

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



**André Fernando Ditondo Micas**

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA E  
BACTERIOSTÁTICA DA VIOLACEÍNA”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
André Fernando Ditondo Micas  
[Assinatura]  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Mestre em Genética e Biologia  
Molecular, na área de Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Brocchi

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

**M581a**

Micas, André Fernando Ditondo  
Avaliação da atividade bactericida e bacteriostática da violaceína / André Fernando Ditondo Micas. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

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

1. Violaceína. 2. Antibióticos. 3. *Staphylococcus*. 4. Bactericidas. 5. Agentes antibacterianos. I. Brocchi, Marcelo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

**Título em inglês:** Evaluation of the bactericide and bacterostatic activity of violacein.

**Palavras-chave em inglês:** Violacein; Antibiotics; *Staphylococcus*; Bactericides; Antibacterial agents.

**Área de concentração:** Microbiologia.

**Titulação:** Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Banca examinadora:** Marcelo Brocchi, Elsa Masae Mamizuka, Domingos da Silva Leite.

**Data da defesa:** 04/04/2008.

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular.

**BANCA EXAMINADORA**

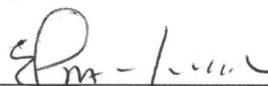
Prof. Dr Marcelo Brocchi



---

Assinatura

Prof. Dra. Elsa Masae Mamizuka



---

Assinatura

Prof. Dr . Wanderley das Dias Silveira

---

Assinatura

Prof. Dr. Domingos da Silva Leite.



---

Assinatura

Prof. Dr. Paulo Sérgio Rodrigues Coelho

---

Assinatura

## RESUMO

A violaceína é um composto indol, de intensa cor violeta que é produzido por *Chromobacterium violaceum*, uma bactéria ubíqua de zonas tropicais e subtropicais. Esta molécula apresenta inúmeras propriedades antimicrobianas, tais como agente antimicótico, antiviral e atividade contra certos protistas. Observações importantes apontam para uma atividade bactericida considerável, tornando premente um estudo mais aprofundado a cerca desta propriedade. No presente trabalho sondou-se a sensibilidade a este composto para algumas bactérias de interesse médico e um fitopatógeno, sua cinética de inibição do crescimento bacteriano, assim como se obtiveram importantes pistas sobre o mecanismo de ação. Foi encontrada atividade inibitória considerável para *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, com uma maior inibição durante a fase estacionária, assim como para *Xanthomonas axonopodis p.v passifloraceae*. Através de micrografias eletrônicas pôde-se constatar profundas alterações na parede celular em *S. aureus*, indicando esta estrutura como sítio de atuação da violaceína, assim como através de espectrometria de massa (MALDI-TOF) a identificação de proteínas diferencialmente expressas por *S. aureus* na presença ou ausência de violaceína, indicando uma grande perturbação no metabolismo bacteriano, com inibição a alguns fatores de patogenicidade e também inibição da síntese protéica.

## ABSTRACT

Violacein is a deeply violet indol compound produced by *Chromobacterium violaceum*, an ubiquitous tropical and subtropical bacterium. This molecule presents many antimicrobial properties, like antimycotic, antiviral and activity against some protists. Important reports pointed to a considerable bactericide activity, which brings an extremely necessary quest. This work evaluated the resistance of many clinical bacteria, the violacein kinetic of bacterial growth inhibition and some cues about the mechanism of action of this molecule. It was obtained significant inhibition activity against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Xanthomonas axonopodis* p.v *passifloraceae*. From transmission electron micrographs it was observed profound disturbs on *S. aureus* cell wall, which indicates this structure as violacein site of action. By using mass spectrometry (MALDI-TOF) of proteins differently expressed from bidimensional gel electrophoresis of *S. aureus* treated and not-treated with violacein, it was found a strong metabolic disturb, with inhibition of some pathogenical factors and inhibition of proteic synthesis.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi pela orientação e paciência durante o desenvolvimento do trabalho e a sua conclusão, principalmente.

Agradeço também aos amigos de laboratório: Gustavo (Dãã), Guilherme, Fernanda, Luciana, Diego, Eduardo, Mário Paulo, Isabela, Débora, Elisa, Evandro e, especialmente, ao Dr. Gerson que nunca se cansou de ajudar. Este trabalho não seria possível sem a sua ajuda.

Agradeço aos professores da UNICAMP, prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira, ao Prof. Dr. Domingos da Silva Leite, ao Prof. Dr. Aureo Tatsumi Yamada, pela ajuda indispensável nas técnicas de microscopia eletrônica. Ao Prof. Dr. José Camilo Novello e ao Ricardo Shiniti Oka Horiuchi por toda a ajuda nas análises de expressão protéica.

Agradeço às funcionárias da Secretaria da Pós-Graduação da Genética, em especial à Lourdes, por socorrer diversas vezes nas difíceis horas de burocracia.

Agradeço a minha família pelo apoio e compreensão por todo o tempo em que estive ausente.

E especialmente eu agradeço a Deus, a minha Pri e a Dr<sup>a</sup>. Fátima que me socorreram nas horas mais difíceis, apontando a esperança quando eu não mais acreditava nela.

Muito obrigado.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Violaceína.....	1
1.2 Resistência a antibióticos.....	3
1.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	4
1.2.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	7
1.2.3 <i>Enterococcus</i> .....	7
1.2.4 <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	8
1.2.5 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	8
1.2.6 <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	9
1.2.7 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	10
1.2.8 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	10
1.2.9 Enterobacterias .....	11
2. JUSTIFICATIVA .....	14
3. OBJETIVOS.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1. Violaceína.....	17
4.2. Amostras e Linhagens bacterianas .....	17
4.3. Determinação de concentração inibitória mínima de violaceína, oxacilina e vancomicina (CIM) e teste de toxicidade do DMSO.....	20
4.4. Avaliação de efeito bactericida ou bacteriostático da violaceína .....	21
4.5. Inibição de sistemas de transporte (bombas de efluxo).....	22
4.6. Testes com <i>Staphylococcus</i> sp.....	22
4.7. Interação entre violaceína com oxacilina ou vancomicina na inibição do crescimento de <i>S. aureus</i> . .....	23
4.8. Curva de crescimento com violaceína.....	24
4.9. Curva de crescimento com adição de uma segunda dose de violaceína.....	25
4.10. Varredura de mutantes resistentes a violaceína.....	26
4.11. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	26
4.12. Determinação de alterações na expressão protéica.....	27
4.12.1. Extração total de proteínas de <i>S. aureus</i> .....	27
4.12.2. SDS-PAGE.....	28
4.12.3. Gel Bidimensional .....	28
4.12.4. Espectrometria de Massas (MALDI -TOF).....	29
4.12.5. Análise dos dados espectrométricos .....	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	30
5.1. Teste de toxicidade do DMSO sobre bactérias.....	30
5.2. Determinação de concentração inibitória mínima para a violaceína (CIM).....	33
5.2.1. Concentração inibitória mínima para oxacilina.....	35
5.2.2. Concentração inibitória mínima para vancomicina.....	35
5.3. Resistência a violaceína por bomba de efluxo .....	38
5.4. Avaliação de efeito bactericida ou bacteriostático da violaceína .....	38
5.5. Curva de crescimento com violaceína.....	41

5.6. Varredura por mutantes .....	43
5.7. Curva de crescimento com duas adições de violaceína.....	44
5.8. Avaliação de ação combinada entre oxacilina e violaceína .....	46
5.9. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	53
5.10. Determinação de alterações na expressão protéica.....	57
5.10.1. SDS-PAGE .....	57
5.10.2. Gel Bidimensional .....	58
6. CONCLUSÕES .....	63
7. REFERÊNCIAS .....	64

## SUMÁRIO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química da violaceína.....	1
<b>Figura 2.</b> Experimento de interação entre antimicrobianos.....	24
<b>Figura 3.</b> Crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> Rib1 e ATCC029213 na presença e na ausência de DMSO.....	32
<b>Figura 4.</b> Concentração inibitória mínima de violaceína para isolados ou linhagens de <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> e <i>X. axonopodis</i> .....	34
<b>Figura 5.</b> Concentração inibitória mínima (CIM) para oxacilina.....	36
<b>Figura 6.</b> Concentração inibitória mínima (CIM) para vancomicina.....	37
<b>Figura 7.</b> Avaliação da atividade bactericida/bacteriostática da violaceína.....	40
<b>Figura 8.</b> Curva de crescimento de <i>S. aureus</i> Rib1 e <i>S. epidermidis</i> na presença de violaceína (50µM).....	42
<b>Figura 9.</b> Concentração inibitória mínima das linhagens de <i>S. aureus</i> Rib 1 e <i>S. epidermidis</i> 1E antes a após cultivo na presença de violaceína.....	43
<b>Figura 10.</b> Curva de crescimento de <i>S. aureus</i> Rib1 e <i>S. epidermidis</i> 1E com violaceína (50 µM) administrada uma única vez (tempo 0) ou em duas doses (tempo 0 e 7 horas).....	45
<b>Figura 11.</b> Comparação das curvas de crescimento de <i>S. aureus</i> Rib1 com violaceína a 50 µM e 100 µM e curva controle.....	46
<b>Figura 12.</b> Curva de crescimento para verificar a atividade conjunta dos antibióticos violaceína e oxacilina sobre <i>S. aureus</i> BEC9393 sob diferentes concentrações de antibióticos.....	47
<b>Figura 13.</b> Valores de concentração inibitória mínima (CIM) obtidos na combinação entre violaceína e oxacilina na inibição de <i>S. aureus</i> Rib1. ....	49
<b>Figura 14.</b> Valores de concentração inibitória mínima (CIM) obtidos na combinação entre violaceína e oxacilina na inibição de <i>S. aureus</i> BEC9393. ....	50
<b>Figura 15.</b> Curva de teste de aditismo entre a violaceína e o antibiótico β-lactâmico oxacilina..	51
<b>Figura 16.</b> Curva de crescimento para avaliação da interação entre a violaceína e a vancomicina na inibição do crescimento de uma linhagem de <i>S. aureus</i> com fenótipo VISA.....	52
<b>Figura 17.</b> Micrografias eletrônicas de transmissão de <i>Salmonella enterica</i> LT2. ....	54
<b>Figura 18.</b> Linhagem de <i>S. aureus</i> Rib1 submetida a tratamento com violaceína (50 µM).....	55

<b>Figura 19.</b> Micrografia eletrônica de transmissão de <i>S. aureus</i> Rib1 submetida a duas horas de tratamento com violaceína (50 µM). .....	56
<b>Figura 20.</b> SDS-PAGE (15%) de proteínas totais de <i>Staphylococcus aureus</i> linhagens N315 e Rib1 na presença ou não de 50 µM de violaceína. ....	58
<b>Figura 21.</b> Gel bidimensional de <i>S. aureus</i> Rib1.....	60

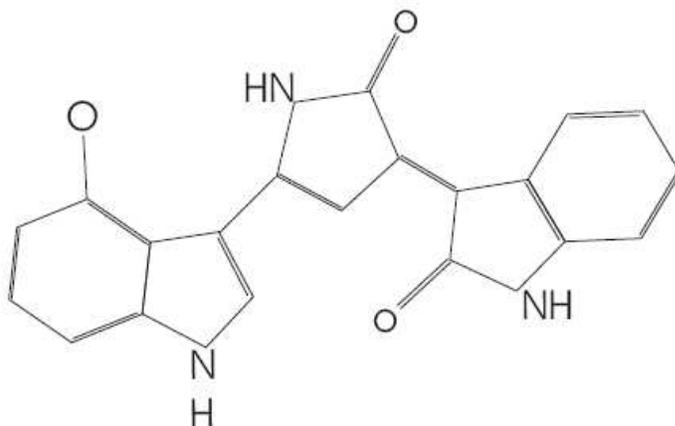
## SUMÁRIO DE TABELAS

<b>Tabela I.</b> Lista de bactérias Gram-positivas utilizadas neste trabalho.....	18
<b>Tabela II.</b> Lista de bactérias Gram-negativas.....	19
<b>Tabela III.</b> Bactérias submetidas ao tratamento com reserpina. ....	38
<b>Tabela IV.</b> Identificação das proteínas de <i>S. aureus</i> Rib1 com padrão de expressão alterado ....	61

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Violaceína

A violaceína é um pigmento arroxeado, produto derivado indol, formado a partir da condensação de duas moléculas de triptofano, caracterizada como 3-(1,2-dihidroxi-5-(5-hidroxi-1H-indol-3-il)-2-oxo-3H-pirrol-3-ilideno)-1,3 dihidro-2H-indol-2-ona (FERREIRA et al., 2004), conforme a Figura 1, produzida por linhagens e isolados de *Chromobacterium violaceum*, uma bactéria Gram-negativa encontrada em amostras de água e solos em regiões subtropicais e tropicais. *C. violaceum* é uma bactéria essencialmente saprófita, descrita como um patógeno oportunista, mas fatal, responsável por septicemias em animais, incluindo humanos, possuindo casos relatados no Vietnã, Taiwan, Malásia, Estados Unidos e Brasil (MARTINEZ, 2000; KIM et al., 2005).



**Figura 1. Estrutura química da violaceína. Pigmento derivado de duas moléculas de triptofano modificadas, consistindo de três núcleos principais: 5-hidroxiindol (à esquerda), oxiindol (superior direita) e 2-pirrol (centro), com peso molecular (P.M) 343,34 e um espectro de absorção de luz entre 575-600nm.**

O pigmento violaceína é produzido por um número limitado de espécies bacterianas Gram-negativas, além de *C. violaceum*, como as bactérias pertencentes ao gênero *Iodobacter* e o gênero *Janthinobacterium* como, por exemplo, *Janthinobacterium lividum*. Tais bactérias produtoras de violaceína compartilham um habitat comum, mas o papel deste pigmento na vida e no metabolismo bacterianos não está completamente compreendido. Há trabalhos que apontam

algumas propriedades antibióticas da violaceína, contra certos protozoários, certas espécies de bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, e contra alguns fungos, tal como *Candida* (LICHSTEIN e VAN DE SAND, 1948; LEON et al., 2001; ANDRIGHETTI-FRONHER et al., 2003; DESSAUX et al., 2004; FERREIRA et al., 2004; MATZ et al., 2004 apud PANTANELLA et al., 2006). Estas propriedades poderiam ter um papel muito importante na sobrevivência e na disseminação da bactéria produtora de violaceína em ambientes hostis, onde a bactéria compete por nutrientes e por certos nichos no ambiente. *C. violaceum*, assim como outras bactérias de ecossistemas aquáticos e terrestres, são expostas à predação por protozoários, sendo tal pressão um dos maiores fatores de redução de biomassa bacteriana. Há inúmeras alternativas encontradas pelas bactérias para evadirem da predação, seja através da sua morfologia, como por exemplo, colônia filamentosa, ou através de compostos secundários, muitos destes com atividades antibióticas e citotóxicas (MATZ et al., 2004).

A produção de compostos biologicamente ativos é algumas vezes correlacionada com a presença de pigmentos nos isolados ambientais (MATZ et al., 2004). Em muitos experimentos, com aumento da pressão predatória por protozoários, foi observado um acúmulo de linhagens pigmentadas na comunidade bacteriana (MATZ e JÜRGENS, dados não publicados apud MATZ et al., 2004). Tem sido sugerido que a formação de pigmentos pelas bactérias heterotróficas pode ter um papel protetor não somente contra a radiação solar, mas também contra a predação por protozoários (MATZ et al., 2004). Além da pressão predatória por protozoários, que pode ser presumida como uma força seletiva para a produção e estocagem de produtos metabólicos secundários pelas comunidades bacterianas, a competição bacteriana por recursos naturais limitantes é amplamente aceita como um fator seletivo para a biossíntese de compostos antimicrobianos (MATZ et al., 2004).

SINGH (1945) apud MATZ et al. (2004) constatou que certas colônias bacterianas com pigmentação vermelha, verde ou violeta não eram ingeridas por amebas do solo ou que estas inibiam o crescimento amebiano. MATZ et al. (2004) demonstraram que a violaceína era altamente tóxica para culturas de protozoários nanoflagelados, assim como linhagens com alta produção de violaceína provocavam mais rapidamente a diminuição de abundância de protozoários nanoflagelados, do que outras linhagens com menor produção em testes *in vitro*. Sugeriu-se, assim, a violaceína como um mecanismo de sobrevivência, altamente efetivo para a redução da predação das bactérias produtoras.

Estes dados inferem que a violaceína pode ser utilizada como um importante produto biotecnológico no combate de protozoários como apresentado pelos trabalhos de LEON et al. (2001) e DURAN e MENCK (2001), os quais relataram atividades antileishmaniais e antitripanossomatídeas, respectivamente. As propriedades biosintéticas e biológicas da violaceína têm sido extensivamente estudadas, e seu espectro de possível utilização foi muito ampliado, uma vez que foi constatada atividade antiviral para certas linhagens de vírus *Herpes simplex* e antitumorais (FERREIRA et al., 2004).

Tal constatação, somada com a observação de que, nas mortes provocadas por septicemias, na região das infecções, não se notava a presença de outros microorganismos, além de *C. violaceum*, o que levanta a suspeita de ação antibiótica da violaceína (DURÁN et al., 2001).

## **1.2 Resistência a antibióticos**

Desde a introdução da sulfonamida e da penicilina nas décadas de 1930 e 1940 respectivamente, a percepção mundial era de que as doenças infecciosas eram totalmente controladas pelos antibióticos (YONEYAMA e KATSUMATA, 2006).

No início da década de 1970 os médicos foram finalmente forçados a abandonar a crença de que com a vasta gama de agentes antimicrobianos, virtualmente todas as infecções bacterianas eram tratáveis. Seu otimismo foi abalado pela emergência de resistência a múltiplos antibióticos entre patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium tuberculosis* (LOWY, 2003).

A disseminação do uso de antibióticos impõe uma forte pressão seletiva para o desenvolvimento da resistência a antibióticos, o maior problema atual na saúde pública. (LEEB, 2004 apud YONEYAMA e KATSUMATA, 2006; PALUMBI, 2001 apud YONEYAMA e KATSUMATA, 2006). A real percepção que se deve ter é que a resistência a antibióticos é uma mera questão de tempo, uma vez que, quanto mais aumenta a frequência do uso de antibióticos, maior é a velocidade do desenvolvimento da resistência, diminuindo assim a efetividade dos antibióticos (DAVIES, 1994 apud YONEYAMA e KATSUMATA, 2006).

O surgimento de bactérias resistentes a drogas em níveis preocupantes em termos de saúde pública ocorre meses ou anos após a introdução de um novo antibiótico no uso clínico (WALSH,

2000 apud YONEYAMA e KATSUMATA, 2006; LIVERMORE, 2004 apud YONEYAMA e KATSUMATA, 2006). A resistência à penicilina, por exemplo, foi detectada poucos anos após a sua introdução em 1942 (TRAVIS, 1998 apud YONEYAMA e KATSUMATA, 2006) e a estreptomicina, um ano após sua descoberta em 1944 (DAVIES, 1994 apud YONEYAMA e KATSUMATA, 2006; WAKSMAN et al., 1945 apud YONEYAMA e KATSUMATA, 2006).

No caso excepcional da vancomicina, a resistência apareceu quase 30 anos – em 1987 - após o início de seu uso clínico. Se comparado a outros antibióticos, o aparecimento de bactérias de importância médica resistentes à vancomicina foi mais demorado sendo decorrente, em parte, pelo seu uso limitado nos primeiros 25 anos, quando outros antibióticos eram disponíveis durante a “era dos antibióticos” nas décadas de 1950 e 1960. Mas o uso indiscriminado de meticilina ou oxacilina, por exemplo, resultou na emergência das linhagens MRSA (*Staphylococcus aureus* meticilina resistente), que exibem resistência múltipla a antibióticos de estruturas não-correlacionadas. Por sua vez, *Enterococcus* vancomicina resistentes (VRE) surgiram em 1986 pelo uso disseminado da vancomicina, que era mantida como antibiótico de último recurso (WILLIAMS, 1996; COATES et al., 2002 apud YONEYAMA e KATSUMATA, 2006).

Com a descoberta de linhagens de *S. aureus* resistentes intermediárias a vancomicina em 1997, logo surgiram os primeiros casos de *S. aureus* resistentes a vancomicina (SIEVERT et al., 2002 apud YONEYAMA e KATSUMATA, 2006).

### **1.2.1. *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* é uma bactéria habitante comensal de humanos e outros animais. Em humanos, seu habitat primário é o trato respiratório superior, particularmente o epitélio que recobre as fossas nasais (FOSTER, 2004). Cerca de 20% da população está sempre colonizada por esta bactéria, cerca de 60% são carreadores intermitentes e 20% são não-carreadores. A taxa de infecção cresce consideravelmente em pacientes internados e em profissionais de saúde, como médicos, enfermeiros e auxiliares de enfermagem (FOSTER, 2004; GRUNDMANN et al., 2006).

*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 e uma série de toxinas que causam danos e destroem células e tecidos, atuando como enzimas

citolíticas ou superantígenos (FOSTER, 2004). Esta bactéria é causadora de uma gama de doenças em humanos caracterizadas por infecções localizadas ou disseminadas. Isso faz de *S. aureus* um dos principais agentes causadores de infecções nosocomiais e na comunidade (SALYERS e WHITT, 2002).

A introdução da penicilina na década de 1940 ofereceu uma oportunidade de tratar com sucesso infecções estafilocócicas severas. Entretanto, no mesmo ano que o primeiro sucesso clínico com penicilina foi relatado, foi descrita também uma enzima produzida por *S. aureus*, a penicilinase, agora conhecida por  $\beta$ -lactamase, produto do gene *blaZ*, que apresenta atividade proteolítica, quebrando o anel  $\beta$ -lactâmico (LOWY, 2003; HARDY et al., 2004). O gene *blaZ* é freqüentemente localizado em um plasmídio de alto peso molecular que contém genes de resistência a outras classes de antibióticos (LOWY, 2003). A partir disto, mais precisamente na década de 1960, a meticilina, uma penicilina semi-sintética resistente à atividade de  $\beta$ -lactamases, foi desenvolvida para combater essas linhagens. No entanto, um ano após sua introdução, o primeiro caso de *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) foi detectado e a primeira falha clínica com meticilina para o tratamento de *S. aureus* foi descrita (LOWY, 2003; HARDY et al., 2004; GRUNDMANN et al., 2006).

Amostras MRSA têm evoluído pela aquisição de um elemento genético conhecido como cassete *mec* cromossômico estafilocócico (*SCCmec*). Este cassete carrega o gene codificador de uma proteína ligante de penicilina (PBP) conhecida como PBP2A, que apresenta afinidade reduzida para antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo penicilinas semi-sintéticas e cefalosporinas (LOWY, 2003; HARDY et al., 2004; GRUNDMANN et al., 2006).

O *SCCmec* está inserido em um *locus* específico do cromossomo (*attB<sub>c</sub>*) localizado próximo a origem de replicação. A mobilidade deste elemento é mediada por recombinases específicas codificadas por genes localizadas dentro do elemento e por isso denominadas recombinases do cassete cromossômico (*ccrA/ccrB* ou *ccrC*) (GRUNDMANN et al., 2006). Até o momento, baseado no complexo de genes *mec*, *ccr* e genes adicionais, foram descritos cinco tipos de *SCCmec* (*SCCmec* I a V) e alguns variantes (GRUNDMANN et al., 2006).

Atualmente, na prática clínica, a oxacilina tem sido utilizada com freqüência muito maior que a meticilina, daí alguns autores utilizarem a designação ORSA ao invés de MRSA para amostras de *S. aureus* resistentes a estes antibióticos. No texto, utilizaremos a designação MRSA. Amostras MRSA geralmente são multiresistentes, ou seja, apresentam resistência a uma série de

antibióticos de uso clínico além da oxacilina, sendo que algumas destas marcas de resistência podem também estar presentes no SCC<sub>mec</sub> (LOWY, 2003; GRUNDMANN et al., 2006). Estas amostras, antes associadas predominantemente com infecções nosocomiais, começaram a serem isoladas com frequência em infecções adquiridas na comunidade (KOLLEF e MICEK, 2006; SABOL et al., 2006) e, por isso, receberam a denominação CA-MRSA para *S. aureus* metilina resistentes adquiridos na comunidade. Estas amostras apresentam SCC<sub>mec</sub> tipos IV e V. Observações clínicas e epidemiológicas indicam que amostras MRSA, particularmente as hospitalares, mas também amostras CA-MRSA, são geralmente mais virulentas que amostras sensíveis a metilina (MSSA) (LOWY, 2003; GRUNDMANN et al., 2006).

Devido a multiresistência a drogas exibida por amostras MRSA, a vancomicina, um antibiótico do grupo dos glicopeptídeos, surgiu como droga de escolha e, muitas vezes, como a última opção no tratamento de infecções causadas por MRSA. Contudo, com o passar do tempo, foram isoladas amostras com resistência intermediária a vancomicina (VISA) e mais recentemente, amostras resistentes a esta droga (VRSA) (TENOVER et al., 2001; LOWY, 2003; HARDY et al., 2004; APPELBAUM, 2006; GRUNDMANN et al., 2006; TIWARI e SEN, 2006), inclusive foram isoladas amostras VISA no Brasil (OLIVEIRA et al., 2001).

O mecanismo de resistência a vancomicina exibido por amostras VISA é complexo e envolve o espessamento da parede celular (LOWY, 2003). Por outro lado, a resistência exibida por amostras VRSA envolve a presença de elemento transferível contendo o *operon vanA* de *Enterococcus faecalis*. O *operon vanA* está envolvido na alteração de síntese de um precursor da parede, mais precisamente no peptídeo terminal D-Ala-D-Ala que é substituído por D-Ala-D-Lac. O novo dipeptídeo tem afinidade muito menor a vancomicina, quando comparado a D-Ala-D-Ala (LOWY, 2003).

Existem drogas que podem ser utilizadas no tratamento de infecções causadas por amostras MRSA e, particularmente, amostras VISA e VRSA, como quinupristina-dalfopristina e linezolida. No entanto, a aquisição de resistência a linezolida já foi descrita (LOWY, 2003), colocando em risco a eficiência de tais drogas e impondo a necessidade urgente na busca de novos antimicrobianos e novos alvos terapêuticos.

### **1.2.2 *Staphylococcus epidermidis***

*Staphylococcus epidermidis* é um estafilococo coagulase negativo (CNS) amplamente distribuído na superfície do corpo humano, e constitui, conjuntamente com os outros CNSs, a maior parcela das bactérias comensais da microbiota. *S. epidermidis* é o CNSs mais freqüentemente isolado e responsável por infecções. As infecções causadas por *S. epidermidis* são freqüentemente persistentes e recidivas, embora esta bactéria e outros CNSs sejam geralmente envolvidos na maioria das infecções relacionadas a implantes. Os CNSs são responsáveis por uma grande proporção das infecções de próteses de válvulas cardíacas (40-50%), próteses de articulações (20-50%) e a maioria das infecções após procedimentos neurocirúrgicos. A prevalência de linhagens meticilina resistentes de *S. epidermidis* (MRSE) e a emergência da resistência de vancomicina nesta espécie complicam ainda mais o tratamento destas infecções.

A emergência de linhagens *S. epidermidis* com capacidade superior de colonização de biomateriais implantados tem importantes implicações para o desenvolvimento e implementação de estratégias terapêuticas e medidas de controle de infecções. A inerente capacidade deste organismo de causar infecções decorre primeiramente por sua habilidade de formar biofilmes mucoides sobre superfícies inertes sintética de implantes cirúrgicos. Tal fator tem obtido sérias conseqüências clínicas, proporcionando o aumento de infecções crônicas e persistentes. As células bacterianas no biofilme são embebidas em uma matriz de exopolissacarídeos, que proporciona proteção à população bacteriana dos mecanismos de defesa do hospedeiro e dos agentes antimicrobianos (O’GARA E HUMPHREYS, 2001).

### **1.2.3 *Enterococcus***

Enterococos são bactérias Gram-positivas, comensais normais de humanos, adaptadas para ambientes ricos em nutriente, com baixos níveis de oxigênio e ecologicamente complexos da cavidade oral, trato gastrointestinal e vaginal. É o Gram-positivo predominante das fezes, com concentrações variando entre  $10^5$  e  $10^6$  UFC/g, embora sejam menos de 0,01% da microbiota intestinal (BRADLEY et al., 1994).

Enterococos são causa freqüente de uma gama ampla de doenças em humanos. São, freqüentemente, a causa de infecções no trato urinário, infecções circulatórias, endocárdio, abdômen, duto biliar, queimaduras, e implantes cirúrgicos. Embora os enterococos possam infectar o sistema nervoso central, pulmão, tecidos moles, sinos paranasais, ouvido, olhos e tecido peridontal, estas infecções são menos freqüentes.

*Enterococcus faecalis* causam de 80 a 90% das infecções causadas por enterococos em humanos. Nas décadas de 1970 e 1980, os enterococos estabeleceram-se como um dos maiores agentes de infecções hospitalares. Eles atualmente são a quarta causa principal de infecções adquiridas no ambiente hospitalar e a terceira causa principal de bacteremia nos Estados Unidos. A mortalidade entre pacientes com bacteremia varia de 12 a 68%, com morte devido à sepsis de enterococos entre 4 a 50% dos casos (BRADLEY et al., 1994).

#### **1.2.4 *Streptococcus pyogenes***

*Streptococcus pyogenes* é, entre os patógenos humanos, um dos mais flexíveis e prevalentes. É responsável por uma ampla gama de doenças, variando de infecções leves e auto-limitantes como faringites, escarlatina e impetigo, a doenças invasivas severas e de risco de morte como a fascite necrosante e a síndrome do choque tóxico estreptocócica. Curiosamente, *S. pyogenes* pode ser carregado sem sintomas, e de fato, um terço de todos os humanos estão colonizados por este patógeno. Além de doenças agudas, *S. pyogenes* pode provocar o desenvolvimento de severas seqüelas auto-ímmunes, como a febre reumática aguda, doença reumática cardíaca e glomerulonefrite aguda pós-infecção estreptocócica (MEDINA e LENGELING, 2005).

#### **1.2.5 *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva caracterizada como patógeno intracelular facultativo que provoca a sua captura em células não-fagocíticas e se dissemina de

célula a célula usando um processo de mobilidade baseado em actina. É frequentemente encontrada em alimentos ou disseminada no ambiente (RAMASWAMY et al., 2007).

*Listeria* é ubíqua no ambiente, e pode ser encontrada em animais selvagens e domésticos, solo, plantas e esgoto. Como ela é encontrada no solo e vegetação, *L. monocytogenes* é facilmente transmitida para rebanhos, e é frequentemente isolada em gado, ovelhas, galinhas e produtos derivados do leite, frutas e verduras (RAMASWAMY et al., 2007).

*L. monocytogenes* pode causar uma variedade de doenças, incluindo infecções na gravidez, variando desde uma leve febre à precipitação do parto, e meningite em recém-nascidos. Septicemia e meningite ocorrem em adultos cuja imunidade está debilitada, como pacientes sofrendo de câncer ou transplantados (RAMASWAMY et al., 2007).

### **1.2.6 *Acinetobacter baumannii***

*Acinetobacter baumannii* é uma Gram-negativa oportunista de difícil tratamento que tem se tornado freqüente em unidades de terapia intensiva (UTI). É associada mundialmente com surtos de infecções hospitalares. Como *Pseudomonas*, ela é intrinsecamente resistente a muitos antimicrobianos. *A. baumannii* freqüentemente coloniza UTIs e pode sobreviver em superfícies úmidas e secas por períodos prolongados. Cerca de um terço dos profissionais da saúde em UTIs possuem espécies de *Acinetobacter* colonizando as suas mãos. Assim como *Pseudomonas* também, *A. baumannii* ataca pacientes imunodeprimidos por doenças ou tratamento, e os pacientes com aparelhos invasivos, como respiradores artificiais. Foram também constatadas infecções de tecidos moles, do trato urinário, infecções associadas a cateteres e bacteremias primárias (SIEGEL, 2008).

*A. baumannii* está se tornando o patógeno nosocomial mais importante mundialmente, particularmente em pneumonias associadas a respiradores artificiais ou infecções sanguíneas em unidades de terapia intensiva. O seu tratamento está tornando-se mais difícil, devido à tendência de adquirir resistência a múltiplas classes de antibióticos (DOI et al., 2007).

### **1.2.7 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* é uma das espécies de um gênero de bacilos Gram-negativos estritamente aeróbios que são amplamente distribuídos na natureza como saprófitos ou patógenos de plantas, insetos e animais. *P. aeruginosa* é extremamente versátil bioquimicamente, e pode crescer em ambientes tão diversos como tanques de combustíveis e água destilada. Ela ataca carboidratos, oxidando-os. Em hospitais *P. aeruginosa* possui alta taxa de sobrevivência em ambientes relativamente úmidos, como pias, respiradores artificiais, umidificadores, entre outros, e é, ocasionalmente, encontrada nas mãos dos profissionais da saúde (PITT, 1986).

*P. aeruginosa* é um patógeno extremamente virulento e uma fonte de múltiplos tipos de infecções, incluindo pneumonia, infecções do trato urinário, bacteremia, e infecções de feridas. *P. aeruginosa* possui propriedades que a torna particularmente problemática no ambiente hospitalar, incluindo resistência inerente a muitas classes de antibióticos, a habilidade de adquirir resistência por mutação. Este patógeno possui mais capacidade de contornar as atividades dos antimicrobianos que virtualmente todos os outros microorganismos. Em muitos casos, as infecções por *P. aeruginosa* ocorrem em ambientes hospitalares com doenças associadas e o implante de cateteres e cirurgias. Há, entretanto, um aumento no número de casos de infecções na comunidade, em pacientes com doenças estruturais no pulmão ou hospitalização prévia, mas algumas vezes sem nenhum fator claro de predisposição (SIEGEL, 2008).

### **1.2.8 *Klebsiella pneumoniae***

*Klebsiella* é uma das causas principais de pneumonia adquiridas na comunidade (fora do ambiente hospitalar) ocorrendo freqüentemente em alcoólatras crônicos e mostrando anormalidades radiográficas características devido a severa infecção piogênica, a qual apresenta uma alta taxa de mortalidade de se não tratada. A vasta maioria das infecções de *Klebsiella*, entretanto, é associada com hospitalização. Como patógenos oportunistas, *Klebsiella* spp. primariamente ataca indivíduos que estão hospitalizados e sofrem de severas doenças como *diabetes mellitus* ou obstrução pulmonar crônica (PODSCHUN e ULLMANN, 1998).

Infecções nosocomiais de *Klebsiella* são causadas principalmente por *Klebsiella pneumoniae*, que é clinicamente a mais importante espécie do gênero. É estimado que cerca de 8% das infecções nosocomiais bacterianas são provocadas por *Klebsiella* spp. nos Estados Unidos e Europa. O trato urinário é o sítio mais comum de infecção. *Klebsiella* abrange cerca de 6 a 17% de todas as infecções urinárias e mostram uma grande reincidência em pacientes em risco, como pacientes com bexigas neuropáticas ou *diabetes mellitus*. *Shigella* é a segunda maior causa de infecções nosocomiais causadas por Gram-negativas, atrás de *Escherichia coli* (PODSCHUN e ULLMANN, 1998)..

*Klebsiella* spp. é ubíqua na natureza, e provavelmente compartilha dois habitats distintos, sendo um deles as águas superficiais, esgoto, solo e plantas, e o outro a superfície de mucosas de cavalos, porcos e humanos. *K. pneumoniae* é presente como saprófita na nasofaringe e no trato intestinal. Por ser uma Gram-negativa e, portanto, não obtendo boas condições de crescimento na pele humana, é considerada como um membro transiente da microbiota neste sítio (PODSCHUN e ULLMANN, 1998).

### 1.2.9 Enterobacterias

A emergência e disseminação da resistência entre Enterobacteriaceae estão dificultando o tratamento de sérias infecções hospitalares por criar espécies resistentes para todos os agentes de controle atualmente disponíveis. Aproximadamente 20% das infecções de *Klebsiella pneumoniae* em unidades de terapia intensiva nos Estados Unidos envolvem linhagens que não são susceptíveis às cefalosporinas de terceira geração. Tal resistência é tipicamente causada pela aquisição de plasmídios portadores de genes que codificam  $\beta$ -lactamases de amplo espectro (ESBLs), e estes plasmídios freqüentemente também portam outros genes de resistência. Linhagens de *K. pneumoniae* e *E. coli* ESBLs são relativamente comuns nos ambientes hospitalares e freqüentemente exibem resistência múltipla. Enterobactérias produtoras de ESBLs são atualmente encontradas também na comunidade *Salmonella* e outras enterobactérias produtoras de ESBLs podem causar gastroenterite, o que aumenta a relevância quando crianças requerem tratamento para infecções invasivas, devido à grande possibilidade de complicações no tratamento (PATERSON, 2006).

### **1.2.9.1 *Salmonella* spp.**

Doenças causadas por sorovares de *S. enterica* são especialmente prevalentes em países em desenvolvimento, como o Sudeste asiático, África e América do Sul. Desafios com linhagens de *Salmonella* resistentes a antibióticos infligem um grande desafio para o desenvolvimento de terapias aplicáveis nas condições destes países. Sorovares de *Salmonella enterica* *Typhi* e *Paratyphi* causam doenças sistêmicas que afetam cerca de 20 milhões de pessoas mundialmente, com 200.000 mortes por ano. Em países do Sudeste asiático, como Vietnã, a prevalência de salmoneloses tifóides é alta, e pacientes frequentemente sofrem de infecções recorrentes e recidivas (BOYLE et al., 2007).

### **1.2.9.2 *Shigella* spp.**

Shigeloses são um problema de saúde mundial, com quatro espécies de *Shigella* ocasionando-as, i.e, *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* e *S. sonnei* capazes de produzir doença. Os sintomas de shigelose incluem diarreia e/ou disenteria com fezes frequentemente mucóides sanguinolentas, dores abdominais e tenesmus (sensação de defecação incompleta). *Shigella* multiplica-se entre as células epiteliais do cólon, causa a morte celular e se dissemina lateralmente para infectar e matar a células epiteliais adjacentes, causando a ulceração da mucosa, inflamação e sangramento. A transmissão ocorre via alimento e água contaminados ou por contato pessoa-pessoa (NYOGI, 2005).

O gênero *Shigella* é uma bactéria Gram-negativa pertence à tribo Escherichia e à família Enterobacteriaceae. Em estudos de hibridização DNA-DNA, as espécies de *E. coli* e *Shigella* não puderam ser diferenciadas. Entretanto, o fenótipo de virulência de *Shigella* é um padrão distinto deste gênero. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) são muito similares bioquimicamente à *Shigella* e também provocam diarreia e/ou disenteria (NYOGI, 2005).

### **1.2.9.3 *Yersinia enterocolitica***

*Yersinia enterocolitica* é uma bactéria Gram-negativa que pode causar, no trato gastrointestinal, enterite aguda, e, especialmente em crianças, enterocolites, linfadenites e ileites terminais. Infecções clínicas podem originar-se da ingestão de microorganismos em alimentos e água contaminados ou por inoculação direta por transfusão sanguínea (BOTTONI, 1997).

## 2. JUSTIFICATIVA

Os trabalhos que demonstraram atividade antibiótica da violaceína contra bactérias, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas são, em sua maioria, contemporâneos ao trabalho de LICHSTEIN e VAN DE SAND em 1948. Estes trabalhos não utilizaram um método de purificação que oferecesse uma violaceína isenta de desoxiviolaceína (que não possui atividade antibiótica), além do fato de não seguirem a padronização do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). No presente trabalho, foi utilizada uma violaceína obtida através do método apresentado por RETTORI e DURÁN (1998), que oferece uma violaceína pura, isenta de desoxiviolaceína, além de os testes terem sido realizados segundo as padronizações do CLSI (2007).

A necessidade de um estudo como este se dá principalmente por, atualmente, ter sido observado um aumento considerável dos perfis de resistência das bactérias de interesse médico, como por exemplo, *Staphylococcus aureus*, a qual, desde o advento dos tratamentos com antibióticos, tem desenvolvido resistência para virtualmente todos os agentes antimicrobianos utilizados (HARDY et al., 2004). Desta forma, é imperativa a busca por novos antibióticos. A violaceína apresenta-se como uma boa opção, devido ao fato de ser uma molécula já caracterizada molecularmente, por haver recombinantes produtores desta molécula, e também métodos confiáveis de purificação. O próximo passo a ser dado é justamente sondar a sensibilidade de bactérias de importância médica que requerem novos agentes antimicrobianos, caracterizando a sensibilidade à violaceína e investigando o seu modo de ação.

A violaceína como composto antibiótico, pode ter as seguintes ações sobre bactérias: 1) bactericida (causa morte celular com redução do crescimento bacteriano maior ou igual a 80%); 2) bacteriostática (inibe o crescimento bacteriano com redução geralmente inferior a 80% já que não ocorre morte celular); ou 3) não apresentar atividade, ou seja, quando a bactéria é resistente ao mesmo, de acordo com CLSI (2007). Nas bactérias em que a violaceína atua de forma bactericida, é possível medir qual a concentração inibitória mínima (CIM) para cada isolado bacteriano em que o crescimento é inibido pelo composto, seja ele utilizado sozinho ou combinado com outros antibióticos.

A partir da determinação da CIM, pode-se estabelecer em qual fase do ciclo de crescimento do isolado a violaceína atua de forma mais significativa, através de curvas de

crescimento. Com isso, pode-se utilizar o tempo de exposição mínimo em que há redução de crescimento para verificar alterações morfológicas das células, assim como verificar a mudança do padrão de expressão de proteínas.

### 3. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos gerais:

- Caracterizar a atividade da violaceína sobre bactérias de interesse médico, classificando-a em bactericida ou bacteriostática.

- Investigar o modo de ação da violaceína nas espécies bacterianas em que foi observado efeito bactericida em baixas doses, buscando alterações morfológicas nas células.

Os objetivos específicos consistiram em:

- Avaliar o efeito bactericida ou bacteriostático da violaceína em bactérias de interesse médico, de forma a selecionar aquelas em que o efeito bactericida ocorreu nas menores concentrações de violaceína;

- Medir a concentração inibitória mínima da violaceína sobre diferentes espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas;

- Avaliar o efeito inibitório da violaceína sobre *Staphylococcus aureus*, isoladamente ou em associação com os antibióticos oxacilina e vancomicina, uma vez que diferentes espécies de *Staphylococcus* sp demonstraram sensibilidade pronunciada à violaceína;

- Estabelecer a cinética de crescimento de *S. aureus* e *Staphylococcus epidermidis* na presença de violaceína isoladamente ou combinada com oxacilina ou vancomicina;

- Analisar possíveis alterações morfológicas induzidas pela violaceína sobre *S. aureus*;

- Avaliar quais as proteínas são expressas diferencialmente pela ação da violaceína em *S. aureus*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Violaceína

A violaceína utilizada neste experimento foi gentilmente cedida pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Vasconcellos Antonio da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e pelo Prof. Dr. Néilson Eduardo Durán Caballero do Instituto de Química da UNICAMP. Para os experimentos, a violaceína foi diluída em dimetil sulfoxido (DMSO) absoluto (Sigma Aldrich, Inc, USA) para a concentração de 20 mM, mantida sob a proteção da luz e sob refrigeração (-20°C).

### 4.2. Amostras e Linhagens bacterianas

As amostras e linhagens bacterianas utilizadas neste estudo estão descritas nas Tabelas I e II. Foram caracterizadas as espécies *S. aureus*, incluindo linhagens MRSA (*S. aureus* meticilina resistente), VISA (*S. aureus* vancomicina intermediário), Hetero-VISA (padrão heterogêneo de resistência a vancomicina), *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC) e Enterohemorrágica (EHEC), *Salmonella enterica* sorovares Typhimurium, 4,[5],12:i:-, Enteritidis e Typhi, todas da subespécie I, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* e *Xanthomonas axonopodis* pv. *passifloraceae*. É importante salientar que em termos taxonômicos, *Shigella* sp e *Escherichia coli* deveriam compor um único gênero, devido à grande similaridade genética. Entre estas duas “espécies”, similaridade acima do valor utilizado para a classificação em uma mesma espécie (PENG et al., 2006). Contudo, seguindo outros autores e por critérios históricos, no texto utilizaremos o sistema antigo de classificação. Todas as bactérias citadas foram crescidas em caldo ou meio sólido Mueller-Hinton (Acumedia®), sendo as culturas crescidas a 37°C por 18 horas, exceto a linhagem de *X. axonopodis* pv. *Passifloraceae* mantida a 32°C por 56 horas e *Yersinia enterocolitica* a qual foi mantida a 30°C por 18 horas.

**Tabela I. Lista de bactérias Gram-positivas utilizadas neste trabalho.**

<b>Linhagem ou Amostra</b>	<b>Fonte</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 MSSA	LGBMOL
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 05923 MSSA	Prof. Dr. Nelson E. Duran Caballero
<i>Staphylococcus aureus</i> N315 MSSA	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Elsa Masae Mamizuka
<i>Staphylococcus aureus</i> Rib1 MRSA	Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
<i>Staphylococcus aureus</i> Rib 2 MSSA	Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
<i>Staphylococcus aureus</i> HC562 MRSA	Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
<i>Staphylococcus aureus</i> BEC9393 MRSA	Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
<i>Staphylococcus aureus</i> 16/4/4-1 MSSA	Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
<i>Staphylococcus aureus</i> 16/4/4-2 MSSA	Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
<i>Staphylococcus aureus</i> 16/4/4-3 MSSA	Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
<i>Staphylococcus aureus</i> 16/4/4-4 MSSA	Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
<i>Staphylococcus aureus</i> HV 27Hetero VISA MRSA	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Elsa Masae Mamizuka
<i>Staphylococcus aureus</i> HV 138 Hetero VISA MRSA	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> .Elsa Masae Mamizuka
<i>Staphylococcus aureus</i> VISA V15 MRSA	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Elsa Masae Mamizuka
<i>Staphylococcus aureus</i> VISA V7 MRSA	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Elsa Masae Mamizuka
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228 MSSE	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Ana Lúcia da Costa Darini
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Epi 1E MSSE	Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Epi 2E MSSE	Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Epi 4E MSSE	Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Epi 6E MSSE	Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Epi 7E MSSE	Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Epi 8E MSSE	Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Epi 9E MSSE	Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Epi 10E MSSE	Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Epi 11E MSSE	Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
<i>Staphylococcus epidermidis</i> Epi 12E MSSE	Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM2875 ou ATCC29213 VR	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Ana Lúcia da Costa Darini
<i>Enterococcus faecalis</i> 1814	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Ana Lúcia da Costa Darini
<i>Enterococcus faecalis</i> 6778	LGBMOL
<i>Enterococcus faecium</i> VSE1	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Ana Lúcia da Costa Darini
<i>Enterococcus faecium</i> VSE10	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Ana Lúcia da Costa Darini
<i>Enterococcus faecium</i> VSE21	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Ana Lúcia da Costa Darini
<i>Enterococcus faecium</i> VSE25	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Ana Lúcia da Costa Darini
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Maria Luiza Moretti
<i>Listeria monocytogenes</i>	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Elaine Cristina P. de Martinis

Legenda descrita na próxima página.

**Tabela II. Lista de bactérias Gram-negativas.**

<b>Linhagem ou Amostra</b>	<b>Fonte</b>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Prof. Dr. Roberto Martinez
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Ana Lúcia da Costa Darini
<i>Escherichia coli</i> EPEC 2398/69	Prof. Dr. Domingos da Silva Leite
<i>Escherichia coli</i> EPEC 0142:1/6	Prof. Dr. Domingos da Silva Leite
<i>Escherichia coli</i> EHEC 154.2(6)	Prof. Dr. Domingos da Silva Leite
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 4058	LGBMOL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 280	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Maria Luiza Moretti
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 399	Prof <sup>ª</sup> . Dr <sup>ª</sup> . Maria Luiza Moretti
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium LT2	Prof. Dr. Roy Curtiss III
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium UK1	Prof. Dr. Roy Curtiss III
<i>Salmonella enterica</i> I,4,[5],12:i:-	LGBMOL
<i>Salmonella enterica</i> Enteritidis	LGBMOL
<i>Salmonella enterica</i> Typhi	LGBMOL
<i>Shigella boydii</i> SBB 5608	Prof. Dr. Antony Maurelli
<i>Shigella dysenteriae</i> SD3818T	Prof. Dr. Antony Maurelli
<i>Shigella flexneri</i> SF2457T	Prof. Dr. Antony Maurelli
<i>Shigella flexneri</i> 13	LGBMOL
<i>Shigella flexneri</i> 28	LGBMOL
<i>Shigella sonnei</i> SSB5514	Prof. Dr. Antony Maurelli
<i>Yersinia enterocolitica</i> IP8240	LGBMOL
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>passifloraceae</i>	Instituto Biológico-IBSBF

Legenda: MSSA = *Staphylococcus aureus* meticilina-sensível; MRSA = *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente; MSSE = *Staphylococcus epidermidis* meticilina-sensível, VR= vancomicina resistente, VioS = violaceína sensíveis, VR= violaceína resistentes (CIM  $\geq$ 1mM); LGBMOL = Laboratório de Genômica e Biologia Molecular Bacteriana.

- Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Lúcia da Costa Darini: Universidade de São Paulo, Departamento de Análises Clínicas Toxicológicas e Bromatológicas. Av. do Café s/n, 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brasil
- Prof. Dr. Antony Maurelli: USU AG, – Milbrae- Califórnia, Estados Unidos da América.
- Prof. Dr. Domingos da Silva Leite: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Imunologia. 13081-862 - Cidade Universitária Zeferino Vaz, Barão Geraldo, Campinas, SP, Brasil
- Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elaine Cristina Pereira de Martinis: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Análises Clínicas Toxicologia e Bromatologia. Av. do Café s/n, Monte Alegre 14040-903 - Ribeirão Preto, SP – Brasil
- Prof<sup>ª</sup>Dr<sup>ª</sup> Elsa Masae Mamizuka: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Av. Lineu Prestes, 580 Butantã Cid. Universitária, Bloco17, Depto. Anal. Clínicas Butantã , 05508900 São Paulo, SP, Brasil.
- Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Luiza Moretti: Universidade Estadual de Campinas. Rua Alexandre Fleming, 40 Cid. Universitária Zeferino Vaz 13081-970 - Campinas, SP – Brasil
- Prof. Dr. Nelson E. Duran Caballero: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química-UNICAMP. 13085-970, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Barão Geraldo, Campinas, SP, Brasil
- Prof. Dr. Roberto Martinez: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Clínica Médica, Divisão de Moléstias Infecciosas e Tropicais. Avenida Bandeirantes, 3900 Monte Alegre 14049-900 - Ribeirão Preto, SP – Brasil
- Prof. Dr. Roy Curtiss III: Arizona State University, School of Life Sciences in the College of Liberal Arts and Sciences. Arizona, Estados Unidos da América
- Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Imunologia. - Caixa-Postal: 6109, 13081-862 - Cidade Universitária Zeferino Vaz, Barão Geraldo, Campinas, SP, Brasil.
- Instituto Biológico-IBSBF Laboratório de Bacteriologia Vegetal Rodovia: Heitor Penteado km3, CaixaPostal 170, 13001-970, Campinas, SP, Brasil
- LGBMOL: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Imunologia. Caixa-Postal: 6109, 13083-862, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, SP, Brasil

### **4.3. Determinação de concentração inibitória mínima de violaceína, oxacilina e vancomicina (CIM) e teste de toxicidade do DMSO**

Para avaliar o perfil de sensibilidade de diferentes bactérias mediante a violaceína, foi utilizado o método de microdiluição em caldo, conforme padronizado pelo CLSI (2007), utilizando microplacas de 96 *wells*.

Antes de iniciar os testes da concentração inibitória mínima, foi necessário um experimento para avaliar a toxicidade do DMSO para as células bacterianas, uma vez que a violaceína foi dissolvida nesta substância. O teste de inibição do DMSO sobre o crescimento bacteriano foi realizado de modo semelhante ao da violaceína, adicionando apenas meio Müller-Hinton (MH) concentrado duas vezes, e adicionando, nos poços da segunda fileira da microplaca, 50 µL de DMSO puro (Devido ao volume relativamente alto de DMSO foi utilizado o caldo Mueller Hinton duas vezes concentrado). A partir desta, foi realizada a microdiluição, conforme protocolo sugerido pelo CLSI (2007) sendo posteriormente, adicionados 50 µL das culturas bacterianas ( $10^6$  células/mL), obtidas através das diluições das amostras bacterianas ajustadas para a turbidez 0,5 da escala de MacFarland (aproximadamente  $10^8$  células/mL) seguida de uma diluição 1/100, diluídas também em meio MH concentrado duas vezes. Desta forma, o gradiente de concentração de DMSO testado variou de 50% a 0,78%. Após a incubação da cultura a 32°C por 56 horas para *X. axonopodis*, 30°C por 24 horas para *Yersinia* e para todas as demais por 18-24 horas a 37°C, a absorbância foi medida através de um leitor de ELISA (BioRad 3550) no comprimento de onda de 590 nm. Comparando a absorbância de cada poço contendo o DMSO com os poços controle (cultura bacteriana em meio MH), o qual foi denominado como crescimento absoluto (100%), pode-se medir a inibição efetuada pelo DMSO sobre as culturas bacterianas em valores relativos ao controle. Todas as amostras e linhagens bacterianas foram avaliadas quanto à sensibilidade ao DMSO.

Na avaliação de CIM para a violaceína, foram testadas todas as amostras e linhagens bacterianas descritas nas Tabelas I e II. Estas bactérias foram cultivadas em placas de meio MH agar e diluídas em salina até obter aproximadamente  $10^6$  células/mL. Em placas de microdiluição, foram adicionadas as suspensões de bactérias ( $10^6$  células/mL, com a concentração final na placa de  $5.10^5$  células/ml) e a violaceína em meio MH líquido, sendo que a concentração de violaceína testada variou de 1 mM a 15,625 µM.

Efetuada este procedimento, as culturas foram cultivadas a 37°C por 18-24 horas, (32°C por 56 horas para *X. axonopodis* e 30°C por 24 horas para *Yersinia*) e, com o auxílio de um Leitor de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) a absorbância foi medida no comprimento de onda de 590 nm. Comparando-se o resultado obtido com os poços da primeira fileira da microplaca, que possuíam culturas contendo apenas bactérias, com poços contendo violaceína foi possível constatar quais as concentrações de violaceína que inibiam o crescimento bacteriano. A menor concentração que foi capaz de inibir o crescimento bacteriano foi denominada como Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Com relação à determinação da CIM para a vancomicina e a oxacilina, apenas as amostras e linhagens de *Staphylococcus* foram avaliadas. Para a determinação da CIM para a vancomicina, a cultura foi mantida por 24 horas a 35°C. Já para a determinação da CIM da oxacilina, foi adicionado NaCl ao meio MH para a concentração final de 2%, como preconizado pelo CLSI, sendo a cultura incubada a 37°C por 24 horas.

Foram também realizados testes para avaliar o efeito conjunto da violaceína com oxacilina ou vancomicina. Para culturas na presença de violaceína + vancomicina, os procedimentos foram os mesmos citados acima. Já para o teste de interação entre violaceína e oxacilina, como mencionado acima, foi adicionado NaCl ao meio MH na concentração final de 2% p/v.

Os testes de CIM para a violaceína indicaram que a espécie mais sensível a este antibiótico foi *Staphylococcus* sp, incluindo *S. aureus* MRSA e *S. epidermidis*. Desta forma, o presente trabalho foi direcionado para um estudo mais aprofundado da atividade de violaceína sobre esta espécie.

#### **4.4. Avaliação de efeito bactericida ou bacteriostático da violaceína**

Para constatar se o efeito da violaceína sobre as espécies bacterianas era bactericida ou bacteriostático, foi utilizado o método de avaliação preconizado pelo CLSI (2007). O teste consistiu em cultivar as bactérias em meio Müller- Hinton agar (Acumedia®) com violaceína 50 µM (valor médio da CIM obtido com diferentes linhagens e amostras de *S. aureus* e *S. epidermidis*) e comparar o diâmetro das colônias das mesmas neste meio, em relação ao

crescimento em meio Müller-Hinton agar (MH agar) sem violaceína. Se em meio com violaceína as colônias possuísem uma redução igual ou superior a 80% em relação ao diâmetro observado nas placas controle, sem violaceína, o composto é caracterizado como bactericida. Se a redução for inferior a 80%, o composto é considerado bacteriostático.

#### **4.5. Inibição de sistemas de transporte (bombas de efluxo)**

A resistência a antimicrobianos pode resultar da modificação enzimática da droga, da alteração do alvo ou através do transporte ativo do antimicrobiano para fora da célula, por via de sistemas de bombas de efluxo, impedindo que o antibiótico atinja concentrações inibitórias no interior celular. A resistência por bombas de efluxo em *S. aureus* pode afetar a sensibilidade a muitas classes de drogas, incluindo tetraciclina, macrolídeos e fluorquinolonas. (DE MARCO et al., 2007). Um dos melhores testes disponíveis para se avaliar a participação de sistemas de efluxo na resistência bacteriana consiste na determinação da CIM para uma determinada droga na presença de inibidores de bombas de efluxo, como a reserpina, um alcalóide extraído de plantas, que é um inibidor de largo espectro de bombas de efluxo. (COLANGELI et al., 2005; SACCHETTINI e ALLAND, 2005)

Desta forma, a CIM da violaceína combinada com 25 µg/mL de reserpina foi determinada para algumas das bactérias das tabelas I e II, conforme item 4.3. Através da comparação da CIM da violaceína com reserpina, buscou-se avaliar a influência de bombas de efluxo na sensibilidade da violaceína. Como clorofórmio foi utilizado como diluente para a reserpina, foi utilizada uma placa-controle com apenas reserpina (diluída em clorofórmio).

#### **4.6. Testes com *Staphylococcus* sp.**

Os testes de CIM para a violaceína indicaram que a espécie mais sensível a este antibiótico foi *Staphylococcus* sp, incluindo *S. aureus* MRSA e *S. epidermidis*. Desta forma, como salientado anteriormente, todos os testes descritos a seguir foram realizados com *S. aureus* e ou *S. epidermidis*.

#### **4.7. Interação entre violaceína com oxacilina ou vancomicina na inibição do crescimento de *S. aureus*.**

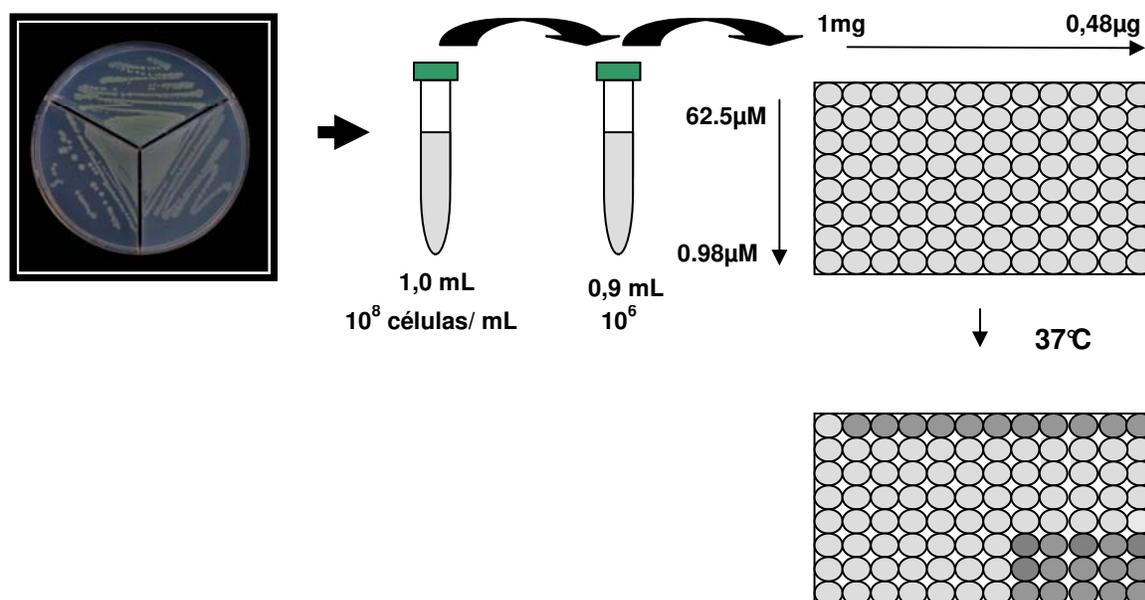
Como salientado, devido aos resultados de CIM, a atividade da violaceína foi focalizada para *Staphylococcus* sp. Desta forma, foi avaliada a interação da violaceína com os antibióticos oxacilina ou vancomicina, utilizados na terapia de infecções por *S. aureus* e *S. epidermidis*. Para tanto, elaborou-se uma metodologia denominada de teste de sinergismo, o qual consistiu de uma adaptação da técnica de microdiluição, realizada conforme o CLSI (2007). Esta metodologia envolveu a montagem de gradientes de concentração para dois antimicrobianos diferentes, de tal forma que o gradiente para um antimicrobiano foi montado nas colunas (vertical) e o de outro nas fileiras (horizontal), conforme demonstrado na Figura 2. No gradiente vertical, foi utilizada a violaceína, enquanto que na horizontal, foram preparados gradientes de oxacilina ou vancomicina. Assim, concentrações diferentes de dois antimicrobianos foram combinadas e a menor concentração dos dois que inibiu completamente o crescimento de *Staphylococcus* determinada.

Na placa de microdiluição foram adicionados 50 µL de meio MH esterilizado, exceto na segunda fileira (poços horizontais), na qual foi adicionado a violaceína diluída em meio Mueller Hinton (100 µL). A partir desta fileira, foram retirados 50 µL, que foram transferidos para a próxima fileira (terceira fileira horizontal) com o emprego de uma pipeta multicanal, sendo a suspensão homogeneizada através de várias pipetagens. Este procedimento foi repetido até a oitava e última fileira. Nesta última, após homogeneização, 50 µL da suspensão foram retirados e desprezados, de forma que no final, todos os poços continham o volume final de 50 µL. Este procedimento permitiu a construção do gradiente vertical de concentração.

O segundo composto a ser testado foi utilizado para criar um gradiente ao longo das colunas. Para isso, nos poços da primeira coluna da microplaca foram adicionados 100 µL de meio Mueller-Hinton (MH). A partir desta, por meio de sucessivas passagens de 50 µL de meio MH, o gradiente do segundo antibiótico foi montado ao longo das 12 colunas da microplaca, sendo que os 50 µL excedentes, presentes nos poços da última coluna foram desprezados. Terminado o segundo gradiente, efetuou-se a adição de 50µL por poço das bactérias em suspensão ( $10^6$  células/mL), conforme mencionado previamente, completando o volume para 100µL.

Quando foi utilizada a vancomicina na placa de interação, a cultura foi mantida por 24 horas a 35°C, enquanto que nas placas com oxacilina, foi preciso ajustar o meio MH com 2% de NaCl (concentração final) e as culturas cultivadas a 37°C por 24 horas.

O crescimento bacteriano no teste de interação foi determinado pela leitura da D.O (densidade óptica) no comprimento de onda de 590 nm. A CIM foi considerada a menor concentração de ambos os antibióticos que inibiram o crescimento bacteriano, normalmente visível como um quadrilátero com inibição de crescimento iniciando na extremidade inferior direita da placa.



**Figura 2.** Experimento de interação entre antimicrobianos. Foram montados gradientes de concentração de dois antibióticos organizados ao longo das fileiras e das colunas, respectivamente. Isso permitiu que diferentes concentrações de cada antibiótico fossem combinadas, indicando qual a menor concentração de cada um em combinação inibia o crescimento bacteriano.

#### 4.8. Curva de crescimento com violaceína

Foram realizadas curvas de crescimento onde o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foi determinado ao longo do tempo, para avaliar o efeito da violaceína sobre o crescimento bacteriano em função do tempo de exposição a esta molécula. Neste teste, foram

avaliadas somente as espécies *S. aureus* e *S. epidermidis*, que apresentaram valores de CIM para a violaceína próximos de 50  $\mu\text{M}$ . Este teste consistiu em incubar as células bacterianas em meio MH agar durante a noite. Uma alíquota desta pré-cultura foi diluída em meio MH até que atingisse a turbidez correspondente ao tubo 0,5 da escala MacFarland, equivalente a  $10^8$  células/mL. Em seguida, esta nova cultura foi diluída 100 vezes, para se alcançar  $10^6$  células/mL. A nova cultura foi dividida em dois frascos, sendo adicionada violaceína em um deles, para se obter a concentração final de 50  $\mu\text{M}$ . Ambas as culturas, com e sem violaceína (cultura controle), foram cultivadas em paralelo, nas mesmas condições (200 rpm e a  $37^\circ\text{C}$ ), sendo a UFC determinada em função do tempo de cultivo.

Antes da adição de violaceína, foi retirada uma alíquota da cultura, que após diluição seriada em salina 0,9%, foi utilizada para semear placas de meio sólido Müller-Hinton, tendo-se como objetivo determinar a UFC inicial da cultura (tempo 0). Tal procedimento foi também realizado ao longo do cultivo, na ausência e na presença de violaceína, inicialmente nos tempos de 0, 30 minutos, 1,2,4,5,7,10 e 24 horas e posteriormente apenas nos tempos de 0, 2, 5, 7, 10, 14 e 24 horas, para a determinação da UFC.

Como controle adicional, culturas de *S. aureus* e *S. epidermidis* foram cultivadas na presença de DMSO, uma vez que este composto é utilizado na suspensão de violaceína. O DMSO foi adicionado na concentração final de 2,5% (equivalente ao volume utilizado para uma concentração final de violaceína de  $500\mu\text{M}$ ) e a UFC comparada com a curva padrão. Neste experimento, foi utilizada a linhagem de *S. aureus* RIB1 como representativa.

#### **4.9. Curva de crescimento com adição de uma segunda dose de violaceína**

Como durante as curvas de crescimento foi constatado aumento da UFC bacteriana após 7 horas de cultivo, foi elaborada uma curva de crescimento com uma segunda adição de violaceína (mais uma dose de  $50\mu\text{M}$ ) na sétima hora de incubação, para verificar se o aumento da UFC era devido ao esgotamento de violaceína no meio. Este procedimento foi denominado de curva de crescimento com duas doses de violaceína.

#### **4.10. Varredura de mutantes resistentes a violaceína**

O aumento da UFC observado após 7-10 horas de crescimento na presença de violaceína poderia ser devido ao surgimento e seleção de mutantes resistentes a este pigmento. Para confirmar ou descartar esta hipótese, colônias resgatadas de culturas cultivadas na presença de violaceína após 24 horas de cultivo foram reavaliadas quanto a CIM por microdiluição, sendo os resultados comparados com os valores de CIM obtidos inicialmente. Para este experimento, a linhagem de *S. aureus* Rib 1 foi utilizada como padrão.

#### **4.11. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Análises da ultra-estrutura celular por MET foram realizadas para verificar possíveis alterações morfológicas em *S. aureus*, decorrentes da ação da violaceína. Para isso, linhagens bacterianas crescidas em placas de MH ágar (18 horas, 37°C) foram diluídas em meio MH até obterem-se  $10^6$  células/mL. Em seguida, a violaceína foi adicionada na concentração correspondente à concentração inibitória mínima (CIM) determinada previamente. Essas culturas bacterianas foram cultivadas (37°C, 200 rpm) em diferentes períodos de tempo (2, 3 e 5 horas).

Para cada experimento, uma das amostras não foi tratada com a violaceína representando, assim, o controle possuindo apenas DMSO. Após estes períodos, as culturas foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos e a 25°C. O precipitado foi fixado por 2 horas, em gelo, com 1 mL de glutaraldeído a 3% em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). Após a fixação, as amostras foram centrifugadas novamente (1000g por 10 minutos) a 25°C e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi lavado 3 vezes com o tampão fosfato. Em seguida, o material foi tratado por 1 hora, em temperatura ambiente, com OsO<sub>4</sub> 0,2 M em tampão fosfato. Após esse tratamento, o OsO<sub>4</sub> foi retirado e o material lavado 2 vezes com tampão fosfato. Após este último passo, o material foi desidratado com etanol em concentrações crescentes (50, 70, 90 e absoluto). Após a desidratação, o material foi tratado com resina para inclusão (EMBED 812) e as preparações foram transferidas para cápsulas “Beem” sob vácuo, com resina suficiente para cobrir o material.

As cápsulas “Beem” foram completadas com resina e deixadas em estufa a 60°C por 72 horas para polimerização. Os cortes do material foram feitos em ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT no Laboratório de Microscopia eletrônica, Instituto de Biologia, Unicamp) com cortes de 0,5 µm e ultrafino com 600 nm. Os cortes foram contrastados em acetato de uranila (4%) por 30 minutos e em citrato de chumbo (0,3%) por 3 minutos.

Finalmente, as imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de transmissão no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas. Estas análises foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Aureo Yamada do Instituto de Biologia da UNICAMP.

#### **4.12. Determinação de alterações na expressão protéica**

##### **4.12.1. Extração total de proteínas de *S. aureus***

As linhagens de *S. aureus* foram crescidas até a 37°C e 150rpm por 18 a 24 horas, seguidas de uma diluição na proporção 1/50 em 50mL de caldo Müeller Hinton e mantidas a 37°C a 150rpm por 4 horas, após este período adicionou-se violaceína para a concentração final de 50µM e no tubo controle adicionou-se o mesmo volume em DMSO. A cultura foi centrifugada a 1200 g a 4°C por 5 minutos e efetuaram-se três ciclos de lavagem com tampão TRIS-EDTA utilizando centrifugação a 1200g a 4°C por 5 minutos em cada, no final da terceira lavagem o precipitado foi ressuspendido com tampão Tris HCl pH 8,8 com 5U DNase e 20µL de coquetel de inibidores de proteases (Sigma Aldrich, Inc, USA) esta suspensão foi incubada a 37°C durante 1 hora na presença de 100 µg de lisoestafina (Sigma Aldrich, Inc, USA) para a quebra da parede celular. Terminada a incubação o material foi centrifugado a 1200g a 4°C por 5 minutos, em seguida, o material foi centrifugado a 1200 g durante 15 minutos, o precipitado foi ressuspendido em tampão de lise (TRIS HCl 1M pH 8,8, CHAPS 2%(Sigma-Aldrich, Inc, USA), DTT 1M (Sigma-Aldrich, Inc, USA), 20µL Coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, Inc, USA), 5 U DNase (Sigma-Aldrich, Inc, USA) e água ultrapura q.s.p 2ml). Terminado o tratamento o material é submetido à pressão por passagens repetidas em seringa de insulina até

redução considerável da viscosidade, o produto foi centrifugado a 1200g a 4°C por 5 minutos e o sobrenadante coletado e mantido a -80°C.

A concentração de proteínas em cada extrato foi, então, dosada através do método de Bradford (BRADFORD, 1976) e as proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 15%).

#### **4.12.2. SDS-PAGE**

Os extratos protéicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida, utilizando-se a técnica de SDS-PAGE para separar as proteínas de acordo com sua massa molecular. Para tal, foi utilizado um gel de separação a 15% e um gel de empacotamento a 5%. A preparação do gel e do tampão de corrida foi feita segundo a metodologia descrita por SAMBROOK e RUSSEL (2001). Proteínas extraídas de linhagens de *S. aureus*, tratadas e não-tratadas com violaceína em diferentes tempos de ação, foram corridas lado a lado no gel para futuras comparações dos perfis de proteínas. A corrida eletroforética prosseguiu até o corante marcador ter alcançado a extremidade inferior do gel. As bandas protéicas foram visualizadas após coloração por Comassie Blue e/ou por prata (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

#### **4.12.3. Gel Bidimensional**

A eletroforese bidimensional foi realizada de acordo com a metodologia descrita por SMOLKA et al. (2003). Antes da corrida, 5 µL de cada extrato protéico foi diluído para um volume final de 350 µL em tampão de diluição (8 mM uréia, 4% CHAPS, 2% anfólitos pH 3-10, 70 mM DTT e 0,001% azul de bromo fenol). Após centrifugação (800 g por 2 min), o sobrenadante foi usado para a primeira corrida. As amostras foram aplicadas nas fitas de IPG com a capacidade de separação por ponto isoelétrico (*pI*) em gradiente de pH 3-10 (Amersham®). Após 12 horas de hidratação, a corrida foi conduzida a 20 °C, por 1 hora a 500 V, a 1.000 V por mais uma hora e a 8.000V por 10 horas, utilizando o aparato IPGphor (Amersham®), mantendo uma corrente limite de 50 µA por fita.

Após a corrida em primeira dimensão, as fitas foram submetidas a tratamentos de redução e alquilação antes da corrida eletroforética de segunda dimensão. As fitas foram submersas por 10 minutos em tampão (50 mM Tris [pH6,8], 6 M uréia, 30% glicerol, 2% SDS e 2% de DTT) e por 10 minutos adicionais em mesmo tampão contendo 2,5% iodoacetoamida.

Após os passos de equilíbrio, as fitas foram lavadas com água destilada, submersas por alguns minutos em tampão de corrida (LAEMMLI, 1970) e imediatamente submetidas à segunda dimensão: eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE). A visualização dos “spots” protéicos foi feita através do método de coloração por Comassie Blue (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

#### **4.12.4. Espectrometria de Massas (MALDI -TOF)**

As “bandas” e “spots” protéicos diferencialmente expressos entre as linhagens de *S. aureus* tratadas e não-tratadas com violaceína foram extraídas dos géis cortando-se um segmento correspondente à região da banda ou do “spot” no gel. Os segmentos foram lavados com acetonitrila 100% e secos a vácuo. Em seguida, as proteínas foram digeridas com uma solução de tripsina (10 µg/µL) a 37°C durante 16 horas. Após a digestão, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante coletado.

As amostras foram secas a vácuo e purificadas, sendo misturadas com a matriz  $\alpha$ -ciano-4-ácido hidroxicinâmico (concentração de 1 mg de matriz para 50 uL de acetonitrila 60% + ácido trifluoacético q.s.p). As amostras foram aplicadas nas placas e analisadas por espectrometria de massas por MALDI-TOF, utilizando a infra-estrutura do Instituto de Biologia, Laboratório de Proteômica, UNICAMP- Campinas – SP, sob a orientação e colaboração do Prof. Dr. José Camillo Novello.

#### 4.12.5. Análise dos dados espectrométricos

Os espectros de massas dos peptídeos obtidos por MALDI-TOF foram analisados e a identificação dos peptídeos foi feita utilizando o programa MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu>) e os bancos de dados mais recentemente atualizados do NCBI e Swiss-PROT.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Teste de toxicidade do DMSO sobre bactérias

Tendo em vista que DMSO apresenta toxicidade já conhecida contra células procarióticas, os resultados para o mesmo foram fundamentais para o prosseguimento dos demais experimentos, no sentido de se confirmar que esta substância não teria influência sobre os resultados de suscetibilidade para a violaceína. Como será visto adiante, concentrações de 1mM de violaceína, que corresponderia a 5% de DMSO, não inibiu o crescimento da maioria das bactérias testadas. Dessa forma, pode-se concluir que o DMSO na concentração de 5% não foi inibitório para estas espécies bacterianas. No entanto, como *Staphylococcus* sp demonstrou-se sensível à violaceína, com CIM variando de 15 a 60 $\mu$ M, a avaliação da sensibilidade de *Staphylococcus* sp ao DMSO tornou-se imperativa.

Através do método de microdiluição em placa, utilizando duas linhagens de *S. aureus* como representativas (ATCC029213 e Rib1), chegou-se ao valor mínimo de DMSO (5%) que parecia influenciar o crescimento bacteriano, conforme demonstrado na Figura 3 (Painel A). DMSO a 2,5% parecia influenciar apenas marginalmente o crescimento bacteriano. Assim, optou-se por efetuar uma curva de crescimento utilizando DMSO na concentração de 2,5%, que é 10 vezes superior à maior concentração de DMSO que permanece após a diluição da violaceína a concentrações que inibem *Staphylococcus* sp. Para este experimento utilizou-se a linhagem de *S. aureus* Rib1. Os resultados obtidos na comparação dos valores de UFC na amostra tratada com 2,5% DMSO apontaram apenas uma leve inibição nas primeiras duas horas de crescimento, mas nenhum efeito inibitório após este período, sendo que os valores de UFC apresentaram-se

levemente maiores que os obtidos no experimento controle, onde *S. aureus* Rib1 foi cultivado na ausência de DMSO (Figura 3B). As diferenças observadas nos valores de UFC não foram estatisticamente significantes, sendo, portanto, devidas a variações amostrais. Desta forma, podemos concluir que o DMSO não inibe o crescimento de *S. aureus*, não influenciando os resultados verificados de sensibilidade a violaceína, uma vez que neste teste a concentração encontra-se cerca de 10 vezes maior que às concentrações utilizadas nos experimentos de suscetibilidade.

Com base nestes resultados, fizemos a suposição que os mesmos valores são verdadeiros para *S. epidermidis* e *Xanthomonas axonopodis*. No entanto, este experimento deverá ser realizado também com estas espécies.

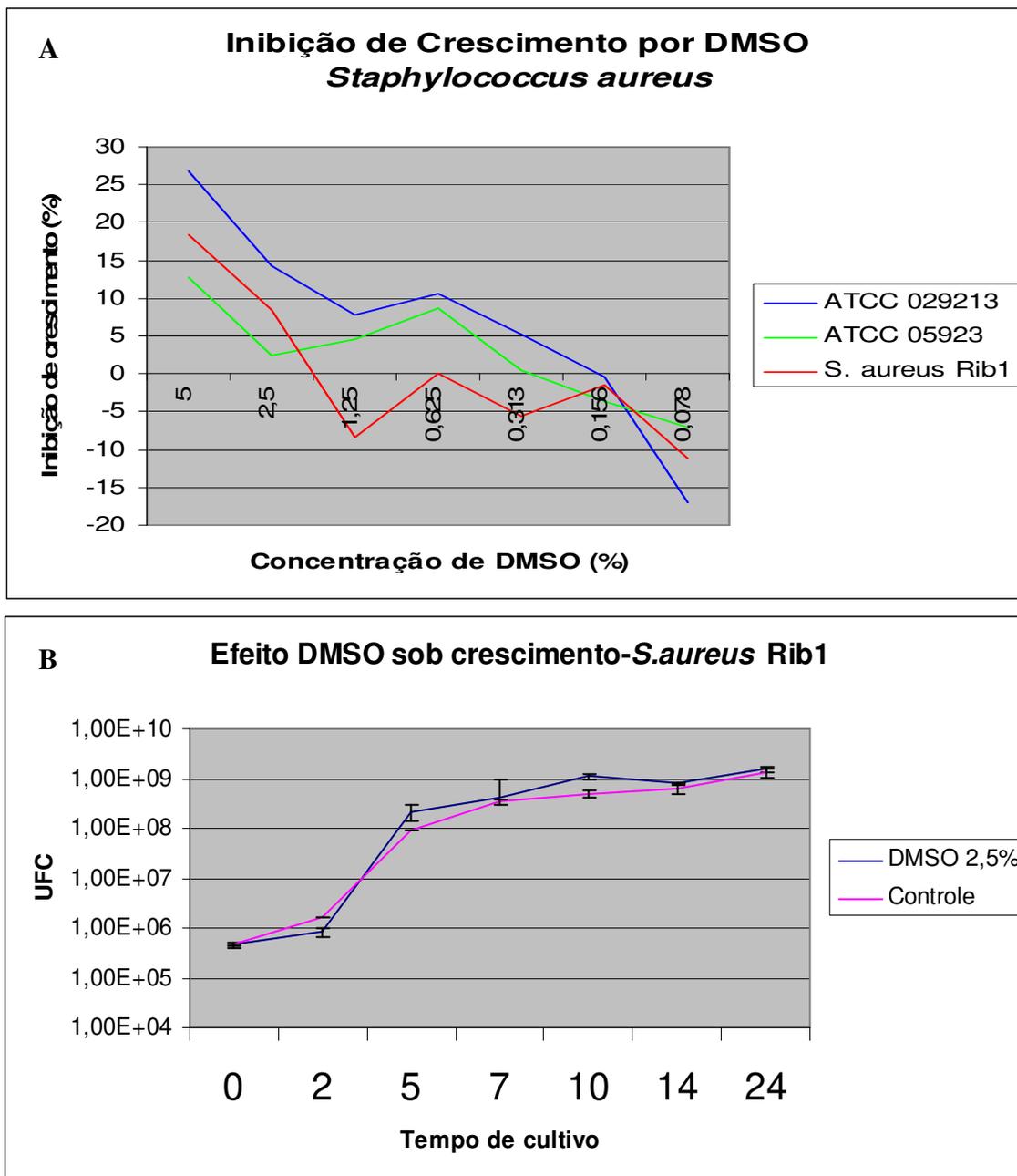


Figura 3. Crescimento de *Staphylococcus aureus* Rib1 e ATCC029213 na presença e na ausência de DMSO. A) Método por microdiluição, onde as linhagens de *S. aureus* Rib1 e ATCC099213 foram avaliadas; B) Curva de crescimento de *S. aureus* Rib1 na presença de 2,5% DMSO.

## 5.2. Determinação de concentração inibitória mínima para a violaceína (CIM)

A determinação da CIM como descrita no item 4.3 foi restrita a concentração máxima de 1 mM de violaceína, uma vez que levando em consideração que esta molécula apresenta toxicidade, valores superiores a este certamente não poderiam ser utilizados como agente antimicrobiano para fins terapêuticos. Desta forma, bactérias que possuem CIM superior a esta concentração foram consideradas com CIM >1mM.

Com exceção de *Staphylococcus* sp, *X. axonopodis* pv. , *P. aeruginosa* e *S. pyogenes* todas as demais espécies bacterianas avaliadas apresentaram CIM superior a 1 mM. Os valores de CIM da violaceína para *P. aeruginosa* e *S. pyogenes* (dados não mostrados) foram superiores aos observados para *S. aureus* e *S. epidermidis*. Assim sendo, a violaceína apresentou grande potencial para ser utilizada como agente antimicrobiano no controle de *Staphylococcus* sp e *Xanthomonas axonopodis*, bactérias Gram-positivas (G+) e Gram-negativas (G-), respectivamente. Bactérias G+ e G- são derivadas de ramos evolutivos distintos, apresentando diferenças morfológicas e fisiológicas consideráveis (FENG, 1997). Os resultados de sensibilidade a violaceína apontam para um mecanismo de ação que independe de características fisiológicas e ou morfológicas particulares de G+ ou G-.

Os valores de CIM da violaceína para a linhagem de *X. axonopodis* e para as diferentes linhagens ou isolados de *S. aureus* e *S. epidermidis* variaram entre 15-30 µM, exceto para as linhagens de *S. aureus* VISA e Hetero-VISA (com resistência heterogênia, mas aumentada a vancomicina) onde valores CIM superiores a 60µM foram observados (Figura 4).

A menor sensibilidade a violaceína exibida por linhagens VISA e Hetero-VISA é interessante e merece algumas considerações. *S. aureus* VISA e Hetero-VISA apresentam espessamento da parede celular (OLIVEIRA et al., 2001) o que sugere que a violaceína possa atuar diretamente nesta estrutura ou influenciar de alguma forma seu metabolismo.

Considerando os resultados de CIM, o enfoque deste trabalho foi direcionado para *Staphylococcus* sp. Embora os dados obtidos com *X. axonopodis* são igualmente importantes, abrindo perspectivas do uso da violaceína no controle de bactérias patogênicas para plantas, o estudo de fitopatógenos foge ao nosso objetivo central.

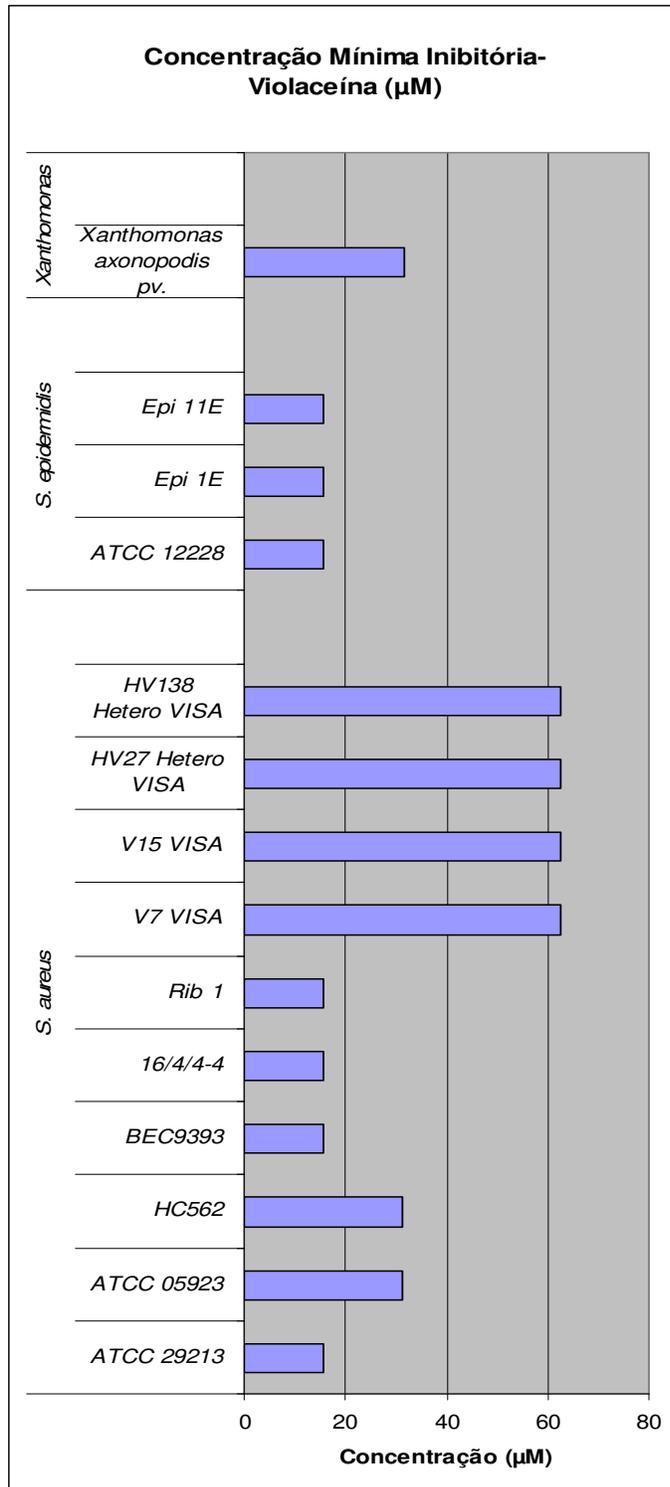


Figura 4. Concentração inibitória mínima de violaceína para isolados ou linhagens de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *X. axonopodis*. Os valores são apresentados em µM. Estas medidas foram repetidas ao menos três vezes.

Assim, considerando o enfoque do trabalho, a CIM das linhagens e isolados de *S. aureus* e *S. epidermidis* foi determinada para dois importantes antibióticos de uso clínico no tratamento de infecções causadas por estas bactérias, a oxacilina que, além de antibiótico, funciona como um importante marcador de resistência, pois geralmente a resistência a este composto é acompanhada de resistência a vários compostos, assim como a vancomicina, que é um antibiótico de último recurso na clínica médica. Estes resultados, além de confirmarem a manutenção fenotípica destas características de resistência, possibilitam avaliar o resultado da interação entre estas drogas, indicando se em combinação, tais antimicrobianos apresentam atividades aditiva, sinérgica ou antagônica.

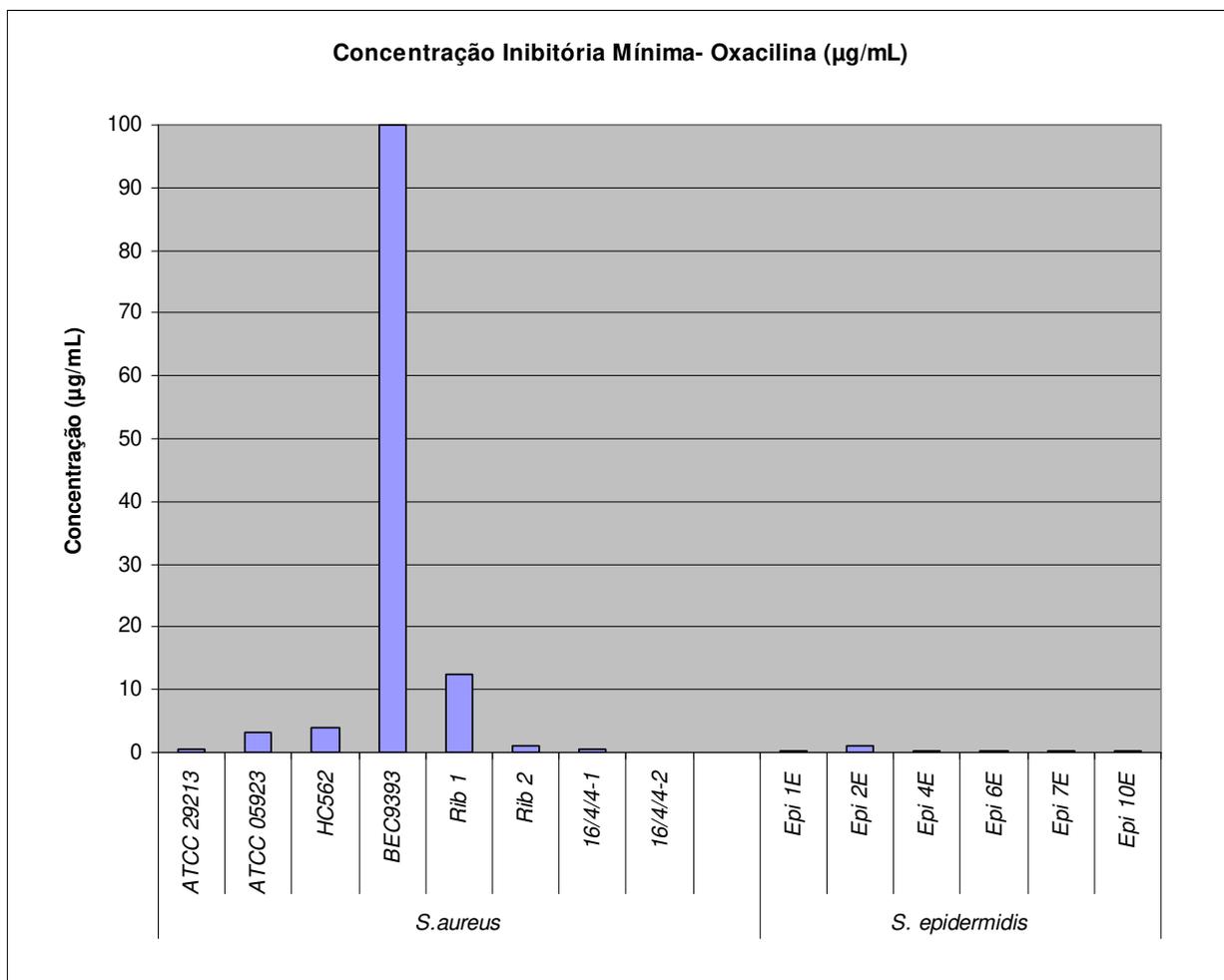
### **5.2.1. Concentração inibitória mínima para oxacilina**

As amostras e linhagens de *S. aureus* e *S. epidermidis* foram selecionadas conforme o padrão de sensibilidade / resistência a oxacilina. No entanto, para homogeneizar os resultados, a CIM para a oxacilina foi determinada novamente sob nossas condições experimentais. A resistência a oxacilina / meticilina é uma característica importante, uma vez que ela é um importante marcador de isolados multi-resistentes. Os valores de CIM obtidos para a oxacilina estão descritos na Figura 5. Como esperado, as linhagens BEC 9393 (clone brasileiro de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente) e Rib1 (isolado hospitalar meticilina resistente), apresentaram valores de CIM superiores a 4µg/mL, acima da concentração limite de bactérias sensíveis, como padronizado pelo CLSI (2007). As linhagens VISA e HeteroVISA não foram avaliadas, uma vez que apresentam perfil marcadamente de meticilina-resistentes.

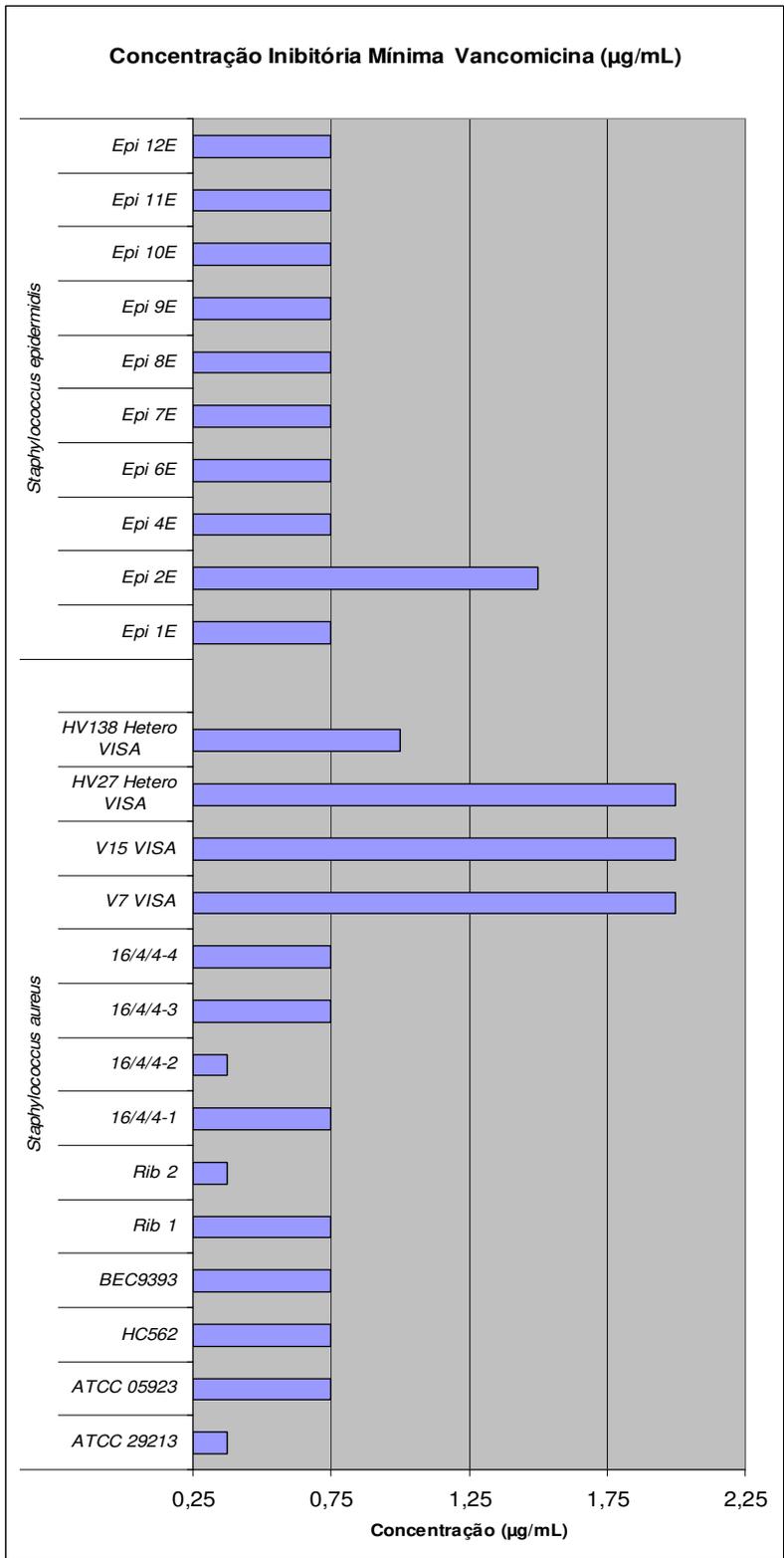
### **5.2.2. Concentração inibitória mínima para vancomicina**

Como a vancomicina é quase sempre o antibiótico de último recurso, a resistência a este antibiótico é utilizada como um marcador importante para isolados de *S. aureus*. As linhagens Hetero VISA e VISA (Vancomycin Intermediary *Staphylococcus aureus*) de *S. aureus* apresentam padrão intermediário de resistência a vancomicina, resultante de um espessamento da

parede celular. No entanto, esta característica é resultado de alterações fisiológicas complexas existindo a necessidade de constantes seleções em meio de cultura com vancomicina. Desta forma, a CIM para a vancomicina foi reavaliada como um controle adicional aos experimentos. Como esperado, as amostras ou linhagens VISA e Hetero VISA apresentaram valores superiores de CIM quando comparadas às outras linhagens de *S. aureus* (Figura 6), mas com níveis inferiores ao descrito na literatura (OLIVEIRA et al., 2001), provavelmente decorrente da descontinuidade da pressão seletiva pela presença da vancomicina, como observado por OLIVEIRA et al. (2001).



**Figura 5.** Concentração inibitória mínima (CIM) para oxacilina de isolados ou linhagens de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Os valores de CIM estão expressos em µg/mL.



**Figura 6.** Concentração inibitória mínima (CIM) para vancomicina de isolados ou linhagens de *S. aureus* e *S. epidermidis*. Os valores de CIM estão expressos em µg/mL.

### 5.3. Resistência a violaceína por bomba de efluxo

Foi analisada a participação de sistemas de efluxo no perfil de sensibilidade à violaceína para determinadas bactérias que apresentaram uma CIM superior a 1mM (Tabela III). Seguindo o protocolo descrito no item 4.3, com adição de reserpina na concentração final de 25µg/mL à violaceína. Montou-se uma placa controle apenas com a reserpina, que não apresentou inibição no crescimento bacteriano.

Através do uso da reserpina não foram encontradas alterações nos valores de CIM (violaceína e violaceína + reserpina), indicando que a resistência a violaceína parece não ser devida a sistemas de bombas de efluxo, ao menos aos sistemas que são inibidos pela reserpina.

**Tabela III. Bactérias submetidas ao tratamento com reserpina.**

#### **Bactérias testadas**

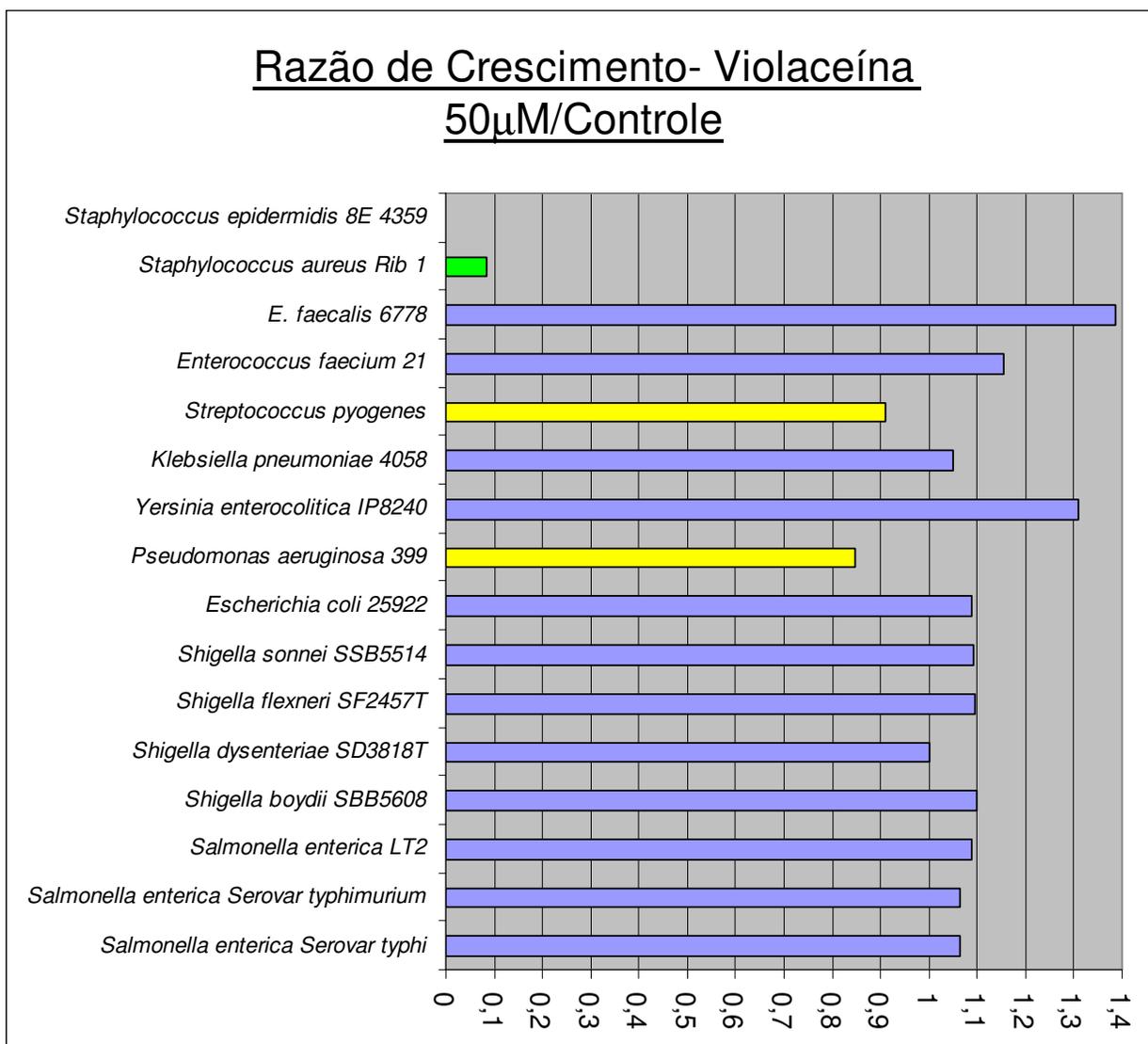
<b>Gram (+)</b>	<b>Gram (-)</b>
<i>Enterococcus faecalis</i> 1814	<i>Escherichia coli</i> EPEC 0142:1/6
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 2875	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 4058
<i>Enterococcus faecium</i> VSE 1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 280
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 399
	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium LT2
	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium UK1
	<i>Shigella flexneri</i> SF2457T

### 5.4. Avaliação de efeito bactericida ou bacteriostático da violaceína

O efeito bactericida ou bacteriostático da violaceína foi avaliado pela comparação dos diâmetros dos halos de crescimento em placas contendo ou não violaceína. Considerando os valores de CIM médios para violaceína (15-30µM) apresentados por *S. aureus* e *S. epidermidis*, uma concentração um pouco superior a CIM (50µM) foi escolhida para este teste. Entre as diferentes espécies bacterianas testadas, a violaceína demonstrou ter efeito bactericida apenas sobre espécies do gênero *Staphylococcus*, tais como *S. aureus* e *S. epidermidis*, enquanto que atividade bacteriostática foi verificada sobre *P. aeruginosa* e *S. pyogenes* (Figura 7). Estes

resultados corroboram o teste de CIM, uma vez que apenas estas espécies apresentaram valores de CIM inferiores a 1mM.

Este suposto direcionamento de atividade da violaceína não se apresenta de acordo com a literatura, como reportado por DURÁN et al. (1983). Provavelmente, o número pequeno de espécies bacterianas sensíveis a violaceína pode ser decorrente do número relativamente restrito de bactérias testadas. Sugere-se, portanto, que a violaceína representa uma molécula estrategicamente produzida para proteger bactérias contra a predação por protozoários nanoflagelados, o que justificaria sua atividade sobre protistas. Mas também a violaceína apresentaria uma função estratégica na competição por recursos com outras bactérias ambientais, grupo no qual seria esperada uma gama muito maior de bactérias sensíveis a este composto (MATZ et al., 2004), como visto para o fitopatógeno *Xanthomonas axonopodis*, que apresentou sensibilidade semelhante à *Staphylococcus*, como visto através de seu CIM na Figura 4.



**Figura 7. Avaliação da atividade bactericida/bacteriostática da violaceína pela comparação do crescimento na presença e ausência de violaceína (50 µM), indicando atividade bactericida para o gênero *Staphylococcus* (barras verdes), e atividade bacteriostática para *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pyogenes* (barras amarelas). Bactérias que não apresentaram sensibilidade significativa na concentração de violaceína utilizada (50 µM) estão apresentadas em roxo.**

### 5.5. Curva de crescimento com violaceína

Para analisar a cinética de morte provocada pela violaceína sobre *S. aureus* e *S. epidermidis*, foi efetuada a curva de crescimento na presença de 50µM de violaceína, valor este levemente superior aos valores de CIM (15-30µM) obtidos para estas espécies, sendo o crescimento comparado com a curva controle (meio MH sem violaceína). Nestas condições, foi observada inibição significativa do crescimento bacteriano a partir da segunda hora de exposição a violaceína, com a maior inibição observada após cerca de sete horas de incubação. No entanto, esta inibição do crescimento foi invariavelmente acompanhada pelo aumento da UFC após 7-10 horas de cultivo (Figuras 8A e B). É importante ressaltar que a linhagem BEC9393, a linhagem resistente a oxacilina com os maiores valores de CIM, foi igualmente inibida pela violaceína na concentração de 50µM, indicando não existir relação entre a resistência entre estes antibióticos (Figura 8B). É importante também ressaltar que a diminuição da UFC para valores inferiores a 3 logs indica efeito bactericida, o que pode ser verificado tanto para *S. aureus* quanto para *S. epidermidis* (Figura 8A e B), confirmando assim os resultados obtidos com a diminuição do halo de crescimento (Figura 7). Os resultados obtidos com *S. epidermidis* ATCC12228 demonstraram ainda maior sensibilidade a violaceína (dados não mostrados).

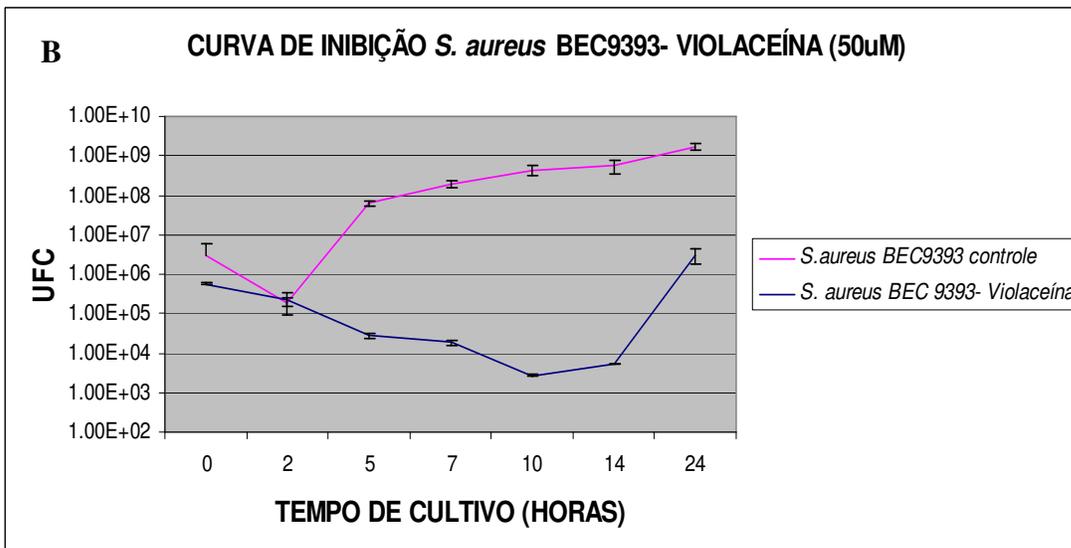
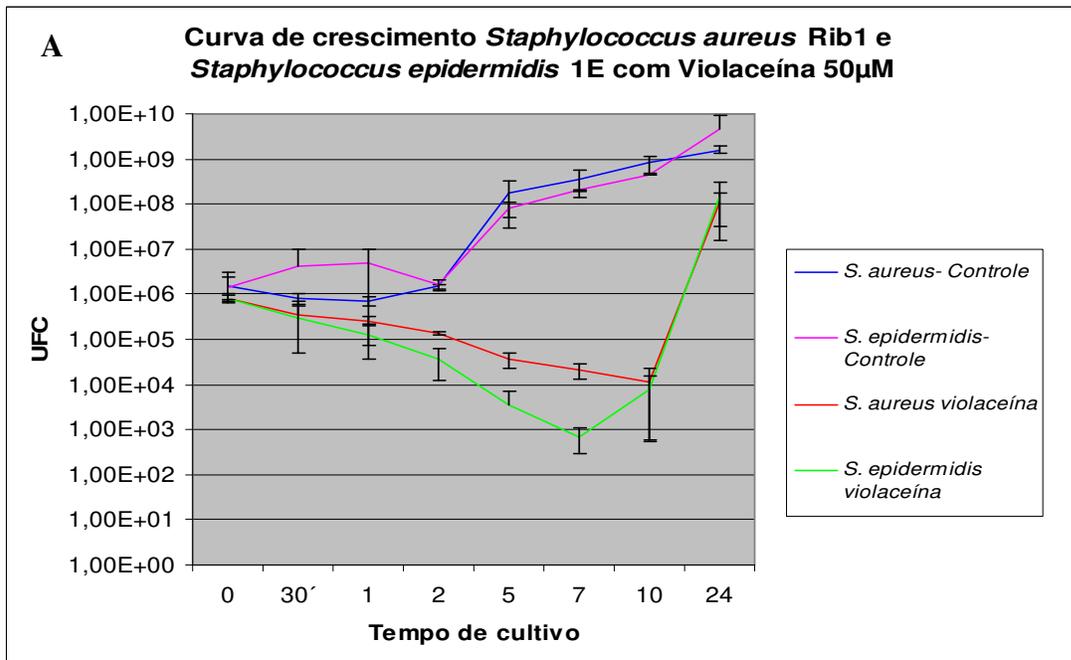


Figura 8. Curva de crescimento de *S. aureus* Rib1 e *S. epidermidis* na presença de violaceína (50µM). A) Resultados obtidos com *S. aureus* Rib1 e *S. epidermidis* 1E; B) Resultados obtidos com *S. aureus* BEC9393.

## 5.6. Varredura por mutantes

Para avaliar se o crescimento observado após 7-10 horas de incubação na presença de violaceína (50  $\mu\text{M}$ ) é decorrente da seleção de clones bacterianos resistentes, foram coletadas alíquotas de culturas crescidas na presença de violaceína (50  $\mu\text{M}$ ) após 24 horas de cultivo a 37°C e após diluições seriadas em solução salina 0,9%, foram plaqueadas em meio MH sólido e a nova cultura incubada a 37°C por 18 horas. Este procedimento foi realizado com *S. aureus* Rib 1 e *S. epidermidis* 1E. Após o cultivo em meio sólido, dez colônias isoladas de cada linhagem foram recuperadas e caracterizadas quanto a CIM para a violaceína, sendo os resultados comparados com os valores de CIM previamente obtidos, como mencionado ao final do item 4.3. A lógica deste experimento é verificar se clones bacterianos com mutações que conferem resistência a violaceína foram selecionados na presença desta molécula e acumularam após 7-10 horas de cultivo. Se este fosse o caso, os clones apresentariam aumento na CIM para a violaceína.

Entretanto, não foram observadas alterações nos valores de CIM (Figura 9). Desta forma, o crescimento observado pode ser decorrente de: esgotamento ou inativação da violaceína ou um estado metabólico não-responsivo a esta molécula.

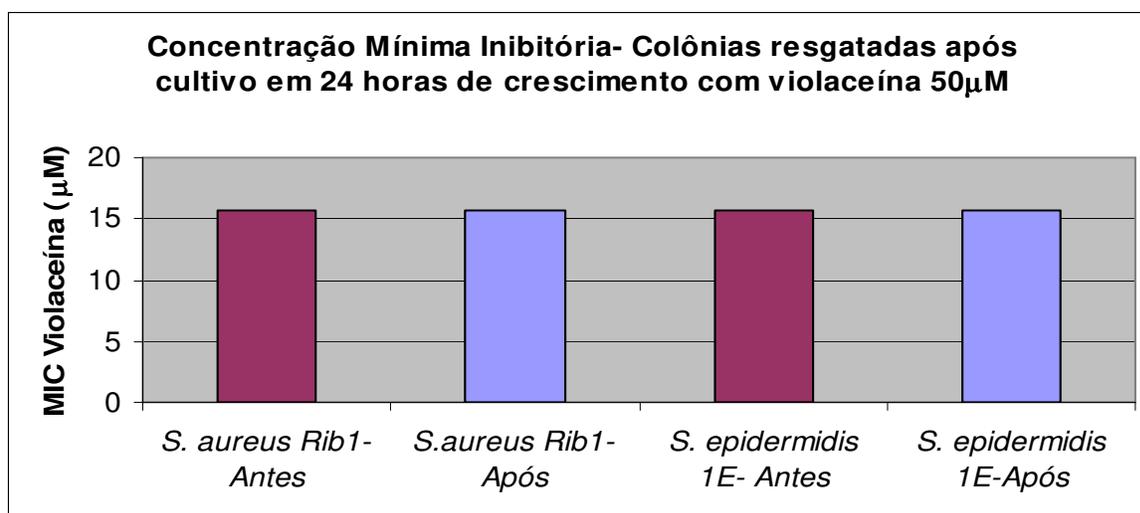


Figura 9. Concentração inibitória mínima das linhagens de *S. aureus* Rib 1 e *S. epidermidis* 1E antes a após cultivo na presença de violaceína. Foram testadas dez colônias de cada linhagem que foram recuperadas após 24 horas de crescimento na presença de violaceína (50  $\mu\text{M}$ ).

### 5.7. Curva de crescimento com duas adições de violaceína

Para confirmar a possibilidade de esgotamento da violaceína no meio, foi efetuada uma curva de crescimento com uma dose adicional de violaceína, tanto para *S. aureus* Rib1 quanto para *S. epidermidis* 1E. Neste experimento, foi observada apenas uma pequena redução, cerca de dois logaritmos, no número de unidades formadoras de colônias (UFC). Comparando-se as curvas de crescimento com uma (tempo 0) ou duas doses (tempos 0 e 7 horas) de violaceína (Figura 10A e B), pode ser descartada a hipótese de esgotamento do composto como o principal responsável pelo aumento na UFC, sendo provavelmente decorrente de um estado metabólico não responsivo. Ainda, para verificar se concentração maior de violaceína, administradas uma única vez, no início do crescimento, poderia inibir o aumento da UFC posteriormente, a curva de crescimento de *S. aureus* Rib 1 foi avaliada na presença de 100 $\mu$ M de violaceína. No entanto, o comportamento da curva foi semelhante ao observado com metade da concentração, embora a inclinação da curva tenha diminuído, indicando uma maior dificuldade bacteriana em recuperar o crescimento (Figura 11).

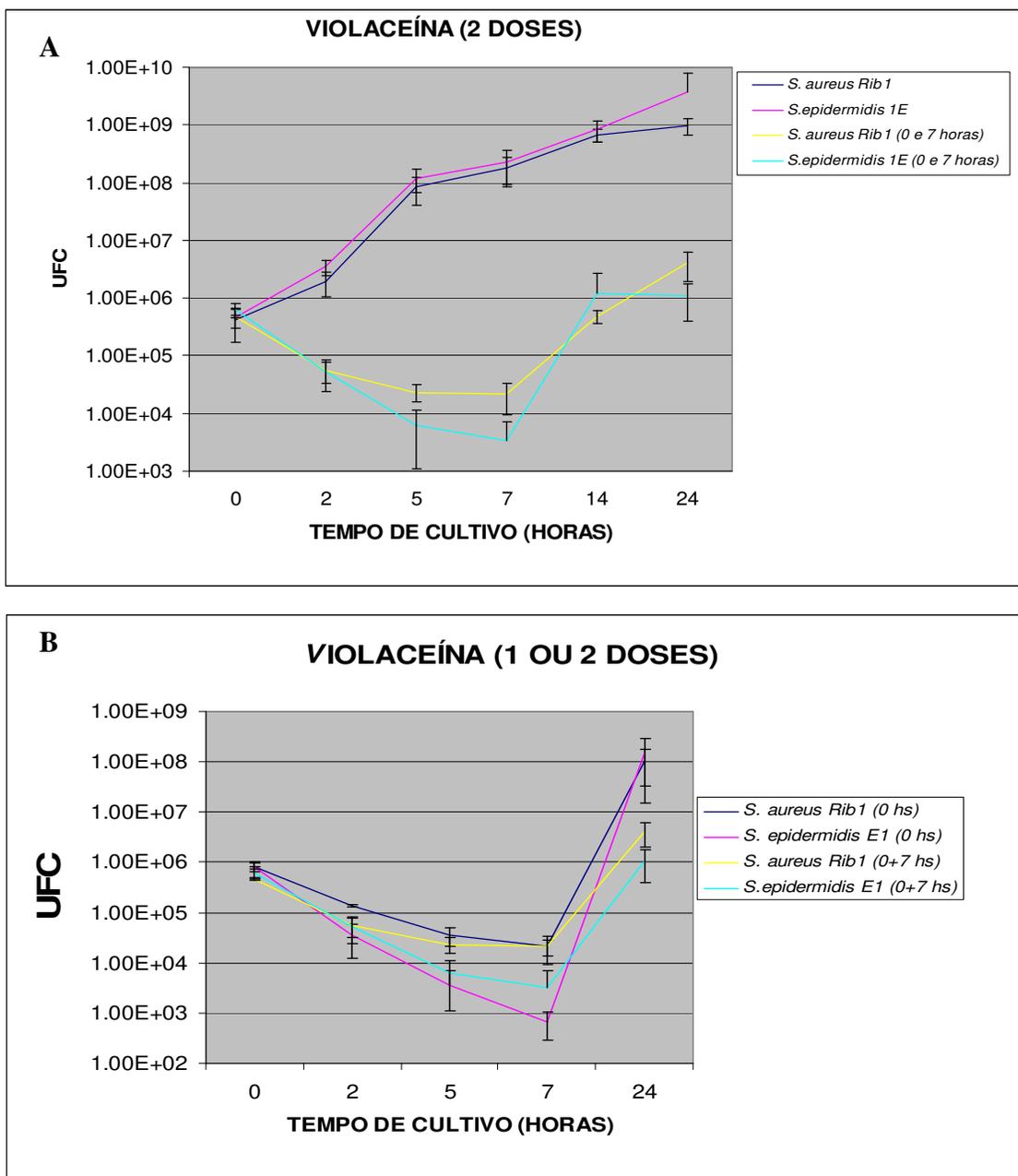


Figura 10. Curva de crescimento de *S. aureus* Rib1 e *S. epidermidis* 1E com violaceína (50  $\mu$ M) administrada uma única vez (tempo 0) ou em duas doses (tempo 0 e 7 horas). A) Comparação das curvas de crescimento com duas doses de violaceína e as curvas controle, sem violaceína; B) Comparação entre as curvas de crescimento com uma ou duas doses de violaceína (+ 50  $\mu$ M).

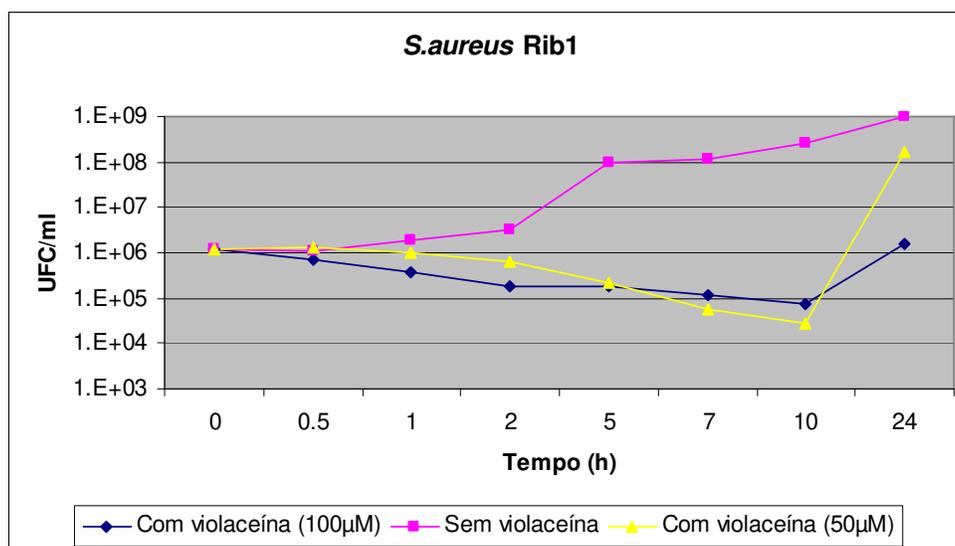


Figura 11. Comparação das curvas de crescimento de *S. aureus* Rib1 com violaceína a 50 µM e 100 µM e curva controle.

### 5.8. Avaliação de ação combinada entre oxacilina e violaceína

Com os perfis de crescimento de *S. aureus* e *S. epidermidis* na presença de violaceína já determinados, foi levantada a hipótese de melhoria da inibição de crescimento de *S. aureus* utilizando violaceína associada a oxacilina, mesmo em linhagens resistentes a esta. A associação da violaceína com oxacilina também permitiria verificar se estes dois antimicrobianos atuam de forma aditiva, sinérgica ou antagônica. Assim, este ensaio foi realizado com duas linhagens de *S. aureus*, *S. aureus* BEC 9393 e Rib1, ambas linhagens MRSA.

Um primeiro experimento foi desenhado para verificar se a combinação de violaceína com oxacilina poderia ter algum potencialização de efeito comparado a estes antibióticos usados isoladamente. Para isso, a curva de crescimento de BEC9393 foi acompanhada na presença de concentrações sub-inibitórias destes dois antibióticos, isoladamente ou em combinação. O crescimento de *S. aureus* BEC9393 na presença de 8µM de violaceína ou 4µg/mL (9,06 µM) de oxacilina apresentam efeito inibitório secundário. No entanto, a associação das duas drogas reduz consideravelmente o crescimento de BEC9393 (Figura 12A). Elevando a concentração de oxacilina a 125µg/mL (superior a CIM) leva a um efeito ainda mais pronunciado quando os dois

antibióticos são associados. Estes resultados descartam uma ação antagônica entre oxacilina e violaceína e sugerem uma interação aditiva ou sinérgica.

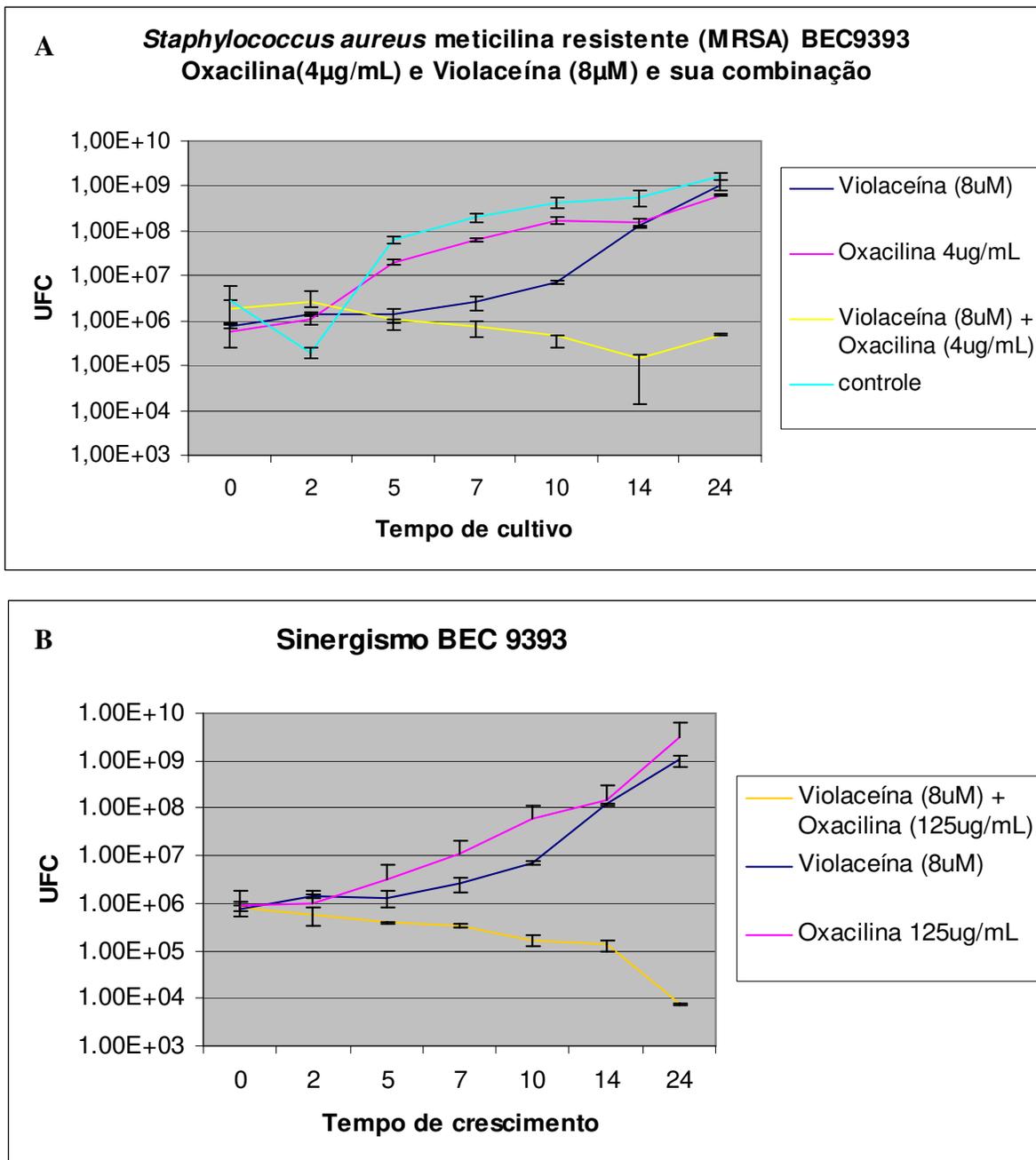


Figura 12. Curva de crescimento para verificar a atividade conjunta dos antibióticos violaceína e oxacilina sobre *S. aureus* BEC9393 sob diferentes concentrações de antibióticos. A) Oxacilina a 4µg/mL e violaceína a 8µM e sua combinação e B) Oxacilina a 125µg/mL e violaceína a 8µM e sua combinação.

Como foi encontrada uma interação aditiva ou sinérgica entre a violaceína e a oxacilina, tornou-se importante melhor avaliar a interação destes dois antibióticos. Assim, efetuou-se uma adaptação da técnica de microdiluição, na qual houve a adição de um segundo gradiente de concentração de antibiótico de modo que pode-se saber a CIM de cada antibiótico testado, como foi descrito no item 4.7.

A Figura 13 exibe os dados obtidos com a linhagem *S. aureus* Rib 1. Neste caso, nota-se que quando combinados, concentrações menores de antibióticos são requeridas para inibir o crescimento bacteriano. A CIM para a violaceína quando combinada a oxacilina correspondeu a aproximadamente metade da concentração necessária quando utilizada isoladamente para inibir *S. aureus* Rib 1 (Figura 13B), sugerindo um efeito aditivo. No entanto, os dados com oxacilina merecem ser destacados, uma vez que a concentração necessária para inibir Rib1 em combinação com a violaceína é menor que a metade da CIM deste antibiótico usado isoladamente (Figura 13 A). Estes dados corroboram o fenômeno de aditismo entre a oxacilina e violaceína, mas também indicam uma interação sinérgica no que diz respeito a oxacilina.

Este mesmo teste foi também realizado com a linhagem *S. aureus* BEC 9393, obtendo-se para ambos os compostos uma redução à metade da CIM dos antibióticos quando usados isoladamente. Deste modo, confirmou-se à interação aditiva entre estes antibióticos (Figuras 14A e B).

Para comprovar o efeito aditivo entre a violaceína e a oxacilina através de análises das curvas de crescimento, foi montado um último experimento com a linhagem Rib1, utilizando concentrações sub-inibitórias destes dois antimicrobianos (Figura 15). Neste experimento, a concentração dos antimicrobianos (violaceína e oxacilina) combinados correspondeu à metade da concentração dessas drogas utilizadas separadamente na inibição do crescimento. Confirmando os resultados anteriores, foram observadas nitidamente três curvas muito semelhantes, correspondentes às drogas utilizadas isoladamente ou em combinação, indicando assim uma ação aditiva.

Como foi encontrado um efeito aditivo entre a violaceína e a oxacilina, foi também testada a interação entre a violaceína e a vancomicina. Neste teste, foi desafiada a linhagem *S. aureus* VISA V15 com resistência intermediária a vancomicina, apresentando CIM de 2 µg/mL (1,34µM) para a vancomicina e 62 µM para a violaceína, sendo a avaliação feita pela análise da curva de crescimento (Figura 16). Para o teste, foram utilizadas concentrações correspondendo à

metade do MIC para a violaceína e concentração aproximadamente dez vezes menor de vancomicina, para possibilitar a melhor observação da interação entre estas drogas, uma vez que utilizando concentrações maiores de vancomicina ocorria morte celular completa com a esterilização da cultura.

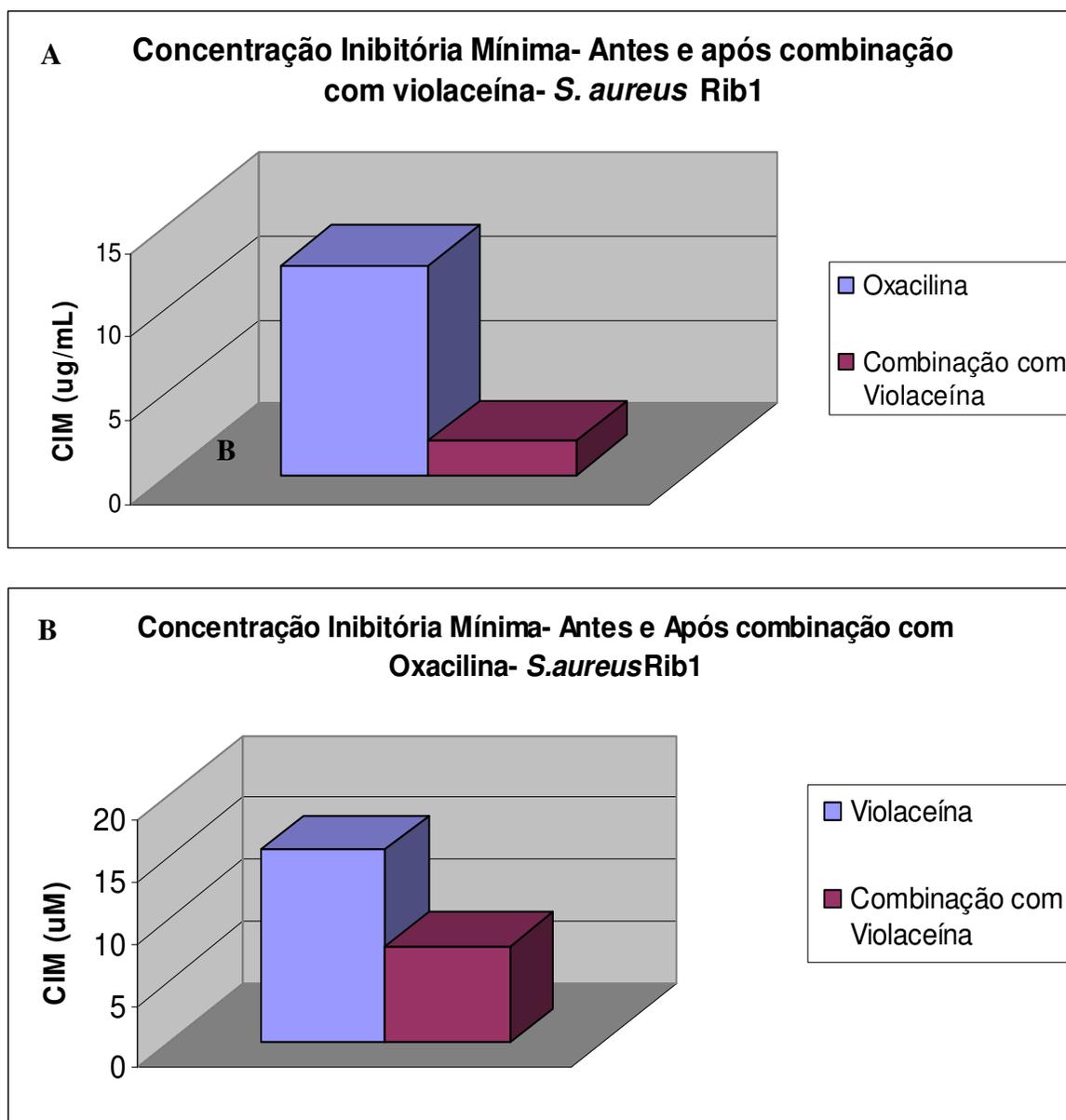
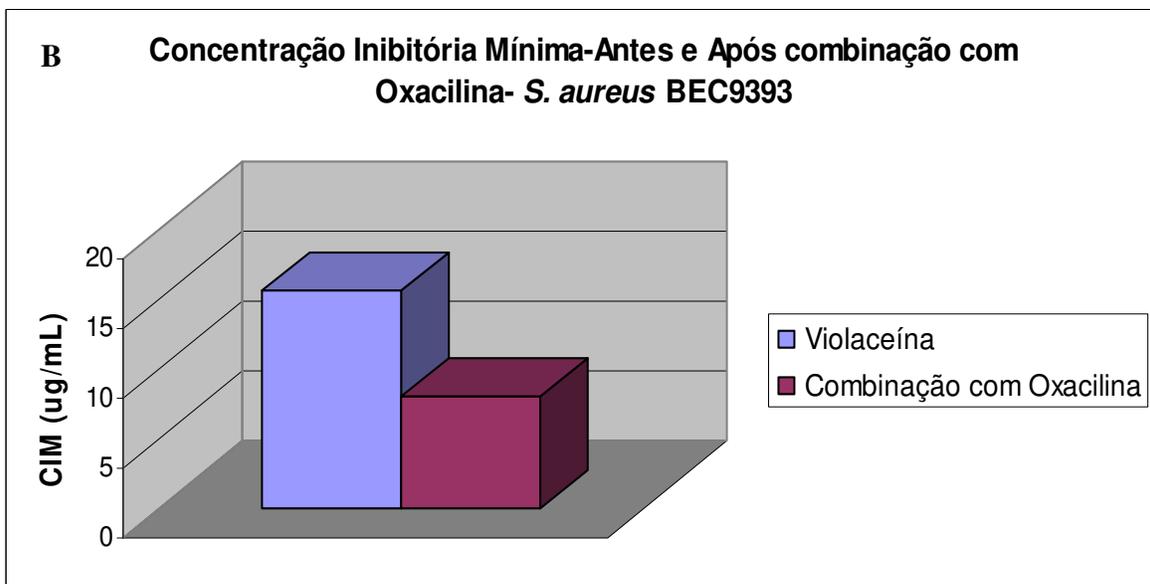
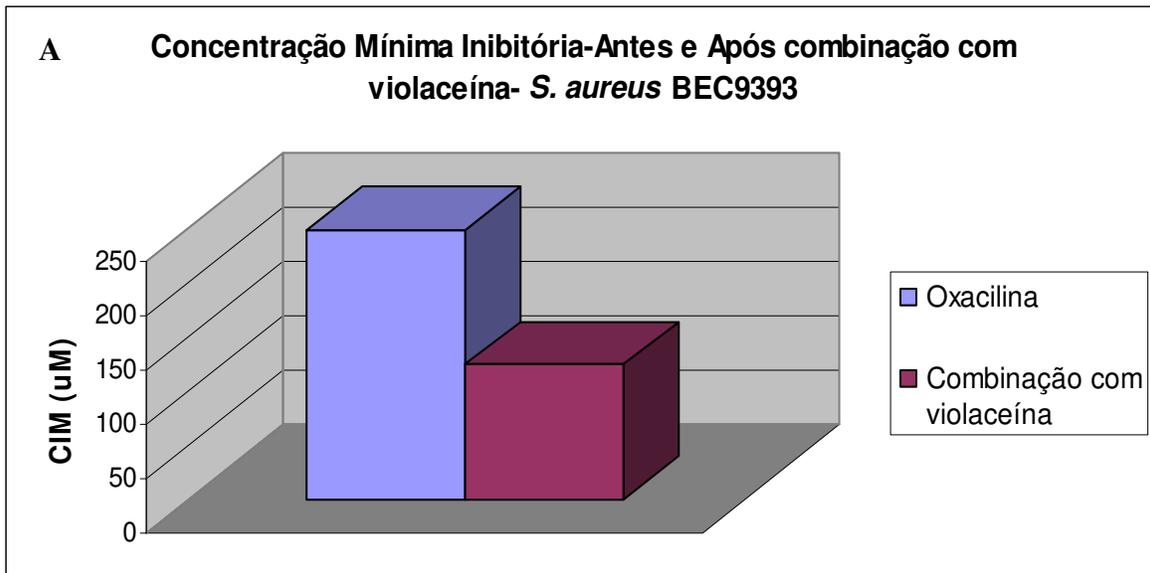
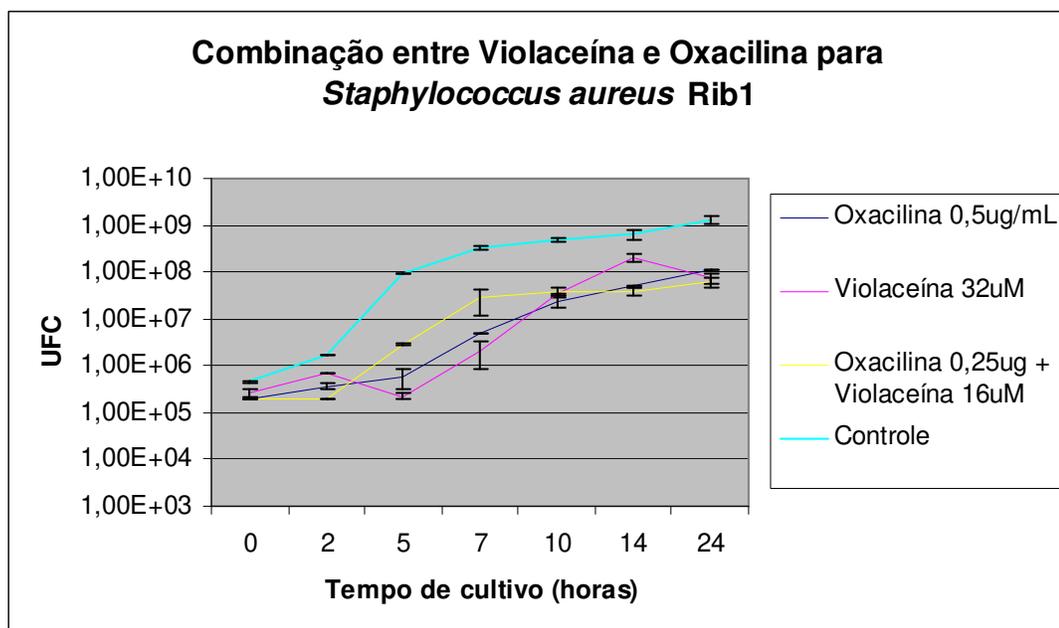


Figura 13. Valores de concentração inibitória mínima (CIM) obtidos na combinação entre violaceína e oxacilina na inibição de *S. aureus* Rib1. (A) CIM para oxacilina isoladamente e em combinação com a violaceína; (B) CIM para violaceína sozinha e com adição de oxacilina.



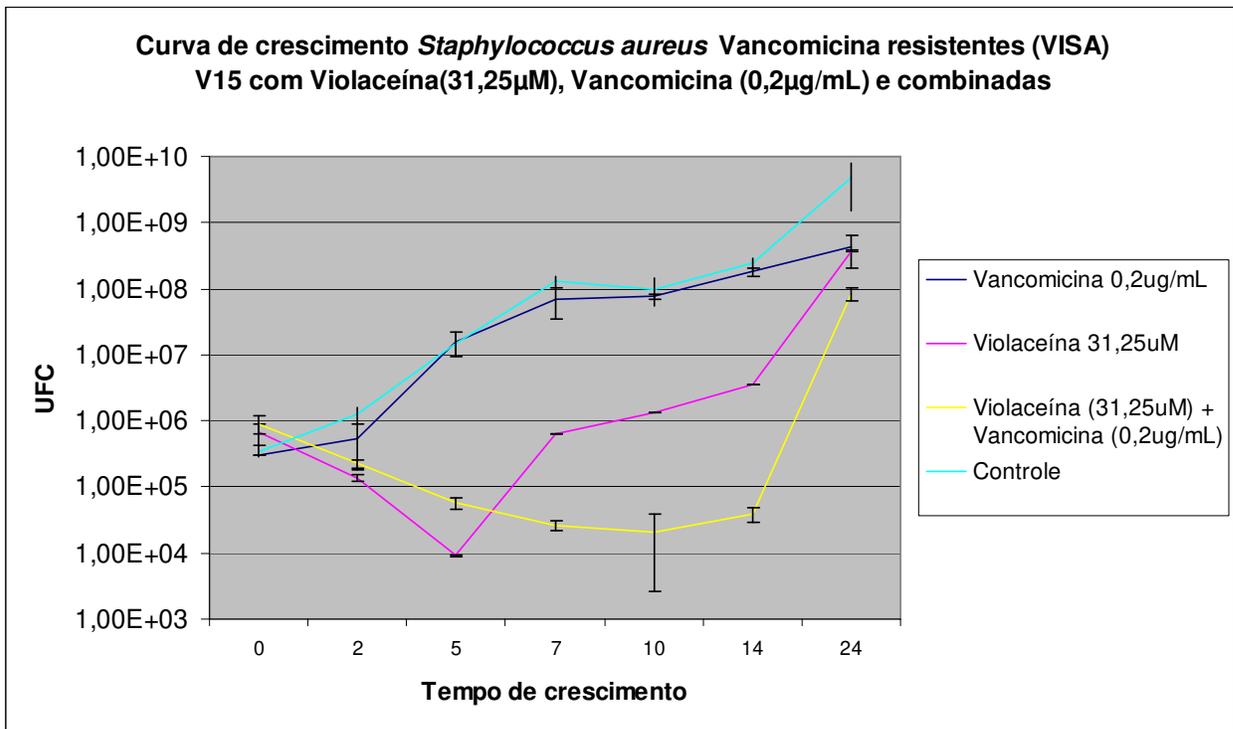
**Figura 14.** Valores de concentração inibitória mínima (CIM) obtidos na combinação entre violaceína e oxacilina na inibição de *S. aureus* BEC9393. (A) CIM para oxacilina isoladamente e em combinação com a violaceína; (B) CIM para violaceína sozinha e com adição de oxacilina.



**Figura 15. Curva de teste de aditismo entre a violaceína e o antibiótico  $\beta$ -lactâmico oxacilina.**

Foi observada uma redução de crescimento até 14 horas após a adição da vancomicina combinada com a violaceína, mas com crescimento após este período (Figura 16), embora não alcançando os valores de UFC encontrados na curva controle (sem antimicrobianos) ou nas curvas com apenas um dos antimicrobianos. Estes resultados sugerem um efeito aditivo ou mesmo sinérgico, embora não foi possível ainda definir qual entre estas interações estaria ocorrendo entre a vancomicina e a violaceína. Considerando que concentrações maiores de vancomicina combinadas à violaceína levam à esterilização da cultura, nossa hipótese é que estes dois antimicrobianos possam ter um efeito sinérgico, embora futuras análises sejam necessárias para uma resposta definitiva a esta questão. A amostra VISA foi escolhida devido a sua maior resistência à vancomicina frente às amostras de MRSA analisadas. No entanto, decorrente da grande dificuldade de estabilizar a CIM de vancomicina das VISAs, o trabalho foi aprofundado apenas na relação entre a violaceína e a oxacilina.

No estudo da interação entre a vancomicina e a violaceína, resultados similares aos observados com a oxacilina eram esperados, uma vez que tanto a oxacilina ( $\beta$ -lactâmico) quanto à vancomicina (glicopeptídeo) atuam na inibição de síntese da parede bacteriana, mas a com alvos diferentes na síntese desta estrutura.



**Figura 16.** Curva de crescimento para avaliação da interação entre a violaceína e a vancomicina na inibição do crescimento de uma linhagem de *S. aureus* com fenótipo VISA.

Uma questão importante que emerge da comparação entre os resultados obtidos por microdiluição e pelas curvas de crescimento, é que os valores de CIM obtidos pela primeira metodologia não impedem o crescimento bacteriano se aplicados na segunda. Isso pode ser observado claramente na Figura 14. A CIM da violaceína calculado por microdiluição para a linhagem Rib1 foi 15µM. No entanto, a concentração de 32µM não impediu o crescimento bacteriano ao longo do tempo, embora tenha inibido o crescimento se comparado ao controle. Estas discrepâncias estão seguramente associadas a diferenças entre estas metodologias, como volume de meio, agitação, entre outras. De qualquer forma, ambas as técnicas demonstraram de forma inequívoca que violaceína é capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus* e, dependendo da concentração, apresenta efeito bactericida. Adicionalmente, a associação com outras drogas, como oxacilina (metecilina) e vancomicina parece ser um campo promissor e que por isso deve ser melhor explorado.

## 5.9. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Foram realizadas micrografias eletrônicas de transmissão com o intuito de se avaliar alterações morfológicas celulares que pudessem indicar pistas sobre o(s) mecanismo(s) de ação e possível(is) alvo(s) da violaceína. Como o gênero que demonstrou maior sensibilidade a violaceína foi *Staphylococcus* sp, nossas análises foram direcionadas para as espécies *S. aureus* e *S. epidermidis*, utilizando linhagens bacterianas Gram-negativas como controle.

Não foram observadas alterações morfológicas em células de *S. enterica* Typhimurium LT2 (Gram-negativa) na presença de violaceína (50µM), após 2 (Figura 17) e 5 horas de tratamento. Estes resultados eram esperados uma vez que concentrações elevadas de violaceína (1mM) não inibiram o crescimento de *S. enterica*.

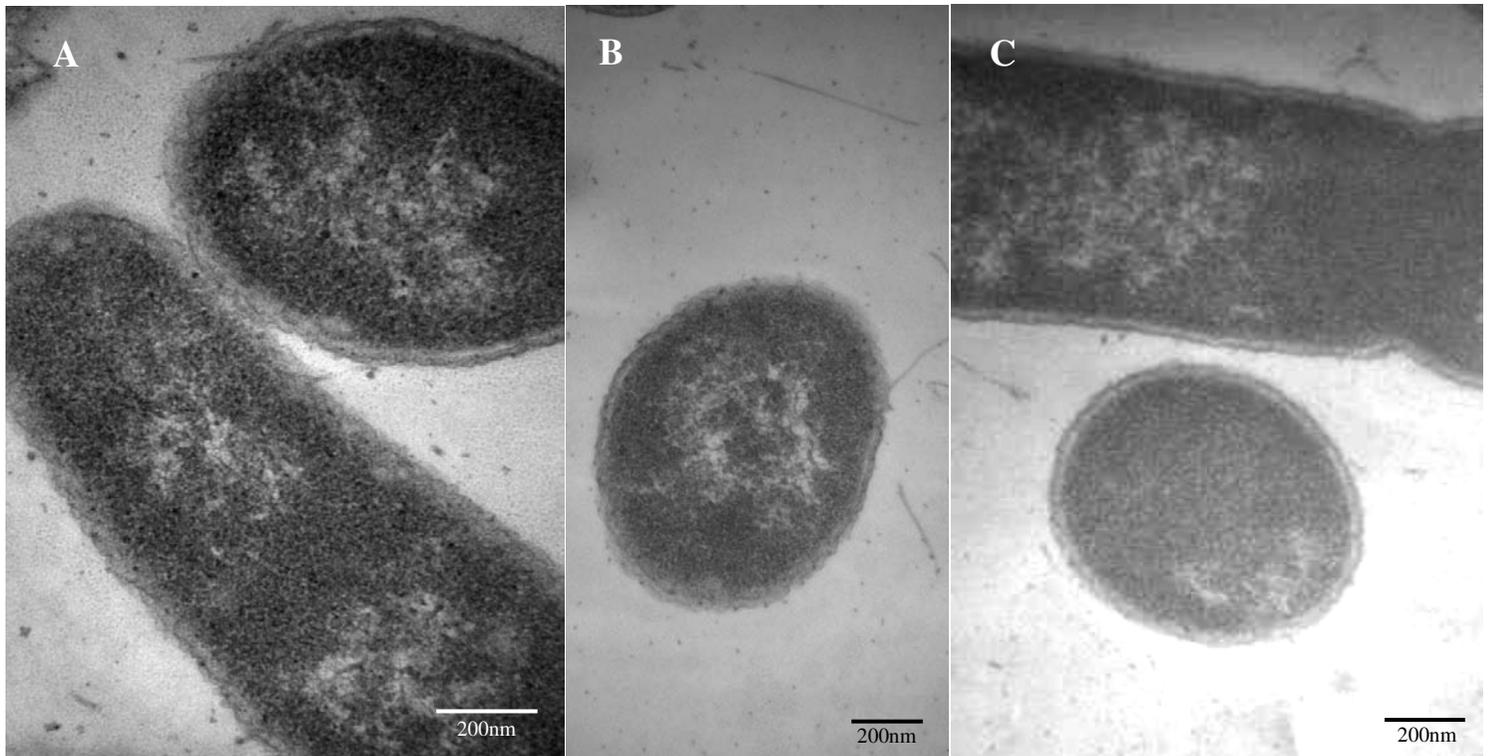
Foram observadas alterações significativas na parede celular de *S. aureus* Rib1 com alterações abrangendo desde leves desestruturações da parede (Figura 18A) até sua completa destruição (Figura 18C). Foi possível, através das análises das micrografias, estabelecer certos paralelismos com as alterações encontradas em células de *Staphylococcus* tratadas com penicilina como, por exemplo, o extravasamento de material citoplasmático (Figura 18B).

As alterações estruturais acima descritas não foram encontradas nas micrografias controle, com meio de cultura Mueller-Hinton e DMSO na concentração final de 0,25%, como pode ser observado na Figura 18, painéis D, E e F.

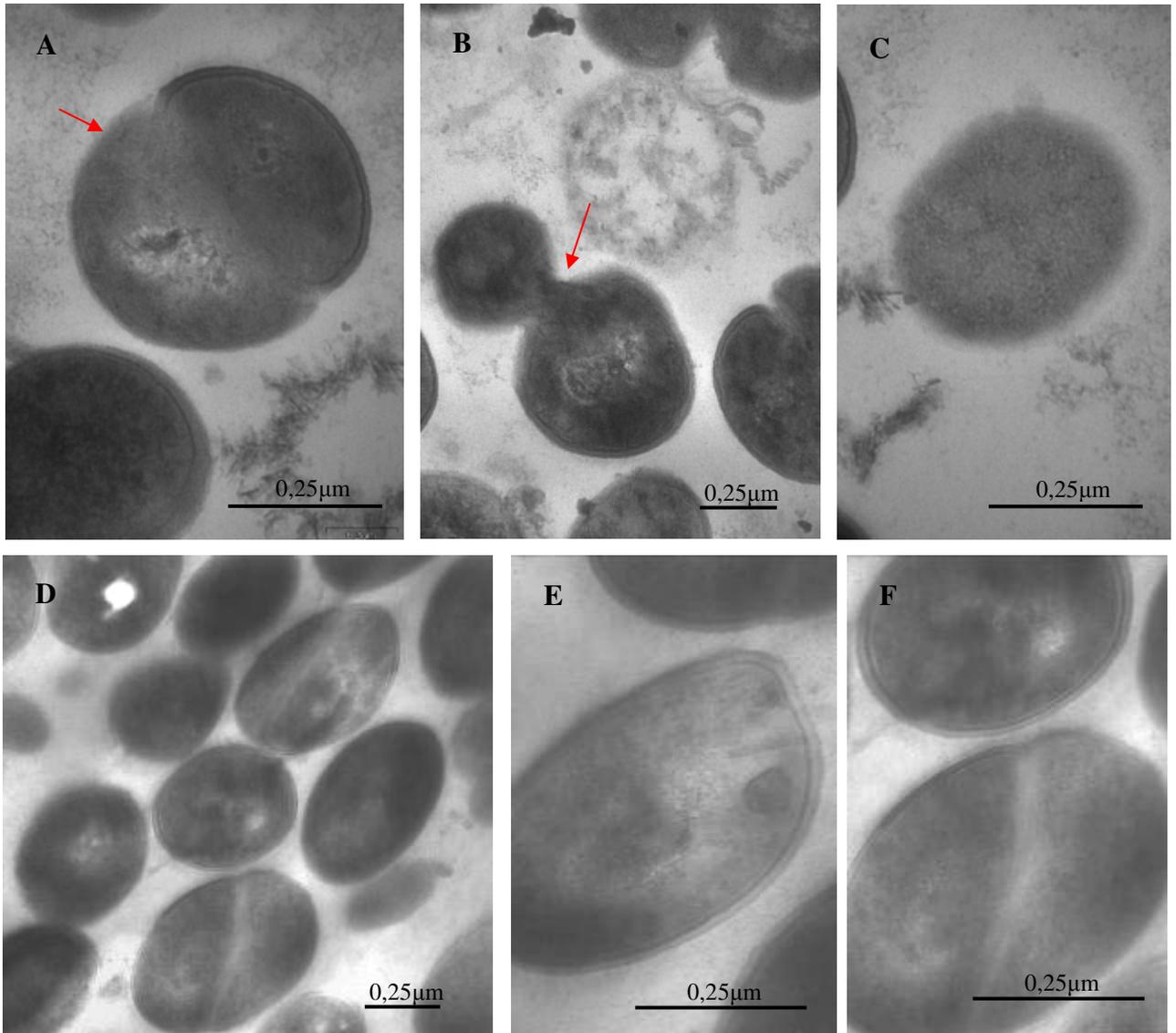
Quando foram analisadas as micrografias da linhagem de *S. aureus* Rib1 submetida ao tratamento por duas horas com violaceína (50µM), foram observadas alterações morfológicas (Figura 18) semelhantes às encontradas em bactérias submetidas a concentrações inibitórias de penicilina. Neste caso, notou-se o afrouxamento da parede celular adjacente aos sítios de contato entre duas células filhas em processo de divisão, possivelmente com atuação de proteínas autolíticas presentes nos murossomos (Figura 19).

Com os resultados obtidos com *S. aureus* Rib1, nossa intenção era realizar os mesmos procedimentos com a linhagem *S. aureus* BEC 9393, assim como para as linhagens VISA, as quais apresentaram perfil de resistência a violaceína superior que os apresentados por *S. aureus* Rib1. Além disso, nossa intenção era avaliar as possíveis alterações morfológicas causadas pela violaceína em *X. axonopodis*, uma vez que esta foi a única, entre as bactéria Gram-negativa testadas, a apresentar sensibilidade a violaceína. No entanto, não foi possível obter tais

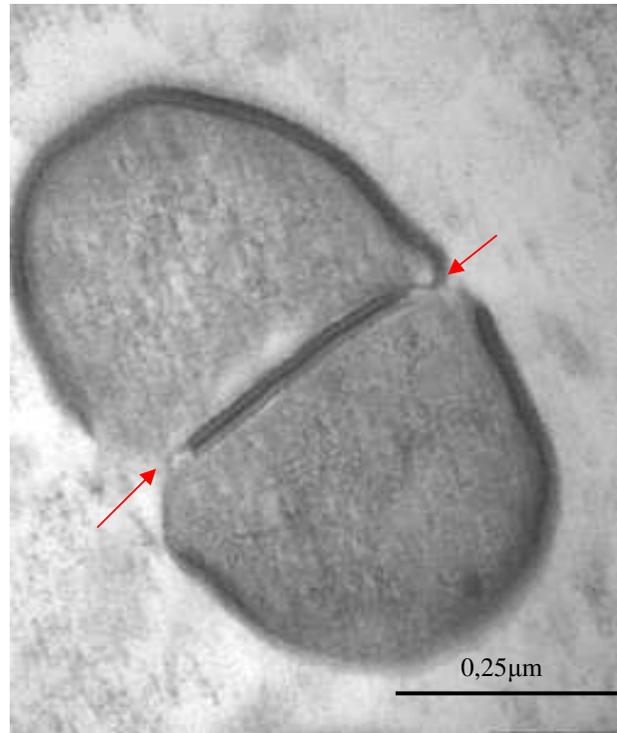
resultados, devido ao fato dos microscópios eletrônicos do Instituto de Biologia na Unicamp e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, estarem fora de operação no período em que estes experimentos foram programados. No entanto, estas análises serão realizadas ainda no primeiro semestre deste ano.



**Figura 17. Micrografias eletrônicas de transmissão de *Salmonella enterica* LT2. A) Tratamento controle, sem violaceína. B e C) Tratamento com violaceína (50  $\mu$ M) por 2 horas.**



**Figura 18.** Linhagem de *S. aureus* Rib1 submetida a tratamento com violaceína (50  $\mu\text{M}$ ). A, B e C - Micrografias eletrônicas de transmissão de *S. aureus* Rib1 submetido a cinco horas de incubação na presença de violaceína. D, E e F (detalhe de D) - Micrografias eletrônicas de *S. aureus* Rib1 na ausência de violaceína (controle).



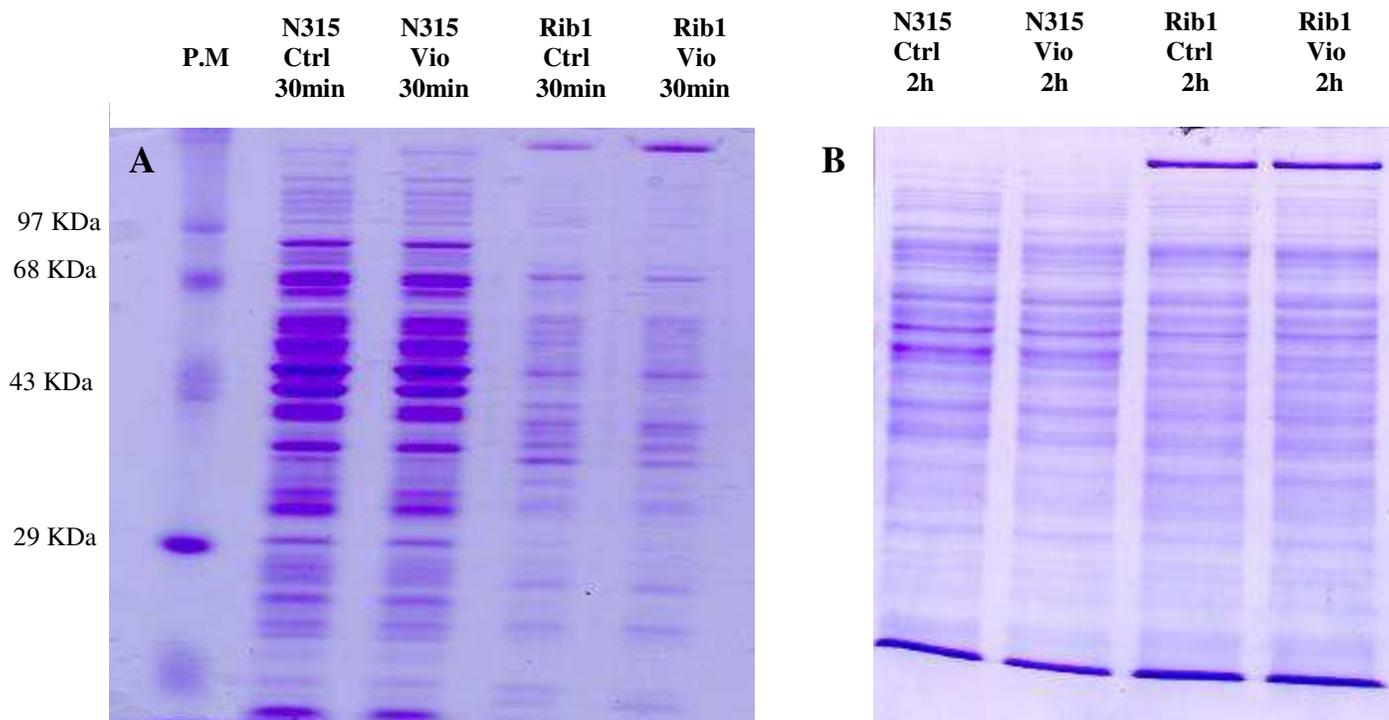
**Figura 19. Micrografia eletrônica de transmissão de *S. aureus* Rib1 submetida a duas horas de tratamento com violaceína (50 µM).**

Por intermédio da microscopia eletrônica de transmissão foram detectadas, portanto, alterações nas paredes das bactérias tratadas com violaceína a 50 µM, com sua destruição e afrouxamento, notando-se várias bactérias rompidas, ou apresentando estreitamento de parede. Sugere-se, assim, que a atividade da violaceína ocorra, provavelmente, sob esta estrutura, possivelmente através da indução da atividade de autolisinas, uma vez que a molécula de violaceína é muito pequena para que porte atividade enzimática. Seu efeito provavelmente ocorre através da interferência no metabolismo bacteriano. Como a violaceína também apresenta atividade inibitória para uma espécie bacteriana Gram-negativa, *X. axonopodis*, podemos descartar a ação desta droga sobre um componente ou estrutura específica de um desses grupos. Assim, especulamos que a violaceína atue em uma via metabólica ou componente que seja comum a *Staphylococcus* e *Xanthomonas*. Como estas espécies não são filogeneticamente próximas, não é possível descartar que o mecanismo de ação da violaceína seja diferente em ambas as espécies. Assim, um estudo mais aprofundado da ação da violaceína sobre estas espécies bacterianas se faz necessário, para responder a esta questão de forma definitiva.

## 5.10. Determinação de alterações na expressão protéica

### 5.10.1. SDS-PAGE

Como foram notadas alterações no padrão de crescimento de *S. aureus*, assim como alterações na estrutura da parede celular, verificadas através da microscopia eletrônica de transmissão, buscou-se, através de uma abordagem proteômica, tal como análises de SDS-PAGE e de eletroforese bi-dimensional, encontrar alterações no padrão de expressão protéica de *S. aureus* na presença e na ausência de violaceína. Os resultados obtidos poderiam indicar o modo de ação da violaceína. Análises de SDS-PAGE de proteínas totais não permitiram encontrar diferenças marcantes na expressão protéica na linhagem de *S. aureus* Rib1, assim como na linhagem padrão *S. aureus* N315, crescidas na presença de 50  $\mu\text{M}$  de violaceína. A escolha das linhagens de *S. aureus* avaliadas nestes experimentos (Rib1 e N315) foi baseada na disponibilidade de dados de análises prévias assim como do conhecimento da seqüência genômica, no caso de N315. Grosso modo, análises do perfil de proteínas totais não permitiram identificar alterações pronunciadas na expressão protéica na presença e na ausência de violaceína, com tempos de incubação de 30 minutos e 2 horas (Figura 20). Deste modo, para uma avaliação mais criteriosa do padrão de expressão protéica, foi utilizada a técnica de eletroforese bidimensional, que é baseada na separação das proteínas por massa e por ponto isoelétrico, de modo que é possível analisar diferentes estados de fosforilação ou outras modificações de um polipeptídeo, oferecendo assim uma melhor resolução, como encontrada nas Figuras 21 e 22.



**Figura 20.** SDS-PAGE (15%) de proteínas totais de *Staphylococcus aureus* linhagens N315 e Rib1 na presença ou não de 50  $\mu$ M de violaceína. A) Perfil de proteínas totais após cultivo por 30 minutos na presença de violaceína; B) Perfil de proteínas totais após cultivo por 2 horas na presença de violaceína

### 5.10.2. Gel Bidimensional

Através desta técnica, foi possível a separação de vários polipeptídios, sendo que cerca de 18 apresentaram expressão diferencial na presença ou na ausência de violaceína (Figura 21). Dos polipeptídios com padrão de expressão modificado, foram selecionados 10 “spots”, que apresentaram as maiores alterações na expressão. Estes foram submetidos à digestão por tripsina e identificação em espectrômetro de massa MALDI-TOF. As seqüências obtidas foram identificadas através do banco de dados SWISS PROT pelo programa MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu>), sendo os resultados apresentados na Tabela IV.

Os resultados de eletroforese bi-dimensional obtidos com *S. aureus* Rib1 indicaram que a violaceína parece inibir a expressão de polipeptídios identificados como sendo fatores de

virulência de *S. aureus* (Tabela IV). Nas células tratadas com violaceína houve a redução da expressão de esfingomielinase C, que catalisa a hidrólise de esfingomielina, constituinte de membrana celular de eucariotos, em ceramida e fosforilcolina, e o aumento da expressão da proteína CvfB, nomeada também de fator de virulência conservado, que regula a expressão de outros fatores de virulência, como as exoproteínas hemolisina e DNase, de proteases e da proteína A, tal aumento pode ser decorrente de uma resposta de proteção da célula tratada com violaceína. Também foi encontrada alteração no nível de expressão do fator de alongação TS (EF-Ts), envolvido na interação com o fator de alongação EF-Tu, que por sua vez, promove a ligação do aminoacil tRNA ao sítio acceptor A do ribossomo. A proteína EF-Ts está envolvida na liberação de GDP, substituindo por GTP no complexo EF-Tu-GTP, possibilitando-o de ligar a outro aminoacil tRNA, carregando este último até o sítio A ribossomal.

Foi encontrado também outro fator envolvido na síntese protéica com a sua expressão diminuída nas células tratadas com violaceína, como o fator de reciclagem de ribossomos, sendo este fator responsável pela liberação dos ribossomos no final da tradução das moléculas de mRNA.

E, finalmente, foi encontrada uma importante proteína envolvida na produção do polissacarídeo capsular, que possui a propriedade de dificultar a destruição da célula pelo sistema imune, inibindo a fagocitose e a quimiotaxia, a UTP-glicose-1-fosfato uridililtransferase, com expressão aumentada nas células tratadas com violaceína, o que também, pode ser decorrente de uma resposta ao dano a parede celular, como foi possível ser observado nas micrografias eletrônicas (Figuras 18 e 19), o que reforçou a hipótese de atuação da violaceína sobre esta estrutura.

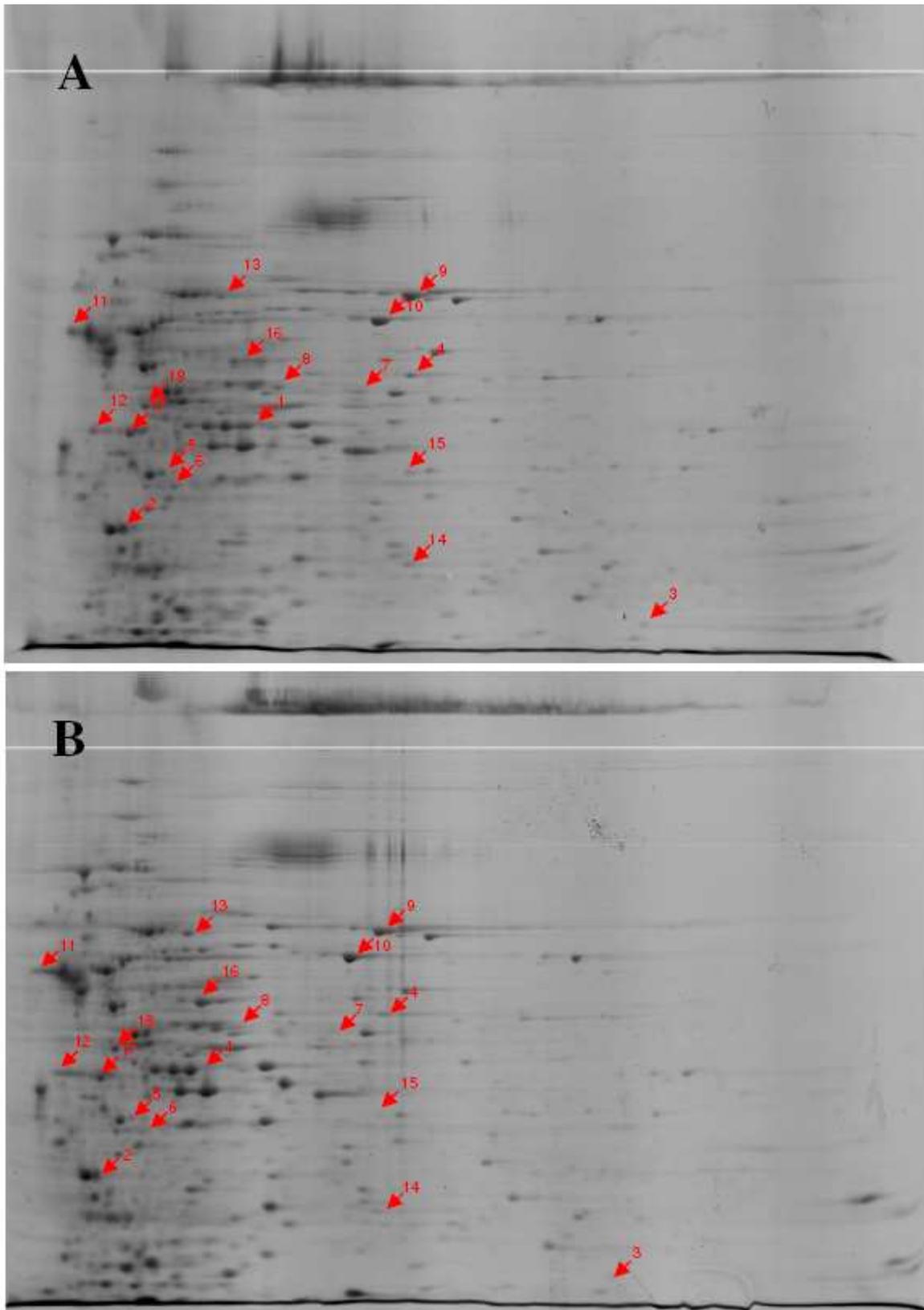


Figura 21. Gel bidimensional de *S. aureus* Rib1. A) Controle tratado com 0,25% DMSO por 2 horas. B) Tratamento com violaceína (50 µM) por 2 horas.

**Tabela IV. Identificação das proteínas de *S. aureus* Rib1 com padrão de expressão alterado.**

<b>Expressão Aumentada</b>	<b>Spot</b>	<b>Proteína</b>	<b>pI (th)</b>	<b>Cobertura</b>
Vio	17	Conserved virulence factor B	5.03	42%
Ctrl	5	Elongation factor Ts	5.05	44%
Ctrl	7	Ribosome recycling factor	5.65	67%
Ctrl	8	Sphingomyelinase C	5.40	100%
Ctrl	9	Methyltransferase gidB	6.46	20%
Ctrl	3	UPF0291 protein CTC_01690.1	7,95	68%
Vio	13	UPF0061 protein BA_3567/GBAA3567/BAS3307	5.19	12%
Ctrl	15	Phosphoadenosine phosphosulfate reductase	6.71	35%
Ctrl	1	N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase	5.14	40%
Vio	18	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	5.42	17%

As outras proteínas encontradas com padrão de expressão alterado foram proteínas envolvidas em rotas metabólicas diversas, em que não foi possível encontrar um ponto de união entre elas. Possivelmente podem ser respostas difusas aos danos produzidos pela violaceína. Nas bactérias tratadas com violaceína, há o aumento da expressão de N-(5'-fosforilribosil) antranilato isomerase, que é uma proteína monomérica lábil para a maioria dos microrganismos mesofílicos envolvida na síntese de triptofano. Foram encontradas também proteínas envolvidas em inúmeros processos metabólicos como a fosfoadenosina fosfosulfato redutase, além de proteínas de função desconhecida (UPF0291 e UPF0061).

Desta forma, o possível mecanismo de atuação da violaceína dá-se sobre a inibição da síntese protéica, como observado para a menor expressão do fator de reciclagem de ribossomos e do fator de alongação EF-Ts nas células tratadas com violaceína.

Como foi encontrada atividade contra *Xanthomonas axonopodis*, há a necessidade de realizar tanto micrografias eletrônicas como a análise da expressão protéica desta espécie submetida ao tratamento com violaceína. Também é necessário aprofundar as análises de expressão protéica de *S. aureus*, analisando um maior de isolados além de abranger a

identificação de um número maior de “spots”. Desta forma, pode-se encontrar uma proteína chave que possa unir as alterações encontradas..

Como foram encontradas profundas alterações na parede celular, através das micrografias eletrônicas (Figuras 18 e 19) essa estrutura ainda pode ser considerada o alvo de ação da violaceína. Deste modo, há a necessidade de novos estudos, incluindo também outras linhagens de *S. aureus* e a análise de mais “spots” protéicos diferencialmente expressos. Em complementação a tais análises, iremos também utilizar a técnica de ICAT (*Isotope coded affinitytag*) assim como estudar o transcriptoma de *S. aureus* na presença e na ausência de violaceína, utilizando a tecnologia de microarranjos. Para que seja obtida uma (ou mais) proteína (s) chave(s) que possa(m) unir as alterações morfológicas e de expressão protéica encontradas.

## 6. CONCLUSÕES

1. Os resultados sugerem que a violaceína é um antimicrobiano bactericida de potencial uso no controle de *Staphylococcus* sp, um importante patógeno humano, e *X. axonopodis* p.v , uma bactéria fitopatogênica;
2. A violaceína apresenta atividade bacteriostática sobre *P. aeruginosa* e *S. pyogenes* na concentração de 50µM, concentração esta bactericida para *Staphylococcus* sp e *X. axonopodis*;
3. A resistência a violaceína parece não ser devida a ação de sistemas de efluxo, uma vez que a reserpina não diminuiu o MIC para a violaceína;
4. A violaceína tem um efeito aditivo quando combinada a oxacilina na atividade sobre *Staphylococcus* sp. Quanto a vancomicina, novos estudos ainda devem ser realizados;
5. *Staphylococcus* sp parece desenvolver um estado metabólico de resistência após crescimento por várias horas na presença de violaceína. No entanto, este estado parece ser inibido quando a violaceína é combinada a oxacilina .
6. O modo de atuação da violaceína parece envolver alterações do metabolismo celular, com comprometimento da integridade desta estrutura em *Staphylococcus* sp.

## 7. REFERÊNCIAS

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; ANTONIO, R.V.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 2003, vol. 98, p. 843-848.

APPELBAUM, P.C. The emergence of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin. Microbiol. Infect.**, 2006. vol 1, 16-23.

BRADFORD, M.M.. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principles of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 1976, vol. 72, p. 248-254.

BRADLEY, D.J.; HUYCKE, M.M.; GILMORE, M.S. Virulence of Enterococci. **Clinical Microbiol. Reviews**, vol. 7(4). P. 462-478.

BOTTONI, E.J. *Yersinia enterocolitica*: The charisma continues. **Clinical Microbiology Reviews.**, 1997, vol. 10(2), p.257-276.

BOYLE, E.C.; BISHOP, J.L., GRASSL, G.A, FINLAY, B.B. *Salmonella*: from pathogenesis to therapeutic. **Journal of bacteriology.**, 2007, vol.189(5), p.1489-1495.

CLSI 2007- <http://www.nccls.org/>

COLANGELI, R.; HELB, D.; SRIDHARAN, S.; SUN, J.; VARMA-BASIL, M.; HAZBÓN, M.H.; HARBACHEUSKI, R.; MEGJUGORAC, N.J.; JACOBS, W.R.; HOLZENBURG, A.; SACCHETTINI, J.C.; ALLAND, D. The *Mycobacterium tuberculosis* *ini A* gene is essential for activity of na efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol. **Molecular Microbiology**, 2005, vol. 55(6), p.1829-1840.

DE MARCO, C.E.; CUSHING, L.A.; FREMPONG-MANSO, E.; SEO, S.M; JARAVAZA, T.A.A.; KAATZL, G.W. Efflux-Related Resistance to Norfloxacin, Dyes, and Biocides in Bloodstream Isolates of *Staphylococcus aureus*. **Microbial Agents and Chemotherapy**, Setembro, 2007, Vol. 51, No. 9, p. 3235–3239

DESSAUX, Y.; ELMERICH, C.; FAURE, D. La violacéine: une molécule d'intérêt biologique, issue de la bactérie tellurique *Chromobacterium violaceum*. **La revue de médecine interne**, 2004, vol. 25: 659-662.

DOI, Y.; ADAMS, J.M.; YAMANE, K.; PATERSON, D. L. Identification of 16S ribosomal RNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2007, vol. 51(11), p.4209-4210.

DURÁN, N.; ERAZO, S.; CAMPOS, V. Bacterial chemistry-II : Antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. **An. Acad. Brasil. Cienc.**, 1983, vol 55, p. 231-234.

DURÁN, N.; DE SOUZA, A.O. Process for the violacein application as antimycobacterial agent. **Brazilian Patent PIBr**, in Press, 2001.

DURÁN, N.; MENCK, C.F.M. *Chromobacterium violaceum* : A review of pharmacological and industrial perspectives. **Critical Rev. Microbiol.** 2001, vol. 27, p. 201-222.

FENG, D.; CHO, G.; DOOLITTLE, R.F: Determining divergence times with a protein clock: Uptade reevaluation. **Proc. Natl. Acad. Scien.** 1996, vol.94. p.13028-13033.

FERREIRA, C.V.; BOS, C.L.; VERSTEEG, H.H.; JUSTO, G.Z.; DURÁN, N; PEPPELENBOSH, M.P.. Molecular mechanisms of violacein-mediated human leukemia cell death. **Blood.**, 2004, vol 104(5), p. 1459-1464.

FOSTER, T.J. The *Staphylococcus aureus* « superbug ». **J. Clin. Invest.**, 2004, vol.114, p.1693-1696.

FRANCO, M.M.; TAKATSU, A. Sensibilidade de *Xanthomonas axonopodis p.v passiflorae* a cobre. **Biosci. J.**, 2004, vol. 20, p.207-210

GRUNDMANN, H.; AIRES-DE-SOUSA, M.; BOYCE, J.; TIEMERSMA, E. Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. **Lancet**. 2006, vol. 368, p.874-885.

HARDY, K.J.; HAWKEY, P.M.; GAO, F.; OPPENHEIM, B.A Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. **Br. J. Anaesth.**, 2004, vol. 92, p.121-130

KIM, M.H.; LEE, H.J.; SUH, J.T.; XHANG, B.S.; CHO; K.S. A case of *Chromobacterium* infection after car accident in Korea. **Yonsei Medical Journal.**, 2005, vol. 46(5), p. 700-702.

KOLLEF, M.H.; MICEK, S.T. METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus*: a new community-acquired pathogen? **Curr. Opin. Infect. Dis.**, 2006, vol.19, p.161-168.

LAEMMLI, U.K. SDS-PAGE. **Nature.**, 1970, vol 227, p.680-687.

LEON, L.L; MIRANDA, C.C; DE SOUZA, A. O.; DURÁN, N. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.**, 2001, vol.48, p. 445-448.

LICHSTEIN, H.C.; VAN DE SAND, V.F Violacein, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. **J. Infect. Dis.**, 1945, vol. 76, p.47-51.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Invest.**, 2003, vol. 111, p.1265-1273.

MARTINEZ R.; SANCHES M.A.; VELLUDO. L.; DOS SANTOS, V. R.; DE DINAMARCO, P.V. *Chromobacterium violaceum* infection in Brazil - A case report. . **Ver. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, 2000, vol 42(2) p. 111-113.

MATZ, C.; DEINES, P.; BOENIGK, J.; ARNDT, H. ; EBERT, L.; KJELLEBERG, S.; JÜRGENS, K. Impact of violacein-producing bacterial on survival and feeding of Bacteriovorous nanoflagellates. **Appl. Environ. Microbiol.**, 2004, vol 70, p.1593-1599.

MEDINA, E.; LENGELING, A. Genetic regulation of host responses to Group A *Streptococcus* in mice. **Briefings in functional genomics and proteomics.**, 2005, Vol. 4(3). p.248-257

NYOGI, S.K. Shigellosis. **The Journal of Microbiology.**, 2005, vol.43(2), p.133-143.

PANTANELLA, F.; BERLUTTI, F.; PASSARIELLO, C.; SARLI, S.; MOREA, C.; SCHIPPA, S. Violacein and biofilm production in *Jantnobacterium lividum*. **Journal of Applied Microbiology.**, 2007, vol.102, p.992-999.

PATERSON, D.L. Resistance in Garm-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **The American Journal of Medicine.**,2006, vol.119, p.S20-S28.

PITT, T.L. Biology of *Pseudomonas aeruginosa* in relation to pulmonary infection in cystic fibrosis. **Journal of Royal Society of Medicine Supplement.**, 1986, vol.73(12) p.13-18

PODSCHUN, P.; ULLMANN, U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiol. Reviews**, 1998, vol-11(4), p. 589-603

O'GARA, J.P.; HUMPHREYS, H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. **J. Med. Microbiol.**, 2001, vol.50, p.582-587.

OLIVEIRA, G.A.; DELL'AQUILA, A.M. ; MASIERO, R.L. ; LEVY, C.E. ; GOMES, M.S.; CUI, L.; HIRAMATSU, K.; MAMIZUKA, E.M. Isolation in Brazil of nosocomial *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, 2001, vol.22, p.443-448.

PENG, J.; ZHANG, X.; YANG, J.; WANG, J.; YANG, E.; BIN, W.; WEI, C.; SUN, M.; JIN, Q: The use of comparative genomic hybridization to characterize a genome dynamics and diversity among the serotypes of *Shigella*. **BMC Genomics**, 2006, vol. 7. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/7/218>>. Acesso em janeiro de 2008.

RAMASWAMY, V.; CRESENCE, V.M.; REJITHA, J.S.; LEKSHMI, M.U.; DHARSANA, K.S.; PRASAD, S.P.; VIJILA, H.M. **J. Microbiol. Immuno. Infect.**, 2007, vol. 40, p.4-13.

RETTORI, D.; DURÁN, N. Production, extraction and purification of violacein : an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 1998, vol. 14, p.685-688.

SABOL, K.E.; ECHEVARRIA, K.L.; LEWIS, J.S. 2ND. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: new bug, old drugs. **Ann. Pharmacother.**, 2006, vol. 40, p. 1125-1133

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. *Staphylococcus* species. In: **Bacterial pathogenesis: a molecular approach**. 2<sup>nd</sup> Edition, ASM Press, Washington, D.C., 2002, p. 216-231.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular Cloning: **A Laboratory Manual**. 3<sup>rd</sup> Edition. Cold Spring harbor Laboratory Press, N.Y.,2001, p. A8.40-A8.51.

SIEGEL, R.E. Emerging Gram-negative antibiotic resistance: Dauting challenges, declining sensitivities, and dire consequences. **Respiratory Care.**, 2008, vol.53(4), p.471-479.

SMOLKA, M.B.; MARTINS, D.; WINCK, F.V.; SANTORO, C.E.; CASTERALLI, R.R.; FERRARI, F.; BRUM, I.J.; GALEMBECK, E.; DELLA COLETTA FILHO, H.; MACHADO, M.A.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C. Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution. **Proteomics.**, 2003, vol. 3, p.224-237.

TENOVER, F.C.; BIDDLE, J.W.; LANCASTER, M.V. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. **Emerg. Inf. Dis.**, 2001, vol. 7, p.327–332.

TIWARI, H.K.; SEN, M.R. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. **BMC Infect. Dis.**, 2006, vol. 6, p.156

YONEYAMA, H.; KATSUMATA, R. Antibiotic resistance in bacteria and it's future for novel antibiotic development. **Bioscience Biotechnologic Biochemistry**, 2006, vol. 70(5), p.1060-1075.