

Condições de cultivo e produção de pigmentos por *Chromobacterium violaceum*

Ana Kelly Pitlovanciy¹
Margot Érika Caris²
Luismar Marques Porto²
Rozangela Curi Pedrosa¹
Regina Vasconcellos Antônio^{1*}

¹Depto. de Bioquímica – Universidade Federal de Santa Catarina – Centro de Ciências Biológicas
Caixa Postal 5040 – 88040-900 Florianópolis – SC

²Depto. de Engenharia Química – Universidade Federal de Santa Catarina

* Autora para correspondência
rantonio@mbox1.ufsc.br

Submetido em 04/04/2005
Aceito para publicação em 09/08/2005

Resumo

A bactéria *Chromobacterium violaceum* é uma Beta-proteobactéria, Gram-negativa e anaeróbica facultativa, encontrada em amostras de solo e água de regiões tropicais e subtropicais em diversos continentes. *Chromobacterium violaceum* produz como metabólitos secundários pigmentos indólicos derivados de triptofano. Os pigmentos majoritários produzidos são violaceína e desoxiviolaceína. Trabalhos prévios mostraram que extratos da cultura de *C. violaceum* contendo estes pigmentos apresentaram atividades biológicas relevantes, como efeitos antitumorais e antibióticos. Daí o interesse em determinar condições de cultivo adequadas à maior produção de violaceína e demais pigmentos. Os resultados deste trabalho mostraram que a produção de violaceína é dependente da fonte de carbono utilizada, sendo desfavorecida quando a fonte de carbono é a glicose e a frutose, porém estimulada em presença de glicerol. Além disso, observou-se uma maior produtividade de pigmento em meio sólido, contendo glicerol.

Unitermos: *Chromobacterium violaceum*, violaceína, desoxiviolaceína, pigmentos, condições de cultivo

Abstract

Cultivation conditions for pigment production by *Chromobacterium violaceum*. *Chromobacterium violaceum* is a beta proteobacterium, gram-negative, facultative anaerobe, found in soil, riverbanks and waters of tropical and subtropical regions all around the world. The species produces, through secondary metabolism, several indole pigments derived from tryptophan. Violacein and desoxyviolacein are the most abundant pigments produced by *C. violaceum*. Previous studies have reported that culture extracts from *C. violaceum*, containing the pigments, possess important biological properties, such as antitumoral and antibiotic activities. This accounts for the current interest in defining cultivation conditions for the improvement of violacein and other pigment production. Our results showed that violacein production depends on carbon source. The pigment production is stimulated by glycerol, but its production is reduced in the presence of an easily metabolized carbon source, such as glucose or fructose. In addition, the utilization of a solid medium in the presence of glycerol is a better medium for the production of violacein and related pigments by *C. violaceum*.

Key words: *Chromobacterium violaceum*, violacein, desoxyviolacein, pigment, cultivation conditions

Introdução

A bactéria *Chromobacterium violaceum* é classificada como uma Beta-proteobactéria, Gram-negativa, anaeróbica facultativa, com formato de bastonete (Holt et al., 1994), cujo habitat é o solo e as águas ao redor do mundo em extensas áreas tropicais e subtropicais. Ocasionalmente, pode atuar como patógeno oportunista de animais e homens, causando septicemia fatal, com lesões na pele e/ou abscesso no fígado e no pulmão (Richards, 1993; Midani e Rathore, 1998). Esta bactéria tem sido objeto de estudo para diversos pesquisadores devido a sua característica fenotípica marcante: a produção de pigmento violeta chamado violaceína, o qual confere coloração característica de suas colônias (DeMoss, 1967). *Chromobacterium violaceum* é responsável pela produção de uma diversidade de metabólitos secundários com potencial biotecnológico.

A violaceína, pigmento principal produzido por *C. violaceum* tem despertado interesse devido às atividades biológicas: como antibacteriano, antitumoral, e antiparasitário (Caldas et al., 1978; Durán et al., 1989; Melo et al., 2000). A estrutura química da violaceína (Figura 1a) foi definida e consiste de três subunidades estruturais: 5-hidroxiindol, 2-oxoindol e 2-pirrolindona. Para a síntese do pigmento, a bactéria necessita do oxigênio molecular e condensação de duas moléculas de triptofano (August et al., 2000). *C. violaceum* produz ainda um outro pigmento minoritário característico, a desoxiviolaceína (Figura 1b), o qual difere da violaceína, na porção 5-hidroxiindol, pela ausência do grupo hidroxila, sendo assim menos polar. Na década de 90, foram propostos vários compostos intermediários na biossíntese de violaceína, como o ácido cromopirrólico, proviolaceína, prodeoxiviolaceína, pseudoviolaceína, além de rearranjos intramoleculares do anel indólico no lado do 5-hidroxiindol (August et al., 2000; Hoshino e Momem, 2000).

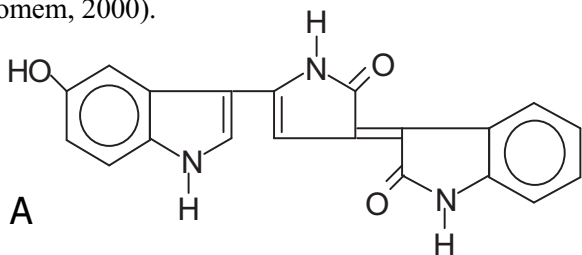


FIGURA 1a: Estrutura química da violaceína.

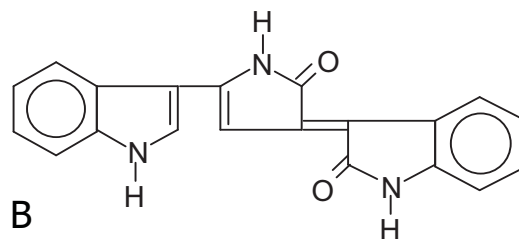


FIGURA 1b: Estrutura química da desoxiviolaceína.

Outros estudos revelaram que a *C. violaceum* apresenta um grupo de enzimas capazes de sintetizar compostos estruturalmente similares a violaceína, a oxiviolaceína, prodeoxiviolaceína e a pseudoviolaceína, a partir de outros substratos que não o L-triptofano (Durán e Menck, 2001).

O papel fisiológico do pigmento sintetizado pela bactéria para o seu metabolismo é desconhecido. No entanto, sabe-se que o pigmento só ocorre sob condições aeróbias. A partir da determinação do elevado 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 poderia estar envolvido na proteção contra efeitos da radiação solar sobre o microrganismo. Outros estudos sugeriram que o pigmento poderia estar relacionado à regulação da concentração do triptofano, uma vez que esse aminoácido em elevadas quantidades seria tóxico para a bactéria (DeMoss, 1967; Durán e Faljoni-Alario, 1980).

Trabalhos recentes sugeriram que a produção de violaceína está sob controle de um sistema de regulação, chamado de “*quorum sensing*”, característico de bactérias Gram-negativas. A produção de violaceína é induzida especificadamente por uma molécula sinal, N-hexanoil homoserina lactona (HHL), cuja concentração é proporcional ao aumento da população bacteriana em um determinado meio. O mecanismo parece ser uma forma de ajustamento da população frente à disponibilidade de nutrientes. O “*quorum sensing*” controla também a expressão de outros fenótipos em *C. violaceum*, incluindo a produção de cianeto, quitinases extracelulares, elastases, antibióticos, fenazina e enzimas extracelulares (Blosser e Gray, 2000; Brazilian National Genoma Project Consortium, 2003).

Diversos estudos relataram a importância biológica dos metabólitos produzidos por *C. violaceum*. Alguns destes metabólitos apresentaram atividades de interesse como:

potenciadores de antibióticos beta-lactâmicos, glicopeptídeos, antibióticos (arfamenine B, aerocianidin, aerocavin, 3,6-diidroxiindoxazene, monobactama SB-26, 180) antitumorais (violaceína, depsipeptídeo FR 901228), inibidor de carboxipeptidase, além de polihidroxialcanoatos que podem ser usados na produção de plásticos biodegradáveis (Durán e Menck, 2001).

Vários trabalhos relataram as atividades antibióticas de extratos pigmentados de culturas de *C. violaceum* e de violaceína purificada. Diversos resultados mostraram que embora a violaceína apresente atividade antibiótica relevante, os extratos brutos não purificados parecem ter maior eficácia. Uma das principais dificuldades em se testar as atividades biológicas dos extratos ou pigmentos isolados de *C. violaceum* é a sua baixa produtividade em meios complexos. Desta forma, neste estudo, avaliou-se a produção de violaceína e desoxiviolaceína, sob diferentes substratos carbônicos (glicose, frutose e glicerol), em culturas líquidas e sólidas.

Material e Métodos

Para avaliação do crescimento celular bem como da produção de pigmentos em meio líquido, *Chromobacterium violaceum* foi cultivada em erlenmeyers de 500 mL, contendo 100 ml de meio Luria-Bertani (LB) contendo: triptona (10 g/L), extrato de levedura (5 g/L), NaCl (5 g/L) e glicose, glicerol ou frutose (20 g/L), mantidos a 30°C, sob agitação a 150 rpm.

Nos ensaios em que meio sólido foi empregado, os cultivos foram realizados em placas de Petri, contendo 25 mL/ placa de meio LB, preparado como descrito anteriormente, ao qual foi adicionado Agar-agar (15 g/L). Os cultivos foram mantidos em estufa bacteriológica a 30 °C. A cada 24 horas, foi recuperada a biomassa superficial de uma placa de Petri e seca em estufa bacteriológica a 40°C por aproximadamente 6 dias, para posterior pesagem e extração dos pigmentos.

Avaliação da produção de pigmentos

Para a avaliação de pigmentos nos meios líquidos, recolheu-se 1 mL de do caldo de cultivo, ao qual adicionou-se 1 mL de acetato de etila, após agitação vigorosa e

repouso para separação das fases orgânica e aquosa, leu-se a absorbância do extrato orgânico a 577 nm, contra acetato de etila.

Para os meios sólidos, aproximadamente 50 mg da massa celular seca foi obtida como descrito anteriormente, e adicionados 0,5 mL de álcool metílico e deixada sob agitação, a 150 rpm em temperatura ambiente por 2 horas. Após este período a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi diluído quando necessário para a leitura da absorbância a 577 nm.

Análises cromatográficas por cromatografia de camada delgada (CCD)

Os extratos orgânicos de acetato de etila ou metanol foram obtidos, como descrito para a avaliação da produção de pigmentos. Cinquenta microlitros de cada extrato foram aplicados a 10 mm de uma das extremidades das placas cromatográficas (150 X 200 mm) de sílica gel G60 (Alugram®FilG). As cromatografias foram realizadas em cubas cromatográficas, previamente preenchidas com as fases móvel, fechadas e deixadas em repouso à temperatura ambiente para saturação com o vapor de solvente, por aproximadamente 30 min. Após este período, as placas cromatográficas contendo as amostras, já secas, foram colocadas na cuba. A corrida cromatográfica teve duração de aproximadamente 25 minutos.

Resultados e Discussão

Com objetivo de definir meios de cultivo para *C. violaceum*, visando aumentar a produção de pigmentos pela bactéria, esta foi cultivada em meio líquido contendo fontes de carbono de elevado rendimento energético, como glicose e frutose, bem como na presença de glicerol. O glicerol tem sido relatado como sendo uma fonte de carbono que favorece a produção de metabólitos secundários em bactérias. Na figura 2, está representada a curva de crescimento de *C. violaceum* na presença destas três fontes de carbono. Observou-se que o crescimento celular de *C. violaceum*, expresso como absorbância da suspensão celular em 720 nm (Absorbância 720nm), na presença de glicose e frutose, apresentaram valores superiores aos obtidos na presença do glicerol, e que mesmo após 96 horas de cultivo,

ocorreu uma tendência crescente. Na presença de glicerol, o estado estacionário se estabeleceu em torno de 50 horas de cultivo.

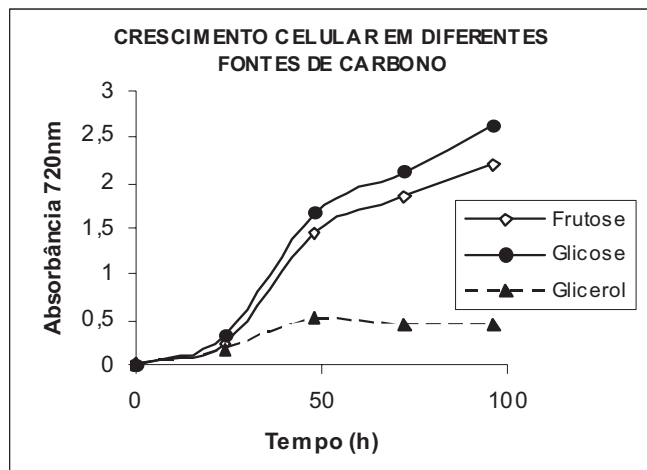


FIGURA 2: Curso temporal do crescimento celular (Absorbância a 720 nm) de *C. violaceum* em meio LB + 20 g/L de cada uma das seguintes fontes de carbono: frutose, glicose e glicerol. Incubadas a 30°C.

No entanto, como se pode observar pelos resultados apresentados na figura 3, a produção de pigmentos expressa como absorbância em 577 nm sob as mesmas condições, apresentou perfil diferente. Observou-se (Figura 3) que quando glicerol é a fonte de carbono utilizada para o crescimento, a produção de pigmento foi maior do que na presença de frutose ou glicose. Este resultado poderá ser explicado pelo fato de que, por serem

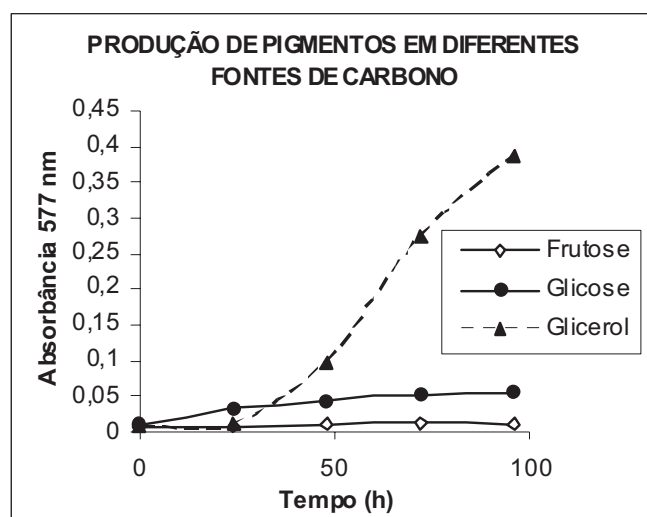


FIGURA 3: Curso temporal da produção de pigmentos (Absorbância a 577 nm) por *C. violaceum*, em meio LB + 20 g/L de frutose, glicose e glicerol. Observação: leituras corrigidas para 1 mL de meio de cultura. Incubadas a 30°C.

metabólitos secundários, a violaceína e pigmentos relacionados têm suas produções inibidas pela presença de concentrações elevadas de carbono, bem como, por fontes de carbono com alto rendimento energético, tal como glicose e frutose. O metabolismo de glicerol rendeu menos energia do que quando se incluiu a glicose e a frutose. Resultados prévios mostraram que a produção de violaceína foi aumentada em meio sólido, quando comparada em meio líquido, quando a mesma fonte de carbono foi utilizada (Antônio, 1994).

Uma vez que o meio agar LB contendo glicerol foi o mais eficiente para produção de pigmentos, acompanhou-se a produção dos pigmentos neste meio, durante 10 dias consecutivos.

Com o objetivo de saber se existiria a produção de diferentes pigmentos durante este período, acompanhou-se qualitativa e quantitativa a produção dos pigmentos, por cromatografia de camada delgada (CCD), empregando-se como fase móvel o acetato de etila, como previamente relatado por Antônio (1994). Na figura 4, são apresentados os perfis cromatográficos dos extratos obtidos das culturas de *C. violaceum*, em meio Agar LB + glicerol. Observou-se visualmente a produção de dois pigmentos separados através do sistema cromatográfico empregado. Tanto a coloração dos pigmentos, púrpura e outro violeta, como pela polaridade, com coeficiente de migração do pigmento púrpura maior em relação ao pigmento violeta, pode-se sugerir que estes sejam desoxiviolaceína e violaceína, respectivamente.

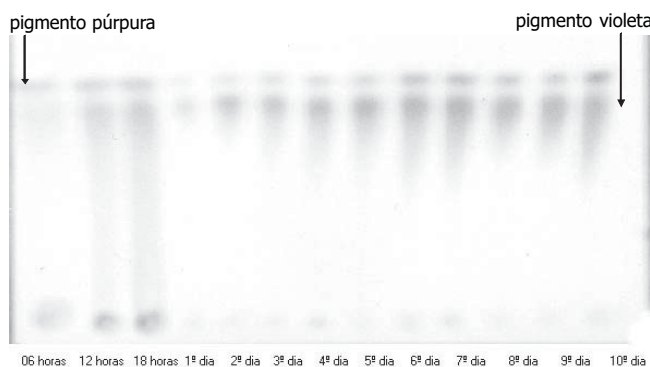


FIGURA 4: Cromatografia de camada delgada dos extratos metanólicos de *C. violaceum* cultivada em meio sólido, na presença de glicerol. As setas indicam a presença de pigmento púrpura e violeta.

Estas observações estão de acordo com resultados apresentados em estudos anteriores, nos quais, após se-

paração dos pigmentos por CCD, realizada sob as mesmas condições deste trabalho, estes foram levados à caracterização química e, através de espectrofotometria de infravermelho e H-RMN (Antônio, 1994; Retori, 1996), os resultados mostraram que embora impuros os pigmentos majoritariamente produzidos por *C. violaceum* foram violaceína e desoxiviolaceína.

Contudo, como neste estudo esta metodologia não foi adotada, apenas sugere-se, pela cor característica dos pigmentos, bem como, pela suas polaridades, que estes sejam violaceína (pigmento violeta) e desoxiviolaceína (pigmento púrpura).

A revelação do cromatograma com vapores de iodo auxiliou a visualização de outros compostos, sem colorações aparentes, presentes nos extratos metanólicos (Figura 5).

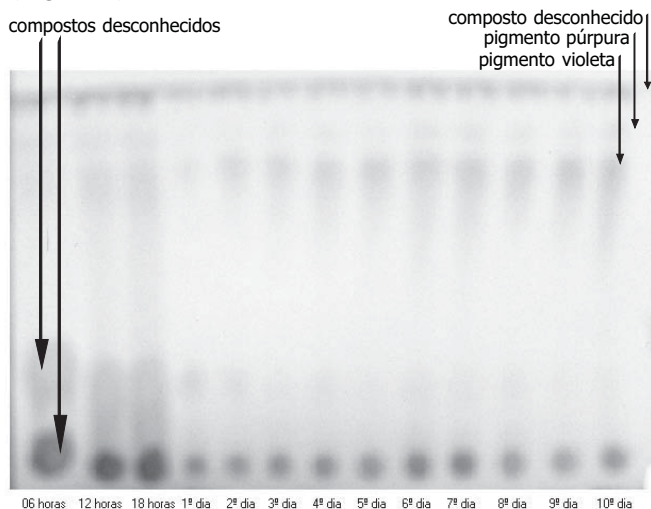


FIGURA 5: Cromatografia de camada delgada dos extratos metanólicos de *C. violaceum* cultivada em meio sólido, na presença de glicerol revelada através de vapor de iodo. A seta, à esquerda, aponta não caracterizada; as setas à direita, de cima para baixo: indicam a presença de metabólitos não caracterizados, desoxiviolaceína e violaceína.

Através da leitura das absorvâncias dos extratos metanólicos das células crescidas em meio sólido, realizou-se estimativa da produção de pigmento ao longo de 10 dias (240 horas) de cultivo em placas de Petri. O curso temporal da produção de pigmentos, expresso como a leitura da absorvância dos extratos metanólicos a 577 nm durante este período, acompanhada por CCD, é apresentada na figura 6. O cultivo em placas de Petri impossibilitou uma determinação do crescimento celular. Contudo, considerando-se o volume de meio colocado em cada pla-

ca, igual a 25 mL e fazendo-se a devida correção da absorvância de um extrato obtido a partir de 1 mL de meio de cultivo, foi possível estimar na presença de glicerol o rendimento dos pigmentos, enquanto em meio líquido a absorvância a 577 nm após 96 horas de cultivo foi igual a 0,4 em meio sólido a leitura foi igual a 0,9. Esses resultados mostram que a produção de pigmento é cerca de duas vezes maior em meio sólido que em meio líquido.

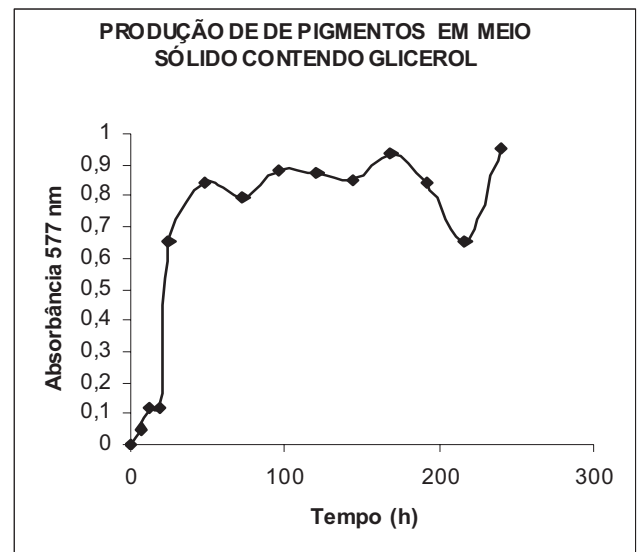


FIGURA 6: Curso temporal da produção de pigmentos (Absorvância a 577 nm) por *C. violaceum* cultivada em meio agar LB + glicerol 20 g/L. Observação: leituras corrigidas para 1 mL de meio de cultura. Incubadas a 30°C

Segundo a literatura, a produção de violaceína, pigmento majoritário produzido por *C. violaceum*, ocorre como uma resposta à produção de N-hexanoil homoserina lactona, uma molécula que sinaliza a necessidade de controle do crescimento celular, quando a disponibilidade de nutrientes está reduzida no meio (Blosser e Gray, 2000). Está observação explicaria, nos experimentos realizados nesse estudo, porque a produção de pigmentos é menor em condições nas quais uma fonte de carbono de alto rendimento energético, como frutose e glicose, é utilizada, ao contrário do que ocorre na presença do glicerol.

Através deste estudo foi possível estabelecer-se uma condição de cultivo na qual se pode tanto otimizar a produção de pigmentos, visando obter-se quantidades suficientes para isolamento, caracterização e utilização dos compostos isolados, como moléculas precursoras para o desenvolvimento de derivados com atividades

farmacológicas interessantes, uma vez que estudos prévios têm mostrado um grande potencial farmacológico de violaceína.

Referências

- Antônio, R. V. 1994. **Biossíntese de violaceína por *Chromobacterium violaceum*: síntese e atividades biológicas de um provável intermediário.** Tese de Doutorado. Universidade de Campinas, Brasil, 73 pp.
- August, P. R.; Grossman, T. H.; Minor, C.; Draper, M. P.; MacNeil, I. A.; Pemberton, J. M.; Call, K. M.; Holt, D.; Osburne, M. S. 2000. Sequence analysis and functional characterization of the violacein biosynthetic pathway from *Chromobacterium violaceum*. **JMMB Research Article**, 2 (4): 513-519.
- Blosser, R. E.; Gray, F. 2000. Extraction for violacein from *Chromobacterium violaceum* provides a new quantitative bioassay for N-acyl homoserine lactone autoinducers. **Journal of Microbiological Methods**, 40: 47-55.
- Brazilian National Genoma Project Consortium. 2003. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100 (20): 11660-11665.
- Caldas, L. R.; Leitão, A. A. C.; Santos, S. M.; Tyrrell, R. M. 1978. Preliminary experiments on the photobiological properties of violacein. **International Symposium on Current Topics Radiobiology and Photobiology**, Rio de Janeiro, Brasil p. 121-132.
- DeMoss, R. D. 1967. Violacein. **Antibiotics**, 2: 77-81.
- Durán, N.; Campos, V.; Riveiros, R.; Joyas, A.; Pereira, M. F.; Haun, M. 1989. Bacterial chemistry III. Preliminary studies on trypanosomal activities of *Chromobacterium violaceum* products. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 61: 31-36.
- Durán, N.; Faljoni-Alario, A. 1980. Bacterial chemistry-I: studies of a potencial phototherapeutic substance from *Chromobacterium violaceum*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 52: 297-302.
- Durán, N.; Menck, F. M. 2001. *Chromobacterium violaceum*: A review of pharmacological and industrial perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, 27 (3): 201-222.
- Holt, J. G.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T.; Willians, S. T. 1994. Facultatively anaerobic gram-negative Rods. In: Garrity, G. M. (ed.). **Bergeys Manual of Determinative Bacteriology**. 9nd ed. Willians & Wilkins, New York, USA, p. 198.
- Hoshino, T.; Momen, A. Z. M. 2000. Biosynthesis of violacein. Intact incorporation of the tryptophan molecule on the oxindole side, with intramolecular rearrangement of the indole ring on the 5-hydroxyindole side. **Biotechnology and Biochemistry**, 64 (3): 539-549.
- Melo, P. S.; Maria, S. S.; Vidal, B. C.; Haun, M.; Durán, N. 2000. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In vitro Cellular Development Biology Animal**, 36: 539-543.
- Midani, S.; Rathore, M. 1998. *Chromobacterium violaceum* infection. **Southern Medical Journal**, 91: 464-466.
- Retori, D. 1996. **Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic produced by *Chromobacterium violaceum*.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 54 pp.
- Richards, C. 1993. *Chromobacterium violaceum*, opportunistic pathogenic bacteria isolated in tropical and subtropical areas. **Bulletin Social Pathology Exotique**, 86: 169-173.