

7.
mar. 1996



PATRÍCIA DA SILVA MELO

mt
**PIGMENTOS OBTIDOS DE *Chromobacterium violaceum* e
Serratia marcescens, PROPRIEDADE TRIPANOCIDA DA
PRODIGIOSINA E ESTUDOS TOXICOLÓGICOS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a)
Patrícia da Silva Melo
e aprovada pela Comissão Julgadora.

30/1/96 *Guarules*

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção do título de Mestre em
Ciências, área Bioquímica.

Orientadora
Profa. Dra. Nora Marcela Haun Quirós

Campinas, 1996



| | |
|---------|--|
| ADE | BC |
| HAMADA: | UNICAMP |
| | M491p |
| Ex. | |
| BO BC/ | 27113 |
| C. | 667/96 |
| | <input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/> |
| CO | R\$ 11,00 |
| A | 21/03/96 |
| CPD | C.M. 00085280-3 |

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

M491p

Melo, Patrícia da Silva

Pigmentos obtidos de *Chromobacterium violaceum* e *Serratia marcescens*, propriedade tripanocida da prodigiosina e estudos toxicológicos / Patrícia da Silva Melo. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Nora Marcela Haun Quirós.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

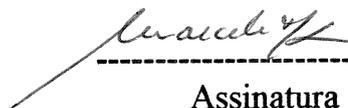
1. *Chromobacterium violaceum*. 2. *Serratia marcescens*. 3. Tripanossomose. I. Haun Quirós, Nora Marcela. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 30 de Janeiro de 1996.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Profa. Dra. Nora Marcela Haun Quirós (Orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Maria Lucia Furlan Wada



Assinatura

Profa. Dra. Satie Hatsushika Ogo



Assinatura

SUPLENTE:

Prof. Dr. Hernandes Faustino de Carvalho

Assinatura

Aprovada

Aos meus pais, que me mostraram os caminhos da vida. À Cristina pelo apoio e amizade constantes. A vocês devo este trabalho.

À Carmen pela solidariedade e agradável convivência.

Aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Nora Marcela Haun pela orientação e confiança depositadas no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Nelson Durán pela colaboração e incentivo no decorrer de todas as etapas.

À Profa. Solange de Castro por realizar os testes de atividade tripanocida.

Aos membros da pré-banca Wanderley, Hernandes e Lúcia, pelas correções e valiosas sugestões.

Aos funcionários do Instituto de Química e do Departamento de Bioquímica, que contribuíram além da assessoria técnica com a amizade.

Às amigas Regina, Carmen, Angela e Rosi, pelo estímulo, sugestões e críticas, que colaboraram em etapas cruciais deste trabalho. Ao Mauro, pela ajuda com o microcomputador.

Aos amigos, que contribuíram através da convivência agradável, compreensão e incentivo nos momentos difíceis. Vocês foram essenciais ao desenvolvimento do trabalho. Muito obrigada a todos.

À CAPES, PADCT e FAEP pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

RESUMO

SUMMARY

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. Doença de Chagas - Aspectos Gerais..... | 1 |
| 1.2. Microbiologia..... | 6 |
| 1.2.1. Metabolismo Secundário..... | 6 |
| 1.2.2. <i>Chromobacterium violaceum</i> | 8 |
| 1.2.3. <i>Serratia marcescens</i> | 11 |
| 1.3. Citotoxicidade..... | 13 |
| 2. OBJETIVOS GERAIS..... | 18 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 19 |
| 3.1. Microbiologia..... | 19 |
| 3.1.1. <i>Chromobacterium violaceum</i> | 19 |
| 3.1.2. Técnicas Empregadas para Identificação das Bactérias do Sedimento do Rio Negro..... | 22 |
| 3.1.3. <i>Serratia marcescens</i> | 22 |
| 3.2. Atividade Biológica..... | 26 |
| 3.2.1. Teste de Hemólise..... | 26 |
| 3.2.2. Atividade Tripanocida da Prodigiosina: Estudos <i>in vitro</i> | 27 |
| 3.2.3. Ensaio Citotóxicos em Células de Mamíferos..... | 27 |
| 4. RESULTADOS..... | 31 |
| 4.1. PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA VIOLACEÍNA..... | 31 |
| 4.2. IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS DO RIO NEGRO..... | 32 |

| | |
|--|----|
| 4.3. PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PRODIGIOSINA..... | 34 |
| 4.4. ATIVIDADE BIOLÓGICA..... | 34 |
| 4.4.1. TESTE DE HEMÓLISE..... | 35 |
| 4.4.2. ATIVIDADE TRIPANOCIDA..... | 35 |
| 4.4.3. ENSAIOS CITOTÓXICOS..... | 35 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 53 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 60 |
| 7. PERSPECTIVAS..... | 61 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 62 |
| 9. APÊNDICE..... | 73 |

SUMMARY

Chromobacterium violaceum is a widely distributed microorganism. It is in soil, water and in the Rio Negro (Amazon). This Gram negative rod shaped bacteria produces the pigment violacein, which has shown trypanocide activity. Since violacein is produced in small quantity, the initial purpose of this study was to investigate different strains of bacteria from Rio Negro which may produce violacein in highest yield. Sediment was collected from Rio Negro, inoculated in simple broth, 30°C /24 h and striated in simple agar. Only three kinds of colonies - white, yellow, and red grew (rod Gram negative bacteria). After two days the white strain changed to violet indicating violacein production. Spectral analysis, UV/Vis (UV/Visible), IR (Infra Red) and NMR (Nuclear Resonance Magnetic), confirmed the presence of violacein. In order to determine of *C. violaceum* characteristics and its non pigmented variants, laboratories tests were undertaken. Gram'staining, motility, morphological, growth and biochemical studies indicated that the white, yellow and violet colonies were *C. violaceum*. The red one was *Serratia marcescens* (*Chromobacterium prodigiosum*) which produces the red pigment antibiotic prodigiosin. The spectral data (UV/Vis, IR and NMR) reinforce this conclusion. The low number of microorganisms isolated in the sample confirm the high antibiotic activity of the pigments produced by *C. violaceum* (violacein) and *Serratia marcescens* (prodigiosin) in the Rio Negro water. The chemotherapy of Chagas' disease remains an unsolved problem, and the search for alternative drugs is in course. Current therapy of this disease is unsatisfactory and only Nifurtimox is in general used, with several restricted applicability for chronic patients, as well being deleterious effects. Thus, it is of fundamental importance to search for new drugs with different mechanism of action of Nifurtimox in order to avoid these problems. We have found a potential compounds for the treatment of Chagas' disease, the pigments extracted from *S. marcescens* and *C. violaceum*, respectively prodigiosin (ID₅₀ of less 100 µM) and violacein (ID₅₀ of 46 µM). Evaluation ID₅₀ through DNA synthesis inhibition, soluble tetrazolium/formazan (MTT) and Neutral Red (NR) tests on V-79 Chinese hamster (M-8) cells were carried out. Using MTT viability test, ID₅₀ was 6 µM for prodigiosin, 7 µM for violacein and 500 µM for Nifurtimox, and for NR test the ID₅₀ was 1.0 µM, 12 µM and 250 µM for prodigiosin, violacein and Nifurtimox, respectively. Prodigiosin resulted in a ID₅₀ value of 20 µM, for violacein of 5 µM and for Nifurtimox of 300 µM obtained through DNA synthesis inhibition.

RESUMO

Chromobacterium violaceum é um microrganismo de larga distribuição podendo ser encontrado no solo, água e no Rio Negro (Amazônia). Esta bactéria Gram negativa produz um pigmento denominado violaceína, que apresenta alguma atividade tripanocida. Como a violaceína é produzida em pequena quantidade o propósito inicial desse estudo foi investigar cepas diferentes provenientes do Rio Negro que produzissem a violaceína em um maior rendimento. Um sedimento coletado do Rio Negro foi inoculado em caldo simples, 30°C/24 h e posteriormente inoculado através de estrias em ágar nutriente. Somente três tipos de colônias - branca, amarela e vermelha cresceram (todas bactérias Gram negativas). Após dois dias de incubação a colônia branca adquiriu tonalidade violeta indicando a produção de violaceína. Análises espectrais, UV/Vis, IV (Infra Vermelho) e RMN (Ressonância Magnética Nuclear), confirmaram a presença da violaceína. Para determinar as características de *C. violaceum* e sua variante não pigmentada, testes laboratoriais foram realizados. A coloração pelo Gram, motilidade e estudos bioquímicos e de crescimento indicaram que as colônias branca/violeta e amarela eram *C. violaceum*. A colônia vermelha era *Serratia marcescens* (*Chromobacterium prodigiosum*) a qual produz o pigmento com ação antibiótica chamado prodigiosina. Os dados espectrais (UV/Vis, IV e RMN) reforçam essa conclusão. O pequeno número de bactérias isoladas na amostra confirma a alta atividade antibiótica dos pigmentos produzidos pela *C. violaceum* (violaceína) e *S. marcescens* (prodigiosina) na água do Rio Negro. A quimioterapia da doença de Chagas permanece um problema sem solução, e a pesquisa para drogas alternativas está em andamento. A terapia atual dessa doença é insatisfatória e somente o Nifurtimox está em uso, com diversas restrições na administração em pacientes crônicos, devido aos seus efeitos colaterais. Desse modo é de importância fundamental a pesquisa de novas drogas com mecanismos de ação diferentes do Nifurtimox com o objetivo de evitar esses problemas. A violaceína e a prodigiosina extraída da *C. violaceum* e da *S. marcescens*, respectivamente apresentam atividade tripanocida, a primeira possui um ID₅₀ de 46 µM e a segunda, menos que 100 µM. A avaliação da citotoxicidade foi realizada através da inibição da síntese de DNA, redução do MTT e captação do Vermelho Neutro (VN), utilizada em células de hamster chinês V-79 (M-8). No teste de viabilidade através da redução do MTT o ID₅₀ foi de 6 µM para a prodigiosina, 7 µM para a violaceína e 500 µM para o Nifurtimox, no teste do VN o ID₅₀ para a prodigiosina foi de 1,0 µM, 12 µM para a violaceína e 250 µM para o Nifurtimox. A prodigiosina resultou em um valor de ID₅₀ de 20 µM, o Nifurtimox de 300 µM e a violaceína de 5 µM obtidos através da inibição da síntese de DNA.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Chagas - Aspectos Gerais

A doença de Chagas é uma patogenia crônica resultante da parasitemia do *Trypanosoma cruzi* no organismo humano. Uma das mais graves consequências é uma lesão cardíaca cuja expressão máxima conduz a uma redução da capacidade física com consequente diminuição do tempo de vida. A doença é típica de locais miseráveis com casas de barro e sem saneamento básico, que favorecem a proliferação do vetor (Bryan *et alii*, 1994).

A doença de Chagas define-se como uma protozoose tecidual e hemática, de natureza endêmica, apresentando como agente causal o hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* e possui ampla distribuição na América Latina, apresentando 60 milhões de pessoas sob risco de infecção (Schirmer *et alii*, 1995). Essa doença é um problema médico-social grave que atinge grande parte do continente americano, principal e especificamente a América do Sul, onde cerca de 20 milhões de pessoas apresentam sorologia positiva, sendo portanto a principal doença parasitária desta região. No Brasil seu nível endêmico é alto, onde existem cerca de 5 milhões de chagásicos (Silva *et alii*, 1993; Goldenberg, 1993).

Essa doença atinge quase todo o território brasileiro, exceto a Região Amazônica e a Mata Atlântica (Brenner & Andrade, 1979). Embora seja uma enfermidade tipicamente rural, observamos atualmente o fenômeno de urbanização da doença que é resultante de migrações internas e do progressivo aumento da transmissão do *T. cruzi* por via transfusional (Dias & Brenner, 1984; Rocha *et alii*, 1994).

O agente transmissor da doença de Chagas é um inseto da ordem Hemiptera, família Reduviidae e sub-família Triatominae. As espécies mais importantes na epidemiologia da doença de Chagas são o *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e o *Panstrongylus megistus* (Brenner & Andrade, 1979).

O homem torna-se infectado quando tripomastigotas infectantes presentes nas fezes do barbeiro penetram no local da picada, em outras feridas ou em mucosas. Os tripomastigotas são ingeridos por macrófagos, tornam-se amastigotas e começam a proliferar por divisão binária nas células do sistema retículo-endotelial. Uma lesão

primária (**chagoma**) frequentemente se desenvolve no local da picada. Os parasitas proliferam intracelularmente como amastigotas e então se transformam em tripomastigotas invadindo a corrente sanguínea, conduzindo a infecção a todas as partes do organismo (Storino & Milei, 1986).

Formas amastigotas se multiplicam dentro de vários tipos de células nos órgãos e tecidos do corpo causando febre e linfadenopatia. Tripomastigotas podem, frequentemente, ser demonstrados no sangue periférico durante a fase febril da doença, apesar da parasitemia ser baixa. O sistema retículo endotelial, os músculos cardíaco, esquelético e liso e as células nervosas são alvos preferenciais para a invasão (Rey, 1991).

Várias espécies de triatomíneos são infectadas ao alimentarem-se de sangue de animais parasitados, podendo, a partir disso, contaminar outros animais. No momento em que o triatomíneo abandonou o ambiente silvestre, domiciliando-se, o homem passou a ser parte da cadeia epidemiológica.

Outros mecanismos de transmissão da doença são: a via congênita; através do leite materno; contaminação por transplantes de órgãos; infecção pela via digestiva, através de alimentos contaminados por fezes de triatomíneos, sendo esta a provável explicação para alguns surtos descritos na literatura (Chagas, 1991).

O *T. cruzi* apresenta diversas variações morfológicas, fisiológicas e ecológicas, além de diferentes padrões de infectividade e patogenicidade, o que leva alguns autores a definir esta espécie como “um complexo cruzi”. Inúmeras técnicas e novos procedimentos têm sido utilizados para fazer a distinção dos diferentes parasitas, chegando-se atualmente a um total de sessenta linhagens ou cepas, descritas por diferentes autores (Rey, 1991). Os principais critérios utilizados na caracterização das diferentes cepas do *T. cruzi* são: a origem geográfica, a virulência e a patogenicidade, as espécies de hospedeiros, a sensibilidade do flagelado a quimioterápicos e outras drogas, as formas clínicas e epidemiológicas da enfermidade, os zimodemas (características enzimáticas específicas do parasita evidenciadas por técnicas eletroforéticas) e os esquizodemas, características do DNA cromossômico e mitocondrial pesquisadas através do uso de sondas especiais de DNA (Goldenberg, 1993).

Durante seu ciclo, o *T. cruzi* pode apresentar quatro formas evolutivas dependendo do hospedeiro onde se encontre. No hospedeiro vertebrado são observadas as formas amastigotas (intracelulares) e tripomastigotas (sanguíneas), enquanto nos hospedeiros invertebrados e em meios de cultivo estão presentes os epimastigotas, que posteriormente passam a tripomastigotas metacíclicos (Neves, 1986).

A patogenia da doença de Chagas produz uma série de fenômenos de agressão/defesa, resultando diversos tipos de lesões acompanhadas de variadas respostas imuno-inflamatórias e sintomas nos diferentes pacientes. Essas lesões podem ser provocadas pelo parasitismo em si (aglomerados de amastigotas lesando ou rompendo a célula parasitada) ou pelos seus antígenos os quais induzem respostas imunológicas e inflamatórias no hospedeiro. As respostas imuno-inflamatórias ocorrem como uma reação do organismo aos antígenos presentes no foco parasitário. Estes antígenos são restos das células parasitadas e de formas parasitárias (amastigotas ou tripomastigota) degeneradas (Brener, 1994).

Muitas drogas com atividade anti-chagásica têm sido descritas, tais como arsenobenzenos, 8-aminoquinoleínas, 5-nitrofuranos, 5-nitroimidazóis, 5-nitrotiazóis e certos antibióticos (Durán & Haun, 1991; De Castro, 1993; Brener, 1975; Gutteridge, 1976). Entre estas, tem merecido destaque o derivado imidazodioxolânico, Cetoconazol, por apresentar eficiência na Leishmaniose cutânea e na doença de Chagas *in vivo* e *in vitro* (Mc Cabe *et alii*, 1984). Entretanto, nenhuma destas drogas é totalmente curativa e normalmente são bastante tóxicas.

Entre os medicamentos usados com acompanhamento criterioso estão o Nifurtimox (fig. 01.a) e o Benznidazol. Esses medicamentos são indicados especialmente nos casos agudos que tenham ocorrido por transmissão natural, por transfusão sanguínea ou acidental. De toda forma, o objetivo é eliminar precocemente a infecção. Contudo, nos casos crônicos apesar da pouca eficiência e alta toxicidade dos medicamentos, aconselha-se o seu emprego, principalmente em crianças (Dias, 1990).

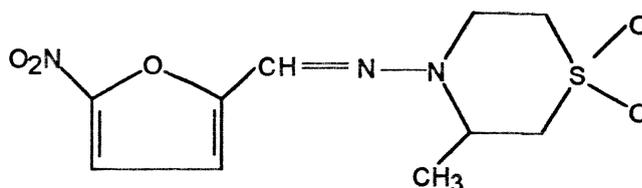


Fig. 01.a: ESTRUTURA DO NIFURTIMOX

A terapêutica da doença de Chagas não é totalmente eficaz, sendo que o Nifurtimox e o Benznidazol são parcialmente efetivos no tratamento na fase aguda da doença e não efetivos na fase crônica (Stoppani, 1983). Outros problemas enfrentados no tratamento da doença de Chagas referem-se às diferenças regionais de susceptibilidade do *T. cruzi* à droga. Assim, o Nifurtimox mostra-se eficiente em chagásicos crônicos na Argentina, porém é pouco eficaz em Minas Gerais, devido às diferenças entre cepas (Storino & Milei, 1986).

O Nifurtimox age nas formas sanguíneas teciduais, é administrado por via oral, sob a forma de comprimido na dose de 8 a 12 mg/Kg por dia, até 60 dias. Os efeitos colaterais que aumentam com tratamentos mais prolongados são: anorexia, emagrecimento, parestesias, hiperexcitabilidade, neurotoxicidade e depressão medular (De Méo *et alii*, 1992).

Embora o Nifurtimox seja efetivo contra o *T. cruzi* “*in vitro*”, quando usado clinicamente a droga exerce ação supressora e não curativa (Mester *et alii*, 1991). Através de xenodiagnósticos e métodos de imunoaglutinação para detectar o parasita em pacientes tratados com a droga, verificou-se que esta droga reduzia a parasitemia a níveis muito baixos, mas não eliminava o parasita completamente (Cançado *et alii*, 1976).

Dentre as drogas com atividade tripanocida destacam-se os nitroheterociclos derivados do furano e imidazol, compostos de uso disseminado na prática médica como agentes antimicrobianos e antiparasitários (Kedderis & Miwa, 1988). Acredita-se que a ativação biológica de compostos nitroheterocíclicos seja dependente do metabolismo redutivo. Nesse processo há enzimas que catalisam a transferência de elétrons de redutores endógenos para o xenobiótico ativando-o (Docampo & Stoppani, 1979).

A seletividade tecidual dos efeitos da ativação biológica de compostos nitroheterocíclicos depende de vários fatores incluindo localização celular, níveis de enzimas antioxidantes e agentes amplificadores como o oxigênio, disponibilidade de enzimas específicas para iniciar o processo redutivo e capacidade de reparo dos danos mediados por nitrocompostos. Na toxicidade ocorre a formação de agentes alquilantes e se estabelece um ciclo redox (Mac Lane *et alii*, 1983).

No caso do Nifurtimox, a ação tripanocida parece depender do ciclo redox (Docampo *et alii*, 1981). A redução enzimática da droga leva à formação de um derivado radicalar que reage com o oxigênio gerando o íon superóxido e regenerando o composto de partida. Desencadeia-se assim a formação do radical hidroxila, cuja reatividade e inespecificidade seriam responsáveis pelo ataque intenso às estruturas funcionais do parasita levando ao seu colapso (Docampo & Moreno, 1984).

A quimioterapia de doença de Chagas é um campo de muito interesse com poucas substâncias atingindo testes clínicos. Um melhor entendimento das drogas atualmente utilizadas e de novos compostos sintetizados ou biossintetizados é necessário a fim de se identificar o mecanismo de toxicidade seletiva para o parasita. Desta forma outros agentes quimioterápicos mais eficazes e menos tóxicos poderão ser obtidos (Stutz, 1987).

A constatação de que agentes anti-micóticos como a terbinafina (Nishikawa & Naka, 1994) possuem atividade tripanocida e que microrganismos produzem uma larga variedade de compostos com propriedades antibióticas e anti-fúngicas conduziram à utilização da biotecnologia na pesquisa da produção de compostos com atividade anti-chagásica. Alguns produtos farmacêuticos como antibióticos, esteróides e alcalóides geralmente, são metabólitos secundários produzidos por bactérias, possuidores de atividades biológicas diversas. A pesquisa de microrganismos produtores de antibióticos que poderiam possuir atividade anti-chagásica apresenta-se, portanto, como um campo vasto na pesquisa de possíveis drogas tripanocidas.

1.2. Microbiologia

Microorganismos de interesse industrial são aqueles que possuem propriedades fisiológicas diversas as quais possibilitam a produção de um ou mais produtos de interesse específico. Além dessa capacidade de produção, o microrganismo precisa estar disponível em uma cultura pura, ser geneticamente estável e se possível, crescer em larga escala em cultura. Outras características inerentes aos microrganismos e que são importantes para a utilização como fonte de biofármacos são a biossíntese do composto em um período relativamente curto e a facilidade de extração deste.

As bactérias *Chromobacterium violaceum* e *Serratia marcescens* produzem metabólitos secundários com propriedades antibióticas que poderão ser úteis na pesquisa de novos anti-chagásicos.

1.2.1. Metabolismo Secundário

O metabolismo secundário consiste de processos que de alguma forma beneficiam o organismo no qual ele ocorre (BU'Lock *et alii*, 1982). Este possui uma atividade multifacetada que providencia vantagens diferenciadas ao microrganismo as quais, genericamente, podem ser representadas como intrínsecas ou extrínsecas. Funções intrínsecas afetam beneficemente a fisiologia do crescimento ou a reprodução do microrganismo produtor; funções extrínsecas implicam na atividade de outros organismos e têm várias rotas na regulação da interação entre o produtor e seu meio ambiente. A distinção importante entre metabólito primário e secundário reside na função, sendo que no primeiro caso sua função é indispensável ao metabolismo normal e está universalmente distribuída. No segundo é dispensável ao crescimento do microrganismo produtor (Vining, 1992).

Parece evidente, devido à natureza complexa e especializada da rota biossintética pelos quais os metabólitos secundários são produzidos, existir grande possibilidade da sua perda por mutação e, que há dificuldades na manutenção dessa sofisticada capacidade biossintética. Para persistir, o processo precisa ser positivamente selecionado e, somente através da seleção, existirá a possibilidade da persistência da rota bioquímica para a biossíntese do metabólito integrada à fisiologia do microrganismo (Campbell, 1984).

Um volume substancial de pesquisas tem estabelecido o modelo de controle fisiológico e, ao mesmo tempo, revelam a similaridade entre o controle do metabolismo secundário e de outros processos em resposta às mudanças do meio ambiente. A aplicação da genética molecular, e em particular dos procedimentos de clonagem gênica está possibilitando progressos rápidos na análise minuciosa desses mecanismos de controle (Gross *et alii*, 1989). Respostas à depleção específica de nutrientes, estresse causado por temperatura, mudança osmótica ou substâncias quimiosmóticas são mediadas por dois mecanismos principais de transdução de sinais. Um deles envolve um sensor de membrana ativado por mensagem do meio ambiente, enquanto que o segundo componente é uma proteína ligante de DNA que é ativada nesta mudança e afeta a função de um promotor. Em alguns sistemas a última etapa envolve a indução de genes alvos por causar a síntese de fatores específicos. Todo o processo segue um alto grau de discriminação na transmissão de sinais do meio ambiente para os determinantes genéticos que codificam a atividade fisiológica do microrganismo. (Vining, 1992).

A produção de um metabólito secundário depende de um controle fisiológico geral que responde a fatores ambientais (Demain *et alii*, 1983; Vining, 1986). Devido a isso, quando os microrganismos “selvagens” são cultivados em meios artificiais balanceados e ricos em nutrientes, eles não sintetizam os seus metabólitos secundários, ou o fazem abaixo do seu potencial. Embora a glicose seja frequentemente utilizada como fonte principal de energia e de carbono para o crescimento do microrganismo, este carboidrato é pouco utilizado na obtenção de metabólitos secundários. A glicose e outras fontes de carbono, têm sido consideradas como supressoras da biossíntese de vários metabólitos secundários, que possuem atividade bactericida, tais como, a neomicina, a bacitracina, as cefalosporinas, a penicilina, a violaceína e a prodigiosina (Drew & Demain, 1977).

Os processos formadores dos metabólitos secundários constituem uma evolução, sendo que novos metabólitos são produzidos através de mutações que alteram a especificidade de enzimas pré-existentes. Alguns destes, conferem uma vantagem seletiva aos seus microrganismos produtores (Lóren & Guinea, 1978; Martín & Liras, 1981).

1.2.2. *Chromobacterium violaceum*

O gênero *Chromobacterium* é composto de bastonetes Gram negativos, heterotróficos, os quais produzem o pigmento roxo insolúvel em água, denominado violaceína (fig. 01.b). No Brasil, a *C. violaceum* é encontrada principalmente nas águas e no solo do Rio Negro, Amazônia (Riveros *et alii*, 1988).

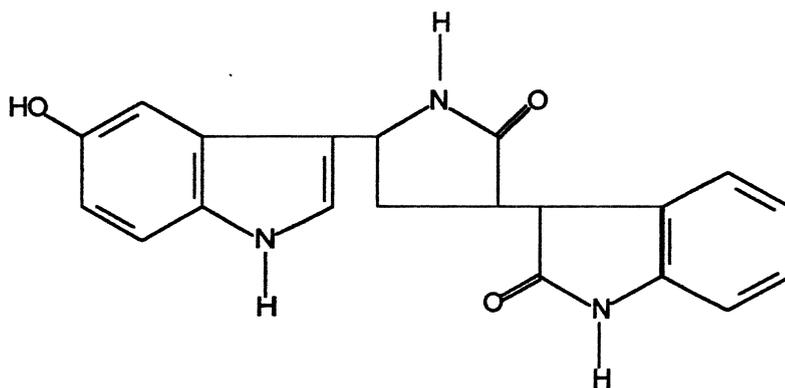


Fig. 01.b: ESTRUTURA DA VIOLACEÍNA

A descrição do gênero, a seguir, está baseada naquela feita por Sneath (1960, 1974) para *C. violaceum*. O gênero *Chromobacterium* consiste de bastonetes Gram negativos, oxidase positiva, catalase positiva, móveis por meio de flagelos. A *Chromobacteria* é anaeróbica facultativa e produz colônias violetas em meio sólido ou um anel violeta na superfície quando em meio líquido. A temperatura ótima para o seu crescimento está entre 30 a 35 °C, a temperatura mínima para crescimento está entre 10 a 15 °C e a máxima 40°C, utiliza carboidratos, principalmente pela via fermentativa. Cresce em meios comuns e é resistente a benzilpenicilina (10 µg/mL) e a agentes vibriostáticos.

C. violaceum é uma bactéria saprófita do solo e água e, normalmente é considerada como não patogênica para os homens, mas, ocasionalmente ela é um agente patogênico de extrema virulência para homens e animais (Petrillo, 1984). Esta bactéria tem sido isolada de infecções sérias em homens e animais, sendo a água e/ou solo contaminado com este microrganismo os principais agentes causais. Uma revisão sobre chromobacteriose foi feita por Sneath (1960), os sintomas podem variar consideravelmente mas evoluem na maioria das vezes para septicemia, causando a

morte rapidamente. A doença pode ser curada se tratada no estágio inicial usando tetraciclina.

As condições e os meios de cultivo utilizados podem influenciar fortemente o isolamento da *C. violaceum*. Sneath (1960) concluiu que ágar sangue é mais eficaz para o isolamento de *C. violaceum* de infecções do que ágar nutriente, que normalmente apresenta peróxido o qual inibe o crescimento desta bactéria. A *Chromobacterium* pode crescer facilmente na maioria dos meios comumente usados nos laboratórios tais como ágar nutriente ou GYCA (1% glicose, 0,5% extrato de levedura, 3% CaCO₃ e 2% ágar em água destilada), contudo, o O₂ é imprescindível para a produção da violaceína.

Em seu habitat, a *C. violaceum* usualmente constitui componente minoritário da microflora total, sendo encontrada mais frequentemente em regiões tropicais e subtropicais, do que em climas temperados. Para isolamento do solo e da água os meios de cultivo comuns não são muito eficazes porque a *Chromobacterium* representa somente uma pequena parcela da microflora presente. Outras bactérias podem inibir o crescimento ou a produção da violaceína, que é um fator importante na seleção deste microrganismo (Moss & Ryall, 1978).

Corpe (1951) descreveu a seguinte técnica usando meio seletivo: "Amostras de solo com água destilada estéril eram colocadas em placas de Petri. Grãos de arroz pré-cozidos eram espalhados sobre a superfície da amostra em teste e as placas incubadas a 23°C - 25°C durante 5 dias. Ao final do período de incubação alguns dos grãos de arroz estavam parcialmente recobertos com pontuações violetas indicando a presença de *Chromobacterium* sp. O princípio da seletividade do meio de e Enriquecimento não é conhecido, contudo o uso de polissacarídeos como principal fonte de energia pode ser significativa mas foram infrutíferas as tentativas preliminares para identificar um fator específico que aumentasse a produção do pigmento no arroz (De Moss, 1967).

Quando a cepa de *Chromobacterium* é pigmentada é preciso diferenciá-la de outras cepas produtoras de violaceína pertencentes aos gêneros *Janthinobacterium* ou a *Chromobacterium fluviatile*. *Chromobacterium* difere de *Alteromonas luteoviolacea* por sua habilidade em utilizar citrato, glicose, frutose e manose (Gauthier, 1976, 1982).

Cepas não pigmentadas de *C. violaceum* podem ser confundidas com membros de *Vibrio* e *Aeromonas*. Contudo, *C. violaceum* difere de *Aeromonas* por possuir flagelo, apresentar reação negativa para indol e vermelho de metila. Pode ser distinguida de *Vibrio* por resultados negativos para a descarboxilação de ornitina e lisina (Sivendra & Tan, 1977).

Lichstein & Van De Sand (1945) testaram as propriedades antibióticas da violaceína em uma faixa de concentração de 1,0 a 300 µg/mL contra 51 cepas de bactérias. O crescimento em 1 mL de triptose ou caldo triptose glicose, após inóculo de cerca de 10^6 células do mesmo meio foi usado como critério para o efeito antibiótico. Em geral, com a exceção de duas cepas de *Neisseria meningitidis*, o pigmento não teve efeito contra dez cepas Gram negativas testadas. De modo inverso, o pigmento exibiu ação notável contra o restante das bactérias, com exceção da *Clostridium welchii*, todas Gram positivas.

Além da violaceína, *C. violaceum* produz outros antibióticos: aerocianidin, que possui um grupo isonitrila e é ativo contra bactérias Gram positivas (Parker *et alii*, 1988); aerocavin, que exibe atividade contra bactérias Gram positivas e negativas *in vitro* (Singh *et alii*, 1988); 3,6- dihidroxindobenzeno que inibe crescimento de bactérias Gram negativas (Hamada *et alii*, 1983).

Experimentos anteriores mostraram que a violaceína possui efeito tripanocida quando se expõem o *T. cruzi* ao pigmento não purificado em uma concentração de 75 µg/mL (Durán *et alii*, 1994; Caldas *et alii*, 1978).

1.2.3. *Serratia marcescens*

Serratia marcescens é uma bactéria em forma de bastonete, Gram negativa, caracterizada pela habilidade em produzir um pigmento vermelho denominado prodigiosina. Nos últimos anos aumentou-se o interesse sobre esta bactéria pelo fato desta ser um patógeno oportunista (Davis *et alii*, 1970). Contudo, entre os diferentes biotipos de *Serratia marcescens*, somente os não cromogênicos constituem uma ameaça real aos hospitais. As espécies cromogênicas normalmente são isoladas do meio ambiente: água, solo, plantas ou insetos.

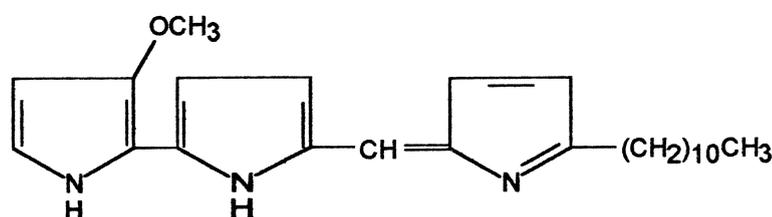


Fig. 01.c: ESTRUTURA DA PRODIGIOSINA

A *Serratia marcescens* é uma bactéria pequena que se movimenta por meio de flagelos. Fermenta manitol, sacarose e salicilina com a produção de ácido e algumas bolhas de gás. É indol negativo, geralmente dando resultado negativo para o Vermelho de Metila e positivo para Voges-Proskauer (Grimont & Grimont, 1978).

As reações bioquímicas para *S. marcescens* são a formação de ácido a partir da arabinose, lactose, sacarose e xilose, produz hemólise em ágar sangue entre 24 a 48 h de incubação. Não há formação de gás a partir do inositol, glicerol, celobiose ou amido (Parker & Duerden, 1990).

As colônias de *Serratia marcescens* em ágar são usualmente indiferenciadas nos dois primeiros dias, e depois desenvolvem uma pigmentação difusa. O pigmento só é formado na presença de O₂ e em uma temperatura de 30°C. A temperatura ótima para a formação do pigmento não é necessariamente a mesma que aquela para o crescimento, assim, as cepas crescem melhor em temperatura próxima a 37°C mas produzem pouco ou não produzem o pigmento (Williams *et alii*, 1971; Kobayashi, 1981). A habilidade em produzir a prodigiosina normalmente diminui ou há perda irreversível após repetidos repiques.

A formação do pigmento é influenciada pela composição do meio, pH, temperatura de incubação e suprimento de oxigênio (Heineman *et alii*, 1970), sendo que a localização intracelular e a função da prodigiosina para a bactéria não estão totalmente claras (Williams *et alii*, 1980).

A prodigiosina é solúvel em álcool, éter, clorofórmio, acetona e benzeno, mas é insolúvel em água. A estrutura tripirrólica foi confirmada por Hubbard e Rimington (1950). A prodigiosina também é formada por outros microrganismos além da *Serratia*, incluindo um actinomiceto (Nakamura *et alii*, 1986).

Existe uma interrelação que condiciona a produção de prodigiosina em resposta a concentração de glicose. O pigmento só é produzido na fase estacionária, em meio em que a fonte de carbono e energia se encontrem praticamente esgotadas. Considerando-se o mesmo processo ocorrendo em meio sólido com uma concentração alta de glicose (20 g/L), a população bacteriana entra na fase estacionária e a produção da prodigiosina é nula. Isto demonstra uma perfeita sincronização entre a cinética de produção do pigmento em relação ao decréscimo da concentração da glicose (Lóren & Guinea, 1978).

A produção da prodigiosina quando a bactéria se encontra com a fonte de carbono e energia esgotada manteria de certo modo o equilíbrio de populações de *Serratia* situadas em habitats naturais para esta bactéria. Nestas circunstâncias, a prodigiosina que é um metabólito dotado de propriedades antifúngicas e antibacterianas, inibiria o crescimento de outras bactérias. Estabelecendo uma similitude esta situação pode ser comparada à indução da produção de esporos por bactérias capacitadas para isso (Lóren & Guinea, 1978).

A biossíntese de metabólitos normalmente é inibida pelo produto final e o fato de que a prodigiosina é insolúvel na água e acumula dentro da célula poderia inibir sua formação.

1.3.Citotoxicidade

Além de verificar a atividade biológica de um composto, é de fundamental importância determinar a toxicidade deste, uma vez que deve se analisar o efeito terapêutico *versus* a toxicidade. A demanda atual condiciona que novas drogas, cosméticos, aditivos alimentares e outras matérias primas, passem através de testes de toxicidade extensos antes de serem liberados para uso (Freshney, 1994). Isso, usualmente, consome um grande número de experimentos com animais, os quais acarretam alto custo financeiro além dos aspectos éticos questionados por entidades protetoras de animais. Devido a esses fatores, existem pressões, de ordem econômica e humana, para realizarem-se parte dos testes de toxicidade *in vitro* (citotoxicidade).

Uma aplicação crescente no uso de cultura de células é testar e investigar o modo de ação de vários produtos que podem ter usos diversos tais como drogas, detergentes, cosméticos, inseticidas e preservantes. Contudo, os resultados obtidos usando cultura de células não podem ser extrapolados diretamente para a situação do organismo como um todo. Entretanto, espera-se que, se algum produto produz efeitos deletérios *in vitro* em diferentes linhagens celulares, algum efeito deve ser previsível quando o produto for utilizado no animal. Apesar das limitações da cultura de células, os resultados dos testes são muito reprodutíveis (Freshney, 1978).

Analisando a disciplina de toxicologia, duas áreas básicas podem se distinguir: toxicologia descritiva e a toxicologia mecanística. A toxicologia descritiva possui interesse na sintomatologia dos efeitos colaterais de produtos químicos no organismo e, em estabelecer a dose na qual isso ocorre. Geralmente os testes em animais de laboratório são realizados para se investigar esses fatores, seguindo os protocolos padronizados. A toxicologia mecanística tem como objetivo analisar os mecanismos que acompanham os vários tipos de efeitos colaterais (Schou, 1990).

Utilizando uma toxicologia celular comparativa é possível detectar a potência tóxica de vários compostos. Essa é a base para a caracterização da toxicidade *in vitro* e para a identificação dos tipos e/ou funções celulares mais vulneráveis. Contudo, quando resultados quantitativos de diferentes testes *in vitro* são comparados, outros aspectos de citotoxicidade comparativa têm que ser considerados, principalmente a influência das condições de exposição. Os resultados de um teste em cultura de células

não dependem somente das propriedades do tipo celular usado, mas das condições experimentais tais como tempo de exposição, composição do meio, relação entre o volume celular e a quantidade de meio. Enquanto alguns desses fatores podem ser mantidos constantes é necessário variar outros devido a diferenças bioquímicas e fisiológicas das células usadas.

Torna-se evidente que um experimento de citotoxicidade apropriado permite uma interpretação limitada em relação ao mecanismo de toxicidade do composto testado porém, isso serve como uma base para a avaliação das características toxicológicas de novos químicos, tanto quanto habilita decidir sobre quais experimentos *in vivo* deverão ser realizados e quais são os órgãos ou organelas mais afetados (Stark *et alii*, 1986). Esses experimentos complementares dependem da natureza do composto e qual a utilização almejada para este.

Procedimentos comparativos baseados no conhecimento da performance dos estudos *in vitro* são fundamentais para a seleção racional de baterias de testes com a intenção de reduzir ou substituir o uso de animais em avaliações de risco. Neste caso, a relevância dos ensaios *in vitro* tem que ser avaliada através de comparações apropriadas com os dados *in vivo*, sendo que essas comparações devem considerar as diferenças entre fatores toxicocinéticos operando nos dois sistemas (Seibert *et alii*, 1994).

Toxicidade é um evento complexo *in vivo*, onde suas expressões podem ser manifestas em um espectro largo de efeitos, desde simples morte celular até aberrações metabólicas complexas como neuro e/ou nefrotoxicidade, onde necessariamente não há morte celular, somente alterações funcionais. Devido a essas considerações, os ensaios de citotoxicidade *in vitro* devem procurar abranger diversos parâmetros que avaliem alvos diferentes, conseguindo grande reprodutibilidade. Um problema que precisa ser sanado é a obtenção de uma maior correlação entre os ensaios *in vitro* e *in vivo* (Roguet *et alii*, 1993).

Testes de citotoxicidade avaliam a capacidade de uma substância matar células, sendo que alguns desses ensaios são desenvolvidos com propósitos diferentes, tais como na seleção de drogas com atividade anti-cancerosa, outros são métodos com usos gerais. O número de métodos disponíveis para distinguir células mortas das células

vivas tem aumentado rapidamente nos últimos anos. O fator limitante nos testes de citotoxicidade é o número de tipos celulares que podem ser cultivados *in vitro*.

A cultura de células pode ser usada para a avaliação basal da citotoxicidade e da toxicidade em órgãos alvos (Ekwall & Ekwall, 1988; Balls & Fentem, 1992). A maioria dos compostos químicos exercem os seus efeitos tóxicos através da modificação do metabolismo celular e/ou por danos nas estruturas celulares, por isso, um fator importante na citotoxicidade de químicos é a relação entre o tipo celular estudado e o órgão alvo *in vivo*. Outro fator importante em citotoxicidade é adequar as células para biotransformar xenobióticos em metabólitos mais ou menos tóxicos, processo conhecido como metabolização da droga. Drogas e outros químicos são metabolizados por várias rotas, as quais são classificadas em dois grupos: reação da fase I, principalmente catalisada pelo citocromo P450 e as reações da fase II de conjugação. As atividades das fases I e II têm sido demonstradas em cultura de hepatócitos, providenciando um modelo para avaliar a citotoxicidade através do metabolismo (Roguet *et alii*, 1993).

Alguns testes, como por exemplo a análise do conteúdo de ácido desoxirribonucleico (DNA), o conteúdo de proteína, a incorporação do corante Vermelho Neutro, a exclusão do Azul de Tripán e a redução do MTT [brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium)], têm adquirido atenção considerável no contexto de citotoxicidade. Em todos os testes as células são cultivadas em placas de plástico com várias concentrações da substância adicionadas ao meio de cultura. Após um período de exposição a substância-teste é retirada do meio e procedimentos de análise são desenvolvidos (Goldberg & Frazier, 1989).

O Vermelho Neutro e o MTT fornecem informações sobre as funções metabólicas celulares. O Vermelho Neutro é uma medida da integridade lisossomal e o MTT assegura o correto funcionamento do sistema enzimático mitocondrial (Renzi *et alii*, 1993).

A exclusão do Azul de Tripán junto com observações morfológicas permite avaliar a integridade estrutural da célula. Esse ensaio mede a habilidade das células vivas que possuem a membrana celular intacta em excluir o corante, permitindo a

quantificação do número de células vivas após a tripsinização ou o tratamento (Loveland *et alii*, 1992).

Um procedimento largamente utilizado para avaliar a citotoxicidade é o ensaio com Vermelho Neutro (2-amino-3-metil-7-dimetil-amino-cloreto de fenanzina) (Borefreund & Puerner, 1984). Este teste tem sido usado para estudar a citotoxicidade de compostos químicos, fármacos, surfactantes, aditivos alimentares, pesticidas, solventes misturas complexas e uma variedade de agentes químicos (Babich & Borefreund, 1990). Células de vários órgãos e espécies de mamíferos e peixes têm sido usadas como alvos (Babich & Borefreund, 1991). O ensaio é baseado na habilidade de células viáveis incorporarem e ligarem o Vermelho Neutro, um corante vital, ligeiramente catiônico, que consegue penetrar na membrana celular por difusão passiva não-iônica e concentra nos lisossomas, onde se fixa através de ligações eletrostáticas a grupos aniônicos inclusive fosfatos hidrofóbicos da matriz lisossomal (Repetto & Sanz, 1993).

Os resultados, utilizando o ensaio com Vermelho Neutro, são dependentes de dois fatores principais, primeiro, os resultados são dependentes do número de células viáveis na cultura, onde há uma relação linear entre o Vermelho Neutro extraído da cultura e o número de células viáveis nesta cultura (Parish & Mullbacher, 1983), o que implica que alterações tóxicas na proliferação celular podem modificar significativamente os resultados. Em segundo lugar, os resultados dependem da viabilidade lisossomal das células ou função destas. O termo viabilidade celular de uma cultura representa a porcentagem de células que expressam certas características inatas às células vivas, por exemplo, a exclusão de um corante como o Azul de Tripan. A incorporação do Vermelho Neutro por células viáveis pode ser modificada por alterações na superfície celular ou na membrana lisossomal. Dessa maneira, é possível distinguir células viáveis das injuriadas ou mortas, de acordo com sua capacidade lisossomal em incorporar o corante (Triglia *et alii*, 1991).

Teoricamente é possível que o tratamento com as drogas possa causar um aumento do número de células ou que o tamanho e/ou o número de lisossomas pode ser aumentado sem um aumento concomitante do número de células. Esses efeitos quando ocorrem não são tão óbvios quanto no caso do sulfato de cloroquina, uma

droga anti-malária que aumenta o pH dentro dos lisossomas e por isso é usada comumente em estudos de inibição da função lisossomal (Riddel *et alii*, 1986).

O ensaio de incorporação do Vermelho Neutro está descrito como sendo o mais sensível quando comparado a outros três parâmetros não-específicos que são: a liberação e quantificação da lactato desidrogenase extracelular (LDH), o conteúdo de proteína celular total e a habilidade de redução do MTT (Fautrel *et alii*, 1991).

O MTT é um composto útil para a determinação espectrofotométrica de células viáveis. A metodologia foi descrita originalmente por Mosmann (1983). Células que mantêm a integridade mitocondrial reduzem o MTT amarelo para o seu produto azul (formazan), com absorbância em 540 nm (Denizot & Lang, 1986).

A conversão para o formazan é uma medida quantitativa confiável do número de células vivas para um vasto número de linhagens celulares sendo um ensaio simples, reprodutível e semi-automático para quantificar o número de células, evitando-se o uso de isótopos radioativos, reagentes e equipamentos caros e o tempo gasto na realização dos protocolos experimentais (Loveland *et alii*, 1992).

2. OBJETIVOS GERAIS

O objetivo inicial do trabalho foi testar a Violaceína em cultura de células V-79 utilizando ensaios de citotoxicidade descritos recentemente. Para isso foi preciso cultivar a *Chromobacterium violaceum*, induzir a biossíntese do pigmento, extraíndo e purificando-o repetidamente. No transcorrer do trabalho, visando obter a violaceína em maior rendimento, procuramos encontrar uma cepa de *C. violaceum* através de um sedimento arenoso oriundo do Rio Negro (habitat natural da bactéria), que produzisse o composto em maior quantidade e, avaliar a produção da violaceína. Uma das bactérias identificadas foi a *Serratia marcescens*, produtora do pigmento vermelho denominado prodigiosina, o qual foi extraído, purificado e caracterizado por medidas espectroscópicas. Houve interesse em investigar a atividade tripanocida da prodigiosina e avaliar a sua citotoxicidade, realizando estudos comparativos com a violaceína e o Nifurtimox. A primeira possui alguma atividade tripanocida e o segundo, fármaco utilizado criteriosamente no tratamento de chagásicos, surgindo assim uma nova perspectiva do trabalho inicialmente proposto apenas para a violaceína.

De acordo com o descrito acima os objetivos gerais foram:

- a) Cultivar *C. violaceum*, obter e purificar a violaceína;
- b) Identificar as bactérias presentes no sedimento do Rio Negro;
- c) Cultivar *S. marcescens*, produzir, purificar e caracterizar o pigmento produzido (prodigiosina);
- d) Testar a atividade tripanocida da prodigiosina;
- e) Avaliar comparativamente a citotoxicidade do Nifurtimox e dos pigmentos prodigiosina e violaceína;
- f) Padronizar o uso do MTT e do Vermelho Neutro para a avaliação de citotoxicidade no laboratório.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os reagentes utilizados na preparação dos meios de cultura, na extração e purificação dos pigmentos foram de grau analítico.

3.1. Microbiologia

3.1.1. *Chromobacterium violaceum*

A cepa de *C. violaceum* foi obtida originalmente do laboratório de Fotobiologia Molecular do Instituto de Biofísica da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ. A bactéria *C. violaceum* responsável pela produção de violaceína foi mantida e repicada mensalmente em tubos contendo ágar nutriente (apêndice I) e armazenada a 4°C.

3.1.1.1. Cultivo de C. violaceum para Produção da Violaceína

Para obtenção de uma quantidade apropriada de massa celular uma alçada de bactérias do tubo de manutenção foi transferida para 50 mL de caldo nutriente (anexo I), incubada sob agitação (150 rpm) a 30°C durante 24 h. Nesse meio glicosado a bactéria apresenta bom crescimento, sem produção da violaceína.

Um mL do inóculo descrito acima foi transferido para os Erlenmeyers contendo meio de arroz cozido e estéril (anexo I), cultivado em estufa a 30°C até o aparecimento do pigmento (48 a 72 h). Esse procedimento foi utilizado na maioria das vezes, tendo sido o meio de arroz substituído por ágar manitol ou ágar batata (anexo I) quando a bactéria deixava de produzir ou reduzia a quantidade de violaceína nesse meio.

3.1.1.2. Extração da Violaceína

Aos Erlenmeyers (cerca de 40 por vez) contendo a violaceína produzida em cerca de 400 g de meio de arroz foram adicionados 10 mL de acetona para extração do pigmento. Realizava-se uma filtração simples para retirar impurezas maiores (como pedaços de grãos de arroz, por exemplo). Em um funil de separação contendo o filtrado (400 mL de extrato acetônico) adicionava-se volumes de 100 mL de acetato de etila e uma solução saturada de NaCl. Após cerca de cinco lavagens com essa solução

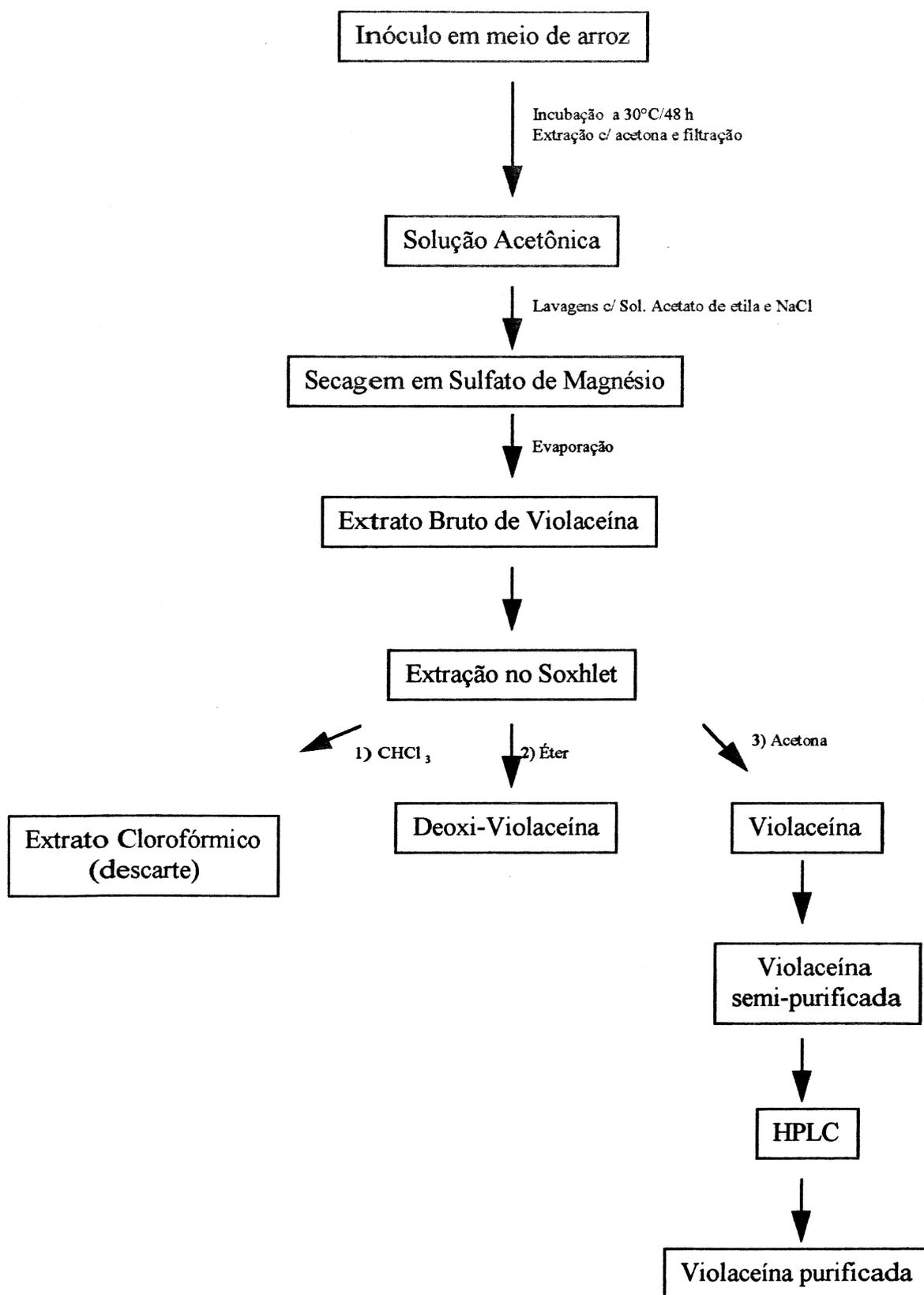
aquosa de acetato de etila e NaCl, conseguia-se separar e descartar algumas impurezas e água, ficando a violaceína solubilizada na fase orgânica. A solução acetônica contendo o pigmento foi vertida sobre 20 g de MgSO₄ seco (secante) e a seguir foi filtrada novamente. Esse filtrado foi colocado em um balão no rotavapor, para eliminar o solvente, obtendo 1500 mg de extrato bruto de violaceína.

3.1.1.3. Purificação da Violaceína

A pré-purificação foi realizada em um extrator tipo Soxhlet de 500 mL de capacidade, onde foi colocado o extrato cru de violaceína (1500 mg) dentro de um envoltório de papel de filtro. Os solventes para extração foram usados em ordem de polaridade crescente e em volumes de 500 mL. A primeira extração foi realizada com clorofórmio, durante uma hora, onde se retinham impurezas tais como restos de membranas de bactérias, já que lipídeos são solúveis nesse solvente. Na segunda parte da extração utilizava-se éter etílico também por uma hora, retirando-se a deoxi-violaceína que possui alta solubilidade nesse solvente. Na terceira e última etapa utilizava-se a acetona durante aproximadamente cinco horas até que toda a violaceína estivesse extraída, ou seja, até que a acetona permanecesse incolor após passar pelo cartucho contendo o extrato cru de violaceína. Em seguida, evaporava-se o solvente, precipitava-se a violaceína com éter etílico, centrifugava-se a 5000 rpm durante 10 minutos, descartando o sobrenadante, obtendo-se assim a violaceína parcialmente purificada (Antônio, 1994).

A purificação final foi realizada por HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Pressão), usando como eluente a mistura metanol/água (3:1). A fração contendo violaceína foi concentrada em um rotavapor com eliminação parcial do metanol aumentando assim a proporção de água para cristalização final.

As etapas para a obtenção da violaceína estão sumarizadas no esquema I.



Esquema I: OBTENÇÃO DA VIOLACEÍNA

3.1.1.4. Identificação da *Violaceína*

A identificação do pigmento foi feita por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton (H^1 RMN), infravermelho (IV) e ultra-violeta (UV).

Os espectros de absorção (UV/Vis) foram registrados em um espectrofotômetro modelo Beckman DU-70. Os espectros de infra-vermelho (IV) obtidos em espectrofotômetro Perkin-Elmer modelo 180 em pastilhas de KBr e as frequências de absorção expressas em cm^{-1} . Os espectros de ressonância magnética nuclear de próton (RMN H^1) foram registrados em um aparelho Varian-Gemini (300 Mhz) utilizando como solvente dimetilsulfóxido (DMSO) e tetrametilsilano (TMS) como referência interna. Os deslocamentos químicos estão expressos em ppm, a multiplicidade indicada como singleto (s), dubleto (d), tripleto (t), quarteto e multipletto (m).

Os espectros de infra-vermelho e de ressonância magnética protônica, foram analisados com base na literatura (Laatsch & Thomson, 1984; Hoshino & Kondo, 1987; Riveros *et alii*, 1988).

3.1.2. Técnicas Empregadas para Identificação das Bactérias do Sedimento do Rio Negro

Após a obtenção dos microrganismos em cultura pura, estes foram identificados de acordo com Cowan (1974). A metodologia utilizada está descrita no anexo II.

3.1.3. *Serratia marcescens*

A cepa de *S. marcescens* foi isolada a partir de uma amostra proveniente do Rio Negro, Amazônia, Brasil. A bactéria *S. marcescens* responsável pela produção de prodigiosina foi mantida e repicada mensalmente em tubos contendo ágar nutriente e armazenada a 4°C.

3.1.3.1. Cultivo de *S. marcescens* para Produção da Prodigiosina

O cultivo de *Serratia marcescens* para obtenção de massa celular foi realizada de maneira similar a *C. violaceum*. Uma alçada do tubo de manutenção foi transferida para 50 mL de caldo nutriente (anexo I), incubado sob agitação a 150 rpm a 30°C

durante 24 h. Nesse meio glicosado a bactéria possui um bom crescimento sem a produção do pigmento.

Um mL do inóculo descrito acima foi transferido para placas de Petri contendo ágar manitol (anexo I), incubado a 30°C até o aparecimento do pigmento (48-72 h).

3.1.3.2. Extração da Prodigiosina

• Extração Alcalina:

As bactérias foram lavadas do meio com uma solução alcalina de NaOH (10%) e NaCl (0,9%). Após 2 h etanol e éter de petróleo foram adicionados em quantidades equivalentes ao volume da solução. A mistura foi agitada vigorosamente em um funil de separação e a camada inferior foi desprezada. A solução orgânica foi extraída repetidamente com éter de petróleo até que todo o pigmento tivesse sido removido. Tentou-se evaporar o extrato etéreo para posterior purificação, mas durante todo o procedimento de extração no funil de separação havia a formação de uma emulsão que impossibilitou a evaporação total do éter de petróleo. Para eliminar a solução etérea residual houve a necessidade de liofilizar a mistura contendo a prodigiosina para posterior purificação por coluna cromatográfica (Wasserman *et alii*, 1966).

• Extração Ácida

A cultura foi lavada do ágar com acetona contendo 10% (v/v) de ácido acético glacial (2%) e foi repetidamente extraída, seguida por posterior centrifugação. O extrato acetônico foi diluído com um volume de água destilada e alcalinizado através da adição de NaOH 10% até que a cor mudasse do vermelho para alaranjado, então foi extraído com várias porções de éter de petróleo. Quando não houve mais pigmento para ser extraído a solução acetônica foi descartada e o extrato etéreo foi evaporado ao máximo. O extrato etéreo residual contendo a prodigiosina foi liofilizado (Hubbard & Rimington, 1949).

• Purificação:

O extrato cru de prodigiosina das extrações ácida e alcalina foram dissolvidos em metanol e mantidos neste durante 12 h. Após evaporar o solvente, foi feita a purificação do pigmento em coluna contendo alumina.

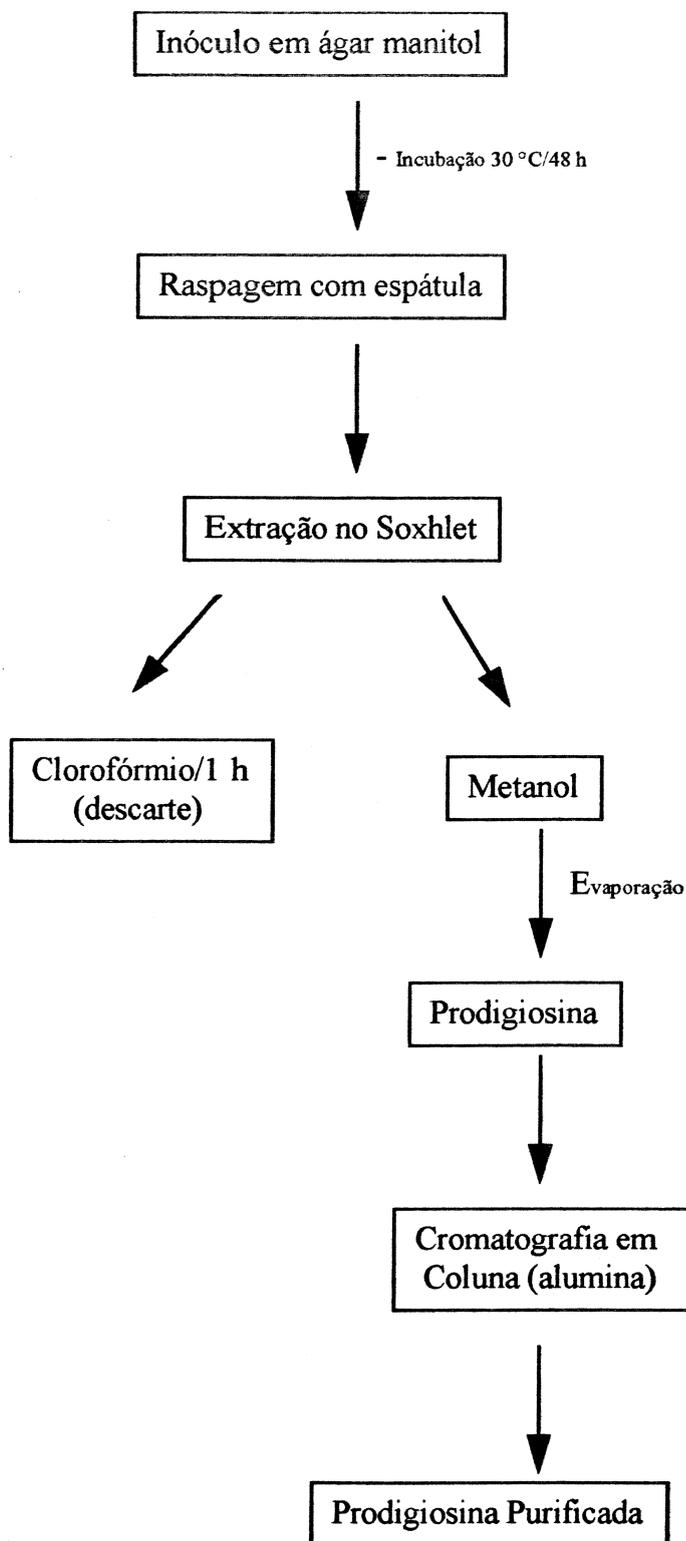
- **Extração Metanólica:**

O procedimento escolhido para extrair e purificar a prodigiosina foi realizar uma raspagem com espátula sobre as superfícies das placas de Petri, retirando-se a massa bacteriana contendo o pigmento. Essa massa bacteriana contendo prodigiosina foi colocada para extrair no Soxhlet. Foram utilizados em volumes de 500 mL, os solventes, clorofórmio durante 1 hora e, metanol até total extração do pigmento (cerca de 3 h) O metanol foi evaporado e o extrato bruto (1 g) da prodigiosina passou para a fase final de purificação.

3.1.3.3. Purificação da Prodigiosina

O extrato bruto (1 g) de prodigiosina foi purificado em coluna cromatográfica (1,5 x 50 cm) usando alumina como adsorvente. O pigmento foi dissolvido em cerca de 1 mL de clorofórmio, aplicado na coluna, onde ficou adsorvido no topo. A eluição foi realizada com volumes de 100 mL dos seguintes solventes, aumentando-se gradualmente a polaridade: hexano, hexano-benzeno, benzeno, benzeno-éter, éter. As frações que continham coloração vermelha-alaranjada foram combinadas e evaporadas. O material coletado foi cristalizado em éter de petróleo. O controle das frações coletadas durante a eluição foi feita por cromatografia em camada delgada (Morgan & Tanner, 1955).

As etapas para a obtenção da prodigiosina estão resumidas no esquema II.



ESQUEMA II : OBTENÇÃO DA PRODIGIOSINA

3.1.3.4. Identificação da Prodigiosina

Foram realizados espectros de varredura em UV/Vis, análises em IV e RMN, da mesma maneira que foram realizados para a violaceína, sendo que para o RMN a prodigiosina foi dissolvida em clorofórmio deuterado usando TMS como referência interna.

O espectro de massa foi obtido em espectrofotômetro MAT 311A à um potencial de ionização de 70 ev. As intensidades relativas dos fragmentos descritas em porcentagem da razão entre unidade de massa e carga (m/z). Os espectros foram analisados de acordo com Boger & Patel (1988).

3.2. Atividade Biológica

3.2.1. Teste de Hemólise

- **Preparo das Hemácias:**

Foram retirados aproximadamente 20 mL de sangue de doador sadio em tubo previamente heparinizado. O sangue foi mantido à temperatura ambiente por uma hora e em seguida colocado em tubos cônicos em banho de gelo. O sangue foi fracionado em alguns tubos (aproximadamente 2,5 ml em cada tubo), o volume foi completado para 8 mL com salina tamponada gelada para lavagem das hemácias. Os tubos foram levemente agitados e centrifugados a 2000 rpm, 5 minutos, 5°C. O sobrenadante foi então descartado e o procedimento repetido duas vezes para uma lavagem eficiente das hemácias. Na última lavagem juntou-se a papa de hemácias de todas as preparações em um tubo único.

- **Procedimento**

Todo o procedimento foi feito em banho de gelo. Foram colocados 100 µL de hemácias em tubos de ensaio. Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução da violaceína (0,045 mM a 1 mM) a ser testada nas hemácias, também foram preparados simultaneamente os tubos controles do branco e de 100% de hemólise. Os controles 0% de hemólise e 100% de hemólise foram obtidos adicionando 100 µL de salina tamponada e 100 µL de água destilada, respectivamente. Os tubos foram incubados a 37°C, 30 minutos, após este tempo colocados em banho de gelo e o volume foi

completado para 2,5 ml com salina tamponada. As amostras foram agitadas levemente e centrifugadas a 2000 rpm durante 15 minutos, o sobrenadante foi retirado e a leitura de absorvância feita em 576 nm (pico correspondente à hemoglobina).

3.2.2. Atividade Tripanocida da Prodigiosina: Estudos *in vitro*

A avaliação da atividade tripanocida foi feita em colaboração com a Profa. Solange Lisboa de Castro da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manguinhos, RJ.

As formas tripomastigotas de *T. cruzi*, cepa Y (Silva & Nussenzweeg, 1953) foram obtidas de camudongos com pico de parasitemia (7 e 22 dias após inoculação, respectivamente).

Os tripomastigotas foram incubados, na presença ou ausência das drogas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB), de 2 a 72 h a 37°C, e então examinados ao microscópio, ou contados em câmara de Neubauer para avaliação de sobrevivência e mobilidade (De Castro *et alii* 1987).

3.2.3. Ensaio Citotóxico em Células de Mamíferos

- **Manutenção da Cultura**

As células utilizadas nos experimentos foram do tipo fibroblástico, da linhagem estabelecida em cultura V-79, oriunda de pulmão de hamster chinês, cedidas pelo Prof. Rogério Meneghini, Instituto de Química, USP, SP. Os fibroblastos foram mantidos em cultura contínua, através de repiques periódicos quando atingiam a densidade de confluência. As células foram descoladas usando solução de ATV (Associação Tripsina Versene - tripsina a 0,1% e versene a 0,016%). O número de células viáveis para os cultivos e plaqueamentos foi determinado homogenizando-se uma alíquota dessa suspensão celular com uma quantidade equivalente de solução de Azul de Tripan a 0,1% contando as células em câmara de Neubauer, excluindo as células que incorporaram o corante. O cultivo foi realizado em meio DMEM, contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, suplementado com 10% de

soro fetal bovino (SFB). A incubação foi feita em estufa a 37°C sob atmosfera úmida e contendo 5% de CO₂.

Os compostos utilizados neste estudo - violaceína, prodigiosina e Nifurtimox foram dissolvidos em etanol absoluto e diluídos inicialmente em tampão salina fosfato (PBS) e depois em DMEM antes de suas utilizações nos tratamentos. A porcentagem de etanol utilizada não excedeu 0,1% nos diferentes experimentos, sendo que para esta concentração de etanol foi constatada ausência de toxicidade em células V-79, confirmando os dados da literatura (Borefreund & Puerner, 1984). Os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.2.3.1. Análise do Crescimento Celular

O plaqueamento foi realizado inoculando-se 3×10^4 células/mL em cada poço da placa (24 pocinhos) e incubando a 37°C por 48 h. Posteriormente as células foram tratadas durante 24 h com diferentes concentrações de Nifurtimox (10 a 300 µM), prodigiosina (1 a 30 µM) e violaceína (2 a 20 µM) dependendo do experimento. Após a incubação e remoção do meio com a droga, as células foram lavadas com PBS - Ca²⁺ fixadas com ácido tricloroacético a 5%, lavadas 2 vezes com etanol (todas as soluções geladas), secadas ao ar e lisadas com NaOH 0,5M (1 mL/poço, 1 hora a 37°C). Controles contendo a maior porcentagem de etanol, presente nas soluções das drogas mais concentradas (sempre < 0,1%), foram utilizados para expressar a porcentagem de proliferação relativa dos efeitos da droga, determinada pela absorbância a 260 nm (Abs₂₆₀). Este parâmetro indica a população celular, visto que a relação entre os valores de A₂₆₀ e o número de células no lisado descrevem uma função linear (Cingi *et alii*, 1991).

3.2.3.2. Ensaio com Vermelho Neutro

Células V-79 ($3,0 \times 10^4$ células/mL) foram inoculadas em uma placa contendo 24 pocinhos e incubadas por 48 h. O meio foi removido e substituído por meio sem soro contendo Nifurtimox (50 a 450 µM), prodigiosina (1×10^{-10} a 1×10^{-4} M) e violaceína (2,5 a 30 µM). As células foram incubadas por mais 24 h e após este

período o meio foi removido e trocado por outro contendo 50 μM do corante Vermelho Neutro [Vermelho Neutro - VN (2-amino-3-metil-7-dimetil-amino-cloreto de fenanzina)], pré-incubado durante 12 h a 37°C e filtrado, em membrana Millipore (0,22 μm), antes do uso. Após 3 horas de incubação as células foram lavadas com PBS- Ca^{2+} a 37°C para retirada do excesso de corante não incorporado pelos lisossomas. A cada pocinho foi adicionado 1 mL da solução aquosa contendo ácido acético glacial (1%) e etanol (50%) para fixar as células e extrair o VN incorporado no lisossoma. As placas foram agitadas por 20 min em um agitador de placas e as absorbâncias das soluções lidas a 540 nm (Riddell *et alii*, 1986).

3.2.3.3. Ensaio com MTT

MTT [brometo de (3- (4,5-dimetilazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium)] é um corante amarelo, que é reduzido por células viáveis para um composto azul (formazan), insolúvel em solução aquosa. A quantidade de formazan pode ser determinada espectroscopicamente uma vez solubilizado em etanol absoluto (Denizot & Lang, 1986).

Células V-79 ($3,0 \times 10^4$ /mL) foram inoculadas em placas contendo 24 pocinhos e incubadas por 48 h. O meio foi removido e trocado por meio sem soro contendo um dos compostos: Nifurtimox (100 a 500 μM), prodigiosina (2,5 a 20 μM) e violaceína (2,5 a 30 μM). As células foram incubadas por mais 24 h, em seguida o meio foi removido e trocado por outro sem soro contendo o corante (1 mg/mL), e incubadas durante 5 h, tempo necessário para a redução acontecer. O meio foi retirado cuidadosamente e adicionou-se 1 mL de etanol para solubilização do formazan. As placas foram agitadas por 10 min e a absorbância de cada poço foi lida no espectrofotômetro a 570 nm. Poços controles contendo a maior quantidade de solvente foram considerados como 100%.

3.2.3.4. Medida da Recuperação Celular

O plaqueamento em três placas foi realizado obtendo-se uma densidade de 2×10^4 células/mL em cada poço da placa (24 pocinhos), incubando-as a 37°C por 24 h e, então, as células foram tratadas com Nifurtimox (10 a 300 μM), prodigiosina (1 a 30

μM) e violaceína (2 a 10 μM) durante 24 h. Após esse período de tratamento, o meio com a droga foi removido trocado por meio fresco e as placas incubadas por mais 24, 48 ou 72 h. Após o respectivo período de incubação de cada placa, o meio foi removido, as células lavadas com PBS - Ca^{2+} fixadas com ácido tricloroacético a 5%, lavadas com etanol (2 vezes), secadas ao ar e lisadas com NaOH 0,5 M (1 mL/poço, 1h a 37°C). Controles com solvente/PBS foram utilizados para expressar a proliferação normal em relação aos efeitos da droga, determinada pela absorbância a 260 nm (Cingi *et alii*, 1991).

4. RESULTADOS

4.1. PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA VIOLACEÍNA

A violaceína foi obtida de acordo com a metodologia resumida no esquema I. Durante a extração no Soxhlet foi utilizado o clorofórmio com o objetivo de retirar restos de membrana bacteriana e o éter para separar a deoxi-violaceína da violaceína. O rendimento em todas as etapas até se obter a violaceína pura foi baixo, tendo se iniciado com um inóculo em 400 g de arroz cozido foi obtido cerca de 10 mg do pigmento purificado.

Os dados espectroscópicos obtidos estão descritos na tabela I, confirmando a estrutura da violaceína apresentada na figura 2 e estão de acordo com os resultados da literatura (Hoshino & Kondo, 1987).

TABELA I : DADOS ESPECTROSCÓPICOS DA VIOLACEÍNA

| | |
|----------------------------------|---|
| UV/vis (nm) | λ_{\max} 260, 370, 580 |
| IV (KBr) cm^{-1} | ν_{\max} : 1680, 1655, 1602 |
| RMN (CDCl_3 , 300 Mhz) | 11,90 (s, H_1); 10.75 (s H_1''), 10.50 (s, H_1'); 9.35 (s, OH); 8.90 (d, H_2''); 8.10 (s, H_2); 7.60 (s, H_2'); 7.35 (d, H_5); 7.25 (s, H_3); 7.20 (t, H_4''); 6.95 (t, H_3''); 6.80 (2d, H_5'' e H_4) |

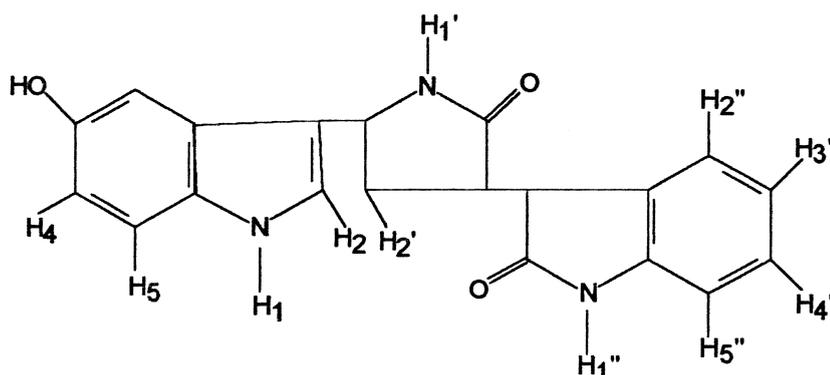


Fig. O2: ESTRUTURA DA VIOLACEÍNA

4.2. IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS DO RIO NEGRO

Como a violaceína é produzida em pequena quantidade houve interesse em procurar isolar uma nova cepa de bactéria que produzisse o pigmento com melhor rendimento.

Para começar a classificar essas bactérias foi realizado o método de Gram, sendo que as 3 colônias (colônias brancas/violeta, amarelas e vermelhas) foram bastonetes Gram negativos. Alguns detalhes indicavam a possibilidade de se ter conseguido isolar uma nova cepa de *C. violaceum*: uma bactéria produzindo um pigmento violeta, aliado ao fato de ter crescido somente 3 tipos de colônias de uma amostra. Como o sedimento não foi recolhido assepticamente, poderia indicar alguma atividade bactericida, impedindo o crescimento de outros microrganismos. Testes morfológicos e bioquímicos foram realizados para classificar essas bactérias (tabela II).

De acordo com os resultados da tabela concluiu-se que a bactéria vermelha é *Serratia marcescens* e a branca/violeta *Chromobacterium violaceum* (Cowan, 1974). A bactéria amarela não foi classificada, mas provavelmente é também da espécie *Chromobacterium*, variante não pigmentada (Sivendra & Lo, 1975). A bactéria classificada na primeira coluna foi a *C. violaceum* obtida inicialmente da UFRJ e utilizada com o objetivo de servir como referência padrão.

TABELA II - IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS

| PROVAS/Testes | <i>C.violaceum</i> ^a | Branca/Violeta ^b | Amarela ^b | Vermelha ^b |
|------------------------|---------------------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------|
| Motilidade | + | + | + | + |
| Indol | - | - | + | + |
| Catalase | + | + | + | + |
| Hemólise | + | + | - | + |
| VM | + | + | + | + |
| VP | - | - | - | - |
| Cresc.37°C | + | + | + | + |
| Cresc.4° C | - | - | - | - |
| pH 5 a 11 | + | + | + | + |
| Hid. Amido | - | - | - | - |
| Red. NO ₃ | + | + | + | + |
| Prod. H ₂ S | + | + | - | + |
| Glicose | + | + | + | + |
| Frutose | + | + | + | + |
| Manose | + | + | + | + |
| Sacarose | + | - | - | - |
| Lactose | + | + | - | + |
| Manitol | - | - | - | + |
| Arabinose | - | + | - | + |
| Galactose | + | + | + | + |
| Rafinose | + | + | - | - |
| Xilose | + | + | + | + |
| Glicerol | - | - | - | - |
| Cor | violeta | violeta | ausente | vermelha |
| DNAse | - | - | - | + |
| Bactéria | <i>C. violaceum</i> | <i>C.violaceum</i> | n.d. | <i>Serratia</i> |

(+): houve crescimento; (-): não houve crescimento; (n.d.) não determinada.(a): cepa mantida no laboratório; (b): amostra proveniente do Rio Negro, Amazônia

4.3. PRODUÇÃO, EXTRAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PRODIGIOSINA

Algumas dificuldades foram encontradas na extração e purificação da prodigiosina, portanto foram testados diferentes procedimentos descritos na literatura, entre eles a utilização de solução alcalina (NaOH), solução ácida ou metanólica para extrair o pigmento. O procedimento escolhido para extrair a prodigiosina foi com metanol, visto que as extrações com as soluções ácidas ou alcalinas revelaram através do espectro de RMN, que a prodigiosina continha impurezas, mesmo após a eluição em coluna cromatográfica. Além disso, nas etapas utilizando o funil de separação, havia a formação de uma emulsão, que dificultava a extração e a evaporação do solvente. Havia a necessidade de liofilizar esse extrato emulsificado, para evaporar o solvente orgânico.

Seguindo o protocolo de extração com metanol, a quantidade de prodigiosina cristalizada após a purificação foi em torno de 30 mg quando inoculava-se 40 placas de Petri (400 g de ágar manitol).

O pigmento purificado foi caracterizado por análises espectroscópicas e os dados obtidos estão sumarizados na tabela III. Estes dados confirmam a estrutura da prodigiosina 25-C apresentada na figura 01.c (Boger & Patel, 1988).

TABELA III: DADOS ESPECTROSCÓPICOS DA PRODIGIOSINA 25-C

| | |
|----------------------------------|---|
| UV (nm) | λ_{max} (isopropanol): 466, 336, 280 |
| IV (KBr) cm^{-1} | ν_{max} : 3424, 3105, 2960, 2855, 1623, 1555, 1464, 1360, 1264, 1232, 1118, 1060, 1000, 959, 891, 804, 740, 589 |
| RMN (CDCl_3 , 300 Mhz) | 6.75 (s, 1H); 6.6 (m, 2H); 6.25 (s, 1H), 6.10 (t, 1H); 6.0 (s, 1H) - conjunto de sinais referentes 1 CH vinílico + 6 CH aromáticos); δ 3.90 (s, 3H, OCH ₃); 2.15 (t, 2H, CH ₂ adjacente anel aromático); 1.70 (broad s, 2CH, CH ₂); 1.1 - 1.4 - conjunto multipletos não resolvidos (m, 14H, 7CH ₂); 0.80 (t, 3H, CH ₃) |
| EIMS, m/e | 393 (M ⁺ , 1), 386 (5), 368 (28), 327 (5), 313 (10), 296 (13), 255 (10), 236 (26), 213 (10), 199 (8), 185 (10), 152 (13), 131 (23), 111(36), 83 (74), 69 (100), 55 (87) |

4.4.ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.4.1.TESTE DE HEMÓLISE

Utilizando a metodologia descrita em Materiais e Métodos, a hemólise de eritrócitos causada por violaceína que foi de 0 % na faixa de 15,6 $\mu\text{g/mL}$ a 250 $\mu\text{g/mL}$ (0,045 mM e 0,730 mM respectivamente). Foi obtida 10 % de hemólise na concentração de 342 $\mu\text{g/mL}$ (1mM).

4.4.2.ATIVIDADE TRIPANOCIDA

Os resultados para a atividade tripanocida da prodigiosina são encorajadores, apesar da grande diferença encontrada em dois experimentos: um apresentou um valor de ID_{50} (dose em que ocorre 50% de sobrevivência das formas tripomastigotas) de 5 μM e no outro, um valor de 100 μM . Novos testes estão sendo realizados para confirmar esses dados.

4.4.3.ENSAIOS CITOTÓXICOS

4.4.3.1.Crescimento Celular

O conteúdo de DNA e proteína são métodos úteis para quantificar o material celular. O DNA pode ser medido pela absorvância a 260 nm onde 50 $\mu\text{g/mL}$ possui uma absorvância em 260 nm de 1.0.

Analizamos a taxa de crescimento celular de fibroblastos V-79 expostos a diferentes concentrações de Nifurtimox, prodigiosina e violaceína. Procuramos encontrar o valor de ID_{50} (dose inibitória), que significa a dose em que ocorre 50 % de inibição do crescimento ou da atividade celular

Da figura 3 podemos obter um ID_{50} de 5 μM para a violaceína.

Na figura 4 encontramos um ID_{50} em torno de 20 μM para a prodigiosina após tratamento de 24 h sobre células em fase exponencial de crescimento.

Na figura 5, observando a curva dose-resposta encontramos um ID_{50} de 300 μM para o Nifurtimox.

Analisando as 3 figuras observamos que o Nifurtimox se apresentou com menor toxicidade sobre a proliferação celular comparado aos outros 2 agentes.

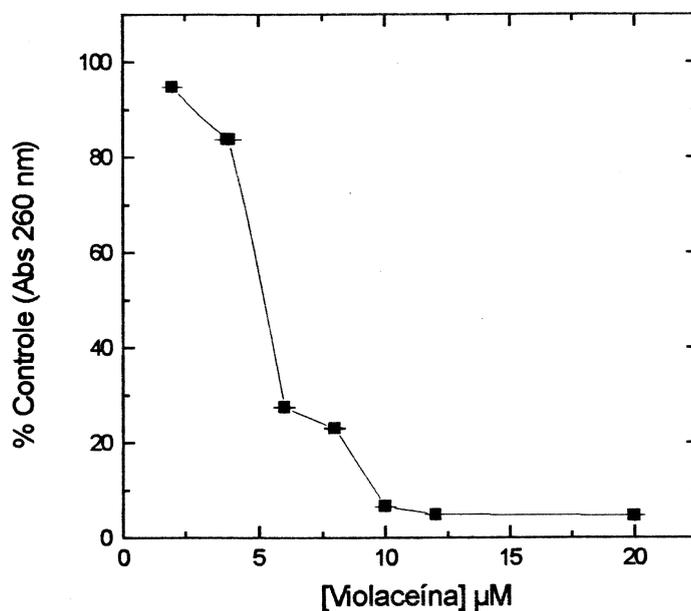


Fig. 03: Crescimento Celular: Efeito da Violaceína

Inibição do crescimento celular após tratamento com violaceína durante 24 h a 37°C, estando as células em fase exponencial de crescimento (30.000 céls/mL incubadas previamente a 37°C/48 h). Ao final do tratamento as células foram lisadas com NaOH 0,5 N. A proliferação celular relativa foi expressa como percentuais da variação da A_{260} em relação aos controles.

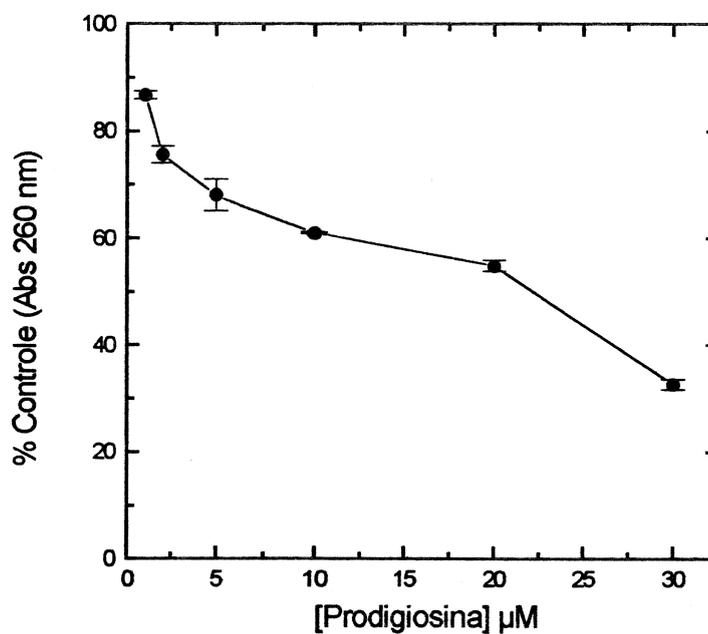


Fig. 04: Crescimento Celular: Efeito da Prodigiosina

Inibição do crescimento celular após tratamento das células com prodigosina durante 24 h a 37°C, estando as células em fase exponencial de crescimento (30.000 céls/mL incubadas previamente a 37°C/48 h). Ao final do tratamento as células foram lisadas com NaOH 0,5N. A proliferação celular relativa foi expressa como percentuais da variação da A_{260} em relação aos controles.

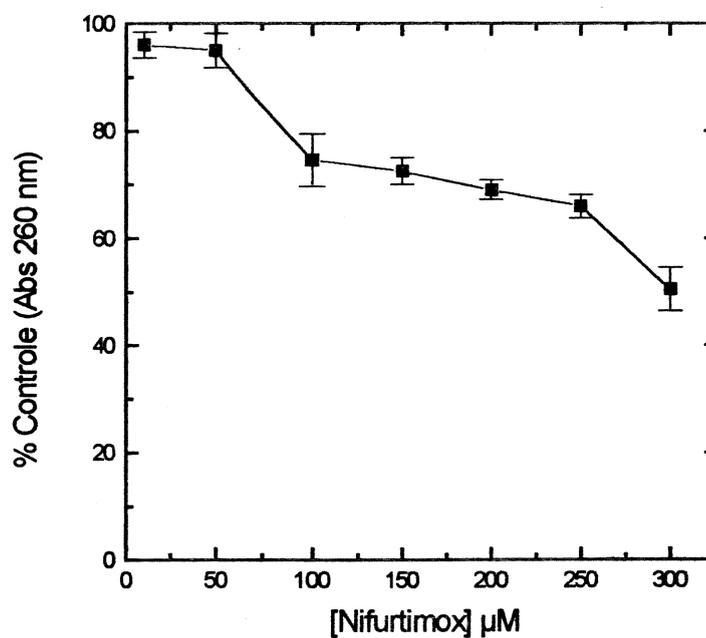


Fig. 05: Crescimento Celular: Efeito do Nifurtimox

Inibição do crescimento celular após tratamento das células com Nifurtimox durante 24 h a 37°C, estando as células em fase exponencial de crescimento (30.000 céls/mL incubadas previamente a 37°C/48 h). Ao final do tratamento as células foram lisadas com NaOH 0,5 N. A proliferação celular relativa foi expressa como percentuais da variação da A_{260} em relação aos controles.

4.4.3.2. INCORPORAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO

A citotoxicidade foi determinada pela medida do VN captado pelos lisossomas das células, detectada através da medida de absorbância a 540 nm após solubilização do corante em solução aquosa contendo ácido acético glacial (1%) e etanol (50%). Os valores expressam a captação relativa do VN pelas células tratadas em relação ao controle tratado com porcentagens iguais de etanol utilizado nos tratamentos com os agentes tripanocidas. A absorção determinada para os controles foi considerada como 100%.

As figuras 6, 7 e 8 representam o tipo de “dose-resposta” avaliam assim a citotoxicidade dos agentes Nifurtimox, prodigiosina e violaceína.

A curva dose-resposta apresentada na figura 6 mostra que o Nifurtimox tem uma inibição da captação do corante VN na faixa de concentração que varia de 50 a 350 μM e apresenta uma pequena mudança na resposta do efeito medido em concentrações maiores que esta (350 a 450 μM). O ID_{50} encontrado foi de 250 μM .

A figura 7 mostra uma curva “dose-resposta” para a prodigiosina, indicando que esta possui uma inibição na captação do VN em função da dose na faixa de concentração que vai de 1×10^{-10} M a 1×10^{-4} M. O ID_{50} encontrado está em torno de 1 μM (1×10^{-6} M).

A citotoxicidade da violaceína avaliada pela técnica de incorporação de VN está apresentada na figura 8, a qual demonstra que esta inibe a captação do corante na faixa de concentração de 2 a 30 μM . O ID_{50} encontrado foi de 12 μM .

Comparando o efeito tóxico dos três compostos Nifurtimox, prodigiosina e violaceína verifica-se que o primeiro apresenta uma toxicidade menor ($\text{ID}_{50} = 250 \mu\text{M}$) quando comparado à prodigiosina ($\text{ID}_{50} = 1 \mu\text{M}$) e à violaceína ($\text{ID}_{50} = 12 \mu\text{M}$).

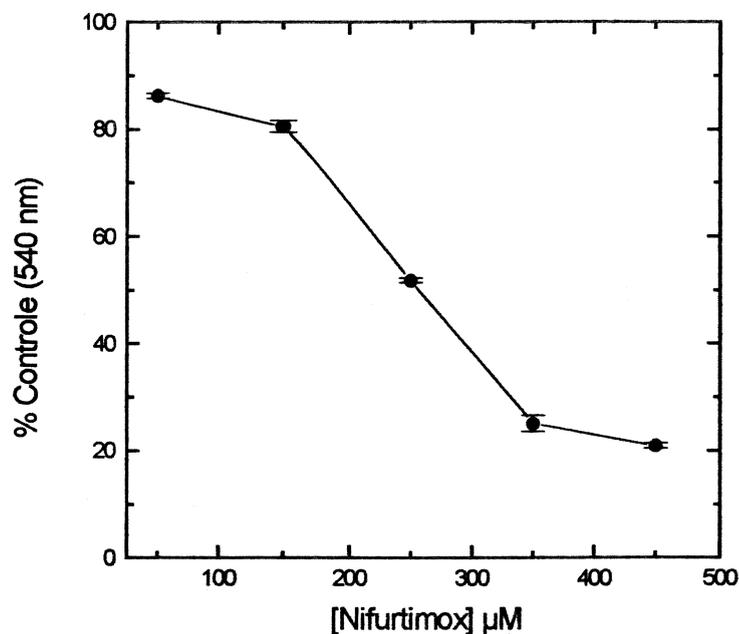


Fig. 06 : Incorporação do Vermelho Neutro: Citotoxicidade do Nifurtimox

Captação do Vermelho Neutro por lisossomas de células V-79 após exposição ao Nifurtimox durante 24 h a 37°C, estando as células em fase exponencial de crescimento (30.000 céls/mL incubadas previamente a 37°C/48 h). Após o tratamento o meio foi removido e trocado por meio sem soro contendo 50 $\mu\text{g/ml}$ do VN, as células foram incubadas a 37°C durante 4 h.. A incorporação do corante foi medida pela absorção a 540 nm após solubilização em solução etanólica e a toxicidade foi determinada através de porcentagens da variação da cor em relação aos controles.

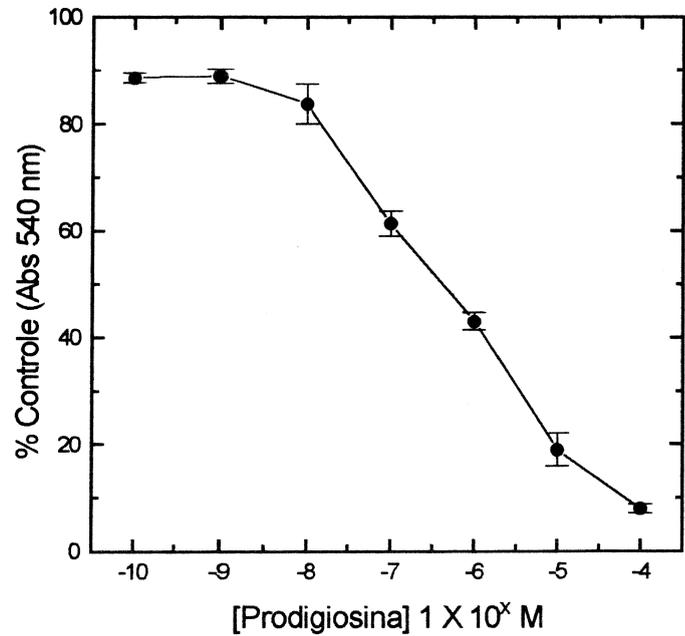


Fig. 07 : Incorporação do Vermelho Neutro: Citotoxicidade da Prodigiosina

Captação do Vermelho Neutro após exposição à prodigiosina durante 24 h a 37°C, estando as células em fase exponencial de crescimento (30.000 céls/mL incubadas previamente a 37°C/48 h). Após o tratamento o meio foi removido e trocado por meio sem soro contendo 50 µg/mL do VN, as células foram incubadas a 37 °C durante 4 h. O corante incorporado pelas células foi solubilizado como descrito em Materiais e Métodos e a toxicidade foi expressa como porcentagem da variação da cor em relação ao controle.

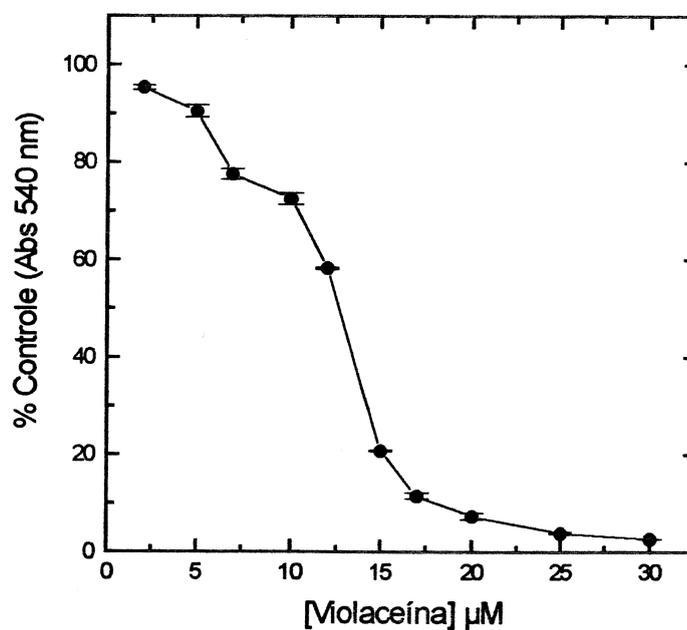


Fig. 08 : Incorporação do Vermelho Neutro: Citotoxicidade da Violaceína

Incorporação do Vermelho Neutro após exposição à violaceína durante 24 h a 37°C, estando as células em fase exponencial de crescimento (30.000 céls/mL incubadas previamente a 37°C/48 h).. Após o tratamento o meio foi removido e trocado por meio sem soro contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ do VN, as células foram incubadas a 37°C durante 4 h. O corante incorporado pelas células foi solubilizado em solução etanólica e a toxicidade foi expressa como diminuição da cor em relação ao controle.

4.4.3.3. INIBIÇÃO DA REDUÇÃO DO MTT

A citotoxicidade foi avaliada pela inibição da redução do MTT pelas células, detectada pela medida em absorbância a 570 nm, após solubilização do formazan. Os valores expressam a inibição da redução do MTT pelas amostras em relação aos poços controles (tratados com porcentagens iguais do etanol utilizado na solubilização das drogas).

As figuras 9, 10 e 11 representam gráficos tipo dose-resposta avaliando a citotoxicidade dos tripanocidas Nifurtimox, prodigiosina e violaceína utilizando a técnica de redução do MTT.

A curva demonstrada na figura 9 mostra o efeito do Nifurtimox na redução do MTT em células V - 79. O ID_{50} encontrado foi cerca de 500 μ M.

A figura 10 mostra o efeito da prodigiosina sobre a redução do MTT, o ID_{50} encontrado foi de 6 μ M e a curva mostra um efeito de saturação da droga entre 10 a 20 μ M.

Na figura 11 foi encontrado um ID_{50} de 7 μ M para o efeito da violaceína na inibição da redução do MTT.

Comparando a potência tóxica dos diferentes tripanocidas analisados, verificou-se que o Nifurtimox apresentou menor toxicidade ($ID_{50} = 500 \mu$ M) sendo que a prodigiosina e a violaceína apresentaram toxicidades similares.

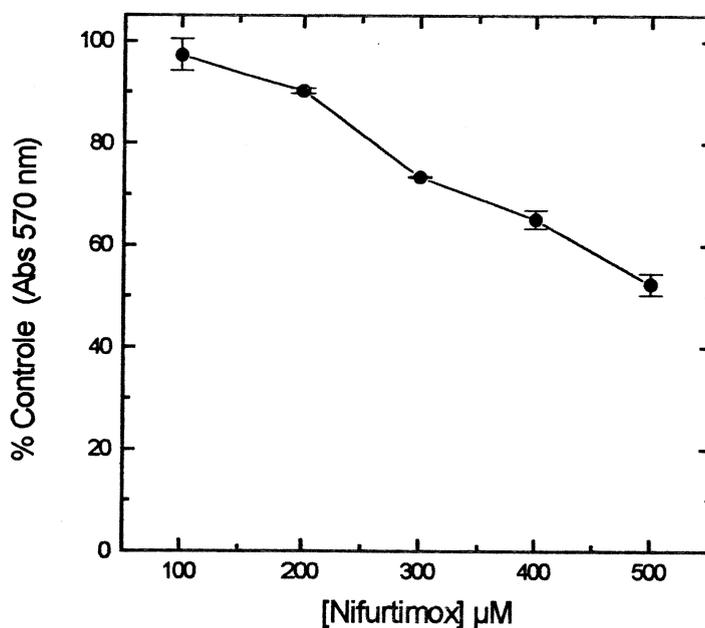


Fig. 09: Efeito do Nifurtimox na Redução do MTT em Células V-79

Redução do MTT por Células V-79 tratadas com Nifurtimox durante 24 h. Células V-79 em fase exponencial de crescimento foram tratadas por 24 h a 37°C com os diferentes concentrações de Nifurtimox dissolvidas em DMEM contendo 10% de SFB. Ao final do tratamento as células tiveram o meio trocado por DMEM sem soro contendo 1 mg/mL de MTT e incubadas a 37 °C durante 8 h. O meio foi retirado cuidadosamente e adicionou-se 1 mL de etanol para solubilização do formazan formado. A redução foi expressa como percentuais da variação da A_{570} em relação aos poços controles.

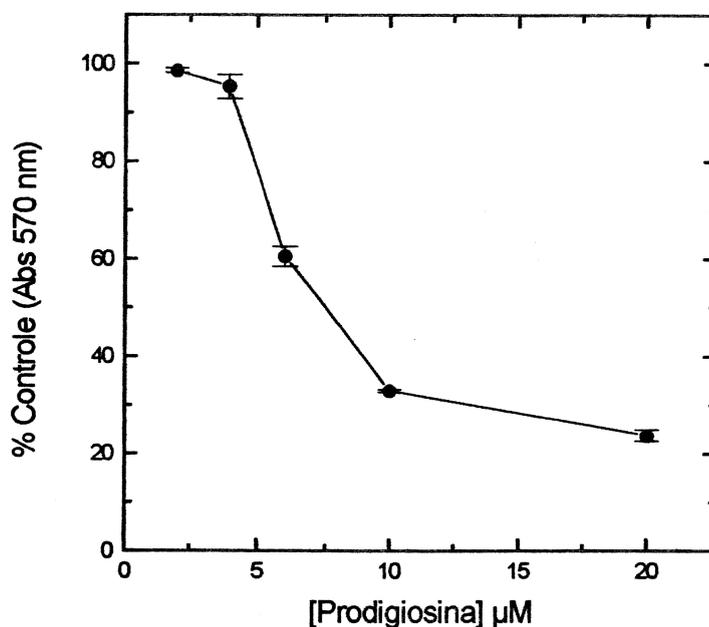


Fig. 10 : Efeito da Prodigiosina na Redução do MTT em Células V-79

Redução do MTT por células V-79 tratadas com prodigiosina durante 24 h. Células V-79 em fase exponencial de crescimento foram tratadas durante 24 h a 37°C com diferentes concentrações de prodigiosina dissolvidas em DMEM contendo 10% de SFB. Ao final do tratamento as células tiveram o meio trocado por DMEM sem soro contendo 1 mg/mL de MTT e incubadas a 37°C durante 8h. O meio foi retirado cuidadosamente e adicionou-se 1 mL de etanol para solubilização do formazan formado. A redução foi expressa como percentuais da variação da A_{570} em relação aos poços controles.

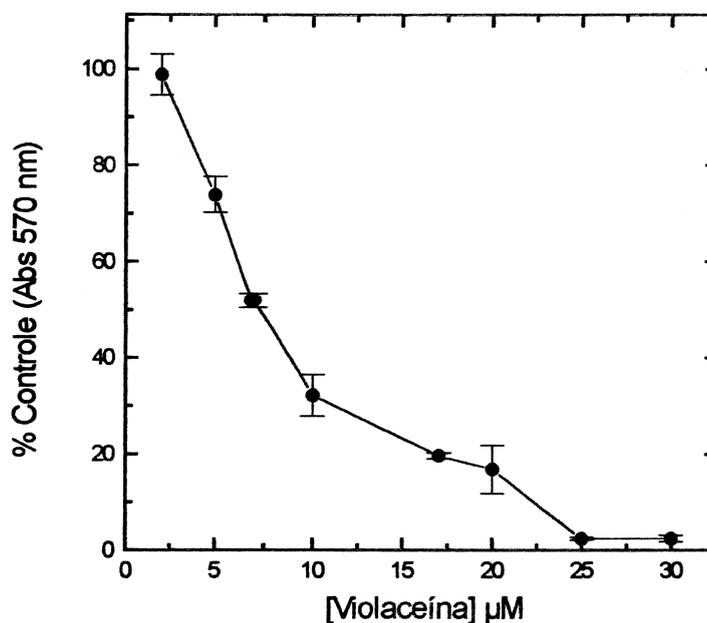


Fig. 11: Efeito da Violaceína na Redução do MTT em Células V-79

Redução do MTT por células V-79 tratadas com violaceína durante 24 h. Células em fase exponencial de crescimento foram tratadas por 24 h a 37°C com diferentes concentrações de violaceína dissolvidas em DMEM contendo 10% de SFB. Ao final do tratamento o meio foi trocado por meio sem soro contendo 1 mg/mL de MTT e as células foram incubadas durante 8 h a 37°C. Após esse período de incubação o meio foi retirado e o formazan produzido foi solubilizado em etanol. A redução foi expressa como percentuais da variação da A_{570} em relação aos poços controles.

4.4.3.4. RECUPERAÇÃO CELULAR

A figura 12 apresenta as curvas de recuperação celular em função da concentração de Nifurtimox e dos períodos seguidos para a recuperação da proliferação celular. Após 24 h o ID₅₀ encontrado em resposta ao efeito do Nifurtimox foi de 300 µM; com 48 h e 72 h de incubação o ID₅₀ encontrado foi de 250 µM, indicando que o Nifurtimox possui um efeito crescente na inibição do crescimento celular.

As curvas dose-resposta mostradas na figura 13 indicam um ID₅₀ para a prodigiosina de 4 µM para os diferentes períodos de incubação (24, 48 e 72 h), mostrando que o efeito tóxico sobre o crescimento celular permaneceu nas gerações posteriores. Observando as curvas notamos uma saturação do efeito entre 10 a 30 µM.

Na figura 14 observamos as curvas dose-resposta da violaceína sobre a recuperação celular. O ID₅₀ encontrado foi de 5 µM para os três períodos de incubação providos para a recuperação celular. Observamos que com 72 h de incubação a curva apresenta uma ligeira tendência de recuperação celular quando comparado com a curva de 24 h.

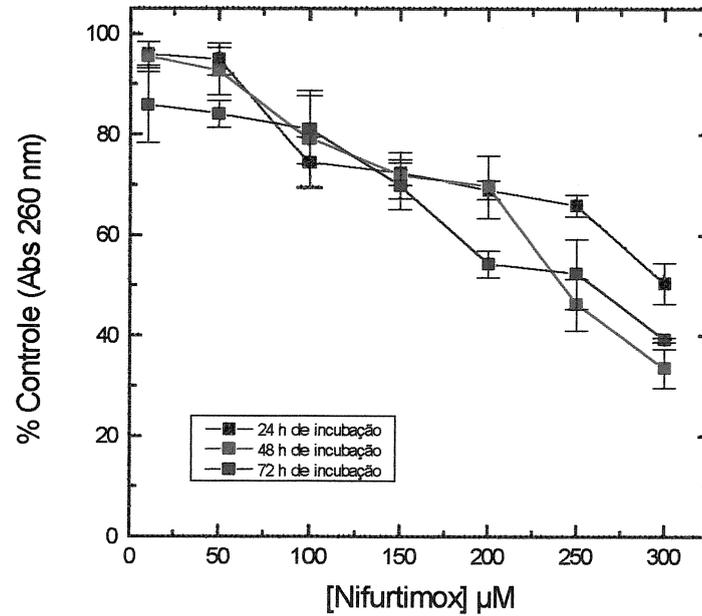


Fig. 12: Recuperação Celular: Efeito do Nifurtimox:

Plaqueamento de 20000 céls/mL, incubação a 37°C/24 h, em seguida realizava-se o tratamento com Nifurtimox durante 24 h, substituição do meio contendo a droga por meio com 10% SFB e incubação por 24, 48 e 72 h a 37°C. As células foram lisadas com NaOH 0,5 N após os respectivos tempos de incubação. A recuperação celular relativa foi expressa como percentuais da variação da A_{260} em relação aos poços controles.

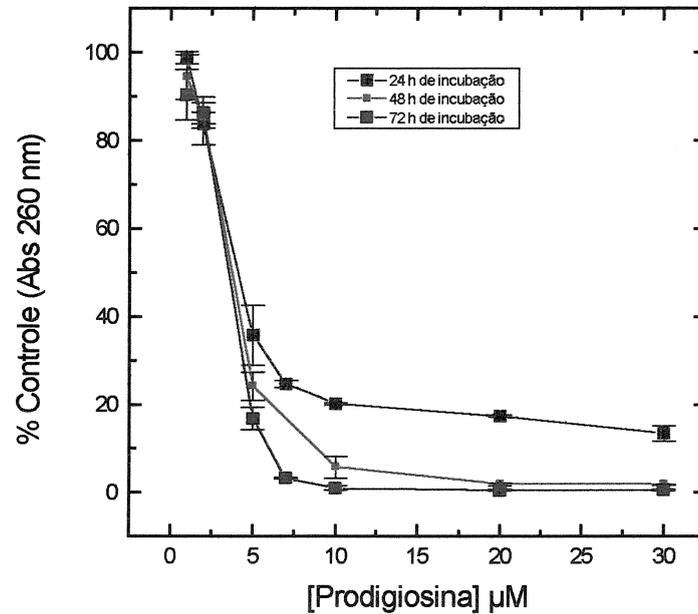


Fig.13: Recuperação Celular: Efeito da Prodigiosina.

Plaqueamento de 20000 céls/mL, incubação a 37 °C/24 h, em seguida realizava-se o tratamento com prodigiosina durante 24 h, substituição do meio contendo a droga por meio com 10% SFB e incubação por 24, 48 e 72 h a 37°C. As células foram lisadas com NaOH 0,5 N após os respectivos tempos de incubação. A recuperação celular relativa foi expressa como percentuais da variação da A_{260} em relação aos poços controles.

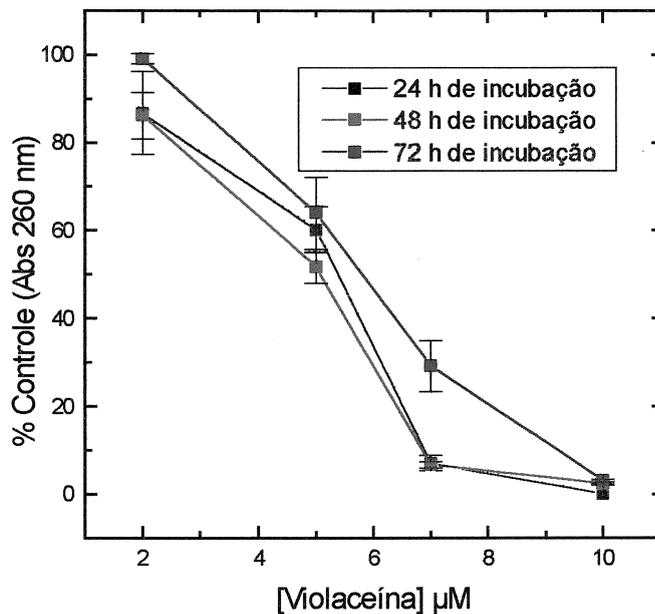


Fig. 14: Recuperação Celular: Efeito da Violaceína

Tratamento com violaceína durante 24 h após incubação prévia de 20000 céls/mL a 37°C durante 24 h. Retirada do meio contendo a droga, substituição por meio DMEM com 10 % de SFB, incubação a 37°C durante 24, 48 e 72 h. Ao final do respectivo tempo de incubação as células foram lisadas com NaOH 0,5 N. A recuperação celular foi expressa como percentuais da variação da A_{260} em relação aos controles.

TABELA IV: ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE (ID₅₀)

| Teste | Nifurtimox | Prodigiosina | Violaceína |
|--------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | (μM) | (μM) | (μM) |
| VN | 250 | 1 | 12 |
| MTT | 500 | 6 | 7 |
| Rec. Celular | | | |
| 24h | 300 | 4 | 5 |
| 48h | 250 | 4 | 5 |
| 72h | 250 | 4 | 5 |
| Viabilidade | 300 | 20 | 5 |

A tabela IV apresenta os valores de ID₅₀ dos diferentes ensaios de citotoxicidade realizados.

5. DISCUSSÃO

A principal dificuldade na obtenção da violaceína, foi o aparecimento de variantes não pigmentadas durante o desenvolver do trabalho, sendo necessário fazer vários repiques em meios diferentes, até se isolar colônias de *C. violaceum* pigmentadas para poder retornar a produção da violaceína.

A cepa de *C. violaceum* isolada do Rio Negro foi repicada e colocada para produzir o pigmento nas mesmas condições em que a cepa da coleção do laboratório o faz. Uma única vez essa nova cepa produziu violaceína nos Erlenmeyers contendo arroz, após o que, ela parou de produzir o pigmento em qualquer dos meios usados com esse objetivo (meio de arroz, ágar batata ou ágar manitol). Desta forma, somente foi possível caracterizá-la, sendo óbvio que a avaliação do rendimento da produção não foi realizada.

A violaceína possui efeito hemolítico de 10% na concentração de 1 mM, que é um valor superior à concentração em que ela apresenta atividade tripanocida (46 μ M). Esses resultados possibilitariam a adição da violaceína ao sangue em bancos de sangue, para a profilaxia da doença de Chagas. Esta ação seria semelhante ao uso do cristal violeta em transfusões sanguíneas (Docampo & Moreno, 1985). O cristal violeta possui atividade contra formas tripomastigotas, podendo ser usado em bancos de sangue para eliminar a transmissão da doença de Chagas através de transfusões sanguíneas.

O interesse em avaliar a atividade tripanocida da prodigiosina deve-se à semelhança da sua estrutura com uma droga conhecida como anti-chagásica: a terbinafina. Esta possui atividade antifúngica comprovada (Nishikawa & Naka, 1994). Existe uma relação já descrita na literatura (Hay, 1991) para alguns compostos com propriedades anti-micóticas e fungicidas apresentarem também atividade tripanocida, pois estes atuam através da inibição da biossíntese do ergosterol (Stutz, 1987). Esses compostos possuem alialminas, que também estão presentes na estrutura da prodigiosina. Esta observação levou-nos a testar a prodigiosina 25-C, com comprovada ação anti-micótica (Lóren & Guinea, 1977), como possível agente tripanocida e, em resultados preliminares a prodigiosina confirmou essa propriedade.

Os dados encontrados para o efeito tripanocida da prodigiosina estão discrepantes: em dois experimentos diferentes, realizados em triplicatas, os valores de ID_{50} encontrados foram de 5 e 100 μM . Novos ensaios estão sendo realizados para confirmar qual valor é realmente o correto. Comparando com a atividade tripanocida do Nifurtimox, se for confirmado um ID_{50} de 5 μM para a prodigiosina, esta possuirá um potencial tripanocida *in vitro* maior do que o medicamento utilizado atualmente no tratamento dos chagásicos. O Nifurtimox apresenta um ID_{50} de 157 μM sobre as formas tripomastigotas (De Castro, 1987). Por outro lado, se o valor correto for próximo a 100 μM , a prodigiosina ainda assim apresentará um efeito tripanocida maior do que o Nifurtimox. Dessa maneira, estudos farmacológicos com a prodigiosina deverão ser conduzidos analisando o efeito terapêutico *versus* os efeitos toxicológicos, visando uma possível aplicação da prodigiosina como anti-chagásico.

Dos ensaios citotóxicos, a técnica de incorporação do corante Vermelho Neutro informa sobre a função metabólica celular, desde que mede a integridade lisossomal, refletindo a capacidade de células viáveis incorporarem o corante vital dentro de seus lisossomas (Forsby, *et alii*, 1991).

Alterações na superfície celular ou na membrana lisossomal provocadas pela ação de drogas modificam a captação e ligação do corante, possibilitando a distinção entre células viáveis e células lesadas ou mortas. Os resultados são dependentes do número de células viáveis na cultura. Há uma relação linear entre o Vermelho Neutro extraído da cultura e o número de células nesta cultura (Borefreund & Puerner, 1984). Esta técnica tem sido largamente utilizada na análise de drogas diversas, por ser um teste sensível, simples, reprodutível e econômico.

Comparando o efeito tóxico dos três compostos Nifurtimox, prodigiosina e violaceína verifica-se que o primeiro apresenta uma toxicidade menor ($ID_{50} = 250 \mu\text{M}$) quando comparado à prodigiosina ($ID_{50} = 1 \mu\text{M}$) e à violaceína ($ID_{50} = 12 \mu\text{M}$), no teste do Vermelho Neutro.

A redução do sal tetrazolium MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- difenil tetrazolium bromide) para um produto colorido (formazan) pelo complexo enzimático succinato desidrogenase mitocondrial (Slater *et alii*, 1963) é potencialmente de muita utilidade para ensaios de sobrevivência e proliferação celular. A conversão se realiza

somente em células viáveis e a quantidade de formazan produzida é proporcional ao número de células presentes. O fato de que esta enzima não está presente no soro permitiu o desenvolvimento por Mosmann (1983) de um ensaio rápido e simples, o qual tem sido usado para a detecção de fatores de crescimento de células T e linfotoxinas (Green *et alii.*, 1984). Contudo, o método original (Mosmann, 1983) apresenta limitações técnicas, principalmente pouca sensibilidade, uma resposta variável devido a precipitação de proteína após a adição do solvente orgânico usado para dissolver o formazan produzido e uma baixa solubilidade do produto. Esses problemas têm sido solucionados após as modificações seguintes: evitando o soro no meio de incubação, desse modo se evita a precipitação de proteínas ao adicionar o solvente orgânico; eliminando o indicador de pH (vermelho de fenol) no meio de incubação, dessa maneira se evita o uso de ácido no solvente orgânico o qual altera as propriedades espectrais do formazan; eliminação do meio contendo MTT após a reação e o uso subsequente de propanol ou etanol para a solubilização imediata do formazan (Denizot & Lang, 1986).

O método original, de Mossmann, foi realizado nesses estudos, mas apresentou as dificuldades descritas acima. A solubilização do formazan foi extremamente difícil, restando partículas em suspensão, desestabilizando a leitura no espectrofotômetro. Devido a isso, o protocolo modificado por Denizot & Lang (1986) foi escolhido como padrão para esses ensaios, havendo apenas uma única alteração. Denizot & Lang (1986) utilizam o DMEM sem o indicador (vermelho de fenol). Devido a impossibilidade de obtermos o DMEM, sem o indicador, optamos por aspirar cuidadosamente o meio de cultura das placas, tomando a precaução de evitar a retirada dos cristais do formazan junto com o meio aspirado. As etapas seguintes foram as mesmas utilizadas por Denizot & Lang (1986).

Essa técnica foi aplicada nos nossos experimentos, por se apresentar como um teste simples, o qual possibilita a avaliação quantitativa das células viáveis que crescem em monocamadas, sem a necessidade de tripsinização ou suspensão das mesmas. De modo semelhante ao que ocorreu no ensaio do Vermelho Neutro, o Nifurtimox foi o que teve menor toxicidade quando comparado à violaceína e prodigiosina, no ensaio do MTT.

A medida da taxa de inibição da proliferação celular tem sido largamente utilizada como um sinalizador efetivo da citotoxicidade. A taxa de proliferação celular foi medida com o aumento da população celular nos períodos de 24, 48 e 72 h, subsequentes ao tratamento com os agentes testes. Esse ensaio teve por objetivo verificar a capacidade de recuperação celular após tratamento das células com os agentes e a retirada destes, com incubação consecutiva das células durante os tempos especificados.

Comparando os três agentes testados constatamos que o Nifurtimox apresenta um efeito tóxico gradativo sobre o crescimento celular, aumentando o ID_{50} mesmo após a retirada do agente lesivo. A violaceína e a prodigiosina permanecem com o mesmo ID_{50} para os diferentes períodos dados para a recuperação celular, sendo que a violaceína foi o único agente testado a mostrar uma leve inclinação para a recuperação celular. Essas diferenças na recuperação celular para os compostos testados, podem ter duas explicações: a primeira, no caso do Nifurtimox, este poderia apresentar maior permeabilidade e, conseqüentemente, atravessar a membrana, permanecendo na célula mesmo após a retirada do meio e lavagem das células com PBS. A permanência do Nifurtimox explicaria o aumento da ação tóxica no período subsequente para a observação da recuperação celular. Outro fator que poderia estar ocorrendo seria que o Nifurtimox apresentaria um efeito cumulativo ou irreversível sobre o crescimento celular, permanecendo a toxicidade sobre as gerações posteriores. A ligeira tendência de recuperação celular observada para a violaceína, pode ter explicações similares ao que estaria ocorrendo nas células tratadas com o Nifurtimox, mas de uma maneira inversa. A violaceína estaria sendo retirada do meio no processo de lavagem de forma efetiva, ou seja, não sobraria resíduos dela no interior celular. A outra probabilidade, seria que a violaceína possuiria um efeito tóxico sobre o crescimento celular, somente enquanto estivesse presente no meio. A retirada da violaceína possibilitaria a recuperação das células nas gerações posteriores.

O Nifurtimox apresenta toxicidade similar nos diferentes ensaios utilizados. Possui ID_{50} variando de 200 a 500 μM de acordo com a técnica utilizada. Apresentou toxicidade maior no ensaio de longa duração, na recuperação celular no período de 72 h (ID_{50} de 200 μM). Apresentou menor toxicidade no ensaio de redução do MTT (ID_{50}

de 500 μM). Para explicar a diferença entre os valores de ID_{50} para o VN e MTT pode ser que o Nifurtimox induza maior permeabilidade da membrana biológica nas duas organelas-alvo, sendo por isso mais tóxico a nível de lisossomas do que para mitocôndrias, ou seja, há uma seletividade em relação a organela alvo para esse composto (Roguet et alii, 1993).

A prodigiosina apresenta menor toxicidade no ensaio de crescimento celular ($\text{ID}_{50} = 20 \mu\text{M}$) e maior toxicidade na técnica do VN ($\text{ID}_{50} = 1 \mu\text{M}$).

A violaceína foi mais tóxica no ensaio de recuperação celular e de viabilidade celular ($\text{ID}_{50} = 5 \mu\text{M}$), tendo resultado similar na técnica de redução do MTT ($\text{ID}_{50} = 7 \mu\text{M}$). A técnica de incorporação do VN resultou em um ID_{50} de 12 μM .

Analisando os três agentes tripanocidas constatamos que o Nifurtimox apresentou uma citotoxicidade menor e sem dúvida foi muito menos tóxico que a prodigiosina e a violaceína, nas condições experimentais desenvolvidas.

A maior formação de radicais livres pode ser a causa básica da toxicidade do Nifurtimox em mamíferos. Muitas das drogas anti-parasitárias produzem radicais livres. A redução intracelular seguida por auto-oxidação gerando O_2^- e H_2O_2 tem sido sugerida como mecanismo de ação do Nifurtimox sobre *Trypanosoma cruzi* e como base da sua toxicidade em mamíferos. Para avaliar a citotoxicidade do Nifurtimox sobre células V-79 deverá ser feita uma pré-incubação com microsomas, NADPH e o Nifurtimox ou utilizar cultura de hepatócitos (cultura primária). Os metabólitos gerados nesta incubação deverão ser testados sobre a V-79 e poderão apresentar uma toxicidade maior, corroborando os dados da literatura que declaram que o Nifurtimox é uma droga mutagênica e apresenta alta toxicidade *in vivo* (Teixeira et alii., 1994).

Muitos tipos de reações adversas de drogas são devidos ao metabolismo destas, gerando espécies reativas. Esses metabólitos tóxicos podem romper a estrutura e função de macromoléculas tissulares de várias maneiras, tais quais como alquilação de proteínas e ácidos nucleicos ou estímulo da peroxidação de lipídios, e isso leva a uma variedade de respostas patológicas incluindo necrose celular e carcinogênese (Gillette et alii, 1974).

Muitos tipos de reações adversas de drogas são devidos ao metabolismo destas, gerando espécies reativas. Esses metabólitos tóxicos podem romper a estrutura e função de macromoléculas tissulares de várias maneiras, tais como alquilação de proteínas e ácidos nucleicos ou estímulo da peroxidação de lipídios, e isso leva a uma variedade de respostas patológicas incluindo necrose celular e carcinogênese (Gillette *et alii*, 1974).

Nos nitrofuranos verifica-se a sua redução *in vitro* por enzimas citosólicas como aldeído oxidases e xantina oxidase ou por enzimas microsossomais contendo flavina como citocromo c redutase. A redução enzimática de alguns nitrofuranos produzem metabólitos reativos capazes de ligar covalentemente macromoléculas. Os metabólitos reativos são suspeitos de ser N-hidroxilamina furanos, postulados como responsáveis para a carcinogenicidade de nitrofuranos numerosos *in vivo*. A primeira etapa na redução enzimática de nitrocompostos mostram a transferência de um elétron simples (single) para o substrato tanto quanto gerar um radical nitroaromático (ânion). Certos radicais nitroaromáticos podem presumivelmente reagir com o oxigênio produzindo superóxido e regenerar o nitro composto. Concentrações farmacológicas do Nifurtimox são capazes de produzir estímulo máximo de O_2^- pela fração mitocondrial de *T. cruzi* e iniciar a difusão de H_2O_2 para fora das células. Esses encontros amparam a hipótese de que essas drogas podem sobrecarregar a redução cíclica e auto-oxidação as quais geram superóxido e peróxido de hidrogênio no parasita (Docampo & Stoppani, 1979).

Em conclusão os métodos empregados nos estudos de citotoxicidade são baseados em diferentes alvos finais, tais como: proliferação celular (sobrevivência), incorporação do Vermelho Neutro, redução do MTT e recuperação celular. Em adição, a morfologia celular foi rotineiramente observada no decorrer de cada experimento. Essas avaliações informam sobre diferentes funções celulares ou compartimentos celulares. Esse estudo serve para ilustrar o valor de se usar diferentes métodos celulares como uma maneira de se obter conhecimento do mecanismo de ação tóxica. A variação das respostas obtidas com os diferentes ensaios após o tratamento com os agentes descritos, oferecem um ponto de partida para a formulação de hipóteses para a ação tóxica. Os dados apresentados aqui não amparam a eliminação de nenhum ensaio, cada um contribuiu para o valor global do estudo. Cada ensaio adicional aumenta a

permitem avaliar a toxicidade em concentrações que variam de nanomolar a milimolar. A principal vantagem é o uso de pouco material em uma análise completa, normalmente menos que 10 mg, sendo por isso um método ideal para a seleção de novos produtos sintetizados, os quais usualmente são produzidos em pequenas quantidades ou para aqueles extraídos de microrganismos que requerem várias etapas de purificação.

6. CONCLUSÕES

De maneira geral os objetivos do trabalho foram concretizados, a violaceína foi obtida em quantidade suficiente para realizar os testes de citotoxicidade; as bactérias do sedimento do Rio Negro foram identificadas, tendo sido isolada a *C. violaceum*, apesar de não conseguirmos mantê-la nas condições de laboratório para quantificar a produção da violaceína.

A outra bactéria identificada *S. marcescens*, possibilitou a produção, purificação e caracterização da prodigiosina. Testes de atividade tripanocida comprovaram que há atividade tripanocida, com potencial igual ou maior do que o Nifurtimox.

Os testes de citotoxicidade da violaceína e da prodigiosina foram comparados com o Nifurtimox, um conhecido terapico utilizado no tratamento da doença de Chagas. Apesar do Nifurtimox ter apresentado menor toxicidade em relação aos pigmentos bacterianos, posteriores ensaios de citotoxicidade utilizando mecanismos de metabolização deverão ser realizados.

Finalmente, todas as técnicas citadas exceto a quantificação de DNA, foram padronizadas e implantadas no laboratório seguindo a literatura recente, incorporando assim uma bateria de ensaios citotóxicos indispensáveis para a seleção de novos compostos, propiciando maior aporte deste trabalho ao grupo de pesquisa.

7. PERSPECTIVAS

Foi relatado que a produção de violaceína e prodigiosina decrescem ou são inibidas na presença de glicose, por isso, novos substratos devem ser testados na tentativa de aumentar o rendimento da produção. As rotas biossintéticas devem ser desvendadas possibilitando a manipulação das condições da cultura induzindo um incremento na produção dos metabólitos, isso será possível conhecendo a função desempenhada por esses pigmentos para os seus próprios microrganismos produtores. A otimização da biossíntese dos pigmentos a partir da seleção de meios de cultivo favoráveis possibilitará a obtenção de maiores quantidades dos compostos. Isso propiciará a síntese de outros derivados da violaceína e prodigiosina. Estas modificações na estrutura química serão realizadas, visando aumentar a solubilidade e a atividade biológica, e/ou diminuir a toxicidade.

A atividade tripanocida da prodigiosina deverá ser estudada mais profundamente.

Novos ensaios deverão ser realizados aprofundando os estudos de citotoxicidade do Nifurtimox, prodigiosina e violaceína, verificando a toxicidade dos três compostos após serem metabolizados, isso poderá ser feito acrescentando frações microssomais à cultura de células V-79 ou, usando cultura primária de hepatócitos, técnica que está em fase de implantação no laboratório.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTÔNIO, R. V. (1994). Biossíntese de Violaceína por *Chromobacterium violaceum*: Síntese e Atividades Biológicas de um Provável Intermediário. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, UNICAMP.
- BABICH, H & BOREFREUND, E. (1991). Cytotoxicity and Genotoxicity Assays with Cultured Fish Cells: a Review. *Toxic. In Vitro* 5, 91-100.
- BABICH, H & BOREFREUND, J. A. (1990). Applications of the Vermelho Neutro Cytotoxicity Assay to In Vitro Toxicology. *ATLA* 18, 129-144.
- BALLS, M. & FENTEM, J.H. (1992). The Use of Basal Cytotoxicity and Target Organ Toxicity Tests in Hazard Identification and Risk Assessment. *ATLA* 20, 368-388.
- BLACK, W.A., HODGSON, R. & McKECHIE (1971). Evaluation of Three Methods Using Deoxyribonuclease Production as a Screening Test for *Serratia marcescens*. *J. Clin. Pathol.* 24: 313.
- BOGER, D.L. & PATEL, M. (1988). Total Synthesis of Prodigiosin, Prodigiosene, and Desmethoxyprodigiosin: Diels-Alder Reactions of Heterocyclic Azadienes and Development of an Effective Palladium (II)-Promoted 2,2'-Bipyrrrole Coupling Procedure. *J. Org. Chem.* 53: 1405-1415.
- BOREFREUND, E. & PUERNER, J. A. (1984). A Simple Quantitative Procedure Using Monolayer Cultures for Cytotoxicity Assays (HTD/VN 90). *J. Tiss. Cult. Meth.* 9: 7-9.
- BRENER, Z. (1994). The Impact of Immunology Research in Chagas Disease in Brazil: A Personal Overview. *Cien. e Cul.*, 46 (5/6): 328-332.
- BRENER, Z. (1975). Chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* Infections. *Ad Pharmacol. Chemother.*, 13: 1-44.
- BRENER, Z., ANDRADE, Z. (1979) *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas. Rio de Janeiro, Guanabar Koogan.

- BRYAN, R. T., BALDERRAMA, F., TONN, R.J. & DIAS, J.C.P. (1994). Community Participation in Vector Control: Lessons From Chagas' Disease. *Am. Trop. Med. Hyg.*, 50 (6) suppl.: 61-71.
- BU'LOCK, J.D., NISBET, L.J. & WISTANLEY, D.J., eds. (1982). *Bioactive Microbial Products - Search and Discovery*. Academic Press, London.
- CALDAS, L.R., LEITÃO, A.A.C., SANTOS, S.M. & TYRREL, R.M. (1978). Preliminary Experiments on the Photobiological Properties of Violacein. International Symposium Topic in Radiation and Photobiology, Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, November, 122-126.
- CAMPBELL, I.M. (1984). Secondary Metabolism and Microbial Physiology. *Adv. Microb. Physiol.* 25: 1-5.
- CANÇADO, J.R., SALGADO, A.A., BATISTA, S.M. & CHIARI, C. (1976). Segundo Ensaio Terapêutico com o Nifurtimox na Doença de Chagas. *Rev. Goiana Med.* 22: 203-233.
- CHAGAS, C. (1991). Nova Entidade Mórbida do Homem. Resumo Geral de Estudos Etiológicos e Clínicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 3: 219-275.
- CINGI, M.R., De ANGELIS, I., FORTUNATI, E., REGGIANI, D., BIANCHI, V., TIOZZO, R. & ZUCCO, F. (1991). Choice and Standardization of Test Protocols in Cytotoxicology: a Multicentre Approach. *Toxic. In Vitro*, vol. 5 (2): 119-125.
- CORPE, W.A. (1951). A Study of the Wide Spread Distribution of *Chromobacterium* Species in Soil by a Simple Technique. *J. Bacteriol.* 62: 515-517.
- COWAN, S.T. (1974). *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 2nd edn. Cambridge University Press, London.
- COWAN, S.T., HOLT, J.G., LISTON, J., MURRAY, R.G.E., NIVEN, C.F., RAVIN, A.W. & STANIER, R.Y. (1974). *BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY*, 8th edn Baltimore, Williams and Wilkins.
- DAVIS, J.T., FOLTZ, E. & BLAKEMORE, W.S. (1970). *Serratia marcescens*: a Pathogen of Increasing Clinical Importance. *J. Am. Med. Assoc.* 214: 2190-2192.

- De CASTRO, S., SOEIRO, M.N.C. & MEIRELLES, M.N.L. (1987). Effect of Drugs on Amastigotes and Tripomastigotes of *Trypanosoma cruzi* on the Interaction of Heart Muscle Cell With Bloodstream Trypomastigotes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 81: 154.
- De CASTRO, S. (1993). The Challenge of Chagas' Disease Chemotherapy: An Update of Drugs Assayed Against *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop.: 53: 183-198.
- De MÉO, VANELLE, P., BERNADINI, E. LAGET, M., MALDONADO, J., JENFZER, O., CROZET, M.P. & DUMÉNIL, G. (1992). Evaluation of the Mutagenic and Genotoxic Activities of 48 Nitroimidazoles and Related Imidazole Derivatives by the Ames Test and SOS Chromotest. Environ. and Mol. Mutagenesis 19: 167-181.
- De MOSS (1967). Violacein, 77-81. In: D. Gottlieb, and P. Shaw (ed), Mechanisms of Action and Biosynthesis of Antibiotics, Vol. 2 Springer-Verlag, New York.
- DENIZOT, F. & LANG, R. (1986). Rapid Colorimetric Assay for Cell Growth and Survival. Modifications to the Tetrazolium Dye Procedure Giving Improved Sensitivity and Reliability. J. Immunol. Methods, 89, 271-277.
- DIAS, J.C.P. (1989) Doença de Chagas. J. Biol. Mol., 56: 58-82.
- DIAS, J.C.P., BRENER, Z. (1984). Chagas' Disease and Blood Transfusion. Mem Inst. Oswaldo Cruz 79 (suppl.) 1319-147.
- DIAS, J.C.P. (1990). Doença de Chagas. Clínica e Terapêutica. Brasília, Ministério da Saúde.
- DOCAMPO, R. & STOPPANI, A.O.M (1979). Generation of Superóxido Anion and Hydrogen Peroxide Induced by Nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. Arch. Bioche. Biophys. 197, 317-321.
- DOCAMPO, R., MASON, R.P., MOTTLEY, C., MUNIZ, R.P.A. (1981). Generation of Free Radicals Induced by Nifurtimox in Mammalian Tissues. J. Biol. Chem., 256 (21): 10. 930-3.

- DOCAMPO, R. & MORENO, S.N.J. (1984). Free Radical Metabolites in the Mode of Action of Chemotherapeutic Agents and Phagocytic Cells on *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Infect. Dis.*, 6 (2): 223-38.
- DOCAMPO, R. MORENO, S.N.J. (1985). Biochemical Toxicology of Antiparasitic Compounds Used in the Chemotherapy and Chemoprophylaxis of American Trypanosomiasis (Chagas' disease). *Rev. Biochem. Toxicol.*, 7: 159-204.
- DREW, S.W. & DEMAIN, A.L. (1977). Effect of Primary Metabolites on Secondary Metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.*, 31: 343- 347.
- DURÁN, N. & FALJONI-ALARIO, A. (1980). Bacterial Chemistry-I: Studies of a Potential Phototherapeutic Substance from *Chromobacterium violaceum*. *An. Acad. Bras. Ci.*, 52 (2): 297-302.
- DURÁN, N. & HAUN, M. (1991). Trypanocides: State of Art. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, RJ, Suppl. I.* 86: 29-30.
- DURÁN, N., ANTONIO, R.V., HAUN, M. & PILLI, R.A. (1994). Biosynthesis of a Trypanocide of *Chromobacterium violaceum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10: 686-691.
- EKWALL, B. & EKWALL, K. (1988). Comments on the Use of Diverse Cell Systems in Toxicity Testing. *ATLA* 15, 193-200.
- FAUTREL, A., CHESNÉ, C., GUILLOUZO, A., DE SOUSA, G., PLACIDIM., RAHMANI, R., BRAUT, F., PICHON, J., HOELLINGER, H., VINTEZOU, P., DIARTE, I., MELCION, C., CORDIER, A., LORENZON, G., BENICOURT, M., VANNIER, B., FOURNEX, R., PELOUX, A.F. BICHET. N., GOUY, D., CANO, J.P. & LOUNES, R. (1991). A Multicentre Study of Acute In Vitro Cytotoxicity in Rat Liver Cells. *Toxic. In Vitro* 5, 543-547.
- FORSBY, A., ANDERSSON, M., LEWAN, L. & STERNER, O. (1991). The Cytotoxicity of 22 Sesquiterpenoid Unsaturated Dialdehydes, as Determined by Vermelho Neutro Absorption Assay and by Protein Determination. *Toxic. In Vitro*, 5, 9-14.

- FRESHNEY, R.I. (1978). Use of Tissue Culture in Predictive Testing of Drug Sensitivity. *Cancer Topics* 1: 5-7.
- FRESHNEY, R.I. (1994). In: *Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique*. 3rd. ed. Wiley-Liss.
- GAUTHIER, M.J. (1976). Morphological, Physiological and Biochemical Characteristics of Some Violet-pigmented Bacteria Isolated from Seawater. *Can. J. Microbiol.* 22: 138-149.
- GAUTHIER, M.J. (1982). Validation of the Name *Alteromonas luteoviolaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32: 82-86.
- GILLETTE, J. R., MITCHELL, J.R. & BRADIE, B.B. (1974). Biochemical Mechanisms of Drug Toxicity. *Annu. Re. Pharmacol.* 14, 271-288.
- GOLDBERG, A.M. & FRAZIER, J.M. (1989). Alternatives to Animal in Toxicity Testing. *Scientific American*, 261 (2): 16-22.
- GOLDENBERG, S. (1993). Molecular Biology of *Trypanosoma cruzi*: New Tools for Tacking the Problem of Chagas' Disease. *Cien. e Cul.* 45(3/4): 206-209.
- GREEN, L., READE, J.L. & WARE, C.F. (1984). Rapid Colorimetric Assay for Cell Viability : Application to the Quantitation of Cytotoxicity and Growth Inhibitory Lymphokines. *J. Immunol. Methods* 70, 257.
- GRIMONT, P.A.D. & GRIMONT, F. (1978). The Genus *Serratia*. *Annu Rev. Microbiol.* 32: 221-248.
- GROSS, R., ARICO, B. & RAPPUOLI, R. (1989). Families of Bacterial Signal Transducing Proteins. *Mol. Microbiol.* 3: 1661-1667.
- GUTTERIDGE, W.E. (1976). Chemotherapy of Chagas' Disease: The Present Situation. *Trop. Dis. Bull.*, 73 (9): 699-705.
- HAMADA, M., KONDO, S., NAKAMURA, H., IKEDA, T., IKEDA, D., IINUMA, K., GOMI, S., IKEDA, Y., TAKEUCHI, T., UMEZAWA, H. & IITAKA, Y. (1983). A New Antibiotic, 3,6-dihydroxyndoxazene. *J. Antibiot.* 36: 445-447.
- HAY, R.J. (1991). Antifungal Therapy and the New Azole Compounds. *J. Antimicrob. Chemother.* 28, Suppl. A, 35-46.

- HEINEMANN, B., HOWARD, A.J. & PALOCZ, H.Y. (1970). Influence of Dissolved Oxygen Levels on Production of L-asparaginase and Prodigiosin by *Serratia marcescens*. *Applied Microbiology* 19: 800-804.
- HOSHINO, T., KONDO, T., UCHIYAMA, T., OGASAWARA, N. (1987). Biosynthesis of Violacein: a Novel Rearrangement in Tryptophan Metabolism with a 1,2-Shift of the Indole Ring. *Agric. Biol. Chem.* 51 (3): 965-968.
- HUBBARD, R. & RIMINGTON, C. (1949). The Biosynthesis of Prodigiosin, the Tripyrrylmethene Pigment from *Bacillus prodigiosus* (*Serratia marcescens*). *Biochem.* 46: 220-225.
- HUGH, R. & LEIFSON, E. (1953). The Taxonomic Significance of Fermentative versus Oxidative Metabolism of Carbohydrates by Various Gram Negative Bacteria. *J. Bacteriol.* 66: 24-26.
- ISENBERG, H.D. & BERKMAN, J.I. (1966). Recent Practices in Diagnostic Bacteriology. In *Progress in Clinical Pathology*, vol. I, 237-317. Edited by M. Stefanini. New York: Grune and Stratton.
- JEFFRIES, C.D., HOLTMAN, D.F. & GUSE, D.G. (1957). Rapid Method for Determining the Activity of Microorganisms on Nucleic Acids. *J. Bacterio.* 73, 590-591.
- KEDDERIS, G.L. & MIWA, G.T. (1988). The Metabolic Activation of Nitroheterocyclic Therapeutic Agents. *Drug Metab. Rev.*, 19 (1): 33-62.
- KOBAYASHI, N. (1981). Influence of Carbon Sources on the Biosynthesis of Prodigiosin in *Serratia marcescens*. *J. of Saitama Medical School* 8: 97-102.
- KOLMOS, H.S. & SCHMIDT, J. (1987). Failure to Detect Hydrogen-sulphide Production in Lactose/Sucrose Fermenting *Enterobacteriaceae* Using Triple Sugar Iron Agar. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scan. Sect. B* 95: 85-87.
- LAATSCH, H. & THOMSON, R. H. (1984). Spectroscopic Properties of Violacein and Related Compounds: Crystal Structure of Tetramethylviolacein. *J. Chem. Soc. Perkins Trans II*: 1331- 1339.

- LAUTROP, H. (1960). Laboratory Diagnosis of Whooping Cough or *Bordetella* Infections. Bull WHO 23: 15-35.
- LICHSTEIN, H.C. & VAN DE SAND, V.F. (1945). Violacein, an Antibiotic Pigment Produced by *Chromobacterium violaceum*. J. Infect Dis 76: 47
- LÓREN, J.G. & GUINEA, J. (1978). Efecto de la Concentración de Glucosa en la Biosíntesis de Prodigiosina por *Serratia marcescens*. Rev Española Fisiol, 34: 247-252.
- LOVELAND, B.E., JOHNS, T.G., MACKAY, I.R., VAILLANT, F., WANG, Z.X. & HERTZOG, P. (1992). Validation of the MTT Dye Assay for Enumeration of Cells in Proliferative and Antiproliferative Assays. Biochem. Int. 27: 501-510.
- Mac FADDIN, J.F. (1980). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 2nd Ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Mac LANE, K.E., FISCHER, J., RAMAKRISHMAN, K. (1983). Reductive Drug Metabolism. Drug Metab. Rev., 14 (4): 741-99.
- Mc CABE, R.E.; REMINGTON, J.S., ARAÚJO, F.G. (1984). Ketoconazole Inhibition of Intracellular Multiplication of *Trypanozoma cruzi* and Protection of Mice Against Lethal Infections with the Organisms. J. Infect. Dis., 150 (4): 594-601.
- MARTÍN, J.F. & LIRAS, P. (1981). Biosynthetic Pathway of Secondary Metabolites in Industrial Microorganisms. In Biotechnology, Vol. 1, Microbial Fundamentals, ed H. J. Rehm, G. Reed, 212-233.
- MESTER, B., CLARAMUNT, R.M., ELGUERO, J., ATIENZA, J., BARRIO, A.G. & ESCARIO, J.A. (1991). Research for New Antichagasic Drugs. Chem. Pharm. Bull 39 (8): 1990-1993.
- MORGAN, E.N. & TANNER, E.M. Prodigiosin. J. of the Chemical Society, 3305.
- MOSMANN, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. J. Immunol. Methods, 65, 55.

- MOSS, M.O., RYALL, C. & LOGAN, N.A. (1978). The Classification and Characterization of *Chromobacteria* from a Lowland River. *J. Gen. Microbiol.* 105: 11-21.
- NAKAMURA, A., NAGAI, K., ANDO, K. & TAMURA, G. (1986). Selective Suppression by Prodigiosin of the Mitogenic Response of Murine Splenocytes. *The J. Antibiotics* 39: 1155-1159.
- NEVES, D.P. *Parasitologia Humana*. 3a. ed. Rio de Janeiro, Livraria Atheneu, 1986, 59-86.
- NISHIKAWA, T. & NAKA, W. (1994). Evaluation of Antifungal Effects of Terbinafine and Itraconazole Using Neutral Red Staining. *British J. Dermatology* 130: 4-6.
- O'MEARA, R.A.Q. (1931). A Simple, Delicate and Rapid Method of Detecting the Formation of Acetylmethylcarbinol by Bacteria Fermenting Carbohydrate. *J. Pathol. Bacteriol.* 34: 401-406.
- PARISH, R. & MULLBACHER, A. (1983). Automated Colorimetric Assay for T Cell Cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* 58: 223-337.
- PARKER, W. L., RATHNUM, M.L., JOHNSON, J.H., WELLS, PRINCIPE, P.A. & SYKES, R.B. (1988). Aerocyanidin, a New Antibiotic Produced by *Chromobacterium violaceum*. *J. Antibiot.* 41: 454-460.
- PARKER, M.T. & DUERDEN, B.J. (1990). Topley & Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. *Systematic Bacteriology*. Vol. 2. 429-443; 589-592.
- PESSOA, S. B.; VIANA MARTINS, A. *Parasitologia Médica*. 10a. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977.
- PETRILLO, V.F., SEVERO, V., SANTOS, M.M & EDELWEISS, E.L. (1984). Recurrent Infection with *Chromobacterium violaceum*: First Case report from South America. *Journal of Infection* 9: 167-169.
- RENZI, D., VALTONILA, M. & FOSTER, R. (1993). The Evaluation of A multi-endpoint Citotoxicity Assay System. *ATLA* 21: 89-96.

- REPETTO, G. & SANZ, P. Vermelho Neutro Uptake, Cellular Growth and Lysosomal Function: In Vitro Effects of 24 Metals. *ATLA* 21, 501-507, 1993.
- REY, L. *Parasitologia*. 2a. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991. 115-137.
- RIDDELL, R.J., CLOTHIER, R.H. & BALLS, M. (1986). An Evaluation of Three *in vitro* Cytotoxicity Assays. *Fd.Chem. Toxic.* 24 (6/7), 469-471.
- RIDDELL, R.J., PANACER, D.S., WILDE, S.M., CLOTHIER, R.H. & BALLS, B. (1986). The Importance of Exposure Period and Cell Type in In Vitro Cytotoxicity Tests. *ATLA* 14: 86-92.
- RIVEROS, R., HAUN, M., CAMPOS, V. & DURÁN, N. (1988). Bacterial Chemistry IV: Total Characterization of Violacein. An Antibiotic with Trypanocide from *Chromobacterium violaceum*. *Ars. Biol. tecnol.* 31: 475-480.
- RIVEROS, R., HAUN, M. & DURÁN, N. (1989). Effect Of Growth Conditions on Production of Violacein by *Chromobacterium violaceum* (BB- 78 Strain). *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 22: 569-577.
- ROCHA, A., MENESES, A.C.O., SILVA, A.M., FERREIRA, M.S., NISHIOKA, S.A., BURGARELLI, M.K.N., ALMEIDA, E., TURCATO, G., METZE, K, & LOPES, E.R. (1994). Pathology of Patients with Chagas' Disease and Acquired Immunodeficiency syndrome. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 50 (3): 261-268.
- ROGUET, R., COTOVIO, J., GAETANI, Q., DOSSOU, K. G. & ROUGIER, A. (1993). Citotoxicity of 28 MEIC Chemicals to Rat Hepatocytes using Two Viability Endpoints: Correlation with Acute Toxicity Data in Rat and Man. *ATLA* 21: 216-224.
- SCHIRMER, R.H., MULLER, J.G & KRAUTH-SIEGEL, R.L. (1995). Disulfide-Reductase Inhibitors as Chemotherapeutic Agents: The Design of Drugs for Trypanosomiasis and Malaria. *Angew. Chem.Int. Ed. Engl.*34: 141-154.
- SCHOU, J. S. (1990). Mechanistic Studies in Man, Laboratory Animals and In Vitro Systems. *Fd. Chem. Toxicol.* 28: 767-770.
- SEIBERT, H., GULDEN, M. & VOSS, J.U. (1994). Comparative Cell Toxicology. The Basis for In Vitro Toxicity Testing. *ATLA* 22: 168-174.

- SILVA, J.S., NETTO, M.B. & REED, S.G. (1993). Aggravation of Both *Trypanosoma cruzi* and Murine Leukemia Virus by Concomitant Infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49(5): 589-597.
- SILVA, L.H.P. & NUSSENZWEIG, V. (1953). Sobre uma Cepa de *Trypanosoma cruzi* Altamente Virulenta para o Camudongo Branco. *Folia Clin. Biol.* 20: 191-207.
- SINGH, P.D., LIU, W.C. , GOUGOUTAS, J.Z., MALLEY, M.F., PORUBCAN, M.A., TREJO, W.H., WELLS, J.S. & SYKES, R.B. (1988). Aerocavin, a New Antibiotic Produced by *Chromobacterium violaceum*. *J. Clin. Microbiol.* 5: 514-516.
- SIVENDRA, R. & LO, H.S. (1975). Identification of *Chromobacterium violaceum*: Pigmented and non Pigmented Strains. *J. Gen. Microbiol.* 90: 21-31.
- SIVENDRA, R. & TAN, S.H. (1977). Pathogenicity of non Pigmented Cultures of *Chromobacterium violaceum*. *J. Clin. Microbiol.* 5: 514-516.
- SLATER, T. F., SAWYER, B. & STRAULI, U.D. (1963). Studies on Succinate-tetrazolium Reductase Systems III. Points of Coupling of Four Different Tetrazolium Salts. *Biochim. Biophys. Acta* 77: 383.
- SNEATH, P.H.A. (1960). A Study of the Bacterial Genus *Chromobacterium*. *Iowa State J. Sci.* 34: 243-500.
- SNEATH, P.H.A. (1974). *Chromobacterium Bergonzini* 1881. 8th ed., 354-357. In: R.E. Buchanan, and N.E. Gibsons (ed), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- STARK, D.M., SHOPSIS, C., BOREFREUND, E. & BABICH, H. (1986). Progress and Problems in Evaluating and Validating Alternative Assays in Toxicology. *Fd. Chem Toxic.* 24 (6/7): 449-455.
- STOPPANI, A.O.M. (1983). Bioquímica del *Trypanosoma cruzi*. *Interciencia*, 8 (6): 396-416.
- STORINO, R.A., MILEI, J. (1986). Miocardiopatía Chagásica Crónica - Un Enfoque para El Clínico General. Buenos Aires, Editorial Club de Estudio, 121-200.

- STUTZ, A. (1987). Allylamine Derivatives - a New Class of Active Substances in Antifungal Chemotherapy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26: 320-328.
- TEIXEIRA, A.R.L., CALIXTO, M.A. & TEIXEIRA, M.L. (1994). Chagas' Disease: Carcinogenic Activity of the Antitrypanosomal Nitroarenes in Mice. *Mutation Res.* 305: 189-196.
- TRIGLIA, D., BRAA, S.S., YONAN, C. & NAUGHTON, G.K. (1991). In Vitro Toxicity of Various Classes of Test Agents Using The Neutral Red Assay on a Human Three-Dimensional Physiologic Skin Model. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27A: 239-244.
- VINING, L.C. (1992). Secondary Metabolism. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8 (1): 90-91.
- WASSERMAN, H.H., McKEON, J.E., SMITH, L.A. & FORGIONE, P. (1966). Studies on Prodigiosin and the Bipyrrole Precursor. *Tetrahedron*, 8 (II): 647-662.
- WILLIAMS, R.P. GOTT, C.L., QADRI, S.M.H. & SCOTT, R.H. (1971). Influence of Temperature Incubation and Type of Grown Medium Upon Pigmentation in *Serratia marcescens*. *J. of Bacteriology* 106: 438-443.
- WILLIAMS, R.P. & QADRI, S.M.H. (1980). The Pigment of *Serratia*, 31-75. In von Graevenitz, A., and Rúbin, S.J. (eds), *The Genus Serratia*, CRC Press Inc., Boca Raton.

9. APÊNDICE

ANEXO I

Caldo Nutriente (pH 6,8)

| | |
|---------------------|------|
| Peptona | 0,5% |
| Extrato de Levedura | 0,2% |
| Glicose | 0,5% |
| Água Destilada qsp | 100% |

Transferia-se 50 mL de caldo nutriente para Erlenmeyers de 125 mL. Esterilizava-se a 121°C, 1 atm por 15 minutos em autoclave vertical modelo 103 FABRE (procedimento de esterilização realizado para todos os meios de cultura, exceto nos casos especificados).

Meios Utilizados para a Produção da Violaceína

a) Meio de Arroz

Uma porção de grãos de arroz (cerca de 5 g) foi colocada em cada erlenmeyer de 125 mL, contendo 10 mL de água destilada. Os frascos foram tampados com uma rolha de algodão recoberta com papel alumínio e foram esterilizados em autoclave conforme já descrito.

b) Ágar Manitol (pH 6,8)

| | |
|---------------------|------|
| Peptona | 0,5% |
| Extrato de levedura | 0,2% |
| Manitol | 2% |
| Ágar | 1% |
| Água destilada qsp | 100% |

O meio foi esterilizado conforme já descrito. Posteriormente ele foi distribuído em placas de Petri, previamente esterilizadas a 121°C, 1 atm durante 40 minutos.

c) **Ágar Batata**

| | |
|---------------------|---------|
| Batata | 200,0 g |
| Peptona | 5,0 g |
| Extrato de levedura | 3,0 g |
| Ágar | 10,0 g |
| Água destilada qsp | 1000 mL |

As batatas (200 g) foram picadas, cozidas por uma hora em um Becker de 1000 mL contendo 500 mL de água destilada. Depois de resfriadas foram filtradas através de gaze. Ao filtrado foram adicionados peptona, extrato de levedura e ágar e o pH ajustado para 6,8. Em seguida, o volume da solução foi completado para 1000 mL. Aliquotas de 20 mL foram distribuídas assepticamente em placas de Petri estéreis.

ANEXO II

Morfologia Celular (Gram)

O Gram é um método de dupla coloração, muito usado na sistemática bacteriana e que, além dos caracteres morfológicos, permite evidenciar determinadas propriedades tintoriais das bactérias indispensáveis à sua classificação.

As bactérias, de acordo com esse método, são classificadas em dois grupos: Gram positivas e Gram negativas.

- **Soluções Usadas no Gram:**

a) **Solução de violeta genciana**

| | |
|----------------------------|---------------|
| Violeta de genciana | 1,0 g |
| Ácido fênico | 2,0 g |
| Álcool a 95° | 10 mL |
| Água destilada | 100 mL |

b) **Solução de lugol fraca**

| | |
|-----------------------------|---------------|
| Iodo | 1,0 g |
| Iodureto de potássio | 2,0g |
| Água destilada | 300 mL |

c) **Diferenciador**

Álcool absoluto

d) **Solução de fucsina fenicada de Ziehl**

| | |
|-----------------------|---------------|
| Fucsina básica | 1,0 g |
| Fenol fundido | 5,0 g |
| Álcool a 95° | 10 mL |
| Água destilada | 100 mL |

Foi realizado um esfregaço da bactéria em uma lâmina de vidro que foi fixado passando a lâmina pela chama do bico de Bunsen. A seguir o esfregaço foi coberto com a solução de violeta de genciana, deixando-a agir durante 1 minuto. O corante foi desprezado da lâmina e, sem lavar, esta foi coberta com a solução de lugol durante 1 minuto. Em seguida, a lâmina foi lavada em água corrente e descorada com álcool

absoluto, evitando o descoramento excessivo e novamente lavada em água corrente. A lâmina foi submersa rapidamente na solução diluída de fucsina de Zielh para a obtenção de uma coloração de contraste e lavada em água corrente. A preparação foi examinada com objetiva de imersão após a sua secagem.

- **Interpretação dos Resultados:**

Bactérias Gram positivas: coram-se em roxo;

Bactérias Gram negativas: coram-se em vermelho.

Prova de Motilidade das Bactérias

Para esse tipo de prova foi usada uma suspensão bacteriana de uma cultura jovem (com menos de 18 h). Foi feita uma semeadura em picada em um meio de cultura semi-sólido (ágar a 0,5%) utilizando uma agulha de platina na posição vertical embebida na suspensão bacteriana alcançando o fundo do tubo. A incubação da cultura foi a 30°C durante 24 h.

O crescimento das bactérias imóveis será ao longo da linha de picada, enquanto que as bactérias móveis difundirão-se no meio de cultura em várias direções.

Prova da Catalase

Em uma lâmina de vidro foi colocada uma colônia de bactérias, adicionando a esta uma gota de peróxido de hidrogênio, quando houver desprendimento de gás (O₂) a bactéria é catalase positiva e, quando isto não ocorrer a bactéria é catalase negativa, ou seja, não produz a enzima ou produz em quantidade não detectada pelo método (Sneath, 1960).

Prova da Produção de Hemolisina

A produção de hemolisina ou capacidade hemolítica de uma bactéria é verificada pela formação de um halo ao redor de uma colônia bacteriana semeada em placas contendo meio ágar-sangue.

| | |
|---------------------|------|
| Glicose | 0,5% |
| Extrato de Levedura | 0,2% |
| Peptona | 0,5% |
| Ágar | 1% |
| Sangue heparinizado | 5% |
| Água destilada qsp | 100% |

Todos os reagentes acima, exceto o sangue são misturados, autoclavados a 121°C. Aguarda-se o resfriamento do meio até uma temperatura aproximada de 45°C. No fluxo laminar adiciona-se então o sangue, homogenizando bem e distribuindo em placas de Petri estéreis.

Prova do Vermelho de Metila (VM)

Alguns microrganismos, graças ao seu complexo enzimático, têm a propriedade de provocar um grau de acidez variável, quando crescem em meio glicosado e fosfatado. É uma reação lenta do tipo desmólise. A adição de vermelho de metila permite detectar a queda do pH do meio.

- Meios de Cultura e Reativos Usados

Meio de Clark & Lubs

| | |
|---------------------|---------|
| Peptona | 5,0 g |
| Fosfato dipotássico | 5,0 g |
| Glicose | 5,0 g |
| Água destilada qsp | 1000 mL |

Os constituintes do meio foram aquecidos para facilitar a dissolução e o pH foi ajustado para 7,5. O meio foi filtrado em papel de filtro e distribuído em tubos, os quais foram a seguir esterilizados a 121°C durante 15 minutos em 3 dias consecutivos.

A bactéria foi cultivada durante 2 a 5 dias no meio de Clark & Lubs, a 30°C. Ao final do período de incubação foram adicionadas ao tubo algumas gotas do indicador (solução hidroalcoólica de vermelho de metila a 0,1%).

- Interpretação dos Resultados:

Reação VM positiva: coloração vermelha (pH 4,5);

Reação VM negativa: coloração amarela (pH 7,0).

Prova de Voges Proskauer (VP)

O meio de cultura utilizado é o caldo glicosado (descrito em 3.1.1). Essa reação se processa pela ação do complexo enzimático do microrganismo agindo sobre o substrato (O'Meara, 1931)

O microrganismo foi cultivado em caldo glicosado a 30°C durante 24 h e a 2 mL dessa suspensão foram adicionados 1 mL do reagente de Barrit (Solução de KOH em α -naftol (1:3)), agitando em seguida.

- Interpretação dos Resultados:

Reação de VP positiva: coloração vermelha;

Reação de VP negativa: ausência de cor vermelha.

Crescimento de Bactérias Mesófilas

A bactéria foi inoculada em um ágar glicosado e incubada a 37°C durante 24 h, observando se houve o crescimento após esse tempo.

Crescimento de Bactérias Psicrófilas

A bactéria foi inoculada em um ágar glicosado e incubada a 4°C durante 7 dias, observando se houve o crescimento após esse tempo.

Redução de Nitratos

O termo redução de nitratos inclui todos os processos pelos quais o nitrato desaparece do meio de cultura sob a influência da ação bacteriana, aparecendo o nitrogênio em produtos com estado de oxidação menor. A redução dos nitratos se faz somente sob condições anaeróbias.

- Meios e Reativos Usados:

a) Caldo Nitrato:

| | |
|------------------|--------|
| Nitrato de Sódio | 1,0 g |
| Caldo simples | 100 mL |

Esterilizar em autoclave.

b) Caldo Simples

| | |
|------------------|--------|
| Extrato de carne | 4,0 g |
| Peptona | 10,0 g |
| Cloreto de sódio | 4,0 g |
| Água destilada | 100 mL |

Aquecer para dissolver. Ajustar o pH a 7,4 - 7,6. Deixar ferver por 10 minutos. Filtrar em papel e completar o volume para 100 mL com água destilada. Esterilizar em autoclave.

c) Reagente para Detecção de Nitritos:

| Solução A: | | Solução B: | |
|-------------------|--------|----------------------|--------|
| Ácido sulfanílico | 0,8 g | α naftilamina | 0,5 g |
| Ácido acético | 30 mL | Ácido acético | 30 mL |
| Água destilada | 100 mL | Água destilada | 100 mL |

Os tubos contendo o meio de nitrato foram inoculados com as bactérias e incubados a 30 °C durante 24 h. A formação de nitritos é detectada após adição de 3 a 4 gotas da solução A na superfície do meio de cultura, seguida da adição de 3 a 4 gotas da solução B.

A presença de nitrito é indicada pelo aparecimento de uma coloração vermelha. Resultados negativos serão confirmados pela adição ao tubo de cultura de uma pequena quantidade de pó de zinco que promove a redução dos nitratos a nitritos ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$). O aparecimento da cor vermelha é indicativo de que os nitratos não foram reduzidos.

Produção de Ácido Sulfídrico

Essa prova permite verificar se a bactéria, através de um complexo enzimático, promove a degradação de aminoácidos (cistina) dando como produto final gás sulfídrico (Kolmos & Schmidt, 1987).

A bactéria foi inoculada em caldo glicosado simples, sendo que dentro do tubo de cultura havia uma tira de papel de filtro embebida em solução de acetato de chumbo presa na rolha de algodão por uma das extremidades. A incubação foi a 30°C durante 24 h.

A reação positiva é evidenciada pela formação de manchas negras no papel reativo, que indicam o aparecimento de gás sulfídrico (H_2S).

Prova da Urease

Trata-se de uma reação na qual o microrganismo por meio da urease hidrolisa a uréia, dando como produto final a amônia. Como produto da alcalinidade desenvolvida no meio há uma viragem do indicador de pH (Lautrop, 1960).

O microrganismo foi inoculado em meio contendo uréia e o indicador de pH azul de timol, a incubação foi a 30°C, sendo observado entre 24 h até 5 dias após a incubação. A reação positiva é observada pelo aparecimento de uma cor violácea.

Fermentação de Carboidratos

A capacidade fermentativa de carboidratos por um microrganismo é verificada através da formação de produtos finais da reação, tais como: álcoois, ácidos, CO₂, NH₄ e H₂. O meio mais empregado é a água peptonada, podendo ser na forma líquida ou semi-sólida. Os meios semi-sólidos são distribuídos em camada alta e a semeadura é feita em picada profunda.

Adiciona-se ao meio de cultura um indicador, o vermelho de fenol, para revelar a acidez, produto da fermentação (Hugh & Leifson, 1953).

Foi utilizado um meio de cultura básico (água peptonada) adicionando-se a este as soluções estéreis do açúcar teste e do vermelho de fenol ambos em uma concentração final de 1,0%. A seguir a bactéria foi inoculada a 30°C entre 24 a 48 h.

- Interpretação dos Resultados:

Se há turvação do meio sem modificação da cor, indicando que a bactéria não fermentou o carboidrato e o resultado é negativo;

Se há mudança da cor do meio, com produção de gás, a bactéria desdobrou o açúcar e a reação é positiva;

Se há mudança da cor do meio, sem produção de gás, a reação é positiva sem gás.

ANEXO III

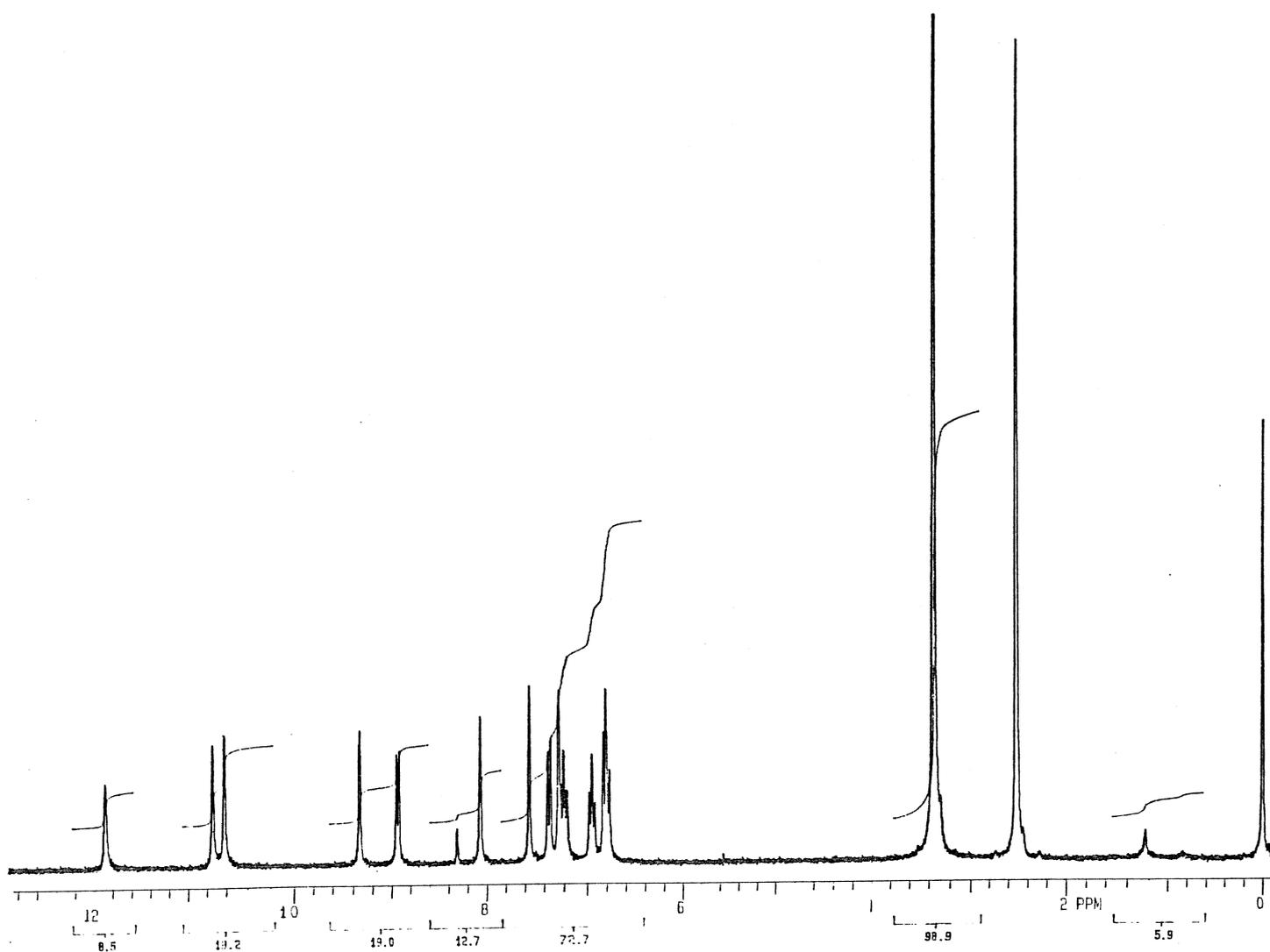


Figura 1 A: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H da Violaceína. Uma amostra foi dissolvida em DMSO e o espectro foi registrado em 300 Mhz.

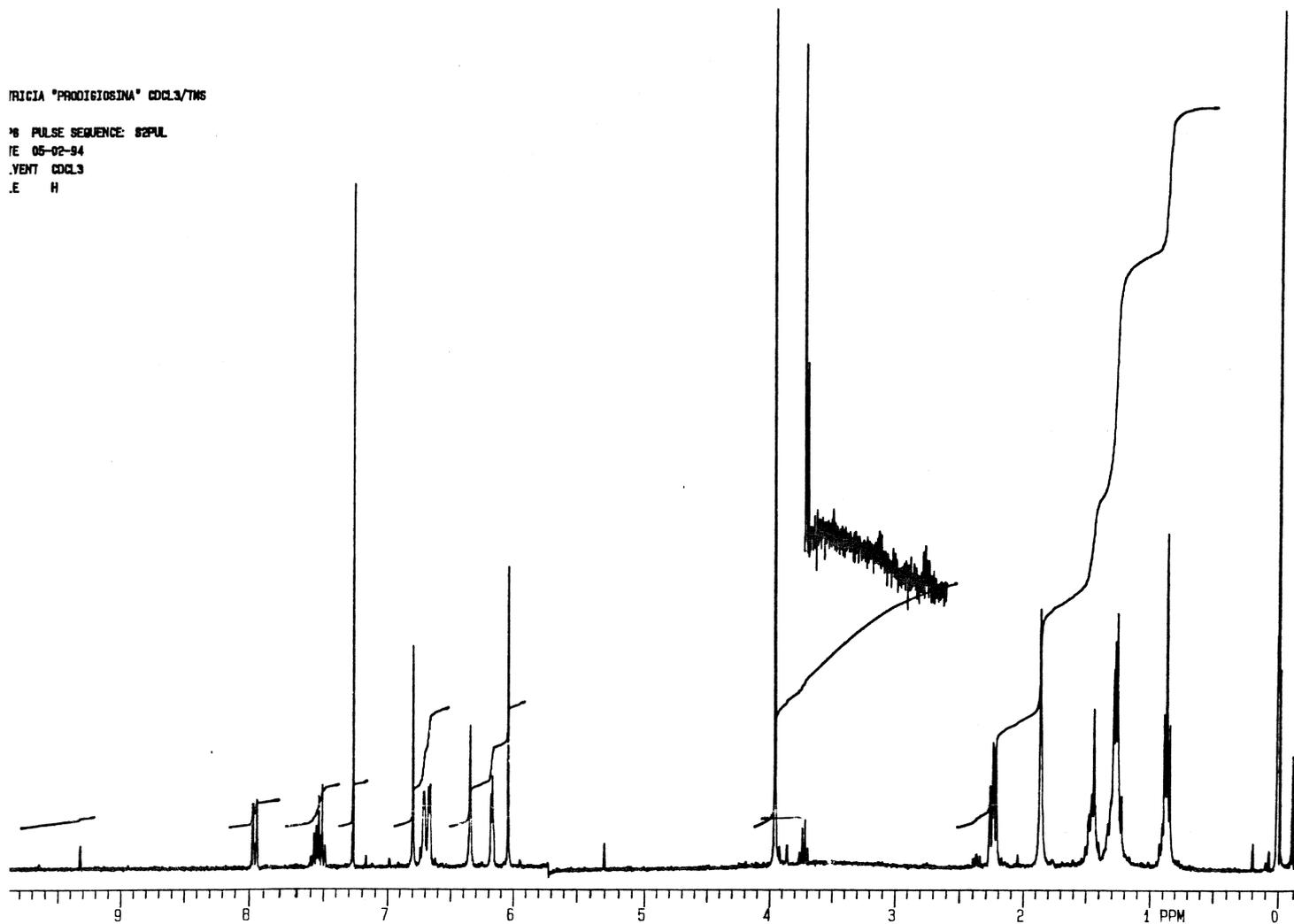


Figura 2A: Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H da Prodigiosina 25-C. Uma amostra foi dissolvida em Clorofórmio deuterado tendo como referência interna TMS e o espectro foi registrado em 300 MHz.