



Universidad Austral de Chile

**Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia**

**PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Eduardo Valenzuela F.
INSTITUTO DE MICROBIOLOGÍA
FACULTAD DE CIENCIAS**

**PROFESOR CO-PATROCINANTE: Juan Carlos Paredes G.
INSTITUTO DE QUÍMICA
FACULTAD DE CIENCIAS**

**“CARACTERIZACION FISICO QUIMICA DE PIGMENTOS DE ORIGEN
BACTERIANO AISLADOS DE SEDIMENTOS MARINOS DE LA REGION DE LOS
LAGOS”.**

Tesis de grado presentada como
parte de los requisitos para optar
al Título de Químico Farmacéutico

JORGE RODRIGO JARAMILLO CISTERNA

VALDIVIA – CHILE

2007

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer sinceramente a todas las personas que me han apoyado en este largo camino en la Universidad, las cuales han dejado infinitas enseñanzas en mi alma y corazón.

A los profesores Eduardo Valenzuela, Juan Carlos Paredes y Humberto Dölz por su confianza, buena disposición y enseñanzas.

A Joel Pardo por su ayuda desinteresada y amistad durante mi estadía en esta casa de estudios.

A la profesora Mónica Quiñones por su buena disposición y alegría.

A Ana Luisa Ulloa por su buena voluntad para conmigo en el Laboratorio.

Al profesor Aldo Aguilera por su comprensión y ayuda cuando inicié este viaje, que Dios lo guarde en su santo reino.

A mis amados padres Osvaldo y Teresa, junto con mis hermanos Carlos y Francisco por ser unas personas tan maravillosas y brindarme su amor y apoyo.

A mi pareja Maria de los Ángeles por su maravilloso, dulce e infinito amor.

A mis abuelos: Walterio, Corina, José y Celmira por su amor incondicional.

A mis tíos: Carlos, Corina, Inés, José, Mónica, Patricia y Walter por su alegría, apoyo y cariño.

A mi legión de amigos del alma con quienes compartimos momentos de estudio, sano esparcimiento, afecto y una amistad para toda la vida: Alexis, Alfredo, Ivonne, Javier, Joaquín, Juan Eduardo, Mambi, Mauricio, Patricio, Rodrigo, Ronny, Rubén, Sandra, Thomas y Thompson.

A mi buen amigo Jorge Villegas por su ayuda, apoyo y alegría.

Al cuerpo de guardias y de auxiliares de la Universidad Austral de Chile por su infinita alegría, buena disposición, cariño y amistad.

A todos ellos que Dios los llene de bendiciones.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Pág.

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN. | 1 |
| SUMMARY. | 2 |
| 2. INTRODUCCIÓN. | 3 |
| 2.1 Generalidades de los pigmentos. | 3 |
| 2.2 Clasificaciones de los pigmentos. | 5 |
| 2.3 Pigmentos de origen microbiano. | 6 |
| 2.4 Análisis instrumentales. | 12 |
| 2.5 Inestabilidad de los pigmentos. | 14 |
| | |
| 3. MATERIAL Y MÉTODO. | 17 |
| 1. MATERIALES. | 17 |
| 1.1 Material biológico. | 17 |
| 1.2 Reactivos. | 17 |
| 1.3 Equipos. | 17 |
| 1.4 Otros. | 18 |
| 2. MÉTODOS. | 18 |
| 2.1 Masificación de las cepas bacterianas. | 18 |
| 2.2 Determinación de la ubicación intracelular o extracelular de los pigmentos. | 19 |
| 2.3 Determinación de la solubilidad de los componentes bacterianos. | 20 |
| 2.4 Obtención de contenido bacteriano para análisis físico-químicos. | 20 |
| 2.5 Obtención de los componentes de ambas cepas bacterianas. | 20 |
| 2.6 Cromatografía de capa fina. | 21 |
| 2.7 Fraccionamiento del contenido bacteriano. | 21 |
| 2.8 Determinación del punto de fusión. | 23 |
| 2.9 Espectroscopía UV-Visible. | 23 |
| 2.10 Espectroscopía de infrarrojo (IR). | 24 |
| 2.11 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RNM H ¹ y C ¹³). | 24 |
| 2.12 Determinación de la de la estabilidad de los pigmentos. | 24 |

| | |
|---|----|
| 2.12.1 Determinación de la estabilidad de los contenidos bacterianos obtenidos en el punto 2.5 de métodos. | 24 |
| 2.12.2 Determinación de la estabilidad de la fracción de <i>Chromobacterium violaceum</i> obtenida en el punto 2.7 de métodos. | 25 |
| 4. RESULTADOS. | 28 |
| 4.1 Crecimientos de cepas bacterianas en agares. | 28 |
| 4.2 Características Físico Químicas de las fracciones bacterianas retenidas en los filtros. | 29 |
| 4.3 Separación de los constituyentes de los productos obtenidos de las cepas bacterianas en estudio. | 32 |
| 4.4 Determinación de compuestos por cromatografía en placa fina a partir de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna. | 34 |
| 4.5 Determinación del punto de fusión. | 36 |
| 4.6 Espectroscopía UV-Visible de la Fracción 3 de <i>Chromobacterium violaceum</i> | 36 |
| 4.7 Espectroscopía de infrarrojo de la Fracción 3 de <i>Chromobacterium violaceum</i> | 37 |
| 4.8 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de H ¹ de la Fracción 3 de <i>Chromobacterium violaceum</i> | 39 |
| 4.9 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de C ¹³ de la Fracción 3 de <i>Chromobacterium violaceum</i> | 41 |
| 4.10 Determinación de la de la estabilidad de la Fracción 3 de <i>Chromobacterium violaceum</i> | 43 |
| 4.11 Estabilidad de la Fracción 3 de <i>Chromobacterium violaceum</i> sometida a distintas temperaturas. | 45 |
| 4.12 Determinación de la estabilidad de la Fracción 3 de <i>Chromobacterium violaceum</i> frente a la acción de 4 metales. | 46 |

| | |
|---|----|
| 5. DISCUSIÓN. | 47 |
| 5.1. Crecimientos de cepas bacterianas en agares. | 47 |
| 5.2 Características Físicas Químicas de las fracciones bacterianas retenidas en los filtros. | 48 |
| 5.3 Separación de los constituyentes de los productos obtenidos de las cepas bacterianas en estudio. | 50 |
| 5.4. Espectroscopía UV-Visible de la Fracción 3 de <i>Chromobacterium</i> <i>violaceum</i> | 51 |
| 5.5 Espectroscopía de infrarrojo de la Fracción 3 del pigmento de <i>Chromobacterium</i> <i>violaceum</i> | 52 |
| 5.6 Análisis espectros Resonancia Magnética Nuclear H ¹ y C ¹³ de la Fracción 3 de <i>Chromobacterium violaceum</i> | 53 |
| 5.7 Análisis de estabilidad de la Fracción 3 de <i>Chromobacterium</i> <i>violaceum</i> | 57 |
| 6. CONCLUSIÓN. | 61 |
| ANEXO. | 62 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA. | 64 |

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

| | |
|---|----|
| Figura 1. Espectro electromagnético. | 4 |
| Figura 2. Estructura del β -caroteno. | 7 |
| Figura 3. Estructura de la indigoidina. | 8 |
| Figura 4. A) Núcleo del prodigioseno. B) Núcleo de la prodiginina. | 9 |
| Figura 5. Estructura de la Violaceína. | 10 |
| Figura 6. Estructura de la Piocianina. | 11 |
| Figura 7. Rangos expresados en cm^{-1} correspondientes al IR próximo, IR medio e IR lejano. | 12 |
| Figura 8. Placas Petri con cultivo desarrollado de A= <i>Chromobacterium violaceum</i> y B= <i>Cytophaga salmonicolor</i> | 28 |
| Figura 9. Espectro de absorción UV-Visible de los productos de <i>Chromobacterium violaceum</i> | 31 |
| Figura 10. Espectro de absorción UV-Visible de los productos de <i>Cytophaga salmonicolor</i> | 31 |
| Figura 11. Espectro de absorción UV-Visible de la Fracción 3 de <i>Chromobacterium violaceum</i> | 37 |
| Figura 12. Espectro de Resonancia magnética nuclear de H^1 de la Fracción 3 de <i>Chromobacterium violaceum</i> | 40 |
| Figura 13. Ampliación de la región entre los 6,0 y 9,0 ppm (δ). | 41 |
| Figura 14. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear C^{13} de la Fracción 3 de <i>Chromobacterium violaceum</i> | 42 |
| Figura 15. Gráficos de los espectros de absorción UV-Visible de la Fracción 3 de <i>Chromobacterium violaceum</i> sometida a: A= pH 6 y B= pH 10. | 44 |
| Figura 16. Estructura química de la Violaceína. | 51 |
| Figura 17. Resonancia del cromóforo existente en la molécula de Violaceína. | 52 |

| | |
|--|----|
| Figura 18. Numeración de los carbonos y nitrógenos utilizada por la bibliografía consultada. | 54 |
| Figura 19. Interacción del grupo hidroxilo con el cromóforo de la Violaceína. | 57 |

ANEXO.

| | |
|---|----|
| Figura 1. Espectro IR de la Fracción 3 de <i>Chromobacterium violaceum</i> | 62 |
| Figura 2. Gráfico de los valores de las absorbancias máximas de la Fracción 3 de <i>Chromobacterium violaceum</i> sometida a diferentes temperaturas. | 63 |

ÍNDICE DE TABLAS

Pág.

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Relación entre el color observado y la longitud de onda absorbida. | 5 |
| Tabla 2. Estructura Porcentaje de crecimiento de las cepas bacterianas en agares. | 28 |
| Tabla 3. Estabilidad de los productos retenidos en los filtros a diferentes temperaturas. | 29 |
| Tabla 4. Productos bacterianos retenidos en filtros y su estabilidad a distintos pHs. | 29 |
| Tabla 5. Solubilidad en solventes orgánicos de los productos bacterianos retenidos en los filtros. | 30 |
| Tabla 6. Muestras obtenidas por cromatografía de columna del producto de <i>Chromobacterium violaceum</i> | 32 |
| Tabla 7. Muestras obtenidas por cromatografía de columna del producto de <i>Cytophaga salmonicolor</i> | 33 |
| Tabla 8. Características de las muestras obtenidas a partir de cromatografía de columna mediante cromatografía de capa fina de <i>Chromobacterium violaceum</i> | 34 |
| Tabla 9. Fracciones de <i>Chromobacterium violaceum</i> obtenidas a partir de cromatografía de columna las cuales fueron reunidas mediante análisis con cromatografía en placa fina. | 35 |
| Tabla 10. Número de bandas de absorción y posición en el espectro infrarrojo de la fracción 3 de <i>Chromobacterium violaceum</i> | 38 |
| Tabla 11. Estabilidad de la Fracción 3 frente a valores distintos de pH. | 43 |
| Tabla 12. Valores de las absorbancias máximas de la Fracción 3 de <i>Chromobacterium violaceum</i> frente a diferentes temperaturas. | 45 |
| Tabla 13. Estabilidad de la Fracción 3 de <i>Chromobacterium violaceum</i> frente a 4 metales. | 46 |
| Tabla 14. Valores encontrados experimentalmente para las señales del espectro de Resonancia Magnética Nuclear de H ¹ | 55 |

Tabla 15. Valores de las señales encontradas entre las 100 y 180 ppm. En el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de C^{13} 57

1. RESUMEN

La actual preocupación de los consumidores por la salud y el medio ambiente obliga a privilegiar los elementos de origen natural en la elaboración de los productos de industrias tales como la alimenticia y cosmética. Esta situación se ha convertido en un incentivo para la búsqueda de nuevas fuentes de colorantes naturales.

La presente investigación desarrolló un experimento con las cepas bacterianas *Chromobacterium violaceum* y *Cytophaga salmonicolor*, con el objetivo de obtener los pigmentos presentes en ellas, determinar su solubilidad frente a diferentes solventes orgánicos, realizarles análisis de espectroscopia UV- Visible y determinar su estabilidad frente a condiciones de pH y la acción de la temperatura.

Se utilizaron técnicas cromatográficas para separar en fracciones los pigmentos de ambas cepas obteniendo, para el caso de *Cytophaga salmonicolor* fracciones de pobre coloración en contraste con *Chromobacterium violaceum* de la cual se obtuvo una fracción de marcada coloración violeta; a esta última se le realizaron análisis de espectroscopia UV-Visible, de infrarrojo (IR) y de Resonancia Magnética Nuclear de protones (H^1 RMN) y carbono trece (C^{13} RMN), determinándose alguna similitud con el pigmento Violaceína. Además se realizaron análisis de estabilidad frente a condiciones de pH, de temperatura y la acción de algunos metales.

SUMMARY

Natural elements are privilege in the elaboration of products for food and cosmetic industries, due the current interest of consumers for the health and the environment. This situation has become an incentive for the search of new natural colorants sources.

The main purpose of this study is to obtain the pigments of two highly colored bacterial strains *Cytophaga salmonicolor* and *Chromobacterium violaceum* and assays their solubility in different organics solvents, UV-visible spectral properties and their stability in different pH and temperature conditions.

In order to separate the pigments obtained from both strain chromatographic techniques were used, indicating that the isolate from *Cytophaga salmonicolor* were poorly colored compared to those obtained from *Chromobacterium violaceum* of which a fraction of marked violet coloration was obtained; this last one was subjected to several analysis like UV-visible, infrared (IR) and Nuclear Magnetic Resonance of protons (H^1 RMN) and carbon thirteen (C^{13} RMN) spectroscopy, being determined some similarity with the pigment Violacein. Were also carried analysis of stability assays to differents conditions like pH, temperature and the action of some metals.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades de los pigmentos.

El color ha jugado un papel importante en la historia de la humanidad debido al fuerte impacto emocional que produce, dicha situación fue aprovechada por el hombre primitivo al utilizar sustancias coloreadas para pintar su cara y cuerpo con el fin de intimidar a las tribus enemigas que invadían su territorio o para celebrar sus ceremonias religiosas al realizar pinturas rupestres como las que se encuentran en las cuevas de Altamira en Santander, España. El hombre, durante el transcurso de los siglos, aprovecho el color para resaltar su atractivo personal mediante el uso de colorantes que fueron extraídos desde fuentes de origen mineral, vegetal y animal. (Maison, 1962). En la actualidad el color, nos influye directamente a la hora de aceptar o rechazar un alimento o un medicamento, debido principalmente a que éste nos puede servir como criterio útil de calidad y ser también un indicador de muchos tipos de cambios deteriorativos que pueden sufrir. (Fennema, 2000).

Cuando se habla de sustancias coloreadas es importante explicar el significado de algunos términos utilizados normalmente, como es el caso de la palabra “pigmento” que se refiere a los constituyentes normales de las células o los tejidos que otorgan color; en cambio el termino “colorante” es una designación general para referirse a cualquier compuesto químico que imparte color. Además los pigmentos pueden tener propiedades que van más allá de las de los colorantes, por ejemplo como receptores de energía (clorofilas), transportadores de oxígeno (hemoglobina) o protectores contra radiaciones como es el caso de los carotenoides.

Otro término que generalmente aparece en los textos corresponde a “dye” para referirse a los colorantes utilizados en la industria textil. También se menciona el término “laca” al referirse a un colorante alimentario absorbido en la superficie de un soporte inerte, como la alúmina. (Fennema, 2000).

La coloración de los pigmentos se produce debido a que estos absorben una o más longitudes de onda de la parte visible del espectro electromagnético, que fluctúa desde los 400 a los 700 nm y reflejan o transmiten otras.

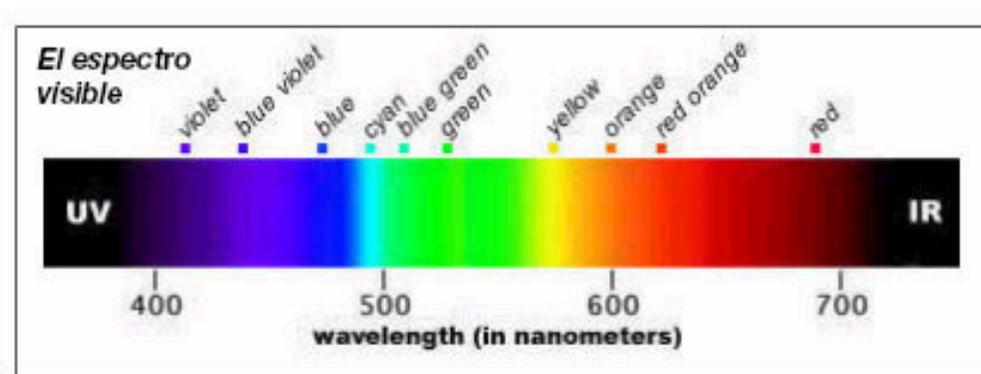


Figura 1: Espectro electromagnético. Fuente: Carey, (2000).

Como se puede observar en la Figura 1, cada longitud de onda de la luz en esta región aparece como un color diferente. La combinación de todos los colores se observa de coloración blanca (como la luz solar), en cambio la ausencia de longitudes de onda aparece negra. La Tabla 1 muestra la relación entre la longitud de onda absorbida y el color observado. De esta tabla se puede inferir, por ejemplo, que un compuesto de color azul oscuro absorbe luz en la región anaranjada. (Chang, 1992).

Tabla 1: Relación entre el color observado y la longitud de onda absorbida.

| Longitud de onda absorbida (nm) | Color observado |
|--|------------------------|
| 400 (violeta) | Amarillo verdoso |
| 450 (azul) | Amarillo |
| 490 (azul verde) | Rojo |
| 570 (amarillo verdoso) | Violeta |
| 580 (amarillo) | Azul oscuro |
| 600 (anaranjado) | Azul oscuro |
| 650 (rojo) | Verde |

Fuente: Chang, (1992).

2.2 Clasificaciones de los pigmentos.

Para un mejor estudio de los pigmentos se han propuesto distintos tipos de clasificaciones que se basan en las siguientes características:

- **Origen:** Esta clasificación divide a los pigmentos en los naturales, los sintéticos y los inorgánicos. Los pigmentos naturales son los producidos por organismos vivos, mientras que los sintéticos son sintetizados en el laboratorio. En cuanto a los pigmentos inorgánicos, estos pueden ser naturales o sintéticos.

- **Estructura química del cromóforo:** El cromóforo es un grupo aislado, covalentemente insaturado que, tiene una absorción característica en la región UV-Visible del espectro electromagnético. (Allinger *et al.*, 1973). Dicho grupo puede tener diversos sistemas conjugados como los carotenoides, las antocianinas, y las betalaínas entre otros. (Gross, 1987).

- **Estructura de los pigmentos naturales:** Entre las estructuras se encuentran los derivados del tetrapirrol (clorofilas), los derivados de los isoprenoides (carotenoides), los que derivan de compuestos N-heterocíclicos (betalaínas), los derivados del benzopirano (antocianinas) y quinonas (benzoquinonas).
- **Como aditivos de alimentos:** Esta clasificación esta establecida por la FDA (Food and Drugs Administration) separando a los pigmentos en dos categorías. Los pigmentos certificados que son de origen sintético y que deben aprobar una serie de estudios para demostrar su inocuidad y los no certificados que son los pigmentos obtenidos desde fuentes naturales como es el caso de la clorofila, los carotenoides y el ácido carmínico entre otros. (Fennema, 2000).

2.3 Pigmentos de origen microbiano.

La síntesis de productos coloreados por parte de los microorganismos es una característica determinada genéticamente. Su formación en muchas bacterias es dependiente de la presencia de la luz, composición del sustrato y la temperatura de incubación. Los pigmentos de los microorganismos son metabolitos secundarios, esto quiere decir que no pertenecen a aquellos compuestos presentes en todos los organismos. Ya al observar su estructura se reconoce que derivan de los metabolitos normales o constituyentes celulares. (Schleguel, 1998).

La presencia de estos pigmentos en las bacterias que se desarrollan en hábitats sometidos a la luz les confiere un efecto protector frente a la radiación ultravioleta, como es el caso de los carotenoides localizados en la membrana plasmática que protegen a la célula de la fotooxidación. (Boss, 2002).

Los pigmentos que se han encontrado en bacterias y que más han sido estudiados son descritos a continuación junto con algunas de sus propiedades:

Carotenoides: (Figura 2). Están presentes en géneros bacterianos tales como: *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* y *Nocardia* (Boss, 2002) a los cuales les otorgan colores que van desde el tono amarillo al rojo. La estructura de los carotenoides es usualmente un tetraterpenoide de 40 átomos de carbono formado por ocho unidades isoprenoides de 5 átomos de carbono cada una, unidos de manera tal que la estructura es simétrica e invertida en el centro. El esqueleto básico es lineal y simétrico y puede ser ciclado en uno o ambos extremos. (Rodríguez-Amaya, 1999a, b).

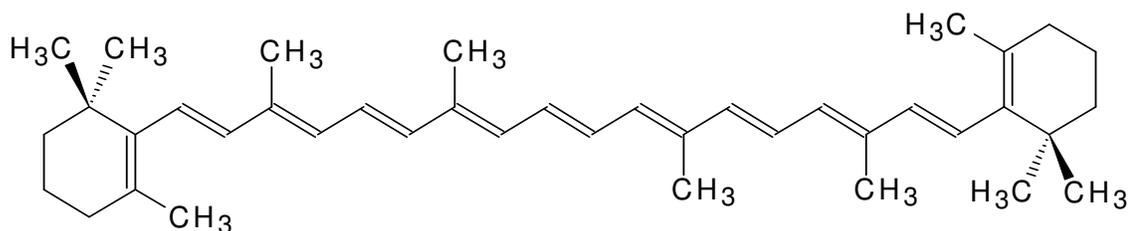


Figura 2. Estructura del β -caroteno.

Los carotenoides de cadena hidrocarbonada son denominados carotenos y aquellos que contienen grupos oxigenados son llamados xantofilas. Ambos grupos están presentes en la naturaleza principalmente en su forma isomérica más estable que es la trans. (Rodríguez-amaya, 1999a).

En general los carotenoides se caracterizan por ser en su mayoría insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos como éter de petróleo, hexano, tolueno (principalmente los carotenos), etanol y metanol (principalmente las xantofilas). Además, su extenso sistema de dobles enlaces conjugados constituye el cromóforo que proporciona el color a estos compuestos. Según su estructura, los carotenoides presentan espectros de absorción característicos para cada compuesto, lo que se utiliza en su identificación y cuantificación ya sea cuando son previamente aislados o separados en columnas cromatográficas, o bien, analizados mediante Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC). (Rodríguez-Amaya, 1999b).

La importancia de los carotenoides va más allá de su función como colorante, debido a las propiedades de pro-vitamina A de algunos de ellos y a la acción biológica como antioxidante asociada a otros. (Oliveira *et al.*, 2004).

Indigoidina: (Figura 3). La indigoidina pertenece a la clase de compuestos de las azaquinonas (diazadifenoquinonas). (Starr *et al.*, 1966).

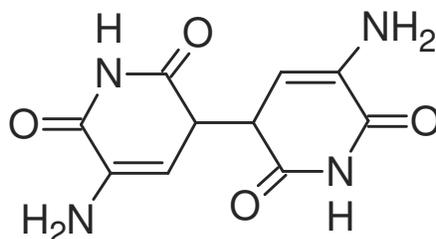


Figura 3. Estructura de la indigoidina.

Se trata de un pigmento de color azul que se excreta al exterior de la célula por diversas bacterias, *Pseudomonas indigofera*, *Corynebacterium insidiosum*, *Arthrobacter atrocyaneus* y *Arthrobacter polychromogenes*, (Schlegel, 1998). La función de este pigmento en el caso de las bacterias del género *Erwinia* es aumentar su resistencia al estrés oxidativo producto del ataque del oxígeno reactivo liberado por la planta a la que estos microorganismos invaden. (Reverchon *et al.*, 2002).

La identificación de este pigmento resulta relativamente fácil mediante espectroscopía UV-Visible ya que se tiene registrada la longitud de onda a la cual absorbe. (Starr *et al.*, 1966).

Prodigiosina: (Figura 4. a y b). La estructura de la prodigiosina se corresponde con el 2-metil-3-pentil-6 metoxiprodigioseno o 2-metil-3-pentilprodiginina, según se considere al esqueleto como prodigioseno (Hearn *et al.*, 1970) o prodiginina (Gerber & Gauthier, 1979) que se diferencian únicamente por el grupo metoxi del segundo pirrol.

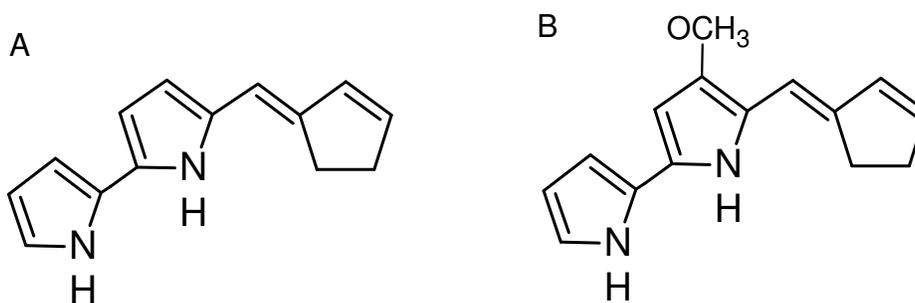


Figura 4. A) Núcleo del prodigioseno. B) Núcleo de la prodiginina.

Se sabe que muchos pigmentos actúan como antibióticos, entre ellos la prodigiosina, siendo más eficaz frente a gram-positivos (Gerber & Gauthier, 1975); también actúa como fungistático, como fungicida y frente a protozoos, habiéndose ensayado incluso en ratones infectados con malaria (Melo *et al.*, 2000). Se ha visto que funciona como fotosensibilizador, produciendo la muerte de otras bacterias y permitiendo así que las bacterias que la produzcan como es el caso de *S. marcescens* colonicen el medio, por lo que se cree que pueda ejercer un papel protector en condiciones desfavorables en las que el crecimiento de dichas bacterias está comprometido (Akimenko & Trukto, 1991).

Violaceína: (Figura 5). Se ha encontrado este pigmento de coloración azul violeta en bacterias del género *Janthinobacterium* y *Chromobacterium*, es un derivado del indol caracterizado como 3-(1,2-dihidro-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilidene)-1,3-dihidro-2H-indol-2-ona. (Durán *et al.*, 2001).

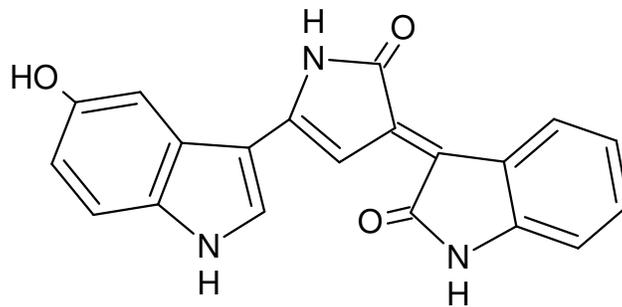


Figura 5. Estructura de la Violaceína.

La biosíntesis y las propiedades biológicas de este pigmento se han estudiado recientemente en particular su actividad antitumoral, antibacteriana y antileucémica. (Veríssima *et al.*, 2004).

La Violaceína presenta su máxima absorción a los 585 nm lo que facilita notablemente su identificación cuando se extrae desde las bacterias que producen este pigmento. (Matz *et al.*, 2004).

Piocianina: (Figura 6). Es un pigmento verde azulado que es excretado al medio de cultivo por bacterias acuáticas como *Pseudomonas aeruginosa*. (Schlegel, 1998). Su estructura química corresponde a (1-hidroxy-5-metilfenacine).

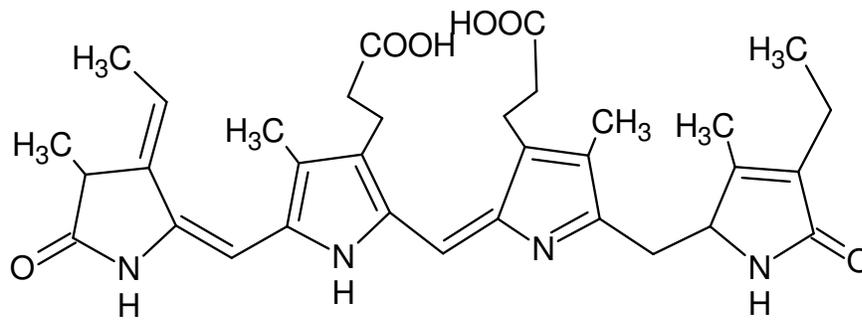


Figura 6. Estructura de la Piocianina.

Se ha demostrado su actividad antimicrobiana contra una variedad de microorganismos, aunque el mecanismo directo de toxicidad de la piocianina permanece incierto, se piensa que la actividad biológica es debida a su habilidad de catalizar la formación de radicales tóxicos como el superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). (Norman, 2004).

2.4 Análisis instrumentales.

Entre los análisis instrumentales más utilizados en la actualidad para estudiar compuestos orgánicos se encuentran los del tipo espectroscópico entre los que podemos encontrar las espectroscopías UV-Visible, la infrarroja (IR) y la de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Espectroscopía UV-Visible: La absorción de radiación UV-Visible (200 -750 nm) hace que ciertos electrones en las moléculas sean excitados desde el estado fundamental a niveles superiores de mayor energía. Por otra parte, cuando la radiación incide sobre una sustancia no toda ella se ve afectada por esta, ya que existen átomos que absorben radiación a los cuales se les denomina cromóforos y otros átomos que no absorben radiación, pero que hacen que se modifiquen algunas de las características de la absorción del cromóforo a los cuales se denomina auxocromos. (Skoog & Leavy, 1995).

Espectroscopía infrarroja (IR): Es un tipo de espectroscopía vibracional que utiliza la radiación del espectro electromagnético (Figura 7) cuya longitud de onda está comprendida entre los 800 y los 400000 nm (0.8 y 400 μm) para actuar sobre la materia orgánica, haciendo vibrar los enlaces de la sustancia a una determina frecuencia característica. (Skoog & Leavy, 1995).

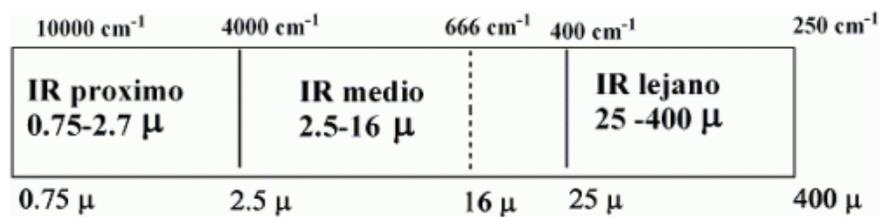


Figura 7. Rangos correspondientes al IR próximo, IR medio e IR lejano.

Las frecuencias en que se produce la vibración de los enlaces son extremadamente características lo que resulta muy útil para identificar grupos funcionales tales como el -OH, -NH₂ y C=O. Además la mayoría de las moléculas tienen regiones de tensión complicadas (1600–600 cm⁻¹) las cuales son difíciles de analizar, pero que sin embargo, son características para cada una de ellas, razón por la cual a esta región se le denomina como la de huella dactilar. (Skoog & Leavy, 1995).

Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear: Esta técnica implica la absorción de radiación electromagnética en la región de las radiofrecuencias del espectro. La absorción de ondas de radio esta acompañada por un tipo especial de transición nuclear y por esta razón se le denomina de esta forma. Ya que los núcleos de los átomos de ciertos elementos se comportan como si fueran cargas girando que al ser colocados en un fuerte campo magnético externo se alinean ya sea a favor o en contra del campo. La absorción ocurre a ciertos valores de la frecuencia de irradiación y es una medida de la diferencia de energía entre los dos alineamientos magnéticos diferentes.

El espectrómetro de RMN detecta estas señales y las registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad, que es el llamado espectro de Resonancia Magnética Nuclear. (Skoog & Leavy, 1995).

2.5 Inestabilidad de los pigmentos.

La mayoría de los pigmentos extraídos desde fuentes vegetales como el caso de los carotenoides, las clorofilas y los flavonoides presentan el inconveniente de ser inestables frente a cambios de pH, al aumento de la temperatura o a la acción de agentes oxidantes. (Ott, 1992). Además, se suman a esto la variabilidad de tonos de color que aparece cuando son extraídos desde vegetales que son de diferente temporada y el tiempo necesario para que se produzca el pigmento en las cantidades adecuadas, problemática que preocupa en gran medida a las industrias de alimentos y farmacéutica debido al creciente interés por parte de los consumidores por productos de origen natural, ya que en la mayoría de los casos por el hecho de provenir de fuentes naturales son seguros de consumir. (Fennema, 2000). En contraste con algunos colorantes sintéticos como es el caso del FD&C ROJO N°3 (Eritrocina) el que fue restringido en 1990 por la Food and Drugs Administration (FDA) por causar daño a la glándula tiroides. (Food and Drugs Administration, 2004).

Por otra parte, dentro de las fuentes de productos naturales, los microorganismos ofrecen grandes posibilidades para la obtención de nuevas estructuras aunque constituyen una de las menos estudiadas y, que gracias al desarrollo alcanzado en las técnicas de aislamiento e identificación no pueden dejar de ser investigadas. (Brizuela *et al.*, 1998).

Por la anteriormente expuesto, se puede concluir que las bacterias que presentan pigmentación pueden llegar a ser una atractiva fuente de colorantes de origen natural, ya que su cultivo es fácil y se pueden obtener pigmentos con rapidez si se comparan con otras fuentes naturales de colorantes como los vegetales, que necesitan un mayor tiempo de desarrollo o; el

caso de los colorantes de origen animal como el ácido carmínico que se extrae del cuerpo seco de la hembra de la cochinilla del nopal (*Coccus cacti*), de la que es necesario esperar a su etapa adulta para poder obtenerlo. (Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO/WHO, 2004). Además, debido a que las bacterias marinas constantemente se encuentran expuestas a condiciones ambientales extremas, es de suponer que los pigmentos presentes en ellas pueden poseer una mayor estabilidad en comparación a los pigmentos presentes en otras fuentes naturales como los vegetales.

En base a lo expuesto anteriormente se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

Los pigmentos obtenidos de cepas bacterianas aisladas de sedimentos marinos no pierden su capacidad colorante al someterlas a tratamientos químicos y físicos.

Para aceptar o rechazar la hipótesis antes enunciada se plantea el siguiente objetivo general y específicos.

Objetivo general.

Se plantea como objetivo general la obtención, caracterización físico-química y la determinación de la estabilidad de los pigmentos obtenidos a partir de cepas bacterianas aisladas desde sedimentos marinos.

Objetivos específicos.

- 1- Cultivar y masificar cepas bacterianas pigmentadas en medio de cultivo sólido.
- 2- Obtener pigmentos desde las cepas bacterianas masificadas y determinar la solubilidad de estos.
- 3- Separar mediante cromatografía los pigmentos obtenidos desde las cepas bacterianas masificadas.
- 4- Analizar químicamente los componentes de los pigmentos separados por cromatografía de columna, espectroscopía infrarroja (IR), espectroscopía en UV-Visible, espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de protones (H^1 RMN) y de carbono trece (C^{13} RMN).
- 5- Determinar la estabilidad de los pigmentos y sus componentes a condiciones de pH, temperatura y, la acción de algunos metales.

3. MATERIAL Y MÉTODO.

1 MATERIALES.

1.1 Material biológico.

Para el trabajo experimental se utilizaron las cepas bacterianas *Chromobacterium violaceum* y *Cytophaga salmonicolor* provenientes del cepario del Instituto de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile, que fueron aisladas desde sedimentos marinos de la playa Chica ubicada en el balneario de Niebla en la Décima Región de los Lagos.

1.2 Reactivos.

Los reactivos utilizados en la fase experimental se indican a continuación en orden alfabético: acetato de etilo MERCK (99% de pureza), acetona MERCK (100% de pureza), ácido fórmico MERCK (100% de pureza), ácido sulfúrico al 3%, agar-agar MERCK (90% de pureza), bromuro de potasio ARQUIMED (100% pureza), celulosa, cloroformo MERCK (100% de pureza), cloruro de sodio VETEC ANALYTICAL REAGENTS (99% de pureza), etanol OXIQUIM (100% de pureza), extracto de carne MERK (90% de pureza), metanol para columna FLUKA (100% de pureza), n- hexano MERCK (96% pureza), peptona de carne MERCK (90% de pureza), poliamida SC6 (Macherey-Nagel), silicagel GF254 (Merk).

1.3 Equipos.

Autoclave Orsa, balanza analítica precisa ADAM modelo AAA250LE, cámara de cultivo Kotterman GMB Type S430, cámara fría Eurofrigo, equipo RMN, espectrofotómetro UNICAM modelo MEΛIOS α, espectrofotómetro IR, estufa de secado NAPCO modelo 620, lámpara

UVSL25 Mineralight, microscopio óptico Carl Zeiss G/427942, prensa Carver modelo C, rotavapor Quimis ISO9002.

1.4 Otros.

Aros sujetadores , asa de siembra, botellas de 250 mL, cámara cromatográfica de vidrio con fondo plano, columna cromatográfica de 72 cm de largo y diámetro de 2.1 cm, columna cromatográfica de 78 cm de largo y diámetro de 2.6 cm, embudo Buchner de porcelana, espátulas metálicas , jeringas de 10 mL, matraces balón de 250 mL, matraces Erlenmeyer 125 y 250 mL, matraz de succión, papel filtro, pinza para sostén, pipetas graduadas 5 mL, parafilm, placas cromatográficas de Celulosa (15 cm de largo y 10 cm de ancho), placas cromatográficas de Poliamida (15 cm de largo y 10 cm de ancho), placas cromatográficas de Silicagel GF₂₅₄ (15 cm de largo y 10 cm de ancho) , placas Petri de 14cm de diámetro, probeta de 100 mL, vasos precipitados de 500 y 250 mL

2. METODOS.

2.1 Masificación de las cepas bacterianas.

La elección de las cepas bacterianas se realizó en base a sus características fenotípicas, es decir visualizando las que exhibieran coloración de interés y una fuerte pigmentación. De manera que se escogieron dos cepas: la primera correspondiente a *Chromobacterium violaceum*, que según la escala de colores europea DIN 16539 tiene una coloración violeta N₀₀M₉₉C₉₀ y la segunda correspondiente a *Cytophaga salmonicolor* que presenta una coloración salmón N₀₀A₄₀M₅₀. (Küppers, 2002).

Las cepas anteriormente nombradas, fueron extraídas en forma individual con un asa de micrón previamente esterilizada desde tubos inclinados con agar peptona al 2% y se inocularon individualmente mediante el método de siembra por estrías, en 9 placas Petri y 9 tubos inclinados con diferentes medios de cultivos sólidos correspondientes a agar peptona al 2 %, agar peptona más 7 % de NaCl y agar Marine Broth.

Una vez realizada esta operación las placas se incubaron en una estufa durante 48 horas a 23 ± 2 °C en condiciones de aerobiosis y en ausencia de luz, con el objetivo de que las cepas bacterianas se masificaran.

Posteriormente y en forma independiente, el cultivo bacteriano masificado de la cepa respectiva, se transfirió con un rastrillo a botellas de vidrio estériles de 250 mL que contenían 10 mL de agua destilada y por su parte los tubos sembrados se almacenaron en una cámara fría a 4 °C para conservarlos como cepario.

2.2 Determinación de la ubicación intracelular o extracelular de los pigmentos.

De la suspensión bacteriana correspondiente de cada cepa se extrajeron 15 mL mediante una jeringa desechable y se hicieron pasar en forma individual a través de un filtro de 6 μ m, recogiendo el filtrado en 2 tubos de ensayo. Una vez realizada esta operación se procedió a observar en forma visual si los pigmentos presentes en las bacterias se conservaron retenidos en el filtro correspondiente a cada cepa o si se encontraban presentes en el filtrado de los tubos, con el fin de determinar si éstos son excretados al medio por las bacterias o si se encuentran en el citoplasma.

2.3 Determinación de la solubilidad de los componentes bacterianos.

Se procedió a separar parte del contenido bacteriano retenido en los filtros y se traspasó a 5 tubos de ensayo que contenían respectivamente los siguientes solventes orgánicos: acetato de etilo, acetona, cloroformo, etanol, metanol y n-hexano. Esta operación sirvió para observar las características de solubilidad del contenido bacteriano correspondiente a cada cepa.

2.4 Obtención de contenido bacteriano para análisis físico-químicos.

Se inocularon mediante el método de siembra por estrías muestras de *C. violaceum* en 40 placas Petri con agar peptona al 2 %, las cuales se incubaron a 23 ± 2 °C durante 48 horas. Luego se extrajo el cultivo contenido en las placas y se pesó en una balanza analítica obteniéndose una cantidad de 9.87 g para los análisis físico-químicos posteriores.

Para el caso de *C. salmonicolor*, se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente obteniéndose 9.35 g de contenido bacteriano.

A continuación el contenido bacteriano correspondiente a cada una de las 2 cepas se transfirió en forma independiente mediante un rastrillo de vidrio a botellas de 250 mL con 50 mL de agua destilada estéril, las que fueron depositadas a resguardo de la luz en una cámara fría a 4 °C.

2.5 Obtención de los componentes de ambas cepas bacterianas.

Las partidas de suspensiones de *C. violaceum* y de *C. salmonicolor* obtenidas anteriormente (punto 2.4 de métodos) se depositaron independientemente en cápsulas de

porcelana para someterlas a desecación a 30 °C por 72 horas en una estufa de secado NAPCO modelo 620, para luego extraerles el contenido con una espátula metálica y depositarlo en un mortero de vidrio (para el caso de *C. violaceum* se obtuvieron 1.85 g y para *C. salmonicolor* 1.14 g). Luego se trituró el contenido y se observó una pequeña porción de este al microscopio óptico para verificar que se rompieran las células bacterianas de manera que se liberaran los pigmentos. Posteriormente el contenido se depositó en tubos de ensayo que se guardaron a resguardo de la humedad y la luz.

2.6 Cromatografía de capa fina.

Esta técnica fue utilizada para seleccionar la fase estacionaria a utilizar en la cromatografía de columna realizada en el punto siguiente. Para ello se sembraron las muestras obtenidas anteriormente en 3 cromatoplasmas: Celulosa (15 cm de largo y 10 cm de ancho), Poliamida (15 cm de largo y 10 cm de ancho) y Silicagel GF₂₅₄ (15 cm de largo y 10 cm de ancho), las que fueron depositadas en una cámara cromatográfica con Acetato de etilo: metanol (80:20). Se escogió la que mejor interactuó con los pigmentos de ambas cepas bacterianas.

2.7 Fraccionamiento del contenido bacteriano.

La técnica utilizada para separar los componentes individuales del contenido bacteriano de cada una de las cepas consistió en la cromatografía de columna. Para *C. violaceum* se preparó una columna de vidrio de 2,1 cm de diámetro y 72 cm de alto a la cual se le depositó lana de vidrio en el fondo y, sobre esta, un poco de algodón para que se retuviera el material sólido en la columna. La fase estacionaria escogida para la realización de esta operación se basó en los resultados obtenidos en la cromatografía de capa fina realizada anteriormente. Debido a esto se

pesaron 30 g de Poliamida que fueron depositados en forma de papilla con el eluyente (acetato de etilo) en la columna hasta alcanzar la altura deseada. Finalmente se abrió la llave inferior de la columna para que salga el exceso de disolvente de manera que no exceda más de 2 cm sobre el sólido. (Abbott & Andrews, 1970).

A continuación, se depositó en forma cuidadosa 1.54 g del contenido bacteriano de *C. violaceum* obtenido en el punto 2.5 de métodos y se procedió a eluir la muestra empleando una serie de disolventes en los que se fue aumentando la polaridad (Acetato de etilo → metanol → ácido fórmico), las fracciones recolectadas a la salida de la columna se depositaron en tubos de ensayo de 20 mL y se concentraron en un evaporador rotatorio para luego analizarlas por medio de cromatografía de capa fina, observando a la luz UV y revelando las placas con ácido sulfúrico al 3% y calor (60°C). Aquellas fracciones con características cromatográficas similares se unieron en matraces aforados previamente rotulados y se guardaron a resguardo de la humedad y la luz.

Para *C. salmonicolor* se realizó la misma operación expuesta anteriormente utilizándose una columna de vidrio con una altura de 78 cm y un diámetro de 2.6 cm a la cual se le depositó 1.26 g del contenido obtenido en el punto 2.5 de métodos. La fase estacionaria escogida correspondió a Poliamida, siendo el orden de adición de la fase móvil la siguiente: Acetato de etilo → metanol → ácido fórmico.

Las fracciones obtenidas se guardaron en tubos de ensayo de 20 mL, se concentraron a pequeño volumen mediante un evaporador rotatorio y, posteriormente fueron sometidas a

cromatografía de capa fina, de manera que las que presentaran igual migración en la fase estacionaria se reunieran en matraces aforados previamente rotulados.

2.8 Determinación del punto de fusión.

El punto de fusión es una característica particular de cada sustancia pura y por lo tanto nos permite poder identificar el compuesto al que se le realiza. (Murthy & Nathan, 1965). Para su determinación se tomo una punta de espátula de componente seco obtenido en el punto 2.7 de métodos y se depositó en un vidrio porta objeto, el cual fue cubierto con una placa de vidrio mas fina (cubre objeto) para luego ser depositados en el receptáculo del microscopio tomador del punto de fusión. Posteriormente se procedió a elevar en forma gradual la temperatura de la platina del receptáculo del instrumento junto con monitorizar cualquier cambio físico de la muestra gracias a un lente incorporado y monitorizar la temperatura mediante termómetros de diferente capacidad, también incorporados.

2.9 Espectroscopía UV-Visible.

Se realizaron barridos a en la región UV-Visible del espectro electromagnético a los compuestos bacterianos obtenidos en el punto 2.5 de métodos, tomándose para el caso de *C. violaceum* una alícuota de 2 mL (0,1 mg/mL de metanol) de contenido bacteriano y para *C. salmonicolor* una alícuota de 2 mL (0,1 mg/mL de metanol), utilizando un espectrofotómetro UNICAM modelo MELIOS α .

Paralelamente se realizaron barridos de forma similar a la anteriormente descrita a las fracciones obtenidas en el punto 2.7 de métodos a partir de una alícuota de 2 mL de muestra de

C. violaceum (0,1 mg/mL de metanol) y de 2 mL de muestra de *C. salmonicolor* (0,1 mg/mL de metanol).

2.10 Espectroscopía de infrarrojo (IR).

Para la realización de este análisis se procedió a fabricar mediante una prensa Carver Modelo C una pastilla de KBr que contenía un 1% de la muestra obtenida en el punto 2.7 de métodos. Dicha pastilla fue depositada en el espectrofotómetro IR y se procedió a medir entre los 4000 y 400 cm^{-1} (zona que correspondería al infrarrojo medio) el espectro IR de la muestra.

2.11 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de protones (H^1 RNM) y carbono trece (C^{13} RNM).

Se realizaron mediciones de espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de protones (H^1 RMN) y de carbono trece (C^{13} RMN) a la muestra de *C. violaceum* obtenida en el punto 2.7 de métodos (disuelta en metanol deuterado ALDRICH) en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Concepción, utilizando para ello un equipo Bruker de 250 MHz.

2.12 Determinación de la de la estabilidad de los pigmentos.

2.12.1 Determinación de la estabilidad de los contenidos bacterianos obtenidos en el punto 2.5 de métodos.

La metodología empleada para determinar la estabilidad de los pigmentos frente a condiciones de pH y de temperatura, se realizó de acuerdo al método descrito por Ott, (1992).

Para determinar el comportamiento de los contenidos bacterianos de ambas cepas en estudio frente a la temperatura, se depositaron alícuotas de 5mL de muestra de *C. violaceum* (0,1 mg/mL de metanol: agua (70:30), pH 6) en 9 tubos de ensayo, los cuales fueron sometidos en forma individual durante 15 minutos a diferentes temperaturas: 0, 5, 20, 30, 40, 50, 60, 80 y 100 °C; monitorizándose su pH mediante tiras de papel indicador. Paralelamente se evaluó la respuesta del contenido bacteriano de *C. salmonicolor*, de la manera descrita anteriormente, utilizando alícuotas de 5 mL (0,1 mg/mL solubilizada en metanol: agua (70:30)).

Posteriormente, para determinar el comportamiento de los contenidos bacterianos frente a condiciones de pH, se depositaron en forma individual 5 mL de muestra de *C. violaceum* (0,1 mg/mL de metanol, pH 6) en 2 tubos de ensayo. Al primero se le adicionó gradualmente mediante un gotario NaOH al 5% (monitorizándose el pH) y, al segundo, se le adicionó HCl al 5% de la misma forma (monitorizándose también los cambios de pH). Con respecto a *C. salmonicolor* se realizó la misma operación descrita anteriormente utilizando alícuotas de 5 mL (0,1mg/mL de metanol).

2.12.2 Determinación de la estabilidad de la fracción de *Chromobacterium violaceum* obtenida en el punto 2.7 de métodos.

La metodología utilizada para determinar la estabilidad de la muestra frente a condiciones de pH, de temperatura y la acción de algunos metales, se realizó de acuerdo al método descrito por Ott, (1992).

Para determinar el comportamiento de la fracción de *C. violaceum* obtenida en el punto 2.7 de métodos, frente a condiciones de pH, se utilizaron alícuotas de 5 mL de muestra (0,1 mg/mL de metanol, pH6), las que fueron depositadas en 5 tubos de ensayo; a 2 se les adicionó en forma individual HCl 5% hasta obtener los valores de pH 3 y 4 respectivamente y, a los 3 tubos restantes se les adicionó NaOH al 5% hasta obtener los valores de pH correspondientes a 7, 9 y 14. Para observar los cambios en la parte visible del espectro electromagnético y poder compararlos con el de la muestra a pH 6, se procedió a medir el espectro UV-Visible de las muestras que se encontraban en los valores de pH que alteraron su coloración. (Jiménez *et al.*, 2004).

Para determinar el comportamiento de la fracción de *C. violaceum* obtenida en el punto 2.7 de métodos, frente a la temperatura, se tomaron 9 alícuotas de 5 mL (0,1 mg/mL de metanol: agua (70:30) pH 6) y se depositaron en tubos de ensayo que fueron sometidos durante 15 minutos en forma individual a diferentes temperaturas que correspondieron a: 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 °C respectivamente (verificando el pH mediante tiras de papel indicador). Posteriormente se procedió a medir el espectro de absorción UV-Visible de las muestras y ver los cambios en los valores de las absorbancias máximas debido al efecto de la temperatura. (Jiménez *et al.*, 2004).

Con respecto al comportamiento de la muestra de *C. violaceum* obtenida en el punto 2.7 de métodos frente a la acción algunos metales, se tomaron 5 mL de muestra (0,1 mg/mL de metanol) y se depositaron en 4 tubos de ensayo, a los cuales se les adicionó respectivamente,

mediante un gotario, soluciones de SnCl_2 0.1 N (pH 1), MgSO_4 0.1 N (pH6), CuSO_4 0.1 N (pH5) y FeCl_3 0.1 N (pH1) para observar en forma visual posibles cambios en las muestras.

4. RESULTADOS

4.1 Crecimientos de cepas bacterianas en agares.

En la Tabla 2, se indican los porcentajes de crecimiento de las cepas bacterianas luego de su cultivo en tres tipos diferentes de agares a 23 ± 2 °C por 48 horas y en la Figura 8 se muestra una fotografía de los cultivos.

Tabla 2. Porcentaje de crecimiento de las cepas bacterianas en agares.

| Bacterias | Porcentaje de crecimiento | | |
|----------------------------------|---------------------------|---|---|
| | A | B | C |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> | 100 % | 0 | 0 |
| <i>Cytophaga salmonicolor</i> | 100 % | 0 | 0 |

A= agar peptona 2 %. B= agar peptona mas 7 % NaCl. C= agar Marine Broth.

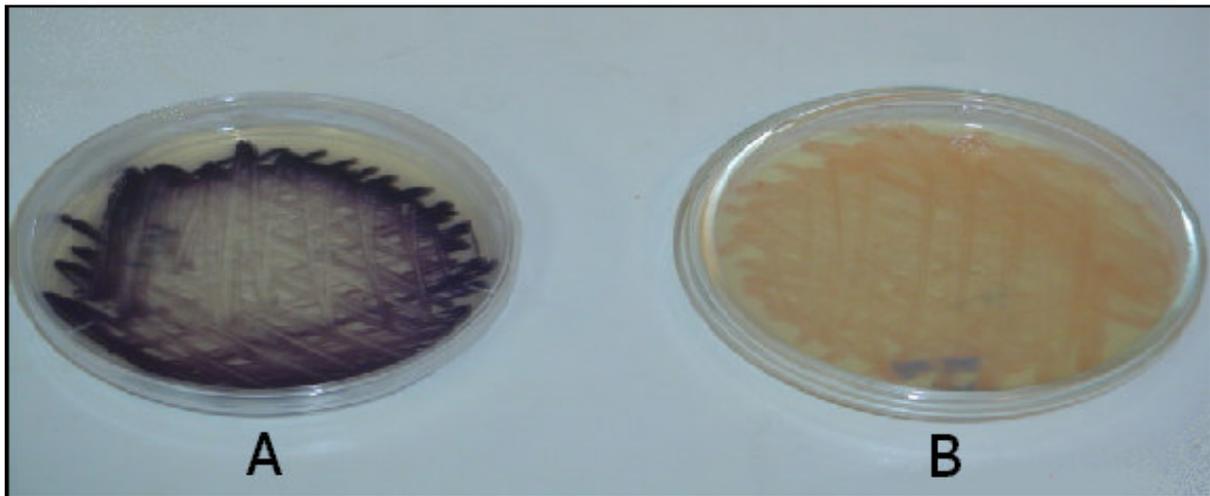


Figura 8. Placas Petri con cultivo desarrollado de A= *Chromobacterium violaceum*. B= *Cytophaga salmonicolor*.

Como se observa en la Tabla 2 las dos cepas en estudio crecieron en un 100% en agar peptona al 2% y no se desarrollaron en los otros dos medios de cultivos ensayados. En la Figura 8 se aprecia el desarrollo de *C. violaceum* de coloración violeta y de la cepa *C. salmonicolor* cuyo desarrollo presenta un color salmón.

4.2 Características Físico Químicas de las fracciones bacterianas retenidas en los filtros.

Se determinó que en los productos que quedan retenidos en los filtros se registra un color más intenso, lo que indicaría que los pigmentos que producen ambas cepas en estudio deberían ubicarse intracelularmente.

En la Tabla 3, se indican los productos retenidos en los filtros y su estabilidad frente a distintas temperaturas y en la Tabla 4 su estabilidad a diferentes valores de pH.

Tabla 3. Estabilidad de los productos retenidos en los filtros a diferentes temperaturas.

| Producto retenido en los filtros | Temperaturas (°C) | | | | | | | | |
|----------------------------------|-------------------|---|----|----|----|----|----|----|-----|
| | 0 | 5 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 80 | 100 |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>Cytophaga salmonicolor</i> | + | + | + | + | + | + | - | - | - |

(+) = estable a la temperatura ensayada. (-) = No estable a la temperatura ensayada.

Tabla 4. Productos bacterianos retenidos en filtros y su estabilidad a diferentes pHs.

| Producto retenido en los filtros | pH | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|----|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
| <i>Chromobacterium violaceum</i> | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - |
| <i>Cytophaga salmonicolor</i> | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - |

(+) = estable al pH ensayado. (-) = No estable al pH ensayado.

En la Tabla 3 se aprecia que el producto de *C. violaceum* no sufrió alteración mantuvo su color, a todas las temperaturas ensayadas; en cambio el producto de *C. salmonicolor* mantuvo su color hasta los 50 °C. A temperaturas superiores éste fue inestable.

Por otra parte en la Tabla 4, se aprecia que el producto de *C. violaceum* mantiene su color en el rango de pH 1 a 10. En cambio el producto de *C. salmonicolor* mantiene su color en el rango de pH 5 a 9.

La Tabla 5 se muestra la solubilidad de los productos bacterianos retenidos en los filtros sometidos a diferentes tipos de solventes orgánicos.

Tabla 5. Solubilidad en solventes orgánicos de los productos bacterianos retenidos en los filtros

| Solvente | Productos de: | |
|------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| | <i>Chromobacterium violaceum</i> | <i>Cytophaga salmonicolor</i> |
| Acetato de etilo | +/- | +/- |
| Acetona | +/- | +/- |
| Cloroformo | +/- | +/- |
| Etanol | + | + |
| Hexano | - | +/- |
| Metanol | + | + |

(+) = soluble. (-) = insoluble. (+/-) = poco soluble (30%).

Al observar la Tabla 5 se puede inferir que el producto de *C. violaceum* es soluble en etanol y metanol. Por su parte, el producto de *C. salmonicolor* también es soluble en los mismos solventes orgánicos citados anteriormente.

En las Figuras 9 y 10 se muestran los gráficos de los espectro de absorción UV-Visible para los productos de *C. violaceum* y *C. salmonicolor* respectivamente.

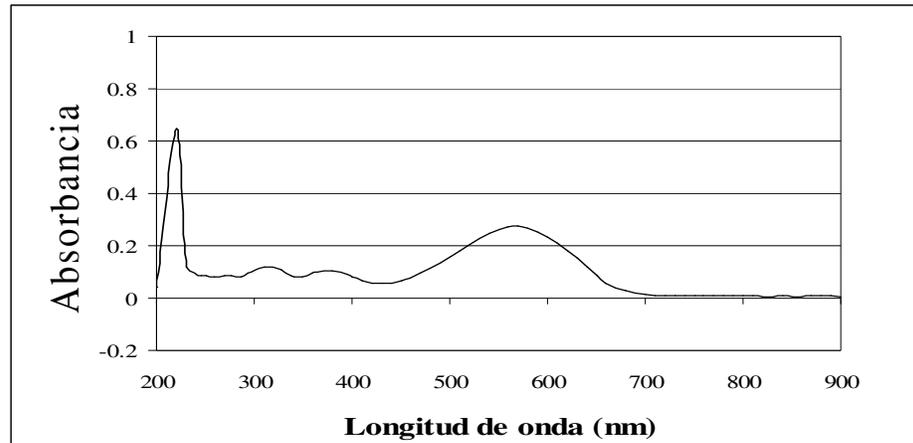


Figura 9. Espectro de absorción UV-Visible de los productos de *Chromobacterium violaceum*.

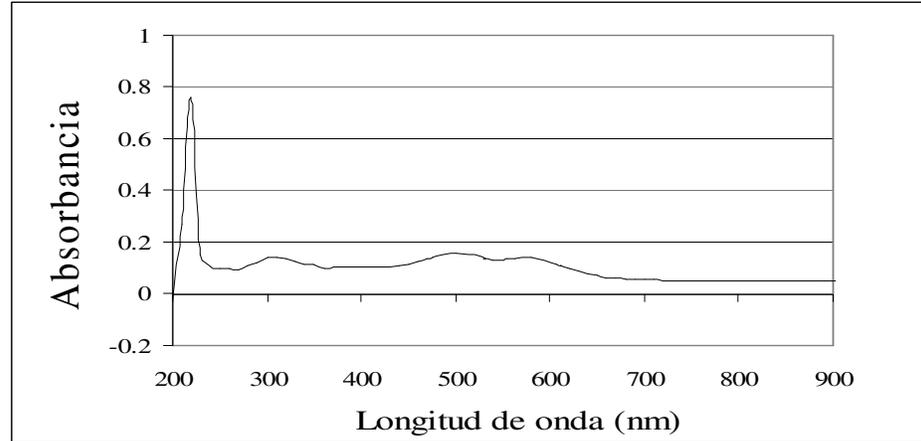


Figura 10. Espectro de absorción UV-Visible de los productos de *Cytophaga salmonicolor*.

En el gráfico de la Figura 9, el producto de *C. violaceum* presenta 4 picos máximos de absorción: a los 220, 310, 380 y 570 nm. Para el caso de *C. salmonicolor* (Figura 10) se aprecian también 4 picos de absorción: a los 220, 310, 500 y 580 nm.

4.3 Separación de los constituyentes de los productos obtenidos de las cepas bacterianas en estudio.

Al realizar por separado la cromatografía de columna a los productos de ambas cepas en estudio, se obtuvieron una serie de muestras que fueron eluidas en polaridad creciente con una batería de solventes orgánicos. Las fracciones obtenidas a partir del producto de *C. violaceum* junto con sus características principales se indican en la Tabla 6 y para el producto de la cepa *C. salmonicolor* en la Tabla 7.

Tabla 6. Muestras obtenidas por cromatografía de columna del producto de *Chromobacterium violaceum*.

| Solvente | Muestras | Características |
|---|-------------------------|--|
| Acetato de etilo: metanol 80:20 60:40 50:50 | 01-23 24-29 30-34 | No se observa coloración. No se observa coloración. No se observa coloración. |
| Metanol: acetato de etilo 70:30 | 35:142 | A partir de la fracción 39 aparece un color amarillo pálido que se mantiene hasta la fracción 103, luego desde la fracción 110 se observa un color violeta pálido, acentuándose más a partir de la fracción 112. Desde la fracción 131 a la 140 se observa un anillo de color violeta oscuro. |
| 80:20 | 143:144 | Se mantiene el color violeta oscuro. |
| 90:10 | 145:146 | Se mantiene el color violeta oscuro. |
| Metanol 100 | 147:150 | . Se mantiene el color violeta oscuro |
| Metanol: ácido fórmico 90:10 | 151:173 | A partir de la fracción 163 comienza a desaparecer gradualmente el color violeta hasta casi desaparecer en la fracción 172. |

Además de las características observadas en la fracciones obtenidas (Tabla 6), se infiere que el uso de la mezcla de solventes Acetato de etilo: metanol 80:20 no produce la migración del producto en la columna, en cambio el uso de la mezcla de solventes Metanol: acetato de etilo 70:30 permite la migración de producto en la columna. Por lo tanto, las fracciones polares recolectadas en la etapa posterior se analizan mediante cromatografía en placa fina.

Tabla 7. Muestras obtenidas por cromatografía de columna del producto de *Cytophaga salmonicolor*.

| Solventes | Muestras | Características |
|----------------------------------|-----------------|---|
| Acetato de etilo 100 | 01-87 | A partir de la fracción 7 comienza a aparecer un color rosa muy pálido. |
| Acetato de etilo: metanol | | |
| 80:20 | 88:106 | Coloración rosa muy pálida. |
| 70:30 | 107 | No hay coloración. |
| 60:40 | 108-115 | No hay coloración. |
| 50:50 | 116:117 | No hay coloración. |
| Metanol: acetato de etilo | | |
| 80:20 | 118:119 | No hay coloración. |
| 70:30 | 120:121 | No hay coloración. |

Como se observa en la Tabla 7 las mezclas de solventes utilizadas permitieron obtener distintas fracciones pero en la mayoría de ellas él o los productos no presentan coloración o esta coloración es muy tenue (rosado pálido). Lo que nos indicaría que la coloración de la cepa bacteriana se debe a la mezcla de pigmentos presentes en ella y que cada uno en forma individual tiene poca coloración. Razón por la cual no se le realizaron los análisis posteriores.

4.4 Determinación de compuestos por cromatografía en placa fina a partir de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna.

Se prepararon 8 placas de Silicagel GF₂₅₄ para analizar las muestras de *Chromobacterium violaceum* obtenidas mediante cromatografía de columna y proceder a reunir las que presentaron igual migración. Los detalles de esta operación se pueden observar en la Tabla 8.

Tabla 8. Cromatografía de capa fina de las muestras de *Chromobacterium violaceum* obtenidas a partir de cromatografía de columna.

| Nº Placa | FM | Revelador | Muestras | Características | Matraz |
|----------|----|-----------|-------------------------------|---------------------------------------|--------|
| 1 | A | A | 3, 4, 11, 12, 14 y 16 | 14 y 16 igual migración. | A |
| 2 | A | A | 17, 20, 25, 30, 35 y 37 | 17 y 20 igual migración. | B |
| 3 | A | B | 35, 37, 40, 43, 45 y 47 | Todas presentan igual migración. | C |
| 4 | A | B | 49, 51, 53, 55, 57 y 59 | 49, 51, 53 y 55 igual migración. | D |
| 5 | B | B | 60, 70, 80, 90, 105 y 115 | 60, 70, 80, 90 y 105 igual migración. | E |
| 6 | A | C | 115, 120, 125, 130, 135 y 140 | Todas presentan igual migración. | F |
| 7 | C | C | 150, 152, 154, 155, 157 y 161 | Todas presentan igual migración. | G |
| 8 | C | C | 162, 165, 167, 169 y 173 | Todas presentan igual migración. | H |

FM (Fase móvil): **A**= Metanol: acetato de etilo (70:30), **B**= Metanol Cloroformo (80:20) y **C**= Metanol.

Revelador: **A**= H₂SO₄ al 30%, **B**= Luz UV y **C**= Observación Visual.

Como se puede inferir a partir de la tabla 8, las fracciones que presentaron igual migración en las placas cromatográficas fueron reunidas en 8 matraces los que fueron rotulados con las letras correspondientes al abecedario.

Posteriormente las muestras presentes en los matraces A, B, C, D y E fueron sembradas en una placa de Poliamida y eluidas en una fase estacionaria de Metanol: acetato de etilo: ácido fórmico (70:20:10). Obteniéndose como resultado que las muestras de los matraces A, B y C presentaron una igual migración y que las muestras de los matraces D y E eluyeron de forma similar. Por su parte, para las muestras de los matraces F, G y H se utilizó una cromatoplaque de Silicagel GF₂₅₄ y una fase móvil de Metanol, observándose que las tres eluyeron en forma similar.

La Tabla 9 muestra las fracciones finales de *C. violaceum* obtenidas, el número de los matraces que las contenían y sus características de coloración.

Tabla 9. Fracciones de *Chromobacterium violaceum* obtenidas a partir de cromatografía de columna las cuales fueron reunidas mediante análisis con cromatografía en capa fina.

| Fracción | Matraces | Características |
|----------|----------|-----------------|
| 1 | A, B , C | Sin coloración |
| 2 | D y E | Amarillo pálido |
| 3 | F, G y H | Violeta |

Como se puede observar en la Tabla 9, se obtuvieron 3 fracciones de *C. violaceum*, de las cuales solo una presenta color violeta. Debido a esto los análisis químicos y físicos que se

realizaron sólo se efectuaron a la Fracción 3. Además hay que indicar que las tres fracciones se secaron a temperatura ambiente protegidas de la luz determinándose la formación de cristales incoloros en la Fracción 1 y de cristales de color amarillo en la Fracción 3, que de acuerdo a la metodología utilizada no fue posible separarlos del pigmento de color violeta.

4.5 Determinación del punto de fusión.

Se realizó la medición del punto de fusión a los componentes de las Fracciones 1 y 3 señaladas en el punto 4.4, obteniéndose los siguientes resultados.

- Los cristales sin coloración correspondientes (Fracción 1), presentaron un punto de fusión de 60 °C.

- Los cristales de coloración amarillenta presentes como contaminante de la Fracción 3, resultaron tener un punto de fusión de 113 °C. En cambio el pigmento correspondiente al componente 3 de *C. violaceum* no presentó cambios a la máxima temperatura aplicada por el instrumento que correspondió a 280 °C.

4.6 Espectroscopía UV-Visible de la Fracción 3 de *Chromobacterium violaceum*.

En la Figura 11 se muestra el gráfico del espectro UV-Visible de una alícuota de 2 mL de la Fracción 3.

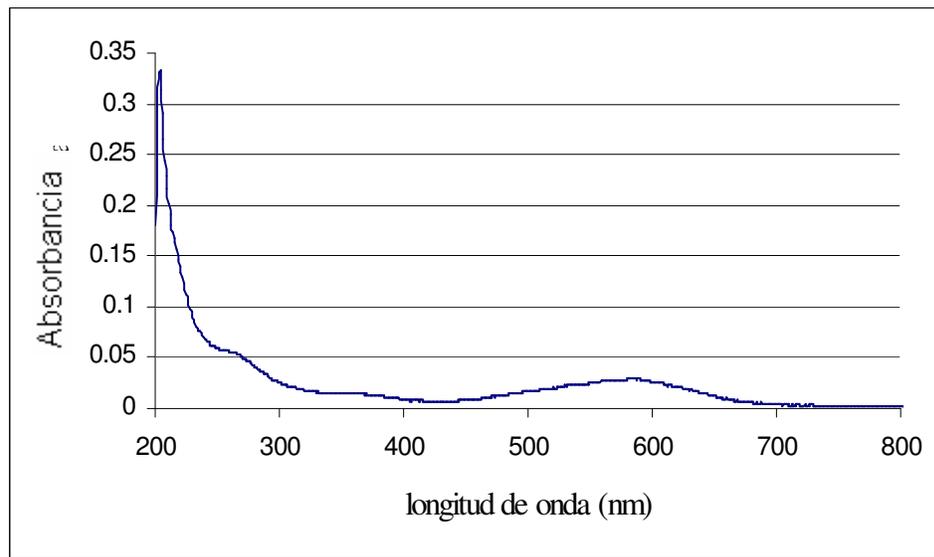


Figura 11. Espectro de absorción UV-Visible de la Fracción 3 de *Chromobacterium violaceum*.

En la Figura 11 se puede observar la presencia de un solo pico en la región visible del espectro cuya absorbancia máxima alcanzada a los 583 nm, corresponde a 0,039 A°. Por su parte en el espectro UV se registran dos picos, uno a los 365 nm y el otro a los 265 nm.

4.7 Espectroscopía de infrarrojo de la Fracción 3 de *Chromobacterium violaceum*.

En la Tabla 10 se detallan el número de bandas detectadas al realizar la espectroscopía IR a la Fracción 3 de *C. violaceum* y su respectiva posición. El gráfico del espectro IR se adjunta en el Anexo (Figura 1).

Tabla 10. Número de bandas de absorción y posición en el espectro infrarrojo de la Fracción 3 de *Chromobacterium violaceum*.

| Nº | Posición cm^{-1} |
|----|---------------------------|
| 1 | 3400,53 |
| 2 | 3300,27 |
| 3 | 2924,08 |
| 4 | 1638,48 |
| 5 | 1548,93 |
| 6 | 1463,12 |
| 7 | 1409,89 |
| 8 | 1065,83 |
| 9 | 526,37 |
| 10 | 518,02 |
| 11 | 508,86 |
| 12 | 498,98 |
| 13 | 489,84 |
| 14 | 461 |
| 15 | 432,43 |
| 16 | 441,83 |
| 17 | 426,16 |

Como se observa en la Tabla 10 se determinaron 17 bandas de absorción en las que se pueden identificar algunas de las bandas características que indicarían lo siguiente.

- La banda de absorción número 1 corresponde a la tensión del enlace O-H.
- La banda de absorción número 2 corresponde a la frecuencia del enlace N-H.
- La banda de absorción número 3 debería ser debido a la tensión C-H.
- La banda de absorción número 4 a los $1638,48 \text{ cm}^{-1}$ indicaría la presencia del enlace C=O.
- Las bandas de absorción número 5 y 6 corresponderían a la tensión del enlace C=C.

4.8 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de protones (H^1 RMN) de la Fracción 3 de *Chromobacterium violaceum*.

La Figura 12 muestra el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de protones (H^1) de la Fracción 3 de *C. violaceum* disuelto en Metanol deuterado a una frecuencia de 250 MHz.

La gran banda a las 5,0 ppm (δ) en la Figura 12, corresponde a los protones del solvente utilizado para disolver la muestra (Metanol deuterado).

En la región entre los 4,0 y 1,0 ppm (δ) de la Figura 12, se pueden apreciar 15 picos, los cuales no se pueden identificar en forma individual debido a que muchos protones unidos a grupos funcionales diferentes aparecen en esta área.

Se puede observar mejor en la Figura 13 la presencia de 7 picos, en la región superior a las 7,0 ppm (δ) lo que indicaría la presencia de protones unidos a anillos aromáticos.

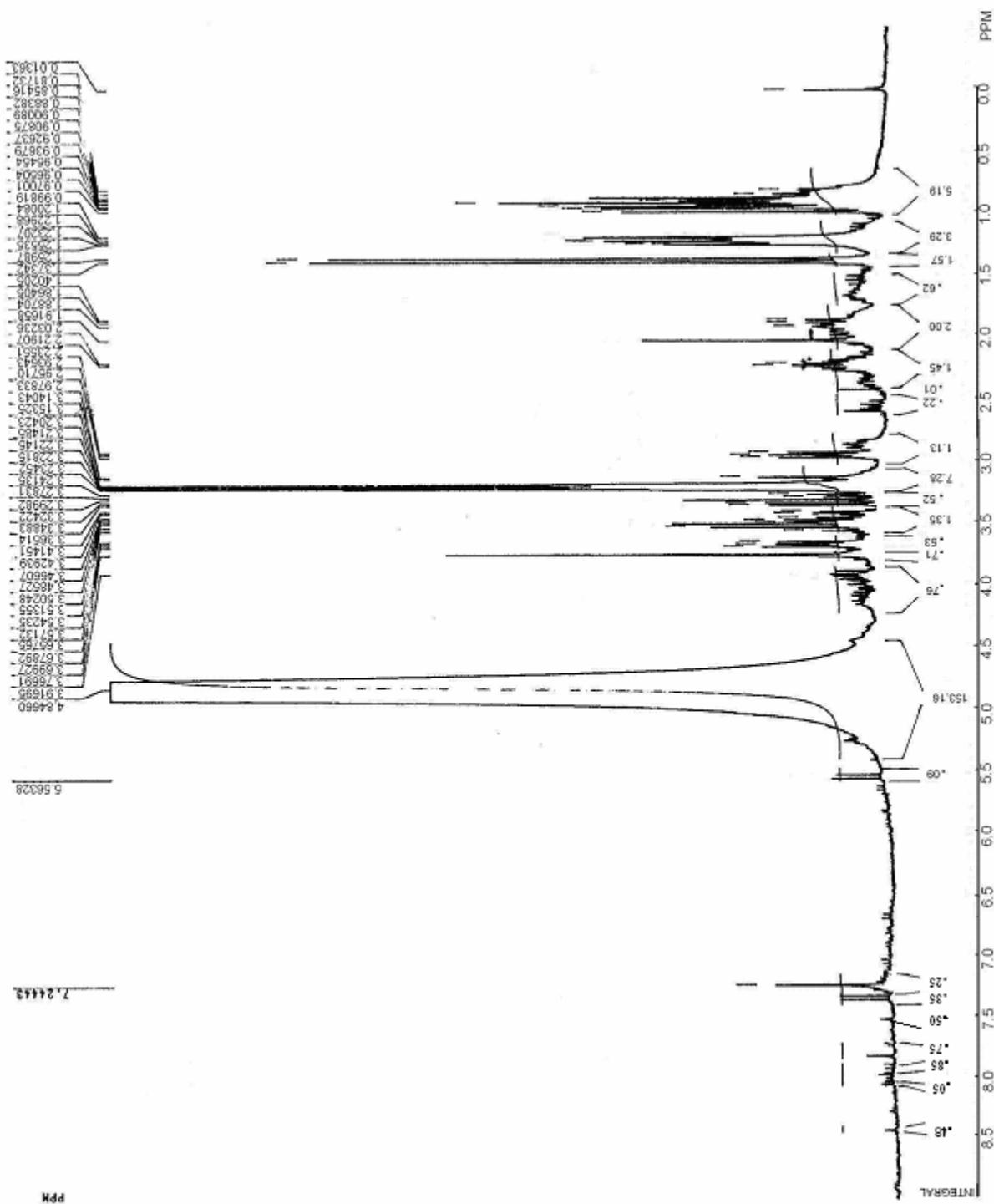


Figura 12. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de protones (H^1 RMN) de la Fracción 3 de *Chromobacterium violaceum*.

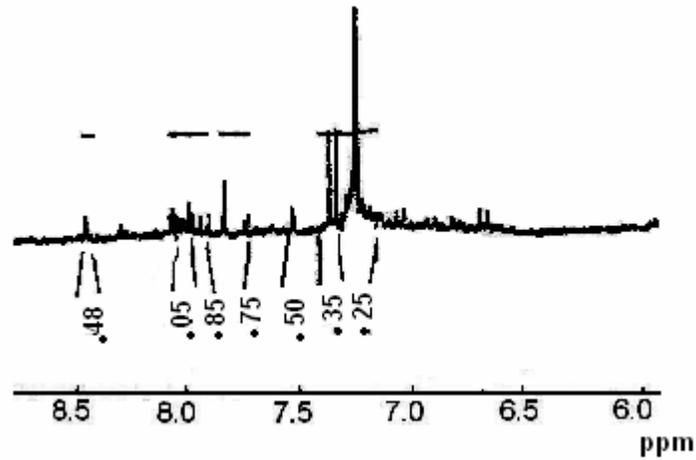


Figura 13. Ampliación de la región entre los 6,0 y 9,0 ppm (δ)

4.9 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de carbono trece (C^{13} RMN) de la Fracción 3 de *Chromobacterium violaceum*.

La Figura 14 muestra el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de carbono trece (C^{13} RMN) de la Fracción 3 de *C. violaceum* a 250 MHz.

Como se puede observar en la Figura 14 entre las 85 ppm (δ) y las 180 (δ) ppm se presentan 6 picos los cuales se encuentran en la región correspondiente a las señales de los carbonos aromáticos. El pico con el valor de 175,4255 ppm (δ) suele corresponder a la señal del carbono R-CO-NR. También se puede observar un pico a las 73,8038 ppm (δ) el cual, por lo general, es asociado a alquinos.

4.10 Determinación de la de la estabilidad de la Fracción 3 de *Chromobacterium violaceum*.

En la Tabla 11 se indican los cambios determinados cuando a alícuotas de la Fracción 3 previamente solubilizadas en metanol, se les adicionaron independientemente según el valor de pH a lograr NaOH al 5% y HCl al 5%.

Tabla 11. Estabilidad de la Fracción 3 frente a valores distintos de pH.

| pH | Observaciones |
|----|--|
| 1 | No se observan cambios |
| 5 | No se observan cambios |
| 7 | No se observan cambios |
| 9 | No se observan cambios |
| 14 | Se producen cambios de coloración a un azul verdoso, para luego desaparecer gradualmente hasta ser casi imperceptible. |

Como se observa en la Tabla 11 solo se determinaron cambios en la coloración de la Fracción 3 cuando fue sometida a pH 14, por lo tanto, se procedió a determinar a que pH dentro de la basicidad se produce el cambio, lo cual fue monitoreado en el espectro UV-Visible.

En la Figura 15 se muestran los gráficos del espectro de absorción UV-Visible de la Fracción 3 sometido a pH 6 (control) y pH 10 respectivamente.

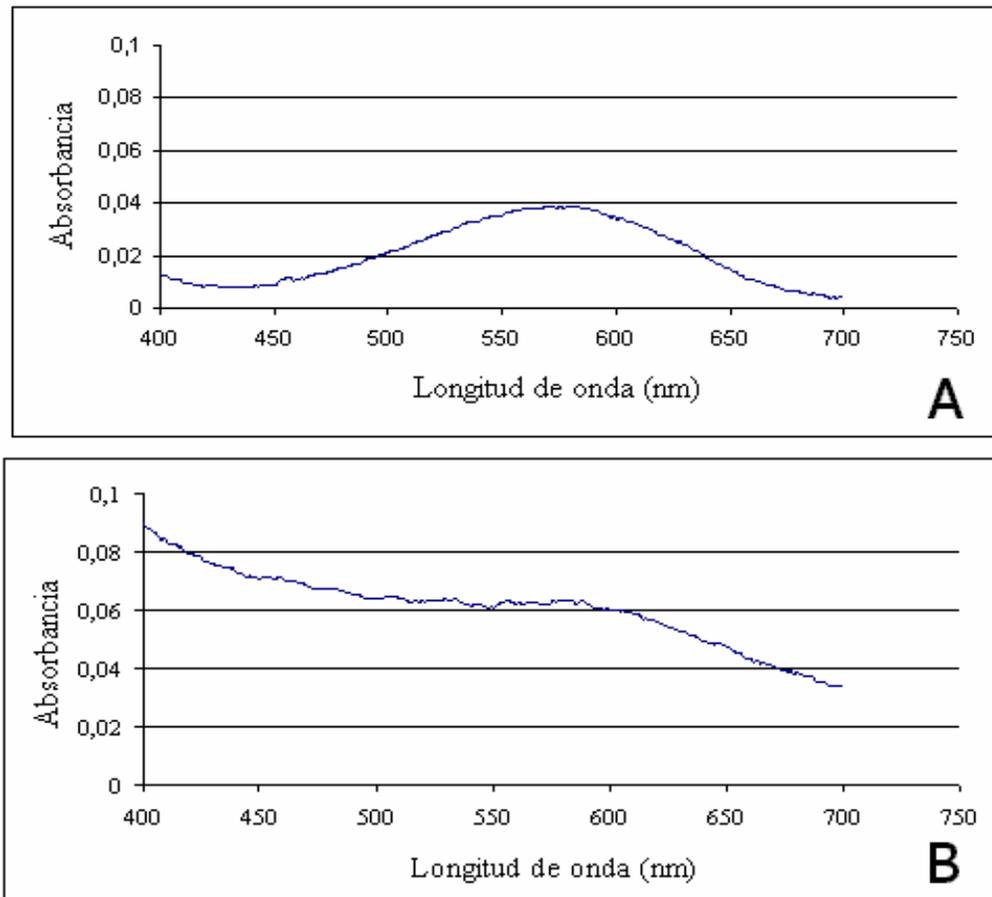


Figura 15. Gráficos de los espectros de absorción UV-Visible de la Fracción 3 de *Chromobacterium violaceum* sometida a: **A=** pH 6 y **B=** pH 10.

En la Figura 15 en el gráfico correspondiente al pH 6 la absorbancia máxima se alcanzó a los 583 nm (0.039 A°). En cambio cuando la muestra es sometida a pH 10 las absorbancias (A°) de todo el espectro aumentan, sobre todo entre los 400 y 550 nm, de manera que el pico característico a los 583 nm no es tan notorio como antes, concordando con la desaparición del color.

4.11 Estabilidad de la Fracción 3 de *Chromobacterium violaceum* sometida a distintas temperaturas.

Posteriormente se determinaron los espectros UV-Visibles de 9 alícuotas de 5 mL de la Fracción 3 solubilizadas en metanol, sometidas en forma individual durante 15 min a diferentes temperaturas que correspondieron a 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100°C respectivamente, obteniéndose a los 583 nm los valores para las absorbancias máximas que se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Valores de las absorbancias máximas de la Fracción 3 de *Chromobacterium violaceum* frente a diferentes temperaturas.

| Temperatura (°C) | Longitud de onda | Absorbancia máxima |
|------------------|------------------|--------------------|
| 20 | 583 | 0,0306 |
| 30 | 584 | 0,0324 |
| 40 | 584 | 0,0375 |
| 50 | 583 | 0,0485 |
| 60 | 584 | 0,0478 |
| 70 | 583 | 0,0461 |
| 80 | 582 | 0,0440 |
| 90 | 583 | 0,0436 |
| 100 | 583 | 0,0424 |

Como se puede observar en la Tabla 12, los valores de las absorbancias máximas fueron incrementando con la temperatura desde los 20°C (temperatura ambiente) hasta los 50 °C, para luego decrecer en forma constante hasta los 100°C. El grafico respectivo se muestra en el Anexo (Figura 4).

4.12 Determinación de la estabilidad de la Fracción 3 de *Chromobacterium violaceum* frente a la acción de 4 metales.

En la Tabla 13 se indica la estabilidad de la Fracción 3 frente a diferentes metales los cuales correspondieron a: SnCl_2 0,1 N (pH 1), MgSO_4 0,1 N (pH 6), CuSO_4 0,1 N (pH 5) y FeCl_3 0,1 N (pH 1).

Tabla 13. Estabilidad de la Fracción 3 de *Chromobacterium violaceum* frente a 4 metales.

| Metales | Observaciones |
|-----------------|--|
| SnCl_2 | No se observaron cambios. |
| MgSO_4 | No se observaron cambios al momento de realizar el experimento, pero 24 hrs más tarde se pudo detectar la precipitación del pigmento en el fondo del tubo. |
| CuSO_4 | No se observaron cambios. |
| FeCl_3 | Se pierde la coloración violeta completamente quedando el contenido del tubo de color amarillo. |

Como se puede apreciar en la Tabla 13 la Fracción 3 es inestable (pierde su color) frente a la exposición del FeCl_3 y presenta luego de un tiempo de exposición inestabilidad al MgSO_4 . En cambio el SnCl_2 y el CuSO_4 no parecen afectar su estabilidad.

5. DISCUSIÓN

5.1. Crecimientos de cepas bacterianas en agares.

Se define a *Chromobacterium violaceum* como una bacteria saprofita que resulta ser normalmente no patológica para los humanos, Gram negativa, anaerobia facultativa y, que es aislada solo en muestras de aguas de regiones tropicales o subtropicales de diversos continentes. Sus colonias son levemente convexas, no gelatinosas y de coloración violeta. (Durán & Menck, 2001).

En los medios de cultivos agar peptona mas 7% de NaCl y agar Marine Broth no se desarrollo *C. violaceum* a diferencia de las cepas sembradas en agar peptona al 2% las cuales crecieron sin problemas, dicha situación no concuerda con lo expresado por Matz *et al.*, (2004) y Chernin *et al.*, (1998) quienes utilizaron otros medios de cultivos para el crecimiento de esta bacteria. Una posible explicación es que las cepas utilizadas en los estudios de los autores antes citados fueron aisladas desde Río Negro, uno de los afluentes más grandes del río Amazonas en Brasil y no como en el presente estudio donde fue aislada desde sedimentos marinos, lo que lleva a pensar que los requerimientos para el crecimiento de esta bacteria se modificaron para adaptarse al ambiente en que se encuentra, ya que la capacidad de sobrevivencia de *C. violaceum* se ve facilitada por su metabolismo versátil capaz de utilizar una amplia rama de fuentes de energía a través del uso de oxidasas y reductasas apropiadas. (Brazilian National Genoma Project Consortium, 2003).

La producción de pigmento de esta cepa bacteriana comenzó luego de 30 horas de incubación. *C. violaceum*, al llegar a una densidad poblacional crítica, induce la síntesis de

pigmento extensivamente en el cultivo, fenómeno conocido como “Quorum sensing”. McClean *et al.*, (1997).

Cytophaga salmonicolor conocida también con el nombre *Marinilabilia salmonicolor* (Nakagawa & Amasato, 1996) es una bacteria Gram negativa, del tipo anaerobia facultativa, que se encuentra en sedimentos marinos. La coloración de sus colonias es rosa-salmón obteniéndose un buen crecimiento en atmósferas aerobias. (Suzuki *et al.*, 1999).

En lo que respecta al crecimiento de *C. salmonicolor* en el medio de cultivo utilizado en este estudio, tampoco concuerda con el señalado por Suzuki *et al.*, (1999), que correspondió a agar Marine Broth.

5.2 Características Físico-químicas de las fracciones bacterianas retenidas en los filtros.

Como se indico en la sección resultados la ubicación de los pigmentos de *C. violaceum*, resulto ser intracelular, situación que concuerda con lo expresado por Retorri & Durán, (1996). Con respecto a *C. samonicolor*, los pigmentos resultaron encontrarse intracelularmente concordando con lo expresado por Bernardet & Nakagawa, (2005).

El ensayo de estabilidad frente a la temperatura demostró que el contenido bacteriano con los pigmentos de *C. violaceum* resiste temperaturas que otros pigmentos de origen natural como los carotenoides, las antocianinas, las batalainas, las clorofilas y pigmentos hemo no pueden soportar debido a que son termolábiles. (Badui, 1999). Con respecto a cómo reaccionan los

pigmentos encontrados en el contenido bacteriano de *C. violaceum* frente a condiciones de pH, se determinó que resisten valores de pH ácidos y que son inestables a pH 10.

Por su parte, el contenido bacteriano con los pigmentos de *C. salmonicolor* resultó ser estable hasta los 60°C coincidiendo con lo expresado por Meléndez *et al.*, (2004), al referirse a la estabilidad térmica de carotenoides como el licopeno. Por otro lado la respuesta del contenido bacteriano con los pigmentos de *C. salmonicolor* frente a condiciones de pH resultó ser inestable entre un rango de pH 5 al pH 10. Lo que concuerda con el estudio realizado por Meléndez *et al.*, (2004), donde se expresa que carotenoides como la flucoxantina y la astaxantina son excepcionalmente inestables al medio alcalino y que los epoxicarotenoides son muy inestables en medio ácido.

El espectro de absorción UV-Visible de los componentes de *C. violaceum* (Fig. 9, sección resultados) presenta un pico característico a los 570 nm, en la región visible del espectro, lo que concuerda con lo expresado por los estudios de Stahly *et al.*, (1942).

Por otro lado, el espectro UV-Visible del contenido bacteriano con los pigmentos de *C. salmonicolor* (Fig. 10, sección resultados) presenta en la región visible 2 picos de absorción uno a los 500 nm y el otro a los 580 nm. Esta información concuerda con la literatura consultada para la identificación de los carotenoides, debido a que éstos presentan 2 bandas de absorción características aproximadamente a los 500 nm. (Myrna *et al.*, 1999). Lo que confirmaría lo expresado por Bernardet & Nakagawa, (2005), quienes sostienen que en las bacterias del orden Cytophagales se encuentran varios tipos de carotenoides en su citoplasma.

5.3 Separación de los constituyentes de los productos obtenidos de las cepas bacterianas en estudio.

Gracias a la separación por cromatográfica de columna realizada a *C. violaceum* se obtuvieron 3 fracciones de las cuales la Fracción 3 presenta una marcada coloración violeta en comparación con las fracciones 1 y 2 las cuales no presentan un color de interés.

Además gracias a la cromatografía de columna se pudo ratificar que la Fracción 3 de *C. violaceum* presentaba grupos polares en su estructura, puesto que eluyó cuando se utilizó una mezcla de solventes correspondiente a Metanol: acetato de etilo (70:30) en donde predomina la fracción polar.

Como no se pudo determinar (exactamente) el punto de fusión de la Fracción 3 de *C. violaceum*, debido a que el instrumento empleado solo puede realizar mediciones menores a los 280 °C, se realizó una búsqueda bibliográfica para encontrar algún pigmento que presentara un punto de fusión superior a esa temperatura encontrándose que el pigmento denominado Violaceína presenta su punto de fusión a temperaturas mayores de 350 °C. (Rettori & Durán, 1996).

Por otra parte, una vez realizada la cromatografía de columna al contenido bacteriano con los pigmentos de *C. salmonicolor* se obtuvieron fracciones con escasa coloración. Por lo tanto es de suponer que el color manifestado en esta bacteria, lo producía la mezcla de los pigmentos presentes en su citoplasma ya que, al ser separados, éstos tendrían un bajo poder de coloración.

Situación que provocó el descarte de la realización de los otros análisis químicos a que debían ser sometidos.

5.4 Espectroscopía UV-Visible de la Fracción 3 de *Chromobacterium violaceum*.

En el espectro UV-Visible realizado a la Fracción 3 de *C. violaceum* (Figura 11, sección resultados) se puede observar la presencia de solo un pico en la región visible del espectro cuya absorbancia máxima de 0,039 A° fue alcanzada a los 583 nm. A su vez, en el espectro ultravioleta se registran dos picos, uno a los 365 nm, longitud de onda en que absorben las cetonas y el otro a los 265 nm, zona en que generalmente absorben los grupos aromáticos. Estos valores concuerdan con los correspondientes al pigmento Violaceína (Figura 16), entregados por la literatura consultada. (Riveros *et al.*, 1988; Rettori & Durán, 1996).

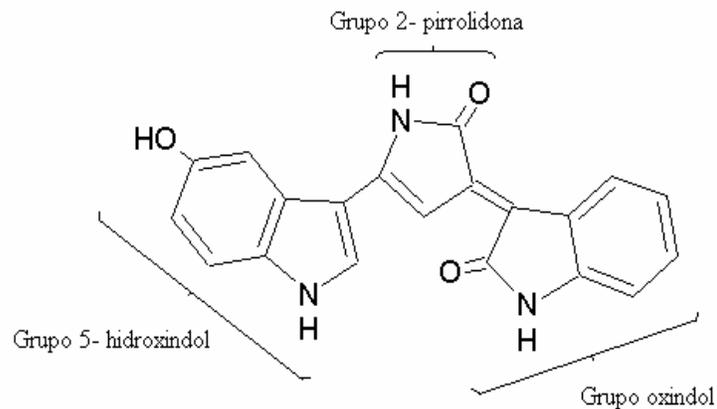


Figura 16. Estructura química de la Violaceína.

Este pigmento es un metabolito secundario resultante de la condensación de dos moléculas modificadas de triptófano. Como se observa en la Figura 16, está constituido por tres subunidades estructurales: 5-hidroxindol, 2-oxindol y 2-pirrolidona. (Caris *et al.*, 2003).

En la Figura 17 se observa la zona donde se produce resonancia en la molécula de Violaceína, la que correspondería al cromóforo que le otorga la coloración violeta característica. (Laatch *et al.*, 1984).

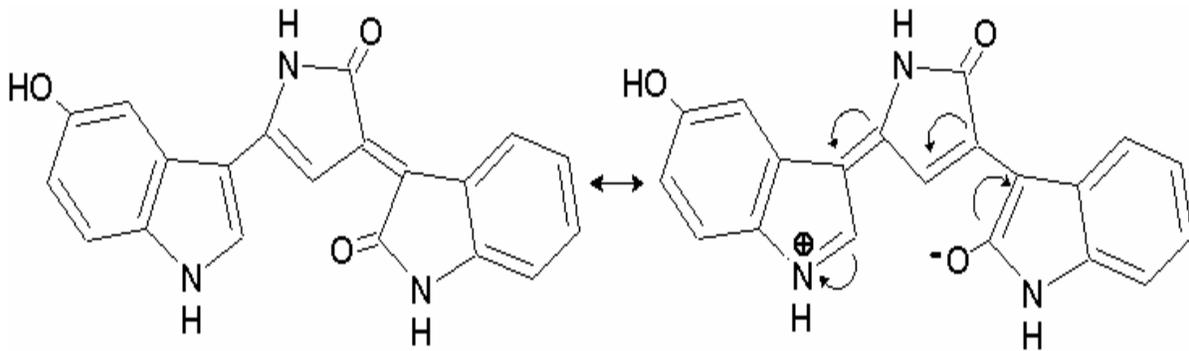


Figura 17. Resonancia del cromóforo existente en la molécula de Violaceína.

Por lo tanto, es de suponer que la única señal detectada en la parte visible del espectro de absorción, a la longitud de onda de 583 nm corresponde a la absorción de este cromóforo.

5.5 Espectroscopía de infrarrojo de la Fracción 3 del pigmento de *Chromobacterium violaceum*.

La espectroscopía infrarroja (IR), detectó bandas características de la Violaceína que pueden ser observadas en el espectro infrarrojo (ver Anexo, Figura 1) y que concuerdan con la literatura consultada (Rettori & Durán, 1996; Laatsch *et al.*, 1984). Identificándose lo siguiente: una banda larga a los $3400,53\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la frecuencia de deformación axial de grupo

OH, la banda a los $3300,27\text{ cm}^{-1}$ se refiere a la frecuencia del N-H. Además, la presencia de la banda a los $1638,48\text{ cm}^{-1}$ informa la existencia del grupo C=O; mientras que las bandas de absorción a los $1548,93\text{ cm}^{-1}$ y los $1463,12\text{ cm}^{-1}$ corresponderían a la tensión del enlace C=C.

Por su parte, el resto de las señales que aparecen entre los 1400 a 600 cm^{-1} estarían en la llamada zona de huella dactilar (Flexión de enlaces CH, CO, CN, CC, etc) que es característica para cada compuesto en particular.

Estos datos entregados por el espectro IR sirven para sugerir que el compuesto encontrado en *C. violaceum* corresponde a Violaceína, pero no para afirmar esta suposición, puesto que sólo entregan información de la presencia de estos grupos funcionales en la molécula del pigmento y no sobre la estructura molecular de éste.

5.6 Análisis espectros Resonancia Magnética Nuclear de protones (H^1RMN) y de carbono trece (C^{13}RMN) de la Fracción 3 de *Chromobacterium violaceum*.

Al consultar la literatura existente sobre el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de protones (H^1RMN) de la Violaceína (Hoshino *et al.*, 1987; Durán, 2000) se encontraron datos que ratifican la presencia de los 7 picos en la región superior a las 7,0 ppm (δ), (Figura 13, resultados) Por su parte, para facilitar una mayor identificación de los protones en el espectro, se utilizó la numeración de los nitrógenos y carbonos realizada por el autor mencionado anteriormente que se puede observar en la Figura 18.

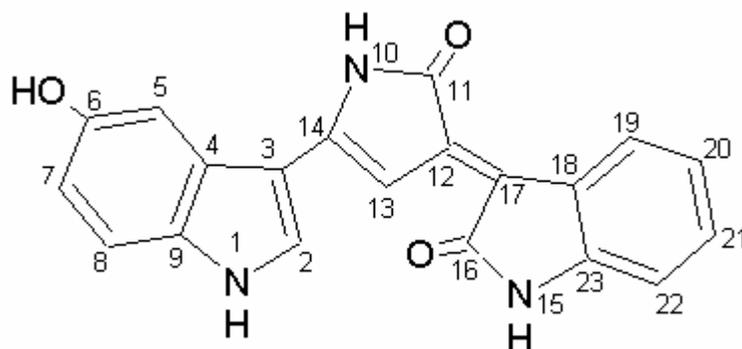


Figura 18. Numeración de los carbonos y nitrógenos utilizada por la bibliografía consultada.

Al comparar los valores obtenidos experimentalmente con los de los autores consultados (Tabla 14) se puede observar que los picos correspondientes a las señales de los protones de los carbonos número 2, 5, 8 y 13 coinciden totalmente, a diferencia de los valores de los picos de los protones de los carbonos con numeración 19, 20, 21 y 22; los cuales se diferencian en cierto grado. Una posible explicación a esta variación puede ser la influencia del entorno que rodea a la molécula, ya que se debe recordar que la fracción analizada no se encuentra pura y por lo tanto las impurezas que lo acompañan pueden interferir con la ubicación de estos picos. Por otro lado, los valores de los picos 6, 1, 10 y 15 que corresponden a protones unidos a grupos fenol y a los nitrógenos de la molécula no pudieron ser determinados debido a que sus valores sobrepasan las 9 ppm (δ) que corresponde al valor máximo obtenido en el espectro por el equipo utilizado. La señal del protón número 7 no fue detectada por el equipo.

Tabla 14. Valores encontrados experimentalmente para las señales del espectro de Resonancia Magnética Nuclear de protones (H^1 RMN).

| N° | A ppm(δ) | B ppm(δ) |
|-------|----------------------|----------------------|
| 1 | * | 11.9 |
| 2 | 8.05 | 8.07 |
| 5 | 7.25 | 7.24 |
| 6 | * | 9.38 |
| 7 | No | 6.79 |
| 8 | 7.35 | 7.35 |
| 10 | * | 10.74 |
| 13 | 7.5 | 7.55 |
| 15 | * | 10.63 |
| 19 | 8.48 | 9.89 |
| 20,21 | 7.85 | 7.19 |
| 22 | 7.75 | 6.82 |

N°: Numeración del carbono o nitrógeno unido al protón a identificar. **A**: Valores asignados según tablas de valores al consultar a Simon *et al.*, (1970). **B**: valores asignados por Durán, (2000). *: Valores ausentes en el cromatograma.

Por otro lado, también se debe mencionar que el medio empleado para solubilizar el pigmento en estas publicaciones (Hoshino *et al.*, 1987; Durán, 2000), correspondió a Dimetilsulfóxido, a diferencia del empleado en el presente trabajo que correspondió a Metanol Deuterado, el cual no solubilizó completamente la Fracción 3 de *C. violaceum* de manera que algunas bandas podrían no haber aparecido en el espectro o también podrían ser detectadas con menos intensidad. Además el espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear, empleado por los autores mencionados anteriormente, trabajó a una frecuencia de 500 MHz en cambio el empleado en este trabajo realizó las mediciones a una frecuencia de 250 MHz.

Al continuar observando la Figura 12 de resultados se puede determinar que a las 5,5 ppm (δ) existe un pico característico que se asigna a los protones presentes en el grupo fenol. La señal mayor a las 5,0 ppm (δ) corresponde a los protones del solvente utilizado para solubilizar la muestra. Por otro lado, los picos entre las 4,0 y las 3,0 ppm (δ) corresponden a señales típicas de los protones unidos a grupos epóxido y los picos presentes en la zona de las 1,5 y 0,5 ppm (δ) corresponden a protones presentes en grupos CH-CH. Por último la señal a las 0 ppm corresponde a la señal del Tetrametilsilano (TMS) (Simon *et al.*, 1970).

La presencia de los picos citados anteriormente podría deberse a que la Fracción 3 de *C. violaceum* tenga unida a su estructura alguna cadena polihidrogenada, que presenta los protones que generan estas señales típicas en el espectro.

Los resultados del espectro de Resonancia Magnética Nuclear de carbono trece (C^{13} RMN) (Figura 14, sección resultados) muestran la existencia de 7 señales de carbonos que se presentan en la Tabla 15 (donde se utiliza la numeración de la Figura 18 para determinar el carbono detectado). La ausencia de las demás señales de los otros carbonos puede deberse a factores como la insuficiente cantidad de muestra disuelta por el solvente, que es diferente a la utilizada por la publicación consultada y al equipo utilizado en este trabajo; el cual recordemos tiene la mitad de la resolución (250 MHz).

Tabla 15. Valores de las señales encontradas entre las 100 y 180 ppm (δ). En el espectro de Resonancia Magnética Nuclear de carbono trece (C^{13} RMN).

| Nº | A ppm (δ) | B ppm (δ) |
|----|-----------------------|-----------------------|
| 2 | 130,4177 | 129,50 |
| 5 | 101,7517 | 104,50 |
| 11 | 175,4255 | 171,50 |
| 16 | 168,8849 | 169,90 |
| 21 | 129,9325 | 129,30 |
| 23 | 143,6153 | 141,80 |

N: Numeración de los Carbonos a identificar. **A:** Valores asignados según tablas de valores de Simon *et al.*, (1970). **B:** Valores asignados por Durán., (2000).

Al continuar analizando la Figura 14 de la sección resultados se aprecia que en la zona entre 0 y 65 ppm (δ) se encuentran 43 picos, que concuerdan con la ubicación de los carbonos pertenecientes a grupos RCH_3 (8-35 ppm (δ)) y grupos RCH_2R (15-50 ppm (δ)). Estos últimos datos experimentales llevan a ratificar que existe la presencia de impurezas.

5.7 Análisis de estabilidad de la Fracción 3 de *Chromobacterium violaceum*.

Uno de los mayores problemas registrados con los colorantes naturales actualmente usados por la industria alimenticia es su inestabilidad a los tratamientos recibidos como parte de su proceso industrial. Ello hace ganar importancia a la búsqueda de sustitutos mas estables que provengan de fuentes naturales. Por esta razón la Fracción 3 de *C. violaceum* fue sometida a la condiciones de pH, temperatura y exposición a metales.

Los resultados obtenidos del comportamiento de la Fracción 3 de *C. violaceum* frente condiciones de pH muestran que el pigmento no pierde su coloración en medios de pH ácido, sin embargo, cuando se somete a pHs superiores a 10 se produce un cambio de tonalidad a un color verde esmeralda muy tenue, el cual luego de algunos segundos desaparece quedando incolora la muestra. Una posible explicación a esta pérdida de coloración (como lo muestra la Figura 19) es que el grupo hidroxilo del NaOH, interactuó con el OH presente en la molécula alterando la resonancia del cromóforo y por lo tanto no se observara coloración.

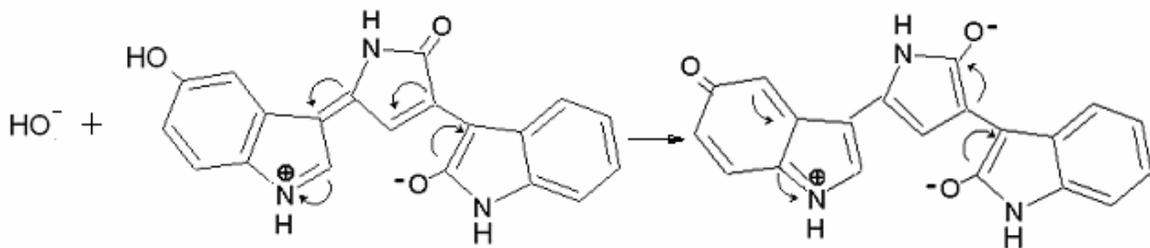


Figura 19. Interacción del grupo hidroxilo con el cromóforo de la Violaceína.

Ante la acción de la temperatura la coloración de la Fracción 3 de *C. violaceum* no resulto verse alterada al observar en forma visual la muestra pero, si se pudo constatar que la absorbancia máxima de la muestra correspondiente al pico en la zona visible del espectro, aumento a los 50°C para luego decrecer en forma constante hasta los 100°C (ver Anexo, Figura 2,). Este aumento de la absorbancia máxima según los estudios realizados a pigmentos vegetales frente a la temperatura por Jiménez *et al.*, (2004), correspondería a un aumento en la tonalidad que, para el caso de este pigmento es prácticamente imperceptible visualmente. Por otra parte, según

literatura consultada la Violaceína resiste temperaturas mayores a los 170 °C sin que se produzcan mayores cambios en su estructura. (Durán., 2000).

La estabilidad frente a la temperatura manifestada como la ausencia de cambios en la coloración de la Fracción 3 de *C. violaceum* resulta sumamente conveniente, comparativamente con otros pigmentos vegetales como las antocianinas que son termolábiles, ya que cambian de tonalidad al calentarse en presencia de oxígeno. (Badui., 1999).

La coloración de la Fracción 3 de *C. violaceum* frente a la acción de metales demostró que es sumamente estable frente a la acción de sales de Cu^{2+} y de Sn^{2+} e inestable frente a sales de Fe^{3+} y de Mg^{2+} . El hecho de que sea estable frente al Sn^{2+} permite adicionar el pigmento a cualquier producto que sea almacenado en latas de conservas, ya que estas son fabricadas a partir de hojalata que es un producto laminado plano, constituido por acero con bajo contenido en carbono (entre 0,03% y 0,13%) y recubierto por ambas caras por una capa de estaño. (Enciclopedia Wikipedia., 2006).

Además la Fracción 3 de *C. violaceum* debido a sus propiedades de estabilidad frente a los agentes físicos presenta un enorme potencial para ser utilizado como pigmento para la industria alimenticia y cosmetológica, siempre y cuando se le realice una certificación de seguridad y uso en la cual se considere su perfil toxicológico ya que para poder comercializar un nuevo aditivo alimenticio o colorante, debe cumplir las normas de la FDA (Food and Drugs Administration).

La aprobación de un aditivo colorante por la FDA es muy importante, pues los colorantes permitidos por resolución del Ministerio de Salud son los mismos que los aprobados por esta entidad internacional.

Gracias a los análisis realizados durante el presente trabajo a la Fracción 3 de *C. violaceum*, se puede suponer que corresponde al pigmento conocido como Violaceína, ya que la mayoría de sus características concuerdan con las encontradas en la literatura existente con respecto al mencionado pigmento. Pero se debe recalcar que con los datos obtenidos experimentalmente (espectroscopía UV-Visible, espectroscopía IR, espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de protones (H^1 RMN) y de carbono trece (C^{13} RMN)) no se puede dilucidar con absoluta certeza la estructura química del compuesto. Un análisis de Espectroscopía de masa (EM) no fue posible de realizar pues el compuesto no reúne las características para análisis en Espectroscopía de Gas Masa (GMS).

Por último se han realizado estudios a la Violaceína en los cuales se han demostrado las actividades, tanto antibacteriana (Rettori & Durán, 1996), como la actividad antitumoral (De Azebedo *et al.*, 2000). Ambos estudios harían aún más atractivo al pigmento para la industria Farmacéutica.

6. CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación y bajo las condiciones en que se realizaron los experimentos se puede concluir lo siguiente:

- Desde la cepas bacterianas de *Cytophaga salmonicolor* se puede obtener un pigmento que presenta distintos grados de solubilidad en solventes orgánicos, es estable en el rango de pH 5 a 9 y en el rango de temperatura de 0 a 50 °C.
- Desde *Chromobacterium violaceum* se puede obtener un pigmento que presenta una mayor solubilidad en solventes orgánicos polares, es estable en el rango de pH 1 a 10, en el rango de temperatura de 0 a 100 °C y en presencia de algunos metales.
- El pigmento de *C. violaceum* se puede separar por métodos químicos en tres fracciones, de las cuales la Fracción 3 (de marcada coloración violeta) al ser analizada por espectroscopía UV-Visible, IR, de RMN de H¹ y C¹³ presenta alguna similitud con el pigmento Violaceína, pero se requieren otros estudios para dilucidar lo anterior.

De acuerdo a lo anterior se da por aceptada la hipótesis planteada en el presente trabajo de tesis.

ANEXO.

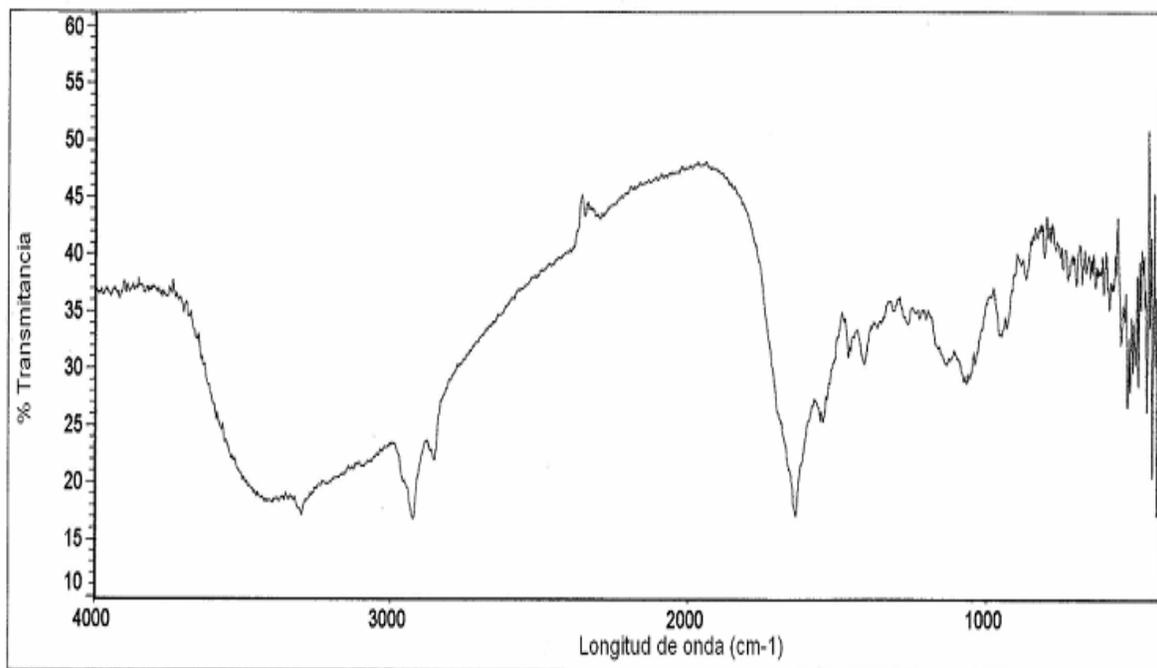


Figura 1. Espectro IR de la Fracción 3 de *Chromobacterium violaceum*.

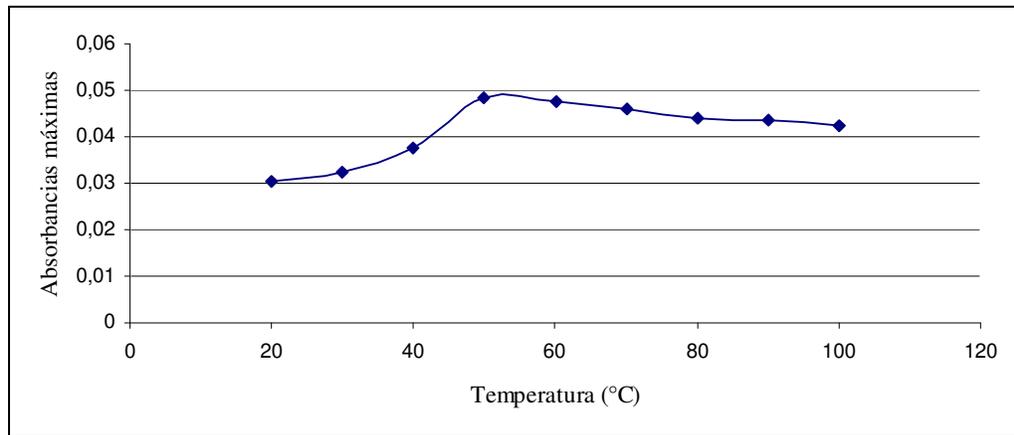


Figura 4. Gráfico de los valores de las absorbancias máximas de la Fracción 3 de *Chromobacterium violaceum* sometida a diferentes temperaturas.

7. BIBLIOGRAFIA.

- Abbott & Andrews, (1970). Introducción a la Cromatografía. Editorial Alhambra. Madrid. España 122 p.
- Allinger, N., Cava, M., De Jongh, D., Jhonson, C., Lebel, N. & Stevens, C. (1973) Química Orgánica. Editorial Reverté. Barcelona. España.1439 p.
- Akimenko, V. & Trutko, S. (1991). Physiological role of the over synthesis of intermediates and he biosynthesis of metabolites for microorganism-producers. Biokhim Mikrobiol. 27:17-35.
- Badui, D. (1999). Química de los alimentos, Editorial Addison Wesley y Logman de México. 736 p.
- Bernardet, J. & Nakagawa, Y. (2005). An Introduction to the Family Flavobacteriaceae. <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaphtm/470/COMPLETE.htm> (25-06-2006).
- Brazilian National Genome Project Consortium. (2003). The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveal sremarkable and exploitable bacterial adaptability.100:20.11660-11665.
- Brizuela, M., García, L., Pérez, L. & Mansur, M. (1998). Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. Revista Iberoam Micol. 15: 69-74.
- Boss, M. (2002). Bacterial Pigments. Rev. Microbiologist. 3: 10-13.
- Carey. F. (2000). Organic Chemistry Fourth Edition. Editorial McGraw-Hill. North America.1422 p.
- Caris. M., Marques, L., Hauck, P. & Vaconcellos, A. (2003). Producción de Violaceína y Desoxiviolaceina por *Chromobacterium violaceum*. Universidad Federal de Santa Catarina. Brasil.
- Chang, R. (1992) Química. Editorial Mc Graw-Hill. España. 1064p.

- Chernin. L, Wilson. M, Thompson.J, Haran. S, Bycroft.B, Chet. L, Williams. P. & Stewart. G. (1998). Chitinolytic Activity in *Chromobacterium violaceum*: Substrate Analysis and Regulation by Quorum Sensing. *Journal of bacteriology*, 180.17: 4435-4441
- De Azevedo, M., Alderete, J., Rodriguez, J., Souza, A., Retorri, D., Torsoni, M., Faljoni-Alario., A., Haun, M. & Durán, N. (2000) Biological Activities of violacein, a new Antitumoral Indole Derivative, in an Inclusion Complex with β - Cyclodextrin. *Journal of Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 37: 93-101
- Durán, N. (2000). Biotransformación de la Violaceína. Universidade estadual de campinas. Instituto de Química. Laboratorio de Química Biológica. Biblioteca central Unicam. Brasil.
- Durán, N., Leon, N., Miranda, C. & De Souza, L. (2001). Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48. 445-458.
- Durán, N. & Menck, F. (2001). *Chromobacterium violaceum*: A review of Pharmacological and industries Perspectives. *Clinical Reviews in Microbiology*. 27:9. 1001-222.
- Enciclopedia wikipedia (2006). Wikimedia Foundation, Inc.
<http://es.wikipedia.org/wiki/Lata> (12-02-2006).
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO/WHO), (2004). JECFA - Monographs & Evaluations. Carmines.
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v17je07.htm> (23-07-2005).
- Food and Drug Administration (FDA). (2004). Foods Colors Facts. Estados Unidos.
<http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd/colorfac.html> (15-09-2005).
- Fennema, O. (2000). Química de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza. 1094 p.

- Gerber, N. & Gauthier, M. (1979). New prodigiosin-like pigment from *alteromonas rubra*. *J. Applied and environmental microbiology*, 37.6: 1176-1179.
- Gerber, N. & Gauthier, M. (1975). Prodigiosin-like pigments. *Rev Microbiol.*3:469-485.
- Gross, J. (1987). *Pigments in fruits*. Academic Press, London. 303 p.
- Hearn, W., Elson, M., Williams, R. & Medina-Castro, J. (1970). Prodigiosene [5-(2-pyrryl)-2,2-dipyrrylmethene] and some substituted prodigiosenes. *J. Organic Chem.* 35:142-146.
- Hoshino, T., Kondo, T., Uchiama, T. & Ogasawara, N. (1987). Biosíntesis of violacein: a novel tryptophan metabolism with a 1, 2 – shift of the indole ring. *Agric. Biol. Chem.* 51:2733-2741.
- Jiménez, M., Zambrano. M., Aguilar. M. (2004). Estabilidad de Pigmentos en Frutas Sometidas a Tratamiento con Energía de Microondas. *Información Tecnológica-Vol.* 15.3, 61-66
- Küppers, H. (2002). *Atlas De Los Colores*. Editorial Blume. S.A. Barcelona. España. 161p.
- Laatsch, H., Thomson, T. & Cox, P. (1984). Spectroscopic properties of violacein and related compounds: crystal structure of tetramethylviolacein. *J. Chemistry Soc. Perkin Trans. 2.* 27.: 1331-1339.
- Maison, G. (1962). *Chemistry and manufacture of cosmetics*. Editorial D. Van Nostrand. Princeton. Inland. 389 p.
- Matz, C., Deines, P., Boenigk, J., Arndt, H., Eberl, L., Kjelleberg, S. & Jürgens, K. (2004). Impact of Violacein-Producing Bacteria on Survival and Feeding of Bacterivorous Nanoflagellates. *Applied and Environmental Microbiology.* 70.3:1593–1599.
- Mcclean, K. H., Winson, M. K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra, S. R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J. H., Swift, S., Bycroft, B. W., Stewart, S. A. B. & Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143: 3703-3711.

- Meléndez-Martínez, A., Vicario, I. & Heredia, F. (2004). Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Revista Archivos Latinoamericanos de Nutrición*.54:2 .
- Melo, P., Durán, N. & Haun, M. (2000). Cytotoxicity of prodigiosin and benzimidazole on V79 cells. *Toxicol. Letters* 116: 237–242.
- Murthy, S. & Nathan. S. (1965) *Química Orgánica Simplificada*. Editorial Minerva-Doubleday. México. 287 p.
- Myrna L. Medina B. y Rafael J. & Carreño D. (1999). Evaluación del material foliar de rayo de sol como posible fuente de xantofilas. *Agronomía Tropical*. 49.4:373-390.
- Nakayawa, Y. & Yamasato, K. (1996). Emendation of the genus *Cytophaga* and transfer of *Cytophaga salmonicolor* to *Marinilabilia* gen. Nov.: phylogenetic analysis of the *Flavobacterium-Cytophaga* complex. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46. 599-603.
- Norman, S., Moeller, P., McDonald, T. & Morris, P. (2004). Effect of Pyocyanin on a Crude-Oil-Degrading Microbial Community. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70. 7: 4004–4011.
- Oliveira, T., Nagem, T., Costa, R., Costa, M., Magalhães, N., Stringheta, P., Queiroga, I., Morales, G. & Silva, V. (2004). Propiedades biológicas de los tintes naturales. *Ars. pharmaceutica*. 45.1: 5-20.
- Ott, D. (1992). *Manual de laboratorio de ciencias de los alimentos. Experimento: pigmentos vegetales.*, Editorial Acribia, España. 228 p.
- Rettori. D. & Durán. N. (1996). Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology*.14:685:688.

- Reverchon, S., Rouanet, C., Dominique, E. & Nasser, W. (2002). Characterization of Indigoidine Biosynthetic Genes in *Erwinia chrysanthemi* and Role of This Blue Pigment in Pathogenicity Journal of bacteriology. 184. 3: 654–665.
- Riveros. R., Haun, M., Campos, V. & Durán, N. (1988). Bacterial Chemistry – IV. Complete characterization of violacein an antibiotic and trypanocide pigment from *Chromobacterium violaceum*. Arq, Biol. Tecnol. 32:475-487.
- Rodriguez-Amaya, D. (1999)a. Carotenoides y preparación de alimentos, Ed. OMNI. Campinas. Brasil. 99 p.
- Rodriguez-Amaya, D. (1999)b. A Guide to Carotenoids Analysis in Foods. Ed. OMNI Campinas. Brasil. 64 p.
- Schlegel, H. (1998). Microbiología General. Editorial Omega, Barcelona. España. 448 p.
- Simon, W. & Clero, T. (1970). Elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Tomo I. Tablas. Editorial Alambra S.A. Madrid. España. 95 p.
- Skoog, D. & Leavy, L. (1995). Principios de análisis Instrumental, 4ª Editorial McGraw-Hill, Madrid, España. 1054 p.
- Stahly, G., Sesler, C. & Brode, W. (1942) a Method for Measuring Bacterial Pigments by the use of the Spectrophotometer and the Photoelectric Colorimeter. J Bacteriology. 43.2: 149–154.
- Starr, P., Cosens, G. & Knackmuss, H. (1966). Formation of the Blue Pigment Indigoidine by Phytopathogenic *Erwinia*. Appl Microbiol. 14.6: 870–872.
- Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S. & Yamamoto, S. (1999). Phylogenetic analysis of genus *Marinilabilia* and related bacteria based on the amino acid sequences of GyrB and emended description of *Marinilabilia salmonicolor* with *Marinilabilia agarovorans* as its subjective synonym. International Journal of Systematic Bacteriology. 49.1551-1557.

- Veríssima, C., Ferreira, C., Versteeg, H., Justo, G., Durán, N. & Peppelenbosch, M. (2004). Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death. *Blood*. 104.5: 1459-1464.