

ATIVIDADE DA VIOLACEÍNA *IN VITRO* SOBRE  
*O Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>RA

Ana Olivia de SOUZA\*  
Dalva Cristina Girello AILY\*\*  
Daisy Nakamura SATO \*\*\*  
Nelson DURÁN\*

RIALA 6/852

SOUZA, A. O. ; AILY, D.C.G.; SATO, D.N. & DURAN,N. - Atividade da Violaceína *In Vitro* sobre *O Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1): 59-62, 1999.

**RESUMO:** Este estudo relata a atividade antimicobacteriana da violaceína, 3-[1,2-Dihidro-5 - (5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3 ilideno] 1,3-dihidro-2H-indol-2-ona sobre a cepa padrão de *M. tuberculosis* H37Ra. A violaceína apresentou ação antimicobacteriana *in vitro* com concentração inibitória mínima (CIM) de 64 µg/mL e concentração bactericida mínima (CBM) de 128 µg/mL. Estes valores são comparáveis aos descritos na literatura para a pirazinamida.

**DESCRITORES:** Violaceína, tuberculose, antimicobacteriano, *Chromobacterium violaceum*, *Mycobacterium tuberculosis*, *in vitro*.

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a tuberculose é responsável por mais de 3 milhões de mortes por ano<sup>12,13</sup> e o aumento da incidência está relacionado com casos de AIDS em muitos países<sup>16</sup>. A quimioterapia com drogas antituberculose se iniciou em 1944 com a estreptomicina<sup>24</sup> e, em 1946, já havia o uso de uma associação terapêutica visando a cura da tuberculose causada por microrganismos resistentes. Além do aumento no número de casos de tuberculose<sup>3</sup> há um aumento da proporção de microrganismos resistentes<sup>4</sup> o que dificulta o tratamento da doença. Isto tem levado à contínua pesquisa por uma quimioterapia alternativa por meio da identificação de novas drogas que sejam mais eficazes e menos tóxicas que as correntemente em uso<sup>1,21</sup>.

A *Chromobacterium violaceum* produz vários compostos que apresentam atividades biológicas. Dentre eles

a aerocianidina e a aerocavina possuem atividade antibiótica<sup>18,20</sup> e o depsipeptídeo bicíclico - FR901228, caracteriza-se por sua ação antitumoral<sup>23</sup>. Além destes compostos, há a violaceína, 3-[1,2-Dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno]1,3-dihidro-2H-indol-2-ona (figura 1), um pigmento violeta, também ex-

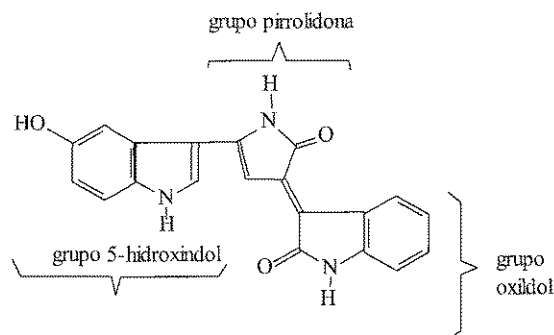


FIGURA 1 — Estrutura da violaceína — 3-[1,2-Dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno]1,3-dihidro-2H-indol-2-ona.

\* Laboratório de Química Aplicada - Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas - Cx. Postal 6154 - Campinas, S.P. CEP-13083-970

\*\* Instituto Adolfo Lutz - Laboratório 1 de Campinas

\*\*\* Instituto Adolfo Lutz - Laboratório 1 de Ribeirão Preto

traído desta bactéria. A violaceína se destaca por sua ampla atividade antibiótica<sup>6,8,14,15</sup>, tripanossomicida<sup>10</sup>, tumoral<sup>9</sup> e potencial fototerapêutico<sup>2,7</sup>. Com o objetivo de buscar novos agentes antimicobacterianos, avaliamos a atividade antimicobacteriana *in vitro* da violaceína frente ao *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra ATCC 25177.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A violaceína foi obtida da *C. violaceum* e purificada de acordo com a metodologia descrita por Reitteri & Durán<sup>19</sup>. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada através da técnica da macrodiluição em meio líquido<sup>11</sup>. A diluição inicial da droga foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) (1000 µg/mL) e as diluições subsequentes foram efetuadas em meio líquido Middlebrook 7H9 enriquecido com ADC (albumina-dextrose-catalase) (Difco) nas concentrações de 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 µg/mL. Os tubos controles continham DMSO nas mesmas proporções usadas para as amostras. A cepa de *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra ATCC 25177 foi cultivada em meio de Lowenstein-Jensen à 37° C por três semanas e subcultivada em meio líquido de Middlebrook 7H9 enriquecido com ADC (Difco) à 37° C por 10 dias, quando a densidade micobacteriana atinge uma turbidez correspondente à escala padrão N<sup>o</sup> 1 de McFarland. Cinquenta microlitros da suspensão micobacteriana foram adicionados a todos os tubos contendo as diferentes diluições da droga e aos tubos controles também. Os tubos foram incubados à 37° C por 10 dias, quando se realizou a leitura macroscópica do crescimento micobacteriano, por turvação do meio de cultura. A CIM é determinada como a menor concentração da droga capaz de inibir macroscopicamente o crescimento micobacteriano.

Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizado o subcultivo em meio de cultura sólido das diluições iguais ou superiores às CIM determinadas pela técnica da macrodiluição. Para isso semeou-se 100 µl dessas diferentes diluições em meio de Lowenstein-Jensen. Os meios de culturas foram incubados à 37° C por 28 dias, para posterior leitura. A CBM foi

definida como a menor concentração da droga capaz de inibir mais de 99,9% da população micobacteriana no meio de cultura.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com o advento da AIDS, o número de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes aos diferentes quimioterápicos têm aumentado consideravelmente<sup>4</sup>, dessa maneira, várias têm sido as tentativas no sentido de encontrar alternativas para o tratamento da tuberculose pulmonar. Novos esquemas terapêuticos alternativos estão sendo avaliados em ensaios clínicos a partir da determinação da atividade *in vitro* de novos quimioterápicos.

O presente estudo demonstrou que a violaceína apresentou Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 64,0 µg/mL e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de 128 µg/mL quando testada frente à cepa padrão de *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra. Estes valores de CIM e CBM são altos se comparados com a isoniazida, hidrazida do ácido nicotínico, droga que faz parte do esquema terapêutico atual da tuberculose pulmonar e que apresenta CIM em torno de 0,02 a 0,05 µg/mL, em experimentos utilizando a mesma metodologia empregada neste estudo<sup>17,22</sup>. Comparando porém com o estudo realizado por CYNAMON et al.<sup>5</sup> com a pirazinamida em diferentes cepas de *M. tuberculosis* (ATCC 27294, ATCC 35801 e ATCC 35828) as CIMs variaram de 16 a > 2048 µg/mL, a violaceína mostrou uma atividade antimicobacteriana promissora.

A macrodiluição em meio líquido, utilizada neste estudo, é a metodologia convencional para se determinar a atividade antimicobacteriana de novas drogas frente às micobactérias extracelulares que apresentam multiplicação intensa. Os estudos da atividade bactericida e bacteriostática *in vitro* da violaceína deverão prosseguir especialmente com relação as micobactérias intracelulares, fagocitadas por linhagens de macrófagos humanos. Entretanto, somente os resultados de estudos em modelos animais, poderão predizer de maneira mais acurada, a eficácia da violaceína na terapia antituberculose.

SOUZA, A. O. ; AILY, D.C.G.; SATO, D.N. & DURAN,N. - *In vitro* Activity of violacein against *Mycobacterium tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 58 (1): 59-62, 1999.

**ABSTRACT:** In this study is are reporting the antimycobacterial activity of violacein, 3-[1,2-Dihydro-5-(5-hydroxy-1H-indole-3-yl)-2-oxo-3H-pyrrol-3-ylidene]1,3-dihydro-2H-indole-2-one, against the *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Ra strain. The violacein showed antimycobacterial action *in vitro* with the minimal inhibitory concentration (MIC) of 64 µg/mL and minimal bactericidal concentration (MBC) of 128 µg/mL. These values are comparable with those from literature for pyrazinamide.

**DESCRIPTORS:** Violacein, tuberculosis, antimycobacterial, *in vitro*, *Chromobacterium violaceum*, *Mycobacterium tuberculosis*.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARBACHYN, M.R.; HUTCHINSON, D. K.; BRICKNER, S.J.; CYNAMON, M.H.; KILBURN, J.O.; KLEMENS, S.P.; GLICKMAN, S.E.; GREGA, K.C.; HENDGES, S.K.; TOOPS, D.S.; FORD, C.W. & ZURENKO, G.E. Identification of a novel oxazolidinone (U-100480) with potent antimycobacterial activity. *J. Med. Chem.*, **39**: 680-685, 1996.
2. CAMPOS, V.; ERAZO, S. & DURÁN, N. Novos Fotoprodutos com Atividade Antimicrobiana de *Chromobacterium violaceum*. *Arg. Biol. Technol.*, **25**:147, 1982.
3. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Estimates of future global tuberculosis morbidity and mortality. *Morb. Mort. Weekly Rep.*, **39**:1542-1545, 1995.
4. COHN, D.L.; BUSTREO, F. & RAVIGLIONE, M.C. Drug resistant tuberculosis: review of the world wide situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. *Clin. Infect. Dis.*, **24**:S121-S130, 1997.
5. CYNAMON, M.H.; SPEIRS, R.J. & WELCH, J.T. In vitro antimycobacterial activity of 5-Chloropyrazinamide. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**:462-463, 1998.
6. DEMOSS, R.D. Violacein. *Antibiotics*, **2**: 77-81, 1967.
7. DURÁN, N & HAUN, M. Processo de produção, obtenção, purificação e atividade antitumoral de 3-[1,2-Dihidro-5-(5-hidroxi-1-H-indol-3-il)-2-oxo-3-H-pirrol-3-ilideno]1,3-dihidro-2H-indol-2-ona. PI 9702918-1, 1997.
8. DURÁN, N. & FALJONI-ALARIO, A. Bacterial Chemistry-I: Studies of a Potential Phototherapeutic Substance from *Chromobacterium violaceum*. *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, **55**: 297-302, 1980.
9. DURÁN, N. ERAZO, S. & CAMPOS, V. Bacterial Chemistry-II: Antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, **55**: 231-234, 1983.
10. DURÁN, N.; CAMPOS, V.; RIVEROS, R.; JOYAS, A.; PEREIRA, M.F. & HAUN, M. Bacterial Chemistry-III: Preliminary Studies on Trypanosomal Activities of *Chromobacterium violaceum*. *An. Acad. Brasil. Ciênc.*, **61**:31-36, 1989.
11. ERICKSSON, H.M. & SHERIS, J.C. Antibiotic sensitivity testing: report for an international collaborative study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* [B]Suppl., **217**:3-90, 1971.
12. HART, C.A; BEECHING, N.J. & DUERDEN, B.I. Tuberculosis into the next century. *J. Med. Microbiol.*, **44**: 1-34, 1996.
13. KOCHI, A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the world Health Organization. *Tubercle*, **72**: 1-6, 1991.
14. LICHSTEIN, H.C. & VAN DE SAND, V.F.J. Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *J. Infect. Dis.*, **76**:47-51, 1945.
15. LICHSTEIN, H.C. & VAN DE SAND, V.F. The antibiotic activity of violacein, prodigiosin, and phthiocol. *J. Bacteriol.*, **52**: 145-146, 1946.
16. LIMA, M.M.; BELLUOMINI, M.; ALMEIDA, M.M.M. & ARANTES, G.R. Co-infecção HIV/tuberculose: necessidade de uma vigilância mais efetiva. *Rev. Saúde Públ. S. Paulo*, **31**:217-20, 1997.
17. MUSSER, J.M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin. Microbiol. Rev.*, **8**: 496-514, 1995.

18. PARKER, W.L.; RATHNUM, M.L. & JOHNSON, J.H. Aerocyanidin, a new antibiotic produced by *Chromobacterium violaceum*. *J. Antibiot.*, **41**: 454-460, 1988.
19. REITTORI, D. & DURÁN, N. Production, extraction, and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *World J. Microbiol. Biothechn.*; in press.
20. SINGH, P.D.; LIU, W.C.; GOUGOUTAS, J.Z.; MALLEY, M.F.; PORUBCAN, M.A.; TREJO, W.H.; WELLS, J.S. & SYKES, R. B. Aerocavin, a new antibiotic produced by *Chromobacterium violaceum*. *J. Antibiot.*, **41**: 446-453, 1988.
21. SNIDER, D. E. & ROOPER, W. L. The new tuberculosis. *N. Engl. J. Med.*, **326**: 703-705, 1992.
22. TSUKAMURA, M. In vitro bacteriostatic and bactericidal activity of isoniazid on the *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex. *Tubercle*, **71**:199-204, 1990.
23. UEDA, H.; MANDA, T.; MATSUMOTO, S.; MUKUMOTO, S.; NISHIGAKI, F.; KAWAMURA, I. & SHIMOMURA, K. FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* No. 968:III. Antitumor activities on experimental tumors in mice. *J. Antibiot.*, **47**:315-323, 1994.
24. WAKSMAN, S.A.; BUGIE, E. & SCHATZ, A. Isolation of antibiotic substance from soil microorganisms with special reference to streptothricin and streptomycin. *Mayo Clin Proc.*, **19**: 537-548, 1944.

Recebido para publicação em 04/06/98