de EtOH e H₂O respectivamente.

Foram preparadas 6 soluções de mesma concentração de violaceína ($[\text{viol}] = 7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) em solventes de seguinte composição (% em volume): 1) (50:50)% EtOH:AcEt; 2) (50:50)% EtOH:Acetona; 3) 100 % EtOH; 4) (50:50)% EtOH:Glicerol; 5) (50:50)% EtOH:DMSO; 6) (50:50)% EtOH:H₂O. Destas soluções, registraram-se os espectros de absorção, emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 575$ e 350 nm) e excitação ($\lambda_{\text{emi}} = 680$ e 440 nm).

Foram obtidos espectros de absorção e emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 575$ e 350 nm) de soluções de mesma concentração de deoxi violaceína e diferentes concentrações de HCl (0-182 mmol L^{-1}). O solvente utilizado era composto de (70:30)% em volume de EtOH e H₂O respectivamente.

Todos os espectros de emissão e excitação (com exceção daqueles obtidos à temperatura de 77 K) foram obtidos utilizando um espectrofluorímetro SPL-500 (Aminco).

Os espectros da solução $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de violaceína a 77 K foram obtidos utilizando um espectrofluorímetro Luminescence System LS-100 (PTI). Para a obtenção dos espectros de absorção utilizaram-se os espectrofotômetros HP8452A (Hewlett Packard) e HP8453 (Hewlett Packard).

2.5- Obtenção da violaceína

A violaceína utilizada foi obtida pelo cultivo da *Chromobacterium violaceum* CCT 4857. A metodologia utilizada encontra-se descrita no artigo de Rettori e Durán publicada em 1998 na revista *World Journal of Microbiology & Biotechnology* (ANEXO 1).⁵

A oito garrafas de Roux de 1 litro - cada uma contendo um “tapete” de algodão de aproximadamente 0,5 cm de espessura, 10 cm de largura e 20 cm de comprimento - inoculava-se 90 mL/garrafa de uma suspensão de *C. violaceum*.

Para a obtenção da suspensão de bactérias, a um Erlenmeyer de 2000 mL (contendo 400 mL de MCL) inoculava-se 4 mL de uma suspensão de *C. violaceum*. Dois Erlenmeyers como estes eram então incubados num agitador rotatório a 120 rpm por 12 horas, antes de serem utilizados para inocular o algodão.

As oito garrafas eram então incubadas a 30 °C por 24 horas (sem aeração).

Após este tempo, os algodões adquiriam uma intensa coloração violeta e iniciava-se o procedimento de extração.

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

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

Rotaevaporava-se o etanol à pressão reduzida e obtinha-se o extrato semipurificado. Este era purificado por recristalização utilizando o par de solventes metanol/água. O material sedimentado era recolhido por centrifugação e seco em estufa a $\approx 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Obtinha-se um extrato semi-purificado por recristalização.

Por último, procedia-se a uma purificação por cromatografia. Injetava-se 1,5 mL de uma solução saturada (em etanol) do extrato semi-purificado, previamente filtrado em filtro Millex-SR ($0,5\mu\text{m}$ de diâmetro dos poros), num cromatógrafo HPLC Prep. LC 4000 System (Waters). As condições utilizadas para o HPLC eram:

vazão	=	7,0 mL/min
$\lambda_{\text{detector}}$	=	230 nm
fase móvel	=	25% H_2O : 75% etanol (% volume)
velocidade do papel	=	0,5 cm/min
atenuação	=	1024
coluna	=	preparativa DELTA PAK C18, 100 Å (poros), 15 μm (diâmetro da partícula), coluna (30 mm x 30 cm), coluna à temperatura ambiente ($\approx 23\text{ }^{\circ}\text{C}$)

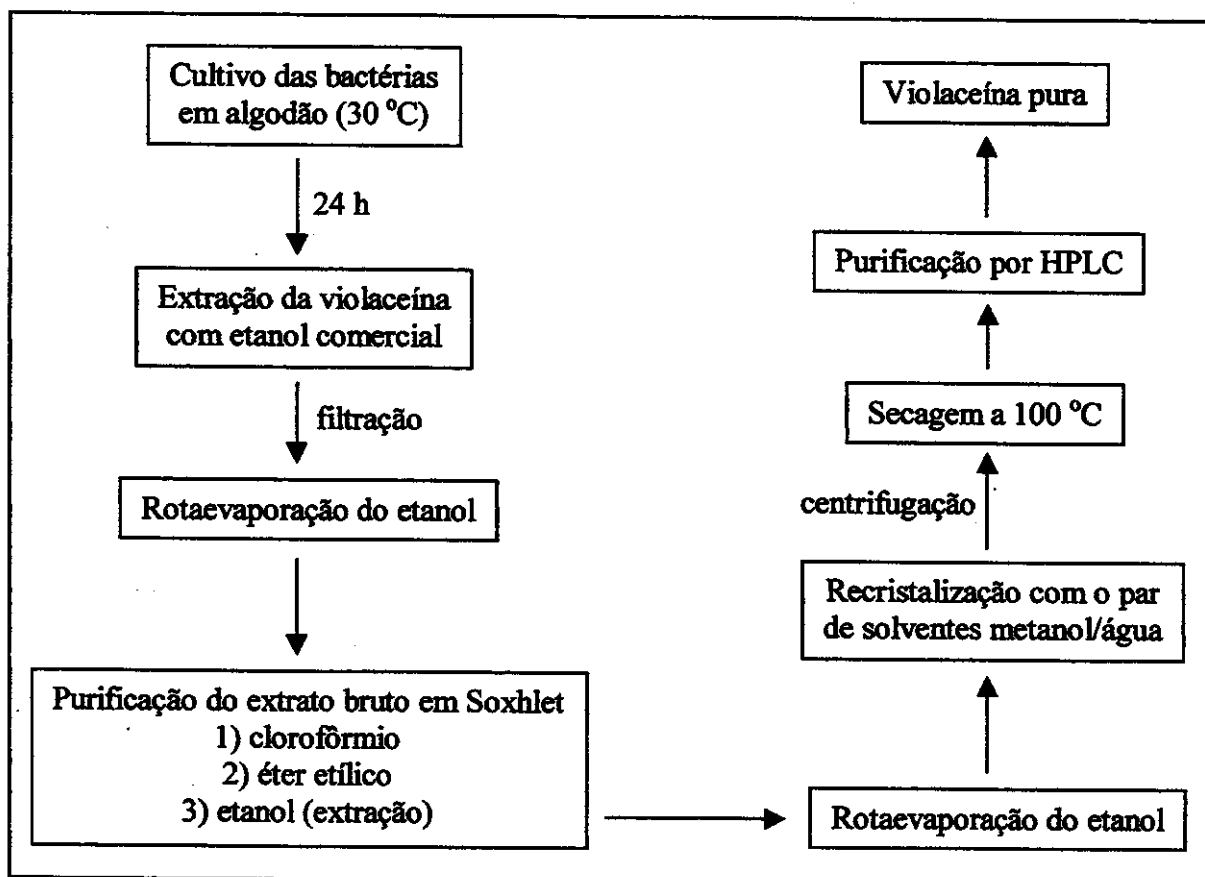


Figura 2.5- Diagrama mostrando o procedimento utilizado para a obtenção de violaceína.

2.6- Referências e notas

-
- ¹ Díaz, R.; Gamazo, C.; López-Gofí, I. *Manual Practico de Microbiologia*; Masson: Barcelona, 1985; pp. 45-54.
- ² A suspensão havia sido preparada - num Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de MCL³ - 24 h antes, mediante repique. Durante as 24 h, o Erlenmeyer ficou sob agitação orbital de 120 rpm a 30 °C.
- ³ O MCL é uma solução aquosa contendo (0,5:0,5:0,2)% em massa de glicose, peptona e extrato de levedura, respectivamente.
- ⁴ O MCS é de mesma composição do MCL mais 1,5 % em massa de ágar.
- ⁵ Rettori, D.; Durán, N. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *14*, 685 (ANEXO 1).
- ⁶ Miller, G. L. *Anal. Chem.* **1959**, *31*, 426.
- ⁷ A solução de DNS é composta de: 5 g DNS + 5 g NaOH + 1 g fenol - dissolvidos em água até o volume de 500 mL.
- ⁸ A solução de Rochell é composta de 40 g de tartarato de sódio e potássio tetrahidratado ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) dissolvidos em água até o volume de 1000 mL.
- ⁹ (a) Guimarães, J. R., Tese de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1990. (b) Moraes, S. G., Tese de Mestrado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1995.

¹⁰ *General Computer Software and Language Mathematica - Version 1.0 for Windows (Student Version)* - 1988-91 Wolfram Research, Inc..

¹¹ Em todas as fermentações utilizaram-se um fermentador BIOFLO III (New Brunswick) e o microrganismo *Chromobacterium violaceum* CCT 4857.

¹² O MCL-catalase é de composição igual ao MCL, acrescido de 0,40 g de catalase (Sigma - 2100 unidades mg⁻¹).

¹³ A violaceína utilizada nestes estudos foi obtida de acordo com o método descrito na literatura.⁵

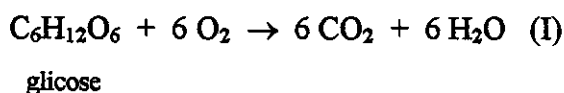
3- Resultados e discussão

3.1- Fermentações

3.1.1- Fermentações exploratórias

Na Figura 3.1.1-A encontram-se graficados os resultados do experimento descrito no item 2.2.1-A (Fermentação exploratória A).

O oxigênio dissolvido no MCL foi totalmente consumido, pela *C. violaceum*, em 4,5 h. A queda do pH, neste mesmo período de tempo, pode ser explicada pela produção de CO₂ durante a respiração aeróbia¹ da bactéria (reação I).



A medida que vai sendo produzido CO₂, este reage com a água para formar o ácido carbônico (H₂CO₃). Estabelecem-se os equilíbrios apresentados na Figura 2.1.4-2 e como resultado do aumento da concentração de prótons, há um decréscimo do pH do meio. Ao iniciar a aeração, em t = 6,5 h, o pH volta a subir devido ao deslocamento dos equilíbrios no sentido da formação de CO₂. Este deslocamento se dá pelo simples fato do ar, que está sendo borbulhado, expulsar por arraste o CO₂ dissolvido no meio.

Outro possível mecanismo para explicar a queda do pH é a do vazamento de prótons da região intermembranas da bactéria. Durante a respiração aeróbia, a cadeia respiratória cria um gradiente de prótons através da membrana interna com a finalidade de promover a síntese de ATP (mediante a ATP-sintase). Sendo a membrana externa permeável a prótons,² o vazamento de prótons para a solução causaria um decréscimo do pH.

A biomassa bacteriana (expressa pela CC) aumentou muito pouco devido a baixa oxigenação do sistema.

Apesar de não quantificada, visualmente pode se observar a não produção de violaceína pelas bactérias.

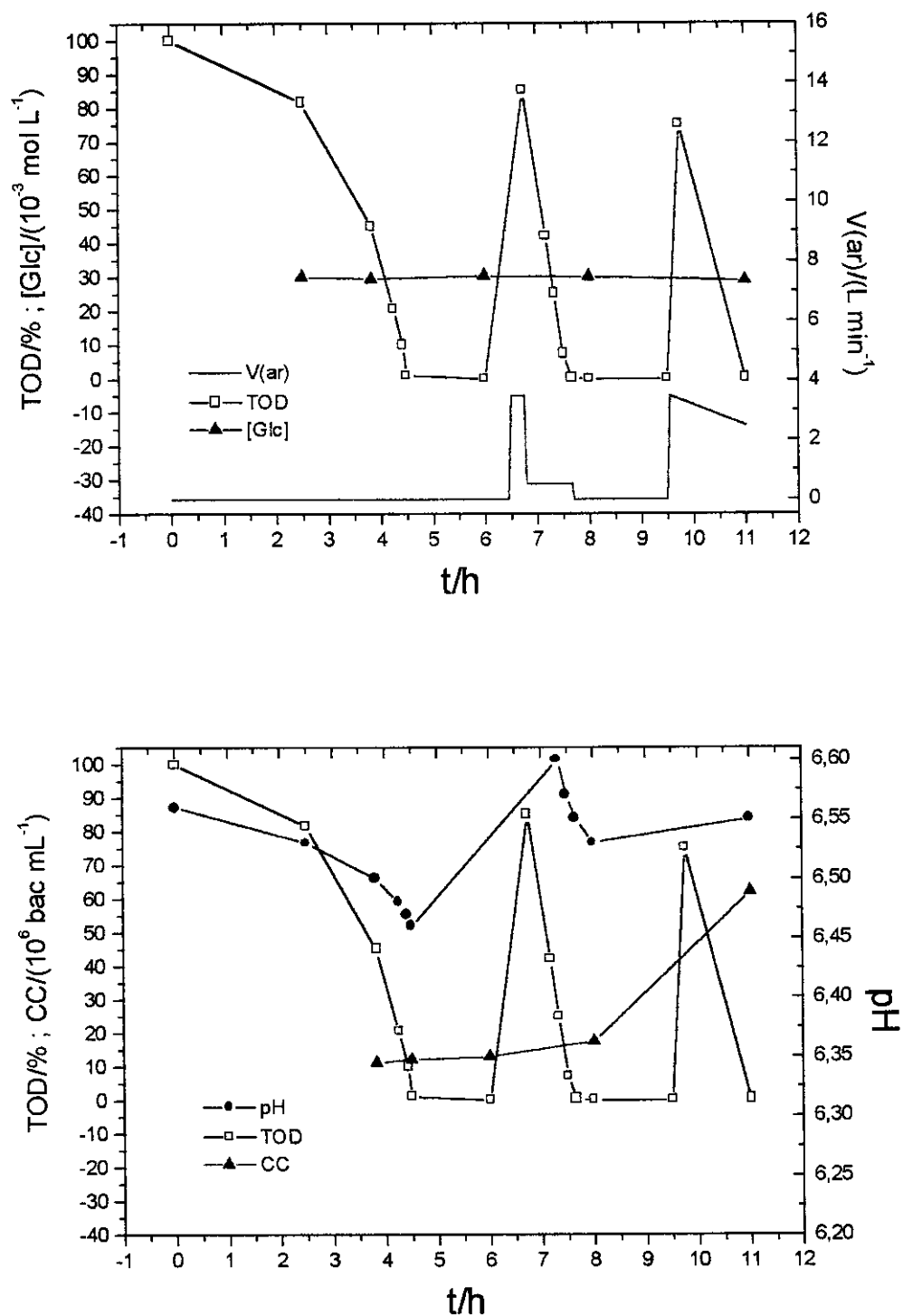


Figura 3.1.1-A- Fermentação exploratória A. Encontram-se graficados, em função do tempo, os parâmetros CC, $[Glc]$, TOD e pH. Também é mostrado como foi variada a $V(ar)$ no decorrer da fermentação. *Vide* item 2.2.1-A.

Devido a demora da *C. violaceum* em consumir O_2 na fase inicial da fermentação (0-4,5 h), e a rapidez no consumo após $t = 9,5$ h (pois mesmo com uma $V_{(ar)}$ em torno de 3 L min^{-1} a TOD caiu para zero), decidiu-se realizar uma nova fermentação com borbulhamento de O_2 puro em vez de ar. Adicionalmente, decidiu-se iniciar a oxigenação ≈ 10 h após o inóculo para poder estender o experimento por mais tempo. Na Figura 3.1.1-B encontram-se os resultados desta nova fermentação (Fermentação exploratória B).

Os gráficos mostram que ainda não foi possível detectar o consumo de glicose, e a biomassa apresentou um aumento pouco expressivo. Visualmente tampouco observou-se produção de violaceína.

O aumento da $[CO_2]$ até $t = 13,75$ h se deve à respiração aeróbia da bactéria (equação I). Por outro lado, o aumento da $[CO_2]$ e da CC entre $t = 13,75$ e $15,75$ h – intervalo de tempo em que a fermentação foi anaeróbia – se deve ao fato da *C. violaceum* ser um microrganismo anaeróbio facultativo³. Sob anaerobiose, bactérias pertencentes ao gênero *Chromobacterium* produzem ácido láctico ($CH_3-CH(OH)-COOH$), o qual é posteriormente descarboxilado.⁴ Portanto, durante este período em anaerobiose, a produção de ácido láctico explica a queda do pH e a descarboxilação, o aumento da $[CO_2]$.

Os pHs registrados na fermentação exploratória B foram inferiores aos da fermentação exploratória A. Na fermentação exploratória B o oxigênio deve ter sido totalmente consumido até $t \approx 4,5$ h, portanto, deste tempo até o início do borbulhamento de O_2 ($t = 10$ h) o sistema permaneceu em anaerobiose. Certamente houve a produção de ácido láctico (nestas $\approx 5,5$ h) o qual causou a leitura de pHs inferiores na fermentação exploratória B.

É importante atentar o leitor para o valor (em milivolts) utilizado para determinar $[CO_2]$. A todas as leituras – feitas de amostras retiradas em diferentes tempos da fermentação – subtraiu-se o valor de 300 mV pois esta é a leitura obtida de uma amostra de $135\text{ }\mu\text{L}$ de MCL puro.

CONCLUSÃO

Devido ao baixo crescimento celular, a não detecção de consumo de glicose e, principalmente a não produção de violaceína, decidiu-se realizar fermentações de intensa oxigenação nas quais foram mantidos constantes os valores de TOD.

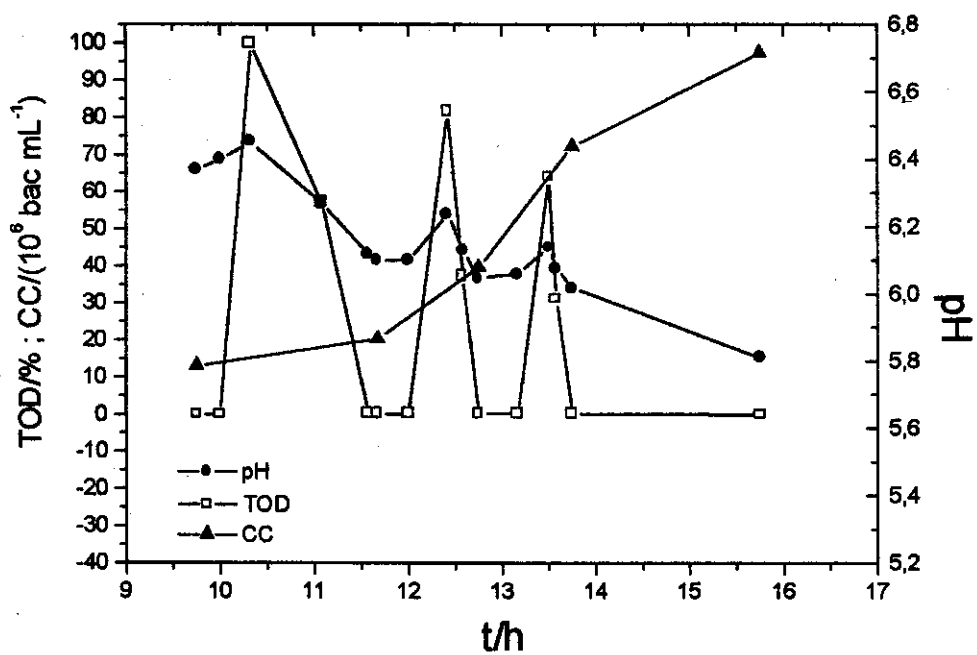
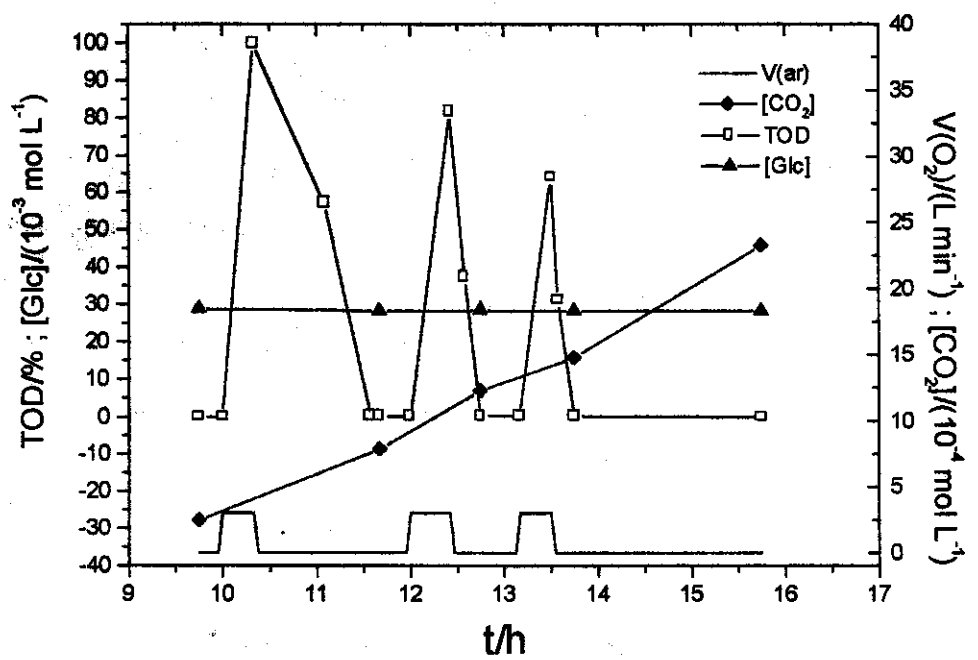


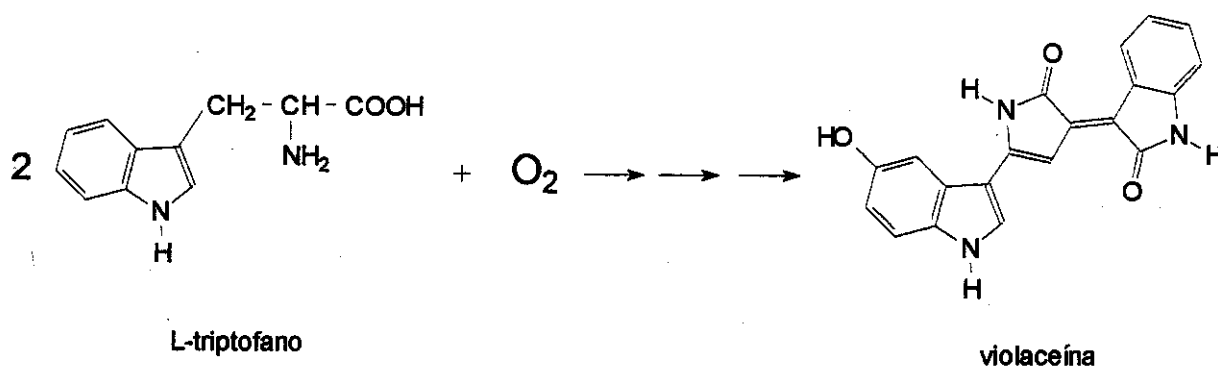
Figura 3.1.1-B- Fermentação exploratória B. Encontram-se graficados, em função do tempo, os parâmetros CC, $[Glc]$, TOD pH e $[CO_2]$. Também é mostrado como foi variada a $V(ar)$ no decorrer da fermentação. *Vide* item 2.2.1-B.

3.1.2- Fermentações a TOD constante

Nas figuras 3.1.2-1, 3.1.2-2 e 3.1.2-3, encontram-se graficados os resultados dos experimentos descritos nos itens 2.2.2-A (Fermentação a TOD = 50 %) e 2.2.2-B (Fermentação a TOD = 10 %).

Em ambas fermentações, o crescimento celular e o consumo de glicose foram idênticos, conforme mostra a Figura 3.1.2-1. O que é claramente diferente é a produção de violaceína. A fermentação de maior TOD foi a que produziu mais violaceína (Figura 3.1.2-2).

Também existe diferença nas variações de pH dos dois experimentos (Figura 3.1.2-3). No final das fermentações (*i.e.*, na fase estacionária do crescimento, $t > 2,3$ h), a de TOD = 50 % ficou com o meio mais básico que a de TOD = 10 %. O aumento da basicidade se deve provavelmente a própria biossíntese de violaceína. Esta é feita, pela *C. violaceum*, a partir de duas moléculas de L-triptofano e oxigênio molecular.⁵



O grupo 2-pirrolidona - da violaceína - é formado pela condensação das cadeias laterais de duas moléculas de L-Trp.⁵ Para isto, além da descarboxilação, é necessário que ocorra a desaminação de um dos L-Trp. A desaminação deve ocorrer de forma a liberar amônia e esta seria a espécie responsável pelo aumento do pH do meio. Portanto, a fermentação de maior produção de violaceína (*i.e.*, a de TOD = 50 %) deveria resultar num aumento maior do pH, e é exatamente isto o que se observa no gráfico da Figura 3.1.2-3.

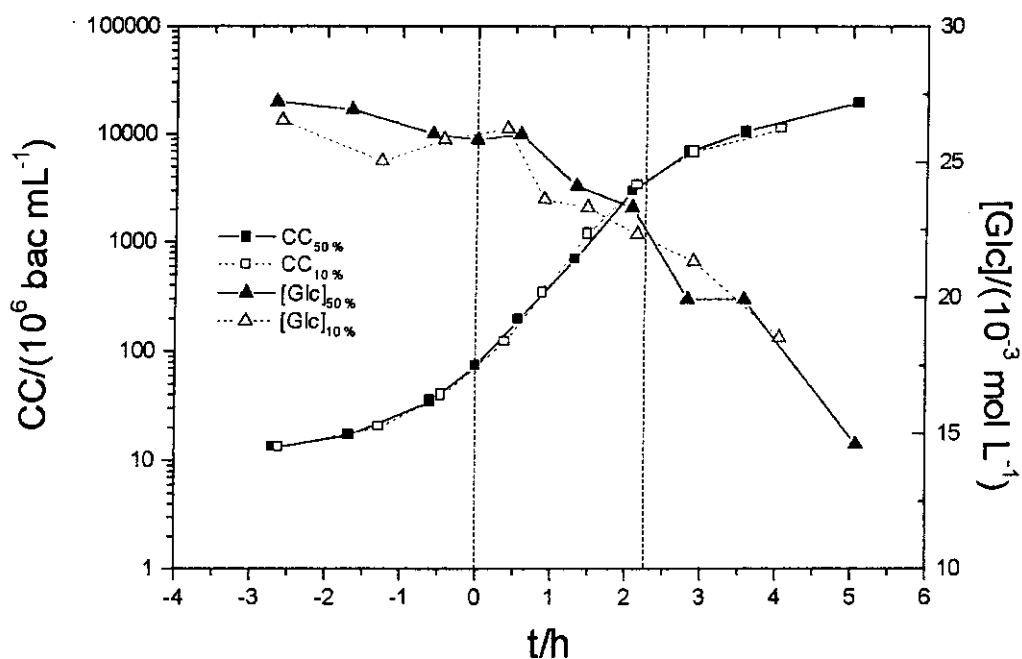


Figura 3.1.2-1- Sobreposição dos experimentos a TOD = 50 e 10 %. Encontram-se graficados, em função do tempo, os parâmetros CC e [Glc]. A fase exponencial de crescimento da *C. violaceum* se encontra delimitada pelas linhas tracejadas verticais. Vide item 2.2.2.

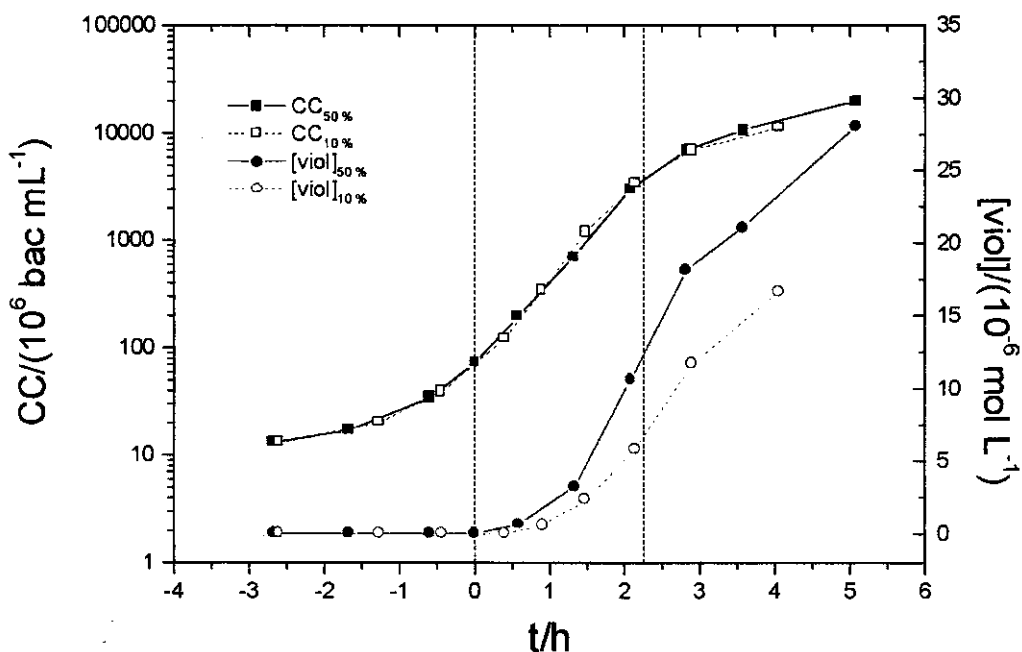


Figura 3.1.2-2- Sobreposição dos experimentos a TOD = 50 e 10 %. Encontram-se graficados, em função do tempo, os parâmetros CC e [viol]. A fase exponencial de crescimento da *C. violaceum* se encontra delimitada pelas linhas tracejadas verticais. Vide item 2.2.2.

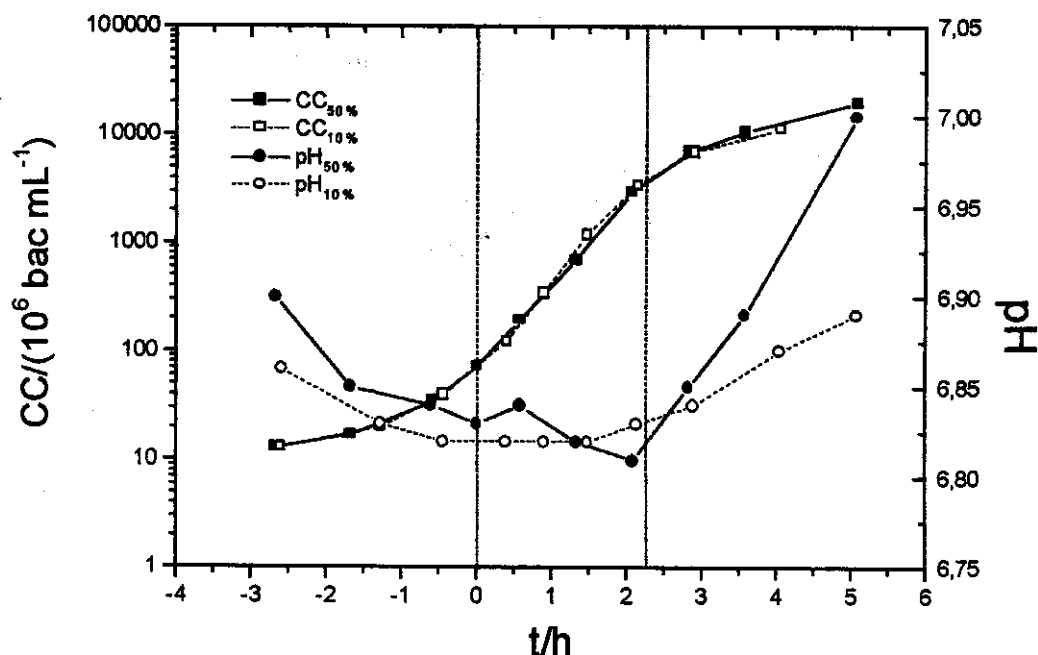


Figura 3.1.2-3- Sobreposição dos experimentos a TOD = 50 e 10 %. Encontram-se graficados, em função do tempo, os parâmetros CC e pH. A fase exponencial de crescimento da *C. violaceum* se encontra delimitada pelas linhas tracejadas verticais. Vide item 2.2.2.

Com o intuito de mostrar que ambas fermentações foram idênticas sob o aspecto do crescimento celular, na fase exponencial, determinaram-se os tempos de geração (t_g) da *C. violaceum*. O crescimento exponencial de uma população de células é dada pela função I:⁶

$$CC = CC_0 e^{\frac{t \ln 2}{t_g}} \quad (I)$$

$$\ln CC = \left(\frac{\ln 2}{t_g} \right) t + \ln CC_0 \quad (II)$$

onde CC é a concentração de células por unidade de volume; CC_0 é a CC no tempo zero; e t é o tempo. O tempo de geração é um parâmetro que expressa o tempo demandado para a biomassa dobrar de valor, em outras palavras, o tempo requerido para uma célula duplicar-

se. Fez-se a regressão linear com os pontos experimentais da fase exponencial do crescimento, *i. e.*, com os dados compreendidos entre as linhas tracejadas verticais dos gráficos. Obteve-se, para o experimento a TOD = 50 %, com intervalo de 95 % de confiança coeficiente angular = $1,79 \pm 0,15$ ($r = 0,9997$), logo:

$$(\ln 2) / t_g = 1,79 \pm 0,15$$

$$t_g = (0,39 \pm 0,03) \text{ h} = (23 \pm 2) \text{ min}$$

Para a fermentação a TOD = 10 %, $t_g = (22 \pm 5) \text{ min}$. Portanto, estes valores mostram que, em termos de crescimento celular na fase exponencial, ambas fermentações foram idênticas.

A produção de violaceína expressa em mols de violaceína por bactéria ($[\text{viol}_{\text{bac}}]$) encontra-se graficada – para ambas fermentações – na Figura 3.1.2-4.

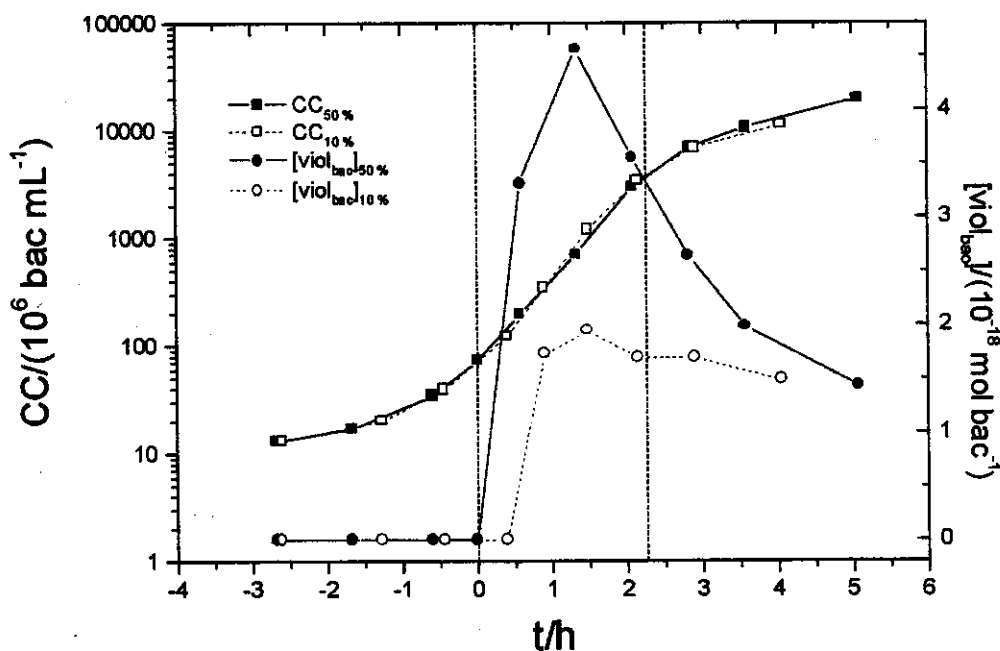


Figura 3.1.2-4- Sobreposição dos experimentos a TOD = 50 e 10 %. Encontram-se graficados, em função do tempo, os parâmetros CC e $[\text{viol}_{\text{bac}}]$. A fase exponencial de crescimento da *C. violaceum* se encontra delimitada pelas linhas tracejadas verticais. Vide item 2.2.2.

O que chama a atenção na figura é o pico de produção de violaceína por bactéria que aparece na fase exponencial do crescimento. Foi por causa desta forma de análise dos resultados que acreditamos ter realizado um *breakthrough*.

O processo biológico da redução de O_2 para H_2O , que ocorre principalmente na cadeia respiratória e que é indiretamente responsável pela biossíntese de ATP,⁷ não é um processo 100 % eficiente. De 1-5 % do oxigênio consumido é desviado para a formação de radicais livres.⁸ A fase exponencial de crescimento é aquela que possui o menor tempo de geração, portanto, é a fase que possui a maior concentração de espécies reativas por célula porque a cadeia respiratória precisa funcionar “a todo vapor” para suprir a alta demanda de ATP necessária para manter um crescimento exponencial. Neste ritmo de funcionamento intenso, a cadeia respiratória produzirá um maior número de espécies radicalares por unidade de tempo e o estresse oxidativo - sofrido pelas bactérias - será máximo.

A correlação parece muito clara. Na fase exponencial de crescimento temos um máximo em termos de produção de violaceína/bac que coincide com um máximo de concentração de espécies oxidantes! Foi nesta etapa do trabalho que postulamos uma função antioxidante para a violaceína. Esta proposta estaria evidentemente inserida num contexto relativo à fisiologia da *Chromobacterium violaceum*.

Com base nesta hipótese, Durán e colaboradores testaram a capacidade da violaceína de inibir a peroxidação lipídica em eritrócitos (ANEXO 2).⁹ Eles utilizaram o método do ácido tiobarbitúrico e, na concentração de $[viol] = 100 \mu mol L^{-1}$, observaram uma inibição de 50 % da peroxidação. Foi mostrado desta forma que a violaceína possui capacidade antioxidante.

Com a intenção de seguir testando a hipótese, realizaram-se fermentações nas quais adicionou-se catalase ao meio de cultura.

3.1.3- Fermentações com catalase

Na Figura 3.1.3 encontram-se graficados os resultados dos experimentos descritos no item 2.2.3.

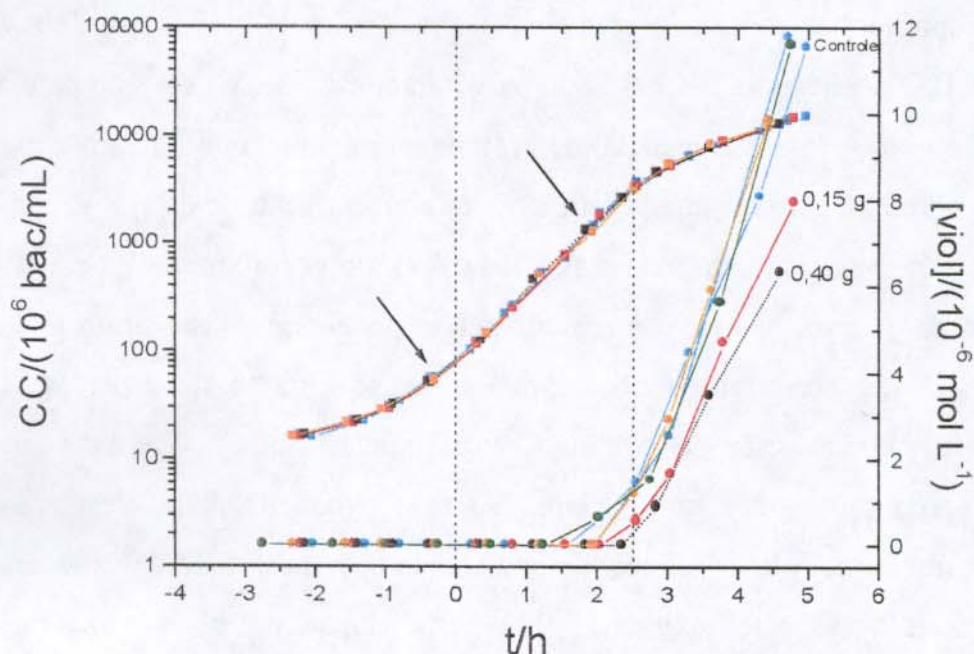


Figura 3.1.3- Sobreposição dos experimentos descritos no item 2.2.3. Encontram-se graficados, em função do tempo, os parâmetros CC (quadrados cheios) e [viol] (círculos cheios). As linhas correspondem a: azul clara cheia – fermentação controle A; azul clara pontilhada – fermentação controle B (duplicata da controle A); vermelha cheia – fermentação com adição de 0,15 g de catalase; preta pontilhada – fermentação com adição de 0,40 g de catalase; laranja cheia – fermentação com adição tardia de 0,40 g de catalase; verde cheia – fermentação na presença de 0,40 g de catalase desativada. As setas indicam os momentos das adições. A fase exponencial de crescimento da *C. violaceum* se encontra delimitada pelas linhas tracejadas verticais. Vide item 2.2.3.

Todos os experimentos deste bloco foram feitos com agitação e vazão de O_2 constantes. Decidiu-se abandonar o método utilizado no bloco anterior (fermentações a TOD constante) devido aos problemas operacionais intrínsecos do método. Para manter a TOD constante era necessário estar permanentemente variando a agitação e a vazão de O_2 . Para isto, o experimento somente podia ser feito por duas pessoas trabalhando

simultaneamente, uma fazendo as leituras dos parâmetros monitorados e a outra variando a agitação e a vazão de O_2 a fim de manter a TOD constante.

Com exceção da fermentação na presença de 0,40 g de catalase desativada, as demais (5 fermentações) apresentaram curvas de crescimento idênticas. Não foi possível determinar o crescimento celular no experimento da catalase desativada porque o meio de cultura (MCL-catalase) estava com a catalase coagulada em suspensão, e esta evidentemente interferia nas leituras de CC.

Pode-se observar claramente que adições crescentes de catalase inibem a produção de violaceína, e, na presença de catalase desativada, não há inibição, indicando que é o efeito enzimático da catalase (dismutação do H_2O_2 em H_2O e O_2) que está atuando no sistema.

Enquanto que a concentração estado-estacionária de $O_2^{\bullet -}$ em bactérias *E. coli* aeróbias, na fase exponencial de crescimento, foi estimada em $(20-40)10^{-12} \text{ mol L}^{-1}$, a concentração intracelular de H_2O_2 foi estimada em $(100-200)10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$.¹⁰ Concentrações de algumas centenas de picomols por litro de $O_2^{\bullet -}$ são suficientes para promover dano ao ADN bacteriano. Se o mesmo estiver acontecendo com a *C. violaceum* – que também é uma bactéria Gram-negativa – esperaríamos a ocorrência de uma concentração de $H_2O_2 \approx 10^4$ vezes maior que a de $O_2^{\bullet -}$ na fase exponencial do crescimento. Desta forma, o peróxido de hidrogênio (que é altamente oxidante $E^\circ = 1,8 \text{ V}$) estaria atuando como principal espécie química na promoção do estresse oxidativo. Apesar da *C. violaceum* possuir catalase,⁴ devido à intensa oxigenação com O_2 puro imposta às fermentações realizadas, a bactéria deve continuar sob estresse oxidativo. Portanto, a produção de violaceína estaria servindo para reduzir este estresse oxidativo na bactéria.

Nos experimentos com catalase, pelo fato do estresse oxidativo estar reduzido devido à catalase adicionada, constata-se uma queda na produção de violaceína em relação aos controles. Pode-se concluir destes experimentos que o peróxido de hidrogênio participa, por algum mecanismo ainda desconhecido, na regulação da biossíntese da violaceína.

Ficou faltando interpretar o resultado no qual não foi inibida a produção de violaceína com a adição tardia de catalase (adição em $t = 1,9 \text{ h}$). Neste experimento, a catalase foi adicionada no exato momento da produção de violaceína. Provavelmente a enzima não tenha indiretamente participado na repressão dos genes que codificam a “maquinária”

enzimática responsável pela biossíntese do pigmento porque ela foi adicionada num tempo posterior ao do período de indução. Se esta hipótese for correta, explica-se o fato da catalase não inibir a produção de violaceína, pelo menos por um curto período de tempo após a adição. Sabe-se que os genes responsáveis por codificar as enzimas que catalisam as reações de biossíntese da violaceína se encontram num fragmento de 14,5 kb do genoma da *C. violaceum*.¹¹

3.2- Estudos de ressonância paramagnética eletrônica

3.2.1- Espectros da violaceína

Decidiu-se investigar o caráter radicalar da violaceína, através da técnica de RPE, a fim de obter informações que pudessem ajudar na compreensão do caráter antioxidante do pigmento. Na Figura 3.2.1-1 encontram-se alguns dos espectros de RPE da violaceína a diferentes temperaturas.

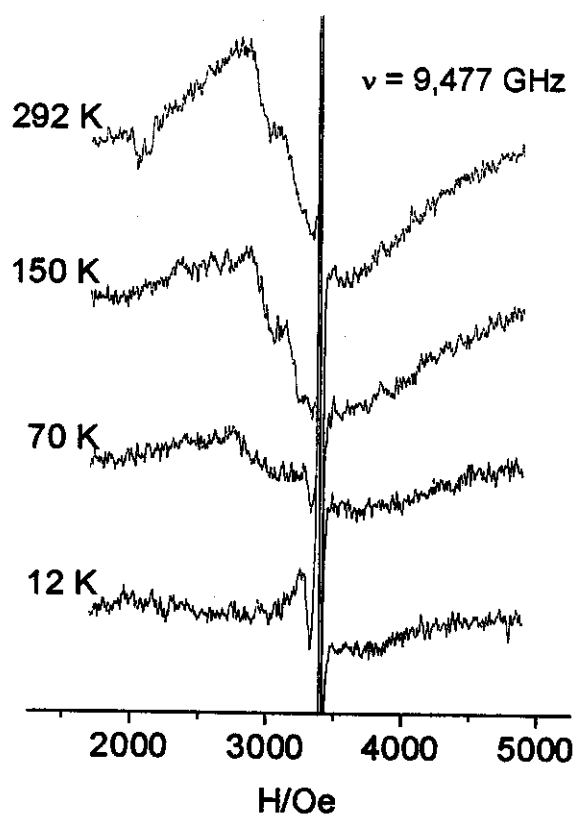


Figura 3.2.1-1- Espectros de RPE de uma amostra de 3,1 mg de violaceína a diferentes temperaturas.

O espectro a 292 K é característico de uma espécie no estado triplete devido à enorme faixa de campo na qual aparece o sinal ($\Delta H = 740 \text{ Oe}$).¹² A fim de determinar se o estado triplete da violaceína era o fundamental ou o primeiro estado excitado, registraram-se espectros a baixa temperatura. Podemos ver na Figura 3.2.1-1 que o sinal diminui de

intensidade a medida que se abaixa a temperatura mostrando claramente que a ressonância é proveniente de uma espécie excitada termicamente.

O pico que aparece em ≈ 3250 Oe, no espectro a 12 K, corresponde a algum tipo de impureza paramagnética do tubo de quartzo utilizado. Isto pode ser visto na Figura 3.2.1-2. As ressonâncias em 3384 Oe serão analisadas no item 3.2.4.

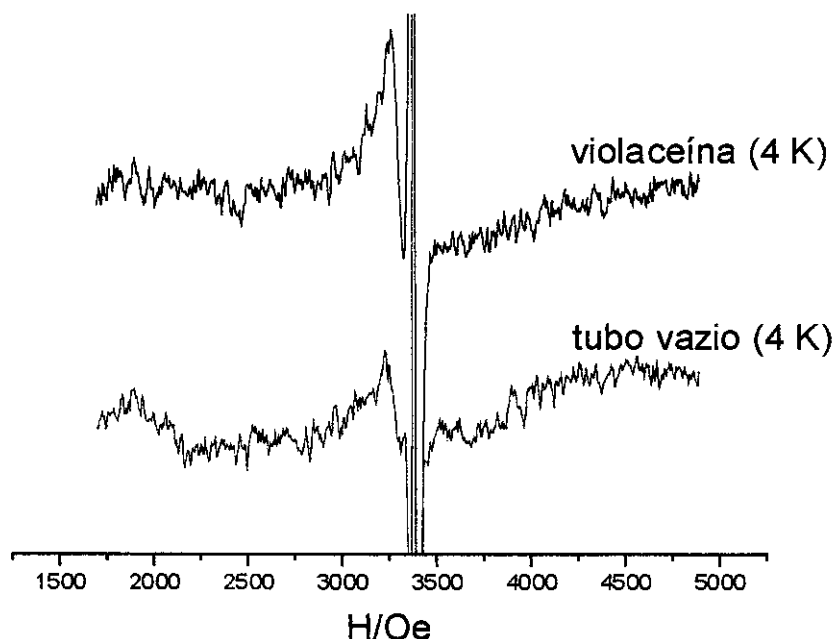


Figura 3.2.1-2- Espectros de RPE da amostra de 3,1 mg de violaceína e do tubo utilizado para a obtenção dos espectros da Figura 3.2.1-1, ambos a 4 K, em preto e azul respectivamente.

A expressão teórica – baseada na distribuição de Boltzmann entre o estado singlete e o triplete – que mostra a dependência da intensidade do sinal (I) de RPE com a temperatura (T), encontra-se a seguir:¹³

$$I = \frac{a}{T} \frac{3 e^{-\Delta E/RT}}{1 + 3 e^{-\Delta E/RT}} \quad (\text{III})$$

a é uma constante que depende do espectrômetro utilizado; R é a constante dos gases ($R = 1,9871 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); ΔE é o *gap* de energia entre o estado singlete e o triplete.

Os espectros obtidos em diferentes temperaturas foram integrados duas vezes. Ao realizar este procedimento obtêm-se valores proporcionais a I . Estes foram graficados em função da temperatura (Figura 3.2.1-3).

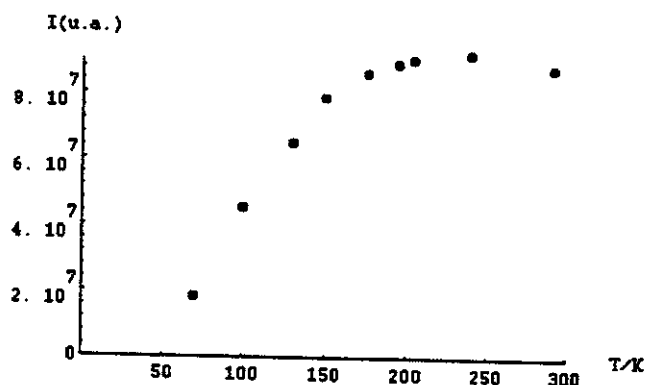


Figura 3.2.1-3- Intensidade do sinal de RPE *versus* temperatura.

Utilizou-se então o programa Mathematica¹⁴ para obter os valores de a e ΔE pelo método iterativo. Na Figura 3.2.1-4 pode-se observar quão bem ajustam-se os pontos experimentais à curva teórica ($a = 55 \cdot 10^9$ e $\Delta E = 0,71 \text{ kcal mol}^{-1}$).

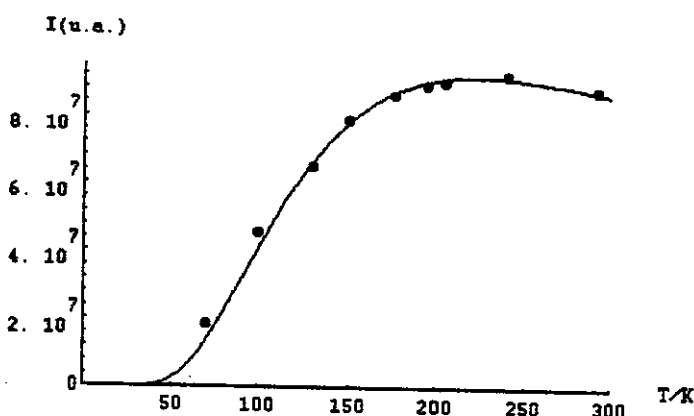


Figura 3.2.1-4- Sobreposição dos pontos experimentais da Figura 3.2.1-3 à função teórica III ($a = 55 \cdot 10^9$ e $\Delta E = 0,71 \text{ kcal mol}^{-1}$).

O valor 0,71 kcal mol⁻¹ obtido é condizente com ΔE s reportados na literatura (ver Tabela 3.2.1).¹⁵

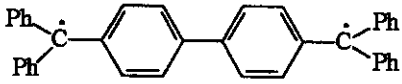
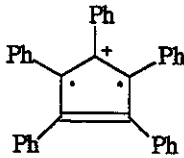
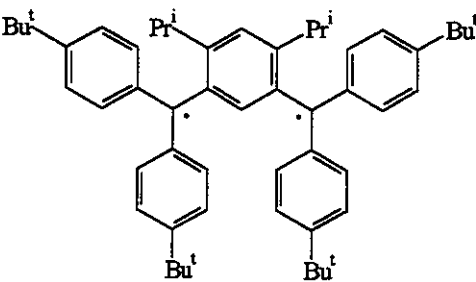
DIRRADICAL	$\Delta E/(\text{kcal mol}^{-1})$	ref.
	2,5	15(a)
	0,48	15(c)
	0,2	15(d)

Tabela 3.2.1- Valores de ΔE (singleto-triplete) para alguns dirradicais orgânicos.

Esta análise corrobora portanto a nossa interpretação de que os sinais de RPE são oriundos de moléculas de violaceína populando o primeiro estado excitado triplete.

Outra confirmação desta interpretação foi lograda mediante a utilização do programa de simulação de espectros XSophe (Bruker). A Figura 3.2.1-5 mostra o espectro obtido experimentalmente a 240 K e o seu respectivo espectro simulado. Pode-se observar que os espectros são idênticos mostrando que o sinal de RPE corresponde à violaceína no estado triplete ($S = 1$).

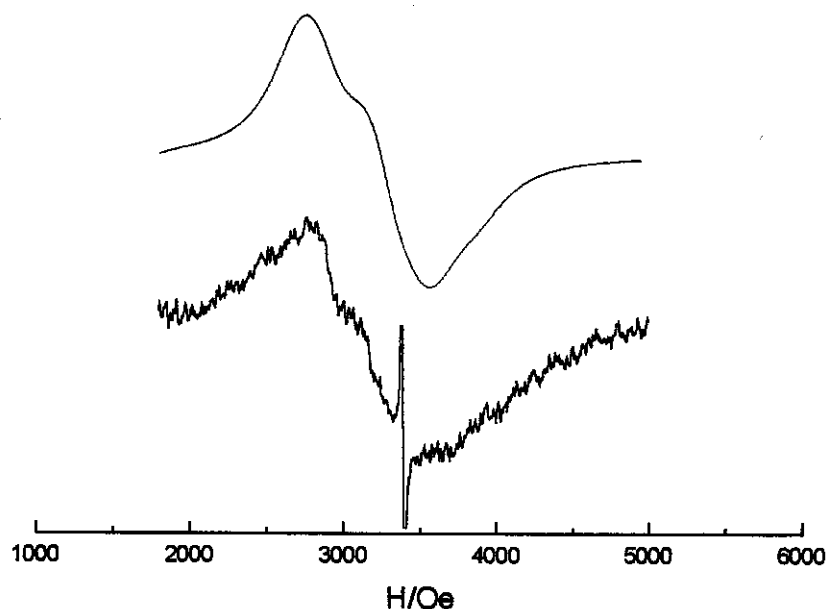


Figura 3.2.1-5- Espectros de RPE, simulado e experimental, a 240 K, em preto e vermelho respectivamente. A simulação foi realizada com o programa XSophe (Bruker) nas seguintes condições: $g_x = 2,18$; $g_y = 2,13$; $g_z = 2,05$; $D = 0,056 \text{ cm}^{-1}$; $E/D = 0,15$; $T = 240 \text{ K}$; $S = 1$; $\nu = 9,477 \text{ GHz}$; simulação de espectro de pó.

O fato de não estarmos observando, em $\approx 1700 \text{ Oe}$ (ver Figura 3.2.2-1- A), a transição proibida $|-1\rangle \leftrightarrow | +1\rangle$ (i.e., a transição $\Delta m_s = 2$),¹⁶ se deve às orientações de polarização do campo magnético da frequência de ressonância e do campo estático.¹⁷ Quando ambos são perpendiculares, somente observam-se as transições $\Delta m_s = 1$, e quando são paralelas, as $\Delta m_s = 2$. Todos os experimentos de RPE realizados foram feitos com os campos perpendiculares entre si, portanto, somente poderíamos ter observado as transições $\Delta m_s = 1$.

3.2.2- RPE quantitativo da violaceína

Com o intuito de determinar a fração de moléculas – a temperatura ambiente – que populam o estado excitado triplete, pois já sabemos que o estado fundamental é singlete, realizamos um experimento quantitativo utilizando o padrão *weak pitch*. A Figura 3.2.2-1 apresenta o espectro da violaceína a 295 K e o espectro do *weak pitch* a 294 K.

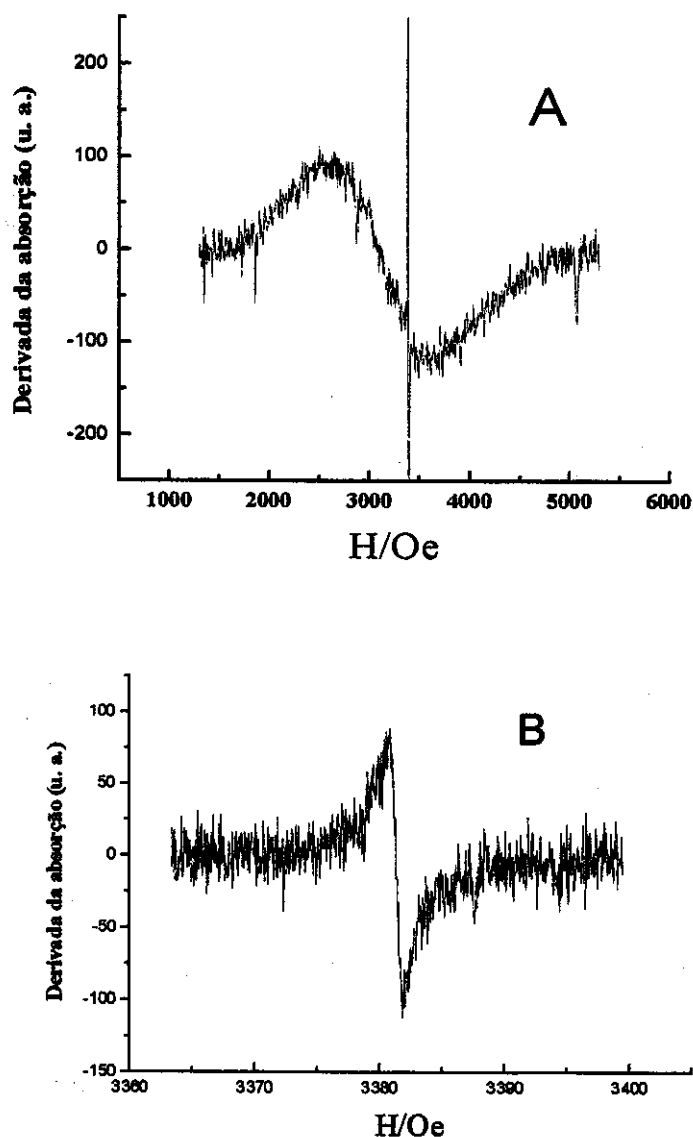


Figura 3.2.2-1- (A) Espectro de RPE de uma amostra de 1,84 mg de violaceína a 295 K. (B) Espectro de RPE do *weak pitch* a 294 K. A frequência da microonda utilizada para a obtenção dos espectros foi $\nu = 9,477$ GHz.

A expressão que relaciona a razão das intensidades do sinal ($I_{\text{viol}}/I_{\text{wp}}$) à razão das quantidades de espécies responsáveis pelo sinal ($N_{\text{viol}}/N_{\text{wp}}$) encontra-se a seguir:¹⁸

$$\frac{I_{\text{viol}}}{I_{\text{wp}}} = \frac{N_{\text{viol}}}{N_{\text{wp}}} \left(\frac{g_{\text{viol}}}{g_{\text{wp}}} \right)^2 \left[\frac{S_{\text{viol}} (S_{\text{viol}} + 1)}{S_{\text{wp}} (S_{\text{wp}} + 1)} \right] \frac{T_{\text{wp}}}{T_{\text{viol}}} \quad (\text{IV})$$

g é o fator de separação espectroscópico; S é o spin eletrônico; T é a temperatura. A dupla integral dos espectros nos fornecem $I_{\text{viol}} = 11,2 \cdot 10^7$ e $I_{\text{wp}} = 1334$. O valor de N , fornecido pelo fabricante, para o *weak pitch* é $N_{\text{wp}} = 1,24 \cdot 10^{13}$ spins cm^{-1} ; a porção do tubo contendo o *weak pitch* a estar inserida na cavidade do espectrômetro era de 2 cm, portanto, $N_{\text{wp}} = 2,48 \cdot 10^{13}$. Utilizando $h\nu = g\beta H$, obtêm-se $g_{\text{viol}} = 2,15$ e $g_{\text{wp}} = 2,00$. Por fim: $S_{\text{viol}} = 1$; $S_{\text{wp}} = \frac{1}{2}$; $T_{\text{viol}} = 295$ K; $T_{\text{wp}} = 294$ K. Substituindo estes valores em (IV), obtêm-se $N_{\text{viol}} = 7 \cdot 10^{17}$. A amostra de violaceína responsável pelo sinal era de 1,84 mg. Esta massa corresponde a $32 \cdot 10^{17}$ moléculas de violaceína ($\text{MM} = 343,34$ g mol^{-1}). Desta forma:

de cada $32 \cdot 10^{17}$ moléculas de violaceína $\rightarrow 7 \cdot 10^{17}$ estão em T_1

de cada 100 moléculas de violaceína $\rightarrow X$

$$X = 22$$

Isto significa que à temperatura ambiente, 22 % das moléculas de uma amostra de violaceína sólida se encontram no primeiro estado excitado tripleto (T_1).

Este dado foi confirmado através da lei de distribuição de Boltzmann:¹⁹

$$\frac{N_{T_1}}{N_{S_0}} = e^{-\Delta E/RT} \quad (\text{V})$$

N_{T_1} é o número de moléculas que se encontram no primeiro estado excitado tripleto; N_{S_0} é o número de moléculas que se encontram no estado fundamental; R é a constante dos gases ($R = 1,9871 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$); T é a temperatura; ΔE é o *gap* de energia entre S_0 e T_1 . Utilizando $T = 295 \text{ K}$ e $\Delta E = 0,71 \text{ kcal mol}^{-1}$ (obtido pela função III), obtêm-se $N_{T_1}/N_{S_0} = 0,3 \cong 23/77$. Portanto, de cada 100 moléculas a temperatura ambiente, 23 populam T_1 . Considerando este método quantitativo (do *weak pitch*) utilizado para se ter uma idéia da ordem de grandeza do número de espécies paramagnéticas, os valores 22 % e 23 % concordam muito além das expectativas.

3.2.3- Conclusões parciais

Esta é a primeira vez que estão sendo reportados estudos de RPE da violaceína. Todos os estudos realizados (itens 3.2.1 e 3.2.2) indicam que o sinal de RPE observado é proveniente de uma fração ($\approx 22 \%$ a temperatura ambiente) das moléculas de uma amostra policristalina de violaceína. Esta fração é constituída de moléculas termicamente excitadas para o primeiro estado excitado tripleto (T_1).

Estes resultados mostram portanto que a violaceína possui no estado sólido uma forma radicalar estável. Um dos requisitos para um composto apresentar atividade antioxidante é possuir uma forma radicalar estável.²⁰ Logo, estes estudos de RPE dão suporte à hipótese formulada no item 3.1.2 de que a violaceína seria uma molécula produzida pela *C. violaceum* com a função de agir como antioxidante.

3.2.4- Monorradicais

Voltando à análise dos espectros da Figura 3.2.1-1 (item 3.2.1), pode-se observar uma ressonância em 3384 Oe. O espectro do tubo vazio apresenta um sinal extremamente fraco nesta região indicando que impurezas paramagnéticas contribuem de forma não significativa para esta ressonância (Figura 3.2.4-1).

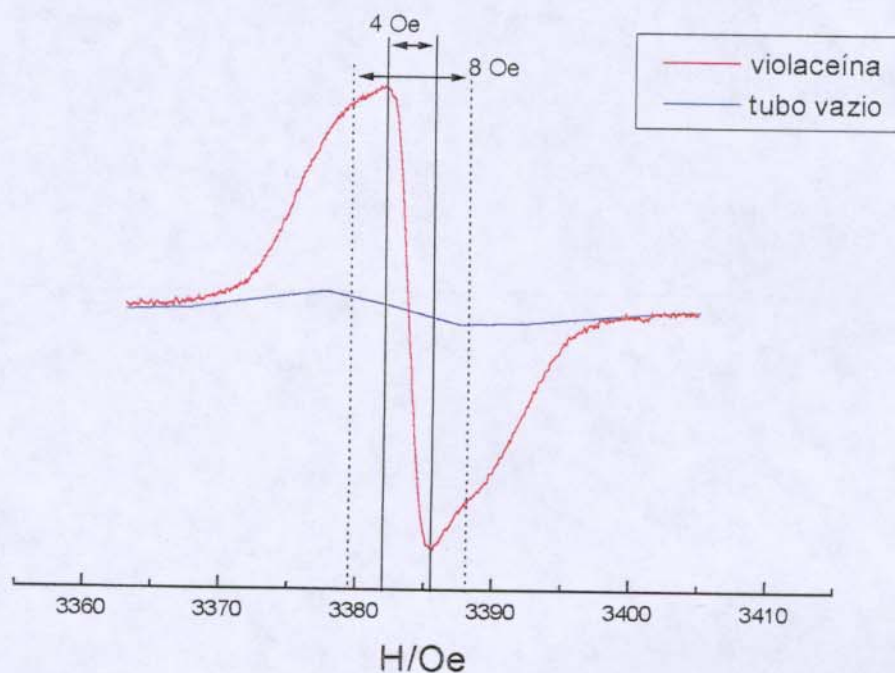


Figura 3.2.4-1- Espectros de RPE da amostra de 3,1 mg de violaceína a 292 K e do tubo vazio a 298 K, em vermelho e azul respectivamente. A frequência da microonda utilizada para a obtenção dos espectros foi $\nu = 9,477$ GHz.

Valores de g em torno de 2,00 são característicos de moléculas que possuem 1 elétron desemparelhado (*i.e.*, espécies monorradicais).²¹ O sinal de RPE proveniente de monorradicais ($S = 1/2$) deve, com o abaixamento da temperatura, apresentar um aumento na intensidade. Isto porque, ao abaixar a temperatura, popula-se mais o estado de spin de menor energia ($m_s = -1/2$), e como consequência, há uma predominância da absorção sobre a emissão na condição de ressonância.²² Na Figura 3.2.4-2 encontram-se alguns dos espectros do sinal em 3384 Oe a diferentes temperaturas. Para obter as intensidades (I), integrou-se duas vezes os espectros e os valores obtidos foram graficados em função da temperatura (Figura 3.2.4-3).

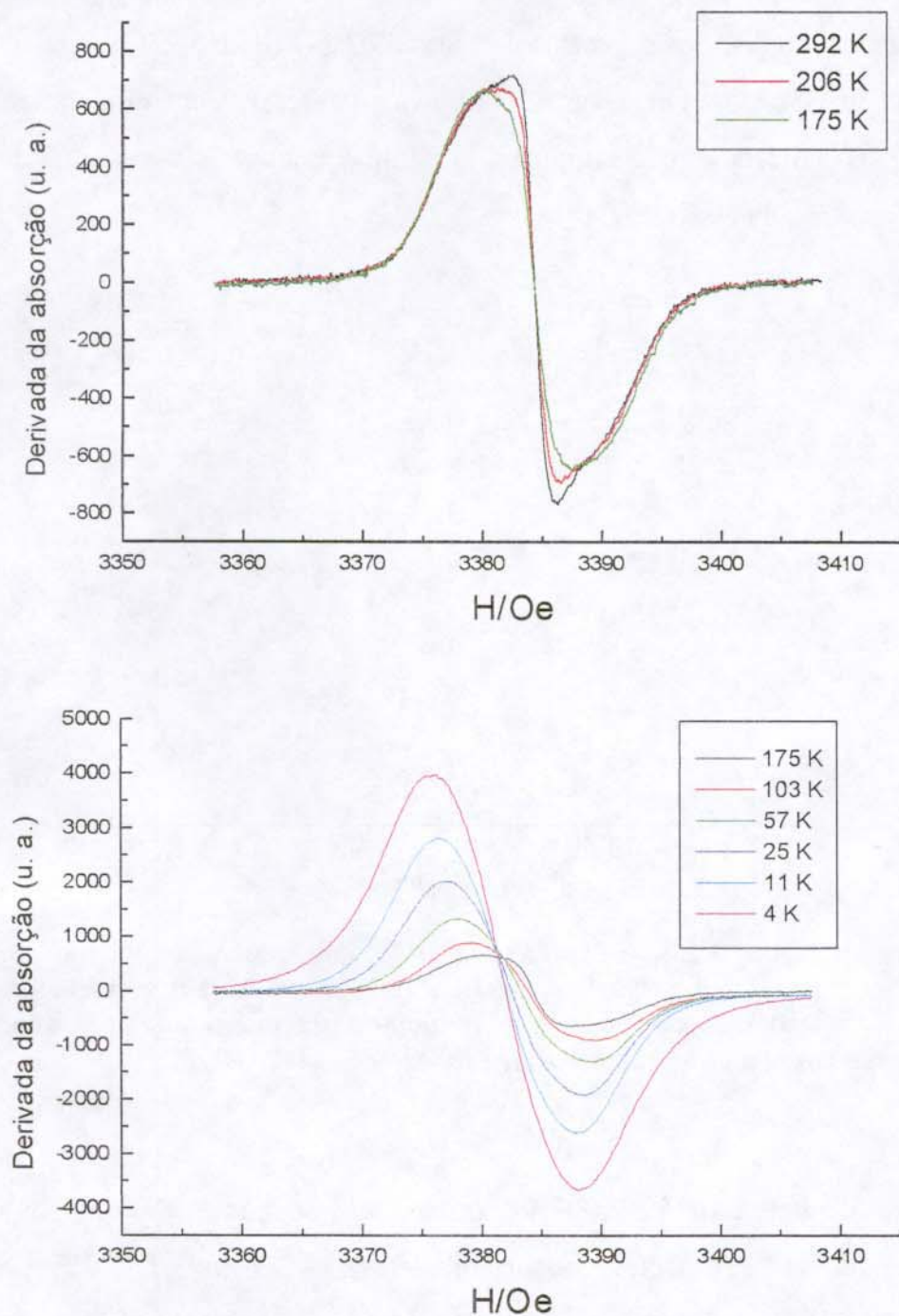


Figura 3.2.4-2- Nesta figura encontram-se espectros de RPE da mesma amostra de 3,1 mg de violaceína utilizada para a obtenção dos espectros da Figura 3.2.1-1, com a diferença que o campo foi varrido de 3357 a 3408 Oe. A frequência da microonda utilizada para a obtenção dos espectros foi $\nu = 9,477$ GHz.

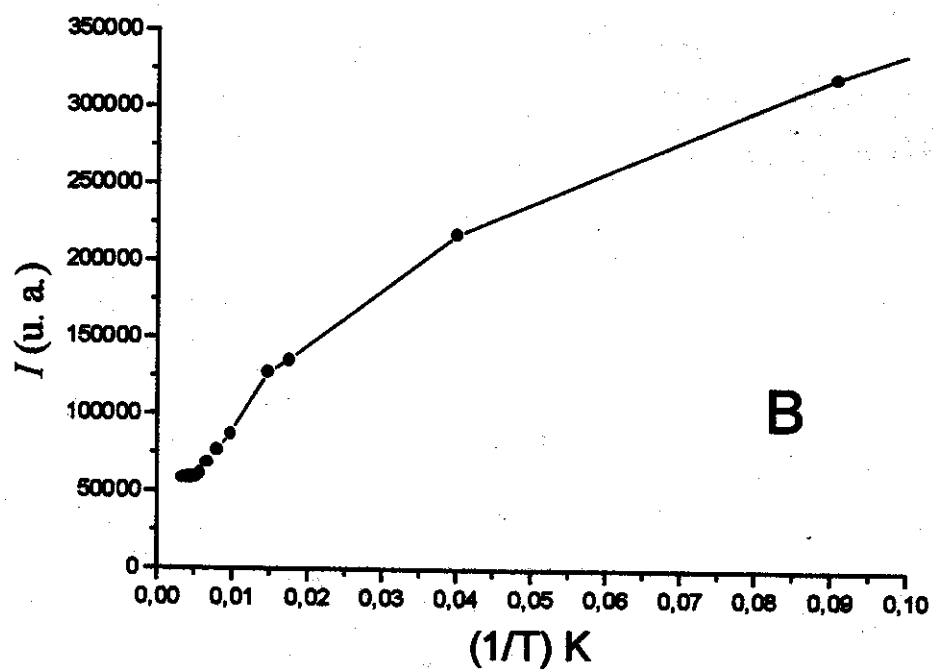
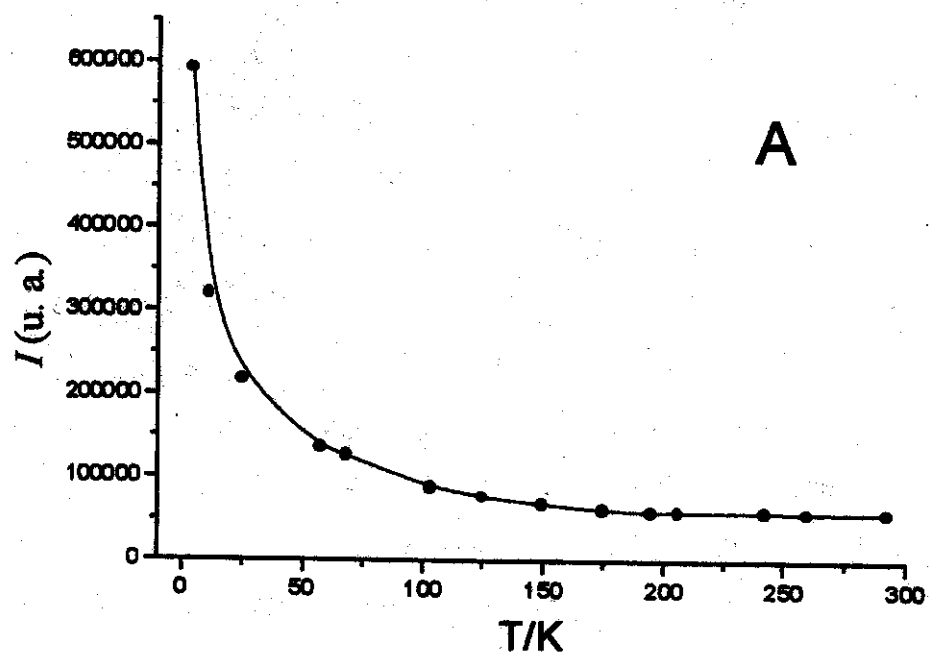


Figura 3.2.4-3- (A) Intensidade dos sinais a 3384 Oe *versus* temperatura. (B) Intensidade dos sinais a 3384 Oe *versus* $1/T$.

Todos os espectros da Figura 3.2.4-2 apresentam valores de g em torno de 2,00. A Figura 3.2.4-3 mostra claramente o aumento da intensidade do sinal com o abaixamento da temperatura. Teoricamente I deveria seguir a lei de Curie: $I = \text{constante}/T$.²³ O desvio da linearidade (Figura 3.2.4-3-B) se deve provavelmente à não idealidade do sistema, *e.g.*, ΔH dos espectros abaixo de 100 K (Figura 3.2.4-2) não é constante.

Pode-se observar também, no espectro a 292 K (Figura 3.2.4-1), uma forma de linha característica da sobreposição de dois sinais. O de maior largura de linha ($\Delta H_M = 8$ Oe) corresponde ao sinal dos monorradicais. O de menor ($\Delta H_{DQ} = 4$ Oe), diminui de intensidade com o abaixamento da temperatura (ver espectros a 292, 206 e 175 K da Figura 3.2.4-2). Este último se deve ao processo bifotônico conhecido como *double quantum transition*.²⁴ O sinal da *double quantum* é oriunda de espécies dirradicalares que absorvem dois fótons para realizar a transição $|-1\rangle \leftrightarrow |+1\rangle$. Ao abaixar a temperatura, devido à despopulação do primeiro estado excitado tripleto da violaceína, observa-se a diminuição da intensidade do sinal da *double quantum*.

Submeteu-se uma amostra de 1,84 mg de violaceína a tratamentos térmicos a diferentes temperaturas (318-433 K). Os resultados deste experimento encontram-se na Figura 3.2.4-4.

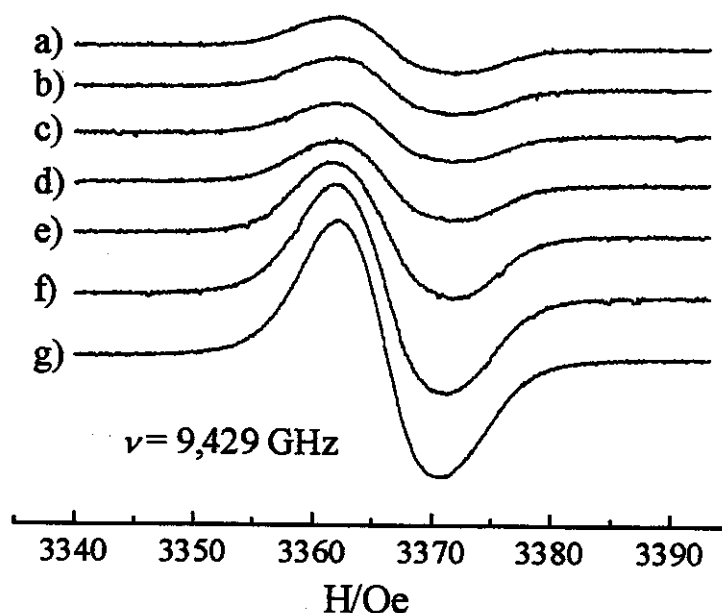


Figura 3.2.4-4 Espectros de RPE de uma amostra de 1,84 mg de violaceína submetida a tratamentos térmicos – por 5 minutos – a: a) sem tratamento térmico; b) 318 K; c) 338 K; d) 358 K; e) 378 K; f) 408 K; g) 433 K. Os espectros foram registrados com a amostra de violaceína sempre a 298 K.

Pode-se observar na figura que tratamentos térmicos superiores a 358 K causam um aumento irreversível na intensidade do sinal. Esta é uma evidência de que os monorradicais responsáveis pelo sinal em $g = 2,00$ são gerados pela decomposição térmica da violaceína. Algumas etapas do procedimento de produção e purificação da violaceína²⁵ são realizadas a temperaturas acima de 358 K, portanto, durante a obtenção do pigmento, uma fração da violaceína é degradada em espécies monorradiculares. É interessante atentar para o fato da intensidade aumentada do sinal permanecer estável, indicando que os monorradicais gerados são estáveis. Esta evidência – da formação de monorradicais estáveis a partir da violaceína – pode ser usada para, mais uma vez, justificar o caráter antioxidante do pigmento.

A extensão desta decomposição é mínima conforme determinado pelo estudo quantitativo com o padrão *weak pitch* (Figura 3.2.4-5).

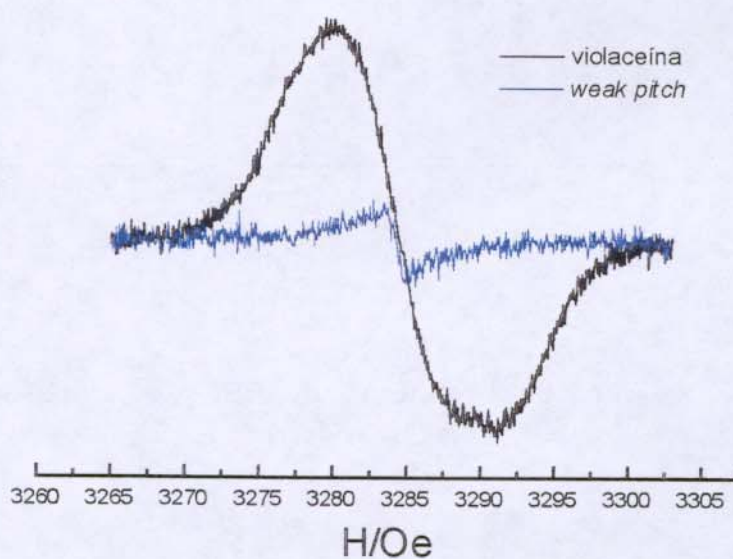


Figura 3.2.4-5- Linha preta: espectro de RPE de uma amostra de 2,0 mg de violaceína a 295 K. Linha azul: espectro de RPE do *weak pitch* ($1,24 \cdot 10^{13}$ spins cm^{-1}) a 295 K. A frequência da microonda utilizada para a obtenção dos espectros foi $\nu = 9,204$ GHz.

Integrando duas vezes os espectros, obtêm-se $I_{\text{monorradicais}} = 16816$ e $I_{\text{wp}} = 745$. Apesar de termos usado a mesma amostra de *weak pitch* utilizada no estudo quantitativo do item 3.2.2, o valor de I_{wp} aqui é diferente porque os espectrômetros utilizados foram diferentes. Neste estudo foi utilizado um E-LINE (Varian) e no do item 3.2.2, um ELEXSYS (Bruker). Aplicando a expressão (IV), obtêm-se $N_{\text{monorradicais}} = 5,6 \cdot 10^{14}$. Como a amostra de violaceína era de 2,0 mg ($3,5 \cdot 10^{18}$ moléculas de violaceína) conclui-se que de cada 6250 moléculas de amostra, somente uma (1) está degradada na forma de monorradical.

Por fim, registrou-se um espectro de RPE em banda-Q (Figura 3.2.4-6).

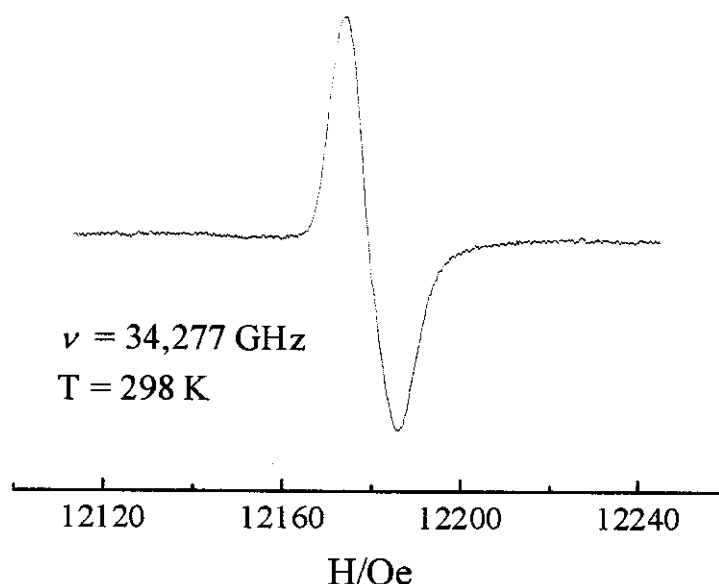
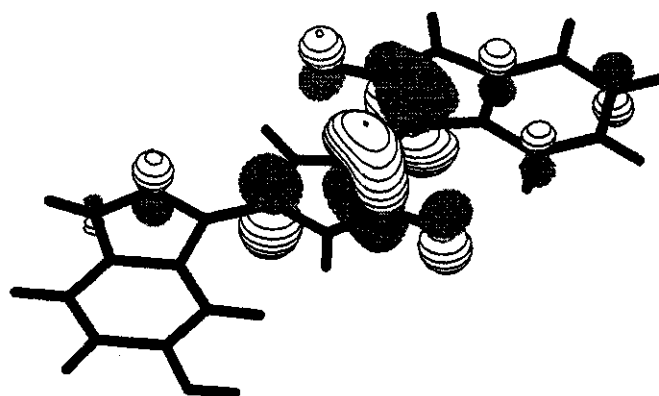


Figura 3.2.4-6- Espectro de RPE em banda-Q de uma amostra de $\approx 1,0$ mg de violaceína.

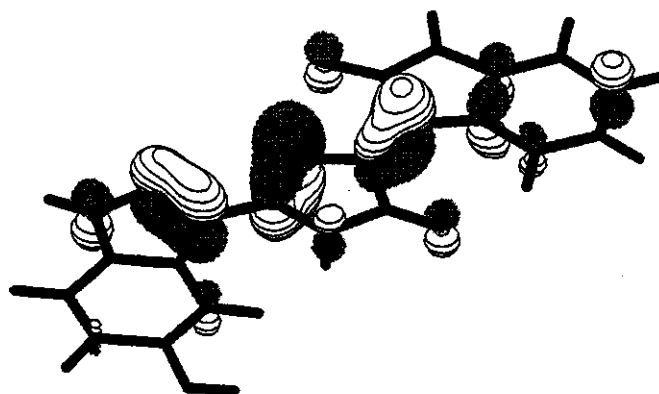
O intuito deste experimento foi o de verificar um possível desdobramento do sinal ou pelo menos uma mudança na forma da linha. Como não foi observado nenhum dos dois, conclui-se que provavelmente somente um tipo de monorradical é formado pela degradação térmica da violaceína.

3.2.5- Proposta de uma estrutura para o dirradical

Foram realizados cálculos *ab initio* (base CEP-31G) a fim de obter a forma dos orbitais de fronteira HOMO e LUMO da violaceína, porque a transição eletrônica de menor energia é aquela na qual um elétron é promovido justamente do HOMO para o LUMO. Foi utilizado o pacote Gaussian 94.²⁶ Encontram-se na Figura 3.2.5-1 a forma dos orbitais HOMO e LUMO.

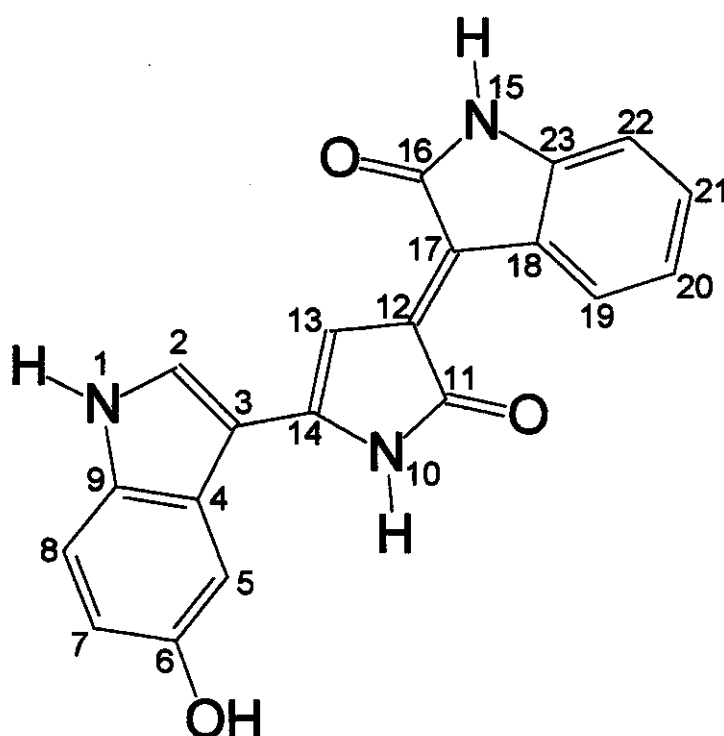


LUMO



HOMO

Figura 3.2.5-1- Forma dos orbitais HOMO e LUMO - da violaceína – obtidos mediante cálculos *ab initio* (base CEP-31G).



Podemos ver na Figura 3.2.5-1 que os orbitais atômicos que mais contribuem para o HOMO são os dos carbonos 2, 3, 14, 13, 12 e 17. Para o LUMO, os dos carbonos 11, 12, 17 e 16. De acordo com o requisito de *overlap* de orbitais – que diz que para uma transição eletrônica ser permitida espacialmente, grande parte dos dois orbitais envolvidos na transição devem ocupar a mesma região do espaço²⁷ – a transição mais provável de ocorrer situa-se na região próxima aos carbonos 12 e 17 porque são os orbitais atômicos destes átomos que contribuem para ambos orbitais de fronteira.

Propomos então – apesar dos cálculos *ab initio* realizados serem “pobres” devido a não utilização das opções 1) correlação eletrônica e 2) interação de configurações – a formação do dirradical da violaceína a partir de uma transição eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$, efetuada termicamente, de um dos elétrons da ligação π entre os carbonos 12 e 17 (Figura 3.2.5-2). A formação do estado excitado tripleto (T_1) exige também a inversão do spin de um dos elétrons.

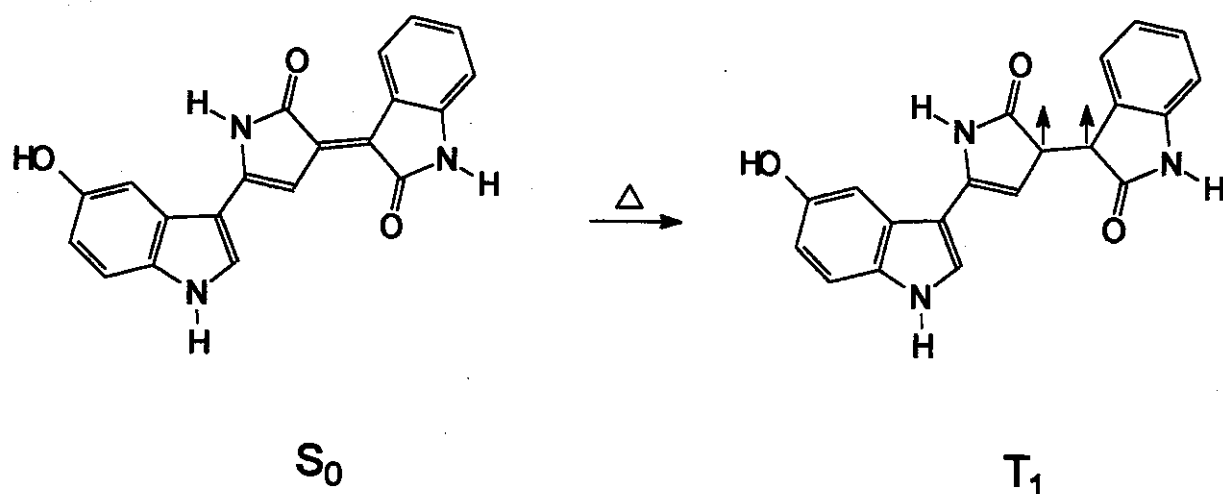


Figura 3.2.5-2- Dirradical proposto que explicaria o sinal de RPE observado (Figura 3.2.1-1) da violaceína.

A Tabela 3.2.5 apresenta os valores do parâmetro D (em cm^{-1}) de algumas espécies no estado tripleto.²⁸

O *zero field splitting* D é um parâmetro indicativo da distribuição espacial dos spins desemparelhados de uma molécula. Quanto menor o valor de D , maior é a distância média entre os elétrons.²⁹ Valores muito baixos, *e.g.*, em torno de $0,05 \text{ cm}^{-1}$, indicam uma distância média alta entre os elétrons. O 4-fenileno-bis-fenilmetileno (ver tabela) possui $D = 0,0521 \text{ cm}^{-1}$ e apresenta 5 ligações de distância entre os elétrons desemparelhados. O valor de D obtido para a violaceína através da simulação de espectro (Figura 3.2.1-5) foi de $0,056 \text{ cm}^{-1}$. Portanto, por analogia, a estrutura mesomérica que mais contribuiria para o híbrido de ressonância do dirradical proposto seria aquela a apresentar 5 ligações de distância entre os elétrons desemparelhados. Uma sugestão para esta estrutura encontra-se na Figura 3.2.5-3.

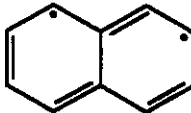
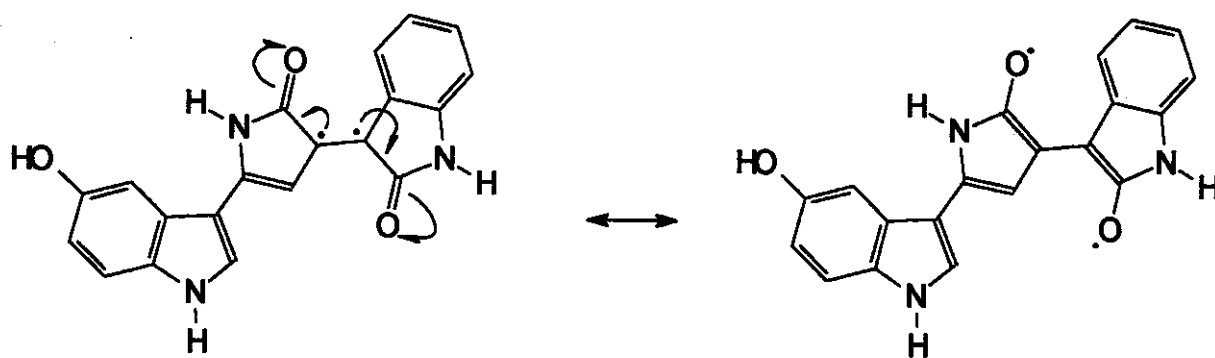
TRIPLETE	ESTRUTURA	D/cm ⁻¹
metileno	$\cdot\dot{\text{C}}\text{H}_2$	1,017
fenilnitreno	$\text{:}\dot{\text{N}}-\text{C}_6\text{H}_5$	1,00
fenilcarbeno	$\text{HC}\dot{\text{C}}-\text{C}_6\text{H}_5$	0,515
4-nitrofenilcarbeno	$\text{HC}\dot{\text{C}}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$	0,480
difenilcarbeno	$\text{C}_6\text{H}_5-\dot{\text{C}}-\text{C}_6\text{H}_5$	0,406
naftaleno		0,1003
4-fenileno-bis-fenilmetileno	$\text{Ph}-\dot{\text{C}}=\text{C}_6\text{H}_4=\dot{\text{C}}-\text{Ph}$	0,0521

Tabela 3.2.5- Tabela apresentando o valor do parâmetro D de algumas espécies triplete.



Estrutura proposta

Figura 3.2.5-3- Proposta de uma estrutura mesomérica que apresenta uma distância média entre os elétrons condizente com o valor obtido de $0,056 \text{ cm}^{-1}$ para a violaceína.

3.2.6- Espectro de massa da violaceína

Na Figura 3.2.6-1, encontra-se o espectro de massa da violaceína:²⁵

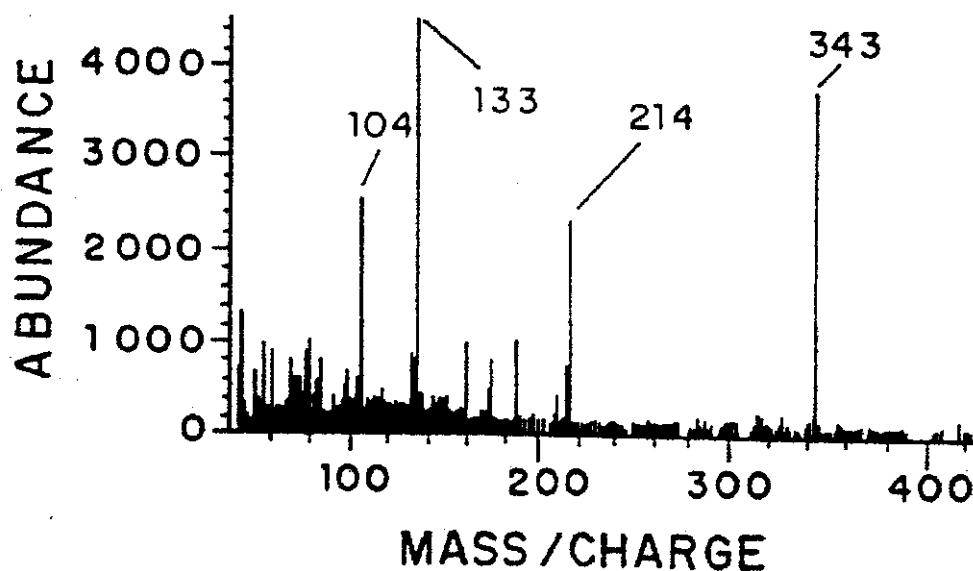


Figura 3.2.6-1- Espectro de massa da violaceína (extraído da Figura 6 da referência 25).

Até bem pouco tempo atrás tivemos dificuldades para fazer a interpretação completa deste espectro de massa. Isto porque, para formar o íon m/z 214, seria necessário abstrair 2 hidrogênios do grupo OX e transferi-los para o grupo 5HI-2PY. A partir da descoberta do dirradical – que se forma termicamente no estado sólido – pudemos propor mecanismos para a interpretação completa do espectro de massa. Nas figuras 3.2.6-2, 3.2.6-3 e 3.2.6-4, encontram-se os mecanismos propostos.

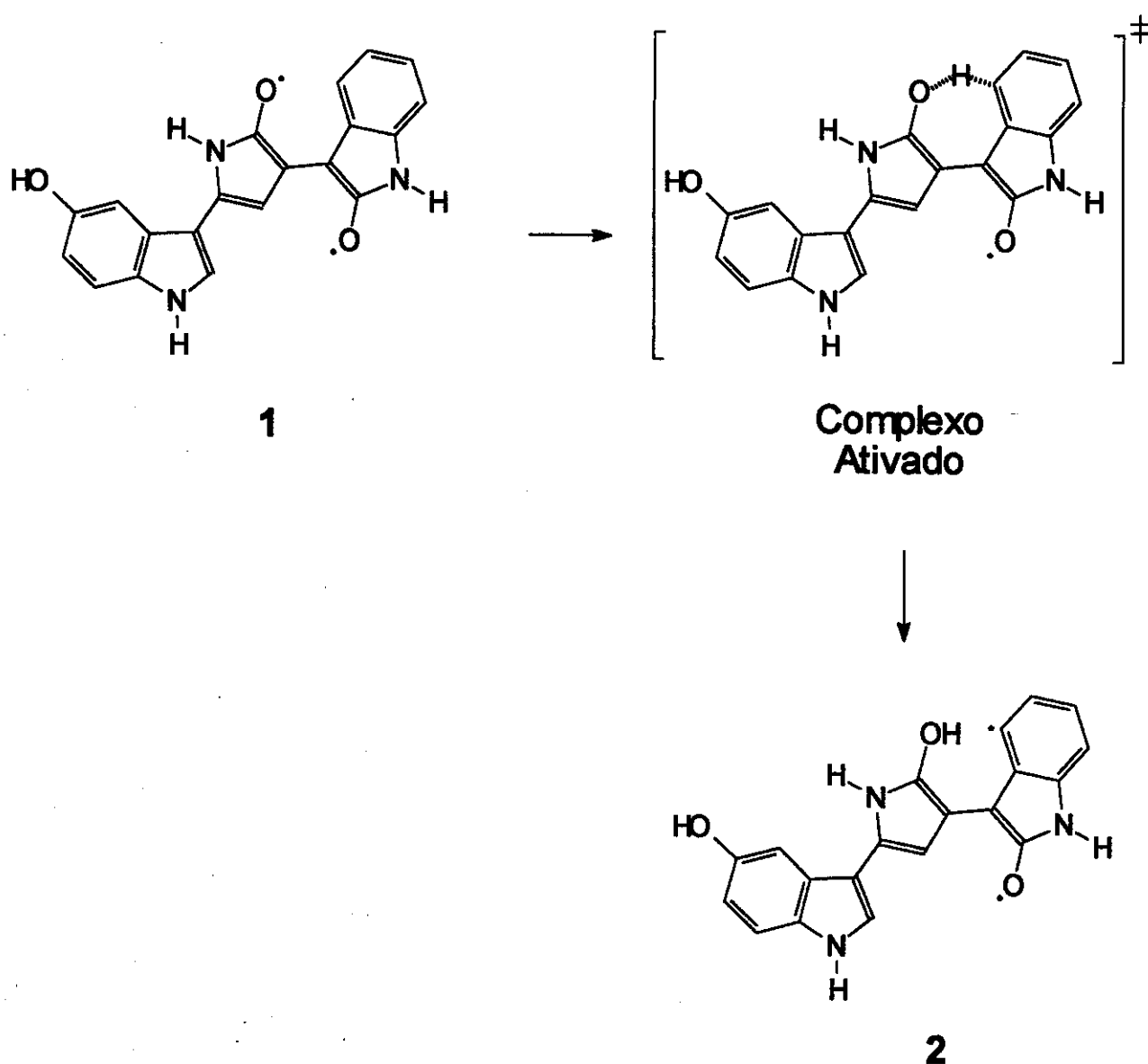


Figura 3.2.6-2- Mecanismo proposto para a transferência do primeiro hidrogênio do grupo OX para o grupo 5HI-2PY.

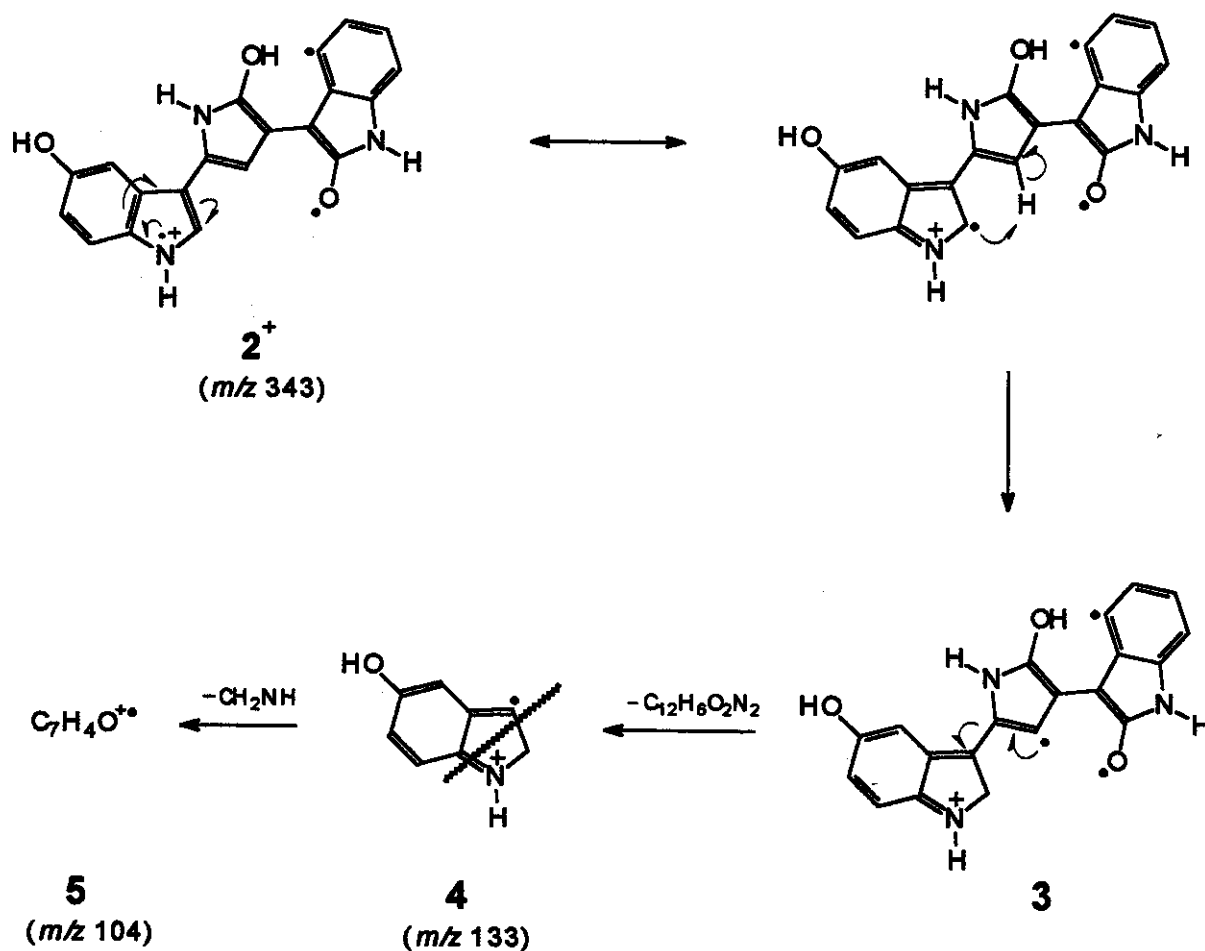


Figura 3.2.6-3- Mecanismo proposto para a formação dos íons *m/z* 133 e 104.

Evidentemente que o mecanismo da Figura 3.2.6-3 pode ser igualmente proposto a partir de uma molécula de violaceína que não tenha sofrido uma transferência intramolecular de hidrogênio conforme mecanismo da Figura 3.2.6-2. Mas, a formação do íon *m/z* 214 (Figura 3.2.6-4) somente pode ser proposto a partir da transferência intramolecular de hidrogênio.

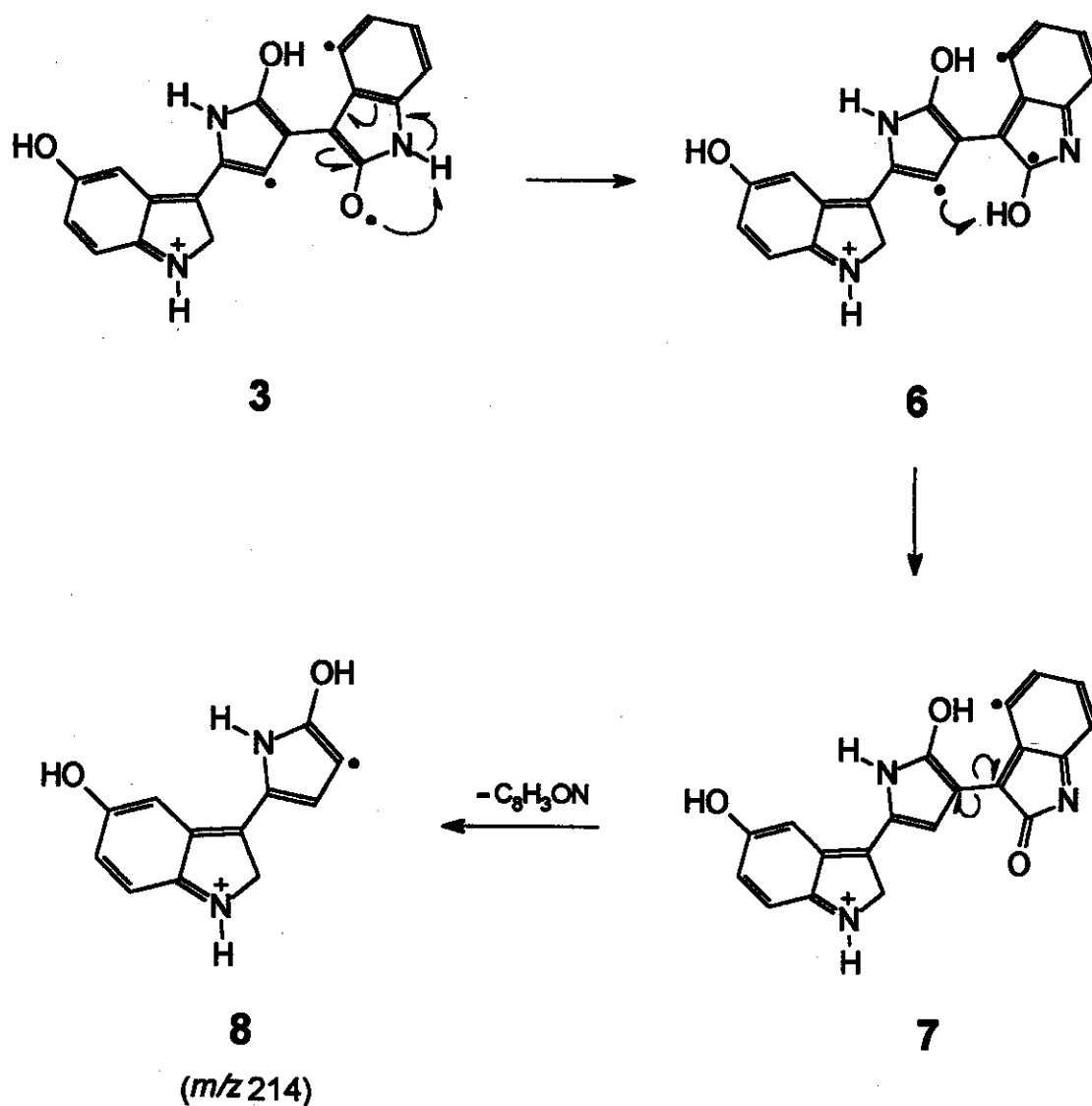
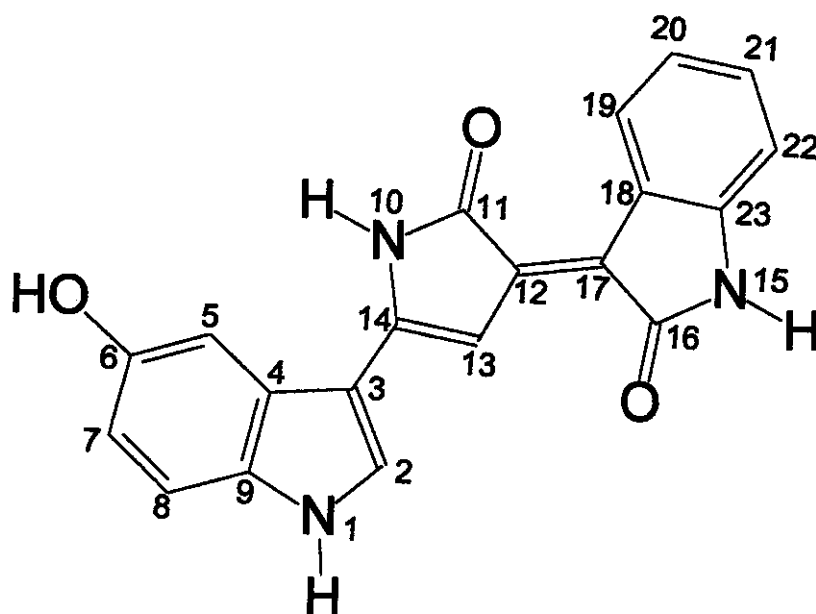


Figura 3.2.6-4 Mecanismo proposto para a transferência do segundo hidrogênio do grupo OX para o grupo 5HI-2PY, com subsequente formação do íon m/z 214.



Considerando a transferência intramolecular de hidrogênio dirigida por proximidade estrutural,³⁰ é mais provável que esta ocorra do hidrogênio 19 para o oxigênio 11 e não do hidrogênio 13 para o oxigênio 16 (Figura 3.2.6-2). Os valores das distâncias intramoleculares - da geometria otimizada - determinadas pelos cálculos *ab initio*, foram: 1) 2,303 Å entre o H13 e o O16; 2) 2,128 Å entre o H19 e o O11. Logo, há maior proximidade entre o H19 e o O11 do que entre o H13 e o O16. A geometria otimizada é aquela apresentada nas figuras, *i.e.*, a que possui os grupos 5HI, 2PY e OX coplanares. Um mecanismo similar – proposto por um processo fotoquímico e não térmico – encontra-se no trabalho de Higuchi *et.al.*³¹

É importante fazer um comentário a respeito da formação do complexo ativado proposto (Figura 3.2.6-2). A princípio poderíamos achar improvável o rompimento da ligação C-H na posição 19 pois isto demandaria aproximadamente 110 kcal mol⁻¹ – a energia de dissociação homolítica (DH°) a 25 °C para o C₆H₅-H é 110 kcal mol⁻¹.³² Mas como a transferência intramolecular de hidrogênio é um processo concertado, a medida que a ligação C-H (na posição 19) vai se rompendo, temos a formação da ligação O-H na posição 11. A energia requerida para romper a ligação C-H acaba sendo proveniente da energia liberada pela formação da ligação O-H. Considerando que a formação desta última libera aproximadamente 103 kcal mol⁻¹ – pois DH° = 103 kcal mol⁻¹ para a ligação O-H do etanol – pode-se observar que é baixa (≈ 7 kcal mol⁻¹) a energia líquida requerida para a formação do complexo ativado.

3.3- Estudos de fotofísica

Os espectros de absorção e emissão da violaceína dissolvida em etanol se encontram nas figuras 3.3.1, 3.3.2 e 3.3.3.

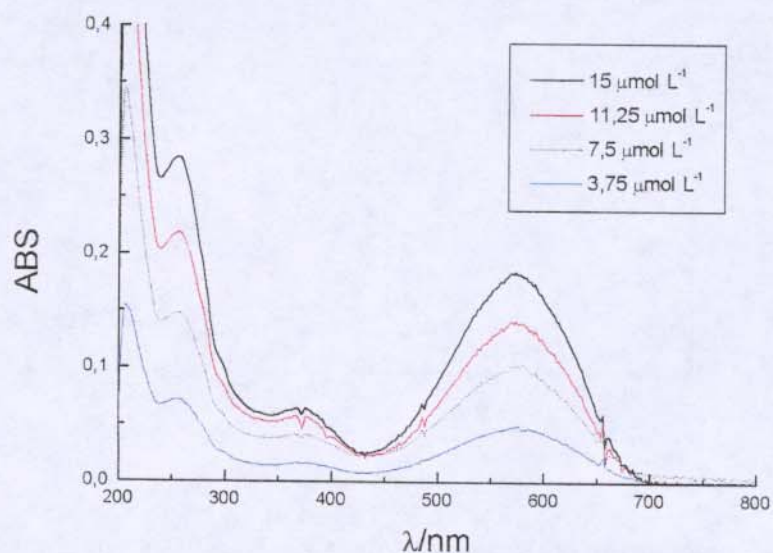


Figura 3.3.1- Espectros de absorção da violaceína dissolvida em etanol.

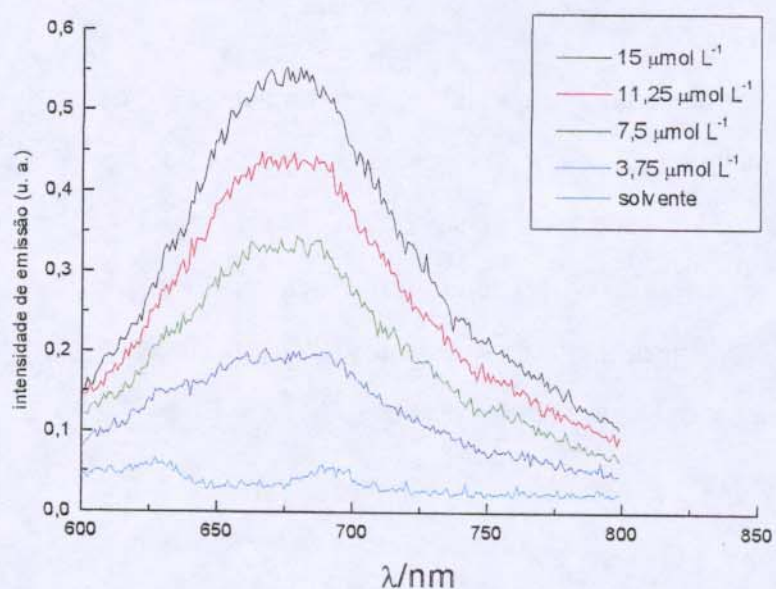


Figura 3.3.2- Espectros de emissão da violaceína dissolvida em etanol ($\lambda_{\text{exc}} = 575 \text{ nm}$).

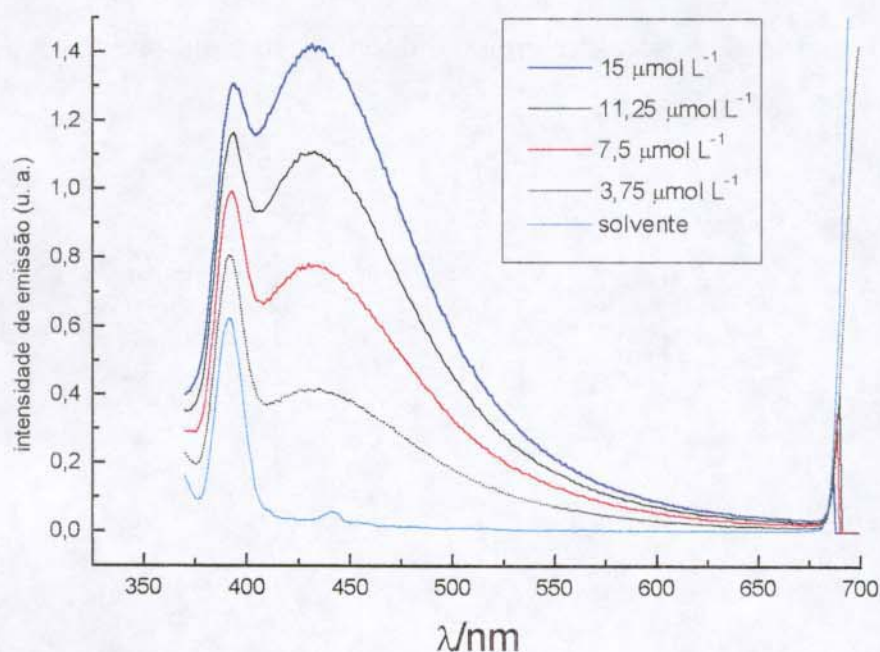


Figura 3.3.3- Espectros de emissão da violaceína dissolvida em etanol ($\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$).

Pode-se ver claramente que não existe formação nem de agregados nem de excímeros na faixa de concentração estudada porque as figuras não apresentam mudanças na forma dos espectros.³³ Nos espectros de absorção (Figura 3.3.1), a banda com $\lambda_{\text{máx}} = 575 \text{ nm}$ (banda de menor energia) corresponde à transição $S_0 \rightarrow S_1$, enquanto que a com $\lambda_{\text{máx}} = 370 \text{ nm}$ à $S_0 \rightarrow S_2$. A fim de confirmar as fluorescências observadas, variou-se o comprimento de onda de excitação (figuras 3.3.4 e 3.3.5).

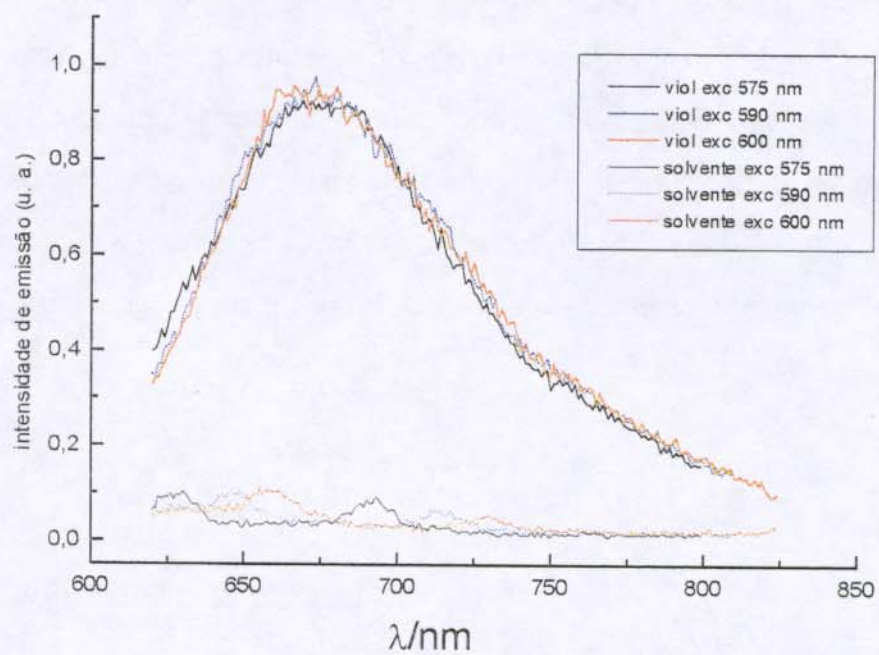


Figura 3.3.4- Espectros de emissão da violaceína dissolvida em etanol ($15 \mu\text{mol L}^{-1}$).

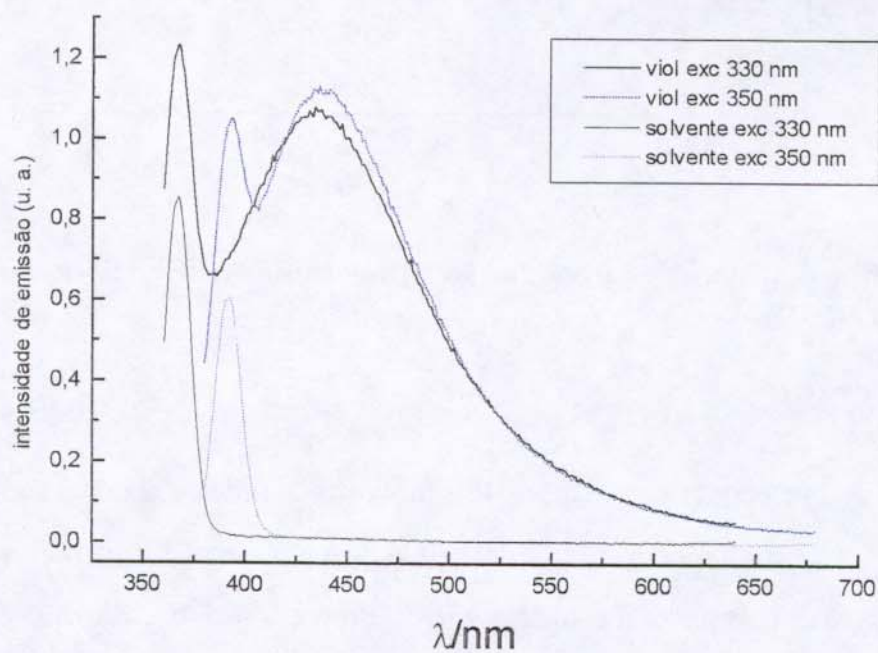


Figura 3.3.5- Espectros de emissão da violaceína dissolvida em etanol ($15 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Conclui-se portanto que a solução etanólica de violaceína possui duas fluorescências. A banda com $\lambda_{\text{máx}} = 390 \text{ nm}$ (Figura 3.3.3) corresponde ao espalhamento Raman do etanol.

Com base na fluorescência anômala apresentada pelo azuleno,³⁴ inicialmente propusemos um decaimento radiativo $S_2 \rightarrow S_0$ para explicar a fluorescência com $\lambda_{\text{máx}} = 440 \text{ nm}$ (figuras 3.3.3 e 3.3.5).³⁵ Ao registrar espectros de emissão a 77 K (da solução de $15 \mu\text{mol L}^{-1}$), somente observou-se a fluorescência correspondente à banda com $\lambda_{\text{máx}} = 680 \text{ nm}$ (Figura 3.3.6).

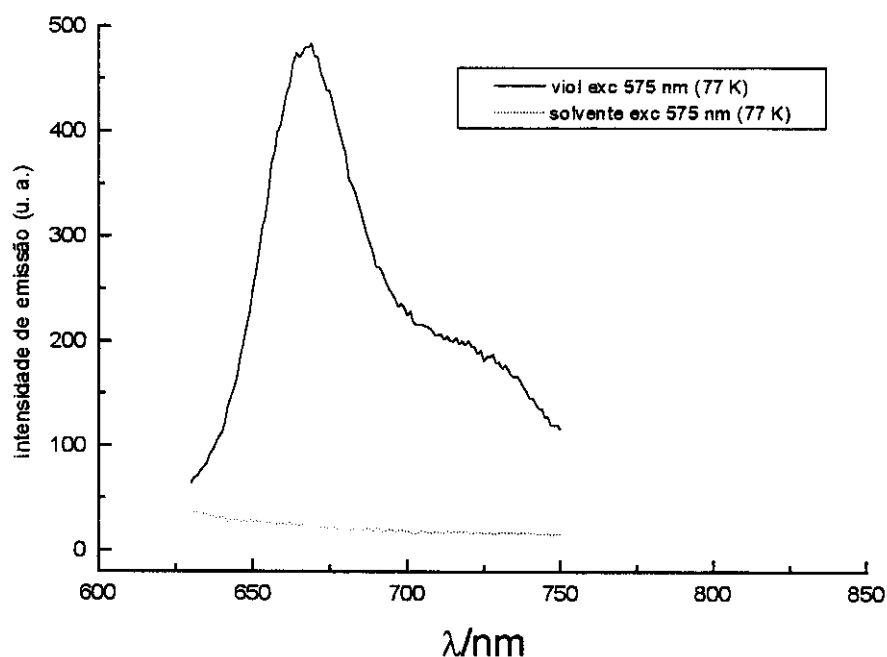


Figura 3.3.6- Espectro de emissão a 77 K da violaceína dissolvida em etanol ($15 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Se a fluorescência com $\lambda_{\text{máx}} = 440 \text{ nm}$ correspondesse à um decaimento $S_2 \rightarrow S_0$, ao abaixar a temperatura para 77 K, deveríamos ter observado um aumento na intensidade desta emissão. Portanto, foi descartada a hipótese do decaimento $S_2 \rightarrow S_0$. Pode-se observar no espectro a 77 K um aumento de resolução, *i. e.*, são observadas duas bandas de fluorescência ao invés de uma. Elas podem ser atribuídas à: 1) bandas de espécies diferentes; 2) bandas de decaimentos para níveis vibracionais diferentes. Espectros de excitação resolveriam esta dúvida, mas infelizmente estes estudos não foram realizados.

Passamos a atribuir a fluorescência anômala ($\lambda_{\text{máx}} = 440 \text{ nm}$) à um exciplexo fluorescente já que é bem sabido que indóis formam exciplexos com álcoois alifáticos.³⁶ A questão passou a ser: que tipo de exciplexo estaria sendo formado? Sabe-se que no primeiro estado excitado singlete, aminas e álcoois aromáticos se tornam mais ácidos e, carbonilas aromáticas, mais básicas.³⁷ Os valores de pKa podem mudar em até 10 unidades. Também já foi reportado o aumento da acidez do 5-hidroxiindol no estado excitado.³⁶ Foi mostrado no trabalho de Dias Jr *et al.* (ANEXO 3),³⁸ que a violaceína forma pontes de hidrogênio com moléculas do solvente (etanol). Portanto, com base nestas informações, propusemos uma desprotonação da violaceína no estado excitado S_2 com subsequente formação do exciplexo. Dois tipos de exciplexo poderiam estar sendo formados (figuras 3.3.7 e 3.3.8): 1) com interações intermoleculares iônicas; 2) com interações intermoleculares do tipo pontes de hidrogênio.

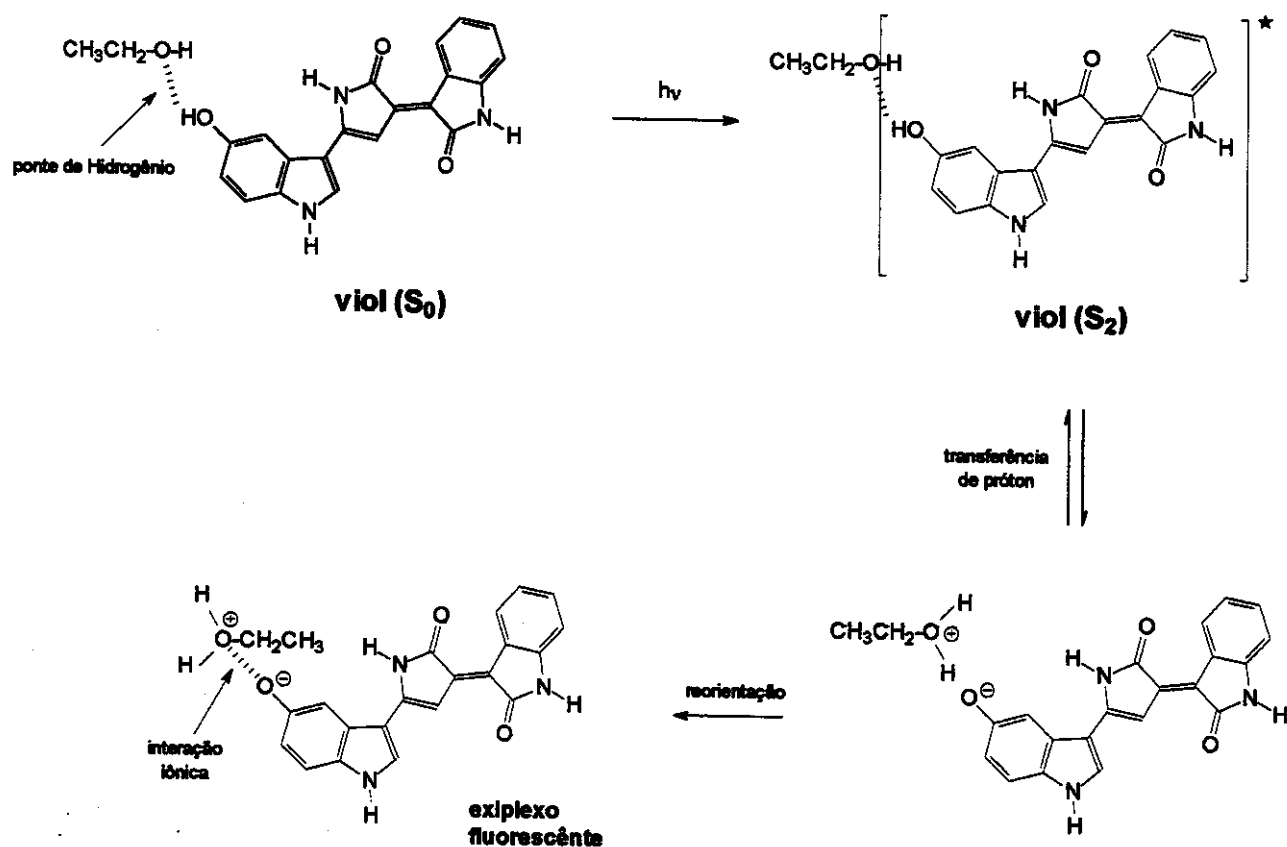


Figura 3.3.7- Proposta de formação do exciplexo que apresenta interação intermolecular iônicas.

O mesmo mecanismo apresentado na Figura 3.3.7 pode ser proposto para a formação de excíplexos com interação iônica entre os grupos NH da violaceína e o solvente.

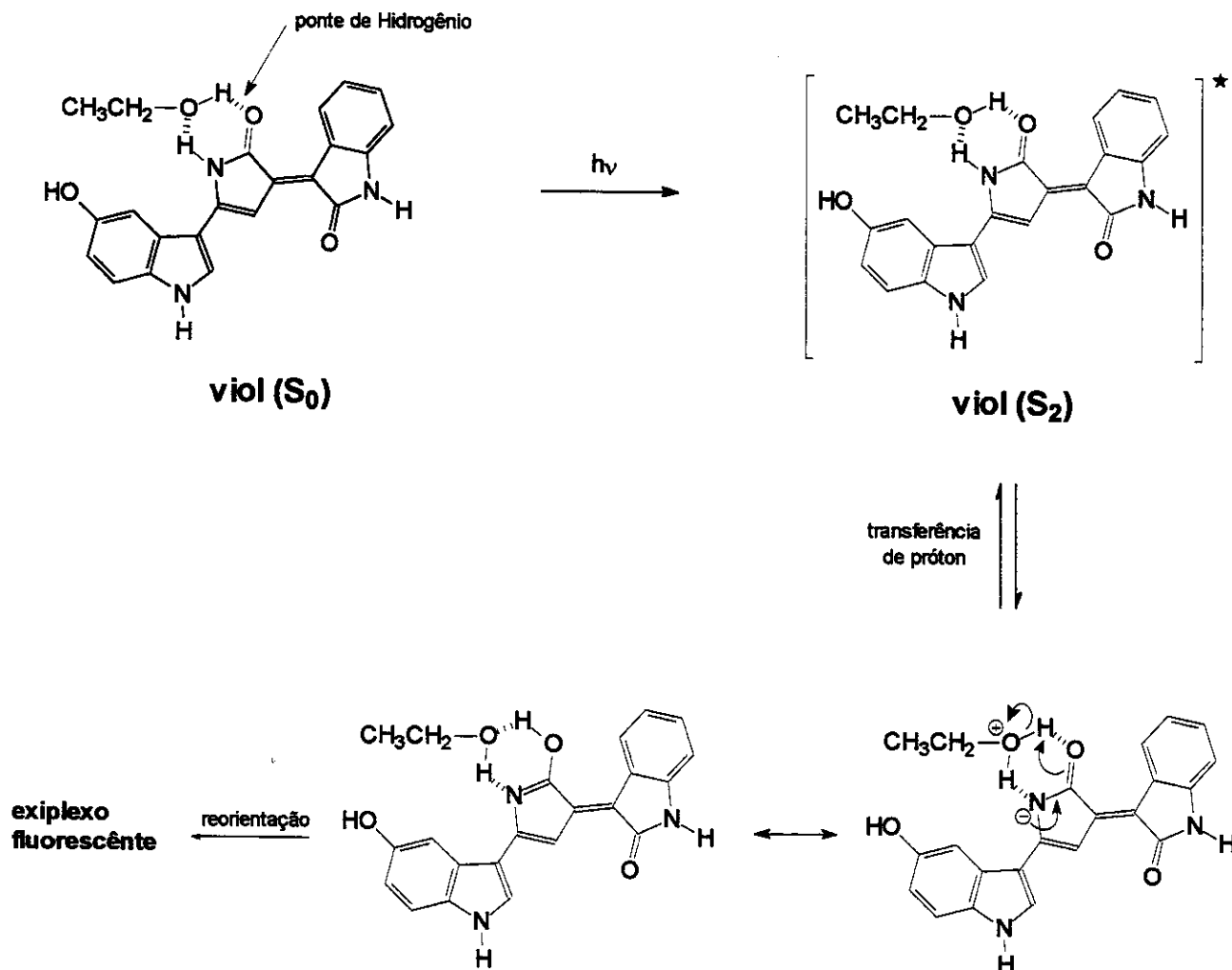


Figura 3.3.8- Proposta de formação do excíplexo que apresenta interações intermoleculares do tipo pontede hidrogênio.

O mesmo mecanismo da Figura 3.3.8 pode ser proposto para a formação do excíplexo no grupo oxindol da violaceína.

Ambos mecanismos propostos explicam o porquê de não estarmos observando – a 77 K – a fluorescência com $\lambda_{\text{máx}} = 440 \text{ nm}$. Uma vez que o sistema está congelado, a etapa da reorientação das moléculas, para formar o exciplexo, não ocorre. Ao não haver a formação do exciplexo fluorescente, não há fluorescência. De acordo com a literatura, exciplexos em geral não se formam a baixa temperatura.³⁹

Decidiu-se então testar a hipótese da formação dos exciplexos. Realizou-se um experimento no qual adicionou-se quantidades crescentes de $\text{HCl}_{(\text{aq})} 2 \text{ mol L}^{-1}$ à uma solução de violaceína ($[\text{viol}] = 45 \mu\text{mol L}^{-1}$). Nas figuras 3.3.9, 3.3.10 e 3.3.11 encontram-se os espectros de absorção e fluorescência deste experimento.

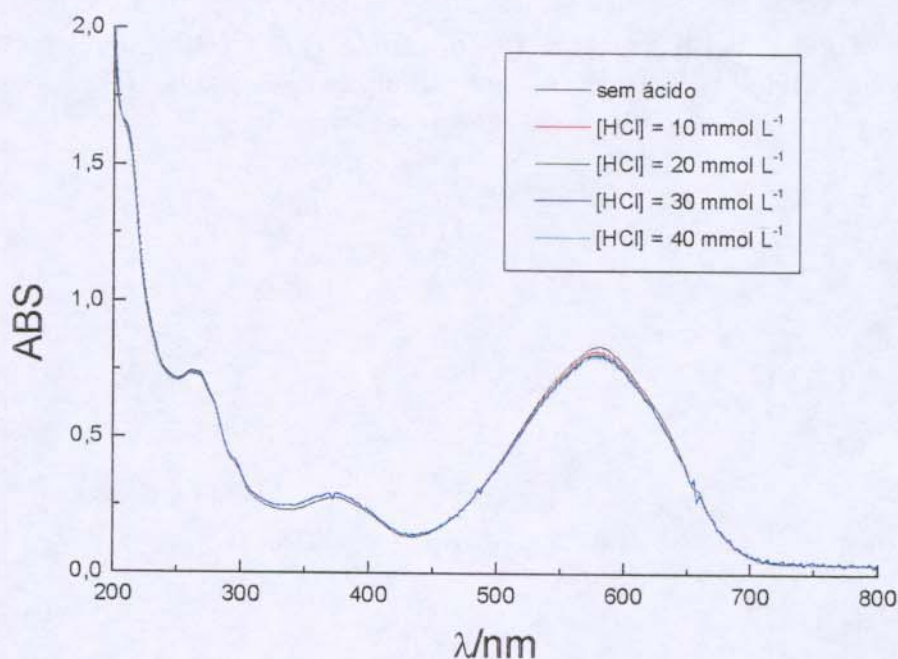


Figura 3.3.9- Espectros de absorção da violaceína ($[\text{viol}] = 45 \mu\text{mol L}^{-1}$ - em etanol) na presença de diferentes concentrações de HCl.

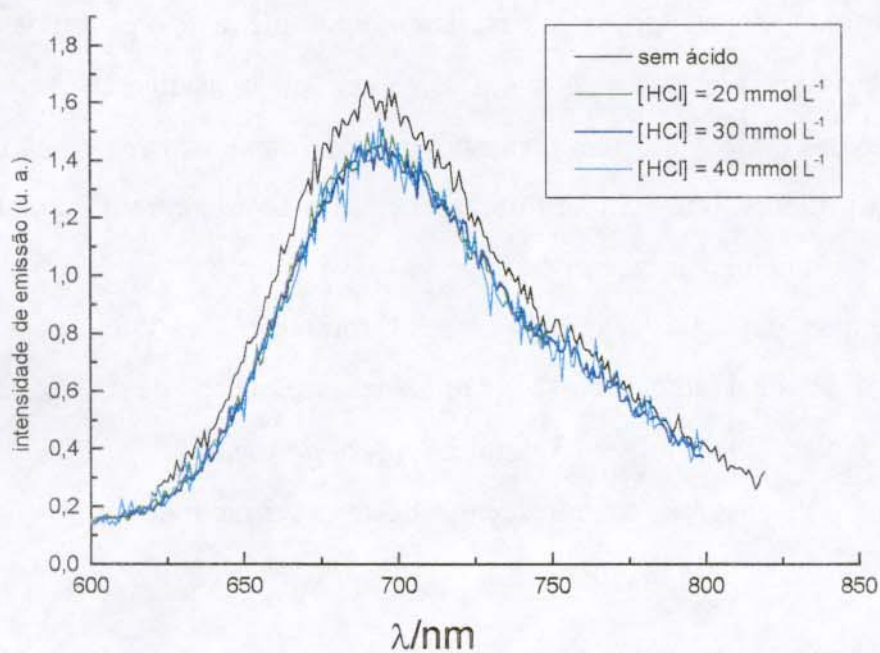


Figura 3.3.10- Espectros de emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 575 \text{ nm}$) da violaceína ($[\text{viol}] = 45 \mu\text{mol L}^{-1}$ - em etanol) na presença de diferentes concentrações de HCl.

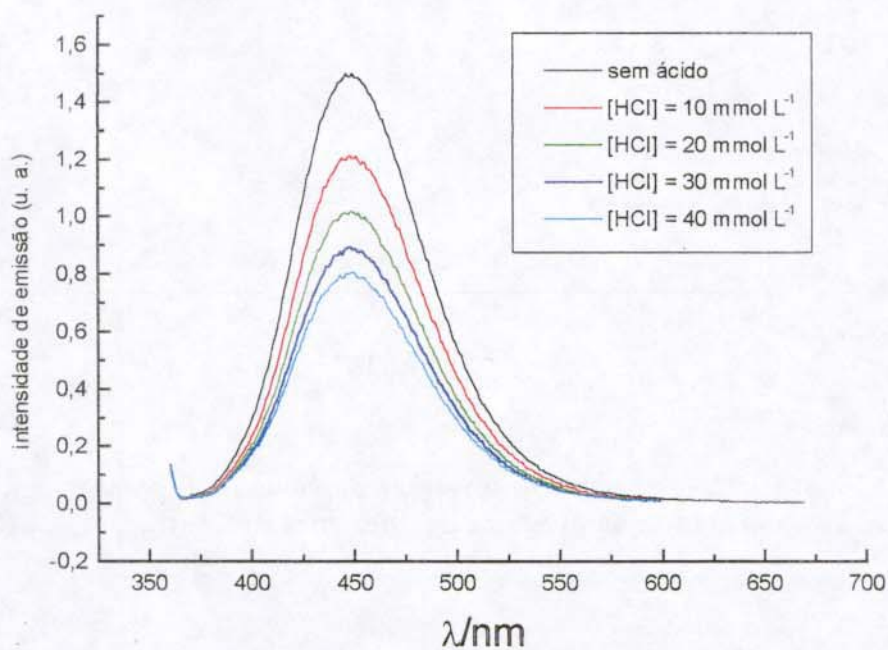


Figura 3.3.11- Espectros de emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$) da violaceína ($[\text{viol}] = 45 \mu\text{mol L}^{-1}$ - em etanol) na presença de diferentes concentrações de HCl.

Pode-se observar que os espectros de absorção e emissão (emissão normal - $\lambda_{\text{máx}} = 690 \text{ nm}$) essencialmente não mudam com a adição de ácido. Já na Figura 3.3.11, constata-se algo bem diferente! Pode-se observar uma diminuição drástica na intensidade de fluorescência ($\lambda_{\text{máx}} = 450 \text{ nm}$) postulada como sendo a do exciplexo. Estes resultados confirmam as hipóteses apresentadas nas figuras 3.3.7 e 3.3.8. Na presença de concentrações mais elevadas de HCl, os equilíbrios do estado excitado encontram-se mais deslocados para a forma não desprotonada da violaceína. Com isto, reduz-se a possibilidade de formação do exciplexo e, em consequência, observa-se uma diminuição da intensidade de fluorescência.

Os deslocamentos dos máximos de fluorescência – em 10 nm para o vermelho – podem ser explicados pela composição do solvente utilizado. Neste experimento com adição de HCl, a violaceína não foi dissolvida em etanol puro, e sim, numa mistura (70:30)% de EtOH e H₂O respectivamente. Sendo a água mais polar, ela estabiliza mais o estado excitado em relação ao fundamental que o etanol – não se deve esquecer que em geral o momento de dipolo é maior no estado excitado. Desta forma, na presença de um solvente mais polar, tem-se uma diminuição do *gap* entre o estado fundamental e o excitado e, em consequência, observa-se um deslocamento dos máximos de fluorescência para o vermelho.

Na Figura 3.3.12 encontram-se os espectros de absorção da violaceína ([viol] = 7,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) dissolvida em solventes de variadas composições.

Três motivos nos levam a atribuir a banda com $\lambda_{\text{máx}}$ em 575 nm à uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$ e, a banda com $\lambda_{\text{máx}} = 370 \text{ nm}$, à uma transição $n \rightarrow \pi^*$. (1) A intensidade de bandas correspondentes à transições $\pi \rightarrow \pi^*$ é maior que as $n \rightarrow \pi^*$ devido ao fato destas últimas serem proibidas pelo requisito de *overlap*.²⁷ (2) Devido à extensa conjugação apresentada pela molécula de violaceína, a transição de menor energia (*i. e.*, àquela que aparece em maior comprimento de onda) seguramente é do tipo $\pi \rightarrow \pi^*$. (3) O aumento da polaridade do solvente resulta no deslocamento, de bandas $\pi \rightarrow \pi^*$, para maiores comprimentos de onda (*bathochromic shift*), enquanto que, as $n \rightarrow \pi^*$, sofrem deslocamentos para menores comprimentos de onda (*hypsochromic shift*).⁴⁰ Este último ponto pode ser visto melhor na Figura 3.3.13.

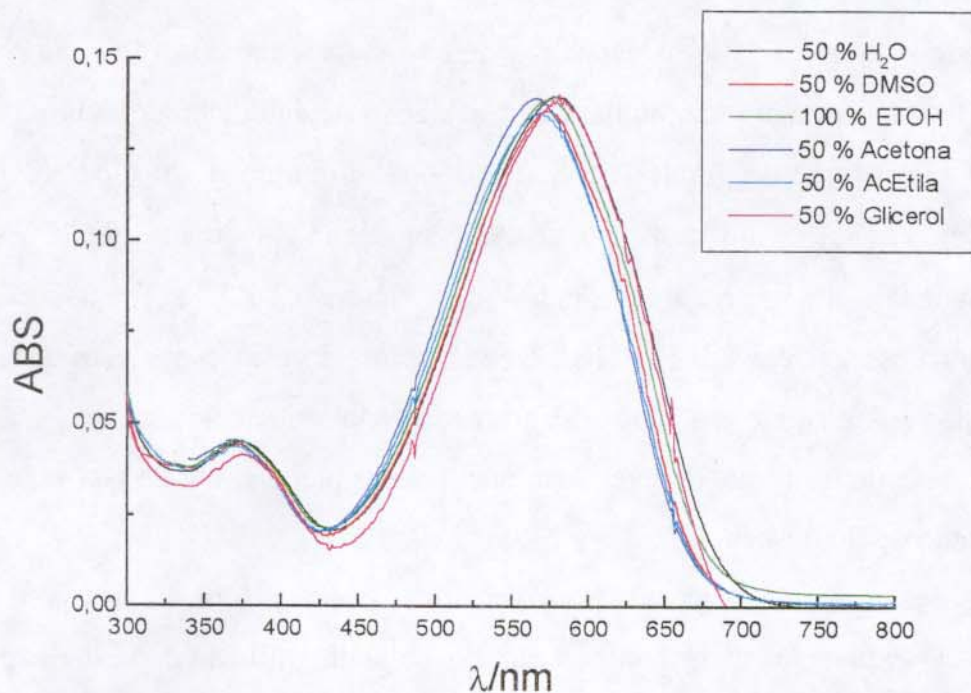


Figura 3.3.12- Espectros de absorção da violaceína ($[viol] = 7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) dissolvida em solventes de seguinte composição: 1) em preto, (50:50)% EtOH:H₂O; 2) em vermelho, (50:50)% EtOH:DMSO; 3) em verde, 100% EtOH; 4) em azul, (50:50)% EtOH:Acetona; 5) em ciano, (50:50)% EtOH:AcEt; 6) em magenta (50:50)% EtOH:Glicerol.

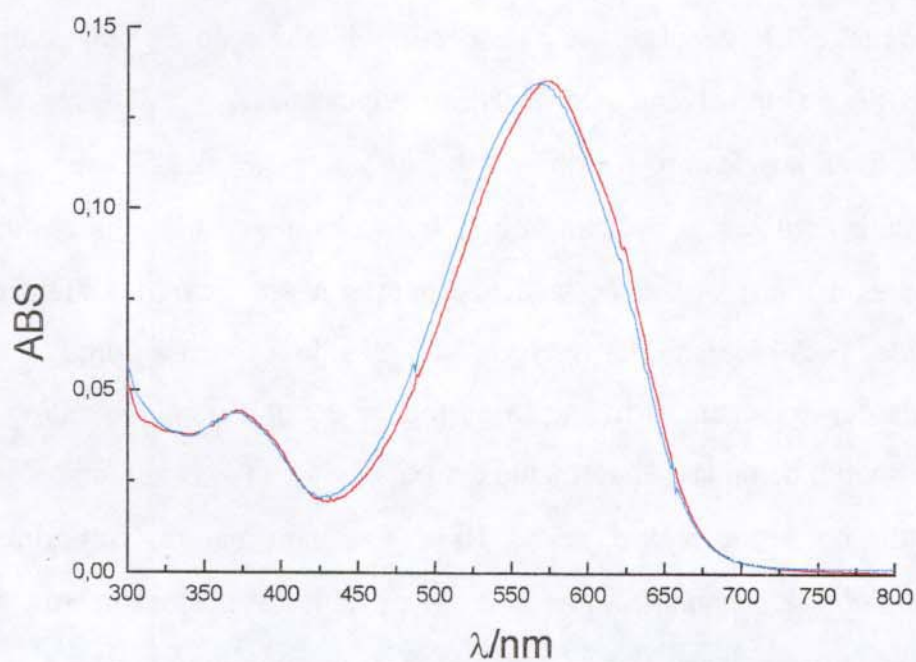


Figura 3.3.13- Sobreposição somente dos espectros em vermelho e ciano da Figura 3.3.12.

Podemos ver que a banda de absorção de menor energia e maior intensidade claramente sofre *bathochromic shift*, indicando que se trata de uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$. Por outro lado, apesar da banda com $\lambda_{\text{máx}} = 370 \text{ nm}$ – atribuída à transição $n \rightarrow \pi^*$ – não sofrer *hypsochromic shift*, ela também não é deslocada para o vermelho. Provavelmente o não deslocamento se deve ao fato das carbonilas estarem conjugadas com o restante da molécula, desta forma, a densidade de carga negativa sobre o oxigênio é superior quando comparada à de carbonilas não conjugadas. Assim, quando da ocorrência da transição $n \rightarrow \pi^*$, que confere uma densidade de carga positiva ao oxigênio, o momento de dipolo da molécula não diminui tanto a ponto do estado $n\pi^*$ não ser o suficientemente estabilizado por um solvente polar para resultar num *hypsochromic shift*.

Para formar o exciplexo, a violaceína tem que ser excitada em torno de 370 nm. Sendo este o comprimento de onda correspondente à transição $n \rightarrow \pi^*$, é de se esperar que os cromóforos - da violaceína – capazes de realizar uma transição $n \rightarrow \pi^*$, se localizem nas regiões da molécula a formarem o exciplexo. Os mecanismos propostos nas figuras 3.3.7 e 3.3.8 mostram exatamente que as regiões da violaceína a formar o exciplexo são àquelas que podem sofrer transições $n \rightarrow \pi^*$. Portanto, esta é mais uma evidência em favor da nossa hipótese.

Outra evidência pode ser vista nos espectros de excitação obtidos. As figuras 3.3.14, 3.3.15, 3.3.16 e 3.3.17, apresentam os espectros de emissão e excitação das mesmas soluções utilizadas para a obtenção dos espectros da Figura 3.3.12.

Os espectros de excitação da Figura 3.3.15 possuem todos o mesmo perfil, indicando que a espécie fluorescente é a mesma (violaceína em S_1). Por outro lado, pode-se observar na Figura 3.3.17 que em diferentes solventes os espectros de excitação apresentam perfis diferentes. Esta é uma forte evidência de que espécies diferentes estão fluorescendo. As espécies diferentes seriam portanto os diferentes tipos de exciplexos formados, sempre entre a violaceína no estado excitado (S_2) e o solvente.

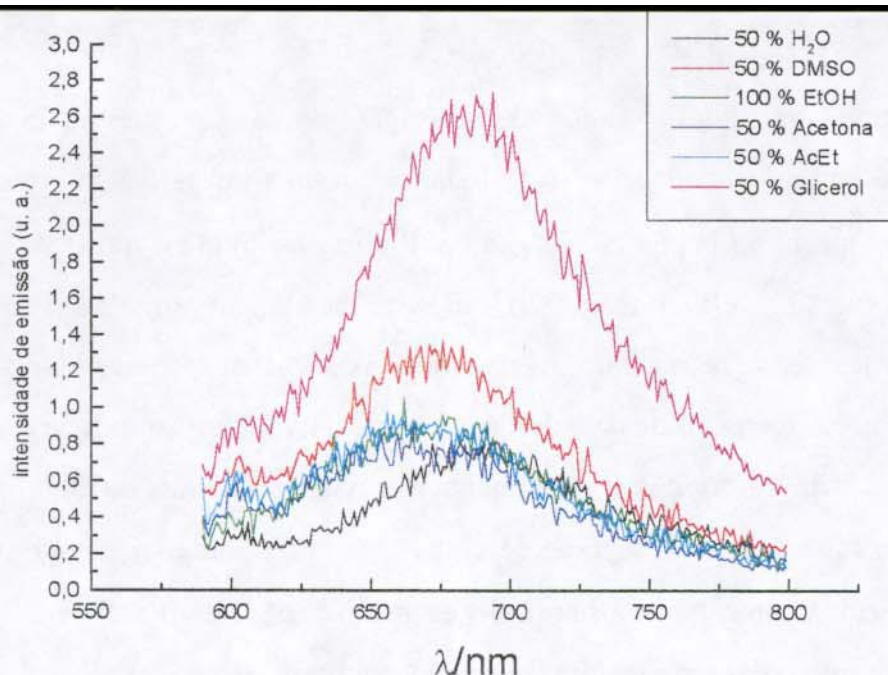


Figura 3.3.14- Espectros de emissão ($\lambda_{exc} = 575 \text{ nm}$) da violaceína ($[\text{viol}] = 7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) dissolvida em solventes de seguinte composição: 1) em preto, (50:50)% EtOH:H₂O; 2) em vermelho, (50:50)% EtOH:DMSO; 3) em verde, 100% EtOH; 4) em azul, (50:50)% ETOH:Acetona; 5) em ciano, (50:50)% EtOH:AcEt; 6) em magenta (50:50)% EtOH:Glicerol.

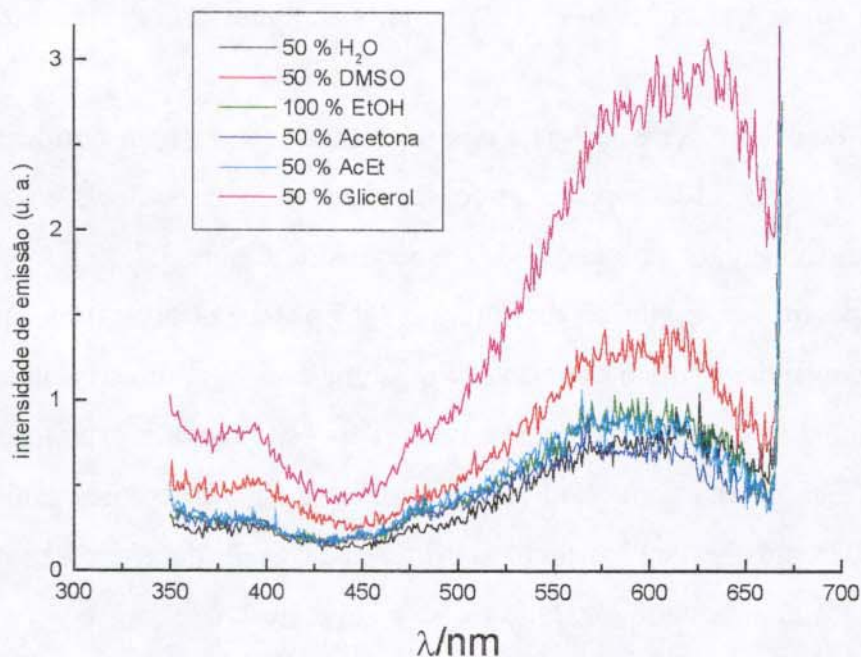


Figura 3.3.15- Espectros de excitação ($\lambda_{emi} = 680 \text{ nm}$) da violaceína ($[\text{viol}] = 7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) dissolvida em solventes de seguinte composição: 1) em preto, (50:50)% EtOH:H₂O; 2) em vermelho, (50:50)% EtOH:DMSO; 3) em verde, 100% EtOH; 4) em azul, (50:50)% ETOH:Acetona; 5) em ciano, (50:50)% EtOH:AcEt; 6) em magenta (50:50)% EtOH:Glicerol.

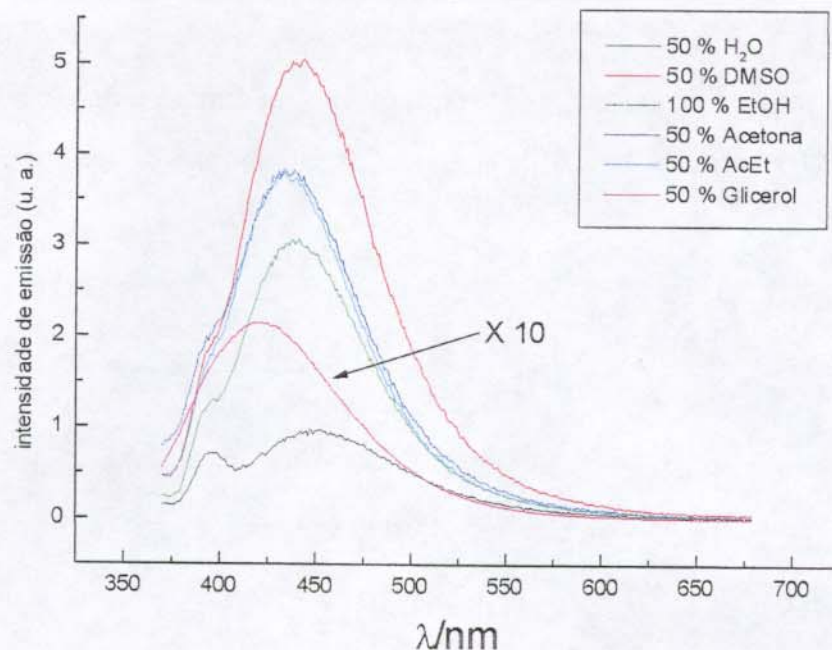


Figura 3.3.16- Espectros de emissão ($\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$) da violaceína ($[\text{viol}] = 7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) dissolvida em solventes de seguinte composição: 1) em preto, (50:50)% EtOH:H₂O; 2) em vermelho, (50:50)% EtOH:DMSO; 3) em verde, 100% EtOH; 4) em azul, (50:50)% ETOH:Acetona; 5) em ciano, (50:50)% EtOH:AcEt; 6) em magenta (50:50)% EtOH:Glicerol.

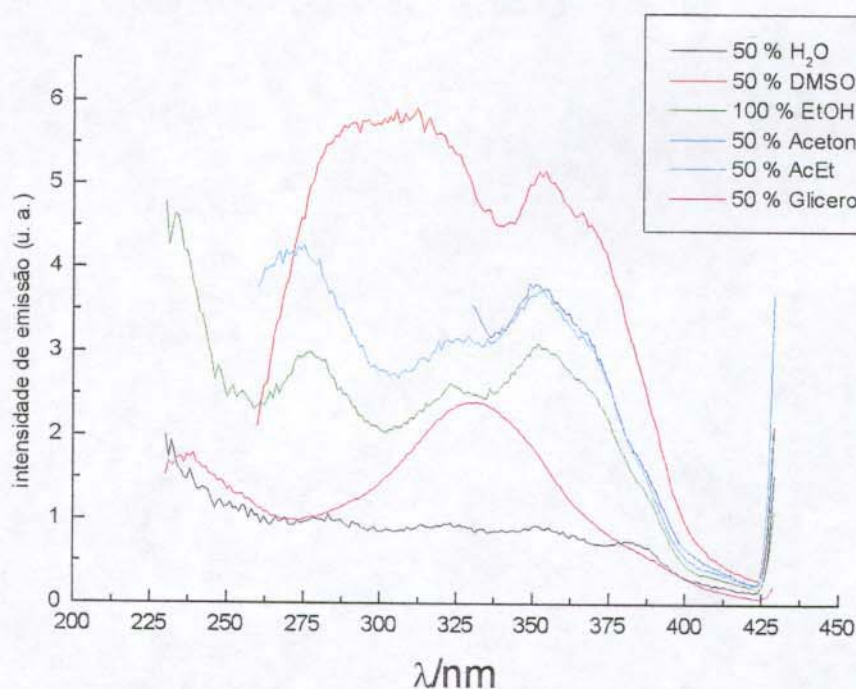


Figura 3.3.17- Espectros de excitação ($\lambda_{emi} = 440 \text{ nm}$) da violaceína ($[\text{viol}] = 7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) dissolvida em solventes de seguinte composição: 1) em preto, (50:50)% EtOH:H₂O; 2) em vermelho, (50:50)% EtOH:DMSO; 3) em verde, 100% EtOH; 4) em azul, (50:50)% ETOH:Acetona; 5) em ciano, (50:50)% EtOH:AcEt; 6) em magenta (50:50)% EtOH:Glicerol.

Por fim, foi realizado um estudo exploratório utilizando a deoxiviolaceína (violaceína sem o grupo OH). Os resultados destes estudos encontram-se nas figuras 3.3.18, 3.3.19 e 3.3.20.

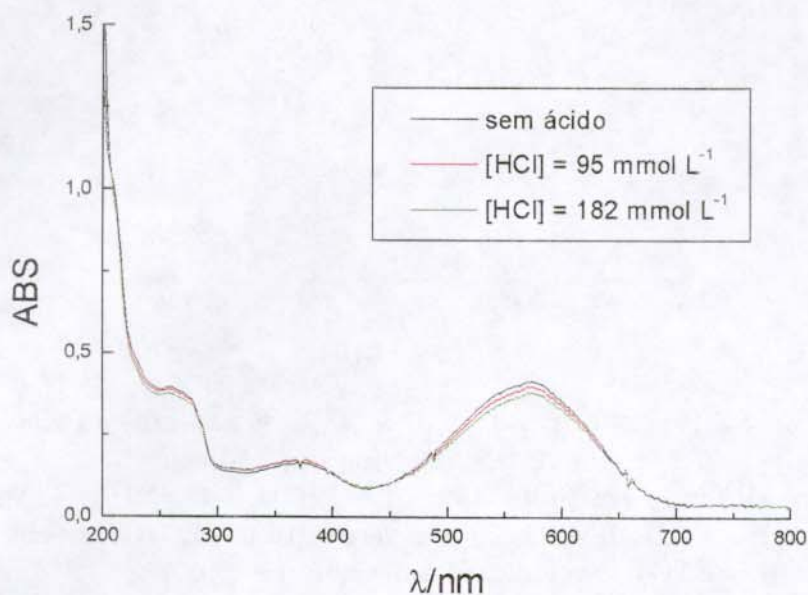


Figura 3.3.18- Espectros de absorção da deoxiviolaceína na presença de diferentes concentrações de HCl.

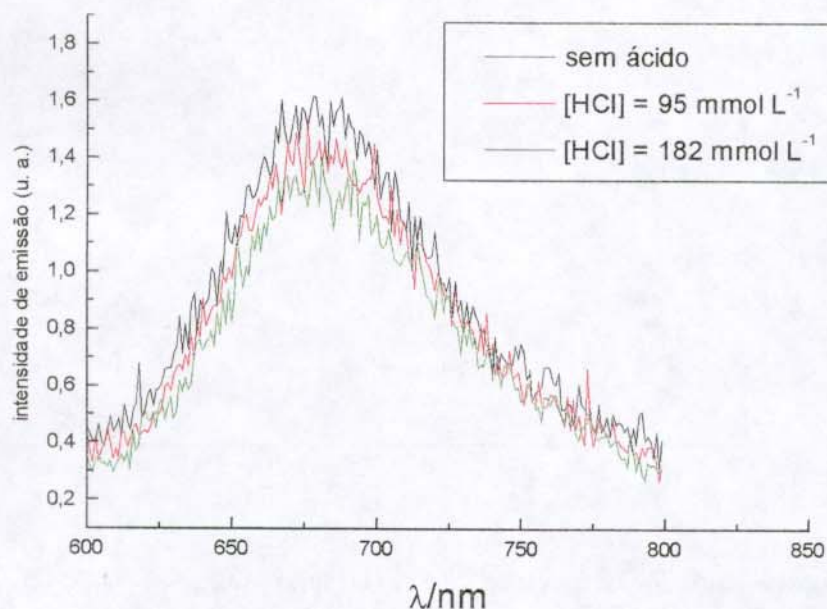


Figura 3.3.19- Espectros de emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 575 \text{ nm}$) da deoxiviolaceína na presença de diferentes concentrações de HCl.

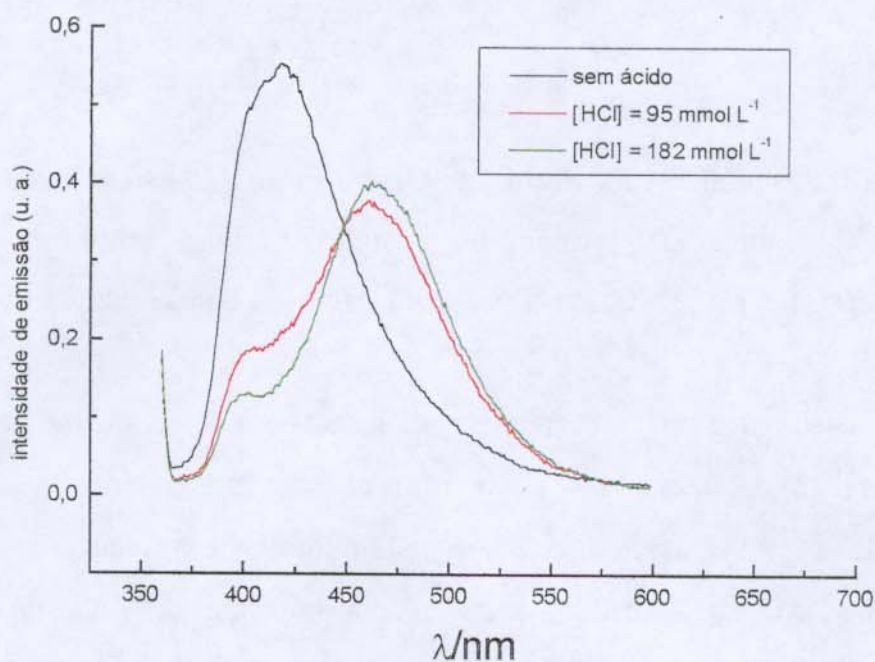
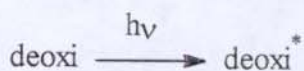


Figura 3.3.20- Espectros de emissão ($\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$) da deoxiviolaceína na presença de diferentes concentrações de HCl.

A deoxiviolaceína apresenta a fluorescência normal $S_1 \rightarrow S_0$ (Figura 3.3.19) e também a fluorescência anômala (Figura 3.3.20). Este resultado é a prova de que o processo de formação do exciplexo não se dá exclusivamente na hidroxila da violaceína. Além disto, com a acidificação, pode-se observar na Figura 3.3.20 uma diminuição na intensidade da banda de fluorescência do exciplexo juntamente com o aparecimento de uma segunda banda em 465 nm. Uma possível forma de interpretar este resultado é através da consideração de um equilíbrio entre a deoxiviolaceína no estado excitado e a deoxiviolaceína protonada também no estado excitado.





Nesta proposta estariam sendo formadas duas espécies no estado excitado: a deoxi^* e a $[\text{deoxi-H}]^*$. Cada uma delas formaria um exciplexo fluorescente e estes seriam diferentes entre si, assim, ficaria justificada a presença das duas bandas de fluorescência da Figura 3.3.20.

Uma questão que poderia ser levantada refere-se à competição entre a desprotonação da violaceína (em S_2) para formar o exciplexo e a conversão interna $S_2 \rightarrow S_1$. Isto porque, se por exemplo a conversão interna $S_2 \rightarrow S_1$ for muito mais rápida que a transferência de próton, não se poderia justificar a transferência de próton da violaceína em S_2 conforme proposto porque, antes que pudesse ocorrer a transferência, a molécula decairia para S_1 . A escala de tempo para uma transferência de próton é de 10^{-12} - 10^{-13} s,⁴¹ e, para a conversão interna, 10^{-11} - 10^{-14} s.⁴² Por apresentarem similares escalas de tempo, ficam portanto viabilizados os mecanismos propostos de transferência de próton – nas figuras 3.3.7 e 3.3.8 – para a formação dos exciplexos.

3.4- Referências e notas

- ¹ Pelczar, M.; Reid, R.; Chan, E. C. S. *Microbiologia*, volume 1; McGraw-Hill do Brasil: São Paulo, 1908; pp. 187-198.
- ² Darnell, J.; Lodish, H.; Baltimore, D. *Molecular Cell Biology*, segunda edição; Scientific American Books: New York, 1990; p. 604.
- ³ Kimmel, K. E.; Maier, S. *Can. J. Microbiol.* **1969**, *15*, 111.
- ⁴ Sneath, P. H. A. Em *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, volume 1; Krieg, N. R.; Holt, J. G. (eds.); Williams & Wilkins: Baltimore, 1984; pp. 580-582.
- ⁵ Hoshino, T.; Takano, T.; Hori, S.; Ogasawara, N. *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 2733.
- ⁶ White, D. *The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes*; Oxford University Press: New York, 1995; pp. 43, 44.
- ⁷ Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, terceira edição; Oxford University Press: Chennai, 1999; pp. 8, 9.
- ⁸ Punchard, N. A.; Kelly, F. J. *Free Radicals – a practical approach*; Oxford University Press: Oxford, 1996; p. 3.
- ⁹ De Azevedo, M. B. M.; Alderete, J.; Rodriguez, J. A.; Souza, A. O.; Rettori, D.; Torsoni, M. A.; Faljoni-Alario, A.; Haun, M.; Durán, N. *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.* **2000**, *37*, 93 (ANEXO 2).
- ¹⁰ Ibidem ref. 7; p. 123.

-
- ¹¹ Pemberton, J. M.; Vincent, K. M.; Penfold, R. J. *Curr. Microbiol.* **1991**, *22*, 355.
- ¹² Bersohn, M.; Baird, J. C. *An Introduction to Electron Paramagnetic Resonance*; W. A. Benjamin: New York, 1966; p. 110.
- ¹³ (a) Calder, A.; Forrester, A. R.; James, P. G.; Luckhurst, G. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 3724. (b) Kothe, G.; Denkel, K-H.; Sümmermann, W. *Angew. Chem. Internat. Edit.* **1970**, *9*, 906. (c) Arnold, D. R.; Humphreys, R. W.; Leigh, W. J.; Palmer, G. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 6225.
- ¹⁴ *General Computer Software and Language Mathematica – Version 1.0 for Windows (Student version)* – 1988-91 Wolfram Research, Inc..
- ¹⁵ (a) Sloan, G. J.; Vaughan, W. R. *J. Chem. Phys.* **1956**, *25*, 697. (b) McConnell, H. M. *J. Chem. Phys.* **1960**, *33*, 115. (c) Breslow, R.; Chang, H. W.; Yager, W. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2033. (d) Rajca, A.; Rajca, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1998**, 1077.
- ¹⁶ Jain, R.; Sponsler, M. B.; Coms, F. D.; Dougherty, D. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1356.
- ¹⁷ De Groot, M. S.; Hesselmann, I. A. M.; Van der Waals, J. H. *Mol. Phys.* **1965**, *10*, 241.
- ¹⁸ Urbano, R. R., Tese de Mestrado, Instituto de Física “Gleb Wataghin”, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2000.
- ¹⁹ Barltrop, J. A.; Coyle, J. D. *Excited States in Organic Chemistry*; John Wiley & Sons: London, 1975; p. 39.

-
- ²⁰ (a) Klemchuck, P. P. *Ullmanns Encyclopedia of Industrial Chemistry*, volume A3; VCH: Weinheim, 1985; p. 94. (b) Teguo, P. W.; Fauconneau, B.; Deffieux, G.; Huguet, F.; Vercauteren, J.; Mérillon, J-M. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61*, 655.
- ²¹ Leffler, J. E. *An Introduction to Free Radicals*; John Wiley & Sons: New York, 1993; p. 18-20.
- ²² Ibidem ref. 12; p. 43.
- ²³ Poole Jr, C. P. *Electron Spin Resonance – A Comprehensive Treatise on Experimental Techniques*; Interscience Publishers: New York, 1967; pp. 544, 814.
- ²⁴ Wasserman, E.; Snyder, L. C.; Yager, W. A. *J. Chem. Phys.* **1964**, *41*, 1763.
- ²⁵ Rettori, D.; Durán, N. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **1998**, *14*, 685 (ANEXO 1).
- ²⁶ Gaussian 94, Revisão B.3: Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Gill, P. M. W.; Johnson, B. G.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Keith, T.; Petersson, G. A.; Montgomery, J. A.; Raghavachari, K.; Al-Laham, M. A.; Zakrzewski, V. G.; Ortiz, J. V.; Foresman, J. B.; Peng, C. Y.; Ayala, P. Y.; Chen, W.; Wong, M. W.; Andres, J. L.; Replogle, E. S.; Gomperts, R.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Binkley, J. S.; Defrees, D. J.; Baker, J.; Stewart, J. P.; Head-Gordon, M.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. Gaussian, Inc.; Pittsburgh, PA; 1995.
- ²⁷ Turro, N. J. *Molecular Photochemistry*; W. A. Benjamin: New York, 1967; p. 27.
- ²⁸ Huang, R. L.; Goh, S. H.; Ong, S. H. *The Chemistry of Free Radicals*; Edward Arnold (Publishers): London, 1974; p. 14.
- ²⁹ Ibidem ref. 21; p. 41.

-
- ³⁰ Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*; University Science Books: Sausalito, 1991; p. 371.
- ³¹ Higuchi, J.; Fujisawa, M.; Yokoyama, Y.; Yagi, M. *J. Photochem. Photobiol. A* **1999**, *124*, 53.
- ³² Solomons, T. W. G.; Fryhle, C. B. *Organic Chemistry*, sétima edição; John Wiley & Sons: New York, 2000; p. 434.
- ³³ (a) Calvert, J. G.; Pitts Jr, J. N. *Photochemistry*; John Wiley & Sons: New York, 1966; p. 314. (b) Allen, N. S.; McKellar, J. F. *Photochemistry of Dyed and Pigmented Polymers*; Applied Sciences Publishers: London, 1980; p. 41.
- ³⁴ (a) Viswanath, G.; Kasha, M. *J. Chem. Phys.* **1956**, *24*, 574. (b) Ibidem ref. 30; p. 148.
- ³⁵ Rettori, D.; Dias Jr, L. C.; Alderete, J. B.; Azevedo, M. B. M.; Pessine, F. B. T.; Durán, N. *Photophysical studies of 5-hydroxyindol and violacein – 14th International Conference on Physical Organic Chemistry* (Florianópolis, Brasil) **1998**, p. 41.
- ³⁶ Hershberger, M. V.; Lumry, R.; Verrall, R. *Photochem. Photobiol.* **1981**, *33*, 609.
- ³⁷ (a) Wyman, G. M.; Zarnegar, B. M. *J. Phys. Chem.* **1973**, *77*, 1204. (b) Kobayashi, T.; Rentzepis, P. M. *J. Chem. Phys.* **1979**, *70*, 886. (c) Prieto, F. R.; Novo, M.; Herbón, J. A. D.; Rodríguez, B. F. *Educ. Chem.* **1992**, *29*, 139.
- ³⁸ Dias Jr, L. C.; Da Motta Neto, J. D.; Rettori, D.; Durán, N. *J. Mol. Struct. (Theochem)* **2000**, submetido (ANEXO 3).
- ³⁹ Lumry, R.; Hershberger, M. *Photochem. Photobiol.* **1978**, *27*, 819.

⁴⁰ Reichardt, C. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*, segunda edição; VCH: Weinheim, 1990; pp. 302-305.

⁴¹ (a) Ibidem ref. 30; p. 7. (b) Suppan, P. *Chemistry and Light*; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1994; p. 267.

⁴² (a) Cowan, D. O.; Drisko, R. L. *Elements of Organic Photochemistry*; Plenum Press: New York, 1976; p. 8. (b) Rauk, A. *Orbital Interaction Theory of Organic Chemistry*; John Wiley & Sons: New York, 1994; p. 216.

4- Conclusões

1. Os experimentos microbiológicos (item 3.1) indicam que muito possivelmente a violaceína seja uma molécula que atua como antioxidante protegendo a *Chromobacterium violaceum* do estresse oxidativo. Quanto maior a tensão de oxigênio dissolvido no meio de cultura, isto é, quanto maior o estresse oxidativo sofrido pelas células, maior é a produção de violaceína. Por outro lado, experimentos com adição de catalase ao meio de cultura apresentaram uma diminuição na produção de violaceína devido à supressão do estresse oxidativo causada pela catalase adicionada.
2. Já foi demonstrado que a violaceína possui capacidade antioxidante (ANEXO 2). Nossos estudos de RPE (item 3.2) mostraram que a violaceína possui, no estado sólido, um estado excitado triplete (forma dirradicalar) muito próximo do estado fundamental ($\Delta E = 0,71 \text{ kcal mol}^{-1}$). Para ser considerado um bom antioxidante uma molécula precisa satisfazer a condição de possuir uma forma radicalar estável, logo, estes estudos de RPE suportam a hipótese da violaceína ser um antioxidante porque os sinais de RPE obtidos são estáveis, indicando que a violaceína possui uma forma radicalar estável.
3. Os estudos de absorção e emissão eletrônica (item 3.3) mostram que a violaceína é uma molécula que possui propriedades fotofísicas interessantíssimas. A fluorescência anômala descoberta foi atribuída à um exciplexo formado entre a violaceína (no segundo estado excitado singlete - S_2) e o solvente.

ANEXO 1

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

D. Rettori and N. Durán*

A procedure for the production, extraction, and purification of violacein was developed using *Chromobacterium violaceum* (CCT 3496) cultivated on cotton, in modified 1 litre Roux bottles. A surface tray bioreactor was built to perform these experiments. Violacein was extracted with commercial ethanol, and purified by filtration, Soxhlet extraction, crystallization and high performance liquid chromatography. The violacein was analysed and identified by proton and carbon-13 NMR spectroscopies, thermogravimetric analysis, mass spectrometry, UV-VIS spectroscopy and infrared spectroscopy. It was concluded that the product was highly purified violacein.

Key words: Antibiotic, bioreactor, *Chromobacterium violaceum*, pigment, violacein.

Chromobacterium violaceum is a Gram-negative, facultatively anaerobic, rod-shaped bacterium (Kaufman *et al.* 1986). It is a common saprophyte found in water and soil from tropical and subtropical regions of the world, and is generally considered to be non-pathogenic (Ponte & Jenkins 1992).

Violacein (Figure 1), the major pigment produced by this bacterium, is a bactericide (Lichstein & Van de Sand 1945; Durán *et al.* 1983), a trypanocide (Caldas *et al.* 1978; Durán *et al.* 1994), a tumoricide (Durán *et al.* 1996) and in addition it has anti-viral activity (May *et al.* 1991).

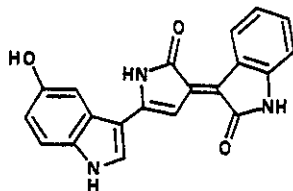


Figure 1. Molecular structure of violacein (molecular mass = 343.34).

The authors are with Instituto de Química, Laboratório de Química Biológica, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6154, Campinas, CEP 13.083-970, SP, Brazil; fax: (+55) 19 789 3023. *Corresponding author.

© 1998 Rapid Science Publishers

In this work we describe, in detail, a simple methodology to obtain highly purified violacein.

Materials and Methods

Microbial Production

Four ml (but less is possible) of a suspension of *C. violaceum* CCT 3496 (grown for 12 h at 30 °C on an orbital shaker at 120 rev/min) were inoculated into 400 ml of liquid medium (0.5% D-glucose; 0.5% peptone; 0.2% yeast extract) in a 2000 ml Erlenmeyer flask. Two inoculated flasks were incubated at 30 °C for 12 h on an orbital shaker at 120 rev/min. Then, suspensions of *C. violaceum* were inoculated onto eight nonsterilized cotton carpets (90 ml/carpet). Each carpet (approximately 10 × 20 × 0.5 cm) was inside a non-sterilized one litre modified Roux bottle (i.e. one carpet per bottle). The eight bottles were incubated at 30 °C for 24 h in a surface tray bioreactor (Rettori & Durán 1997) without aeration. After this time, the cotton attains a bright violet color due to intracellular production of violacein by the bacteria. If production is not attained, aeration of the system is necessary. The modification of the Roux bottles was simply a hole of ≈6 cm in diameter in order to facilitate the insertion and removal of the cotton carpets.

Extraction and Purification

The removed cotton carpets were all squeezed together to eliminate excess medium and then washed twice with distilled water. The violacein was extracted twice with 500 ml of commercial ethanol. The ethanolic solution was filtered and then evaporated under reduced pressure, yielding ≈750 mg of crude

extract. This mass underwent Soxhlet purification firstly with chloroform (quantitatively), secondly with diethyl ether (for 3–4 h) and thirdly (extraction of violacein) with ethanol (almost quantitatively). Evaporation of the ethanol under reduced pressure gave ~40 mg of a semi-purified extract, which was purified further by crystallization with the solvent pair methanol/water. The crystals were harvested by centrifugation and dried at 100 °C for 24 h. Approximately 10 mg were obtained. Finally, these 10 mg were purified by high performance liquid chromatography (HPLC) (with a Waters, model PREP. LC 4000 System) using the following conditions: flow = 7.0 ml/min; stationary phase = DELTA PAK C18 preparative column (30 mm x 30 cm), with pores of 100 Å and particles of 15 µm in diameter; column temperature = room temperature (~23 °C); moving phase = 75% methanol: 25% H₂O (% in volume); detector wavelength = 230 nm; chart speed = 0.5 cm/min. Four injections of a saturated ethanolic solution (previously filtered with 0.5 µm pore diameter size filter) of these 10 mg were made (~1.5 ml each injection) to the HPLC. The fraction collected for each injection had initial elution time of 26 min and final elution time of 34 min (Figure 2). The solution was evaporated under reduced pressure until violacein crystals in water remained. These were harvested by centrifugation and dried at 100 °C for 24 h. Approximately 1 mg violacein was obtained.

Characterization and Analysis

Violacein was characterized and analysed by: proton (300 MHz) and carbon-13 (75 MHz) NMR spectroscopies (with a Varian, model GEMINI 300) (Figures 3 and 4 respectively); thermogravimetric analysis (TGA) (with a TA Instrument, model HI-RES TGA 2950) (Figure 5); mass spectrometry (with a Hewlett Packard, model HP 5988A) (Figure 6); ultraviolet-visible (UV-VIS) spectroscopy (with a Hitachi, model U-2000) (Figure 7); and infrared (IR) spectroscopy (with a Perkin-Elmer FT-IR, model 16 PC) (Figure 8).

Results and Discussion

The Soxhlet purification step with chloroform extracts cell wall and membrane residuals (Melo 1996). The Soxhlet step with diethyl ether solubilizes deoxy-violacein, the minor pigment produced by *C. violaceum* (Durán *et al.* 1983). A small fraction of violacein is lost in

this diethyl ether extraction step and therefore this extraction was limited to 3–4 h.

In Figure 2 (chromatogram corresponding to the HPLC purification step), it can be seen that the fraction collected consists of two peaks (30.14 and 32.62 min). In principle each peak could be attributed to different compounds, but since the NMR spectrum of a sample containing both peaks revealed the existence of a highly purified violacein, all the collected fraction corresponds to violacein. From fluorescence spectroscopy (Rettori 1996) it was concluded that both peaks were due to violacein but that each one corresponded to violacein molecules in different aggregation states.

Comparing our NMR spectra (Figures 3 and 4) with the data in the literature (Hoshino *et al.* 1987) it can be seen that this procedure leads to highly purified violacein. In Figure 3, the peak at 0 ppm corresponds to

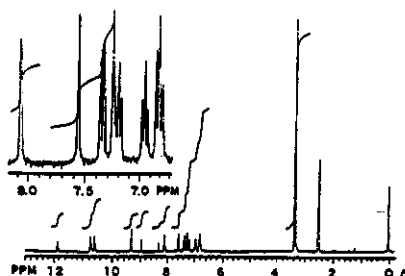


Figure 3. NMR-¹H spectrum of violacein dissolved in DMSO-*d*₆ with an aliquot of CDCl₃ containing TMS.

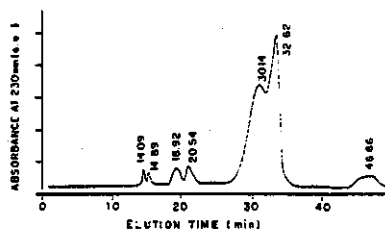


Figure 2. Chromatogram from a sample (1.5 ml) of saturated ethanolic solution of violacein purified by crystallization.

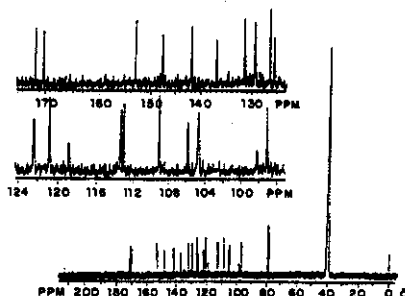


Figure 4. Decoupled NMR-¹³C spectrum of violacein dissolved in DMSO-*d*₆ with an aliquot of CDCl₃ containing TMS.

tetramethylsilane (TMS): at 2.5 ppm to the residual protons of perdeuterated dimethyl sulphoxide (DMSO); at 3.3 ppm to water; and at 8.3 ppm to chloroform. In Figure 4, the peak at 0 ppm corresponds to TMS; at 39 ppm to DMSO- d_6 ; and at 79 ppm to chloroform. However, two unidentified peaks are still observed at 1.25 ppm (Figure 3) and 98.2 ppm (Figure 4). These two peaks are of small intensity and they were attributed to non-significant impurities. The water peak is very intense because DMSO is hygroscopic. However, to determine if this violacein is hydrated or not, a TGA was carried out.

In Figure 5 the thermogram shows a first loss of mass at 170 °C. This is strong evidence that violacein is free of water, otherwise a loss of mass at a lower temperature would be expected. The transition at 386 °C is due to decomposition of violacein (Perkampus *et al.* 1971; Bycroft 1988).

The mass spectrum (Figure 6) shows the molecular ion $m/z = 343$; the UV-VIS spectrum (Figure 7) shows strong absorption at the visible region due to resonance of violacein; and the IR spectrum (Figure 8), according to the literature (Laatsch *et al.* 1984; Riveros *et al.* 1988), presents stretching bands at 1680 and 1655 cm^{-1} due to C=O bonds and a stretching band at 1610 cm^{-1} due to the C=C bond.

Concluding Remarks

The use of the surface tray bioreactor, the modified Roux bottles and the cotton carpets greatly facilitates the handling, by the operator, of all steps related to the production and extraction of violacein. Production is inexpensive, achieved in short periods of time (≈ 24 h), and yields highly purified violacein.

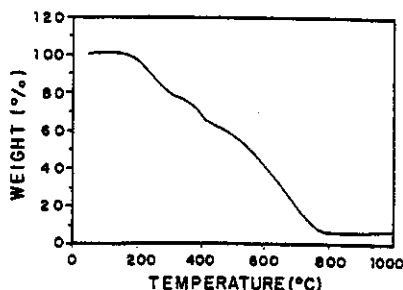


Figure 5. Thermogram of 0.9410 mg of violacein: heating rate = 10 °C/min; argon flow = 100 ml/min.

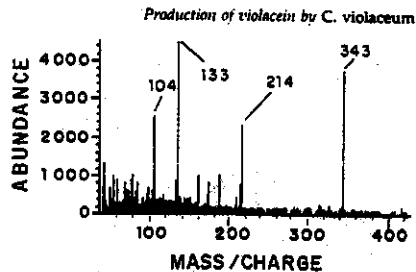


Figure 6. Mass spectrum of violacein; electrons energy = 70 eV; temperature of probe = 250 °C.

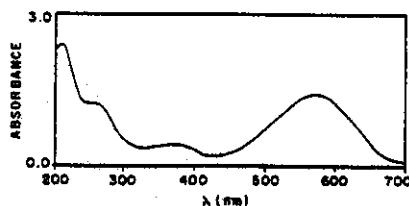


Figure 7. UV-VIS spectrum of violacein in ethanol (51.9 µg/ml); a quartz 1 ml cuvet with path length of 1 cm was used.

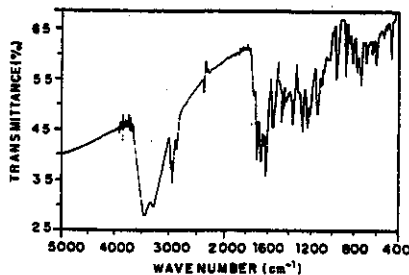


Figure 8. IR spectrum of violacein (KBr pellet).

Acknowledgements

The authors wish to thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Brasília, DF, Brazil) for their financial support, and the Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia 'André Tosello' (Campinas, SP, Brazil) for kindly providing the reference strain. We also thank professor Fred Yukio Fujiwara for a critical reading of the manuscript.

References

- Pycroft, B.W. 1988 *Dictionary of Antibiotics and Related Substances*. London: Chapman and Hall, pp. 733.
- Galdas, L.R., Leitão, A.A.C., Santos, S.M. & Tyrrell, R.M. 1978 Preliminary experiments on the photobiological properties of violacein. In *Proceedings of International Symposium on Current Topics in Radiology and Photobiology*, ed. Tyrrell, R.M. pp. 121-126. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências.
- Durán, N., Erazo, S. & Campos, V. 1983 Bacterial chemistry-II: antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 85, 231-234.
- Durán, N., Antonio, R.V., Haun, M. & Pili, R.A. 1994 Biosynthesis of a trypanocide by *Chromobacterium violaceum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10, 686-690.
- Durán, N., Melo, P.S. & Haun, M. 1996 In vitro evaluation of violacein on AIDS-related lymphoma and human tumor cell lines. In *XXV Annual Meetings of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology*, pp. 150. Caxambu: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBeq).
- Hoshino, T., Kondō, T., Uchiyama, T. & Ogasawara, N. 1987 Biosynthesis of violacein: a novel rearrangement in tryptophan metabolism with a 1,2-shift of the indole ring. *Agricultural and Biological Chemistry* 51, 945-948.
- Kaufman, S.C., Ceraso, D. & Schugurensky, A. 1986 First case report from Argentina of fatal septicemia caused by *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Clinical Microbiology* 23, 996-998.
- Laatsch, H., Thomson, T.H. & Cox, P.J. 1984 Spectroscopic properties of violacein and related compounds: crystal structure of tetramethylviolacein. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions II*, 1331-1339.
- Lichstein, H.C. & Van de Sand, V.F. 1945 Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Infectious Diseases* 76, 47-51.
- May, C., Brümmer, B. & Ott, H. 1991 Verfahren zur Isolierung von violacein und seine Verwendung zur prophylaxe und therapie von tiererkrankungen. Deutsches Patentamt Offenlegungsschrift DE 3,935,066 (CLC12P17/16), 25 April 1991, Application, 20 October 1989, 5pp.
- Melo, P.S. 1996 Pigmentos obtidos de *Chromobacterium violaceum* e *Serratia marcescens*. Propriedade tripanocida da prodigiosina e estudos toxicológicos. Masters Thesis. Biology Institute, Campinas State University, Campinas, SP, Brazil.
- Perkampus, H.H., Sandeman, I. & Timmons, C.J. 1971 *UV Atlas of Organic Compounds*. London: Butterworth, Vol. 5, spectrum number 5812.
- Ponte, R. & Jenkins, S.G. 1992 Fatal *Chromobacterium violaceum* infections associated with exposure to stagnant waters. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 11, 883-886.
- Rettori, D. 1996 Produção, extração e purificação da violaceína: um antibiótico produzido pela *Chromobacterium violaceum*. Masters Thesis. Chemistry Institute, Campinas State University, Campinas, SP, Brazil.
- Rettori, D. & Durán, N. 1997 Um biorreator de proteínas para superfícies (BPS) para a produção de um metabolito bacteriano. Brazilian Patent PI9702966-6.
- Riveros, R., Haun, M., Campos, V. & Durán, N. 1988 Bacterial Chemistry-IV. Complete characterization of violacein: an antibiotic and trypanocide pigment from *Chromobacterium violaceum*. *Arquivos de Biologia e Tecnologia (Brazil)* 31, 475-487.

(Received in revised form 7 January 1998; accepted 22 January 1998)

ANEXO 2



Biological Activities of Violacein, a New Antitumoral Indole Derivative, in an Inclusion Complex with β -Cyclodextrin

MARIÂNGELA B. M. DE AZEVEDO¹, JOEL ALDERETE², JAIME A. RODRIGUEZ³, ANA O. SOUZA¹, DANIEL RETTORI¹, MARCIO A. TORSONI¹, ADELAIDE FALJONI-ALARIO⁴, MARCELA HAUN³ and NELSON DURÁN^{1,*}

¹Instituto de Química, Biological Chemistry Laboratory; ²Organic Chemistry Department, Universidad de Concepción Concepcion, Chile; ³Instituto de Biología, Biochemistry Department, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6154, CEP 13083-970, Campinas-S.P., Brazil; ⁴Biochemistry Department, Universidade de São Paulo, S.P., Brazil

(Received: 26 January 1999; in final form: 22 April 1999)

Abstract. Violacein is a poorly water-soluble antitumoral and antibacterial drug. The solubility can be enhanced by complexation with β -cyclodextrin. The inclusion complex was prepared by the co-precipitation method in molar ratios of 1:1 and 1:2 of violacein/ β -cyclodextrin, respectively. The acute toxicity (*E. coli* strain) of violacein did not change up to 400 μ M, either in the presence or absence of cyclodextrin. Cytotoxicity (V-79 cell culture) through DNA and MTT assays was significantly decreased in the presence of the 1:2 molar ratio complex. Studies on erythrocyte lipid peroxidation by the thiobarbituric acid (TBA) method showed that violacein and violacein/ β -CD (1:2) at 100 μ M cause 50% and 80% inhibition, respectively. At 500 μ M the violacein/ β -CD complex inhibited lipid peroxidation completely; however, with free violacein only 65% inhibition was reached at that concentration.

Key words: inclusion complex, violacein, β -cyclodextrin, toxicity, cytotoxicity, antioxidant.

1. Introduction

The natural cyclodextrins (CDs) have been extensively studied to improve certain properties of drugs, such as solubility, stability, and/or bioavailability [1–6]. The enhancement of drug activity or the reduction of side effects can be achieved by inclusion complex formation. Recent studies show that cyclodextrin complexation results in enhanced drug delivery to the membranes and, consequently, enhanced drug bioavailability [7]. Formulations using Glibenclamide/ β -CD [8], Griseofulvin [9] and Clotrimazole [10] improved their biological activities due to their solubility

* Author for correspondence: Dr. Nelson Durán, Instituto de Química, Biological Chemistry Laboratory, Universidade Estadual de Campinas, C. P. 6154, CEP 13083-970, Campinas, Brazil. Fax: +55-19-788-3023; E-mail: duran@iqm.unicamp.br

Violacein (1)

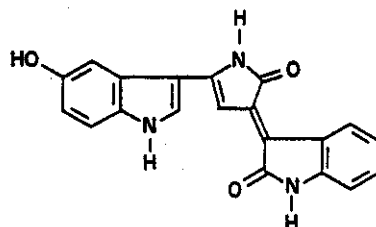


Figure 1. The violacein structure.

by complexation with β -CD. Very few studies relating to indole derivatives and inclusion complexes with β -CD have been published [11, 12].

The formation of inclusion compounds between violacein and β -CD was studied by diffusion measurements and circular dichroism. The results of the two experiments were in good concordance with the formation of 1:1 and 1:2 complexes. The size of molecules involved was monitored using diffusion coefficient and circular dichroism measurements and computational calculations indicated a preference for the inclusion of the most polar part of the molecule to form the 1:2 inclusion complex [13].

Violacein (3-[1,2-dihydro-5-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)-2-oxo-3H-pyrrol-3-ilydene]-1,3-dihydro-2H-indol-2-one) (Figure 1) was isolated from the Amazon river, Manaus, Amazon State, in Brazil, characterized and purified as described recently [14].

Violacein exhibited trypanocidal [15, 16], antibiotic [17] and antitumoral activities [18–20]. Its toxicity was also studied [16]. After *in vitro* testing in a panel cell line by the National Cancer Institute Developmental Therapeutics Program, the response parameter IG_{50} (50% growth inhibition) for ovarian cancer IGROV1 (0.62×10^{-8} M), non-small cell lung cancer NCI-H460 (0.58×10^{-8} M) and colon cancer KM12 (0.27×10^{-9} M) were found [18, 20].

Due to several biological activities of violacein and the inclusion complex previously demonstrated with β -CD [13], the aim of the present paper is to study any improvement of its solubility, enhancement of its biological activities as an antioxidant and the diminution of its toxicity through violacein/ β -CD inclusion complex formation. The aim is to apply this new formulation as an antitumor drug and to explore the feasibility of the carrier in reducing the toxicity and enhancing the antitumor efficacy of violacein.

2. Materials

β -Cyclodextrin was purchased from SIGMA Chemical Co. and was used as received. Violacein was prepared and purified as previously published [14].

The violacein/ β -CD inclusion complex was prepared as previously published [13] as follows: a stock solution of β -CD (10^{-3} M) was prepared with distilled water and dilutions were made from this stock solution to obtain the different desired concentrations. A stock solution of violacein (10^{-3} M) in 0.003% DMSO in pure ethanol was added to aliquots of the β -CD solution to give the desired final concentration.

3. Methods

3.1. CYTOTOXICITY ASSAYS

(a) *Cell culture.* Chinese hamster V-79 lung fibroblasts were grown as previously reported [15, 21, 23].

(b) *Cell growth.* Cells were seeded at 3×10^4 cells/mL in the wells of 24-well plates and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Forty-eight hours later, semiconfluent cultures were exposed to the test at eight different concentrations ranging from 0 to 5 μ M for violacein or the complex with β -CD. Control experiments with the same amount of β -CD in the 0 to 5 μ M range were carried out. The cells were washed twice with PBS solution (the PBS solution contained 0.14 M NaCl; 3.36×10^{-3} M KCl; 8.10×10^{-3} M Na₂HPO₄; 1.84×10^{-3} M KH₂PO₄; 1.26×10^{-3} M CaCl₂ and 0.53×10^{-3} M MgCl₂; pH = 7.2). The cells were then fixed with trichloroacetic acid and submitted to alkaline hydrolysis (0.5 M NaOH). The absorbance of the lysate was recorded at 260 nm in order to quantify nucleic acid. The IC₅₀ corresponds to the drug concentration which caused a 50% decrease of DNA content

(c) *Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) is used to assess the mitochondrial dehydrogenase activity of viable cells* [22]. MTT assay: V-79 cells (3×10^4 cells/mL) were seeded in 24 well plates and incubated until semiconfluence. The culture medium was removed and replaced with a medium containing violacein (0–5 μ M) or in the presence of β -CD. The cells were incubated for an additional 24 h and the culture medium was removed and replaced with a medium containing 0.5 mg/mL of MTT and incubated for 5 h. The culture medium was removed and 1 mL of ethanol was added to each well to solubilize the formazan formed. The plates were gently shaken for 10 minutes and the absorbance was measured at 570 nm [24].

3.2. ACUTE TOXICITY ASSAY

Escherichia coli (ATCC 25922 strain) was used in the acute toxicity assay and the method for determination of bacterial cytotoxicity by flow injection analysis [25] proved to be a reliable and rapid assessment of the toxicity of the compounds by analyzing the alteration of the amount of CO₂ produced and trapped in the culture medium.

3.3. ANTIOXIDANT CAPACITY ASSAY

Studies on erythrocyte lipid peroxidation were carried out by the thiobarbituric acid (TBA) method. This method measures the malonaldehyde content [26]. The red cells were twice washed in 50 times their volume of buffered saline. After the second washing the packed-cell volume (PCV) was adjusted to 2.5%. The cell suspension was pre-incubated at 37 °C for 1 h in a shaking water bath. The suspending medium was removed by centrifugation and the cells were resuspended in fresh buffered saline. The PCV was adjusted to 1 mM of the basis of hemoglobin estimation. Buffered saline solutions of the same pH were used throughout. The final cell suspension (1 mM Hb) was exposed to tert-butylperoxide (1 mM) for 30 min. The same experiments in different concentrations with violacein (0–600 µM) and in the presence of violacein/β-CD were carried out.

Lipid peroxidation was measured indirectly by measuring malonaldehyde (MDA) concentrations. To 4 mL of cell suspension 2 mL trichloroacetic acid (final conc. 12.5%) was added and the mixture was centrifuged. An aliquot (4 mL) of the supernatant was transferred to a boiling tube fitted with an air condenser and 1 mL of thiobarbituric acid solution (1%) was added. The mixture was placed in a boiling-water bath for 15 min then immediately cooled under tap water. The absorption at 532 nm was measured (ϵ mM = 156). The malonaldehyde concentrations were expressed in nmol MDA per g hemoglobin [26].

4. Results and Discussion

Chromobacterium violaceum is a gram-negative bacterium found in samples of water and soil from tropical and subtropical regions of the world. Violacein, a major pigment produced by this bacterium, exhibited several biological activities as mentioned before. Growth curves of *C. violaceum* at 10% and 50% of dissolved oxygen tension were obtained [27]. Violacein production per bacterium started and had a peak at the exponential growth phase, with a 3-fold higher production in the 50% than the 10% experiment. In the presence of either catalase or ascorbic acid the violacein production underwent a 2 h delay. These results indicate that violacein was an antioxidant produced by *C. violaceum* for autoprotection against reactive oxygen species that were responsible for cellular oxidative damage [27].

In order to understand this phenomenon, studies on erythrocyte lipid peroxidation by the TBA method were carried out. This study showed that violacein

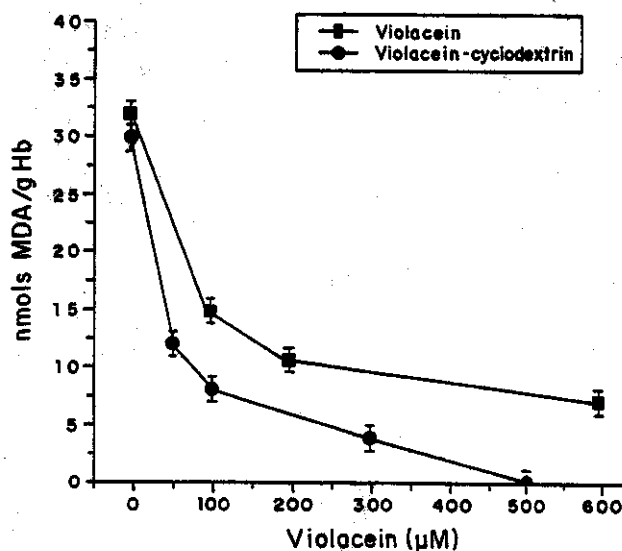


Figure 2. The effect of different concentrations of violacein (—■—) and violacein/ β -cyclodextrin (1:2) molar ratio (—●—) on tert-butylperoxide (1 mM)-induced autooxidation. Pre-incubation time 30 min, pH 7.4, at 37 °C.

and violacein/ β -CD (1:2) at 100 μ M caused 50% and 80% inhibition of lipid peroxidation, respectively (Figure 2). At 500 μ M the violacein/ β -CD completely inhibited lipid peroxidation, but with free violacein at this concentration, only 65% inhibition was reached. This shows that β -CD enhanced the antioxidant activity of violacein, which is probably related to the intracellular protection by violacein in *C. violaceum* against oxidative stress [27].

According to previous studies, the IC_{50} values for the V-79 fibroblast culture cells was 1–5 μ M [28]. Recently it was studied whether violacein toxicity causes apoptosis or necrosis. The results showed that violacein triggers apoptosis instead of necrosis in V-79 culture cells. The violacein induced morphological changes of the V-79 nuclei reflected chromatin condensation and a smaller DNA content [29]. Then it was important to verify the mechanisms of cytotoxicity of violacein because a therapeutic versus toxicological effect of a compound are important parameters in order to assess the possible pharmacological use as an antitumoral in trypanocide drug.

In order to better understand the toxicity of violacein, the multi-endpoints cytotoxicity and acute toxicity were applied. The reduction of 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) is used to assess the mitochondrial dehydrogenase activity of viable cells [21, 24], and the DNA or protein content is

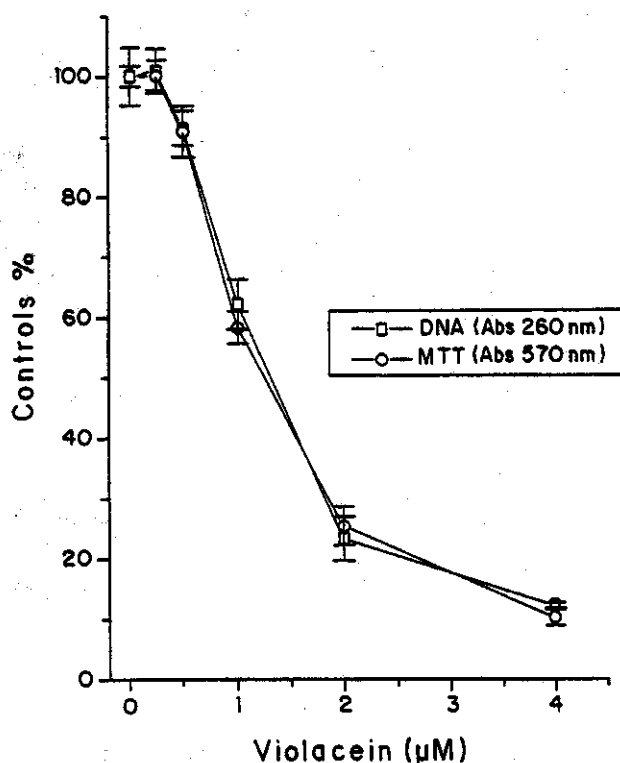


Figure 3. Multi-endpoint cytotoxicity assay: Treatment V79 cells for 24-h with violacein: MTT (—○—) and DNA (—□—) assays.

used to evaluate the content of cellular macromolecules, which are indicative of total cell number.

The DNA content is a useful method to quantify the cellular material. The cellular growth of V79 fibroblast exposed to different concentrations of violacein were measured. Figure 3 shows the dose-response in the DNA content and the IC_{50} value was $1.30 \mu M$ in the absence of β -CD. The dose-response of reduction of MTT of violacein by the V79 cells is represented in Figure 3. This figure shows that the IC_{50} values for violacein was $1.23 \mu M$, identical with the DNA values mentioned above.

The cytotoxicity of $1.2 \mu M$ violacein was not modified when the molar ratio of violacein/ β -CD was 1:1, but was significantly decreased in a molar ratio of 1:2 (Figure 4).

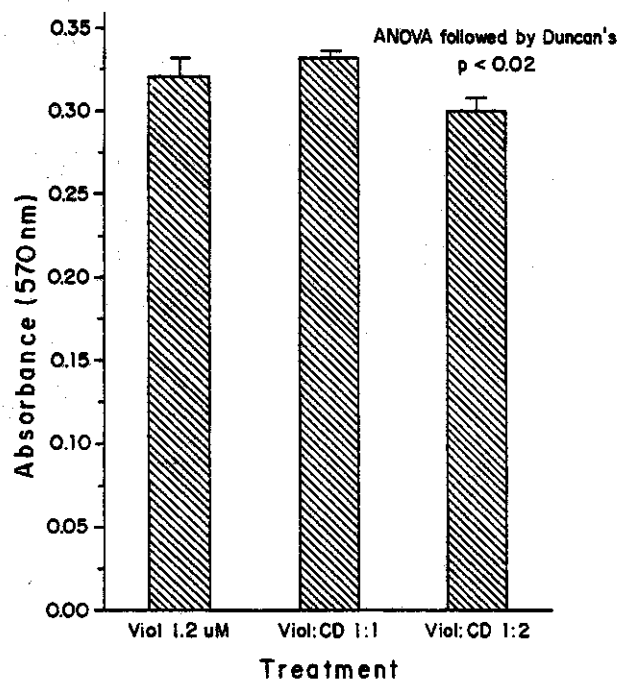


Figure 4. Cytotoxicity of 1.2 μ M violacein in a free form, molar ratio of 1:1 and 1:2 with β -cyclodextrin (from left to right).

The acute toxicity of the violacein against *E. coli* was very low (around 10%) at 400 μ M either in the absence or presence of a 1:1 molar ratio of violacein/ β -CD, similar to that observed in the V-79 culture cell in the cytotoxicity experiments. It seems to us that violacein exhibited a very specific effect in different bacterial strains as previously observed in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra which exhibited minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of 180 μ M and 373 μ M, respectively [30]. The same selectivity was observed when compared with fibroblast in this paper.

Thus the study of the violacein/ β -CD complex resulted in a reduced cytotoxicity and better solubility of the violacein. The exact pharmacokinetics of the complex in terms of systemic absorption may have to be further confirmed by bioavailability studies and studies to determine whether the complex enhances the antitumor activity is currently in progress.

Acknowledgements

Support from FAPESP and CNPq is acknowledged.

References

1. T. Irie and K. Uekema: *J. Pharm. Sci.* **86**, 147 (1997).
2. T. Loftsson and M. E. Brewster: *Pharm. Technol. Eur.* **9**, 26 (1997).
3. V. J. Stella and R. A. Rajewski: *Pharm. Res.* **14**, 556 (1997).
4. J. Szejtli: *J. Mater. Chem.* **7**, 575 (1997).
5. H. Ueda: *Zairyo Gijutsu* **16**, 11 (1998); *Chem. Abstr.* **128**, 158-784 (1998).
6. M. Kata, Z. Aigner, and I. Eros: *Acta Pharm. Hung.* **68**, 107 (1998).
7. T. Loftsson, E. Stefansson, H. Fridriksdottir, and J. K. Kristinnsson: In J. Szejtli and L. Szenté (eds.), *Proc. 8th Int. Symp. Cyclodextrin*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1996), p. 407.
8. J. Savolainen, K. Jarvinen, H. Taipale, P. Jarho, T. Loftsson, and T. Jarvinen: *Pharm. Res.* **15**, 1696 (1998).
9. M. D. Dhanaraju, K. S. Kumaran, T. Baskaran, and M. S. R. Moorthy: *Drug Dev. Ind. Pharm.* **24**, 583 (1998).
10. M. O. Ahmed, I. El-Gibaly, and S. M. Ahmed: *Intern. J. Pharm.* **171**, 111 (1998).
11. S. Nigam and G. Durocher: *J. Photochem. Photobiol. A* **103**, 143 (1997).
12. R. De S. Sinha, and T. Ganguly: *Nuovo Cimento Soc. Ital. Fis. D* **19D**, 955 (1997).
13. M. B. M. De Azevedo, J. B. Alderete, A. C. S. Lino, W. Loh, A. Faljoni-Alario, and N. Durán: *J. Incl. Phenom.* **37**, 67 (2000) (this issue).
14. D. Rettori and N. Durán: *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**(5), 685 (1998).
15. M. Haun, M. F. Pereira, M. E. Hoffmann, R. Riveros, A. Joyas, V. Campos, and N. Durán: *Biol. Res.* **25**, 21 (1992).
16. N. Durán, R. V. Antônio, M. Haun, and R. A. Pilli: *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 686 (1994).
17. N. Durán, S. Erazo, and V. Campos: *An. Acad. Bras. Ci.* **55**, 231 (1983). *Chem. Abstr.* **100**, 48417b (1984).
18. N. Durán, P. S. Melo, and M. Haun: *XXV Annual Meeting Brazilian Biochemical Society (Escritório & Editorial, São Paulo, S.P., Brazil)*, Caxambu, M.G. Brazil. Abstr. O-24 (1996), p. 150.
19. N. Durán, P. S. Melo, and M. Haun: *VIII Brazilian National Meeting in Virology* (Brazilian Soc. Virology Publ., UNESP, Jaboticabal, S.P., Brazil), São Lourenço, M.G., Brazil, Abstr. (1996), p. 179.
20. P. S. Melo, S. S. Maria, B. C. Vidal, M. Haun, and N. Durán: *In vitro Cell. Develop. Biol.* In press (1999).
21. R. De Conti, D. A. Oliveira, A. M. A. P. Fernandes, P. S. Melo, J. A. Rodriguez, M. Haun, S. L. de Castro, A. R. M. Souza-Brito, and N. Durán: *In Vitro Mol. Toxicol.* **11**, 153-160 (1998).
22. M. B. M. Huveneers-oorsprong, L. A. P. Hoogenboom, and H. A. Kuiper: *Toxicol. In Vitro* **11**, 385 (1997).
23. M. R. Cingi, I. De Angelis, E. Fortunati, D. Reggioni, V. Bianchi, R. Tiozzo, and F. Zucco: *Toxicol. In Vitro* **5**, 119 (1991).
24. D. A. Scudiero, P. H. Shoemaker, K. D. Paul, A. Monks, S. Tierney, T. H. Nofziger, M. J. Currens, D. Deniff, and M. R. Boyd: *Cancer Res.* **48**, 4827 (1988).
25. W. F. Jardim, S. M. M. Gimenez, M. C. Canela, and S. G. Moraes: *Chem. Spec. Bioavailab.* **5**, 97 (1993).
26. J. Stocks and T. L. Dormandy: *Br. J. Haematol.* **20**, 95 (1971).

27. D. Rettori, R. A. Rodrigues, and N. Durán: *Rev. Farm. Bioquim. Univer. São Paulo (Brazil)* **34**(Suppl. 1), 169 (1998).
28. P. S. Melo, M. Haun, and N. Durán: *XXV Ann. Meeting. Brazilian Biochem. Soc. (Escritorio & Editorial, São Paulo, S.P., Brazil)*, Caxambu, M.G. Abstr. O-10 (1996), p. 148.
29. S. S. Maria, P. S. Melo, B. C. Vidal, N. Durán, and M. Haun: *XXVII Ann. Meeting. Brazilian Biochem. Soc. (Tec-Art Editora Ltda., São Paulo, S.P., Brazil)*, Caxambu, M.G. Brazil. Abstr. I-36 (1998), p. 89.
30. A. O. De Souza, D. C. G. Aily, D. N. Sato, and N. Durán: *Rev. Inst. Adolfo Lutz (Brazil)* **58**, 15 (1999).

ANEXO 3

Absorption Spectrum of Violacein

Lauro Camargo Dias Jr. ^{1(*)}, Joaquim Delphino Da Motta Neto ¹,

Daniel Rettori ² and Nelson Durán ²

⁽¹⁾ Departamento de Química, P.O. Box 19081, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba- PR, 81531-990, Brazil

⁽²⁾ Laboratório de Química Biológica, Instituto de Química, P.O. Box 6154, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas – SP, 13083-970, Brazil

^(*) corresponding author.

e-mail: laurocd@quimica.ufpr.br

Abstract

Violacein is the major pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. We now report the results of semiempirical calculations on the electronic spectrum of violacein. We have used the AM1 and Intermediate Neglect of Differential Overlap (INDO) model Hamiltonians. Solvent effects have been included with the SCRF model for spectroscopy as proposed by Zerner and Karelson. Our results suggest that in the gas phase violacein is almost planar while in ethanolic solution the H-bond interactions force an internal rotation due to sterical factors. The calculated UV-visible spectrum with the inclusion of specific solvent interactions in the Hamiltonian is in good agreement with the experimental spectrum.

Key Words

Intermediate Neglect of Differential Overlap (INDO) – violacein - spectroscopy – solvent effects – modeling

1. Introduction

Chromobacterium violaceum is a Gram-negative, rod-shaped, facultatively anaerobic bacterium [1]. In Brazil, large amounts of *C. violaceum* are found in the waters and in the soil of the banks of the Negro river, one of the largest afluentes of the Amazon river [2]. Violacein is the major pigment produced by this microbe, and its structural form (Fig. 1) presents three heterocyclic moieties named as 5-hydroxyindole (5HI), 2-pyrrolidone (2PYR) and oxindole (OX).

Violacein has been reported to possess bactericidal [3], trypanocidal [4], antiviral [5] and antitumoral [6] activity. Recently, it has been also shown, by the thiobarbituric acid (TBA) method on erythrocyte lipid peroxidation, that violacein possesses a significant antioxidant activity [7]. Consequently we have carried out EPR measurements with the violacein powder and observed that it is not EPR silent [8].

Following our previous work on the production and characterization of violacein [9], we now report results of semiempirical calculations on this molecule. We have used the semiempirical INDO/S method because the size of the system (39 atoms with 126 valence electrons) clearly does not allow for the use of *ab initio* methods with our current available resources. The UV/VIS absorption spectrum was calculated including solvent effects and the results were compared with the experimental spectrum in an ethanolic solution.

2. Methods and Computational Details.

Initially we have carried out geometry optimizations with the AM1 Hamiltonian [10-12] for both the singlet and triplet states. For the evaluation of electronic spectra, we have used the Intermediate Neglect of Differential Overlap for spectroscopy (INDO/S) technique of Zerner and coworkers [13-21], with the two electron integrals of the form $\gamma_{\mu\nu} = (\mu\mu | \nu\nu)$ calculated by a modified Mataga-Nishimoto recipe [22,23].

Solvent effects were simulated in two levels. Initially, non-specific, bulk dielectric effects were simulated by a self-consistent reaction field (SCRF) according to the continuum model [24-26] in the formulation suggested by Karelson and Zerner (Refs. [26,27], theory B). Then, specific hydrogen bond interactions between violacein and ethanol (solvent) molecules were simulated by explicit inclusion of six solvent molecules around the violacein solute in the zeroth order Hamiltonian, according to the supermolecule model [28-30]. The positions of the surrounding solvent molecules follow the recommendations by Pullman and Pullman [31]. This approach has been quite successful in previous studies on the absorption spectrum of difficult systems such as Reichardt's betaine #1 [32].

The experimental UV-visible spectrum was obtained with an ethanolic solution of violacein (1.5×10^{-5} mol/L). The measurements were carried out in a Hewlett-Packard diode array spectrophotometer model HP8452A, using 1 cm-length quartz cell.

3. Results and Discussion

3.1 - Ground state geometry, in gas phase and SCRF

Fig. 2 shows the AM1 fully optimized geometry of the singlet ground state violacein in gas phase. One can see that the 5HI ring is twisted from the rest of the molecule, as the calculated C(8)-C(9)-C(11)-C(12) dihedral angle assumes a value of about -21° . The barrier to the 5HI rotation about the C(9)-C(11) bond was previously calculated as 3 kcal/mol [33]. The OX and 2PYR rings are coplanar as the C(12)-C(13)-C(17)-C(18) dihedral angle is very close to 0° . That was the only stable geometry obtained by full optimization. In order to evaluate the barrier between the OX and 2PYR rings, we have carried out subsequent partial optimizations fixing the C(12)-C(13)-C(17)-C(18) dihedral at different values. The energy barrier to reach the perpendicular conformation was calculated to be 30 kcal/mol. Therefore, our results suggest that, no other interactions being present, the OX and 2PYR rings should assume a coplanar conformation.

Due to our recent observation that violacein powder is not EPR silent [8], we were prompted to examine the possibility of a low lying triplet state. Thus we have also optimized the violacein geometry in the triplet state. The UHF calculations with the AM1 Hamiltonian showed that this state is ca. 7 kcal/mol above the singlet state. However, completion of the optimization was not possible (gradient norm could not be taken to lower values than 8.8), suggesting that the triplet is probably not stable.

The geometry optimization of the supermolecule (including six solvent molecules as discussed in the previous section) resulted in the non-planar conformation shown in Fig. 3. This structure was only partially optimized as the hydrogen bonds were fixed by freezing the Schuster coordinates at the appropriate values [34,35]. Under these constraints, the 2PYR and OX moieties assume a non-planar conformation as the optimized C(12)-C(13)-C(17)-C(18) dihedral angle is about -70° . A conformation in which the 2PYR and OX moieties are orthogonal, with the C(12)-C(13)-C(17)-C(18) dihedral angle set to -90° was used as the input geometry. The C(8)-C(9)-C(11)-C(12) dihedral angle between the 5HI and 2PYR moieties remains very close to -23° , even with the inclusion of three solvent molecules H-bonded to the 5HI ring (Fig. 3). From this we can draw the conclusion that the inclusion of the specific interactions with the neighbouring solvent molecules plays the role of forcing the OX ring out of the plane of the 2PYR ring by a simple steric effect. Of course this bears some consequence on the conjugation of the 2PYR-OX system. We are tempted to rationalize this in terms of classical Valence Bond (VB) Theory [36-39]. Different resonance structures can be proposed and Fig. 4 shows one possible zwitterionic VB structure. It is easily recognizable that such structure contributes toward breaking the conjugation between the OX and 2PYR rings and therefore is favoured in the non-planar conformation. Our next step was to reproduce the observed electronic spectrum of violacein, using the optimized structures.

3.2 - Electronic spectra in gas phase

Table 1 shows the INDO/S calculated electronic absorption spectrum of gas phase violacein, using the singlet as the reference determinant. The spectrum is dominated by $\pi \rightarrow \pi^*$ transitions, as should be expected since the almost planar conformation of the rings certainly favours delocalization of the charge throughout the molecule. The first, strong transition is located at 415 nm, and might correspond to the strong band observed at 580 nm if solvent effects were included (see discussion below). The medium weak transition at 321 nm is associated to charge transfer (CT) from the OX ring to the 2PYR. The rest of the calculated spectrum shows a progression of medium strength transitions starting at about 315 nm.

3.3 - Electronic spectra of violacein in ethanol

Table 2 shows the calculated electronic spectrum of violacein in ethanol. The low energy part of the spectrum exhibits only one $\pi \rightarrow \pi^*$ transition localized on the central 2PYR ring. This calculated medium strength transition at 664 nm corresponds to the experimentally observed broad band centered at 580 nm, which is presented in Fig. 5. The second, medium weak transition corresponds to a charge transfer from the 5HI ring to the central 2PYR ring. The rest of the calculated spectrum matches almost perfectly the experimental result. It is interesting to observe that this nice agreement was reached *only* after we included the six solvent molecules around the violacein molecule (the reaction field alone was not enough).

Of course some doubt might be cast on our results from the observation that only one configuration was used in the spectroscopic calculations. But this result can be checked by sampling other configurations through Monte Carlo (MC) simulations as suggested by Coutinho et al. [40-44]. Besides, the importance of the hydrogen bonds for the final geometry of the complex makes the procedure employed in this paper expected to be semiquantitative as previously found by Da Motta et al. [32] for the spectrum of Reichardt's betaine #1.

4. Concluding Remarks

In this work we have examined the geometry and absorption spectrum of violacein using the AM1 [10-12] and INDO/S [13-21] semiempirical methods. In gas phase, the molecule is expected to assume a nearly planar conformation. Inclusion of solvent molecules H-bonded to the solute partially break the conjugation, and the OX and 2PYR rings no longer share the same plane. The calculated (INDO/S) spectrum at this last geometry matches very well the observed UV-visible spectrum.

Acknowledgements

This work has been partially supported by Brazilian agency FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) through a Ph.D. grant conceded to DR. We also acknowledge Prof. Dr. Rogerio Custódio for comments and suggestions.

References

- [1] P.H.A. Sneath in N.R. Krieg and J.G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore, 1984, pp. 580-582.
- [2] L.R. Caldas, *Photochem. Photobiol.*, 26 (1977) 1.
- [3] H.C. Lichstein, V.F. Van de Sand, *J. Infect. Dis.*, 76 (1945) 47.
- [4] N. Durán, R.V. Antonio, M. Haun, R.A. Pilli, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 10 (1994) 686.
- [5] G. May, B. Brümmer, H. Ott (Lomapharm R. L.), DE-B 3935066A1 (1991) [Chem. Abstr. 115 (1991) 47764k].
- [6] P.S. Melo, S.S. Maria, B.C. Vidal, M. Haun and N. Durán, *In vitro Cell. Develop. Biol.*, (2000) in press.
- [7] M.B.M. De Azevedo, J.B. Alderete, J.A. Rodriguez, A.O. Souza, D. Rettori, M.A. Torsoni, A. Faljoni-Alario, M. Haun and N. Durán, *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.*, 37 (2000) 93.
- [8] D. Rettori, L.C. Dias Jr., J.R. Costa, R.R. Urbano, A.L. Brandl, N.O. Moreno and N. Durán, *J. Am. Chem. Soc.*, (2000) submitted.
- [9] D. Rettori and N. Durán, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 14 (1998) 685.
- [10] M.J.S. Dewar, E.G. Zebisch, E.F. Healy and J.J.P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.*, 107 (1985) 3902.
- [11] M.J.S. Dewar and E.G. Zebisch, *J. Mol. Struct. (Theochem)*, 180 (1988) 1.
- [12] A.A. Voityuk, *J. Struct. Chem.*, 29 (1988) 120
- [13] J.E. Ridley and M.C. Zerner, *Theoret. Chim. Acta (Berlin)*, 32 (1973) 111.

- [14] N.J. Bruce, J.E. Ridley and M.C. Zerner, *Theoret. Chim. Acta (Berlin)*, 45 (1977) 283.
- [15] M.C. Zerner, G.H. Loew, R.F. Kirchner and U.T. Mueller-Westerhoff, *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (1980) 589.
- [16] J.D. Head and M.C. Zerner, *Chem. Phys. Lett.*, 131 (1986) 359.
- [17] W.D. Edwards and M.C. Zerner, *Theoret. Chim. Acta (Berlin)*, 72 (1987) 347.
- [18] W.P. Anderson, T.R. Cundari, R. Drago and M.C. Zerner, *Inorg. Chem.*, 29 (1990) 1.
- [19] W.P. Anderson, T.R. Cundari and M.C. Zerner, *Int. J. Quantum Chem.*, 39 (1991) 31.
- [20] W.P. Anderson, W.D. Edwards and M.C. Zerner, *Inorg. Chem.*, 25 (1986) 2728.
- [21] M.G. Cory, S. Kostlmeyer, M. Kotzian, N. Rosch e M.C. Zerner, *J. Chem. Phys.*, 100 (1994) 1353.
- [22] N. Mataga and K. Nishimoto, *Zeit. Physik. Chem. (Frankfurt)*, 12 (1957) 335.
- [23] N. Mataga and K. Nishimoto, *Zeit. Physik. Chem. (Frankfurt)*, 13 (1957) 140.
- [24] O. Tapia and O. Goscinski, *Mol. Phys.*, 29 (1975) 1653.
- [25] S. Miertus, E. Scrocco and J. Tomasi, *Chem. Phys.*, 55 (1981) 117.
- [26] M.M. Karelson, T. Tamm, A.R. Katritzky, S.J. Cato and M.C. Zerner, *Int. J. Quantum Chem.*, 37 (1990) 1.
- [27] M.M. Karelson and M.C. Zerner, *J. Phys. Chem.*, 96 (1992) 6949.
- [28] D.L. Beveridge and G.W. Schnuelle, *J. Phys. Chem.*, 78 (1974) 2064.
- [29] P. Claverie, J.P. Daudey, J. Langlet, B. Pullman, D. Piazzola and M.J. Huron, *J. Phys. Chem.*, 82 (1978) 405.

- [30] L.C.G. Freitas, R.L. Longo and A.M. Simas, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **88** (1992) 189.
- [31] A. Pullman and B. Pullman, *Quart. Rev. Biophys.*, **7** (1975) 505.
- [32] J.D. Da Motta Neto, M.C. Zerner and R. Bicca de Alencastro, *Int. J. Quantum Chem. Quantum Chem. Symp.*, **28** (1994) 361.
- [33] M.B.M. De Azevedo, J.B. Alderete, A.C.S. Lino, W. Loh, A. Faljoni-Aliario and N. Durán, *J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem.*, **37** (2000) 67.
- [34] P. Schuster, G. Zundel and C. Sándorfy (Eds.), *The Hydrogen Bond - Recent Developments in Theory and Experiments*, vol. I - III, North Holland, Amsterdam, 1976.
- [35] P. Schuster (Ed.), *Hydrogen Bonds*, Springer-Verlag, Berlin, 1984.
- [36] W. Heitler and G. Rainier, *Nachr. Ges. Wiss. (Göttingen)*, 1930 (1930) 277.
- [37] W. Heitler and F. London, *Z. Physik.*, **44** (1927) 455.
- [38] J.C. Slater, *Phys. Rev.*, **37** (1938) 481.
- [39] L. Pauling, *J. Chem. Phys.*, **1** (1933) 280.
- [40] K. Coutinho, S. Canuto and M.C. Zerner, *Adv. Quantum Chem.*, **28** (1997) 89.
- [41] K. Coutinho, S. Canuto and M.C. Zerner, *Int. J. Quantum Chem.*, **65** (1997) 885.
- [42] K. Coutinho, S. Canuto and M.C. Zerner, *J. Chem. Phys.*, **112** (2000) 9874.
- [43] K. Coutinho, S. Canuto and M.C. Zerner, *J. Chem. Phys.*, **112** (2000) 7293.
- [44] K. Coutinho and S. Canuto, *Int. J. Quantum Chem.*, **77** (2000) 192.

Figure captions

Fig. 1 - Molecular structure of violacein.

Fig. 2 - Optimized AM1 geometry of violacein in the gas phase.

Fig. 3 - Optimized AM1-SM-SCRF geometry of violacein plus six molecules of ethanol.

Fig. 4 -Suggested zwitterionic resonance structure for the conformational behaviour of violacein in solution.

Fig. 5 - Experimental UV-visible spectrum of violacein in ethanol (1.5×10^{-5} mol/L).

Table 1. INDO/S calculated spectral transition energies for violacein in gas phase.

Transition	$\nu_{\text{calcd.}} (\text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\text{calcd.}} (\text{nm})$	$\Gamma_{\text{calcd.}}$	Assignment (CI vector)
1 $\rightarrow$ 2	24121	415	1.108	96% (63 $\rightarrow$ 64)
1 $\rightarrow$ 3	31126	321	0.042	79% (61 $\rightarrow$ 64), 11% (60 $\rightarrow$ 64)
1 $\rightarrow$ 4	31871	314	0.066	41% (62 $\rightarrow$ 65), 22% (62 $\rightarrow$ 64)
1 $\rightarrow$ 5	34446	290	0.093	57% (63 $\rightarrow$ 65), 12% (62 $\rightarrow$ 65)
1 $\rightarrow$ 6	36264	276	0.079	67% (62 $\rightarrow$ 64), 12% (63 $\rightarrow$ 65)
1 $\rightarrow$ 7	37218	269	0.069	48% (60 $\rightarrow$ 64), 14% (61 $\rightarrow$ 64)
1 $\rightarrow$ 8	38874	257	0.194	37% (63 $\rightarrow$ 66), 26% (60 $\rightarrow$ 64)
1 $\rightarrow$ 9	39666	252	0.199	25% (63 $\rightarrow$ 67), 24% (63 $\rightarrow$ 69)
1 $\rightarrow$ 10	41411	242	0.106	46% (63 $\rightarrow$ 69), 23% (63 $\rightarrow$ 68)
1 $\rightarrow$ 11	41913	239	0.444	26% (63 $\rightarrow$ 68), 25% (63 $\rightarrow$ 67)
1 $\rightarrow$ 12	43102	232	0.263	25% (62 $\rightarrow$ 68), 21% (62 $\rightarrow$ 67)

Table 2. INDO/S calculated spectral transition energies for the violacein in ethanol, with six solvent molecules included in the Hamiltonian.

Transition	$\nu_{\text{calcd.}} (\text{cm}^{-1})$	$\lambda_{\text{calcd.}} (\text{nm})$	$\Gamma_{\text{calcd.}}$	Assignment (CI vector)
1 $\rightarrow$ 2	15060	664	0.707	95% (123 $\rightarrow$ 124)
1 $\rightarrow$ 3	26478	378	0.135	64% (121 $\rightarrow$ 124), 24% (119 $\rightarrow$ 124)
1 $\rightarrow$ 4	26498	377	0.032	84% (122 $\rightarrow$ 124)
1 $\rightarrow$ 5	27980	357	0.082	64% (120 $\rightarrow$ 124), 12% (123 $\rightarrow$ 126)
1 $\rightarrow$ 6	31404	318	0.165	44% (132 $\rightarrow$ 125), 21% (123 $\rightarrow$ 126)
1 $\rightarrow$ 7	31691	316	0.040	26% (122 $\rightarrow$ 125), 20% (119 $\rightarrow$ 124)
1 $\rightarrow$ 8	31830	314	0.107	41% (123 $\rightarrow$ 126), 19% (123 $\rightarrow$ 125)
1 $\rightarrow$ 9	32262	310	0.068	54% (123 $\rightarrow$ 127)
1 $\rightarrow$ 10	33241	301	0.032	22% (122 $\rightarrow$ 125), 19% (119 $\rightarrow$ 124)

Fig. 1:

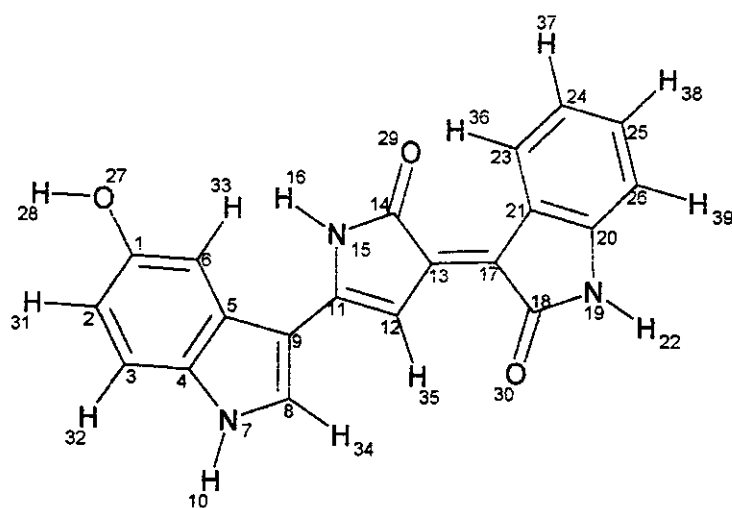


Fig. 2:

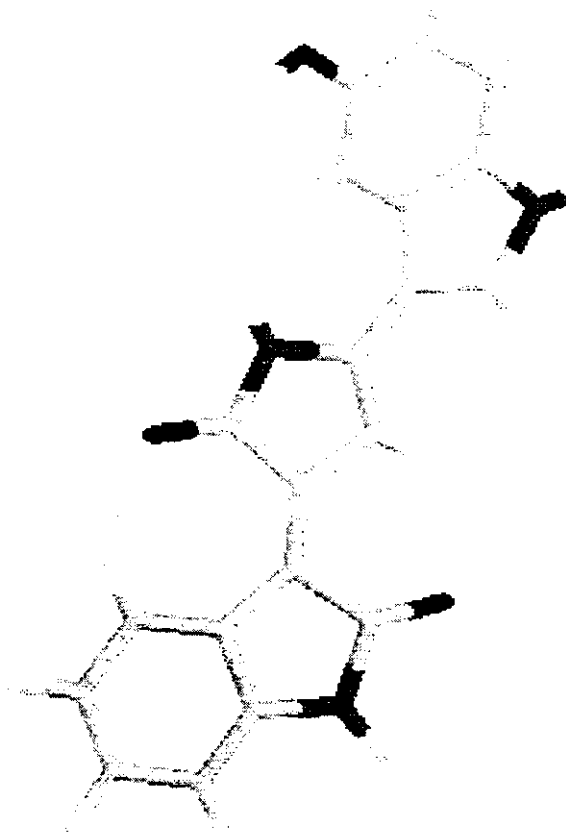


Fig. 3:

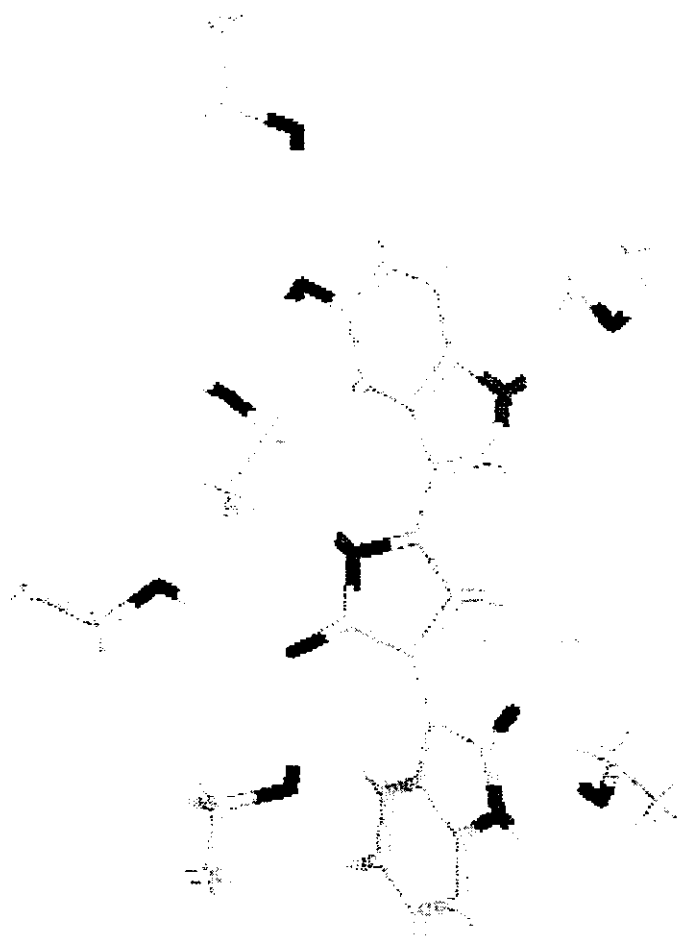


Fig. 4

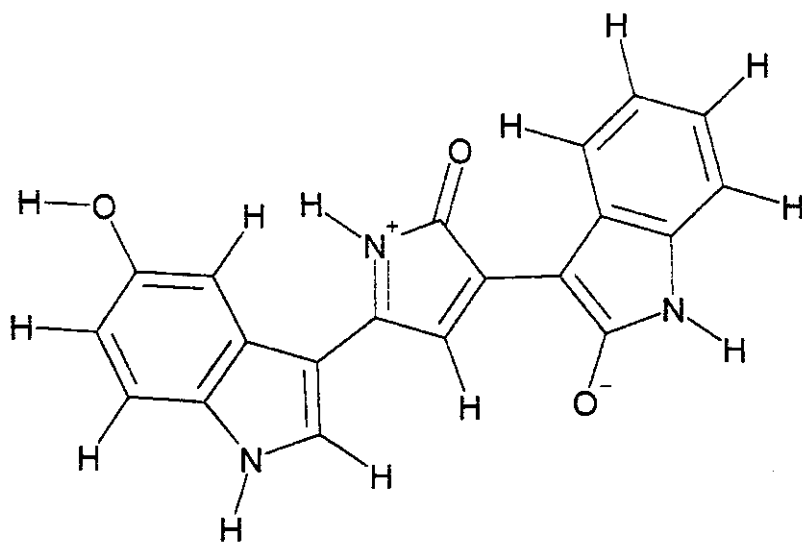


Fig. 5:

