ANA CAROLINA GUIMARÃES CAUZ

"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA VIOLACEÍNA EM LINHAGENS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* COM HETERO-RESISTÊNCIA E RESISTÊNCIA INTERMEDIÁRIA À VANCOMICINA"

CAMPINAS

2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANA CAROLINA GUIMARÃES CAUZ

"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA VIOLACEÍNA EM LINHAGENS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* COM HETERO-RESISTÊNCIA E RESISTÊNCIA INTERMEDIÁRIA À VANCOMICINA"

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do Título de Mestra em Genética e Biologia Molecular, na Área de Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Brocchi.
Co-Orientadora: Dra. Bruna de Araújo Lima.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA ANA CAROLINA GUIMARÃES CAUZ, E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCELO BROCCHI.

CAMPINAS
2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

C313a

Cauz, Ana Carolina Guimarães, 1987-
Avaliação da atividade da violaceína em linhagens de *Staphylococcus aureus* com hetero-resistência e resistência intermediária à vancomicina / Ana Carolina Guimarães Cauz. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Marcelo Brocchi.
Coorientador: Bruna de Araújo Lima.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Violaceina. I. Brocchi, Marcelo,1967-. II. Lima, Bruna de Araújo,1985-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of violacein activity against heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and vancomycin-intermediate *S. aureus* strains
Palavras-chave em inglês:
Staphylococcus aureus
Violacein
Área de concentração: Microbiologia
Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular
Banca examinadora:
Marcelo Brocchi [Orientador]
Cristina Elisa Alvarez martinez
Gerson Nakazato
Data de defesa: 26-03-2015
Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 26 de Março de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Brocchi (Orientador): _____
Assinatura

Profa. Dra. Cristina Elisa Alvarez Martinez _____
Assinatura

Prof. Dr. Gerson Nakazato _____
Assinatura

Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino _____
Assinatura

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira _____
Assinatura

RESUMO

Isolados de *Staphylococcus aureus* correspondem a importantes patógenos para humanos e outros mamíferos, frequentemente associados a doenças em tecidos moles, tanto em infecções localizadas quanto sistêmicas. Tais infecções por *S. aureus* são geralmente de difícil tratamento devido à ocorrência de resistência antimicrobiana. Atualmente, linhagens de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) são isoladas em infecções e uma das últimas drogas de escolha para tratar essas doenças é a vancomicina, um anitbiótico glicopeptídeo. Entretanto, o isolamento de *S. aureus* com hetero-resistência e resistência intermediária à vancomicina (VISA e HVISA) tem sido descrito em diversos países. Dessa forma, a descoberta e caracterização de novas drogas para tratar infecções por *S. aureus* é uma necessidade urgente. Neste trabalho, há a descrição da atividade antimicrobiana da violaceína, uma molécula isolada de algumas espécies de bactérias ambientais, para linhagens VISA e hetero-VISA (HVISA) que se apresentaram resistentes a 24 antibióticos diferentes, o que indica um fenótipo de multirresistência (MRD). Os dados indicam uma atividade antimicrobiana expressiva da violaceína, sendo este efeito também observado através da realização de ensaios de efeito pós-antibiótico e curvas de tempo-morte. O efeito antimicrobiano da violaceína para linhagens de *S. aureus* resistentes a 24 antibióticos pertencentes a diferentes classes indicam um mecanismo distinto de ação da violaceína. Estes resultados sugerem a violaceína como uma droga em potencial para tratar infecções por *S. aureus* MRD, incluindo linhagens VISA e HVISA.

Palavras-chave: ação antimicrobiana, resistência à vancomicina, violaceína, *Staphylococcus aureus.*

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is an important pathogen to human and other mammals frequently associated with soft tissues, causing local and systemic infections. *S. aureus* infections are generally difficult to treat due to antimicrobial resistance. Nowadays, methicilin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains are commonly isolated from infections and one of the last options to treat these diseases is vancomycin, a glycopeptide antibiotic. However, the isolation of vancomycin-intermediate or vancomycin-resistant *S. aureus* (VISA and VRSA strains) has been reported in different countries. Therefore, identification of new drugs to treat *S. aureus* infections is an urgent need. In this work, we described the antimicrobial activity of violacein, a molecule isolated from some groups of environmental bacteria, to VISA and hetero-VISA (HVISA) strains that are resistant to 24 different antimicrobials which indicates a multi-drug resistance (MDR) phenotype. Results reported here show a significant antibacterial activity of violacein. This effect was also observed in post antibiotic assays and in time-kill curves. The antibacterial effect of violacein to *S. aureus* strains resistant to a panel of 24 antimicrobial agents of different classes suggests a diverse antibacterial mechanism for violacein. These results suggest violacein as a potential drug to treat MDR *S. aureus* infections including VISA and HVISA strains.

Keywords: antimicrobial action, vancomycin resistance, violacein, *Staphylococcus aureus*.

SUMÁRIO

RESUMO ..... **vii**

ABSTRACT ..... **ix**

SUMÁRIO ..... **xi**

EPÍGRAFE ..... **xiii**

AGRADECIMENTOS ..... **xv**

LISTA DE FIGURAS ..... **xix**

LISTA DE TABELAS ..... **xx**

LISTA DE ABREVIATURAS ..... **xxii**

1. INTRODUÇÃO **1**

Resistência Bacteriana à Antimicrobianos **1**

1.1. *Staphylococcus* aureus: características, patogenicidade e resistência **2**

1.2. Características de *Bacillus subtilis* **8**

1.3. Novos Antimicrobianos **9**

1.4. Violaceína **11**

2. OBJETIVOS **13**

2.1. Gerais **13**

2.2. Específicos **13**

3. MATERIAIS E MÉTODOS **14**

3.1. Violaceína **14**

3.2. Micro-organismos **14**

3.3. Cultivo Bacteriano **15**

3.4. Indução da Resistência à Vancomicina por Passagem Seriada **15**

3.5. Avaliação do Perfil de Resistência Bacteriana **16**

3.6. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de vancomicina **17**

3.7. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de violaceína **18**

3.8. Concentração Bactericida Mínima (CBM) de violaceína **18**

3.9. Curvas de Tempo Morte **19**

3.10. Efeito Pós Antibiótico (EPA) **20**
3.11. Microscopia Eletrônica de Transmissão **21**
3.12. Atividade Combinada da Violaceína com Antibióticos Comerciais **22**
3.13. Identificação dos Genes de Resistência à Vancomicina por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) **23**
4. RESULTADOS **25**
4.1. Avaliação do Perfil de Resistência das Bactérias Analisadas **25**
4.2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) de vancomicina **27**
4.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de violaceína **27**
4.4. Curvas de Tempo Morte **28**
4.5. Efeito Pós Antibiótico (EPA) **35**
4.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão **36**
4.7. Atividade Combinada da Violaceína com Antibióticos Comerciais **39**
4.8. Identificação dos Genes de Resistência à Vancomicina por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) **40**
5. DISCUSÃO **42**
5.1. Indução da Resistência à Vancomicina por Passagem Seriada **41**
5.2. Avaliação do Perfil de Resistência das Bactérias Analisadas **41**
5.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) **43**
5.4. Curvas de Tempo Morte **45**
5.5. Efeito Pós Antibiótico (EPA) **46**
5.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão **47**
5.7. Identificação dos Genes de Resistência à Vancomicina por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) **48**
6. CONCLUSÕES **50**
7. REFERÊNCIAS **51**
8. ANEXOS **64**

EPÍGRAFE

"I like the scientific spirit—the holding off, the being sure but not too sure, the willingness to surrender ideas when the evidence is against them: this is ultimately fine—it always keeps the way beyond open—always gives life, thought, affection, the whole man, a chance to try over again after a mistake—after a wrong guess."

– Walt Whitman

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado a vida e por me mostrar todos os dias que sou protegida e guiada.

À minha mãe, Ana Regina, por ser a minha melhor amiga, meu porto seguro, por me amar de forma incondicional e nunca me deixar desistir, sempre me fazendo sentir capaz de superar qualquer adversidade. Sem você, eu nada seria.

Ao meu pai, Carlos, por ter me recebido de braços abertos todas as vezes que eu falhei, por ter me dado os melhores ensinamentos sobre honestidade e caráter, e sempre ter me dado liberdade e apoio para escolher o caminho que me fizesse feliz e realizada.

Ao meu irmão amado, Diogo, a pessoa mais iluminada que já conheci. Meu guia e anjo da guarda em forma de gente.

Ao meu querido orientador Professor Doutor Marcelo Brocchi, um grande amigo, que me ensina a ser uma pesquisadora, profissional e

pessoa cada dia melhor. Muito obrigada por todos esses anos de confiança em mim e no meu trabalho. Que venham muitos outros anos!

À minha co-orientadora, Doutora Bruna de Araújo Lima, por tudo o que ela se tornou pra mim. Uma amiga, confidente, psicóloga, que me ajudou sempre que eu precisei.

À Universidade Estadual de Campinas e ao Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, este último representado pelo Coordenador, Prof. Dr. Marcelo Menossi e pela secretária, Lourdes Fagundes, por terem me dado a oportunidade de seguir meus estudos na área em que me apaixonei durante a minha graduação.

Às agências de fomento, CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro dado para que esta pesquisa pudesse ser realizada.

À todos os docentes que participaram tanto da minha qualificação quanto da banca prévia: Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira, Prof.

Dr. Marcelo Lancellotti, Profa. Dra. Cristina Elisa Alvarez Martinez e Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck, pelas sugestões e ideias que com certeza enriqueceram este trabalho.

Aos componentes da minha banca examinadora de defesa de tese: Profa. Dra. Cristina Elisa Alvarez Martinez, Prof. Dr. Gerson Nakazato, Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino e Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira.

Aos professores responsáveis pelas disciplinas cursadas nestes dois anos de mestrado, pelo compartilhamento de conhecimento que contribuiu de forma efetiva para a minha formação acadêmica durante este período.

Aos técnicos do nosso laboratório, Evandro Luis e Sandra Martins, pelo suporte visando tornar as atividades do dia a dia mais simples e estruturadas. Além disso, agradeço também a todos os funcionários que conviveram comigo durante este período, sempre me tratando de maneira muito respeitosa e gentil.

Aos meus colegas de laboratório que estão comigo diariamente: Aline Parolin, Bruna Leite, Camila Pinheiro, Catierine Werle, Diego Nóbrega, Fernanda Luz, Fernanda Moraes, Guilherme Milanez, Jacqueline Boldrin, Juliana Pastorello, Luciana Antoniassi, Meiriele Neves e Tamires Cordeiro. Também agradeço à Marina Gilioli, por tudo o que me ajudou durante o seu período de estágio no laboratório. Cada um de vocês, à sua maneira, me ensinou algo de bom que levarei pro resto da minha vida.

Aos meus queridos amigos, meus irmãos de vida: Giovana Piva, Mayara Maróstica, Jaqueline Previdelli, Bruno Nunes, Ingrid Onofri, Karina Diniz, Pâmela Araújo, Daniel Lobo, Tseng Lei Ti, Gabriel Feltran, Renan Peixinho, Diogo de Oliveira... Vocês fazem os meus dias melhores, muito obrigada por serem a família que eu escolhi para mim!

Enfim... À todos aqueles que fizeram parte da minha vida e deixaram sua marca nela nos últimos dois anos, o meu agradecimento mais profundo!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da violaceína (Adaptado de Rettori & Duran, 1998).

Figura 2. Curvas de tempo-morte das linhagens de *S. aureus* VISA V7 (A) e V15(B) tratadas com concentração inibitória mínima (2,15µg/mL) de violaceína. Os dados são referentes ao tempo de crescimento (horas) plotado por Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL.

Figura 3. Curvas de tempo-morte das linhagens de *S. aureus* HVISA HV27 (A) e HV138 (B) tratadas com violaceína na concentração inibitória mínima (2,15µg/mL). Os dados são referentes ao tempo de crescimento (horas) plotado por Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL.

Figura 4. Curva de tempo-morte da linhagem de *B. subtilis* PY79 tratada com violaceína na concentração inibitória mínima (1,07µg/mL). Os dados foram plotados por tempo de crescimento (horas) por Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL.

Figura 5. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão das linhagens de *S. aureus* VISA V7 e HVISA HV138. A e B são bactérias isoladas de culturas controle (sem tratamento) de V7 e HV 138, respectivamente. Já C e D correspondem às linhagens V7 e 138, respectivamente, tratadas com violaceína em uma concentração equivalente à 2 x CIM (4.3µg/mL). As imagens F e G correspondem à linhagem V7, tratada (fotomicrografia F) e controle (fotomicrografia G). As imagens A, B, C e D foram capturadas com aumento de 100.000x, enquanto que as F e G foram capturadas com aumento de 60.000x.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens bacterianas utilizadas no presente trabalho.

Tabela 2. Antibióticos utilizados para a determinação do perfil de resistência das bactérias avaliadas neste trabalho.

Tabela 3. Perfil de resistência a antibióticos de linhagens de *Staphylococcus aureus* e de *Bacillus subtilis* PY79 utilizadas neste estudo. *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como linhagem controle nesses testes.

Tabela 4. Valores de CIM de vancomicina para linhagens avaliadas

Tabela 5. Valores de CIM e CBM de violaceína para linhagens avaliadas.

Tabela 6. Efeito pós-antibiótico sobre as linhagens VISA, HVISA e B. subtilis PY79 em diferentes concentrações de violaceína.

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	micrograma
µl	microlitro
µm	micrometro
ATCC	*American Type Culture Collection*
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory *Standards Institutes*
DAP	daptomicina
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico gênomico
DO	densidade óptica
EPA	efeito pós-antibiótico
et al.	e outros (de et alli)
FICI	índice de combinação inibitória fracionada
hr	*hora*
HVISA	Staphylococcus *aureus* com heterorresistência à vancomicina
IDSA	The Infectious Disease *Society of America*
Kb	Quilo pares de bases ou quilo bases
L	litro
M	molar
MDR	*multidrug-resistant*
MET	microscopia eletrônica de transmissão
mg	*miligrama*
MH	Müeller-Hinton
mL	mililitro
mm	milímetro
MRSA	*Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

nm	nanômetros
ºC	grau Celsius
OsO4	tetróxido de ósmio
PBP	Penicilin Binding Protein
PCR	reação em cadeia de polimerase
rpm	rotações por minuto
SCCmec	*staphylococcal cassette chromosome mec*
SDC	sistema de dois componentes
UI	unidades internacionais
UFC	unidades formadoras de colônia
VISA	*Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina
VRE	*Enterococcus* resistentes à vancomicina
VRSA	*Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina

1. INTRODUÇÃO

1.1. Resistência Bacteriana à Antimicrobianos

A descoberta e subsequente uso comercial de antibióticos inauguraram uma nova era para a humanidade, na qual patógenos de longa data, que representavam sérios riscos à saúde humana, passaram a ser controlados. Com o passar do tempo, a plasticidade genética e fisiológica bacteriana prevaleceu, o que promoveu o surgimento de linhagens resistentes de diversos patógenos (humanos, inclusive), e a resistência apresentada por estes se espalhou.

Devido ao problema crescente da resistência bacteriana, tornou-se necessária a implementação de definições para descrever e classificar os diferentes níveis dessa resistência aos agentes antimicrobianos, para facilitar a troca de dados epidemiológicos entre diferentes regiões de um mesmo país ou, até mesmo, entre diferentes países. Portanto, três designações principais foram definidas para classificar algumas bactérias - *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. - com alto grau de resistência: multirresistentes, extremamente resistentes (também chamadas de amplamente resistentes) e as pan-resistentes (Magioraklos et al., 2011).

Dessa forma, são consideradas bactérias multirresistentes aquelas que apresentam resistência a três ou mais diferentes classes de antibióticos (concluídos a partir da realização de testes *in vitro*). Já as amplamente resistentes apresentam resistência a quase todas as classes, sendo sensível no máximo a duas delas, enquanto que as pan-resistentes são resistentes a todos os agentes antimicrobianos. Para se assegurar a classificação de uma bactéria como pan-resistente, esta precisa ser testada e detectada como resistente a todos os antimicrobianos aprovados atualmente para uso (Magioraklos et al., 2011, Falagas, 2008).

Em relação às infecções por bactérias resistentes, o Brasil carece de muitos dados epidemiológicos, o que não nos permite avaliar de maneira global o panorama nacional do número de mortes por estas infecções, uma vez que os hospitais não são obrigados a notificar ao governo federal (Ministério da Saúde) tais casos e nem se a doença causou a morte do paciente. O Centro de Controle de Doenças (do inglês, CDC) dos Estados Unidos divulgou um relatório com os dados relativos ao número de mortes por infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos neste país no ano de 2013. Neste documento, foi divulgado que 23.000 pessoas sucumbiram à este tipo de infecção durante este ano. Tal dado serve como ferramenta para ilustrar a gravidade deste que deve ser considerado um sério problema de saúde pública (Centro de Controle e Prevenção de Doenças, 2013).

1.2. *Staphylococcus aureus*: Características, Patogenicidade Resistência

Staphylococcus aureus são cocos Gram-positivos, isolados pela primeira vez na década de 1880 e atualmente incluem 49 espécies e 26 subespécies (da Motta et al., 2014). Seu diâmetro varia entre 0,5 e 1,5µm, não formam esporos e são anaeróbias facultativas - com exceção de *Staphylococcus anaerobius*. Algumas espécies são produtoras de enterotoxinas, como por exemplo o superantígeno toxina-1 do choque tóxico estafilocócico (conhecida como a sigla TSST-1) (Bannerman, 2003). Estas bactérias também apresentam-se divididas de acordo com a sua capacidade de coagular o plasma sanguíneo (reação de coagulase). Os estafilococos coagulase positiva são normalmente as espécies mais patogênicas e os negativos são geralmente comensais, sendo que algumas espécies podem ser infecciosas. (Foster, 1996). Seu genoma apresenta entre 2.700 e 2.800 Kb, com conteúdo GC de aproximadamente 33% (Młynarczyk et al., 1998).

Uma propriedade biológica fundamental de *S. aureus* é a sua habilidade de colonizar assintomaticamente indivíduos saudáveis. Aproximadamente 30% dos humanos são carreadores nasais assintomáticos destas bactérias, sendo que estes apresentam altos riscos de desenvolver infecções, além de serem fontes de transmissão para outras pessoas (Brown et al., 2014). As vias aéreas são os principais reservatórios primários de *S. aureus*, no entanto são passíveis de serem encontradas em todos os micronichos do corpo humano, incluindo trato respiratório, gastrointestinal, sistema genitourinário e pele (Švec et al., 2010; Hauschild & Stepanovic, 2008). A principal via de transmissão de *S. aureus* é o contato direto (pele-a-pele), no entanto o contato com superfícies e objetos contaminados também pode ocorrer. Além disso, a presença de bactérias parece estar relacionada com a colonização de outras áreas do corpo, por transferência pelas mãos (Chambers & DeLeo, 2009).

S. aureus pode ser uma bactéria comensal ou um patógeno oportunista. Isso porque a colonização nasal geralmente persiste, muitas vezes por longos períodos de tempo, o que representa uma pré-disposição para doenças futuras, como por exemplo doenças de pele e tecidos moles, podendo também causar quadros mais graves como bacteremia e sepse. Esta bactéria é causadora de doenças em animais, como a mastite bovina, e de uma enorme gama de doenças em humanos, incluindo patologias causadas por toxina (como gastroenterites e síndrome do choque tóxico), cutâneas (como foliculites, impetigo, furúnculos e síndrome da pele escaldada) e doenças mais graves (como bacteremia, endocardite, pneumonia e osteomielite). Estes fatores, associados à ubiquidade, fazem de *S. aureus* um dos principais agentes causadores de infecções nosocomiais e na comunidade (Brown et al., 2014; Foster, 2004; Banneman, 2003).

O gênero *Staphylococcus sp* representa uma combinação preocupante de resistência e patogenicidade. *S. aureus* produz uma gama de diferentes fatores de patogenicidade incluindo proteínas de superfície que promovem a aderência e danos a tecidos, sistemas de escape do sistema imune (incluindo proteínas específicas e uma cápsula de polissacarídeos) e uma série de toxinas que causam danos e destroem células e tecidos, atuando como enzimas citolíticas ou superantígenos (Brown et al., 2014; Foster 2004; Lowy, 1998).

A resistência a antibióticos agrava a situação. Até o ano de 1940, no qual a penicilina foi introduzida como droga para o tratamento de doenças causadas por *S. aureus*, a taxa de mortalidade por estas infecções era de aproximadamente 80% (Chambers & DeLeo, 2009). Após o início da utilização deste antibiótico, tais infecções passaram a ser controladas. No entanto, dois anos após a introdução deste medicamento, foram isoladas as primeiras linhagens resistentes à penicilina. O mecanismo baseou-se na aquisição de um plasmídeo que contem um gene (*blaZ*) capaz de codificar a produção de uma enzima (penicilinase) que hidrolisa o anel beta-lactâmico da molécula de penicilina, fazendo com que esta perca sua atividade (Olsen et al., 2006). Esta resistência se espalhou rapidamente, sendo que em 1960, oitenta por cento dos *S. aureus* isolados apresentavam resistência a este antibiótico e esta porcentagem já representa 90% dos isolados (Chambers & DeLeo, 2009; Olsen et al., 2006).

Em 1959, no Reino Unido, a meticilina foi introduzida no mercado para o tratamento de infecções por *S. aureus* resistentes à penicilina, tendo como diferencial a capacidade de não ter a atividade perdida pela ação das penicilinases. Porém, apenas dois anos após o início da utilização da meticilina para estes tratamentos, foram descritos na Europa os primeiros casos de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA, do inglês

methicillin- resistant Staphylococcus aureus). Esta resistência é de origem cromossômica e conferida por uma proteína denominada PBP2a - proteína de ligação à penicilina 2a - que apresenta diminuição da afinidade aos beta-lactâmicos. A PBP2a é codificada pelo gene *mecA* que é carregado por um grande elemento genético integrado ao cromossomo de amostras MRSA, designado Cassete Cromossômico Estafilocócico *mec* (SCC*mec,* do inglês *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*) (Chambers & DeLeo, 2009).

Atualmente, são descritos 11 tipos de SCC*mec*, designados como tipos I a XI (Vossenkuhl et al., 2014). Estes diferem entre si principalmente pelo complexo de genes *ccr* e *mec*, os dois elementos mais importantes do cassete, responsáveis pela integração e excisão do SCC*mec* e pelo fenótipo de resistência a beta-lactâmicos, respectivamente (International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements, 2009).

A vancomicina, um antibiótico da classe dos glicopeptídeos, passou a partir de 1958 a ser utilizado em infecções por bactérias Gram-positivas e até hoje representa uma alternativa no tratamento de uma variedade de micro-organismos, especialmente *S. aureus* resistentes à meticilina (Howden et al., 2010). Ela atua interferindo na síntese de parede celular bacteriana, especificamente na etapa de transpeptidação, por ligar-se ao terminal D-Ala-D-Ala dos precursores de peptidoglicano, também chamado de peptidoglicano imaturo (Kwun et al., 2013; Hong et al., 2008).

Em 1997 no Japão foram relatadas as primeiras linhagens apresentando redução na suscetibilidade à vancomicina, descritas como VISA (*Staphylococcus aureus* com resistência intermediária à vancomicina) e *S. aureus* com heterorresistência intermediária à vancomcina (HVISA) (Hiramatsu et al., 1997). No Brasil, os primeiros isolados VISA

foram descritos em amostras hospitalares no ano de 2001 (Oliveira et al., 2001). Não há uma definição precisa para HVISA , entretanto, estas células são consideradas uma subpopulação com diminuição da suscetibilidade à vancomicina em meio a *S. aureus* sensíveis a este antibiótico (Howden et al., 2010).

A redução da suscetibilidade à vancomicina para estas bactérias se dá por dois mecanismos principais. O primeiro consiste em um aumento da síntese de peptidoglicano, o que gera um espessamento da parede e dificulta a chegada da vancomicina ao seu alvo (septo de divisão). Além disso, há nestas células uma diminuição das ligações cruzadas do peptidoglicano, o que leva à exposição dos resíduos D-Ala-D-Ala do peptidoglicano maduro, tornando-os disponíveis para se ligarem à vancomicina, atuando como falsos alvos e impedindo que as moléculas da droga alcancem o seu verdadeiro alvo - peptidoglicano imaturo - presente na membrana plasmática (Hiramatsu et al., 2014; Lowy et al., 2003; Vidaillac et al., 2013).

Em relação às bases genéticas do nível intermediário de resistência à vancomicina, a aquisição do fenótipo VISA parece ser um processo de várias etapas. No entanto, basicamente os mesmos genes encontram-se frequentemente identificados em diversas linhagens desse tipo ao redor do mundo (Howden et al., 2010). Associações entre este fenótipo e mutações nos sistemas de dois componentes (SDC) *graRS* e *vraRS* têm sido demonstradas em vários estudos. Recentemente, mutações no sistema de dois componentes *walKR* também foram identificadas como responsáveis por uma grande parte dos fenótipos VISA (McEvoy et al., 2013; Howden et al., 2011).

Um sistema de dois componentes é um mecanismo de transdução de sinal, presente em diversos organismos. O sistema de dois componentes *graRS* está envolvido com a suscetibilidade da bactéria à peptídeos antimicrobianos catiônicos - muitos deles

produzidos como resposta do sistema imune contra proliferação de micro-organismos - e alguns antibióticos, dentre eles a vancomicina, através da regulação de dois fatores (*dlt* e *mprF*) que influenciam na carga da superfície celular bacteriana (Falord et al., 2011). Já o SDC *vraSR* regula inúmeros genes, alguns necessários à síntese de parede celular como por exemplo o gene *murZ*, responsável pela biosíntese do monômero precursor de peptidoglicano (Galbusera et al., 2011; Kuroda et al., 2004). O sistema de dois componentes *wakKR* está relacionado também com o controle do metabolismo da parede celular, especialmente do peptidoglicano, além de regular a expressão do gene da autolisina na bactéria (McEvoy et al., 2013; Howden et al., 2011).

Já o fenótipo resistente à vancomicina foi relatado pela primeira vez nos Estados Unidos, no ano de 2002 (Centro de Controle e Prevenção de Doenças Infecciosas -CDC, 2002), e é gerado pela aquisição do gene *vanA* de *Enterococcus* spp. (Perichón & Courvalin, 2009). O mecanismo de resistência está relacionado com a alteração do terminal D-Ala-D-Ala para D-Ala-D-Lac no peptidoglicano, o que resulta na queda da afinidade da vancomicina por este terminal em mais de 1000 vezes, por gerar uma interação repulsiva entre a molécula e o seu alvo. É importante destacar que este novo precursor é sintetizado apenas na presença de vancomicina (mesmo que em baixas concentrações), o que permite a continuação da montagem do peptidoglicano (Gardete & Tomasz; 2014; Xie et al., 2011; Lowy et al., 2003).

Em relação às terapias alternativas, muitos estudos relacionados com o desenvolvimento de vacinas para *S. aureus* encontram-se em andamento. No entanto, nenhuma vacina anti-estafilocócica já foi desenvolvida com êxito. Um importante obstáculo para a produção vacinal é a evidência clínica da capacidade de evasão do sistema

imune por estas bactérias (DeDent et al., 2012). Além disso, outra terapia amplamente estudada é o uso de fagos para o tratamento de infecções por *S. aureus*. Muitas delas mostraram resultados promissores no tratamento *in vitro* de diversas doenças em humanos, como por exemplo infecções oculares e pulmonares. Entretanto, alguns fatores impedem atualmente a expansão desta estratégia para o tratamento de infecções bacterianas, sendo o primeiro deles a possibilidade de transferência horizontal de genes por fagos lisogênicos e as possíveis interações com o sistema imune do paciente, que podem reduzir a eficácia desta abordagem terapêutica por conseguir inativar os fagos presentes na circulação e, no caso de outras complicações mais graves, a possibilidade de ocorrência de uma reação alérgica (Kaźmierczak et al., 2014). Dessa forma, a terapia antibiótica ainda continua sendo o principal recurso no tratamento de infecções por *S. aureus*.

1.3. Características de *Bacillus subtilis*

Outra bactéria Gram-positiva amplamente estudada é *Bacillus subtilis*, um micro-organismo aeróbio facultativo, formador de esporos e que habita o solo. Apesar de não ser patogênica, tal bactéria é capaz de causar deterioração em alimentos. O genoma desta bactéria contem 4.215 Kb e aproximadamente 4107 genes, com 43,5% de conteúdo G+C. No aspecto celular, *B. subtilis* apresenta uma espessa camada de peptidoglicano ao redor da membrana citoplasmática, o que confere um proteção significativa contra a ruptura destas células (Wahome, 2008).

Devido ao grande número de informações a respeito desta bactéria e seus diversos processos metabólicos e genéticos, *B. subtilis* tem sido utilizado como um típico representante de bactérias Gram-positivas, por fornecer informações que auxiliam na

compreensão de diversos aspectos da biologia deste grupo de bactérias, assim como *Escherichia coli* atua para as Gram-negativas (Madan Babu, 2013). Estas bactérias são também amplamente estudadas como um modelo de exploração de novos tratamentos farmacológicos para alguns patógenos importantes com os quais são relacionados como *Bacillus anthracis* e bactérias do gênero *Staphylococcus*, como por exemplo *S. aureus*, e também alguns outros com os quais relacionam-se de maneira mais distante, como por exemplo *Clostridium botulinum* e *Streptococcus pneumoniae* (Henry et al., 2009).

A enorme capacidade adaptativa de *B. subtilis* à injúrias e alterações ambientais fez com que este organismo se destacasse tanto na natureza quanto em aplicações industriais. Isso porque sua adaptabilidade à engenharia genética (devido a fatores como por exemplo o desenvolvimento de um estado competente) e sua ampla capacidade fermentativa em larga escala fizeram com que esta bactéria passasse a ser amplamente utilizada na indústria. Dentre os produtos gerados por *B. subtilis*, estão principalmente enzimas (amilase e proteases), antibióticos e inseticidas (Van Dijl & Hecker, 2013).

1.4. Novos Antimicrobianos

Dado o panorama grave de resistência bacteriana a drogas apresentado, destaca-se a necessidade de pesquisa, descoberta e desenvolvimento de substâncias que se apresentem eficazes no tratamento de doenças bacterianas. Nos últimos 50 anos, o desenvolvimento de novos antibióticos baseou-se essencialmente em mudanças estruturais daquelas moléculas que já haviam sido descobertas, principalmente durante os anos de 1940 e 1950, conhecidos como “Anos de ouro da descoberta de produtos antibióticos naturais”. Porém, esforços também devem ser concentrados no sentido de retomar o isolamento de produtos naturais

com atividade antibiótica, a partir de fontes microbiológicas. A principal vantagem desta nova descoberta seria a ampliação da possibilidade destas moléculas apresentarem mecanismos de ação diferentes daquelas atualmente conhecidas, o que contribui para o aumento nas chances de combate às bactérias multi-resistentes. (Roemer et al., 2012; Clardy et al., 2006).

Devido à necessidade urgente da descoberta e desenvolvimento de novos antimicrobianos, a Sociedade de Doenças Infecciosas dos Estados Unidos (IDSA-Infectious Diseases Society of America) criou no ano de 2010 a "Iniciativa 10 x 20", com o intuito de estimular a pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos, e que teve apoio de associações, fundações e sociedades de diversos países. Tal iniciativa consistiu na criação de uma ação global de pesquisa e desenvolvimento de antimicrobianos, visando o desenvolvimento de 10 novos antibióticos seguros e efetivos até o ano de 2020 (Infectious Diseases Society of America, 2010).

De acordo com o documento deste órgão, a iniciativa foi implementada devido ao fato de que desde a década de 90, muitas empresas abandonaram a pesquisa e desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas. Este abandono ocorreu principalmente devido a uma mudança de foco na pesquisa por parte destas empresas, uma vez que atualmente os recursos e esforços estão concentrados principalmente na pesquisa de drogas para serem utilizadas no tratamento de doenças crônicas, cujos lucros após estes medicamentos serem colocados no mercado são maiores do que os provenientes da venda de antibióticos (Infectious Diseases Society of America, 2010).

1.5. Violaceína

Nesse sentido, um deste produtos a ser explorado é a violaceína, um pigmento roxo formado a partir da condensação de duas moléculas de triptofano. Este pigmento consiste em um derivado indólico caracterizado como [3-(1,2-diidro-5-(hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-ilideno)-1,3-diidro-2H-indol-2-ona] e sua molécula encontra-se ilustrada na Figura 1. A violaceína é produzida por diversas bactérias ambientais, incluindo *Chromobacterium violaceum*, *Collimonas* sp., *Duganella* sp., *Janthinobacterium lividum* and *Pseudoalteromonas* spp. (Duran and Menck, 2001; Ballestriero et al., 2014).

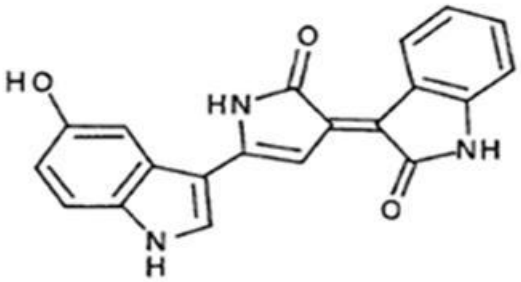


Figura 1. Estrutura química da violaceína (C20H13O3N3) (Adaptado de Rettori & Duran, 1998).

Mesmo com a produção da violaceína por diversas bactérias, a função exata desta molécula na fisiologia de tais células ainda não foi completamente elucidada. Alguns estudos descrevem que a violaceína atua na resistência ao estresse oxidativo (em *C. violaceum*), defesa antifúngica em anfíbios (produção por *J. lividum*) e anti-predadores contra protozoários em ruminantes (*Pseudoalteromonas tunicata*) (Ballestriero et al., 2014).

Apesar da não compreensão da função da violaceína para as bactérias produtoras, este pigmento tem sido estudado devido o seu amplo espectro de ações biológicas, incluindo atividade antiulcerogênica (Duran et al., 2003), antiparasitária (*Tripanosoma*, *Leishmania* e *Plasmodium*) (Duran and Menck, 2001; Leon et al., 2001; Lopes et al., 2009), antioxidante (Konzen et al*.,* 2006), antiviral (Andrighetti-Fröhner et al*.*, 2003) e antitumoral (de Azevedo et al*.*, 2000).

A atividade antimicrobiana da violaceína já foi descrita há décadas (Lichstein and Van De Sand, 1946; Mose and Potsch, 1954). No entanto, ao longo do tempo a sua atividade antimicrobiana não foi amplamente explorada. Resultados prévios do nosso grupo indicaram que a violaceína apresenta uma expressiva capacidade inibitória para *S. aureus* (dados não publicados). Recentemente, sua propriedade antimicrobiana foi descrita para *S. aureus* isolados de mastite bovina (Cazoto et al., 2011). Além disso, Subramaniam e colaboradores (2014) exploraram o efeito sinérgico da violaceína com outros princípios ativos contra diferentes espécies de bactéria, mas somente uma linhagem de *S. aureus* foi utilizada neste estudo e, além disso, como aqui demonstrado, a concentração inibitória apresentada por aqueles autores foi muito maior do que a observado por nós no presente estudo. Portanto, destaca-se a necessidade de maior compreensão da atividade da violaceína para estas bactérias, especialmente aquelas que apresentam-se resistentes à drogas já utilizadas na terapêutica.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

- Avaliação da atividade da violaceína para linhagens de *Staphylococcus aureus* que apresentam suscetibilidade reduzida à vancomicina (linhagens VISA e HVISA).

2.2. ESPECÍFICOS

- Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de violaceína sobre amostras VISA e HVISA;

- Análise dos efeitos da violaceína sobre as bactérias tratadas com este antimicrobiano (com e sem remoção do tratamento), ao longo do tempo, através da realização de curva de tempo-morte e efeito pós-antibiótico;

- Avaliar as possíveis alterações morfológicas nas células tratadas com violaceína por Microscopia Eletrônica de Transmissão;

- Avaliar a ação antimicrobiana da violaceína para uma linhagem tipo de *Bacillus subtilis*, micro-organismo modelo para bactérias Gram-positivas, abrindo perspectivas para a realização de estudos mais aprofundados do mecanismo da violaceína.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. VIOLACEÍNA

As amostras de violaceína utilizadas neste trabalho foram provenientes da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), que a obtém e purifica a partir da bactéria *Jantinobacterium lividum.* Os frascos utilizados durante o trabalho foram provenientes do lote número 118K4041 e apresentam pureza ≥ 98%, de acordo com o certificado de análise, que pode ser visualizado no Anexo 1. A violaceína foi ressuspendida em dimetilsulfóxido (DMSO) puro, até se obter uma solução estoque com concentração de 20 mM.

3.2. MICRO-ORGANISMOS

Para a avaliação da atividade da violaceína, foram utilizadas as linhagens bacterianas descritas na Tabela 1. Tais linhagens correspondem a uma linhagem tipo utilizada em alguns ensaios como controle, quatro cepas que apresentam suscetibilidade reduzida à vancomicina, e uma linhagem de *B. subtilis*. É importante destacar que esta última linhagem foi incluída em todos os testes uma vez que devido ao grande número de informações a respeito da sua genética e seu metabolismo, *B. subtilis* é considerado um organismo modelo de desenvolvimento de sistemas biológicos e de exploração de novos tratamentos farmacológicos (Goezeler et al., 2008; Mäder et al, 2012).

Tabela 1. Linhagens bacterianas utilizadas no presente trabalho.

Linhagem	Procedência
Staphylococcus aureus	
25923	Linhagem-tipo[1]
V7	VISA[2]
V15	VISA[2]
HV27	Hetero VISA[2]
HV138	Hetero VISA[2]
Bacillus subtilis	
PY79	Linhagem Padrão[3]

Legenda:

1. ATCC – American Type Culture Collection. Cedida pela Fundação Oswaldo Cruz

2. VISA e hetero-VISA – *S. aureus* resistência intermediária a vancomicina. Linhagens pertencentes à coleção de culturas da Profa. Dra. Elsa Masae Mamizuka (Depto. de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP Brasil).

3. Linhagem gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Frederico José Gueiros Filho (Depto. De Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo/SP Brasil).

3.3. CULTIVO BACTERIANO

Os meio de cultura de rotina utilizado foi o meio Muller Hinton (MH) caldo ou Agar MH (1,5%), da marca Oxoid. Culturas líquidas foram crescidas a 37ºC sob agitação (150 rpm) e culturas em placas foram também crescidas a 37ºC em aerobiose. O antibiótico vancomicina, quando necessário ser adicionado aos meios de cultura, foi utilizado nas concentrações de 1, 3, 5, 7 e 9 μg/mL.

3.4. INDUÇÃO DA RESISTÊNCIA À VANCOMICINA POR PASSAGEM SERIADA

A passagem seriada foi realizada visando realizar uma pressão seletiva sobre as bactérias com suscetibilidade reduzida à vancomicina, podendo também ativar mecanismos de resistência que por ventura encontrem-se presentes em seu genoma. Este ensaio foi

realizado na presença de concentrações crescentes de vancomicina, baseado na metodologia descrita por Shoji et al, 2011, com adaptações**.** As linhagens VISA e HVISA foram semeadas em placas contendo concentrações crescentes deste antibiótico - 1, 3, 5, 7 e 9μg/mL - presentes em placas de Agar MH, conforme citado em 3.3. A cada plaqueamento, as placas foram incubadas a 30ºC por 24 horas e uma colônia isolada de cada linhagem ali crescida foi transferida para a placa seguinte. Este ensaio foi realizado com as linhagens VISA e HVISA antes destas bactérias serem utilizadas em todos os outros ensaios posteriormente descritos.

3.5. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA BACTERIANA

O antibiograma das bactérias utilizadas no projeto foi realizado através do método de disco-difusão (método de Kirby-Bauer, 1959), no qual realizou-se o crescimento bacteriano em placas de meio Agar MH, a 37ºC, por 18 horas. Feito isso, foram realizadas diluições desta cultura em tubos contendo solução salina 0,9%, para que a concentração final bacteriana nas suspensões fosse equivalente a 10^8 UFC/mL.

A próxima etapa consistiu na semeadura dessas culturas em placas de Agar MH com o auxílio de um *swab* esterilizado. Em seguida, foram adicionados discos contendo os diferentes antibióticos, de maneira equidistante, para evitar uma possível interferência entre os halos de inibição. Esta cultura foi mantida a 37 ºC por 16-18 horas e após este período os halos de inibição, quando presentes, tiveram seu diâmetro determinando. Por fim, os valores dos halos obtidos foram avaliados a fim de se classificar as bactérias como sensíveis ou resistentes (também denominadas não sensíveis) para cada um dos antibióticos testados, de acordo com as recomendações do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (Cockerill et al, 2013; CLSI, document M 100-517, 2007). Foram utilizados 24

antibióticos, de diferentes classes e normalmente utilizados na terapêutica clínica, sendo que estes e suas respectivas concentrações encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Antibióticos utilizados para a determinação do perfil de resistência das bactérias avaliadas neste trabalho.

Droga	Concentração	Droga	Concentração
Ácido Nalidíxico	30 μg	**Estreptomicina**	10 μg
Amoxicilina	10 μg	**Enrofloxacino**	15 μg
Amoxicilina/ Ácido Clavulâmico	30 μg	**Sulfametoxazol/ Trimetropim**	25 μg
Aztreonam	30 μg	**Gentamicina**	10 μg
Canamicina	30 μg	**Lincomicina**	2 μg
Cefotaxima	30 μg	**Meropenem**	10 μg
Cefoxitina	30 μg	**Oxacilina**	1 μg
Cefpodoxima	10 μg	**Penicilina G**	0,6 μg
Ceftazidima	30 μg	**Eritromicina**	10 μg
Ceftriaxona	30 μg	**Sulfato de colistina**	10 μg
Cloranfenicol	30 μg	**Sulfonamida**	300 μg
Ciprofloxacino	5 μg	**Tetraciclina**	30 μg

μg : micrograma

3.6. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE VANCOMICINA

Um dos principais métodos preconizados pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) é a utilização de antibióticos em fitas, também conhecido como Etest (marca bioMerieux®). Estas fitas apresentam um gradiente predefinido de concentrações de antibiótico na faixa de 0,015 μg/mL a 256 μg/mL, para a maioria dos antibióticos.

As suspensões bacterianas foram produzidas e plaqueadas da mesma forma que em 3.5. Após isto, as fitas contendo vancomicina foram então adicionadas às placas de MH

Agar e estas foram incubadas a 37°C por 48 horas. A CIM foi determinada como a concentração indicada na fita associada a completa inibição do crescimento bacteriano.

3.7. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE VIOLACEÍNA

O método de microdiluição seriada foi utilizado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) da violaceína para as bactérias avaliadas neste estudo conforme padronização para testes de antimicrobianos do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003).

As bactérias foram cultivadas inicialmente em placas de Petri contendo meio Agar MH a 37ºC durante 24 horas, e posteriormente suspendidas em meio MH líquido na concentração de 10^5 células/ mL. Em placas de microdiluição, adicionou-se a violaceína, em concentrações seriadas, diluídas em 50 µL de meio MH líquido e posteriormente foram adicionados 50 µL das suspensões bacterianas. A placa de microdiluição contendo as culturas foi então incubada a 37ºC por 24 horas e a CIM foi determinado como a menor concentração de violaceína capaz de inibir o crescimento visual das linhagens na placa de microdiluição. Todos estes experimentos foram realizados em triplicata e também foi testada a atividade antibacteriana do DMSO (em uma quantidade correspondente à maior concentração utilizada nos poços), para garantir que não houvesse influência do solvente na atividade da violaceína.

3.8. CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DE VIOLACEÍNA

Após a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de violaceína para cada linhagem na placa de microdiluição, o CBM foi determinado através do plaqueamento

de alíquotas (25 µL) das suspensões bacterianas tratadas com violaceína provenientes dos poços nos quais não houve crescimento bacteriano visível. As culturas foram plaqueadas em meio Agar MH e incubadas a 37ºC durante 18 a 24 horas para posterior determinação da UFC (Unidades Formadoras de Colônias). A CBM foi definida como a concentração da droga que resultou na morte de > 99,9% de células em relação à concentração de bactéria que esteve presente nos poços na hora zero (CLSI, 2003, documento M26-A).

3.9. CURVAS DE TEMPO-MORTE

Em complementação ao MIC e MBC, foram realizados experimentos para a determinação de curvas de Tempo-Morte (*time-kill*), a fim de se avaliar a atividade da violaceína sobre as bactérias analisadas ao longo do tempo, em comparação com a cultura controle. Inicialmente, as bactérias foram cultivadas em Agar MH a 37ºC para a obtenção de colônias isoladas. Posteriormente, as colônias foram suspensas em solução salina a 0,9% e esta ajustada ao índice de 0,5 da escala MacFarland (correspondente a $1,5x10^8$ UFC/mL). Diluiu-se então a suspensão em caldo MH para que fosse obtida uma densidade celular de 10^5 UFC/mL. Cada cultura foi tratada com uma concentração correspondente ao seu CIM (determinado anteriormente) de violaceína, correspondendo a 1,07 µg/mL para *Bacillus subtilis* e 2,15 µg/mL para as quatro linhagens com suscetibilidade reduzida à vancomicina. Como controle, foram produzidas em paralelo culturas de cada uma das linhagens avaliadas na qual a violaceína não foi adicionada. As culturas foram cultivadas a 37°C com agitação (150 rpm). Alíquotas de 0,1 mL foram retiradas nos tempos 0, 02, 04, 06, 08, 10 e 12 horas de cada tubo, diluídas em salina (0,9%) esterilizada (diluição seriada) e plaqueadas (25 µL) em Agar MH e as placas foram incubadas por 18 a 24 horas a 37°C para posterior

determinação da UFC/mL. Todos os ensaios de tempo-morte foram realizados em triplicata.

3.10. EFEITO PÓS-ANTIBIÓTICO (EPA)

O EPA foi realizado seguindo a metodologia descrita por Craig e Gudmundsson (1991). O inóculo inicial de 1,0 x 10^6 UFC/mL da bactéria foi adicionado em 5 mL de caldo MH contendo violaceína em concentrações equivalentes a 0.5 x CIM, 1 x CIM e 4 x CIM (1,07; 2,15 e 8,60 µg/mL, respectivamente). As culturas controle não foram expostas à violaceína. Após 2 h de incubação a 37°C, com agitação (150 rpm), as amostras foram diluídas (1:1000) em caldo MH (5 mL) para efetivamente remover a violaceína. Alíquotas (0,1 mL) foram coletadas imediatamente após a diluição (0 horas) e de hora em hora até a observação de turvação do tubo controle. Estas amostras foram então diluídas em solução salina 0,9% e plaqueadas em meio Agar MH. Após 18-24 horas de incubação a 37ºC, contagens de viabilidade (UFC/mL) foram realizadas.

O EPA foi calculado como T-C, em que T é o tempo requerido para que as culturas tratadas cresçam 1 $\log_{10}$ em relação à hora zero e C é o tempo para que a cultura controle cresça também 1 $\log_{10}$. Três replicatas do experimento foram realizadas para verificar a reprodutibilidade dos resultados.

3.11. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Para a realização da microscopia eletrônica de transmissão (MET), as linhagens V7 e HV138 foram semeadas em placas de Agar MH para que fossem obtidas colônias isoladas após 18 a 24 horas de incubação, a 37ºC. Posteriormente, foi produzida uma suspensão bacteriana em solução salina, contendo uma densidade bacteriana de 10^6 UFC/mL, e com esta suspensão foi realizada uma diluição 1:50 em caldo MH. As células foram cultivadas a 37ºC sob agitação de 150 rpm por aproximadamente 5 horas, para que a cultura atingisse a fase exponencial (DO_{600} de ~0.7 to 0.8). A violaceína foi então adicionada na concentração de 2 vezes a CIM (4.3 µg/mL) e incubada por uma hora nas culturas tratadas.

Um volume de 50mL de cada cultura foi sedimentado por centrifugação (11500 x g, 10 min, 25ºC) e ressuspenso por 2 horas em uma solução de 3% de glutaraldeído em 0,1 M de tampão fosfato pH 7.4, a 4°C. Após a fixação, as amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. O precipitado celular foi lavado três vezes com tampão fosfato 0,1 M e estas células foram pós-fixadas com solução de tetróxido de ósmio 1%, neste mesmo tampão, durante 1 hora. Após este tratamento, a solução contendo tetróxido de ósmio foi então removida e o material foi lavado duas vezes com tampão fosfato 0,1 M e, em seguida, as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições e o precipitado foi misturado com gotas de solução de agarose 1,5% em água destilada, sob uma lâmina.

Depois de solidificado, o material foi desidratado com soluções de 50, 70 e 90% de etanol absoluto durante 15 minutos (3 vezes cada) e então tratadas com uma solução de etanol e óxido de propileno (1:1) durante 15 minutos, óxido de propileno (100%) durante 15 minutos, óxido de propileno com resina (1:1) por 4 horas e por fim somente resina

durante 18 horas (resina Epon 812, da marca Electron Microscopy Science). As amostras foram incluídas em resina pura por 72 horas em estufa.

Após trimagem do material, os cortes foram feitos em ultramicrótomo com cortes de 0,5 μm e ultrafino com 600 nm. Posteriormente, estes foram contrastados em acetato de uranila (4%) por 30 minutos e em citrato de chumbo (0,3%) por 03 minutos e depois analisados no Microscópio Eletrônico de Transmissão da marca Zeiss, modelo LEO 906. Tais análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia, na Universidade Estadual de Campinas.

3.12. ATIVIDADE COMBINADA DA VIOLACEÍNA COM ANTIBIÓTICOS COMERCIAIS

Para avaliar possíveis ações combinadas da violaceína com antibióticos comerciais (interação aditiva, indiferente, antagonismo, sinergismo), foi utilizada a metodologia de ensaio de determinação do índice de concentração inibitória fracionada ou FICI, como descrito por Orhan et al.(2005). Inicialmente, as CIMs de todos os antibióticos testados foram determinados separadamente, de acordo com os procedimentos descritos na seção 3.3. Posteriormente, foram realizados os ensaios de interação, nos quais foi realizada a preparação de soluções com concentrações correspondentes a no mínimo o dobro da CIM, tanto para os antibióticos convencionais como para a violaceína. Em seguida, 50 μL de caldo MH foi distribuído em cada poço de placas de microdiluição (contendo 96 poços). O primeiro antibiótico da combinação foi diluído ao longo do eixo vertical, enquanto que a violaceína foi diluída ao longo do eixo horizontal. Um inóculo contendo 10^5 UFC/mL foi preparado em caldo MH e 100 μL deste foi adicionado em cada poço. As placas foram

incubadas a 37°C, durante 24 horas. Os resultados foram interpretados como concentração mínima inibitória da combinação, ou seja, a concentração mínima de violaceína que, quando combinada com uma concentração mínima do segundo (antibiótico), promove inibição do crescimento bacteriano. Por fim, o cálculo do índice de FIC corresponde à seguinte fórmula:

$$FICI = CIM(Vc)/CIM(Vs) + CIM(Ac)/ CIM(As);$$

No qual CIM (Vc) é a concentração mínima inibitória da violaceína usada em combinação com o antibiótico, CIM (Vs) é a concentração inibitória da violaceína, CIM (Ac) é a concentração mínima inibitória do antibiótico usado em combinação com violaceína, CIM (As) é a concentração mínima inibitória do segundo antimicrobiano.

Os valores de FICI são interpretados da seguinte forma: FICI $\leq$ 0.5 = interação sinérgica; 0.5 < FICI $\leq$ 4.0 = indiferente; FICI> 4.0 = interação antagônica (Orhan et al., 2005).

3.13. IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA À VANCOMICINA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Todas as linhagens VISA e HVISA empregadas neste estudo foram avaliadas quanto a presença do gene de resistência à vancomicina (*vanA*). O iniciador usado para a detecção do gene *vanA* apresenta a seguinte sequencia (5´- 3´): P1- GGGAAAACGACAATTGC e P2- GTACAATGCGGCCGTTA, sendo que o fragmento amplificado corresponde a 732 pares de bases (Dutka-Malen et al., 1995).

A reação foi realizada com um ciclo inicial de 3 minutos a 94ºC, seguidos por 30 ciclos de desnaturação (94ºC, 1 minuto), anelamento (54ºC, 1 minuto), e extensão (72ºC, 1 minuto). Após, realizou-se um ciclo de extensão final a 72ºC durante 7 minutos. As amplificações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1,2%.

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA BACTERIANA

As linhagens VISA e HVISA foram submetidas ao teste de suscetibilidade aos antibióticos e seus respectivos perfis de resistência/ sensibilidade e fenótipos de multirresistência foram compilados. Neste teste, *S. aureus* ATCC 25923 foi incluído como linhagem controle, sendo que esta bactéria apresentou-se resistente a 4 diferentes antibióticos (ácido nalidíxico, aztreonam, penicilina G e sulfato de colistina). Além disso, a linhagem de *B. subtilis* também foi avaliada, sendo resistente apenas ao antibiótico lincomicina. Os resultados obtidos encontram-se presentes na Tabela 4 e revelaram que todas as linhagens de *S. aureus* com suscetibilidade reduzida à vancomicina foram classificadas como resistentes para todos os 24 antibióticos avaliados, de diferentes classes. É importante ressaltar que este experimento foi realizado com o intuito de, além da determinação do perfil de resistência das bactérias avaliadas quanto à atividade da violaceína, que os dados obtidos pudessem funcionar como indicativo do mecanismo de ação da violaceína para as linhagens testadas, uma vez que a suscetibilidade concomitante a violaceína e uma ou mais classes de antibiótico poderia indicar um mecanismo de ação e ou alvo celular em comum. No entanto, as linhagens VISA e HVISA foram resistentes a todos (24) os antibióticos testados, não permitindo que algum tipo de correlação pudesse ser realizada.

Tabela 3. Perfil de resistência a antibióticos de linhagens de *Staphylococcus aureus* e de *Bacillus subtilis* PY79 utilizadas neste estudo. *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como linhagem controle nesses testes.

	Antibióticos utilizados neste trabalho																							
Linhagens	**Ácido Nalidíxico 30ug**	**Amoxicilina 10ug**	**Amoxicilina/Ácido Clavulânico 30ug**	**Aztreonam 30ug**	**Canamicina 10ug**	**Cefotaxim 30ug**	**Cefoxitina 30ug**	**Cefpodoxima 10ug**	**Ceftazidima 30ug**	**Ceftriaxona 30ug**	**Cloranfenicol 30ug**	**Ciprofloxacino 5ug**	**Enroloxacino 5ug**	**Estreptomicina 10mcg**	**Eritromicina 15ug**	**Gentamicina 10ug**	**Lincomicina 2ug**	**Meropenem 10ug**	**Oxacilina 1ug**	**Penicilina G 1UI**	**Sulfametoxazol/ Trimetoprim 25ug**	**Sulfato de Colistina 10ug**	**Sulfonamida 300ug**	**Tetraciclina 30ug**
***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S
***Staphylococcus aureus* hVISA HV27**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
***Staphylococcus aureus* hVISA HV138**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
***Staphylococcus aureus* VISA V7**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
***Staphylococcus aureus* VISA V15**	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
***Bacillus subtilis* PY79**	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S

R: resistente

S: Sensível

4.2. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE VANCOMICINA

Inicialmente, foi realizada a determinação da concentração inibitória mínima de vancomicina para as quatro linhagens VISA, sendo que os resultados encontram-se presentes na Tabela 4. Este procedimento foi feito visando a confirmação do fenótipo de resistência intermediária à vancomicina, além de auxiliar também no delineamento do perfil de resistência destas linhagens. A análise da tabela indica que as duas linhagens VISA apresentaram valores maiores de CIM (8 ug/mL) do que as linhagens HVISA (4 ug/mL).

Tabela 4. Valores de CIM de vancomicina para linhagens avaliadas.

Linhagem	CIM (ug/mL)
Staphylococcus aureus	
V7	8
V15	8
HV27	4
HV138	4

4.3. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DE VIOLACEÍNA

Os valores de CIM e CBM de violaceína para as linhagens avaliadas encontram-se presentes na Tabela 5. De acordo com a análise dos dados obtidos, pode-se notar que a violaceína apresenta atividade antimicrobiana contra todas as linhagens avaliadas, com valores de CIM de 2.15 ug/mL para as quatro linhagens de *S. aureus* com resistência intermediária à vancomicina e 1,07 ug/mL para a linhagem de *B. subtilis* PY79. Os valores

de CBM foram o dobro dos encontrados para as concentrações inibitórias mínimas (4,30 ug/mL para as linhagens VISA e HVISA e 2,15 ug/mL para *B. subtilis* PY79).

Experimentos prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram que os valores de CIM e CBM para a linhagem padrão de *Staphylococcus aureus* também utilizada no presente trabalho foram inferiores aos obtidos para todas as bactérias com suscetibilidade reduzida à vancomicina. Isso porque para *S. aureus* 25923, os valores de CIM e CBM foram de, respectivamente, 0,11 e 0,21 ug/mL.

Tabela 5. Valores de CIM e CBM de violaceína para linhagens avaliadas.

Linhagem	CIM(**ug/mL**)	CBM(**ug/mL**)
Staphylococcus aureus		
V7	2,15	4,30
V15	2,15	4,30
HV27	2,15	4,30
HV138	2,15	4,30
Bacillus subtilis		
PY79	1,07	4,30

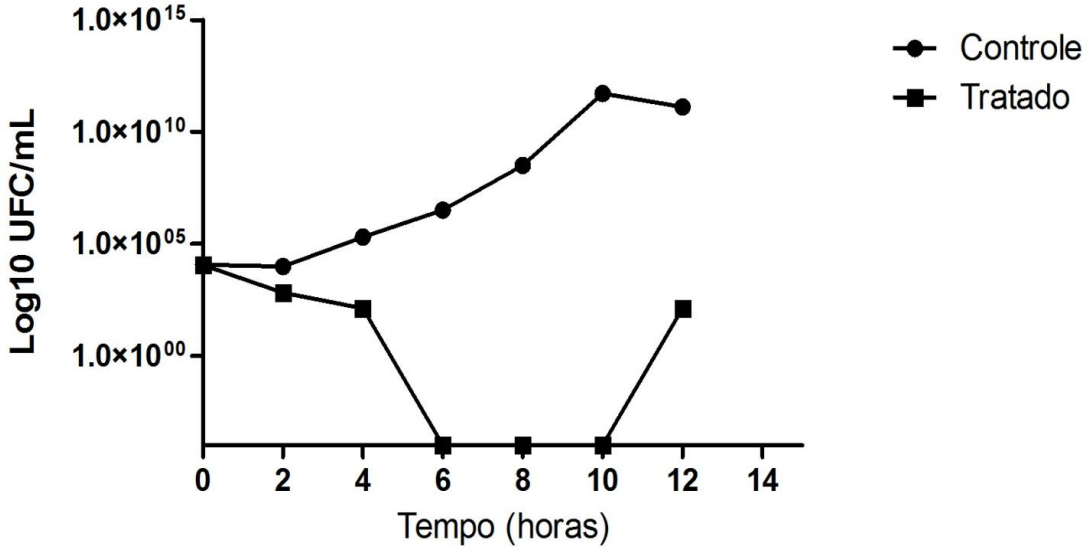
4.4. CURVAS DE TEMPO-MORTE

Este ensaio foi realizado com o intuito de se avaliar o comportamento das bactérias tratadas com violaceína ao longo do tempo, em comparação com a cultura controle. Dessa forma, as Figuras de 2 a 4 correspondem aos gráficos representativos dos experimentos realizados em triplicatas para a determinação das curvas de tempo-morte obtidas das quatro linhagens VISA e da linhagem de *Bacillus subtilis* PY79. A observação dos gráficos nos

permite notar diferenças entre os perfis de crescimento/morte das bactérias tratadas e seus respectivos controles. Isso porque, de acordo com a análise dos gráficos, há a redução de vários *logs* nas culturas tratadas com violaceína, em relação ao controle. Estas observações indicam o efeito inibitório da violaceína sobre as linhagens avaliadas.

Além disso, outra observação importante que se depreende da análise destas curvas é que houve diferença de crescimento entre as linhagens perante o tratamento com violaceína. As linhagens HV27, V7 e V15 foram capazes de retornar o crescimento bacteriano após 12 horas em culturas com violaceína (Figuras 2A e B e 3A). Por outro lado, para *B. subtilis* PY79 e *S. aureus* HV138 não foram detectadas unidades formadoras de colônias após 2 e 8 horas de crescimento na presença desta droga, respectivamente (Figuras 3B e 4). Observa-se assim que todas as linhagens testadas mostraram-se suscetíveis a violaceína sendo que *B. subtilis* apresentou a maior suscetibilidade, uma vez que a partir de 2 horas de cultura na presença deste antibiótico já não foi observado crescimento bacteriano e esse comportamento permaneceu desta forma durante todo o experimento.

A.


1.0×10^15
1.0×10^10
1.0×10^05
1.0×10^00
Log10 UFC/mL
0
2
4
6
8
10
12
14
Tempo (horas)
Controle
Tratado

B.

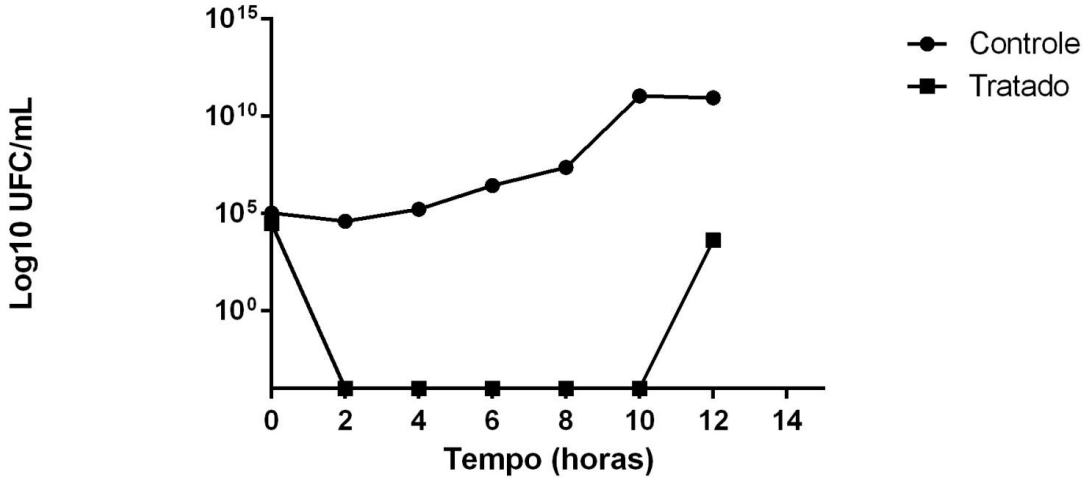
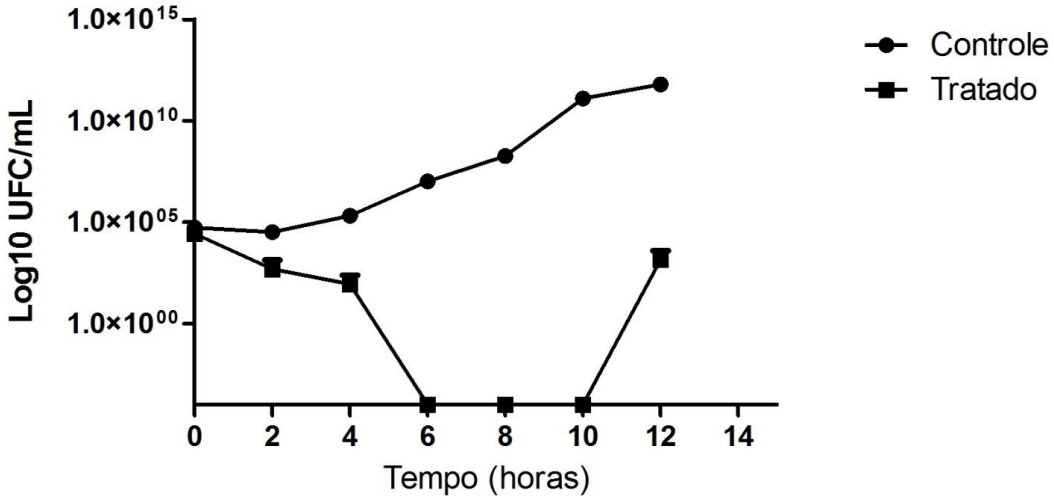


Figura 2. Curvas de tempo-morte das linhagens de *S. aureus* VISA V7 (A) e V15 (B) tratadas com concentração inibitória mínima (2,15µg/mL) de violaceína. Os dados são referentes ao tempo de crescimento (horas) plotado por Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL. Cada um dos gráficos é representativo de uma triplicata.

A.


1.0×10^15
1.0×10^10
1.0×10^05
1.0×10^00
Log10 UFC/mL
0
2
4
6
8
10
12
14
Tempo (horas)
Controle
Tratado

B.

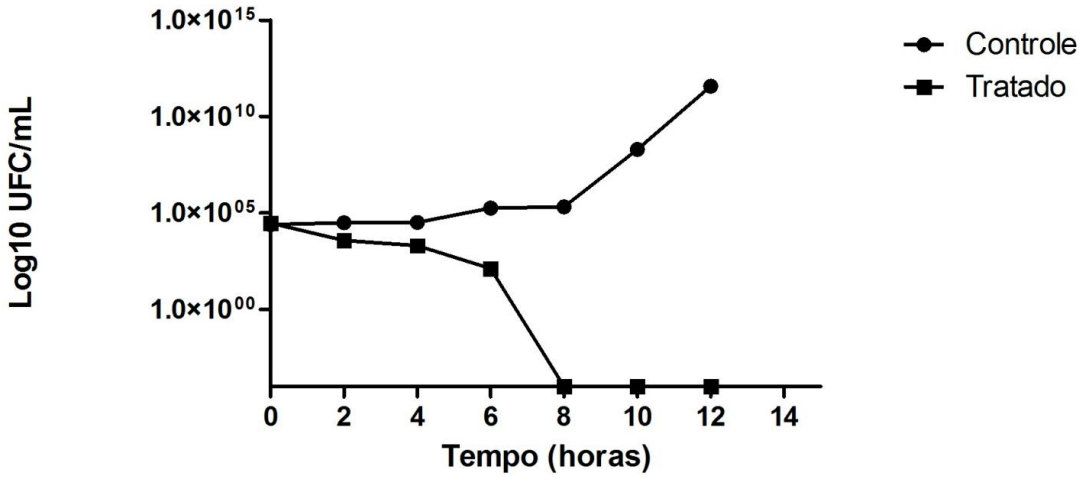


Figura 3. Curvas de tempo-morte das linhagens de *S. aureus* HVISA HV27 (A) e HV138 (B) tratadas com violaceína na concentração inibitória mínima (2,15µg/mL). Os dados são referentes ao tempo de crescimento (horas) plotado por Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL. Cada um dos gráficos é representativo de uma triplicata.

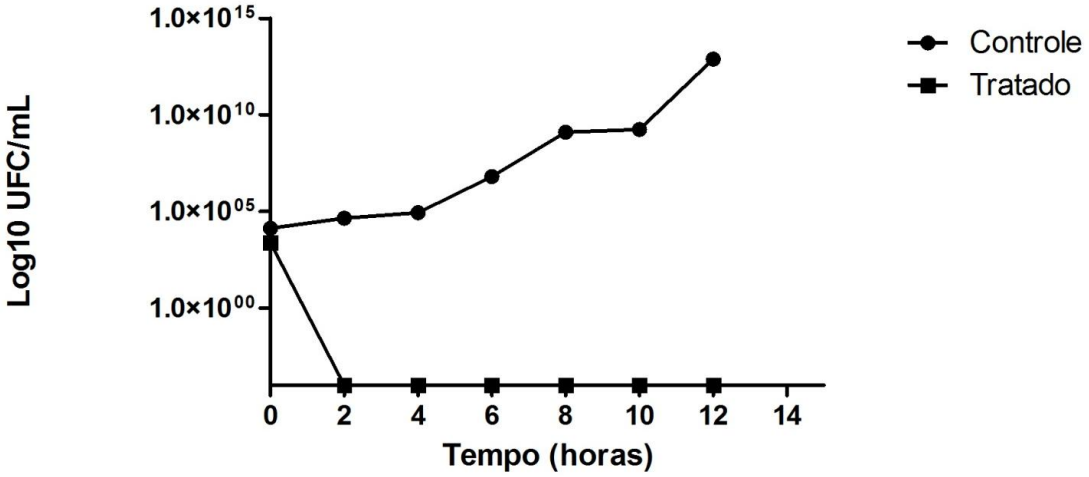


Figura 4. Curva de tempo-morte da linhagem de *B. subtilis* PY79 tratada com violaceína na concentração inibitória mínima (1,07µg/mL). Os dados foram plotados por tempo de crescimento (horas) por Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL. Este gráfico é representativo de uma triplicata.

4.5. EFEITO PÓS-ANTIBIÓTICO (EPA)

Os resultados dos experimentos de efeito pós antibiótico (EPA) encontram-se presentes na Tabela 6. Dados presentes na literatura indicam que valores de EPA acima de 30 minutos são considerados expressivos (Mayer & Nagy, 2000). Dessa forma, os valores calculados e obtidos indicam que a violaceína apresentou capacidade de suprimir o crescimento bacteriano após a remoção do antimicrobiano, com valores que variaram entre 1 e 4 horas, para todas as linhagens avaliadas.

Os dados obtidos indicam que houve diferenças entre os EPAs obtidos com diferentes concentrações de violaceína (0,5 x MIC, 1 x MIC e 4 x MIC, o equivalente a 1,07; 2,15 e 8,60 µg/mL) para as quatro linhagens VISA e para *B. subtilis* PY79 (concentrações de violaceína equivalentes a 0,535; 1,07 e 4,28 µg/mL). Além disso, a análise dos resultados indicou que a concentração de violaceína utilizada para a indução da fase pós-antibiótica influenciou a duração do efeito pós-antibiótico em todos os casos, o que mostra que para a violaceína, o efeito é concentração- dependente.

Tabela 6. Efeito pós-antibiótico sobre as linhagens VISA, HVISA e B. subtilis PY79 em diferentes concentrações de violaceína.

Concentração de violaceína	**Efeito Pós Antibiótico (horas)**				
	Linhagem				
	***S. aureus* V7**	**. *S. aureus* V15**	***S. aureus* HV27**	***S. aureus* HV138**	***B. subtilis* PY79**
0,5 x CIM	1	1	1	1	1
1 x CIM	2	2	2	1	3
4 x CIM	3	3	3	3	4

4.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Este ensaio foi realizado com o intuito de se avaliar possíveis alterações morfológicas e ultraestruturais nas células bacterianas tratadas com violaceína, quando comparadas às células bacterianas da cultura controle (não tratadas). A concentração de violaceína utilizada foi correspondente a 2 x MIC (4.3 µg/mL) para as duas linhagens testadas e a Figura 5 ilustra os resultados (fotomicrografias) obtidos. De acordo com a análise das imagens, as culturas tratadas apresentaram alterações no septo de divisão bacteriano (esta estrutura apresentou-se com formato anômalo ou irregular para ambas linhagens). Além disso, foram também notadas alterações na estrutura da parede celular de algumas células tratadas, comparadas com o controle. Algumas fotomicrografias sugerem a ocorrência de destruição parcial da parede celular de células tratadas. Análise da Figura também indica diferenças no citoplasma das células tratadas, em comparação com o controle, uma vez que o citoplasma das bactérias controle é mais granular, enquanto que o das células tratadas com violaceína pode-se observar um aspecto mais fibrilar.

É importante justificar a realização deste ensaio com apenas duas linhagens. Isso ocorreu devido ao fato de que um volume maior de cultura precisa ser utilizado para a obtenção de maiores quantidades de células bacterianas. Com isso, seriam necessárias quantidades de violaceína também maiores, somado ao fato de que as concentrações deste antimicrobiano que foram utilizadas corresponderam ao dobro do normalmente utilizado (concentração inibitória mínima). Portanto, devido ao alto custo do miligrama da violaceína, foram escolhidas duas linhagens (V7 e HV138), uma VISA e uma HVISA, para a realização destes testes.

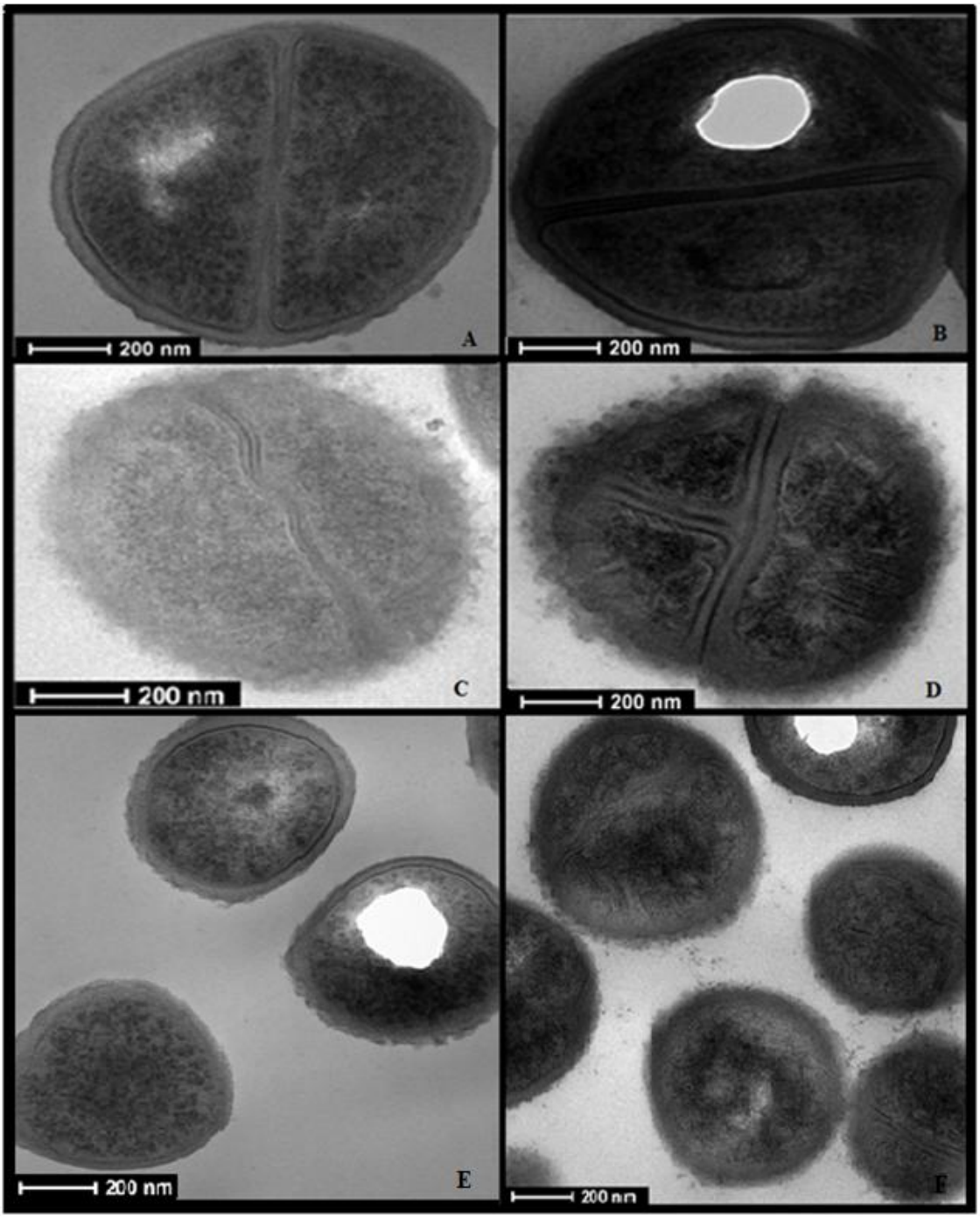


Figura 5. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão das linhagens de *S. aureus* VISA V7 e HVISA HV138. A e B são bactérias isoladas de culturas controle (sem tratamento) de V7 e HV 138, respectivamente. Já C e D correspondem às linhagens V7 e 138, respectivamente, tratadas com violaceína em uma concentração equivalente à 2 x CIM

(4.3µg/mL). As imagens E e F correspondem à linhagem V7, tratada (fotomicrografia E) e controle (fotomicrografia F). As imagens A, B, C e D foram capturadas com aumento de 100.000x, enquanto que as E e F foram capturadas com aumento de 60.000x.

4.7. ATIVIDADE COMBINADA DA VIOLACEÍNA COM OUTROS ANTIBIÓTICOS

Para a realização deste experimento, foram utilizados nove antibióticos, de classes diferentes, que posteriormente seriam combinados com a violaceína, sendo eles: Tetraciclina, cloranfenicol, amoxicilina, gentamicina, trimetropim, estreptomicina, polimixina, canamicina e ampicilina. Neste experimento, a linhagem de *B. subtilis* não foi avaliada, apenas as 4 linhagens de *S. aureus* VISA.

No entanto, uma dificuldade inicial encontrada para a realização deste experimento foi a determinação do CIM para os antibióticos. Foram realizados diversos ensaios de determinação de CIM, inicialmente com 100 µg/mL de concentração máxima inicial, posteriormente com 200 µg/mL e em seguida concentrações sucessivas ainda maiores, até 1 mg/mL. E, para todos os nove antibióticos avaliados não foi possível a determinação da CIM uma vez que todas as quatro amostras demonstraram crescimento positivo.

Entretanto, mesmo sem conseguirmos determinar as concentrações inibitórias mínimas dos antibióticos com os quais desejava-se combinar a violaceína, tentou-se ainda assim interagir estes 9 diferentes compostos com a violaceína, utilizando-se soluções de 1 mg/mL de cada antibiótico. O resultado obtido foi o de inibição de crescimento bacteriano

em concentrações iguais as da violaceína avaliada sozinha. Portanto, pode-se concluir que para este ensaio não houve interação da violaceína com nenhum dos antibióticos avaliados.

4.8. IDENTIFICAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA À VANCOMICINA POR PCR

A reação em cadeia de polimerase foi realizada visando possível detecção do gene *vanA* nas linhgens VISA e HVISA. Este gene não é normalmente encontrado em linhagens VISA, no entanto, recentemente houve a verificação da presença de *vanA* para linhagens com este fenótipo (Banerjee & Anupurba, 2012). De acordo com as análises realizadas, o iniciador do gene pesquisado não foi encontrado em nenhuma das quatro linhagens avaliadas, mesmo com a amplificação deste gene presente na bactéria controle (*Enterococcus faecalis* ATCC 51559, dados não mostrados) o que eliminou a hipótese de problemas com os iniciadores ou mesmo com os reagentes / condições de reação.

5. DISCUSSÃO

5.1. INDUÇÃO DA RESISTÊNCIA POR PASSAGEM SERIADA

Em relação à seleção/ indução de resistência das bactérias com concentrações de antibiótico, este tipo de abordagem foi utilizada baseando-se em duas hipóteses principais. A primeira seria que, no caso das hetero-VISA, por exemplo, apesar de haver um número relativamente pequeno de bactérias com redução de suscetibilidade à vancomicina em uma cultura - provavelmente não a quantidade suficiente para que a resistência fosse detectada - caso esta cultura seja exposta a concentrações crescentes deste antibiótico, as bactérias fenotipicamente resistentes ali presentes apresentarão uma vantagem seletiva (Silveira et al., 2006). Além disso, a presença de antibiótico pode muitas vezes ativar mecanismos de resistência presentes nas bactérias, o que funcionaria como um gatilho para o desenvolvimento da diminuição da suscetibilidade à vancomicina. Esse último mecanismo é bastante relatado em *Enterococcus* spp., em que determinados genes de resistência somente são expressos na presença de glicopeptídeos, e que a transdução de sinal é mediada por um sistema de dois componentes. Tal sistema consiste em um sensor de quinase (VanS) e um regulador de resposta (VanR) (Hong et al., 2004).

5.2. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA BACTERIANA

Nos últimos 40 anos, a vancomicina tem sido a principal droga de escolha no tratamento de infecções causadas por amostras MRSA. Entretanto, com o uso constante deste antibiótico, linhagens bacterianas passaram a apresentar suscetibilidade reduzida à vancomicina, ou até mesmo se tornaram completamente resistentes a este antibiótico. Dessa

forma, alguns autores passaram a sugerir a substituição da vancomicina por outros novos antimicrobianos, com a justificativa de que esta nova abordagem possa resultar na melhora dos tratamentos, diminuindo a mortalidade, o tempo de internação e os custos para tratar as infecções nos pacientes afetados (Hal & Fowler Jr., 2013).

Antibióticos que atualmente apresentam-se como eficazes na eliminação de uma determinada infecção, podem ao longo do tempo se tornarem ineficazes e, dessa forma, perderem a atividade contra as suas bactérias-alvo. Com isso, torna-se imprescindível a pesquisa visando a descoberta de novos antimicrobianos, especialmente aquelas moléculas cujos mecanismos de ação sejam capazes de eliminar bactérias que já apresentam resistência a outros antibióticos (Silveira et al., 2006).

Os antibióticos são classificados de acordo com diversos critérios, como por exemplo, origem (ex: produção por bactérias, tais como actinomicetos); mecanismo de ação (bloqueadores de síntese proteica, inibição de cofatores enzimáticos), quanto à ação predominante (que atuam em Gram-positivos ou em Gram-negativos, em micobactérias, de amplo espectro). Porém, a classificação mais comumente utilizada é a divisão em classes principais, na qual ainda assim há diversas delas. Uma delas classifica os diferentes antibióticos da seguinte forma: penicilinas, cefalosporinas, monobactamas, carbapenêmicos, anfenicóis, tetraciclinas, polipeptídeos, macrolídeos, aminoglicosídeos, lincosamidas, quinolonas, sulfonamidas, glicopeptídeos, rifamicinas e diversos.

No caso deste trabalho, considerarmos as classes de antibióticos com base na composição, estrutura e mecanismos de ação. Assim sendo, os 24 antibióticos avaliados para compor o perfil de resistência das bactérias utilizadas na avaliação da atividade da

violaceína são correspondentes a 9 diferentes classes de antibióticos, sendo elas e seu respectivo número de drogas testadas: Beta-lactâmicos (11), quinolonas (3), aminoglicosídeos (3), sulfonamidas (2), macrolídeos (1), tetraciclínicas (1), anfenicóis (1), polimixina (1) e lincosamida (1).

Dessa forma, a análise do perfil de resistência/suscetibilidade das linhagens de *S. aureus* mostrou que as mesmas foram resistentes a todos os antibióticos avaliados apresentando, portanto, um perfil de resistência mais acentuado do que a cepa ATCC 25923, utilizada apenas para critério comparativo. Dos 24 antibióticos testados, as linhagens V7, V15, HV27 e HV138 foram resistentes a todos eles, enquanto que a linhagem ATTC 25923 foi resistente a quatro desses antibióticos, sendo eles: ácido nalidíxico, aztreonam, penicilina G e sulfato de colistina. Assim sendo, as linhagens de *S. aureus* neste estudo podem ser consideradas multirresistentes à drogas (MDR) . Já a cepa de *B. subtilis* PY79 apresentou-se resistente apenas à lincomicina.

5.3. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

O CIM é o parâmetro mais comumente usado para se avaliar a eficácia de um agente antimicrobiano contra uma determinada bactéria. Em 2006, o CLSI alterou os valores limites nos quais cada linhagem se enquadraria como apresentando resistência intermediária à vancomicina - de 4 para 8 μg/mL - devido a queda na efetividade dos antibióticos para o tratamento de doenças infecciosas causadas por *S. aureus* (Tenover & Moellering, 2007). Ainda de acordo com o CLSI, para valores de CIM acima de 16μg/mL,

estas bactérias poderiam ser consideradas resistentes à vancomicina. De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de determinação da CIM de vancomicina para as linhagens VISA e HVISA, é possível verificar que estes valores encontrados são compatíveis com a classificação das bactérias pelos órgãos regulamentadores. Portanto, as linhagens V7, V15, HV27 e HV138 apresentam um perfil de resistência intermediária à vancomicina quando selecionadas sob condições de crescimento com este antibiótico (Weigel et al., 2007).

Já os valores menores de CIM (2,15 µg/ml) para violaceína obtidos com as linhagens de *S. aureus* com suscetibilidade reduzida à vancomicina avaliadas sugerem que esta molécula apresenta potencial *in vitro* para ser utilizado como agente antimicrobiano no tratamento de infecções causadas por amostras VISA e HVISA. O CBM, ou seja, a concentração bactericida, foi o dobro (4,3 µg/ml) da CIM, porém ainda assim são concentrações relativamente baixas. A diferença entre as atividades da vancomicina e da violaceína para as linhagens avaliadas pode ser causada por uma maior atividade da violaceína ou por um maior número de moléculas capazes de alcançar o sítio ativo, uma vez que os pesos moleculares destes dois compostos são consideravelmente diferentes (343,3 g/mol para violaceína e 1449,2 g/mol para vancomicina).

Outro importante parâmetro a ser levado em conta para a pesquisa de novos anitimicrobianos é a toxicidade. Dados sobre a toxicidade da violaceína já foram descritos (Andrighetti-Frohner et al., 2003; Durán et al., 2007). Entretanto, experimentos realizados com modelos animais demonstraram que este composto quando administrado *in vivo* (modelo murino) nas concentrações terapêuticas são bem tolerados (Lopes et al., 2009). Deve-se destacar também a possibilidade do uso dessa molécula em nanoformulações, a fim de otimizar a atividade a atividade e reduzir a toxicidade (Martins et al., 2011).

5.4. CURVAS DE TEMPO-MORTE

Em geral, há dois tipos de curvas de tempo-morte, baseado no perfil de concentração usado nesses modelos *in vitro*: curva estática e dinâmica. Os modelos de concentração estático representam um sistema com concentrações em estado estacionário, enquanto que o modelo dinâmico tenta simular uma situação *in vivo*, no qual há alterações nas concentrações do antibiótico ao longo do tempo. Entretanto, um estudo avaliando os impactos das diferenças entre os experimentos estáticos e dinâmicos mostraram que a maior parte dos ensaios dinâmicos para a determinação da curva de tempo-morte foram relativamente semelhantes aos resultados dos experimentos estáticos, o que indicou uma certa equivalência entre eles (Nielsen et al., 2011). Desta forma, foi escolhido o modelo estático de experimento para a determinação da curva de tempo-morte em nosso trabalho.

Durante a realização de experimentos para a determinação de curvas de tempo-morte na presença de diferenças drogas, o retorno do crescimento a partir de 8 horas de incubação é um fenômeno comumente observado. Este fato pode ocorrer devido a diversos fatores, como baixa solubilidade do composto, perda da atividade da molécula por modificação ou degradação ao longo do tempo, adaptação do organismo (desenvolvimento ou seleção de resistência), ou uma combinação destes fatores (Aeschlimann et al., 1999). No caso dos experimentos desenvolvidos pelo nosso grupo, foi observado retorno do crescimento a partir de 10 horas para 3 linhagens avaliadas (V7, V15 e HV27). Dessa forma, foram realizadas novas determinações dos MICs de violaceína para colônias reisoladas da cultura após 12 e 24 horas, e os testes indicaram que os valores das concentrações inibitórias mínimas permaneceram iguais (2,15 µg/ml), o que descartou a hipótese de surgimento de linhagens mutantes resistentes.

Além disso, ao compararmos os perfis das curvas de tempo-morte exibidas pelas linhagens VISA com resultados prévios de nosso grupo para linhagens MRSA (N315 e BEC9393, dados não publicados), foi possível observar o mesmo perfil de crescimento, ou seja, dependendo da concentração de violaceína adicionada à cultura, o crescimento bacteriano retorna após algumas horas de cultivo. De qualquer forma, da mesma maneira que para as linhagens VISA, estes resultados não parecem ser devido ao surgimento de mutantes resistentes. Já o comportamento da curva de crescimento observada para *B. subtilis* PY79 diverge daquele observado para as linhagens MRSA (N315 e BEC9393) e VISA (V7, HV27 e V15), mas foi semelhante a HV138, uma vez que ambas não apresentaram o retorno do crescimento observado pelas demais, ao menos nos tempos avaliados neste estudo.

5.5. EFEITO PÓS-ANTIBIÓTICO

O efeito pós antibiótico é um fenômeno que representa a supressão contínua do crescimento bacteriano após uma breve exposição a uma agente antimicrobiano. Apesar dos mecanismos exatos causadores deste efeito ainda não serem completamente elucidados, muitas hipóteses como, por exemplo, a persistência das moléculas nos sítios de ação presentes no interior da célula, uma lenta recuperação celular proveniente de um dano não letal causado à bactéria e um intervalo de tempo necessário para que ocorra a síntese de novas proteínas ou enzimas que mantém o metabolismo celular bacteriano funcionando da maneira correta (Aeschlimann et al., 1999).

Os resultados obtidos na determinação do EPA da violaceína para as linhagens avaliadas neste estudo mostraram que, quando utilizadas concentrações 0,5 CIM, os valores de tempo obtidos foram relativamente curtos (1 hora), enquanto que para 4 vezes o CIM foram obtidos efeitos maiores (3 horas). Isso indica que há uma correlação entre a concentração utilizada para a indução da fase pós-antibiótica e a duração desta. Além disso, até duas horas após a remoção da violaceína, as culturas de V15 e HV27 tratadas com concentrações equivalentes ao CIM e as demais linhagens tratadas com 4xCIM não apresentaram contagem de UFC (unidades formadoras de colônias). Dessa forma, pode-se inferir que grande parte das bactérias foram mortas, ou seja, a violaceína em certos casos apresenta intensa atividade bactericida.

5.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

As imagens obtidas a partir das análises de MET encontram-se resumidas na Figura 5. De acordo com esses dados, podem-se observar claras diferenças entre as células controle e tratadas com violaceína, especialmente na região correspondente ao septo de divisão celular. Entretanto, outras estruturas apresentaram-se afetadas nas bactérias tratadas, como por exemplo o citoplasma e a parede celular.

Estas alterações morfológicas são similares, mas não idênticas às mudanças ocorridas em *S. aureus* e linhagens VRE (*E. faecalis* resistentes à vancomicina), quando estas são tratadas com o antibiótico daptomicina (DAP). Este antibiótico é membro de uma família recentemente descrita, conhecida como lipopeptídeos cíclicos e apresenta atividade antimicrobiana em cocos Gram-positivos, incluindo *S. aureus* e *E. faecalis*, como também

para *Streptococcus* spp. (incluindo linhagens resistentes a diversos antibióticos habitualmente empregados no tratamento destas), além de alguns bacilos Gram-positivos, como por exemplo *Listeria* spp. e *Corynebacterium* spp e algumas espécies anaeróbias (Araos et al., 2012). No entanto, esta molécula não apresenta atividade contra bactérias Gram-negativas, por não ser capaz de penetrar na membrana externa destes micro-organismos. Além disso, é importante destacar que a daptomicina apresenta um mecanismo de ação que não se assemelha a nenhuma outra molécula conhecida (Araos et al., 2012; Humphries, 2013, Randall et al., 2013).

5.7. IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA À VANCOMICINA POR REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Este ensaio foi realizado a fim de promover a busca pelo gene *vanA*, já amplamente descrito como presentes em *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina (VRE) e que poderiam ter sido transferidos às bactérias em estudo. Esta ideia baseou-se no fato de diversos autores terem descrito como o principal mecanismo de resistência à vancomicina a transferência do gene *vanA* de *E. faecalis* para *Staphylococcus aureus* (Chang et al., 2003, Perichón & Courvalin, 2012, Qureschi *et al.*, 2014). Existem seis tipos de resistência a glicopeptídeos (sendo a vancomicina o principal representante deste grupo) descritos em enterococci, que diferem entre si na sequência do gene estrutural que codifica proteína ligase necessária para a resistência. O primeiro tipo,citado anteriormente, é o gene *vanA*, cujas linhagens que o apresentam são caracterizadas por altos níveis de resistência à vancomicina e teicoplanina. Já a presença do gene *vanB* torna as bactérias resistentes à

vancomicina em diferentes níveis, porém são susceptíveis à teicoplanina; a linhagem *vanD* apresenta resistência moderada à vancomicina. Por último, as linhagens com os genes *vanC*, *vanE* e *vanG* correspondem a baixos níveis de resistência à vancomicina, apenas (Departieu et al., 2004; Courvallin, 2006).

No caso do presente trabalho, foi realizado a PCR (reação em cadeia de polimerase) para a detecção do gene *vanA,* o único já descrito na literatura como presente em *S. aureus*, nas quatro bactérias com suscetibilidade reduzida à vancomicina avaliadas neste estudo. Conforme citado anteriormente, não foi identificada a presença deste gene para nenhuma das linhagens de *S. aureus* avaliadas. De acordo com a literatura, a grande maioria das linhagens VISA e HVISA não apresenta nenhum dos determinantes *van* presentes em VRE (Liu & Chambers, 2003; Howden 2010), com exceção de algumas linhagens descritas em trabalhos recentes (Banerjee & Anupurba, 2012). Portanto, o mecanismo pelo qual tais bactérias apresentam resistência intermediária à vancomicina não é devido à presença do gene *vanA*.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que a violaceína apresenta atividade antimicrobiana para as quatro linhagens de *S. aureus* com suscetibilidade reduzida à vancomicina (VISA e HVISA), e também para a linhagem de *B. subtilis*. Os valores de CIM da violaceína observados para as linhagens VISA e HVISA (2.15 ug/mL) são inferiores aos obtidos na determinação da CIM de vancomicina para as mesmas linhagens (8ug/mL para V7 e V15 e 4 ug/mL para HV27 e HV138), o que reforça a atividade antimicrobiana da violaceína.

Além disso, ensaios visando a identificação do gene de resistência à vancomicina (*vanA*) indicaram a ausência deste gene para as quatro linhagens de *S. aureus* avaliadas (VISA e HVISA), o que descartou o mecanismo de resistência à este antibiótico pela presença de *vanA*. Desta forma, estudos continuarão no sentido de realizar mais ensaios com a violaceína para que se possa desvendar o modo de ação deste novo antimicrobiano. Neste sentido, o uso de *B. subtilis*, uma bactéria modelo para Gram-positivos, pode ser bastante útil.

7. REFERÊNCIAS

Aeschlimann JR, Dresser LD, Kaatz GW, Rybak MJ. 1999. Effects of NorA inhibitors on *in vitro* antibacterial activities and postantibiotic effects of levofloxacin, ciprofloxacin, and norfloxacin in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 43: 335–340.

Andrighetti-Fröhner CR, Antonio RV, Creczynski-Pasa, TB, Barardi, CRM, Simões CMO. 2003. Cytotoxicity and Potential Antiviral Evaluation of Violacein Produced by *Chromobacterium violaceum*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98: 843-848.

Araos R, García P, Chanqueo L, Labarca J. 2012. Daptomicina: características farmacológicas y aporte en el tratamiento de infecciones por cocáceas gram positivas. Rev Chil Infect. 29:127-31.

Ballestriero F, Daim M, Penesyan A, Nappi J, Schleheck D, Bazzizcalupo P, Schiavi E, Egan S. 2014. Antinematode Activity and the Role of the Insulin/IGF-1 Pathway in Controlling Violacein Sensivity in *Caenorhabditis elegans*. PLoS ONE. 9(10): e109201.

Banerjee T, Anupurba S. 2012. Colonization with vancomicyn-intermediate *Staphylococcus aureus* strains containing the *vanA* resistance gene in a tertiary-care center in north India. J Clin Microbiol. 50(5):1730-1732.

Bannerman TL. 2003. Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase positive cocci that grow aerobically. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA,

Yolken RH, ed. Manual of clinical microbiology. ASM Press: Washington DC. 8: 384–404.

Bauer AW, Roberts CE, Kirby WM. 1959. Single disc versus multiple disc and plate dilution techniques for antibiotic sensitivity testing. Antibiot Annu. **7**:574–580.

Brown AF, Leech JM, Rogers TR, McLoughlin RM. 2014. Colonization: modulation of host immune response and impact on human vaccine design**.** Front Immunol. 4:507.

Cazoto LL, Martins D, Ribeiro MG, Durán N, Nakazato G. 2011. Antibacterial activity of violacein against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. J Antibiot. 64:395–397.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Atlanta: CDC.

Centers for Disease Control and Prevention. 2002. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin—United States, 2002. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 51:565–567.

Chambers HF, DeLeo FR. 2009. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. Nat Rev Microbiol. 7: 2464-2474.

Chang S, Sievert DM, Hageman JG, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, Shah S, Rudrik JT, Pupp GR, Brown WJ, Cardo D, Fridkin SK. 2003. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. N Engl J Med. 348: 1342-1347.

Clardy J, Fischbach MA & Walsh CT. 2006. New antibiotics from bacterial natural products. Nature Biotechnology, 24:1541-1550.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Seventeenth Informational Supplement. CLSI Document. M 100-517. Clinical Laboratory Standards Institute; Wayne, Pennsylvania, USA: 2007. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test.

Clinical Laboratory Standards Institute. 2003. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; 6th ed. CLSI, EUA.

Cockerill FR, Patel JB, Adler J, Bradford PA, Dudley MN, Eliopoulos GM, et al. 2013. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing;Twenty- Third informational supplement.* M100-S23 editor. Pennsylvania 19087 USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Courvalin, P. 2006. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. Clin. Infect. Dis. 42(Suppl. 1):S25–S34.

Craig, W. A. & Gudmundsson, S. 1991. Postantibiotic effect. In Antibiotics in Laboratory Medicine, Wilkins, Baltimore, MD. 3rd ed. (Lorian, V., Ed.). 403–431.

da Motta CC, Rojas ACM, Dubenczuk FC, Botelho LAB, Moreira BM, Coelho SMO, Coelho IS, Souza MMS. 2014. Verification of molecular characterization of coagulase positive *Staphylococcus* from bovine mastitis with matrix-assisted

laser desorption ionization, time-offlight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) mass spectrometry. Afr J Microbiol Res. 8(48):3861-3866.

de Azevedo MBM, Alderete J, Rodriguez JA, Souza AO, Rettori D, Torsoni MA, Faljoni-Alario A, Haun M, Duran N. 2000. Biological Activities of Violacein, a New Antitumoral Indole Derivative, in an Inclusion Complex with β-Cyclodextrin. J. Inclusion Phenomena Macrocyclic Chem. 37: 93-101.

DeDent A, Kim HK, Missiakas DM, Schneewind O. 2012. Exploring *Staphylococcus aureus* pathways to disease for vaccine development. Semin. Immunopathol. 34:317–333.

Depardieu F, Perichon B, Courvalin P. 2004. Detection of the *van* alphabet of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 42: 5857–60.

Duran N, Menck CFM. 2001. *Chromobacterium violaceum*: A Review of Pharmacological and Industrial Perspectives. Critical Rev. Microbiol. 27, 201-222.

Duran N, Justo GZ, Melo PS, De Azevedo MB, Brito AR, Almeida AB, Haun M. 2003. Evaluation of the Antiulcerogenic Activity of Violacein and its Modulation by the Inclusion Complexation with Beta-Cyclodextrin. Can. J. Physiol. Pharmacol. 81, 387-396.

Durán N, Justo GZ, Ferreira CV, Melo PS, Cordi L, Martins D. 2007. Violacein: properties and biological activities. Biotechnol Appl Biochem. 48: 127-133.

Dutka-Malen, S., S. Evers, and P. Courvalin. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J. Clin. Microbiol. 33**:**24-27.

Falagas ME, Karageorgopoulos DE. 2008. Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among gram-negative bacilli: need for international harmonization in terminology. Clin Infect Dis. 46: 1121–1122.

Falord M, Mader U, Hiron A, Debarbouille M, Msadek T. 2011. Investigation of the *Staphylococcus aureus* GraRS regulon reveals novel links to virulence, stress response and cell wall signal transduction pathways. PLoS One. 6:e21323.

Foster T. 1996. "Staphylococcus." In Medical Microbiology. 4th ed. Edited by Samuel Baron. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. Chapter 12.

Foster, TJ. 2004. The *Staphylococcus aureus* superbug. J. Clin. Invest. 114: 1693-96.

Galbusera E, Renzoni A, Andrey DO, Monod A, Barras C, Tortora P, Polissi A, Kelley WL. 2010. Site-specific mutation of Staphylococcus aureus VraS reveals a crucial role for the VraR-VraS sensor in the emergence of glycopeptide resistance. Antimicrob Agents Chemother. 55(3): 1008–1020.

Gardete, S; Tomasz, A. 2014. Mechanisms of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Invest.124, 7: 2836–2840.

Hauschild, T. & Stepanovic, S. 2008. Identification of Staphylococcus spp. by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of dnaJ gene. J Clin Microbiol 46: 3875–3879.

Henry CS, Zinner JF, Cohoon MP, Stevens RL. 2009. iBsu1103: a new genome-scale model of *Bacillus subtilis* based on SEED annotations. Genome Biol. 10:R69.

Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y, Kobayashi I, 1997a. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet 350: 1670–1673.

Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC, 1997b. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J. Antimicrob. Chemother. 40: 135–136.

Hiramatsu K, Katayama Y, Matsuo M, Aiba Y, Saito M, Hishinuma T. 2014. Vancomycin-intermediate resistance in *Staphylococcus aureus*. J Global Antimicrob Resist. 213-224.

Hong, H.J., Hutchings, M.I. & Buttner, M.J. 2008. Vancomycin resistance VanS/VanR two-component systems. Adv Exp Med Biol. 631:200–213.

Hong H. J., Hutcgings MI, Neu JM. Wright GD. Paget MS, Buttner MJ**.** 2004. Characterization of an inducible vancomycin resistance system in *Streptomyces coelicolor* reveals a novel gene (*vanK*) required for drug resistance. Mol. Microbiol. 52**:**1107-1121.

Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML 2010. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clin Microbiol Rev 23: 99–139.

Howden BP, McEvoy CR, Allen DL, Chua K, Gao W, Harrison PF, Bell J, Coombs G, Bennett-Wood V, Porter JL, Robins-Browne R, Davies JK, Seeman T, Stinear TP. 2011. Evolution of multidrug resistance during *Staphylococcus aureus* infection involves mutation of the essential two component regulator WalKR. Plos Patholog. 7:e1002359.

Humphries RM, Pollett S, Sakoulas G. 2013. A current perspective on daptomycin for the clinical microbiologist. Clin Microb Rev. 26: 759-780.

Infectious Disease Society of America. 2010. The 10 x '20 initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020. Clin Infect Dis. 50:1081-1083.

International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). 2009. Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. Antimicrob Agents Chemother. 53:4961–4967.

Kaźmierczak Z, Górskiemail A, Dąbrowskaemail K. 2014. Facing antibiotic resistance: *Staphylococcus aureus* phages as a medical tool. Viruses 6:2551–2570.

Konzen M, De Marco D, Cordova CA, Vieira TO, Antônio RV, Creczynski-Pasa TB. 2006. Antioxidant Properties of Violacein: Possible Relation on its Biological Function. Bioorg. Med. Chem. 14: 8307-8313.

Kuroda M, Kuroda H, Oshima T, Takeuchi F, Mori H, and Hiramatsu K. 2003. Two-component system VraSR positively modulates the regulation of cell-wall biosynthesis pathway in *Staphylococcus aureus*. Mol. Microbiol. 49**:**807-821.

Kwun, MJ, Novotna, G, Hesketh, AR, Hill, L, Hong, HJ. 2013. *In vivo* studies suggest that induction of VanS-dependent vancomycin resistance requires binding of the drug to D-Ala-D-Ala termini in the peptidoglycan cell wall. Antimicrob Agents Chemother. 57, 4470–4480.

Leon LL, Miranda CC, de Souza AO, Duran N. 2001. Antileishmanial Activity of the Violacein Extracted from *Chromobacterium violaceum*. J. Antimicrob. Chemother. 48, 449-450.

Lichstein HC, van De Sand VF. 1946. The antibiotic activity of violacein, prodigiosin, and phthicol. J Bacteriol. 52: 145-146.

Liu C, Chambers HF.2003. *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. Antimicrob Agents Chemother. 47:3040-5.

Lopes SC, Blanco YC, Justo GZ, Nogueira PA, Rodrigues FL, Goelnitz U, Wunderlich G, Facchini G, Brocchi M, Duran N, Costa FT. 2009. Violacein Extracted from

Chromobacterium violaceum inhibits Plasmodium Growth In Vitro and In Vivo. Antimicrob. Agents Chemother. 53, 2149-2152.

Lowy FD. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus.* J Clin Invest. 111: 1265–73.

Lowy FD. 1998. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med. 339: 520-532.

Madan Babu M. 2013. Bacterial Gene Regulation and Transcriptional Networks, Caister Academic Press.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. 2012. Multidrug- resistant, extensively drug-resistant and pandrugresistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin. Microbiol. Infect. 18:268 –281

Martins D, Costa FTM, Brocchi M, Durán N. 2011. Evaluation of the antibacterial activity of poly-(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein. Journal of Nanoparticle Research. 13(1): 355-363.

Mayer, I., Nagy, E. 2000. Evaluation of post-antibiotic effects of antipseudomonal antibiotics using an automated system. APMIS. 108: 261-266.

McEvoy CR, Tsuji B, Gao W, Seeman T, Porter JL, Doig K, Ngo D, Howden BP, Stinear TP. 2013. Decreased vancomycin susceptibility in *Staphylococcus*

aureus caused by IS256 tempering of WalKR expression. Antimicrob Agents Chemoter. 57:324-3249.

Młynarczyk A, Młynarczyk G, Jeljaszewicz J. 1998. The genome of *Staphylococcus aureus*: a review. Zentralb Bacteriol. 287: 277-314.

Mose JR, Potsch A. 1954. [Biological and bacteriostatic properties of prodigiosin and violacein. Arch Hyq Bakteriol. 138 (1): 52-62.

Nielsen EI, Cars O, Friberg LE. 2011. Predicting in vitro antibacterial designs with a semimechanistic pharmacocinetic- pharmacodynamic model. Antimicrob Agents Chemother. 55:1571-1579.

Olsen, J. E., H. Christensen, and F. M. Aarestrup. 2006. Diversity and evolution of *blaZ* from *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. J. Antimicrob. Chemother. 57**:**450-460.

Orhan G, Bayram A, Zer Y, Balci I. 2005. Synergy tests by Etest and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melittensis.* J Clin Microbiol. 43:140-143.

Perichón B, Courvallin P. 2012. Staphylococcus aureus VRSA-11B Is a Constitutive Vancomycin Resistant Mutant of Vancomycin-Dependent VRSA-11A. Antimicrob. Agents Chemother. 56: 4693-4696.

Périchon B, Courvalin P. 2009. VanA-type vancomycin-resistant Staphylococcus aureus. Antimicrob. Agents Chemother. 53:4580 –4587.

Qureshi NK, Yin S, Boyle-Vavra S. 2014. The Role of the Staphylococcal VraTSR Regulatory System on Vancomycin Resistance and *vanA* Operon Expression in Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. PLoS ONE 9(1): e85873.

Randall CP, Mariner KR, Chopra I, O´Neill AJ. 2013. The target of daptomycin is absent from *Escherichia coli* and other Gram-negative pathogens. Antimicrob Agents Chemother. 57:637-639.

Rettori D & Duran N. 1998. Production, Extraction and Purification of Violacein: an Antibiotic Pigment Produced by *Chromobacterium violaceum*. World J. Microb. Biot., 14, 685-688.

Roemer T, Davies T, Giaever G, Nilslow C. 2012. Bugs, drugs and chemical genomics. Nat Chem Biol. 8:46–56.

Shoji M, Cui L, Iizuka R, komoto A, Neoh HM, Watanabe Y, Hishinuma T, Hiramatsu K. 2011. *walK* and *clp* mutations confer reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 55: 3870-3881.

Silveira GP, Nome F, Gesser JC, Sá MM. 2006. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. Química Nova, 29 (4): 844-855.

Subramaniam S, Ravi V, Sivasubramaniam A. 2014. Synergistic antimicrobial profiling of violacein with commercial antibiotics against pathogenic micro-organisms. Pharm Biol. 52 (1): 86-90.

Švec P, Pantůček R, Petráš P, Sedláček I, Nováková D. 2010. Identification of *Staphylococcus* spp. using $(GTG)_5$-PCR fingerprinting. Syst Appl Microbiol 33: 451–456.

Tenover FC and Moellering RC. 2007. The rationale for revising the Clinical and Laboratory Standards Institute vancomycin minimal inhibitory concentration interpretive criteria for *Staphylococcus aureus*. Clin. Infect. Dis. 44: 1208-1215.

van Dijl JM, Hecker M. 2013. *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. Microb. Cell Fact. 12:3.

van Hal SJ, Fowler VG Jr. 2013. Is it time to replace vancomycin in the treatment of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections? Clin Infect Dis. 56:1779–88.

Vidaillac C, Gardete S, Tewhey R, et al . 2013. Alternative mutational pathways to intermediate resistance to vancomycin in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dis. 208:67-74.

Vossenkuhl B, Brandt J, Fetsch A, Käsbohrer A, Kraushaar B, Alt K, Tenhagen BA. 2014. Comparison of *spa* types, SCCmec types and antimicrobial resistance profiles of MRSA isolated from turkeys at farm, slaughter and from retail meat indicates transmission along production chain. PLoS ONE. 9(5);e96308.

Wahome, PG, "Role of mechanosensitive channels in growth and differentiation of Bacillus subtilis". 2008. *Doctoral Dissertations.* Paper AAI3314629.

Weigel LM, Donlan RM, Shin DH, Jensen B, Clark NC, McDougal LK, Zhu W, Musser KA, Thompson J, Kohlerschmidt D, Dumas N, Limberger RJ, Patel JB. High-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates associated with a polymicrobial biofilm. Antimicrob Agents Chemother. 51:231-238.

Xie J, Pierce JG, James RC, Okano A, Boger DL. 2011. A redesigned vancomycin engineered for dual D-Ala-D-Ala and D-Ala-D-Lac binding exhibits potent antimicrobial activity against vancomycin resistant bacteria. J. Am. Chem. Soc. 133:13946–49.

8. ANEXOS

Certificado de análise da Violaceína (Sigma-Aldrich)

Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name	Violacein from *Janthinobacterium lividum*, >98% (violacein (minimum 85% violacein) and deoxyviolacein, HPLC)
Product Number	V9389
Product Brand	SIGMA
CAS Number	548-54-9
Molecular Formula	$C_{20}H_{13}N_3O_3$
Molecular Weight	343.34
Storage Temp	2-8°C

TEST	**SPECIFICATION**	**LOT 118K4041 RESULTS**
APPEARANCE	DARK BLUE TO VIOLET POWDER	DARK BLUE POWDER
SOLUBILITY	CLEAR DARK BLUE SOLUTION AT 10 MG/ML OF DIMETHYLSULFOXIDE	CONFORMS
PROTON NMR SPECTRUM	CONSISTENT WITH STRUCTURE	CONFORMS
CARBON	69.32 - 70.32% (AS IS)	69.50% (AS IS)
NITROGEN	11.73 - 12.73% (AS IS)	12.20% (AS IS)
PURITY BY HPLC	> OR = 98%	100%
RECOMMENDED RETEST	3 YEARS	SEPTEMBER 2011
QC RELEASE DATE		DECEMBER 2008

Rodney Burbach

Rodney Burbach, Manager
Quality Control
St. Louis, Missouri USA