

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**Centro de Ciências Biológicas - CCB**  
**Departamento de Microbiologia e Parasitologia - MIP**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**ANA KELLY PITLOVANCIV**

**“Atividade Antibiótica de Extratos Obtidos de Culturas de  
*Chromobacterium violaceum*”**

**FLORIANÓPOLIS - SC**

**2005**

**ANA KELLY PITLOVANCIV**

**“Atividade Antibiótica de Extratos Obtidos de Culturas de  
*Chromobacterium violaceum*”**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Biotecnologia da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina, visando à obtenção do grau de  
Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra Rozangela Curi  
Pedrosa  
Co-Orientadora: Profa. Dra Regina V.  
Antônio

**FLORIANÓPOLIS - SC**

**2005**

**ANA KELLY PITLOVANCIV**

**“Atividade Antibiótica de Extratos Obtidos de Culturas  
de *Chromobacterium violaceum*”**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção de grau de **Mestre em  
Biotecnologia no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia** da  
Universidade Federal de Santa Catarina

Orientadora

Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa

Co-Orientadora

Profa. Dra. Regina Vasconcellos Antônio

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Prof. Dr. Mario Steindel

**Banca examinadora:**

Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa

Profa. Dra. Regina Vasconcellos Antônio

Prof. Dr. Artur Smânia Junior

Profa. Dra. Patrícia da Silva Melo

**Florianópolis - SC, fevereiro 2005.**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica Experimental e, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos, coordenado pelas Professoras Dra. Rozangela Curi Pedrosa (Departamento de Bioquímica, CCB) e Dra. Regina Vasconcellos Antônio (Departamento de Bioquímica, CCB), da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, SC.

Dedico este trabalho aos meus pais queridos, João e Maria Arlete,  
pela educação, por seus exemplos, pelo incentivo e por seu amor.

A minha eterna gratidão!

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas virtudes recebidas, como coragem, a fé e por permitir que chegasse até aqui.

À professora Regina V. Antônio, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela valiosa orientação, confiança, pelos ensinamentos e conselhos.

À professora Rozangela Curi Pedrosa, pela orientação, sugestões, apoio e amizade.

Aos meus pais, pela eterna dedicação a minha vida, por todo amor e apoio sempre presentes.

Aos meus familiares, em especial as minhas irmãs Alessandra, Fabiane, Tatyellen e ao meu irmão João Marcio, pela grande amizade, amor e carinho.

Aos colegas de laboratório pelo companheirismo, especialmente aos queridos amigos, Danielle, Cauê, Derce, pelo incentivo e inesquecível convívio.

Às grandes amigas que fiz durante a realização deste trabalho, em especial a Derce, Alessandra, Magali, Márcia.

A Liana pelo convívio e apoio.

Ao pessoal do Laboratório Intelab e ao Laboratório de Bioquímica Experimental, pelo carinho, trabalho em conjunto e companheirismo.

A todos os colegas e amigos do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia.

A todas as pessoas que contribuíram no desenvolvimento desse trabalho, os quais, direta ou indiretamente, participaram da minha formação como profissional e ser humano, o meu muito obrigada.

Ana Kelly  
Florianópolis, 2004.

## RESUMO

Os produtos de origem natural são utilizados como fonte de medicamentos para tratar enfermidades que acometem o ser humano desde tempos imemoriais. A terapêutica moderna provavelmente não teria se desenvolvido sem o suporte desses produtos. Os organismos vivos, vegetais, microrganismos, animais, são capazes de produzir, transformar e acumular uma série de substâncias não essenciais para o seu crescimento e metabolismo reprodutivo. Estes compostos são denominados de metabólitos secundários, sendo umas das maiores classes de produtos naturais. Com o aparecimento de novas doenças infecciosas e o aumento da resistência bacteriana, surge a necessidade de pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de novos antimicrobianos. A *Chromobacterium violaceum*, é uma bactéria Gram-negativa, de vida livre, que popula solos e águas das regiões tropicais e sub-tropicais. Esta bactéria é responsável pela produção de uma diversidade de metabólitos secundários com grande potencial biotecnológico. Este trabalho teve como objetivo definir estratégias de cultivo, que promovessem o aumento na produção de violaceína e outros metabólitos secundários sintetizados por *C. violaceum*, bem como avaliar a atividade antibiótica dos principais pigmentos. Sendo assim, estudou a produção de violaceína e pigmentos relacionados, em meios sólidos e líquidos com diferentes fontes de carbono. Foram avaliadas as produções de massa celulares secas, bem como a produção dos pigmentos. Os maiores rendimentos foram em meio LB sólido com glicerol 1%. Os pigmentos foram extraídos em Soxhlet, utilizou-se éter etílico, clorofórmio e metanol como solventes. No extrato etéreo observou-se a predominância de desoxiviolaceína e um pigmento não identificado. Nos extratos metanólicos, violaceína foi o pigmento majoritário. Os pigmentos isolados foram testados para atividade antibiótica contra três espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Os resultados mostraram que o extrato metanólico foi mais efetivo sobre *P. aeruginosa*, na concentração de 125 µg/mL. No entanto, o extrato metanólico nas concentrações analisadas, teve o efeito reduzido sobre as demais bactérias testadas. O extrato etéreo exibiu alta atividade sobre *P. aeruginosa*. Este extrato mostrou-se o mais efetivo dos extratos sobre as outras linhagens bacterianas testadas. Embora, não obtido o isolamento completo dos pigmentos produzidos por *C. violaceum*, o extrato etéreo contendo desoxiviolaceína e o pigmento não identificado, sem violaceína, exibiu uma atividade antibiótica promissora.

Palavras-chaves: *Chromobacterium violaceum*, violaceína, desoxiviolaceína, atividade antibiótica

## ABSTRACT

Products of natural origin are used as medicinal source to treat human diseases since immemorial times. Modern therapeutics probably would not have being developed without the use of these products. Organisms living are capable to produce, transform and accumulate not essential substance for growth and reproductive metabolism. These substances are called secondary metabolites, are one of the major categories of natural products. The appearance of new infectious illnesses and the increase of the bacterial resistance, created the necessity of research directed to the development new of antimicrobials. *Chromobacterium violaceum* is a Gram-negative bacterium of free-living, which populates soils and waters in tropical and subtropical regions. This bacterium is responsible for the production of a several secondary metabolites with great biotechnological potential. The objective of the present work was to define strategies of culture that promoted the increase the production of violacein and other secondary metabolites synthesized by *C. violaceum*, as well as to evaluate the antibiotic activity of main pigments. It was quantitatively and qualitatively studied the production of violacein and pigments in solids and liquid media, in presence of different carbon sources. Among the studied media, the largest amount of pigment obtained was in agar LB medium, with 1% (v/v) glycerol. The pigments were extracted from cellular mass through Soxhlet apparatus, utilizing used ethyl ether, chloroform and methanol as solvent. It was observed, in the ether extract, predominance of desoxyviolacein and a pigment not identified. In methanolic extracts, violacein was the major pigment. These pigments extracts were tested for antibiotic activity against three bacterial species: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. The results have shown that the methylic extract was more effective against *P. aeruginosa*, in a concentration of 125 mg/mL. However, methylic extract in the evaluated concentrations, effectiveness was very reduced, against the others bacterium. The ether extract exhibited the highest antibiotic activity against *P. aeruginosa*.. Although it was not possible to isolate completely the pigments produced by *C. violaceum*, the ether extract, containing desoxyviolacein and a non-identified pigment, without violacein, exhibited a promising antibiotic activity.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	xii
LISTA DE TABELAS .....	xiii
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUÇÃO, MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
<i>Objetivos específicos:</i> .....	3
CAPÍTULO II.....	5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Importância dos Produtos Naturais.....	5
2.2 Produtos Naturais Envolvidos na Atividade Biológica.....	6
2.3 Agentes Antimicrobianos Derivados de Produtos Naturais .....	9
2.4 Metabólitos Secundários Sintetizados por <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	12
2.4.1 Histórico.....	12
2.4.2 Considerações sobre a Bactéria <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	15
2.4.3 Metabólitos, Pigmentos e Enzimas.....	20
2.4.4 Potencial Biotecnológico .....	29
2.5 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	32
2.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	34
2.7 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	35
CAPÍTULO III.....	37
MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 Linhagens Bacterianas Empregadas .....	37
3.1.1 Para Produção de Pigmentos.....	37
3.1.2 Para Avaliação da Atividade Antibiótica .....	37
3.2 Meios de Cultura.....	37
3.2.1 Meio Luria Bertani (LB) .....	38
3.2.2 Meio Infuso de Cérebro e Coração de Boi (BHI) .....	38
3.3 Preparo do Pré-inóculo de <i>C. violaceum</i> .....	39
3.4 Efeito das Condições de Cultivo sobre o Crescimento e Produção de Pigmentos por <i>C. violaceum</i> .....	39
3.4.1 Efeito da Glicose Sobre a Produção de Pigmentos por <i>C. violaceum</i> .....	39

3.4.1.1 Em Meio Líquido .....	39
3.4.1.2 Em Meio Sólido .....	40
3.4.2 Efeito do Glicerol Sobre a Produção de Pigmentos por <i>C. violaceum</i> .....	40
3.4.2.1 Em Meio Líquido .....	40
3.4.2.2 Em Meio Sólido .....	40
3.4.3 Cultivo sobre Grãos Arroz .....	41
3.5 Extração dos Metabólitos Produzidos por <i>C. violaceum</i> .....	41
3.5.1 Dos Meios Líquidos .....	41
3.5.2 Dos Meios Sólidos .....	42
3.5.3 Extração Fracionada .....	42
3.6 Análise Cromatográfica dos Metabólitos Pigmentados Produzidos por <i>C. violaceum</i> .....	43
3.7 Preparo das Frações para os Teste de Atividade Antibiótica .....	45
3.8 Atividade Antibiótica.....	45
3.8.1 Determinação da Concentração Celular e do Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) .....	46
3.8.2 Teste de Sensibilidade aos Metabólitos .....	46
3.8.3 Determinação da Cinética de Inibição.....	47
3.9 Análise Estatística .....	48
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>50</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
4.1 Estudo da Fonte de Carbono .....	50
4.2 Extração e Isolamento dos Metabólitos Produzidos .....	55
4.2.1 Extrato Metanólico Bruto: Isolamento dos Constituintes e Caracterização Cromatográfica.....	55
4.2.2 Extração Fracionada dos Pigmentos Produzidos por <i>C. violaceum</i> ..	58
4.3 Atividade Antibiótica.....	60
4.3.1 Efeito do Solvente Metanol sobre o Crescimento Microbiano .....	62
4.3.2 Atividade Antibiótica do Extrato Metanólico .....	63
4.3.3 Atividade Antibiótica do Extrato Etéreo .....	63
4.3.4 Atividade Antibiótica do Cloranfenicol.....	64
4.3.5 Determinação da Cinética de Inibição.....	66
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>70</b>
<b>CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS .....</b>	<b>70</b>
5.1 Conclusões.....	70
5.2 Perspectivas.....	71
<b>CAPÍTULO VI.....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

- MCT - "Ministério da Ciência e Tecnologia"  
ATCC - "American Type Culture Collection"  
UFC - "Unidades Formadoras de Colônia"  
LB - "Luria-Bertani"  
BHI - "Brain Heart Infusion"  
CCD - "Cromatografia em Camada Delgada"  
UV - "Ultra Violeta"  
PHAs - "Polihidroxicanoatos"  
LPS - "Lipopolissacarídeo"  
MTT - "3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide"  
G6PD - "Glicose-6-fosfato Dehidrogenase"  
HIV - "Human Immunodeficiency Virus"  
AIDS - "Acquired Immunodeficiency Syndrome"  
 $\epsilon$  - "Coeficiente de Extinção Molar"  
ORFs - "Open Reading Frame"  
rpm - "rotação por minuto"  
pH - "potencial de Hidrogênio"  
nm - "nanômetro"  
mL - "mililitro"  
 $\mu$ L - "microlitro"  
 $^{\circ}$ C - "graus centígrados"  
g - "gramas"  
 $\mu$ g - "microgramas"  
HHL - "Hexanoil Homoserina Lactona"  
RF - "Fator de Referência"

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1 – Micrografia eletrônica da Chromobacterium violaceum. Disponível em <a href="http://www.unb.br/acsweb/imagens/bactéria1.jpg">www.unb.br/acsweb/imagens/bactéria1.jpg</a>, acesso em: 17 janeiro de 2003.</i>	16
<i>Figura 2 – Estrutura química da violaceína.</i>	22
<i>Figura 3 – Estrutura química da desoxiviolaceína.</i>	22
<i>Figura 4 – Via de biossíntese de violaceína (August et al., 2000). Observe a localização dos produtos dos genes <i>vioD</i>, <i>vioA</i>, <i>vioB</i>, e <i>vioC</i> que constituem o operon <i>vioABCD</i>, na via de biossíntese da violaceína.</i>	26
<i>Figura 5 – Metabólitos secundários isolados em CCD, utilizando acetato de etila /éter de petróleo (3:1) como fase móvel.</i>	56
<i>Figura 6 – Inibição do Crescimento de <i>S. aureus</i> por extratos obtidos de <i>C. violaceum</i>.</i>	65
<i>Figura 7 – Inibição do Crescimento de <i>P. aeruginosa</i> por extratos obtidos de <i>C. violaceum</i>.</i>	65
<i>Figura 8 – Inibição do Crescimento de <i>K. pneumoniae</i> por extratos obtidos de <i>C. violaceum</i>.</i>	66
<i>Figura 9 – Curva de sobrevivência da bactéria <i>P. aeruginosa</i>, exposta aos extratos metanólico e etéreo. Os extratos foram adicionados no tempo zero. A concentração para ambos os extratos foi de 125 µg/mL, e o tubo controle s/ pigmento. Os resultados do extrato metanólico igualiza com os do extrato etéreo.</i>	67

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 – Descobertas dos antibióticos e as bactérias das quais foram extraídas as substâncias.....</i>	<i>11</i>
<i>Tabela 2 – Composição do Meio Luria-Bertani – LB (SAMBROOK et al, 1989).....</i>	<i>38</i>
<i>Tabela 3 – Composição do Meio Infusão Cérebro-Coração (BHI – Brain Heart Infusion)* .....</i>	<i>38</i>
<i>Tabela 4 – Sistemas de Solventes utilizados em CCD .....</i>	<i>44</i>
<i>Tabela 5 – Meios de cultivos utilizados para a produção de pigmentos .....</i>	<i>52</i>
<i>Tabela 6 – Perfil cromatográfico dos extratos de Chromobacterium violaceum* .....</i>	<i>57</i>
<i>Tabela 7 – Atividade antibiótica dos extratos obtidos de C. violaceum sobre S. aureus. 61</i>	
<i>Tabela 8 – Atividade antibiótica dos extratos obtidos de C. violaceum sobre P. aeruginosa.....</i>	<i>61</i>
<i>Tabela 9 – Atividade antibiótica dos extratos obtidos de C. violaceum sobre K. pneumoniae.....</i>	<i>62</i>

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO, MOTIVAÇÃO E JUSTIFICATIVA

Muitos metabólitos secundários de grande importância econômica são produzidos em quantidades muito baixas. Em decorrência disto, poucos produtos são gerados para a produção de biofármacos a partir de biotecnologia. As razões que concorrem para este quadro são o alto investimento necessário e a baixa produtividade em cultivos celulares. Na tentativa de superar essas dificuldades, estratégias para otimizar a produção *in vitro* de compostos bioativos tem sido continuamente desenvolvidos com resultados promissores, sendo que no momento atual, os avanços em estudos de engenharia metabólica permitirão incrementos de produtividade de metabólitos secundários nos cultivos *in vitro*, contribuindo para a redução dos custos de produção, ou mesmo viabilizando a produção de novos compostos (HARVEY, 2000; CRAGG, 1997).

A pesquisa de novos fármacos passou por significativos avanços nos últimos anos, principalmente depois da introdução de modelos biológicos realizados *in vitro* e em grande escala, os quais podem avaliar várias amostras, em um curto período de tempo, permitindo a realização de várias repetições

dos experimentos e propiciando uma análise estatística consistente dos resultados (HARVEY, 2000).

É importante ressaltar que grande parte dos avanços da biotecnologia moderna e agricultura são derivados das descobertas recentes nas áreas de genética, fisiologia e metabolismo de microrganismos. A diversidade genética e metabólica dos microrganismos tem sido explorada há muitos anos, visando a obtenção de produtos biotecnológicos, tais como a produção de novos antibióticos e agentes terapêuticos.

Embora exista uma grande gama de fármacos com função antibiótica em uso clínico e vários outros em desenvolvimento, exige-se ainda, uma grande demanda por novos compostos, devido ao aumento no número de bactérias patogênicas resistente a muitos antibióticos comercializados. Assim, a diversidade de estruturas e alvos terapêuticos produzidos através do metabolismo secundário de bactérias e outros organismos, pode suprir esta demanda ou minimizar este problema.

Muitos estudos prévios realizados com a bactéria *Chromobacterium violaceum*, tem demonstrado o seu potencial como produtor de moléculas com atividade antibiótica, antitumoral e antiparasitária. Para a atividade antibiótica tem sido utilizado extrato bruto de um dos seus metabólitos secundários, a violaceína. Contudo, sabe-se de outros metabólitos minoritários são

produzidos, provavelmente como precursores ou sub-produtos da biossíntese de violaceína. Estas observações indicam que mesmo em pequenas quantidades, estes precursores possam apresentar atividade biológica muito interessante do ponto de vista farmacológico (DeMOSS, 1967; De SOUZA, 1999, DURÁN *et al.*, 1989; MELO, 2000).

Este trabalho teve como objetivo definir estratégias de cultivo que visem o aumento na produção de violaceína e outros pigmentos biossintetizados por *Chromobacterium violaceum*, bem como avaliar a atividade antibiótica dos principais pigmentos.

*Objetivos específicos:*

- Avaliar o efeito das condições de cultivo sobre a produção de pigmentos produzidos por *C. violaceum*
- Ampliar a produção dos pigmentos utilizando as condições de cultivo previamente definidas como as mais favoráveis
- Definir condições experimentais para a extração dos metabólitos (pigmentos) de interesse

- Avaliar a atividade antibiótica de extratos obtidos, com relação a alguns patógenos de importância clínica

## CAPÍTULO II

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 Importância dos Produtos Naturais

Os produtos naturais na terapêutica são reconhecidos desde os tempos imemoriais. O conhecimento de plantas alucinógenas pelos ameríndios que as empregavam em seus ritos pagãos, bem como das propriedades afrodisíacas de diversas porções preparadas a partir de distintas espécies vegetais, acompanha o homem há muitos milênios (BARREIRO e FRAGA, 2001).

A terapêutica moderna é composta de um grande número de medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas, provenientes de produtos naturais principalmente de plantas superiores, de toxinas animais e microrganismos. São inúmeros os exemplos de medicamentos desenvolvidos direta ou indiretamente de fontes naturais, sobretudo de plantas. Destaca-se a morfina, quinina, efedrina, atropina, drogas utilizadas no tratamento de câncer (vimblastina, vincristina, taxol), os antibióticos, inibidores de enzima (VERPOOTE, 1998; LAWRENCE, 1999; STROHL, 2000; BARREIRO e FRAGA, 2001).

Atualmente a natureza continua sendo a maior fonte de medicamentos para a humanidade. Estima-se que 41% dos medicamentos disponíveis na terapêutica moderna tenham sido desenvolvidos a partir de fontes naturais, 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais (COWAN, 1999; CRAGG, 1997; HARVEY, 2000).

No Brasil, os produtos naturais merecem destaque devido à ampla biodiversidade que existe em seu território. Estima-se que 20% do patrimônio genético mundial esteja concentrado em território nacional, onde o índice de endemismo de plantas, anfíbios, peixes, insetos, além de milhões de espécies de microrganismos é altíssimo. Desta forma, o país torna-se um celeiro para a busca de nova substância com atividades farmacológicas (PINTO *et al.*, 2002).

## **2.2 Produtos Naturais Envolvidos na Atividade Biológica**

Os organismos vivos podem ser considerados como um “arsenal” biossintético no que se refere à síntese de compostos químicos (carboidratos, proteínas, lípidios) utilizados como alimentos pelos animais inclusive o homem, como também pela síntese de uma infinidade de outras substâncias (glicosídeos, alcalóides, terpenóides), as quais estão relacionadas com as propriedades terapêuticas dos princípios ativos extraídos de plantas e animais (ROBBERS *et al.*, 1997).

O crescimento da maioria dos organismos vivos ocorre às custas do consumo de fontes de carbono simples ou complexas de alto peso molecular, o conjunto destas reações chama-se metabolismo. Este processo requer a ação de enzimas específicas, as quais garantem uma certa direção das reações, estabelecendo o que se denomina de rotas metabólicas. Os compostos químicos formados, degradados ou simplesmente transformados denomina-se de metabólitos e as reações enzimáticas envolvidas, são designadas de anabólicas, catabólicas ou de biotransformação, respectivamente (SIMÕES *et al.*, 2000).

As atividades metabólicas interdependentes fazem parte do denominado metabolismo primário. Os compostos e enzimas do metabolismo primário desempenham um papel bem definido e essencial na manutenção do crescimento e reprodução do organismo (SIMÕES *et al.*, 2000).

Vegetais, microrganismos e, em menor escala animais, são capazes de produzir, transformar e acumular uma série de outras substâncias não necessariamente essenciais para o seu crescimento e metabolismo reprodutivo, estes compostos são denominados de metabólitos secundários. Embora não sendo essenciais para o organismo produtor, os metabólitos secundários garantem vantagens para sua sobrevivência e perpetuação de sua espécie no seu ecossistema (SIMÕES *et al.*, 2000).

O metabolismo secundário compreende uma das maiores classes de produtos naturais. Aproximadamente 20 % de todos os produtos naturais conhecidos são classificados como alcalóides. Outros produtos naturais usados na área farmacêutica são oriundos de compostos fenólicos, quinonas, flavonóides, taninos, cumarinas, terpenóides, óleos essenciais (CALDENTEY e HILTUNEM, 1996).

Os metabólitos secundários têm estruturas químicas diversas. Estes compostos costumam ser produtos característicos de um grupo particular de organismos. São sintetizados através de múltiplos passos, a partir de precursores que são usualmente intermediários do metabolismo primário. Os vários passos da biossíntese dos metabólitos secundários são catalisados por enzimas específicas. A regulação da atividade no nível destas enzimas são fatores importantes no controle na biossíntese do metabólitos secundários. As enzimas do metabolismo secundário podem ser divididas em duas classes: enzimas altamente específicas, envolvidas na formação da base do esqueleto do composto; e as enzimas envolvidas na modificação da base da estrutura. Dehidrogenases, monoxigenase e metil-transferase são exemplos pertencentes a grupos de enzimas finais (CALDENTEY e HILTUNEM, 1996).

### 2.3 Agentes Antimicrobianos Derivados de Produtos Naturais

A definição do termo antibiótico tem história. O termo inicial proposto foi em 1889 por Vuillemin. Este cientista propôs o termo “antibiose” que significa antagonismo dos seres vivos, o que vai “contra a vida”. Meio século após, em 1942 Waksman propôs a palavra antibiótico. O conceito mais formal define como antibiótico uma substância química que é produzida por um microrganismo e que, em baixa concentração possui a capacidade de inibir ou matar, seletivamente outros microrganismos. Essa definição exclui substâncias que quando puras ou em altas concentrações têm uma potente ação antimicrobiana como certos produtos metabólicos os ácidos orgânicos, peróxidos de hidrogênio e álcool. Também exclui os compostos sintéticos, estes são incluídos na categoria de “antimicrobiano” (GREENWOOD, 1997; ROBBERS *et al.*, 1997).

Em 1928, Alexander Fleming, descobriu acidentalmente as propriedades bactericidas da substância que se formava em um tipo de fungo, *Penicillium notatum*, o que daria a origem à penicilina e a toda uma nova classe de medicamentos. E em 1939 a penicilina foi finalmente isolada, e usada pela primeira vez em 1941 no tratamento de infecções. Com o advento do primeiro antibiótico – a penicilina, continuaram os esforços para encontrar novos antibióticos, com novas estruturas e com novas propriedades de ação. Na

Tabela 1, encontram-se alguns antibióticos importantes (TAVARES, 1984; PATRICK, 1995; BARREIRO E FRAGA, 2001).

Os antibióticos correspondem a 12% de todas as prescrições ambulatoriais nos Estados Unidos. Isso gera dispêndio de 15% dos 100 bilhões de dólares gastos anualmente com medicamentos. Atualmente existe cerca de 4.000 antibióticos conhecidos, sendo que desses a maioria é tóxico ou então os custos de produções são tão altos que impedem sua utilização, somente uns 50 são usados na realidade (WANNMACHER, 2004).

Há diversos métodos de classificar os antimicrobianos. Primeiro é quanto à origem, os antimicrobianos podem ser naturais, sintéticos ou semi-sintéticos. Segundo é o efeito, existem bacteriostáticos e bactericidas. Terceiro, é o seu espectro de ação, podem ser de amplo espectro, espectro intermediário e espectro reduzido. E por último são classificados segundo o mecanismo de ação, alguns agem inibindo a síntese da parede celular, outros inibe a síntese protéica e existem aqueles que inibem a síntese de DNA ou RNA (SILVA, 1999).

Tabela 1 – Descobertas dos antibióticos e as bactérias das quais foram extraídas as substâncias.

NOME	DATA DA DESCOBERTA	MICROORGANISMO
Penicilina	1929 – 40	<i>Penicillium notatum</i>
Tirotricina	1939	<i>Bacillu brevis</i>
Griseofulvina	1939	<i>Penicillium griseofulvum</i>
Estreptomícina	1944	<i>Streptomyces griseus</i>
Bacitracina	1945	<i>Bacillus lincheniformis</i>
Cloranfenicol	1947	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Polimixina	1947	<i>Bacillus polymyxa</i>
Framicetina	1947-53	<i>Streptomyces lavendulae</i>
Clortetraciclina	1948	<i>Streptomyces aureofaciens</i>
Cefalosporina C, N e P	1948	<i>Cephalosporium sp</i>
Neomicina	1949	<i>Streptomyces fradiae</i>
Oxitetraciclina	1950	<i>Streptomyces rimosus</i>
Nistatina	1950	<i>Streptomyces noursei</i>
Eritromicina	1952	<i>Streptomyces erithreus</i>
Espiramicina	1954	<i>Streptomyces ambofaciens</i>
Vancomicina	1956	<i>Streptomyces orientalis</i>
Kanamicina	1957	<i>Streptomyces kanamyceticus</i>
Ácido fusídico	1960	<i>Fusidium coccineum</i>
Lincomicina	1962	<i>Streptomyces lincolnensis</i>
Gentamicina	1963	<i>Micromonospora purpurea</i>
Tobramicina	1968	<i>Streptomyces tenebraeus</i>

A descoberta de uma nova substância antibacteriana costuma seguir uma longa trajetória até a sua aprovação como um novo antibiótico. Antes de produzi-lo em escala comercial, devem ser feitos estudos sobre propriedades químicas, físicas e biológicas. Outros fatores que devem ser levado em consideração são a estabilidade química, concentração inibitória mínima contra cepas de organismos patogênicos, manifestações tóxicas e atividade *in vitro* (ROBBERS *et al.*, 1997).

Com o advento dos antibacterianos destinados a medicina humana, veterinária, agricultura, tem-se observado os problemas de resistência a tais antibióticos, e progressivamente a vários outros (LEVY, 2001).

O desenvolvimento de resistência aos antibacterianos, é um fenômeno biológico natural que prosseguiu mediante mutação espontânea, uso inadequado e irracional de antibióticos e transferência horizontal de genes de resistência de um microrganismo a outro (LEVY, 2001).

A despeito da ampla disponibilidade de antibióticos em uso clínico, permanece indispensável à pesquisa contínua de novos agentes antibacterianos, uma vez que a combinação da versatilidade genética associada com uso irracional dos antibióticos, teve como conseqüência, o aumento da resistência bacteriana.

## **2.4 Metabólitos Secundários Sintetizados por *Chromobacterium violaceum***

### **2.4.1 Histórico**

Em 1882 *Compt Rendues d' Academie du Science*, publicou um artigo descrito por Boisbaudran, o qual relatou a formação de uma coloração violeta sobre um preparado à base de arroz, onde o autor referiu o microrganismo como sendo um “pequeno organismo” (BOISBAUDRAN, 1882). Esta

observação foi realizada em 1867, 15 anos antes do artigo ser publicado. Mais tarde, DeMoss definiu o “pequeno organismo” e o pigmento descrito por Boisbaudran, como sendo provavelmente a *Chromobacterium violaceum* e a violaceína respectivamente, por causa do espectro de absorção de luz visível registrado pelo próprio Boisbaudran (De MOSS, 1967).

No ano de 1880 em estudo independente, Bergozini fez uma descoberta acidental enquanto trabalhava com soluções de ovoalbumina na Universidade Moderna na Itália. Ele havia preparado, no final de março de 1880, muitas soluções de albumina de ovo para estudar “o mecanismo de retardamento da putrefação”, e neste experimento, ele esqueceu de descartar uma das soluções que servira de controle. No final do mês de abril, quando se deu conta do esquecimento, descrevera na amostra um aspecto fantástico. O pesquisador italiano reduziu o volume por evaporação e obteve uma solução de um fino filme muito denso de cor violeta. Inicialmente ele suspeitou da espécie *Cromococcus violaceus*, pois era o único microrganismo conhecido que produzira a coloração, entretanto esta possibilidade logo foi descartada devido à insolubilidade dos pigmentos. Após alguns testes, Bergonzini conclui que se tratava de uma nova espécie de bactéria, e nomeou-a de *Cromobacterium violaceum*, e publicou em 1881 a descoberta da nova bactéria “colorida” (BERGOZINI, 1881). Logo depois, Zimmerman corrigiu a ortografia de *Cromobacterium* dado por Bergozini para *Chromobacterium violaceum*, adicionando o ch ao nome (BALOWS *et al.*, 1992; BUCHANAN, 1918;

ZIMMERMAN, 1881). Entretanto, por um longo período a *Chromobacterium violaceum* era chamada de *Bacillus violaceus* (TOBIE, 1934). Hoje, o gênero, descrito por Sneath, é encontrado no Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergeys (HOLT E FRIEG, 1984).

A presença de *Chromobacterium violaceum* no Brasil, foi relatada no ano de 1976, quase um século depois da sua descoberta. Foram coletadas amostras de água da estação de tratamento na cidade de Manaus para análise bacteriológica, e os resultados indicaram a presença de colônias bacterianas: brancas e violetas. O Professor Wilson Chagas de Araújo, do Instituto Microbiológico da Universidade Federal do Rio de Janeiro, identificou as colônias violetas como sendo *Chromobacterium violaceum*. Foi a primeira vez que se isolou e estudou este microrganismo no Brasil (CALDAS, 1978; CALDAS *et al.*, 1978). A suspeita de que a violaceína seria um protetor da irradiação solar para a bactéria, foi reportada pelo Professor Caldas, quem iniciou uma série de estudos que demonstram o potencial fototerapêutico da violaceína (DURÁN E FALJONI-ALARIO, 1980). E a partir de então, muitos estudos têm sido realizados com esta bactéria.

No ano de 2000, devido o seu potencial biotecnológico, a bactéria *C. violaceum*, foi escolhida pelo Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) para ser o primeiro microrganismo a ter o seu genoma completamente seqüenciado por uma rede nacional de seqüenciamento, compreendendo 25 laboratórios

seqüenciadores, um centro de bioinformática e 3 laboratórios coordenadores distribuídos por todo o Brasil. A seqüência completa do seu genoma foi finalizada e publicada em 2002 (BRAZILIAN NATIONAL GENOMA PROJECT CONSORTIUM, 2003).

#### **2.4.2 Considerações sobre a Bactéria *Chromobacterium violaceum***

A bactéria *C. violaceum* é classificada como uma Beta-proteobactéria, família Neisseriaceae (BOONE E CASTENHOLZ, 2001), Gram-negativa, anaeróbia facultativa, com formato de bastonete, e dimensões de aproximadamente 0,5 a 1 µm por 2 a 3 µm (Figura 1). Locomove-se por meio de um flagelo polar e de vários flagelos laterais. Primariamente, a função do flagelo nessa espécie é a locomoção, mas em respostas quimiotáticas, em que a *C. violaceum* responde eficientemente para mudanças químicas na composição do ambiente, existe um talentoso sinal de transmissão entre complexos receptores e motores flagelares (PEREIRA *et al.*, 2004). Ocorre uma modulação na direção da rotação flagelar e conseqüentemente altera a direção do nado.

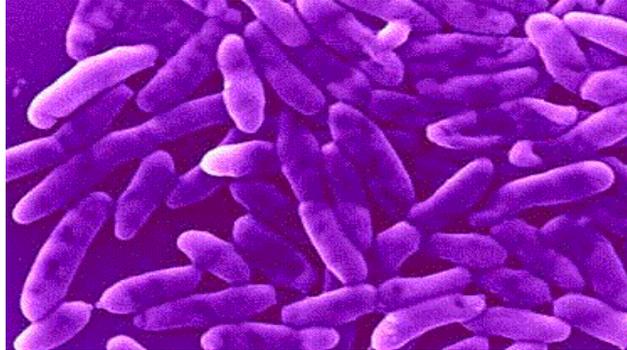


Figura 1- Micrografia eletrônica da *Chromobacterium violaceum*. Disponível em [www.unb.br/acsweb/imagens/bactéria1.jpg](http://www.unb.br/acsweb/imagens/bactéria1.jpg), acesso em: 17 janeiro de 2003.

A bactéria *C. violaceum*, é uma entre os milhões de espécies de microrganismos de vida livre, que popula o solo e águas ao redor do mundo em extensas áreas na biodiversidade tropical e subtropical, registrado geograficamente entre latitudes 35 graus Norte e 35 graus Sul (RICHARDS, 1993). No Brasil, a bactéria é encontrada em elevada abundância nas margens e águas do Rio Negro, sendo o maior componente da Bacia Amazônia (CALDAS, 1978; CALDAS *et al.*, 1978).

A *C. violaceum* é definida como uma bactéria saprófita, normalmente considerada não patogênica para humanos, mas ocasionalmente pode atuar como patógeno oportunista de animais e homens, causando septicemia fatal, ocasionando lesões na pele e/ou abscessos no fígado e pulmão (MIDANI, 1998; RICHARDS, 1993). Seu potencial patogênico foi descrito pela primeira vez por Wooley, em 1905, ao comprovar que este microorganismo causava infecções

fatais em búfalos d' água nas Filipinas por septicemia (WOOLEY, 1905). Posteriormente, verificou-se que esta bactéria pode também causar infecções em outros animais como porcos (LIU, *et al.* 1989; WIJEWANT e WEITTIMUM, 1969), macacos (COLLINS *et al.*, 1985; KUMAR *et al.*, 1999; McCLURE *at al.*; 1976), carneiro (CARRASCO *et al.*, 1996), e cães (GOGOLEWSKI, 1983).

Embora os relatos de contágio por *C. violaceum* em humanos serem escassos, deve-se alertar para o fato de que esta bactéria é encontrada freqüentemente na natureza e causa infecção grave, geralmente associado com uma alta taxa de mortalidade. Muitos pacientes, inicialmente apresentam febre, lesões cutâneas (abscessos), distensão do abdome, com um rápido progresso sistêmico. Investigação radiológica evidenciaram septicemia associada com abscessos em múltiplos órgãos como fígado, pulmão, baço e cérebro. Outras apresentações são celulites no local do trauma, infecções no trato urinário, linfadenites, osteomielites, sinusites, celulite orbital e meningites (MOORE *et al.*, 2001; CHOU *et al.*, 2000).

A porta de entrada para a contaminação com *C. violaceum*, deve ocorrer por pequenos traumas na pele como fraturas ou rachaduras, expostos anteriormente em solo ou águas estagnadas ou correntes com este microrganismo. Raramente ocorre por via oral, sendo mais comum em casos de pneumonia (DESJARDINS, 1999).

Acredita-se que em pacientes imunodeprimidos, acometidos por doença granulomatosa crônica, leucócito polimorfonuclear G6PD, infecção HIV e outras imunodeficiências, existem uma maior predisposição para infecção com *C. violaceum* (MACHER *et al.*, 1982; MANLOCK, 1987). Entretanto, essas generalizações são questionáveis, visto que já foi relatado um caso de infecção severa com *C. violaceum* em uma criança de 12 anos, que não apresentava imunodepressão (BILTON e JOHNSON, 2000).

O primeiro caso de infecção por *C. violaceum* em humanos, foi descrito em 1927, na Malásia (SNEATH *et al.*, 1953). Outros casos sérios e algumas infecções fatais foram reportados na Argentina, Austrália, Brasil, Cuba, Nigéria, Singapura, Taiwan, Estados Unidos, Vietnã, Sri Lanka, Índia, Senegal, Hong Kong e Itália (BALOWS, 1992; BLEREAU, 1980; BILTON e JOHNSON, 2000; CHONG e LAM, 1997; FARREL *et al.*, 1979; FOMBUENA *et al.*, 1998; GEOGHIOU *et al.*, 1989; HASSAN *et al.*, 1993; HIRAOKA *et al.*, 1999; HUFFAM *et al.*, 1998; JOHNSON *et al.*, 1971; KAUFMAN e SCHUGURENSKY, 1986; LEE *et al.*, 1999; MACHIN *et al.*, 1986; MARTIN e BRIMACOMBE, 1992; OGNIBENE e THOMAS, 1970; ONILE e ODUGBEMI, 1984; PETRILLO *et al.*, 1984; PONTE e JENKINS, 1992; ROBERTS *et al.*, 1997; SNEATH *et al.*, 1953; STARR *et al.* 1981, Ti *et al.*, 1993; WILKEY e McDONALD, 1983). Os casos de infecções até agora registrados, foram ocasionados por bactérias pigmentadas e não pigmentadas, deficiente na síntese de pigmento-violaceína (MILLER *et al.*, 1988). As espécies não pigmentadas são mais difíceis de identificar, devido à similaridade

bioquímica com as espécies *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas spp.* Portanto, a patogenicidade não parece estar associada à produção de pigmentos.

Os fatores que contribuem para a virulência da *C. violaceum* podem ser atribuídos aos lipopolissacarídeo da membrana plasmática ou a produção de metabólitos e enzimas que interferem com a função fagocitária do hospedeiro (SCHOROMM *et al.*, 2000; MILLER *et al.*, 1988; ZINS *et al.*, 2001).

A *C. violaceum* um organismo de vida livre e, como esperado, as vias metabólica central e intermediária desta bactéria incluem a síntese e catabolismo de todos os 20 aminoácidos, bem como os nucleotídeos purina e pirimidina. Além disso, possuem vias metabólicas para a síntese de uma ampla faixa de cofatores e vitaminas. É capaz de realizar a biossíntese de polissacarídeos complexos como celulose (mas não glicogênio) e também síntese e degradação de uma variedade de lipídeos, que são utilizados para a formação de membrana e armazenamento energético, incluindo triacilglicerol, fosfolipídeo e lipopolissacarídeo (BRAZILIAN NATIONAL GENOMA PROJECT CONSORTIUM, 2003).

A abundância notável de *C. violaceum* no Rio Negro, indica uma capacidade de resistir a uma ampla variedade de condições ambientais severas, incluindo a escassez de nutrientes, altas temperaturas, próximas de 37°C, sendo

incapaz de sobreviver a 4°C (EFTHIMION, 1969), altos níveis de radiação, e elevadas concentrações de agentes tóxicos, incluindo espécies reativas de oxigênio. A capacidade de sobrevivência da *C. violaceum* nestas condições ambientais, é facilitada pelo seu metabolismo versátil, capaz de utilizar uma ampla faixa de fontes de energia através do uso de oxidases e redutases apropriadas, o que permite também a sua capacidade de respiração aeróbia e anaeróbia (BRAZILIAN NATIONAL GENOMA PROJECT CONSORTIUM, 2003).

#### **2.4.3 Metabólitos, Pigmentos e Enzimas**

Os metabólitos secundários têm estruturas químicas diversas. Estes compostos costumam ser produtos característicos de um grupo particular de microrganismo. São sintetizados em condições bem definidas, através de múltiplos passos e com maior variedades de reações a partir de precursores intermediários do metabolismo primário.

A *Chromobacterium violaceum*, uma bactéria versátil, é responsável pela produção de uma diversidade ampla de metabólitos secundários com grande potencial biotecnológico. Esta bactéria tem sido objeto de estudo para muitos pesquisadores, devido principalmente à sua característica fenotípica marcante: a produção de um pigmento violeta, o qual caracteriza a coloração de suas

colônias. Desde 1867, este pigmento violeta, descrito como violaceína é objeto de atração de estudo.

Reilly e Pyne em 1927 foram os primeiros a estudar detalhadamente a estrutura química do pigmento violeta. Desde então, muitas propostas sobre a estrutura da violaceína foram reportadas e, mais tarde provadas incorretas (REILLY e PYNE, 1927). A dedução correta de sua estrutura ocorreu somente em 1958, na Universidade de Liverpool, por meio de estudos de síntese e degradação (BALLANTINE *et al.*, 1958). A estrutura química da violaceína (Figura 2) está bem definida e consiste de três porções: 5 - hidroxindol, oxindol e um anel pirrolidone na parte central da molécula. Existem outros metabólitos produzidos minoritariamente pela bactéria, como a desoxiviolaceína (Figura 3). Este pigmento parece ser ainda mais interessante que violaceína, mas pouco estudado devido a sua baixa produtividade. Desoxiviolaceína difere da violaceína, na porção 5-hidroxindol pela ausência do grupo hidroxila o que torna a molécula menos polar (HOSHINO E MOMEN, 2000).

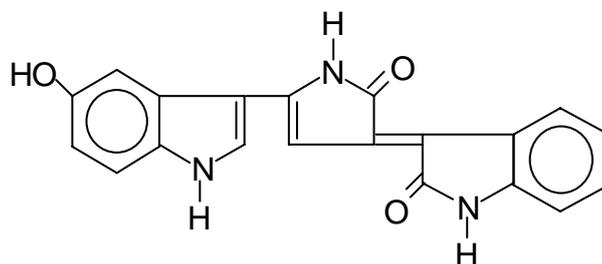


Figura 2 - Estrutura química da violaceína.

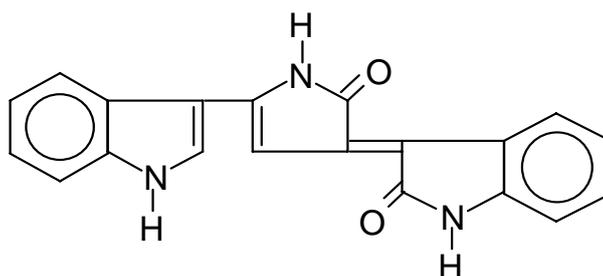


Figura 3 - Estrutura química da desoxiviolaceína.

Em estudos relacionados com a síntese de violaceína, observou-se que ao oxigenar culturas de *C. violaceum* houve um aumento significativamente na produção do pigmento, indicando uma relevância do oxigênio molecular para a síntese. Outros estudos demonstraram que, o pigmento é sintetizado a partir de duas moléculas de L-triptofano (HOSHINO e MOMEN, 2000).

Utilizando o L-triptofano marcado, com  $C^{14}$ , em diferentes posições, foi demonstrado que L-triptofano foi incorporado quase que totalmente à molécula da violaceína, exceto o carbono (C1), o qual é provavelmente retirado por descarboxilação durante a biossíntese do pigmento. Estudos posteriores, usando o triptofano marcado nas posições [2- $C^{13}$ ] e [3- $C^{13}$ ], revelaram que o átomo de carbonos do grupo 2-pirrolidone da violaceína é oriundo da cadeia lateral do L-triptofano (C1, C2, C3). Nesse mesmo trabalho, demonstrou que uma mudança do tipo 1,2 ocorre em um processo intramolecular para formar a porção esquerda (lado 5-hidroindol) do esqueleto da violaceína. Também foi verificado que a ligação C-C do C2 do anel indólico da cadeia lateral do triptofano foi completamente mantida para formar a porção direita (lado oxindole) da violaceína, indicando que o lado direito da molécula de triptofano é inteiramente incorporado à estrutura da violaceína sem nenhuma modificação. Durante a biossíntese, o carbono carboxílico é removido em um passo posterior, provavelmente após a condensação entre as cadeias laterais. Todos átomos de nitrogênio são originados exclusivamente do triptofano. A incorporação de átomos de oxigênio dentro da molécula de violaceína é catalisada por oxigenase e a hidroxilação, primeiro passo da biossíntese, na posição-6 na violaceína é mediada por uma monooxigenase (HOSHINO e MOMEN, 2000) mais especificamente pela enzima triptofano hidroxilase (LENTENDRE *et al.*, 1974). Outras enzimas foram isoladas e caracterizadas da

*C. violaceum*. Por exemplo, L-triptofano-2',3'-oxidase catalisa a formação de uma dupla ligação entre os carbonos C $\alpha$  e C $\beta$  do triptofano (GENET *et al.*, 1995).

Geneticamente, a via de biossíntese de violaceína proposto por August (Figura 4) é codificada por um conjunto de quatro genes, denominados de *vioABCD* organizados em um operon, encontrados em um fragmento de DNA de 8 Kpb. Os genes *vioA*, *vioB*, *vioC* e *vioD* possuem 1254 pb, 2994 pb, 1287 pb e 1119 pb respectivamente. A síntese da violaceína encontra-se em estágio avançado de análise, uma vez que o uso desses fragmentos de DNA permitiu a forte expressão heteróloga de violaceína em *E. coli*, pela obtenção de colônias violeta (PEMBERTON, 1991).

A análise da seqüência dos genes da violaceína (Figura 4) , indica que o *vioA*, *vioC* e *vioD* codificam para monooxigenases e o *vioB* é uma policetídeo sintase, enzima que catalisa a formação de ligação peptídicas sem participação de ribossomo. Esta enzima é encontrada em microrganismos que sintetizam antibióticos (Augusto *et al.*, 2000).

Em estudos com radioisótopo, sugeriu-se que além do L-triptofano, a *C. violaceum* é capaz de sintetizar violaceína a partir do ácido 3-indol acético, metabólito precursor de L-triptofano (DURÁN *et al.*, 1994).

Têm sido propostos vários compostos intermediários da biossíntese da violaceína, como ácido cromopirrólico, proviolaceína, prodeviolaceína, oxiviolaceína e outros (HOSHINO e MOMEN, 2000). Contudo, a via de biossíntese de violaceína e seus intermediários não estão completamente elucidados. Estudos prévios demonstraram que, por fazerem parte do metabolismo secundário, a produção de violaceína e intermediários é grandemente favorecida por baixas concentrações de carbono ou substratos de baixo rendimento energético, como glicerol, manitol e amido, o qual não é metabolizado pela bactéria. Condições que favoreçam um grande crescimento celular, desfavorecem a biossíntese de violaceína (ANTÔNIO, 1994). Observou-se que a produção de pigmentos minoritários ocorre concomitantemente à produção de violaceína, utilizando glicerol como fonte de carbono (CARIS, 2003).

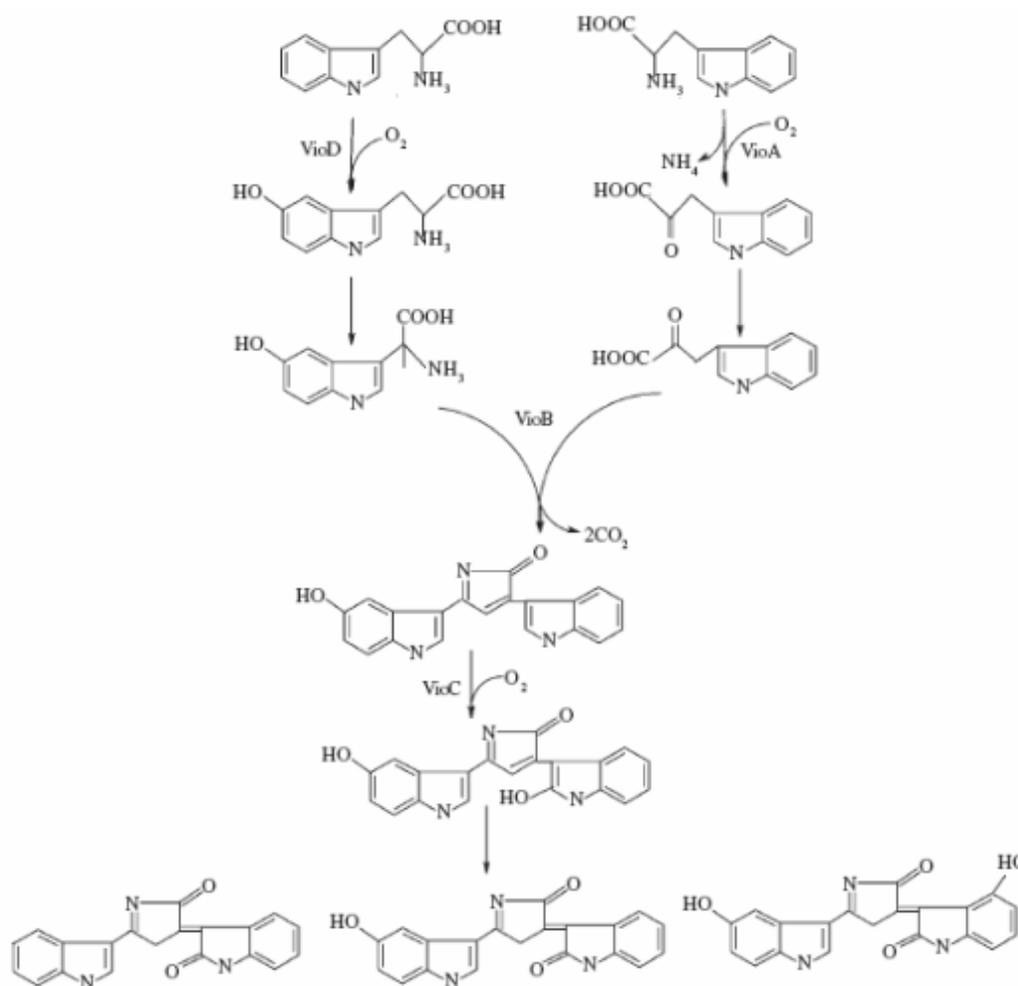


Figura 4 – Via de biossíntese de violaceína (August *et al.*, 2000). Observe a localização dos produtos dos genes *vioD*, *vioA*, *vioB*, e *vioC* que constituem o operon *vioABCD*, na via de biossíntese da violaceína.

O papel fisiológico da violaceína para a bactéria permanece desconhecido, sabe-se que o pigmento é produzido quando a bactéria é cultivada em aerobiose. A partir da determinação do alto coeficiente de extinção molar da violaceína ( $\epsilon = 1,7 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,  $\lambda = 570 \text{ nm}$ ) e baixa solubilidade em água, sugeriu-se que o pigmento estivesse envolvido na proteção contra efeitos da radiação solar sobre o microrganismo. Outros

estudos sugeriram ainda que o pigmento poderia estar relacionado à regulação da concentração de triptofano, uma vez que este aminoácido em altas quantidades seria tóxico para a bactéria. A produção de violaceína poderia então, estar envolvida na regulação da concentração de triptofano, mantendo os níveis adequadamente baixos (DeMOSS, 1967; DURÁN e FALJONI-ALARIO, 1980).

A expressão de muitas características fenotípica em fase tardia de crescimento nas bactérias Gram-Negativas, como as diferenciações celulares, produção de metabólitos secundários e exoenzimas, são fenômenos dependentes de densidade celular mediado por um complexo sistema de comunicação celular, processo conhecido como “quorum sensing”. A sinalização é intercelular e se processa através de um sinal molecular. A molécula de sinalização é uma N-acil homoserina lactona, qual tem um baixo peso molecular, e sua concentração extracelular está relacionada com a densidade populacional das bactérias. Esta molécula sinalizadora, controla a expressão de diversas funções fisiológicas da bactéria (WHITEHEAD, 2001).

A sinalização é transmitida em função das flutuações ambientais, como diferenças de pH, temperatura, disponibilidade de nutrientes e outras. Este fenômeno ocorre, porque as bactérias têm desenvolvido múltiplos sistemas que permitem a sua adaptação ao ambiente. Existe uma extensa gama de

microrganismo que tem a capacidade de perceber e responder à presença de populações vizinhas (WHITEHEAD, 2001).

Alguns trabalhos têm mostrado que, a produção de violaceína em *C. violaceum*, é induzida pela presença de moléculas de N-acil homoserina lactonas. Estudos com mutantes de *C. violaceum* deficientes na produção de violaceína provaram que o *quorum sensing* é um mecanismo regulatório gênico (BLOSSER, 2000).

Estudos têm confirmado a importância dos metabólitos produzidos pela *C. violaceum*. Alguns são de grande interesse, como os potenciadores de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos glicopeptídeos SQ28,504 e SQ28,546, os quais possuem ação especificamente com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos contra bactéria Gram-negativa. Antibióticos como aerocianidim, aerocavin, exibem atividade *in vitro* contra bactéria Gram-negativa e Gram-positiva e foi encontrado gene responsável pela síntese do antibiótico fenazine. Outra substância que inibe o crescimento de bactéria Gram-negativa é o 3,6-Diidroxi-indoxazene (também chamado de Y-T0678H, ou 6-Hidroxi-3-oxo-1,2-benzisoxazole). Nessa bactéria, observou-se a produção do antitumoral depsipeptídeo FR901228, sendo novo membro de agente antineoplástico, como também, monobactama SB-26.180. Foi isolado da *C. violaceum* um inibidor de carboxipeptidase e aminopeptidase, o arfamenine B (DURÁN e MENCK, 2001).

A *C. violaceum* tem sido caracterizada como um microrganismo produtor de exopolissacarídeo. O seu genoma mostrou a presença de genes necessários para a biossíntese de celulose, organizados em um provável operon (BRAZILIAN NATIONAL GENOMA PROJECT CONSORTIUM, 2003).

A produção de polihidroxicanoatos (PHA) é outra característica importante observada em culturas de *C. violaceum*. Os PHAs são depositados intracelularmente na forma de grânulos como reservatórios de carbono e energia (KOLIBACHUK *et al.*, 1999).

Verificou-se nesta bactéria a presença de cianeto. A síntese do cianeto tem como precursor glicina e estimulador metionina (RESSLER *et al.*, 1973).

#### **2.4.4 Potencial Biotecnológico**

Lichstein e Van de Sand foram os primeiros em avaliar a possível atividade antibiótica da violaceína (LISCHSTEIN e VAN de SAND, 1945). Foram realizados testes de atividade antibiótica sobre 51 espécies de bactérias, e de fato o pigmento exibiu um notável efeito inibitório no crescimento de bactérias Gram-positivas e efeito moderado sobre crescimento de bactérias Gram-negativas (LISCHSTEIN e VAN de SAND, 1945; De MOSS, 1967). Em estudos subseqüentes com extratos purificados de violaceína, mostraram que o pigmento possui uma igual eficiência contra os dois grupos de bactérias

(DURÁN e ERAZO, 1983). Violaceína exibiu atividade antifúngica contra *Rosellinia necatrix*, fungo fitopatogênico de amoreira (SHIRATA, 2000) e, também mostrou atividade antibacteriana *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis*, em concentrações comparáveis àquelas descritas na literatura para pirazinamida, fármaco empregado no tratamento de tuberculose (De SOUZA, 1999).

Além da atividade bactericida, vários trabalhos atribuíram propriedade tripanossomicida a violaceína. Este pigmento demonstrou atividade contra *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuen-chilena), sendo que a cepa Y (brasileira) mostrou-se três vezes mais resistente que a Tulahuen. No entanto, quando ratos foram inoculados intraperitonealmente com formas tripomastigotas de *T. cruzi* cepa Y, e depois tratados com violaceína e seus derivados, foi obtido somente 4% de redução da parasitemia. Infelizmente os dados revelam uma baixa atividade tripanocida *in vivo* de violaceína e alguns de seus derivados quimicamente produzidos (DURÁN *et al.*, 1989; HAUN *et al.*, 1992).

Estudos sobre toxicidade e citotoxicidade referente ao pigmento violaceína com linhagem de fibroblastos V79, utilizando as metodologias de redução de MTT, conteúdo de ácido nucleico e neutral red, demonstraram uma atividade altamente citotóxica, o que motivou a realização de estudos da potencial utilização desse composto como antitumoral. Os resultados obtidos foram excelentes em culturas de células de leucemia, linfomas, pulmão, colón e

em linfomas relacionados a AIDS. A citotoxicidade da violaceína em culturas de células processa-se através de apoptose e não de necrose, conforme demonstrado pelo método de Tunel e da reação de Feulgen acoplado à análise de imagem. O processo apoptótico foi retratado pelas mudanças morfológicas ocorridas no núcleo, incluindo condensação da cromatina e degradação de conteúdo de ácidos nucleicos, via ativação de endonucleases (MELO *et al.*, 2000).

Na tentativa de aumentar concomitantemente a solubilidade e atividade biológica da violaceína, foram propostas modificações nas propriedades físico-químicas na violaceína pela complexação com  $\beta$ -ciclodextrina (oligossacarídeo cíclico, constituído de 6, 7 ou 8 unidades de glicose). Estes estudos mostraram que, a violaceína associada a  $\beta$ -ciclodextrina induz apoptose em leucemia promielocítica em linhagem celular HL60. O complexo formado, violaceína- $\beta$ -ciclodextrina, além de aumentar a solubilidade do pigmento, aumenta também a estabilidade e absorção celular (MELO *et al.*, 2003). Estes resultados fornecem a base para uma potencial aplicação na terapia do câncer. Outra estratégia adotada para aumentar a atividade biológica e, reduzir a toxicidade de violaceína foi realizar pequenas alterações na estrutura da molécula pela transformação com uso direto de enzimas peroxidases e oxidases. No entanto, em testes preliminares, a biotransformação da violaceína apareceu ser menos

citotóxica, indicando um decréscimo na atividade antitumoral (DURÁN e BROMBERG, 2001).

Uma mistura de violaceína contendo 10% de deoxiviolaceína, apresentou atividade antiviral, protegendo as células HeLa contra infecção com o vírus Herpes Simplex e Polio (MAY *et al.*, 1991).

## 2.5 *Staphylococcus aureus*

O nome *Staphylococcus* deriva do termo grego significando cocos semelhantes a uvas. Este nome é apropriado, porque a disposição celular destes cocos assemelha-se a um cacho de uva, embora esta seja a maior característica dos estafilococos cultivados em ágar (TRABULSI *et al.*, 1990).

A bactéria *Staphylococcus aureus* são cocos Gram-positivos, com 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, imóveis, anaeróbios facultativos, catalase-positiva, e capazes de crescer em um meio contendo 10% de cloreto de sódio e em uma temperatura que varia de 10° a 40°C. Em geral, estas bactérias são amplamente distribuídas na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas de mamíferos e aves (TRABULSI *et al.*, 1990; MURRAY *et al.*, 1992).

A bactéria *S. aureus* representa a espécie geralmente envolvida em infecções humanas, tanto de origem comunitária quanto hospitalar, sendo,

conseqüentemente, a mais extensivamente estudada. As espécies coagulases negativas são, hoje, também consideradas como importantes causas de infecção, particularmente no ambiente hospitalar, em pacientes com as defesas orgânicas comprometidas ou portadores de corpos estranhos, tais como prótese, cateteres e enxertos sintéticos (TRABULSI *et al.*, 1990).

Em pacientes debilitados por doenças crônicas, traumas físicos, queimaduras ou imunossupressão, este microrganismo pode causar infecções mais graves. Entre as infecções profundas destacam-se, a bacteremia, a endocardite, a pneumonia e, ocasionalmente, a meningite e artrite bacteriana (TRABULSI *et al.*, 1990; BROOKS *et al.*, 1999).

As células de *Staphylococcus aureus* apresentam alguns componentes de superfície, assim como produzem várias substâncias extracelulares, que contribuem para a sua virulência tais como: cápsula, ácidos tecóicos, proteína A, adesinas, enzimas e toxinas extracelulares, hemolisina e leucocidina (TRABULSI *et al.*, 1990).

Embora o *Staphylococcus aureus* possa ser suscetível à ação de vários fármacos ativos contra bactérias Gram-positivas, tais como: penicilina, cefalosporina, eritromicina, aminoglicosídeos, tetraciclina e cloranfenicol, é também conhecida pela sua elevada capacidade de desenvolver resistência a diversas delas. A resistência apresentada por esta bactéria é atribuída à

produção de enzimas capazes de inibir a ação de fármacos (TRABULSI *et al.*, 1990; MURRAY *et al.*, 1992).

## 2.6 *Pseudomonas aeruginosa*

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, caracteriza-se por ser bacilo Gram-negativo reto ou ligeiramente curvo, móvel através de flagelos polares. Este microrganismo é capaz de utilizar poucos carboidratos, (glicose, ribose, gluconato) por metabolismo oxidativo, mas não por metabolismo fermentativo. Uma das características mais notável da espécie é a capacidade produzir um pigmento azul-esverdeado, denominado piocianina. No entanto, nem todas produzem este pigmento. Normalmente habita os solos, águas e parasitas vegetais. Pode ser encontrada na pele e tem sido isolada das fezes e garganta (TRABULSI *et al.*, 1990).

A *P. aeruginosa* é uma bactéria tipicamente oportunista, que pode causar várias doenças. As infecções localizadas, em consequência de processos cirúrgicos ou queimaduras, podem resultar em bacteremias severas. Infecções urinárias, associadas ao uso de cateteres, são freqüentes. Os portadores de fibrose cística são, em sua maioria, colonizadas por *P. aeruginosa*. Pneumonias graves podem também ocorrer em pacientes que usam respiradores contaminados por esta bactéria (TRABULSI *et al.*, 1990; MURRAY *et al.*, 1992; BROOKS *et al.*, 1999).

A *P. aeruginosa* produz uma série de substâncias que poderiam participar da patogênese da infecção. A toxina A é a mais tóxica, tendo mecanismo de ação idêntico da toxina diftérica, isto é, bloqueia a síntese protéica, inibindo o fator de alongamento EF-2 (MURRAY *et al.*, 1992).

A bactéria *P. aeruginosa* é naturalmente resistente a vários antibióticos, esta bactéria pode adquirir resistência a qualquer agente terapêutico, através de mutações ou da aquisição de plasmídeos de resistência. Recomenda-se a realização do antibiograma para seleção do antibiótico a ser usado no tratamento (TRABULSI *et al.*, 1990).

## 2.7 *Klebsiella pneumoniae*

A bactéria *Klebsiella pneumoniae*, pertence à família *Enterobacteriaceae*, a maior e mais heterogênea coleção de bacilos Gram-negativos importante na medicina. Esta bactéria tem formato de bacilo, de tamanho moderado, móveis com flagelos peritríquios, fermentam lactose e possuem uma cápsula proeminente responsável pela aderência mucóide das colônias isoladas e que estimulam a virulência dos organismos *in vivo*. A patogenia esta associada também a endotoxina, antígenos O, K, H e fímbrias (TRABULSI *et al.*, 1990; MURRAY *et al.*, 1992).

Os *Enterobacteriaceae* são organismos ubíquos encontrados em todo o mundo no solo, água, vegetação, e fazem parte da microbiota normal de quase todos os animais, incluindo os seres humanos (MURRAY *et al.*, 1992).

A *K. pneumoniae* é encontrada normalmente nos intestinos. É um dos poucos bacilos Gram-negativos que causam pneumonia lobar. Os alcoólatras são particularmente sensíveis a infecção. A pneumonia geralmente se localiza nos lobos superiores, acompanhando-se de necrose que pode levar a formação de cavidades. A bactéria é também encontrada em associação com infecções do aparelho urinário, endocardites e vários tipos de infecções pós-cirúrgicas. Algumas estatísticas demonstram que a *K. pneumoniae* pode ser responsável por 10% das infecções hospitalares (TRABULSI *et al.*, 1990; MURRAY *et al.*, 1992).

## CAPÍTULO III

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Linhagens Bacterianas Empregadas

##### 3.1.1 Para Produção de Pigmentos

– *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472

##### 3.1.2 Para Avaliação da Atividade Antibiótica

– *Staphylococcus aureus* ATCC25923

– *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853

– *Klebsiella pneumoniae* – fornecida pelo Laboratório de Análises Clínicas da UFSC.

Estoques destas bactérias foram mantidos em suspensão de meio LB, contendo glicerol 10% (v/v) a -20°C.

#### 3.2 Meios de Cultura

### 3.2.1 Meio Luria Bertani (LB)

Tabela 2 - Composição do Meio Luria-Bertani - LB (SAMBROOK et al, 1989)

COMPONENTES*	CONCENTRAÇÃO (g.L <sup>-1</sup> )
Triptona	10,0
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de sódio	5,0

\*Componentes obtidos da BIOLIFE.

O meio LB (Tabela 2) foi usado para manutenção, cultivo, preparo de inóculo e produção de metabólitos secundários por *C. violaceum*.

### 3.2.2 Meio Infuso de Cérebro e Coração de Boi (BHI)

O meio BHI (Tabela 3) foi usado para manutenção e cultivo das bactérias nos ensaios de atividade biológica.

Tabela 3 - Composição do Meio Infusão Cérebro-Coração (BHI - Brain Heart Infusion)\*

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO (g.L <sup>-1</sup> )
Peptona de gelatina	10,5
Infuso de cérebro e coração	6,0
Peptona de carne	11,0
Dextrose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato bibásico de sódio	2,5

\*Meio obtido do laboratório BIOBRÁS Diagnósticos

Todos os meios foram esterilizados em autoclave por 15 minutos, 121°C a 1,0 atm.

### **3.3 Preparo do Pré-inóculo de *C. violaceum***

Utilizou-se Erleymeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio LB e adicionou-se 250 µL de cultura em estoque. A cultura foi incubada a 30 °C, em agitador orbital, a 150 rpm, durante 24 horas.

### **3.4 Efeito das Condições de Cultivo sobre o Crescimento e Produção de Pigmentos por *C. violaceum***

Para os estudos dos efeitos de algumas condições experimentais (fonte carbono: glicerol ou glicose ou grãos de arroz, em meio líquido ou sólido) sobre a produção de pigmentos por *C. violaceum*, os experimentos descritos a seguir foram realizados pelo menos em triplicata. Para os experimentos realizados em meio sólidos foram preparadas 20 placas para cada condição.

#### **3.4.1 Efeito da Glicose Sobre a Produção de Pigmentos por *C. violaceum***

##### **3.4.1.1 Em Meio Líquido**

Foi preparado 350 mL de meio LB com 1% de glicose (m/v) em Erleymeyer de 1000 mL, aos quais foram adicionados 3,5 mL de pré-inóculo. O frasco foi incubado a 30 °C em agitador orbital, a 150 rpm, durante 72 horas, para proporcionar a máxima produção de massa celular pigmentada.

#### **3.4.1.2 Em Meio Sólido**

Vinte mililitros de meio LB, contendo 1,5 % (m/v) de ágar-ágar e glicose 1% (m/v) previamente esterilizada foram distribuídos assepticamente em placas de Petri. Após a solidificação do meio, adicionou-se 100 µL do pré-inóculo à superfície das placas. O pré-inóculo foi espalhado com auxílio da alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 30 °C em estufa por 72 horas.

#### **3.4.2 Efeito do Glicerol Sobre a Produção de Pigmentos por *C. violaceum***

##### **3.4.2.1 Em Meio Líquido**

Foi preparado 350 mL de meio LB, contendo glicerol 1% (v/v) em Erleymeyer de 1000 mL, aos quais foram adicionados 3,5 mL de pré-inóculo. O frasco foi incubado a 30 °C em agitador rotativo a 150 rpm durante 72 horas, para proporcionar a máxima produção de massa celular pigmentada.

##### **3.4.2.2 Em Meio Sólido**

Vinte mililitros de meio LB, contendo 1,5 % (m/v) de ágar-ágar e glicerol 1% (v/v), previamente esterilizados, foram distribuídos assepticamente em placas de Petri. Após a solidificação do meio, adicionou-se 100 µL do pré-inóculo à superfície das placas. O pré-inóculo foi espalhado com auxílio da alça

de Drigalski. As placas foram incubadas a 30 ° C em estufa por 72 horas, para proporcionar a máxima produção de massa celular pigmentada.

### **3.4.3 Cultivo sobre Grãos Arroz**

Em Erlenmeyers de 125 mL foram pesados 10 g de grãos de arroz, aos quais foram adicionados 10 mL de caldo de peptona 0,5% (m/v), esterilizados em autoclave. Após este procedimento foram acrescentados 2 mL de pré-inóculo, sendo mantido em agitador orbital a 150 rpm durante 72 horas a 30 °C.

## **3.5 Extração dos Metabólitos Produzidos por *C. violaceum***

### **3.5.1 Dos Meios Líquidos**

Ambas as culturas celulares dos meios líquidos com diferentes fontes de carbono, glicose e glicerol, foram centrifugadas a 8000 rpm, 4 °C, por um período de 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante e recolheu-se a massa celular, que foi seca por 6 dias a 50 °C, e então pesada. Posteriormente, a massa celular seca foi levada a um extrator Soxhlet para extração dos pigmentos, utilizando-se como solvente metanol.

### 3.5.2 Dos Meios Sólidos

Após o cultivo, as placas contendo a massa celular pigmentada dos meios LB + glicose e LB + glicerol, foi coletada pela raspagem superficial. Das placas com auxílio de espátula. Posteriormente a massa foi colocada para secar a 50 ° C por 6 dias, e finalmente pesado para determinar a massa celular.

Quando grãos de arroz foram utilizados como substrato para a produção de pigmento, os Erlenmeyers contendo os grãos pigmentados foram adicionados 50 mL de metanol e mantido sob agitação a 150 rpm, 30 ° C por 3 horas. Por fim, filtrou-se o meio em papel filtro, obtendo o extrato bruto de pigmento.

### 3.5.3 Extração Fracionada

Tendo-se definido a melhor condição de cultivo para a produção de pigmento por *C. violaceum*, a produção foi ampliada e a extração e isolamento dos metabólitos pigmentados foi realizada por extração fracionada. Neste procedimento utilizou-se o extrator Soxhlet, no qual a massa celular pigmentada seca foi extraída com três solventes com polaridade crescente. Primeiramente foi realizada extração com éter etílico, seguida de extração com clorofórmio e finalmente por metanol, por 72 horas para cada solvente. Foram

utilizados aproximadamente 100 mL de cada um dos solventes, para cada 5 g de massa celular pigmentada.

Os extratos coloridos (metanólico e etéreo) foram concentrados, e utilizados posteriormente nos ensaios de atividade biológica. O extrato etéreo foi evaporado, e o pigmento obtido foi novamente solubilizado em metanol para então ser utilizado nos testes de atividade antibiótica.

### **3.6 Análise Cromatográfica dos Metabólitos Pigmentados Produzidos por *C. violaceum***

Inicialmente os diferentes compostos presentes no extrato metanólico bruto, obtidos por extração em aparelho Soxhlet ou extração simples foram submetidos à análise por cromatografia de camada delgada (CCD). Para este procedimento, foram utilizadas placas analíticas de alumínio, cobertas com sílica gel 60, com 0,2 mm de espessura (Alugram<sup>®</sup>filG). As placas foram aplicadas alíquotas dos diferentes extratos. Procedeu-se a cromatografia utilizando-se, como fase móvel, sistemas de solventes de polaridade variada, visando definir-se qual proporcionaria a melhor separação entre os componentes do extrato bruto, bem como, verificar a pureza dos componentes isolados através de cromatografia de coluna. A Tabela 4 apresenta os sistemas de solventes empregados neste estudo.

Tabela 4 – Sistemas de Solventes utilizados em CCD

<b>Sistema de Solvente*</b>	<b>Proporção (v:v)</b>
Metanol	-
Acetato de etila	-
Metanol/ Acetato de etila	1:1
Metanol/ Acetato de etila	2:1
Acetato de etila/Metanol	1:1
Acetato de etila/Metanol	2:1
Acetato de etila/Metanol	3:1
Acetato de etila/Éter de petróleo	2:1
Acetato de etila/Éter de petróleo	3:1

\*Solventes P.a, marca VETEC

Uma vez definido por CCD, o solvente que proporcionou a melhor separação entre os constituintes do extrato, estes foram colocadas em colunas cromatográficas a fim de separar e coletar os diferentes pigmentos. Para isso, foi utilizada uma coluna de vidro com 50,0 cm de comprimento por 6 cm de diâmetro, preenchida com 71,0 g de gel de sílica 60 (0,05-0,02 mm), ativado com 150,0 mL de solvente definido na CCD. A seguir cada fração coletada foi monitorada com uso de CCD (procedimentos descrito anteriormente, mas utilizando o solvente já definido) para identificar a pureza das amostras. Com a detecção da pureza das frações concentradas, estas foram submetidas a secagem. Sendo que para seca-las foi adotado o procedimento de evaporação do solvente. Posteriormente, seguiu-se ao preparo dos ensaios da atividade antibiótica com os pigmentos isolados.

### 3.7 Preparo das Frações para os Teste de Atividade Antibiótica

Após evaporação dos solventes em evaporador rotatório, cada um foi pesado e solubilizado em metanol, para se obter uma solução na concentração de 3 mg/mL. As soluções foram esterilizadas por filtração, utilizando-se filtros esterilizantes com porosidade de 0,2  $\mu\text{m}$  (MILLIPORE®). Todas as amostras foram protegidas da luz e mantidas a 4 °C para evitar a oxidação e decomposição das mesmas.

Nas frações nas quais foram detectadas violaceína foram realizadas leituras da absorbância em 570 nm. Para calcular a concentração de violaceína considerou-se o valor de  $\epsilon = 1,7 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (DeMOSS, 1967).

### 3.8 Atividade Antibiótica

Com o objetivo de testar a atividade antibiótica dos diferentes metabólitos isolados, foram realizados testes de susceptibilidade, como descritos por Stanlos e Thornsberry (1975). Utilizou-se para avaliar o potencial bactericida e/ou bacteriostático dos diversos pigmentos as seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*.

### **3.8.1 Determinação da Concentração Celular e do Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)**

A concentração celular de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, nos pré-inóculos, foi determinada através da construção de uma curva padrão por diluição seriada de cada linhagem, em solução salina (0,85% m/v). Para cada diluição, realizou-se leitura de absorbância em espectrofotômetro a 600 nm e correspondente contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) em placas. Deste modo obteve-se a correlação entre absorbância e o número de células em suspensão em uma determinada cultura.

### **3.8.2 Teste de Sensibilidade aos Metabólitos**

Para os testes de sensibilidade aos metabólitos, 2,5 mL de meio BHI concentrado (17%), foram distribuídos em tubos com tampas de rosca. Após esterilização, o volume de meio BHI foi completado pela adição de volume apropriado de cada um dos metabólitos a serem testados, e pré-inóculo de cada bactéria. As concentrações dos metabólitos testadas foram 0, 25 e 125 µg/mL. O volume de inóculo adicionado foi o adequado para se iniciar os testes com uma concentração celular aproximadamente igual a  $1 \times 10^6$  células/mL. Quando necessário água destilada esterilizada foi adicionada, para que todos os tubos tivessem o volume final de 3 mL. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37 ° C, por 24 horas, sob agitação orbital a 150 rpm.

Como referência de controle positivo para este experimento, o antibiótico cloranfenicol foi utilizado na concentração de 75 µg/mL para todas as bactérias. Testes com diferentes volumes de metanol foram realizados a fim de avaliar a toxidez do solvente.

Após o período de incubação das bactérias, cada tubo foi agitado em aparelho vórtex por aproximadamente 50 segundos. A partir desta suspensão bacteriana, uma alíquota de 10 µL de cada cultura foi recolhida e diluída em salina (0,85% m/V) na ordem 1/100 vezes. Para determinar o número de UFC, uma alíquota de 50 µL da suspensão diluída, foi espalhada em placas de Petri, contendo BHI ágar-ágar. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 37 °C. Após este período procedeu-se à contagem de UFC.

### **3.8.3 Determinação da Cinética de Inibição**

Nos resultados em que se obteve pelo menos 80% de inibição bacteriana, o ensaio de cinética bacteriana foi empregado utilizando a concentração correspondente para cada inibição.

Para avaliação da cinética de inibição do crescimento celular, 2,5 mL de meio BHI concentrado (17%), foram distribuídos em tubos com tampas de rosca. Após esterilização, o volume de meio BHI foi completado pela adição de volume apropriado de cada um dos metabólitos a ser testado, e pré-inóculo de

cada bactéria. Neste experimento a concentração de metabólito empregada, foi igual àquela capaz de proporcionar uma inibição de pelo menos 80% do crescimento celular, determinado pelo teste de susceptibilidade. O volume de inóculo adicionado foi adequado para se iniciar os testes com uma concentração celular aproximadamente igual a  $1 \times 10^6$  células/mL. Quando necessário água destilada esterilizada foi adicionada, para que todos os tubos tivessem o volume final de 3 mL. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a  $37^\circ \text{C}$ , por até 12 horas, sob agitação orbital a 150 rpm.

As amostras foram coletadas de 2 em 2 horas, totalizando um tempo de 12 horas. Para cada tubo fez-se a diluição apropriada de 1/100 vezes, e de cada diluição, foi recolhida 50  $\mu\text{L}$ , transferido para placas de Petri. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a  $37^\circ\text{C}$ , por 24 horas. Após este período, as colônias bacterianas foram contadas. Assim, foi estabelecida uma curva de sobrevivência.

### **3.9 Análise Estatística**

Os resultados referentes aos rendimentos dos pigmentos foram expressos como médias das triplicatas dos cultivos.

Os resultados da atividade antibiótica foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão das médias das UFC e, calculado a porcentagem de inibição em relação ao controle, o qual não teve adição de pigmento ou solvente.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alguns autores têm relatado que violaceína e ou extratos dos pigmentos produzidos por *C. violaceum* apresentam atividades biológicas importantes como: antibacteriana, antitumoral, antiviral e antiparasitária (CALDAS *et al.* 1978; MELO *et al.* 2000; MAY *et al.*, 1991; DURÁN *et al.*, 1989). Contudo, até o momento não há relatos das atividades biológicas da desoxiviolaceína, um dos vários pigmentos produzidos pela bactéria e com características químicas similares à da violaceína, porém menos polar. Observação semelhante pode ser feita com relação a outros metabólitos coloridos produzidos por *C. violaceum*. Alguns estudos mostram ainda que o extrato bruto dos pigmentos produzidos pela bactéria tem atividade antiparasitário maior que a violaceína purificada. Neste sentido, este estudo objetiva estabelecer condições de cultivo que propiciem o aumento da produção de pigmentos por *C. violaceum*, isolar novos metabólitos e testar suas atividades antibacteriana.

#### 4.1 Estudo da Fonte de Carbono

Com o objetivo de definir condições propícias para crescimento celular e síntese de pigmentos, por *C. violaceum*, foram realizados estudos dos efeitos da

utilização de duas fontes de carbono (glicerol e glicose), em meio líquido e sólido.

Nesse estudo, o crescimento celular foi expresso com a massa celular seca, produzida a partir de cultivos sob condições definidas. A produção de pigmentos foi expressa pela determinação da massa de pigmentos (violaceína e desoxiviolaceína) extraídos e isolados por cromatografia em coluna de sílica gel.

A análise dos resultados experimentais, apresentados na Tabela 5, mostram que o cultivo de *C. violaceum* em meio sólido (ágar LB), na presença de glicose 1% (m/v), proporcionou o maior crescimento celular, expresso em massa celular seca, sendo igual a 3,5 g.L<sup>-1</sup>. Nestas mesmas condições, a produção de violaceína e desoxiviolaceína foram iguais a 11,0 mg. L<sup>-1</sup> e 3,5 mg. L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Alguns estudos sobre a produção de pigmentos em meio líquido por *C. violaceum* utilizam glicerol como fonte de carbono (DeMOSS, 1967). Por este motivo, o efeito de glicerol como substrato, sobre a produção de pigmentos foi testado neste estudo tanto em meio líquido como em meio sólido. Observa-se, também na tabela 5, que no meio ágar LB, contendo glicerol 1% (v/v), obteve-se um crescimento celular de 2,9 g. L<sup>-1</sup> de massa celular seca, superior apenas ao crescimento (1,5 g. L<sup>-1</sup>) apresentado no meio LB líquido, na presença do mesmo substrato. Nas mesmas condições, observa-se ainda que ocorreu a maior

produção de pigmentos, sendo iguais a 80,0 mg. L<sup>-1</sup> e 18 mg. L<sup>-1</sup> de violaceína e desoxiviolaceína, respectivamente.

Os resultados apresentados Tabela 5, mostram que glicerol favorece a produção de pigmentos, quando comparado com a glicose e que, por outro lado glicose favorece o crescimento celular.

Tabela 5 – Meios de cultivos utilizados para a produção de pigmentos

Meios de Cultura	Peso Massa Seca (g.L <sup>-1</sup> )	Rendimento Violaceína (mg.L <sup>-1</sup> )	Rendimento Desoxiviolaceína (mg.L <sup>-1</sup> )	Rendimento Mistura (mg.L <sup>-1</sup> )
LB líq. + 1% glicose	3,0	nd	nd	nd
LB líq. + 1% glicerol	1,5	53,0	8,0	12,0
Suporte de arroz	nd	41,0	7,3	18,0
Ágar LB + 1% glicose	3,5	11,0	3,5	6,3
Ágar LB + 1% glicerol	2,9	80,0	18,0	16,0

nd - não detectável

Em estudos anteriores foi relatado que a *C. violaceum* foi isolada a partir de pasta umedecida de amido (BOISBAUDRAN, 1882), por esta razão, testou-se a produção de pigmentos utilizando-se grãos de arroz. O cultivo de *C. violaceum* sobre substrato levou a uma produção significativa de violaceína e desoxiviolaceína, sendo iguais a 41,0 mg. L<sup>-1</sup> e 7,3 mg. L<sup>-1</sup>, respectivamente. Embora nestas condições não tenha sido possível avaliar o crescimento celular.

Estes resultados reforçam a idéia de que a produção de pigmento também é sempre favorecida em meio sólido (Tabela 5).

Esses resultados confirmam as evidências experimentais, as quais demonstraram que a produção de violaceína é inibida em presença de glicose (ANTÔNIO, 1994). Este comportamento é esperado, desde que a glicose e outras fontes de carbono facilmente utilizáveis têm sido consideradas supressores da biossíntese de vários metabólitos secundários, tais como neomicina, bacitrocina, cefalosporinas, alcalóides de Ergot, penicilina e violaceína (DREW e DEMAIN, 1977).

O glicerol parece favorecer a biossíntese de violaceína e desoxiviolaceína e provavelmente de outros metabólitos secundários, por se constituir em uma fonte de carbono de menor rendimento energético. Enquanto a oxidação completa de um mol glicose pode render até 38 ATPs, sob condições aeróbias, um mol de glicerol renderia, no máximo 16 ATPs, sob as mesmas condições. A presença de glicose atua especificamente sobre os mecanismos de regulação metabólica, que estimulam o crescimento celular, mais que a produção de metabólitos secundários. Além disso, uma baixa disponibilidade de substratos energética, leva a uma resposta metabólica, mediada por moléculas chamadas de “*quorum sensing*”, que têm como função, regular a multiplicação celular, sob condições de estresse ou escassez de nutrientes. Trabalhos publicados têm mostrado que a produção de pigmentos por *C. violaceum*, é regulada pela

elevação da concentração de uma molécula sinal, a hexanoil homoserina lactona (HHL), a qual atua no nível de regulação de expressão gênica, estimulando não apenas a produção destes metabólitos, mas também de algumas enzimas, como quitinase e elastase (CHERNIN *et al.* 1998).

Cabe ressaltar que em meio sólido, a concentração de HHL será sempre maior, quer pelo efeito de solubilidade quer pelo estímulo de sua produção, induzido pela menor acessibilidade aos nutrientes, o que mimetiza escassez de nutrientes (CHERNIN *et al.* 1998).

Estas suposições são reforçadas pela observação de uma maior produção de pigmentos, quando *C. violaceum* foi cultivada sobre grão de arroz. Sabe-se que *C. violaceum* não é capaz da produção de amilases, sendo assim, não pode utilizar o amido como substrato (BRAZILLIAN GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003). Deste modo, os grãos de arroz tiveram como papel, sobre estímulo da produção de pigmentos, apenas de servir como suporte para o crescimento celular.

Os resultados apresentados mostram claramente ainda que: a produção de violaceína não está diretamente relacionada ao crescimento celular. Observou-se que as melhores condições para se obter maior crescimento celular não são as mesmas para a produção de pigmentos.

## 4.2 Extração e Isolamento dos Metabólitos Produzidos

Tendo-se estabelecido condições bastante favoráveis à produção de pigmentos por *C. violaceum*, iniciou-se estudos no sentido de extração dos metabólitos da massa celular seca.

### 4.2.1 Extrato Metanólico Bruto: Isolamento dos Constituintes e Caracterização Cromatográfica

Inicialmente fez-se uma extração simples em aparelho extrator do tipo Soxhlet, utilizando-se como solvente o metanol. Cabe salientar que os pigmentos produzidos por *C. violaceum* são de natureza hidrofóbica, sendo praticamente insolúveis em água. Devido à polaridade dos pigmentos, com a aplicação de metanol foi possível retirar da massa celular, um extrato bruto contendo violaceína, desoxiviolaceína e outros compostos não caracterizados. Para separar os diversos constituintes do extrato bruto metanólico foi realizada cromatografia de camada delgada (CCD) e de coluna, utilizando-se como suporte sílica gel.

Para que se pudesse definir um sistema de solventes adequado à separação dos diferentes constituintes do extrato, procedeu-se um estudo por CCD utilizando diversos solventes (Tabela 4). A Figura 5, mostra que dentre os

sistemas de solvente testados, acetato de etila/éter de petróleo (3/1), foi o qual proporcionou a melhor separação entre violaceína e desoxiviolaceína.

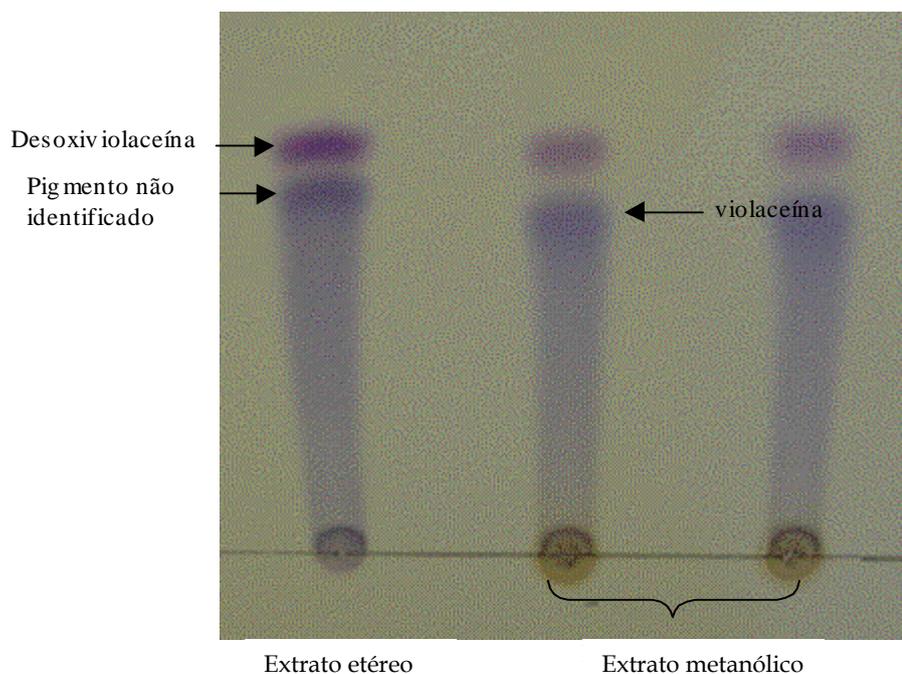


Figura 5 – Metabólitos secundários isolados em CCD, utilizando acetato de etila /éter de petróleo (3:1) como fase móvel.

Na Tabela 6, são apresentados alguns dados cromatográficos dos principais constituintes do extrato. Pela análise do perfil cromatográfico, observou-se uma banda característica (RF 0,59) semelhante à descrita para o pigmento violaceína (TOBIE, 1934; DeMOSS, 1967). Além desta, foi detectada outra banda com RF de 0,77 como sendo a desoxiviolaceína. O RF da desoxiviolaceína é maior devido, ao peso molecular e pela menor polaridade, sendo menos retida na matriz de sílica, que é polar (DURÁN, ERAZO e CAMPOS, 1983; AUGUST *et al.*, 2000; MOMEN E HOSHINO, 2000). Observa-se

ainda que não foi possível separar de modo adequado, os constituintes mais polares do extrato, ou seja, aqueles que ficaram mais retidos na sílica, formando uma espécie de cauda longa que corre do ponto de aplicação da amostra até um pouco antes da banda correspondente para violaceína (Figura 5). Decidiu-se então separar por cromatografia de coluna, utilizando o sistema acetato de etila/éter de petróleo (3/1), três frações do extrato bruto: violaceína, desoxiviolaceína e produtos da cauda.

Tabela 6 – Perfil cromatográfico dos extratos de *Chromobacterium violaceum*\*

<i>C. violaceum</i>	Extrato Metanólico		Extrato Etéreo	
	Rf	Cor	Rf	Cor
Banda 1	0,77	Rosa escuro	0,77	Rosa Escuro
Banda 2	0,59	Violeta	0,64	Roxo claro
Mancha	**	Rosa claro	**	Rosa claro

\* Sistema de solvente empregado: acetato de etila/ éter de petróleo (3/1)

\*\* Não foi possível determinar o Rf

Esse processo de fracionamento e separação dos pigmentos, no entanto, mostrou-se trabalhoso, demorado e com baixo rendimento, produzindo quantidades insuficientes de pigmentos para aplicação nos teste de atividade biológica. Esta metodologia foi adotada apenas para quantificar os pigmentos sintetizados pela *C. violaceum*.

A definição deste sistema de solventes para a separação de violaceína e, desoxiviolaceína de modo bem definido, pode ser aplicado à caracterização dos

pigmentos produzidos sob diferentes condições de cultivo, como os dados apresentados na Figura 5.

#### 4.2.2 Extração Fracionada dos Pigmentos Produzidos por *C. violaceum*

Visando obter pelo menos um pigmento, além de violaceína, para os ensaios de atividades biológicas, procedeu-se uma extração fracionada de pigmentos, presentes na massa celular. Foram utilizados éter etílico, clorofórmio e finalmente metanol. Utilizando-se solventes com polaridades variando de apolares para mais polares, pode-se extrair grupos de compostos, com polaridades também variáveis. Foi observado no éter etílico, o qual fez a extração de compostos menos polar, neste caso, desoxiviolaceína. Em seguida foi utilizado o clorofórmio e por fim o metanol. Em estudos semelhantes, outros autores utilizaram metodologias parecidas (TOBIE, 1934; DURÁN, ERAZO E CAMPOS, 1983).

A composição de cada extrato, metanólico e etéreo foram monitoradas por CCD. Na Figura 5, são mostrados os perfis cromatográficos dos extratos etéreo e metanólico, utilizando-se como suporte cromatográfico sílica gel e acetato de etila/éter de petróleo (3/1) como fase móvel. O perfil do extrato em clorofórmio não é mostrado uma vez que não apresenta quantidades perceptíveis de pigmentos. Para o extrato etéreo, observou-se duas bandas com RF 0,77, compatível como da desoxiviolaceína e outra cujo RF foi igual a 0,64.

Essa banda com RF de 0,64 não pode ser atribuída a nenhum composto previamente identificado, nesse estudo. Contudo, nota-se ser um pigmento diferente de violaceína e desoxiviolaceína. Uma observação interessante é de que o extrato etéreo está livre de violaceína. Quando foi empregado o solvente metanol, este favoreceu a extração do pigmento violaceína, por ser mais polar, e minoritariamente desoxiviolaceína. Em ambos os extratos examinados, ocorreram à presença de uma cauda longa contendo pigmentos mais polares que violaceína, desoxiviolaceína e o pigmento não caracterizado.

A presença de outros pigmentos diferentes de violaceína e desoxiviolaceína não é surpreendente, uma vez que em vários estudos são relatadas as produções de diversos metabólitos pigmentados relacionados a violaceína por *C. violaceum*. Momen, Hoshino (2000) e Augst (2000), ao examinarem a via de biossíntese do pigmento violaceína, relataram que outros minoritários fazem parte da via, como ácido cromopirrólico, proviolaceína, prodeoxiviolaceína, oxiviolaceína.

Sendo assim, escolheu-se o extrato etéreo e metanólico para dar prosseguimento aos ensaios de atividade antibiótica.

### 4.3 Atividade Antibiótica

Os pigmentos do extrato etéreo e extrato metanólico sintetizados por *Chromobacterium violaceum* foram extraídos e testados para a atividade antibiótica contra três espécies de microrganismos, duas espécies Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*) e uma Gram-positiva (*Staphylococcus aureus*). As três bactérias são patogênicas oportunistas, estando freqüentemente envolvidas em vários processos infecciosos.

A triagem da atividade antibiótica dos extratos foi realizada utilizando o método de diluição. A vantagem desta técnica é a sensibilidade e a obtenção de resultados quantitativos. Outros métodos, como difusão em gel e bioautografia, atualmente disponíveis para detectar atividade antibacteriana são considerados qualitativos, pois apenas mostram se existe ou não atividade.

As tabelas 7, 8 e 9 mostram os resultados obtidos para as atividades antibióticas do solvente metanol, dos extratos metanólico e etéreo, bem como do cloranfenicol, como um controle experimental positivo, contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *K. pneuminae*, respectivamente. A seguir, discutiremos os efeitos de cada composto sobre o crescimento celular de cada bactéria.

Tabela 7 – Atividade antibiótica dos extratos obtidos de *C. violaceum* sobre *S. aureus*

Composto	Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	UFC . $10^8$ . $\text{mL}^{-1}$	Inibição (%)
Alc. Metílico	0	$6,2 \pm 0,5$	0,0
	25	$6,8 \pm 2,1$	0,0
	125	$5,5 \pm 1,5$	11,3
Ext. Metanólico	25	$6,6 \pm 1,8$	0,0
	125	$4,8 \pm 0,6$	22,6
Ext. Etéreo	25	$5,5 \pm 0,9$	11,3
	125	$3,4 \pm 1,2$	45,2
Cloranfenicol	75	$0,0 \pm 0,0$	100,0

UFC: Número de unidades formadoras de colônia presentes no inoculo;

% de inibição: Porcentagem de inibição do crescimento em relação ao controle, sem adição de pigmento ou solvente

Tabela 8 – Atividade antibiótica dos extratos obtidos de *C. violaceum* sobre *P. aeruginosa*

Composto	Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	UFC . $10^8$ . $\text{mL}^{-1}$	Inibição (%)
Alc. Metílico	0	$6,9 \pm 0,4$	0,0
	25	$5,7 \pm 1,2$	18,6
	125	$4,7 \pm 0,5$	31,7
Ext. Metanólico	25	$5,4 \pm 0,7$	21,5
	125	$0,0 \pm 0,0$	100,0
Ext. Etéreo	25	$4,5 \pm 2,1$	34,6
	125	$0,0 \pm 0,0$	100,0
Cloranfenicol	75	$0,0 \pm 0,0$	100,0

UFC: Número de unidades formadoras de colônia presentes no inoculo;

% de inibição: Porcentagem de inibição do crescimento em relação ao controle, sem adição de pigmento ou solvente

Tabela 9 – Atividade antibiótica dos extratos obtidos de *C. violaceum* sobre *K. pneumoniae*

Composto	Concentração ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	UFC . $10^8$ . $\text{mL}^{-1}$	Inibição (%)
Alc. Metílico	0	$9,6 \pm 1,0$	0,0
	25	$8,0 \pm 0,4$	16,7
	125	$5,7 \pm 0,5$	40,7
Ext. Metanólico	25	$7,2 \pm 0,7$	24,0
	125	$4,1 \pm 1,3$	57,2
Ext. Etéreo	25	$7,9 \pm 0,4$	18,0
	125	$5,4 \pm 0,7$	44,0
Cloranfenicol	75	$0,0 \pm 0,0$	100,0

UFC: Número de unidades formadoras de colônia presentes no inoculo;

% de inibição: Porcentagem de inibição do crescimento em relação ao controle, sem adição de pigmento ou solvente

#### 4.3.1 Efeito do Solvente Metanol sobre o Crescimento Microbiano

Para solubilização dos extratos testados foi utilizado metanol. Por esta razão, realizaram-se experimentos visando determinar o efeito das concentrações adicionadas deste solvente ( $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sobre a inibição do crescimento celular das três bactérias estudadas. Os resultados apresentados nas Tabela 7, 8 e 9, mostram que este solvente foi bastante tóxico na concentração de  $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para as três bactérias, causando inibição do crescimento de 11,3%, 31,7 % e 40,7%, para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, respectivamente. Na concentração de  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , o metanol mostrou-se um pouco menos tóxico para *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* e, sem toxicidade para *S. aureus*, causando inibição de 18,6%, 16,7% e 0%,

respectivamente. A bactéria *K. pneumoniae* foi a mais sensível ao álcool, em ambas as concentrações.

Deste modo, deve-se considerar que os efeitos inibitórios dos metabólitos testados estão acrescidos do efeito do solvente sendo, portanto menores que os definidos nas tabelas.

#### 4.3.2 Atividade Antibiótica do Extrato Metanólico

O extrato metanólico, contendo majoritariamente violaceína (Figura 6, 7 e 8) exerceu inibição sobre o crescimento celular, o qual foi expresso como o número de UFC após 24 horas de exposição ao metabólito para todas as linhagens testadas. Contudo, esta inibição foi mais efetiva sobre *P. aeruginosa*, na concentração de 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , inibindo o crescimento celular com relação ao controle, em pelo menos 68,3 %. Sobre as demais bactérias, em ambas as concentrações avaliadas, as inibições foram bastante reduzidas, principalmente ao subtrair-se o efeito causado apenas pela presença do solvente.

#### 4.3.3 Atividade Antibiótica do Extrato Etéreo

Com relação ao extrato etéreo, contendo desoxiviolaceína e um pigmento não caracterizado, a inibição do crescimento bacteriano foi novamente expressiva apenas sobre *P. aeruginosa*. Nas concentrações de 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 125

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ , o extrato foi capaz de inibir o crescimento de *P. aeruginosa* em 16% e pelo menos 68,3 % respectivamente, descontado o efeito do solvente. A bactéria *K. pneumoniae* mostrou-se menos susceptível ao efeito do extrato etéreo ao extrato metanólico. Contudo, o extrato etéreo mostrou-se o mais efetivo dos extratos sobre as outras linhagens, inibindo em 33,9 % o crescimento de *S. aureus*.

#### 4.3.4 Atividade Antibiótica do Cloranfenicol

Com o objetivo de avaliar a susceptibilidade das linhagens testadas, foi utilizado o antibiótico de amplo espectro, o cloranfenicol. Como esperado todas as bactérias testadas mostram-se susceptíveis a este antibiótico, na concentração de  $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os resultados obtidos com o uso do antibiótico cloranfenicol estão de acordo com os dados citados na literatura (BROOKS, BUTEL e ORNSTON, 1999).

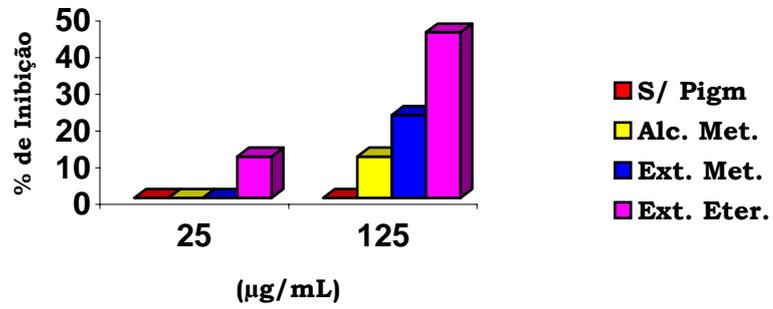


Figura 6 – Inibição do Crescimento de *S. aureus* por extratos obtidos de *C. violaceum*.

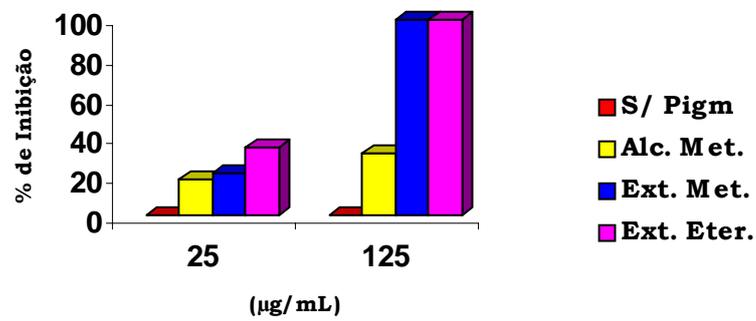


Figura 7 – Inibição do Crescimento de *P. aeruginosa* por extratos obtidos de *C. violaceum*.

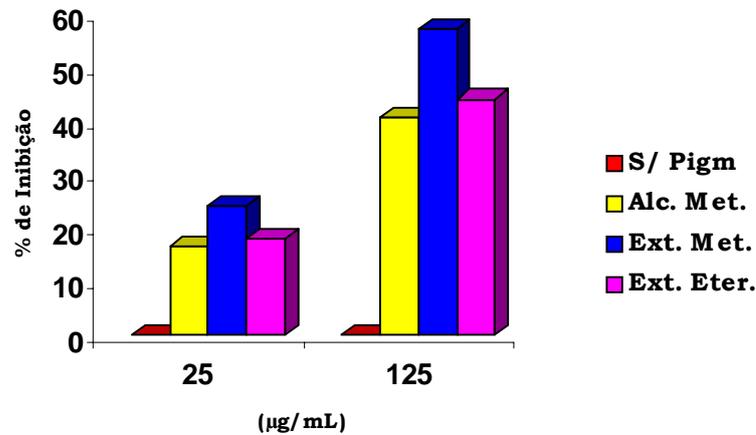


Figura 8 – Inibição do Crescimento de *K. pneumoniae* por extratos obtidos de *C. violaceum*.

As diferenças encontradas na sensibilidade das espécies bacterianas testadas aos extratos se devem provavelmente as diferenças existentes na composição celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e também na própria característica genética apresentada em cada bactéria (GROSVENOR *et al.*, 1995).

#### 4.3.5 Determinação da Cinética de Inibição

A Figura 9 demonstra a curva de sobrevivência da bactéria *P. aeruginosa*. Dentre as bactérias testadas, esta foi a qual apresentou 100% de inibição para ambos os extratos na concentração 125µg/mL. Verificou-se através da curva de crescimento para ambos os extratos, um efeito bactericida dos pigmentos na população bacteriana.

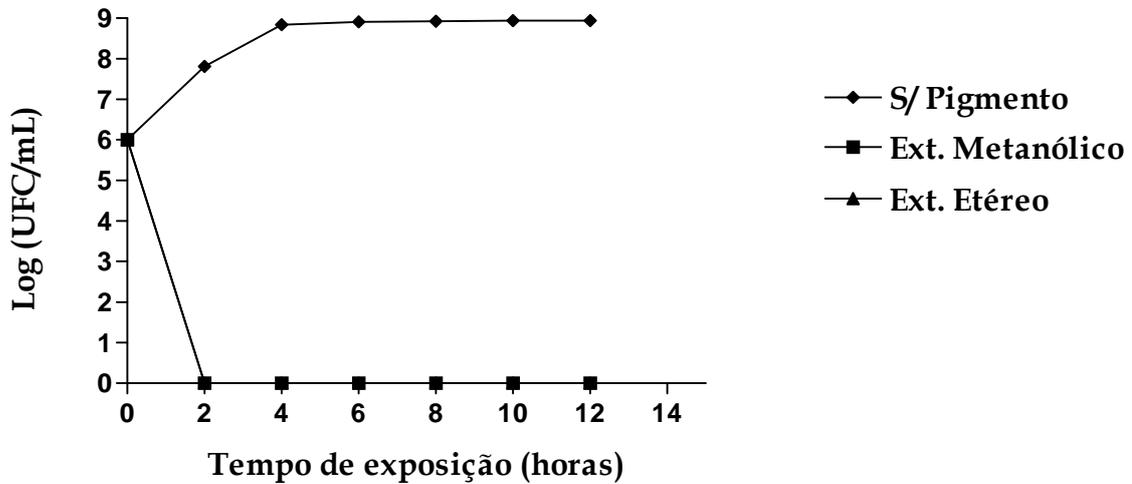


Figura 9 – Curva de sobrevivência da bactéria *P. aeruginosa*, exposta aos extratos metanólico e etéreo. Os extratos foram adicionados no tempo zero. A concentração para ambos os extratos foi de 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , e o tubo controle s/ pigmento. Os resultados do extrato metanólico igualiza com os do extrato etéreo.

A avaliação da atividade antibiótica do pigmento bruto e purificado de violaceína, já vem sendo estudado desde 1945 por Lichstein and Van DeSand. Estes autores testaram a atividade antibiótica da violaceína produzida por *C. violaceum*, sobre diversas linhagens bacterianas e fungos. Este estudo relata a atividade antibiótica do pigmento principalmente contra bactérias Gram-positivas e reduzido efeito sobre Gram-negativas. Contudo, no estudo aqui apresentado apenas a Gram-negativa *P. aeruginosa* foi testada e mostrou-se ser a mais sensível aos extratos utilizados. Certamente, seria necessário ampliar o número de linhagens sob estudos para que se pudesse comparar estes resultados. Uma outra diferença marcante está no tamanho do inóculo. Os melhores resultados de Lichstein e VanDeSand são obtidos num intervalo de concentração de 50 a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e inóculo inicial de  $1 \times 10^4$  UFC. Nesse estudo, empregou-se a concentração celular inicial de  $1 \times 10^6$  UFC. Alguns

autores mostram que para os testes de susceptibilidade microbiana, o tamanho do inóculo inicial tem papel fundamental na determinação desta atividade. Stanloss and Thornsberry (1975), em estudo sobre a aplicação do método de diluição em tubos para a determinação de atividade antibiótica, mostraram que quando o número de organismos no inóculo testado varia, obtêm-se valores diferentes de concentração inibitória. Os autores relatam ainda, que este efeito é mais pronunciado sobre microrganismos que crescem mais lentamente. O maior espectro de ação antibiótica relatada foi para o grupo de bactérias Gram-positivas, ao contrário do que foi constatado em nossos estudos, onde a maior ação inibitória foi para a bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*.

Durán e colaboradores (1983), também relatam atividade antibiótica significativa de extratos cetônicos de cultura de *C. violaceum*, contendo majoritariamente violaceína sobre algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e, salienta um maior efeito sobre bactérias Gram-positivas. Contudo, os pigmentos foram extraídos e posteriormente dissolvidos em acetona. Assim como Lichstein e VanDeSand, os extratos avaliados nestes estudos poderiam ser constituídos de compostos minoritários mais ativos.

Outro fato importante a ser considerado, é que não há estudos na literatura com o pigmento desoxiviolaceína isolado, devido sua baixa produtividade e recuperação a partir de culturas de *C. violaceum*. Nesse

trabalho, o pigmento desoxiviolaceína mostrou-se promissor em relação à atividade antibiótica.

Rios e colaboradores em 1988 já demonstravam que fatores como método de extração, volume do inóculo, composição do meio de cultura, pH e temperatura de incubação podem influenciar nos resultados dos testes de susceptibilidade. Neste trabalho, foram seguidos igualmente em todos os procedimentos, como volume e concentração do inóculo, a composição do meio de cultura, o pH do meio, a quantidade do meio de cultura para cada placa de Petri com as mesmas dimensões, a concentração dos extratos e a temperatura e tempo de incubação.

O estudo envolvendo metabólitos secundários produzidos por *C. violaceum* tem avançado significativamente nos últimos anos, não só devido as suas importantes ações biológicas, como também pelo potencial biotecnológico. Em investigações realizadas com o pigmento violaceína, ficou evidenciado que a sua citotoxicidade é um fator importante para atividade biológica. Como também sua hidrofobicidade facilita a entrada do pigmento na membrana celular dos microrganismos.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS

#### 5.1 Conclusões

- Dos diversos meios testados observou-se maior produção de violaceína e demais pigmentos em meio sólido com 1% de glicerol.
- Verificou-se que o extrato mais eficaz para a inibição do crescimento da bactéria *P. aeruginosa* na concentração de 25µg/mL foi o extrato etéreo
- Observou-se que o extrato metanólico foi o que melhor promoveu a inibição do crescimento da bactéria *K. pneumoniae*
- Avaliou-se que para a bactéria *S. aureus*, o extrato etérico, teve o maior efeito inibitório sobre o crescimento celular.

## 5.2 Perspectivas

- A desoxiviolaceína apresenta-se como um fármaco promissor, contudo o seu rendimento é baixo. Assim, com a Manipulação Genética dos genes envolvidos na síntese da violaceína poderiam favorecer o aumento da síntese de desoxiviolaceína.
- Identificar o pigmento do extrato etéreo e posteriormente avaliar o potencial terapêutico.
- Realizar estudos mais acurados com os demais pigmentos minoritários.

## CAPÍTULO VI

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTÔNIO, R. V., Biossíntese da violaceína por *Chromobacterium violaceum*: Síntese e atividade biológica de um provável intermediário, 1994. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Área Bioquímica) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Unicamp, Campinas.

AUGUST, P. R. *et al.* Sequence Analysis and Functional Characterization of the Violacein Biosynthetic Pathway from *Chromobacterium violaceum*. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.** v. 4, p. 513-519, 2000.

BALLANTINE, J. A.; BEER, R. J. S.; CRUTCHLEY, D. J.; DODD, G. M. and PALMER, D. R. The synthesis of violacein and related compounds, **J. Chem. Soc.** p. 232-233, 1958.

BALOWS, A.; TRUPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. The prokaryotes. v. 3, 2 ed. Nova York: **Springer-Verlag**, 1992.

BARREIRO, E. J & FRAGA, C. A. M. Química Medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. 1 ed. Porto Alegre: **Artmed Editora**, 2001.

BERGOZINI, C. Um nuevo bacterio colorato, **Ann. Soc. Natural. Modena Ser.** 2, v.14, p. 149-158, 1881.

BILTON, R. S. and JOHNSON, L.W. Recurrent nonfatal *Chromobacterium violaceum* infection in a non immunocompromised patient, **Infect. Med.** v. 17, p. 686-690, 2000.

BLEREAU, R. P. Septicemia and death caused by *Chromobacterium violaceum*, **Southern Med. J.** v. 73, p. 1093-1094, 1980.

BLOSSER, R. E.; GRAY, F. Extraction for violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. **J. Microbiol. Met.** v. 40, p. 47-55, 2000.

BOISBAUDRAN, L. Matière colorante se formant dans la colle de farine, **Comp. Rend. Acad. Sci.** v. 94, p. 562-563, 1882.

BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W., eds., In: Garrity, G.M., ed.-in-chief. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology, New York: **Springer**, 2 ed. v. 1, p. 721, 2001.

BRAZILIAN NATIONAL GENOMA PROJECT CONSORTIUM, The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability, **PNAS**, v. 100, n. 20, p. 11660-11665, 2003.

BROOKS, G.F.; BUTEL, J. S.; ORNSTON, L.N. Microbiologia Médica. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1999.

BUCHANAN, E. Studies in the nomenclature and classification of the bacteria, **J. Bacteriol.** v.3, p. 52-57,1918.

CALDAS, L. R. Photochemistry and photobiology in a virgin land, **Photochem. Photobiol.** v. 26, p.1-2, 1977.

CALDAS, L. R.; LEITÃO A. A. C.; SANTOS, S. M. and TYRRELL, R. M. Preliminary experiments on the photobiological properties of violacein, **Intern. Symp. Curr. Topics Radiol. Photobiol. Acad. Brasil. Cienc. Rio de Janeiro**, p. 121-132, 1978.

CALDENTEY, K. M. O.; HILTUNEM, R. Transgenic crops for improved pharmaceutical products, **Field Crops Research**, v. 45, p. 57-69, 1996.

CARIS, C. Produção de desoviolaceína por *Chromobacterium violaceum*. **XIV Simpósio Nacional de Fermentações-Florianópolis, SC**, 2003.

CARRASCO, L. *et al.* Acute pleuropneumonia in Barbary sheep (*Ammotragus lervia*) associated with *Chromobacterium violaceum*, **Veterin. Record.** 138, 499-500, 1996.

CHERNIN, L. S.; WINSON, M. K.; THOMPSON, J. M.; HARAN. S.; BY CROFT, B. W.; CHET, I.; WILLIAMS, P.; STEWART, G. S. Chitinolytic activity in *C. violaceum*: substrate analysis and egulation by quorum sensing, **J. Bacteriology**, v. 180, p. 4435-4441, 1998.

CHONG , C. y. and LAM, M. S. Case report and review of Chromobacterium sepsis-a Gram negative sepsis mimicking melioidosis, **Singapore Med. J**, v. 38, p. 263-265, 1997.

CHOU, Y. L.; YANG, C. C.; LEU, H. S.; TSAO, T. C. Fatal and non-fatal *Chromobacterial* septicemia:report of two cases, **Changgeng Yi Xue Za Zhi**, v. 8, p. 492-7, 2000.

- COLLINS, B.; KOLLIAS, G.; BATTLES, A. and MORELAND, A. *Chromobacterium violaceum* infection in a stumptailed monkey (*Macaca artoices*), **Lab. Animal Sci.** v. 35, p. 530-531, 1985.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-582, 1999.
- CRAGG, G. M. *et al.* Natural products in drug discovery and development. **J. of Nature Products**, v. 60, p. 52-60, 1997.
- DE MOSS, R.D. Violacein, **Antibiotics**, v. 2, p. 77-81, 1967.
- De SOUZA, A. O.; AILY, D. C. G.; SATO, D. N. and DURÁN, N. Atividade da violaceína *in vitro* sobre o *Mycobacterium tuberculosis* H37RA, **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. v. 58, p. 59-62, 1999.
- DESJARDINS, M.; FENLON, C.; MADISON, D. Non-chromogenic *Chromobacterium violaceum* bacteremia, **Clinical Microbiol. Newslett**, v. 21, p. 2-1, 1999.
- DREW, S. W. and DEMAINE, A. L. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. **Annu Rev. Microbiol.** v. 31, p. 343-356, 1977.
- DURÁN, N. and FALJONI-ALARIO, A. Bacterial chemistry-I: studies of a potencial phototherapeutic substance from *Chromobacterium violaceum*, **An. Acad. Brasil. Ciênc.** v. 52, p. 297-302, 1980.
- DURÁN, N. *et al.* Bacterial chemistry-III. Preliminary studies on trypanosomal activities of *Chromobacterium violaceum* products, **An. Acad. Brasil. Sci.** v. 61, p. 31-36, 1989.
- DURÁN, N.; ANTÔNIO, R. V.; Haun, M. and Pilli, R. A. Biosynthesis of trypanocide by *Chromobacterium violaceum*, **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 10, p. 686-690, 1994.
- DURÁN, N.; BROMBERG, N. Violacein transformation by peroxidases and oxidases: implications on its biological properties, **J. of Mol. Catalysis B. Enzym.** v. 11, p. 463-467, 2001.
- DURÁN, N.; ERAZO, S. and CAMPOS, V. Bacterial chemistry-II: Antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*, **An. Acad. Brasil. Ciênc.** v. 55, p. 231-234, 1983.

- DURÁN, N.; MENCK, C. F. M. *Chromobacterium violaceum*: A review of pharmacological and industrial perspectives, *Critical Reviews in Microbiol.* v. 27, p. 201-222, 2001.
- EFTHIMION, M. H. and CORPE, W. A. Effect of Cold Temperatures on the Viability of *Chromobacterium violaceum*, *Applied Microbiology*, v. 17, p. 169-175, 1969.
- FARREL, K. *et al.* *Chromobacterium violaceum* infection: Report of a fatal case, *Papua New Guinea Med. J.* v. 22, p. 94-95, 1979.
- FOMBUENA, M. *et al.* Infection by *Chromobacterium violaceum* in a patient with acquire immunodeficiency virus infection, *Enferm. Infect. Microbiol. Clin.* v. 16, p. 46-47, 1998.
- GENET, R.; BENETTI, P. H.; HAMMADI, A. and KEMP, R. J., L-tryptophan 2',3'-oxidase from *Chromobacterium violaceum*, *J. Biol. Chem.* v. 270, p. 23540-23545, 1995.
- GEOGHIOU, P. R. *et al.* Near-fatal septicemia with *Chromobacterium violaceum*, *Med. J. Austr.* v. 150, p. 720-721, 1989.
- GOGOLEWSKI, R. P. *Chromobacterium violaceum* septicemias in a dog, *Austr. Veter. J.* v. 60, p. 226-226, 1983.
- GREENWOOD, D. *et al.* Historical Introduction, Antibiotic and Chemotherapy. Ed. **Churchill Livingstone**, 1997, p. 2-9, cap. 1.
- GROSVENOR, P. W.; SUPRIONO, A.; GRAY, D. O. Medicinal plants from Riau province, Sumatra, Indonésia. Part 2, Antibacterial and Antifungal activity. *J. of Ethnopharmacology*, v. 45, p. 97-111, 1995.
- HARVEY, A. Strategies for discovering drug from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*, v. 5, p. 294-300, 2000.
- HASSAN, H. *et al.* Fatal *Chromobacterium violaceum* septicemia, *Singapore Med. J.* v. 34, p. 456-458, 1993.
- HAUN, M. *et al.* Bacterial chemistry-VI: Biological activities and cytotoxicity of 1,3-dihidro-2H-indol-2-one derivatives, *Biol. Res.* v. 25, p. 21-25, 1992.
- HIRAOKA, N. *et al.* *Chromobacterium violaceum* sepsis accompanied by bacteria-associated hemophagocytic syndrome in a Japanese man, *Arch. Intern. Med.* v. 159, p. 1623-1624, 1999.

- HOLT, J. G. and KRIEG, N. R. (Eds), *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, **Baltimore**, v. 1, p. 580-582, 1984.
- HOSHINO, T and MOMEN, A. Z. M. Biosynthesis of violacein. Intact incorporation of the tryptophan molecule on the oxindole side, with intramolecular rearrangement of the indole ring on the 5-hydroxynindole side, **Biotechnology and Biochemistry**, v. 64, p. 539-549, 2000.
- HUFFAM, S. E. *et al.* *Chromobacterium violaceum* in tropical northern Australia, **Med. J. Austr.** v. 168, p. 335-337, 1998.
- JOHNSON, W. M. *et al.* Fatal *Chromobacterium violaceum* septicemia, **Am. J. Clin. Pathol.** v. 56, p. 400-403, 1971.
- KAUFMAN, S.; CERASO, D.; SCHUGURENSKY, A. First case report from Argentina of fatal septicemia caused by *Chromobacterium violaceum*, **J. of Clin. Microbiol.** v. 23, p. 956-958, 1986.
- KOLIBACHUK, D.; MILLER, A.; DENNIS, D. Cloning, molecular analysis, and expression of the polyhydroxyalkanoic acid syntase (*phaC*) gene from *Chromobacterium violaceum*, **Appl. Environ. Microbiol.** v. 65, p. 3561-3565, 1999.
- KUMAR, M.; CHATURVEDI, V. K. and SINGH, D. P. *Chromobacterium violaceum*, na unusual pathogen of swine, **Indian Veter. J.** v. 76, p. 869-871, 1999.
- LAWRENCER, N. Rediscovering natural product biodiversity. **Drug Discovery Today**, v. 4, p. 449-451, 1999.
- LEE, J. *et al.* Two cases of *Chromobacterium violaceum* infection after injury in a subtropical region, **J. of Clin. Microbiol.** v.37, p. 2068-2070, 1999.
- LETENDRE, C. H.; DICKENS, G. and GUROFF, G. The tryptophan hydroxylase of *Chromobacterium violaceum*, **J. of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7186-7191, 1974.
- LEVY, S. B. Antibiotic resistance: consequence of ination. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 124-129, 2001.
- LISCHSTEIN, H. C.; VAN DE SAND, V. F. Violacein na antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*, **J. Infect. Dis.** v. 76, p. 47-51, 1945.
- LIU, C. H.; CHU, R. M.; WENG, C. N.; LIN, Y. L. and CHI, C. S. An Acute pleuropneumonia in a pig caused by *Chromobacterium violaceum*, **J. Compar. Pathol.** v. 100, p. 459-463, 1989.

MACHER, A. M.; CASALE, T. B.; FAUCI, A.S. Chronic granulomatous disease of childhood and *Chromobacterium violaceum* infections in Southeastern United States. **Ann Int. Med.** v. 97, p. 51-55, 1982.

MACHIN-VILLAFRANCA, C. *et al.* Infección por *Chromobacterium violaceum*. Presentación de um caso com evolução fatal, **Rev. Cubana Med. Trop.** v. 38, v. 353-357, 1986.

MANLOCK, R. J. *et al.* Glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency, neutrophil dysfunction and *Chromobacterium violaceum* sepsis, **J. Pediatr.** v.111, 852-854, 1987.

MARTIN, J. and BRIMACOMBE, J. *Chromobacterium violaceum* septicemia-The intensive care management of 2 cases, **Anaethes Intensive Care**, v. 20, p. 88-90, 1992.

MAY, G.; BRUMMER, B. and OTT, H. Purification of the antiviral compound violacein from culturas of *Chromobacterium*, **Ger. Offen.** DE 39355066, 1991.

McCLURE, H. M. and CHANG, J. *Chromobacterium violaceum* infection in a nonhuman primate (*Macaca assamensis*), **Lab. Animal Sci.** v. 26, p. 807-810, 1976.

MELO, P. *et al.* Violacein and its  $\beta$ -cyclodextrin complexes induce apoptosis and differentiation in HL60 cells. **Toxicology**, v. 186, p. 217-225, 2003.

MELO, P. S. *et al.* Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells, **In vitro Cell. Dev. Biol. Animal.** v. 36, p. 539-543, 2000.

MIDANI, S. and RATHORE, M. *Chromobacterium violaceum* infection Sourthern, **Med. J.** v. 91, p. 464-466, 1998.

MILLER, D. P.; BLEYNS, W. T.; STEELE, D. B.; STOWERS, M. D. A comparative study of virulent and avirulent of *Chromobacterium violaceum*, **Can. J. Microbiol.** v. 34, p. 249-255, 1988.

MOORE, C. C.; LANE, J. E.; STEPHENS, J. L. Successful treatment of an infant with *Chromobacterium violaceum* sepsis, **Clin Infect Dis.** v. 6, p.107-110, 2001.

MURRAY, P. R.; DREW, W. L.; KOBAYASHI, G. S; THOMPSON, J.H. Microbiologia Médica. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1992.

OGNIBENE, A. J. and THOMAS, E. Fatal infection due to *Chromobacterium violaceum* in Vietman, **Am. J. Clin. Pathol.** v. 54, p. 607-612, 1970.

- ONILE, A. *et al.* Human infection due to *Chromobacterium violaceum*. A report from Ilorin, Nigeria, **East Afr. Med. J.** v. 61, p. 849-852, 1984.
- PATRICK, G. L. An introduction to medicinal chemistry. New Uork: **Oxford University Press**, 1995.
- PEMBERTON, J. M.; VICENT, K. M.; PENFOLD, R. J: Cloning and heterologous expression of the violacein biosyntheses gene cluster from *Chromobacterium violaceum*. **Curr. Microbiol.** v. 22, p. 355-358, 1991.
- PEREIRA, M.; PARENTE, J. A.; BATAUS, D. D. P.C.; SOARES, R. B. A. and SOARES, C. M. A. Chemotaxis and Flagelar genes of *Chromobacterium violaceum*, **Genetics and Molecular Research**, v.1, p. 92-101, 2004.
- PETRILLO, V. F. *et al.* Recurrent infection with *Chromobacterium violaceum*: first case report from South America, **J. Infect.** v.9, p.167-169, 1984.
- PINTO, A. *et al.* Products Naturais: Atualidade e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.
- PONTE, R. and JENKINS, S. G. Fatal *Chromobacterium violaceum* infections associated with exposure to stagnant water, **Pediatr. Infect. Dis.** v. 11, p. 583-586, 1992.
- REILLY, J. and PYNE, G., CXL. On the pigment produced by *Chomobacterium violaceum*, **Biochem. J.** v. 21, p. 1059-1064, 1927.
- RESSLER, C.; ABE, O.; KONDO, Y.; COTTREL, B. and ABE, K. Purification and characterization from *Chromobacterium violaceum* of an enzyme catalyzing synthesis of  $\gamma$ -ciano- $\alpha$ -aminobutirico e tiocianato, **Biochemistry**, v. 12, p. 5369-5377, 1973.
- RICHARDS, C. *Chromobacterium violaceum*, opportunistic pathogenic bacteria isolated in tropical and subtropical areas, **Bull. Soc. Pathol. Exotique.** v. 86, p. 307-307, 1993.
- RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLER, A. Sreening as methods for natural products with antimicrobial activity: Rewiew of the literatura. **J. of Ethnopharmacology**, v. 23, p. 127-149, 1988.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Farmacognosia e Farmacobiotechnologia, 1 ed. **Editora Premier**, 1997, p. 372.
- ROBERTS, S. A. *et al.*, *Chromobacterium violaceum* infection of the deep neck tissues in a traveler to Thailand, **Clin. Infect. Dis.** v. 25, p. 334-335, 1997.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual, New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2 ed, 1989.
- SCHROMM, A. B. *et al.* Biological activities of lipopolysaccharides are determined by the shape of their lipid A portion, **Eur. J. Biochem**, v. 267, p. 2008-2013, 2000.
- SHIRATA, A. *et al.* Isolation of bacteria producing bluish-purple pigment and use for dyeing, **Japan Agric. Res. Quart.** v. 34, p. 131-140, 2000.
- SILVA, C. H. P. M. Bacteriologia: um texto ilustrado. Teresópolis, RJ: **Eventos**, 1999.
- SIMÕES, C. M. O. *et al.* Farmacognosia da planta ao medicamento, 2 ed. Ver. Porto Alegre: **Ed. Da UFRGS**; Florianópolis: **Ed da UFSC**, 2000, p. 821.
- SNEATH P. H. A.; WHELAN J. P. F.; SINGH, R. B.; EDWARDS, D. Fatal infection by *Chromobacterium violaceum*, **Lancet**, v. 2, p. 276-7, 1953.
- STANLOS, D.R., and THORNSBERRY, C. Broth dilution methods for determining the antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. **Antimicrobiol. Agents and Chemotherapy**, v. 7, p. 15-21, 1975.
- STARR, A. J. *et al.*, *Chromobacterium violaceum* presenting as a surgical emergency, **Southern Med. J.** v. 74, p. 1137-1139, 1981.
- STROHL, W. R. The role natural products in a modern drug Discovery program. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 39-41, 2000.
- TAVARES, W. Manual de antibióticos: para o estudante de medicina, 3 ed. Rio de Janeiro: **Atheneu**, 1984, p. 374.
- TI, T. Y. *et al.* Nonfatal and fatal infections caused by *Chromobacterium violaceum*, **Clin. Infect. Dis.** v. 17, p. 505-507, 1993.
- TOBIE, W, C. The pigment of *Bacillus violaceus* I. The production, extraction, and purification of violacein, **J. Bacteriol.** v. 29, p. 223-227, 1934.
- TOBIE, W. C. The pigment of *Bacillus violaceus*. III The apparent relation of violacein to indigo. **Soc. Am. Bacteriol.** 39<sup>th</sup> General meeting, p. 11-12, 1934.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A..N. Microbiologia. São Paulo: **Atheneu**, 1990.

- VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**, v. 3, p. 232-238, 1998.
- WANNMACHER, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: Uma guerra perdida? **Uso racional de medicamentos: Temas selecionados**, v. 1, n. 4, p. 1-5, 2004.
- WHITEHEAD, N. A.; BARNARD, A. M. L.; SLATER, H.; SIMPSON, N. J. L.; SALMOND, G. P. C. Quorum sensing in Gram Negative Bacteria. **FEMS Microbiol.** v. 25, p. 365-404, 2001.
- WIJEWANT, E. A. and WEITTIMUM, S. G. *Chromobacterium violaceum* infection in pigs, **Res. Veter. Sci.** v. 10, p. 389-391, 1969.
- WILKEY, I. S. and McDONALD, A. A probable case of *Chromobacterium violaceum* infection in Australia, **Med. J. Austr.** v. 2, p. 39-40, 1983.
- WOOLEY, P. G., *Bacillus violaceus manilae* (a pathogenic organism), **Bull. Johns Hopkins Hosp.** v. 16, p. 89-90, 1905.
- ZIMMERMAN, B. Review of Bergozini on *Chromobacterium*, **Bot. Centralbl.** v. 4, p. 1528-1530, 1881.
- ZINS, M. M. *et al.* Expression and partial characterization of an elastase from *Chromobacterium violaceum*, **Veterinary Microbiology**, v. 80, p. 63-74, 2001.