



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**HILANIA VALÉRIA DODOU**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA VIOLACEÍNA SOBRE**  
***STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS***

**FORTALEZA**

**2017**

HILANIA VALÉRIA DODOU

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA VIOLACEÍNA SOBRE *STAPHYLOCOCCUS*  
*EPIDERMIDIS*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.  
Área de concentração: Biologia para a saúde.

Orientadora: Profa. Dr<sup>a</sup>. Nádia Accioly Pinto Nogueira.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- D667a Dodou, Hilania Valéria.  
Atividade Antimicrobiana da violaceína sobre *Staphylococcus epidermidis* / Hilania Valéria Dodou. –  
2017.  
93 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e  
Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Profa. Dra. Nádia Accioly Pinto Nogueira.
1. Violaceína. 2. Atividade antimicrobiana. 3. *Staphylococcus epidermidis*. 4. Biofilme. 5. Sinergismo.  
I. Título.

CDD 615

---

HILANIA VALÉRIA DODOU

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA VIOLACEÍNA SOBRE *STAPHYLOCOCCUS*  
*EPIDERMIDIS*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em \_\_/\_\_/\_\_

Banca examinadora:

---

Profa. Dr<sup>a</sup>. Nádia Accioly Pinto Nogueira (Orientadora)  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (UFC)

---

Profa. Dr<sup>a</sup>. Cibele Barreto Mano de Carvalho  
Departamento de Patologia e Medicina Legal (UFC)

---

Profa. Dr<sup>a</sup>. Andréa Bessa Teixeira (externo à instituição)  
Faculdade Metropolitana da Grande Fortaleza

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por tudo.

Aos meus pais, Hiderval e Izolania, por ser minha base para tudo e estarem presentes em todos os momentos de minha vida. Só cheguei até aqui pelo esforço deles na minha educação.

Aos meus irmãos, Hilana e David, pelo companheirismo, confiança, apoio e por serem inspirações para mim.

Ao meu noivo, Joaquim, por estar ao meu lado, me apoiando sempre e me motivando nos momentos difíceis.

À querida professora Nádia, por me orientar desde a graduação, por todos os ensinamentos, pela confiança e por contribuir imensamente no meu crescimento profissional.

Às professoras Cibele e Andréa, por aceitarem avaliar o nosso trabalho e por todas as sugestões.

Ao LabMicro e a todos que fazem parte dele, Gleilton, Andressa, Suelen, Matheus e Pedro, por todo o conhecimento compartilhado e pela companhia a cada dia de experimento, o que tornou tudo mais fácil e mais leve.

À Universidade Federal do Ceará pelo apoio.

À CAPES pelo apoio financeiro concedido.

Á todos os amigos e colegas que de alguma forma estiveram presentes nesta jornada.

Obrigada!!!

## RESUMO

*Staphylococcus epidermidis* faz parte da microbiota natural do homem, mas apresenta potencial patogênico quando se trata de infecções relacionadas a dispositivos médicos. O surgimento de cepas resistente a diversos antimicrobianos vem criando desafios na escolha da terapêutica. Diante desse cenário, tornam-se muito importantes estudos que investiguem novas substâncias com potencial antimicrobiano. A violaceína (VIO) é um metabólito produzido por bactérias de diferentes espécies, com destaque para *Chromobacterium violaceum*, que apresenta potencial atividade antimicrobiana sobre microrganismos Gram-positivo. O estudo visou avaliar a atividade antimicrobiana da VIO sobre cepas de *S. epidermidis* formadoras e não formadoras de biofilme, assim como avaliar sua capacidade de agir sinergicamente com fármacos antimicrobianos já comercializados. A VIO demonstrou excelente ação antimicrobiana sobre *S. epidermidis* ATCC 12228 e ATCC 35984, apresentando, em baixas concentrações, ação bacteriostática (CIM = 10µg/mL e 20µg/mL para *S. epidermidis* ATCC 12228 e 35984, respectivamente) e bactericida (CLM = 20µg/mL para ambas as cepas). Além disso, a ação bactericida foi observada com curtos tempos de exposição (2-3horas). A VIO também foi capaz de modular sinergicamente a ação de diversos antimicrobianos, como amicacina, gentamicina, ciprofloxacino, cefepime, ceftazidima, vancomicina, meropenem, ceftriaxona, cefalotina e oxacilina sobre *S. epidermidis*, reduzindo os valores de CIM em até 16 vezes. A VIO foi capaz de inibir a formação de biofilme microbiano na mesma concentração que inibiu o crescimento em células planctônicas (CIMB=20µg/mL) e erradicou biofilme já formado em concentração 8 vezes maior (CMEB=160µg/mL). Sua ação sobre biofilme já formado foi potencializada quando associada aos fármacos cefepime, ciprofloxacino, vancomicina e meropenem, sendo capaz de erradicar completamente o biofilme na associação com ciprofloxacino, em concentrações equivalentes a ½ CMEB. Estes resultados mostram que a VIO é uma substância promissora para o desenvolvimento de um novo fármaco antimicrobiano com ação sobre este patógeno, inclusive sobre seu biofilme, ou mesmo para ser associada a antibióticos já comercializados.

**Palavras-chave:** Violaceína; Atividade antimicrobiana; *Staphylococcus epidermidis*; Biofilme; Sinergismo.

## ABSTRACT

*Staphylococcus epidermidis* is part of the human's natural microbiota, but has pathogenic potential when it comes to infections related to medical devices. The emergence of strains resistant to several antimicrobials has created challenges in the choice of therapy. Given this scenario, it is very important to investigate new substances with antimicrobial potential. Violacein is a metabolite produced by bacteria of different species, especially *Chromobacterium violaceum*, which has potential antimicrobial activity on Gram-positive microorganisms. The aim of the study was to evaluate the antimicrobial activity of violacein on strains of *S. epidermidis* forming and non-forming biofilm, as well as to evaluate its ability to act synergistically with antimicrobial drugs already marketed. VIO demonstrated excellent antimicrobial action on *S. epidermidis* ATCC 12228 and ATCC 35984, presenting bacteriostatic action (MIC = 10 µg / mL and 20 µg / mL for *S. epidermidis* ATCC 12228 and 35984, respectively) and bactericidal action (MBC = 20µg / mL for both strains). In addition, the bactericidal action was observed with short exposure times (2-3 hours). Violacein was also capable of synergistically modulating the action of several antimicrobial agents, like amikacin, gentamicin, ciprofloxacin, cefepime, ceftazidime, vancomycin, meropenem, ceftriaxone, cephalothin e oxacilin, on *S. epidermidis*, reducing MIC values for these microorganisms by up to 16 times. VIO was able to inhibit the formation of microbial biofilms at the same concentration that inhibited growth in planktonic cells and eradicated already-formed biofilm at 8-fold higher concentration (MBEC = 160 µg / mL). Its action on biofilm already formed was potentiated when associated with antimicrobial drugs already marketed, being able to completely eradicate the biofilm when associated with ciprofloxacin, in concentrations equivalent to ½ MBEC. These results show that VIO is a promising substance for the development of a new antimicrobial drug with action on this pathogen, including its biofilm, or even to be associated with already commercialized antibiotics.

**Keywords:** *Violacein; Antimicrobial activity; Staphylococcus epidermidis; Biofilm; Sinergism.*

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Micrografia da <i>Chromobacterium violaceum</i> , obtida por microscopia eletrônica de varredura .....	15
Figura 2 - Crescimento de <i>C. violaceum</i> em ágar sangue .....	17
Figura 3 - Crescimento de <i>C. violaceum</i> em ágar CLED .....	17
Figura 4 – Estrutura molecular da violaceína .....	19
Figura 5 – Via biossintética da violaceína .....	20
Figura 6 - Desenvolvimento de biofilme em <i>S. epidermidis</i> .....	25
Figura 7 – Fluxograma da estratégia experimental .....	32
Figura 8 – Espectro de absorção na região do infravermelho da VIO.....	33
Figura 9 – Fluxograma da determinação da CIM.....	35
Figura 10 – Fluxograma da determinação da CBM.....	36
Figura 11 – Fluxograma da determinação das curvas de crescimento microbiano..	37
Figura 12 - Fluxograma da determinação do efeito do tempo de exposição à VIO na viabilidade microbiana.....	38
Figura 13 – Fluxograma de classificação das cepas quanto à aderência e formação de biofilme.....	39
Figura 14 – Fluxograma de determinação da CIMB.....	40
Figura 15 – Fluxograma de determinação da CMEB.....	41
Figura 16 – Fluxograma de determinação do efeito do tempo de exposição à VIO na viabilidade microbiana em biofilme.....	42
Figura 17 – Fluxograma do ensaio do <i>Checkboard</i> .....	43
Figura 18 - Fluxograma de determinação do efeito do tempo de exposição à associação VIO-ATB na viabilidade microbiana.....	45
Figura 19 – Fluxograma para determinação da ação moduladora da VIO sobre ATB de uso clínico sobre biofilme de <i>S. epidermidis</i> .....	46



## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Atividade antimicrobiana da VIO sobre <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228..	48
Gráfico 2 - Atividade antimicrobiana da VIO sobre <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.	48
Gráfico 3 - Curva de crescimento da cepa <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....	49
Gráfico 4 - Curva de crescimento da cepa <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.....	49
Gráfico 5- Efeito do tempo de exposição a diferentes concentrações de VIO na viabilidade de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....	50
Gráfico 6 - Efeito do tempo de exposição a diferentes concentrações de VIO na viabilidade de <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.....	51
Gráfico 7 – Isobogramas mostrando o efeito das associações VIO-ATB na inibição do crescimento de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....	53
Gráfico 8 – Isobogramas mostrando o efeito da associação VIO-ATB na inibição do crescimento do <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.....	56
Gráfico 9- Efeito do tempo de exposição à associação VIO-CEF na viabilidade de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....	58
Gráfico 10- Efeito do tempo de exposição à associação VIO-MER na viabilidade de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....	59
Gráfico 11- Efeito do tempo de exposição à associação VIO-CIP na viabilidade de <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.....	60
Gráfico 12- Efeito do tempo de exposição à associação VIO-MER na viabilidade celular do <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.....	61
Gráfico 13 – Cepas de <i>S. epidermidis</i> quanto à aderência e formação de biofilme.	62
Gráfico 14 – CIMB da VIO para <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.....	63
Gráfico 15 – Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme da VIO sobre <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.....	64
Gráfico 16 – Efeito do tempo de exposição à VIO na viabilidade de biofilme de <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.....	65
Gráfico 17 – Efeito da associação VIO-CEF na viabilidade celular de biofilme de <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.....	66
Gráfico 18 – Efeito da associação VIO-VAN na viabilidade celular de biofilme de <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.....	67
Gráfico 19 – Efeito da associação VIO-CIP na viabilidade celular de biofilme de	

<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.....	68
Gráfico 20 – Efeito da associação VIO-MER na viabilidade celular de biofilme de <i>S. epidermidis</i> ATCC 35984.....	69

## LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1 – CIM e CBM de VIO para cepas de S. epidermidis.....</i>	47
Tabela 2 – Efeito modulador da VIO na atividade antimicrobiana de ATBs de uso clínico sobre o crescimento de <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228.....	52
<i>Tabela 3 - Efeito modulador da VIO na atividade antimicrobiana de ATBs de uso clínico sobre o crescimento de S. epidermidis ATCC 35984.....</i>	55
Tabela 4 – Classificação das cepas de <i>S. epidermidis</i> quanto à aderência do biofilme.....	62
Tabela 5 – Redução da viabilidade celular (em log <sub>10</sub> UFC/mL) após exposição às associações VIO-ATB em comparação ao controle, à VIO e ao ATB isolados.....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMI	Amicacina
AHLs	N-hexanoil homoserina lactonas
ANOVA	Análise de Variância
ATB	Antibiótico
ATB-VIO	Associação antibiótico violaceína
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Bap	Proteína associada ao biofilme
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
<i>C. aquaticum</i>	<i>Chromobacterium aquaticum</i>
<i>C. fluviatile</i>	<i>Chromobacterium fluviatile</i>
<i>C. haemolyticum</i>	<i>Chromobacterium haemolyticum</i>
<i>C. pseudoviolaceum</i>	<i>Chromobacterium pseudoviolaceum</i>
<i>C. subtsugae</i>	<i>Chromobacterium subtsugae</i>
<i>C. violaceum</i>	<i>Chromobacterium violaceum</i>
<i>C. piscinae</i>	<i>Chromobacterium piscinae</i>
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CEF	Cefepime
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIMB	Concentração Inibitória Mínima de Formação do Biofilme
CIP	Ciprofloxacino
CLED	<i>Cystine lactose eletrolyte deficient</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CMEB	Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme
CMRVS	Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária
CV	Cristal violeta
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
DOc	Densidade óptica do controle
EPM	Erro padrão médio
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G	Grama
h	Hora
ICIF	Índice da Concentração Inibitória Fracionada
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IPA	Ácido 3-indol pirúvico

IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
LabMicro	Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada
LogUFC/mL	Logaritmo de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro
LTDA	Limitada
MER	Meropenem
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
MRSA	<i>S. aureus</i> resistente à meticilina
N°	Número
nm	Nanômetro
p/v	Peso/volume
PCs	Concentrados de plaquetas
pH	Potencial hidrogeniônico
PIA	Polissacarídeo intracelular de adesão
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo
TSA	Trip Soy Agar
TSB	Trip Soy Broth
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por mililitro
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta
VAN	Vancomicina
VIO	Violaceína
Vol.	Volume
VRE	<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina
µg	Micrograma
µL	Microlitro

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\beta$	Beta
$>$	Maior que
$<$	Menor que
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$\%$	Porcento
$\geq$	Maior ou igual
$\leq$	Menor ou igual
$*$	Asterisco
$=$	Igual

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	16
<b>2.1.</b>	<i>Chromobacterium violaceum</i> .....	16
<b>2.2.</b>	<b>Violaceína</b> .....	18
<b>2.2.1.</b>	<i>Características gerais</i> .....	18
<b>2.2.2.</b>	<i>Biossíntese e regulação da produção de violaceína</i> .....	19
<b>2.2.3.</b>	<i>Atividades biológicas</i> .....	21
<b>2.3.</b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	22
<b>2.3.1.</b>	<i>Características gerais</i> .....	23
<b>2.3.2.</b>	<i>Fatores de virulência</i> .....	23
<b>2.3.3.</b>	<i>Biofilme</i> .....	24
<b>2.3.3.1.</b>	<i>Considerações gerais</i> .....	24
<b>2.3.3.2.</b>	<i>Mecanismo de formação</i> .....	25
<b>2.3.3.3.</b>	<i>Produção de biofilmes e resistência a antibióticos</i> .....	26
<b>2.4.</b>	<b>Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS)</b> .....	27
<b>2.5.</b>	<b>Resistência a antimicrobianos</b> .....	29
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	31
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
<b>4.1.</b>	<b>Desenho do estudo</b> .....	32
<b>4.2.</b>	<b>Obtenção da VIO</b> .....	33
<b>4.3.</b>	<b>Microrganismos, meios de cultura e reagentes</b> .....	33
<b>4.4.</b>	<b>Determinação de atividade antimicrobiana da VIO</b> .....	34
<b>4.4.1.</b>	<i>Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i> .....	34
<b>4.4.2.</b>	<i>Concentração Bactericida Mínima (CBM)</i> .....	35
<b>4.4.3.</b>	<i>Efeito da VIO na viabilidade celular</i> .....	36
<b>4.4.3.1.</b>	<i>Determinação das curvas de crescimento microbiano</i> .....	36
<b>4.4.3.2.</b>	<i>Efeito do tempo de exposição a VIO na viabilidade microbiana</i> .....	37
<b>4.5.</b>	<b>Avaliação da atividade anti-biofilme</b> .....	38
<b>4.5.1.</b>	<i>Avaliação das cepas quanto à aderência e a formação de biofilme</i> ...	38
<b>4.5.2.</b>	<i>Concentração Inibitória Mínima de Formação de Biofilme (CIMB)</i> .	40
<b>4.5.3.</b>	<i>Concentração Mínima de Erradicação de Biofilme (CMEB)</i> .....	41

4.5.4.	<i>Efeito do tempo de exposição á VIO na viabilidade microbiana em biofilme.....</i>	42
4.6.	<b>Atividade moduladora da VIO sobre antibióticos (ATB) de uso clínico em células planctônicas.....</b>	43
4.6.1.	<i>Método do Checkerboard.....</i>	43
4.6.2.	<i>Determinação do efeito do tempo de exposição à associação violaceína-antibiótico (VIO-ATB) na viabilidade microbiana.....</i>	44
4.7.	<b>Atividade moduladora da VIO sobre antibióticos (ATB) de uso clínico sobre biofilme.....</b>	45
4.8.	<b>Análise estatística.....</b>	46
5.	<b>RESULTADOS .....</b>	47
5.1.	<b>Atividade antimicrobiana da VIO.....</b>	47
5.1.1.	<i>Concentrações Inibitória e Bactericida Mínimas (CIM e CBM).....</i>	47
5.1.2.	<i>Curvas de crescimento microbiano.....</i>	49
5.1.3.	<i>Efeito do tempo de exposição à VIO na viabilidade de S. epidermidis.....</i>	50
5.2.	<b>Efeito modulador de VIO na atividade antimicrobiana de ATB de1 uso clínico.....</b>	51
5.3.	<i>Efeito do tempo de exposição a associação VIO-ATB na viabilidade microbiana.....</i>	57
5.4.	<b>Atividade anti-biofilme.....</b>	62
5.4.1.	<i>Classificação das cepas quanto aderência e formação de biofilme....</i>	62
5.4.2.	<i>Concentração Inibitória Mínima de Formação do Biofilme.....</i>	63
5.4.3.	<i>Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme.....</i>	63
5.4.4.	<b>Efeito do tempo de exposição à VIO na viabilidade microbiana em biofilme.....</b>	64
5.5.	<b>Ação moduladora da VIO sobre antimicrobianos de uso clínico sobre biofilme de S. epidermidis. ....</b>	65
6.	<b>DISCUSSÃO.....</b>	71
7.	<b>CONCLUSÃO.....</b>	79
8.	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	80
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	81



## 1. INTRODUÇÃO

*Staphylococcus epidermidis* é um coco Gram-positivo que faz parte da microbiota natural da pele e mucosas do homem, apesar disso, tal microrganismo apresenta potencial patogênico quando se trata de infecções relacionadas à assistência à saúde. É um dos principais agentes relacionado a infecções que envolvem dispositivos médicos, como cateteres, próteses, sondas, *shunts*, entre outros. Sua capacidade de causar infecções está associada a expressão de fatores de virulência, principalmente a formação de biofilme (CHESSA; GANAU; MAZZARELLO, 2015; NANVAR *et al.*, 2014).

O surgimento de cepas deste microrganismo resistente a diversos antimicrobianos, nas últimas décadas, vem criando desafios na escolha da terapêutica, visto que a maior parte das cepas isoladas de infecções hospitalares é resistente aos fármacos betalactâmicos e casos de cepas resistentes aos glicopeptídeos já são descritos (MONTUFAR ANDRADE *et al.*, 2016).

Diante desse cenário, tornam-se muito importantes estudos que investiguem novas substâncias com potencial antimicrobiano. A violaceína é um metabólito produzido por bactérias de diferentes espécies, com destaque para *Chromobacterium violaceum* que apresenta diversas propriedades biológicas já descritas na literatura, como potencial imunomodulador, antioxidante, antiulcerogênico, antitumoral e amplo espectro de atividade antimicrobiana (ANJU *et al.*, 2015; CHOI *et al.*, 2015b; AGATE *et al.*, 2016; VERINAUD *et al.*, 2015; LEAL *et al.*, 2015; ANTONISAMY *et al.*, 2014; ALSHATWI *et al.*, 2016). Apesar disso, sua ação específica sobre cepas planctônicas e biofilme de *S. epidermidis* não está bem descrita. Questionou-se, então, se tal metabólito apresenta ação sobre *S. epidermidis* formadores e não formadores de biofilme.

O presente projeto fundamenta-se, portanto, nessa problemática de resistência crescente do *S. epidermidis* aos antimicrobianos e a necessidade de desenvolvimento de novas substâncias eficazes sobre este patógeno. O estudo visa, então, avaliar a atividade antimicrobiana da violaceína sobre cepas de *S. epidermidis* formadoras e não formadoras de biofilme, assim como sua capacidade de modular sinergicamente a ação de fármacos antimicrobianos já comercializados.

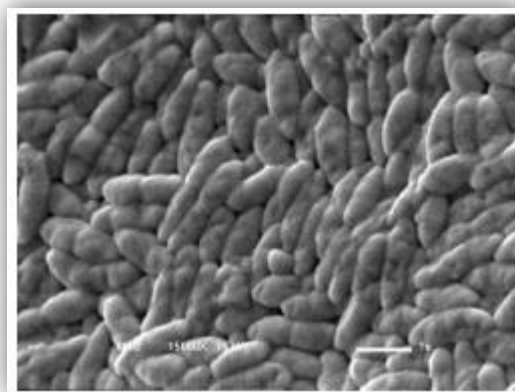
## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. *Chromobacterium violaceum*

O gênero *Chromobacterium* inclui bactérias Gram negativo, de vida livre, com formato de bacilo e extremidades arredondadas e que se movem por meio de flagelos, sendo reconhecidas seis espécies principais atualmente: *C. subtsugae*, *C. aquaticum*, *C. haemolyticum*, *C. pseudoviolaceum*, *C. piscinae* e a *C. violaceum* (BATISTA, 2014; COSTA *et al.*, 2011).

*C. violaceum* caracteriza-se por pertencer à família de  $\beta$ - proteobactérias, ser coco bacilo (Figura 1), Gram negativo, oxidase e catalase positivo, anaeróbio facultativo, que se move por meio de flagelos e tem um crescimento ótimo entre 15 e 40°C (PANT; SHARMA, 2015; BATISTA, 2014).

Figura 1 - Micrografia da *Chromobacterium violaceum*, obtida por microscopia eletrônica de varredura.



Fonte: Azevedo (2005)

É um microrganismo saprófita que domina uma variedade de ecossistemas, sendo facilmente encontrada em água e solos de regiões tropicais e subtropicais, sendo que, na Amazônia brasileira, é componente importante da microbiota do solo, sendo encontrada em abundância nas margens do Rio Negro (CASTRO *et al.*, 2015; GABRIEL *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2016).

Possui um versátil metabolismo de geração de energia decorrente da presença de redutases e oxidases apropriadas, o que permite sua sobrevivência em condições aeróbias e também anaeróbias. É capaz de utilizar açúcares simples, como a glicose,

frutose e galactose, como fontes energéticas, assim como aminoácidos e lipídios (CRECZYNSKI-PASA; ANTONIO, 2004).

Devido sua versatilidade, alta capacidade de se adaptar a diferentes ambientes e de produzir metabólitos de interesse biotecnológico, *Chromobacterium violaceum* (linhagem ATCC 12472) foi escolhida para o sequenciamento do seu genoma no Projeto Genoma Nacional Brasileiro. A completa sequência do genoma desta bactéria revelou extensos caminhos alternativos de formação de energia, sistemas complexos para adaptação ao estresse e motilidade, além de utilização generalizada de *Quorum sensing* para o controle de sistemas que garantem a versatilidade e capacidade de adaptação desta bactéria (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003).

*C. violaceum* cresce facilmente em meios de cultura sólidos usuais como ágar *McConkey*, ágar sangue (Figura 2), ágar chocolate e ágar CLED (Figura 3), nos quais forma colônias violetas decorrente da produção de um pigmento conhecido como violaceína que é alvo de inúmeros estudos (HERRERA *et al.*, 2005; PANT; SHARMA, 2015).

Figura 2 - Crescimento de *C. violaceum* em ágar sangue.



Fonte: Brown *et al.* (2006)

Figura 3 - Crescimento de *C. violaceum* em ágar CLED.



Fonte: Pant; Sharma (2015)

## 2.2. Violaceína

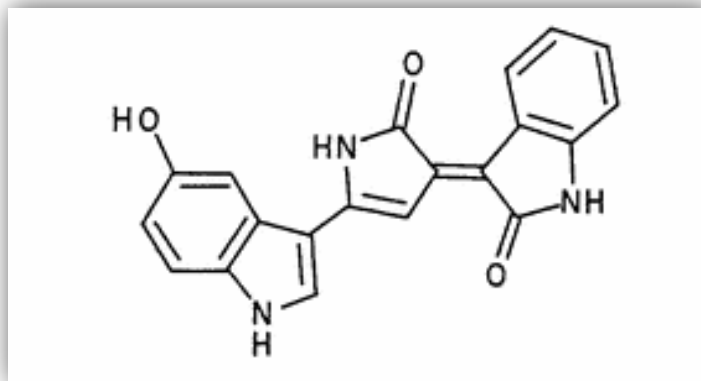
### 2.2.1. Características gerais

A violaceína é um pigmento natural violeta produzido especialmente por bactérias do gênero *Chromobacterium*, como *C. violaceum* (encontrada em rios, águas residuais e estações de tratamento) e *C. fluviatile*, mas também por outras espécies, como *Janthinobacterium lividum* (encontrada em geleiras), *Pseudoalteromonas sp.* e *P. luteoviolacea* (identificadas em águas profundas do mar e superfícies de esponjas do mar), *Duganella sp.* (identificada em solos agrícolas), *Collimonas sp.* (encontrada no litoral Ártico e em águas), *Iodobacter fluviatile* e *Microbulbifer sp.* (ANJU *et al.*, 2015; CHOI *et al.*, 2015a; BALLESTRIERO *et al.*, 2015; LIMA, 2013; LEAL, 2011).

Como as bactérias produtoras de violaceína abrangem diversos gêneros e são encontradas em variados ambientes naturais, o papel deste pigmento na fisiologia dos microrganismos que o produzem ainda é questionado, sendo investigadas funções fisiológicas como: proteção contra radiação ultravioleta, devido suas propriedades fotoquímicas; papel no sistema antioxidante do microrganismo, possibilitando sua adaptação a diferentes condições ambientais; inibição da predação bacteriana por protozoários; fonte de armazenamento do aminoácido triptofano; ou mesmo conferir toxicidade para espécies competidoras, proporcionando vantagem competitiva às bactérias que a produzem (CHOI *et al.*, 2015a; MARTINS JÚNIOR, 2009).

Tal pigmento possui massa molar de 343,34g/mol e é constituído por duas moléculas de L-triptofano modificadas que constituem um dímero formado pelas subunidades 5-hidroxiindole, oxindole e 2-pirrolidona, e é caracterizado quimicamente como (3 - (1,2 - dihidroxi - 5 - (5 - hidroxi - 1H - indol - 3 - il) - 2oxo - 3H - pirrol - 3 - ilideno) - 1,3 dihidro - 2H - indol - 2 - ona) (Figura 4). Sua fórmula química e estrutura foram descritas por Ballantine e colaboradores em 1960 (LIMA, 2013; RETTORI; DURÁN, 1998).

Figura 4 – Estrutura molecular da violaceína.



Fonte: Rettori; Durán (1998).

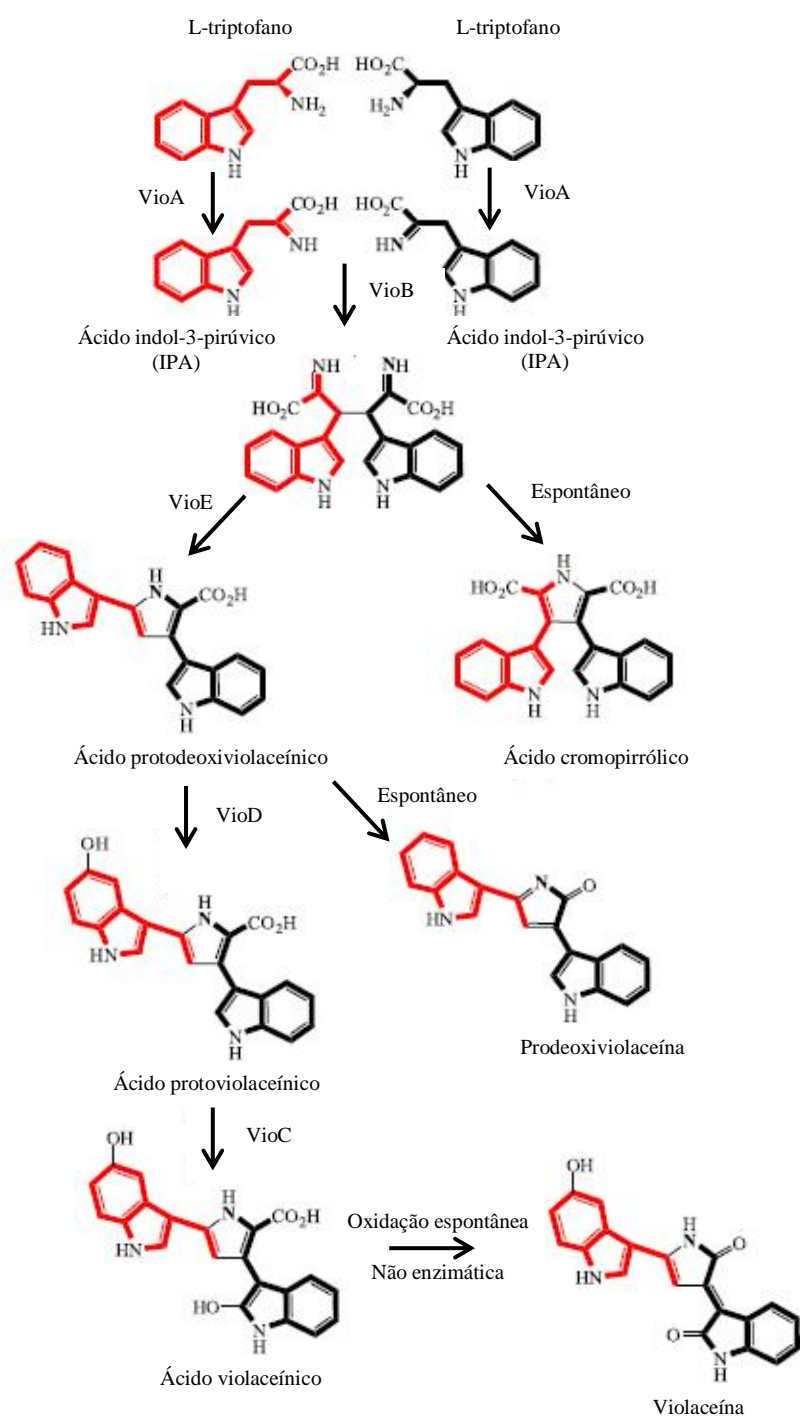
A violaceína é insolúvel em água e, por isso, vários estudos tentam desenvolver nanopartículas poliméricas contendo tal composto com o intuito de aumentar sua solubilidade e potencializar seu efeito. Apresenta baixa solubilidade em etanol, moderada em acetona e é bastante solúvel em metanol, tetrahydrofurano, n-butanol e DMSO (dimetilsulfóxido). Além disso, seu ponto de fusão é  $> 290^{\circ}\text{C}$ . Apresenta ainda características fotoquímicas, fluorescentes e fotodinâmicas específicas, com dois picos de absorção no espectro UV-vis (em 330 nm e uma larga banda de absorção entre 500 e 650 nm, com pico máximo em 575 nm) (MARTINS JÚNIOR, 2009; DURÁN *et al.*, 2007; DURÁN *et al.*, 2007).

Tal pigmento tem atraído crescente interesse de pesquisadores em decorrência de suas importantes atividades biológicas e potencial farmacológico. Além disso, vários grupos têm buscado aprimorar o processo de produção da violaceína por meio de engenharia genética.

### 2.2.2. *Biossíntese e regulação da produção de violaceína*

Os estudos que elucidaram os genes e proteínas envolvidos na síntese da violaceína em *C. violaceum* foram o de Shinoda *et al.* (2007) e Balibar & Walsh (2006). Segundo tais autores um conjunto de cinco genes, que compõem o *operon vioABCDE*, são responsáveis pela biossíntese da violaceína, tendo sido proposta a seguinte via biossintética:  $\text{VioA} \rightarrow \text{VioB} \rightarrow \text{VioE} \rightarrow \text{VioD} \rightarrow \text{VioC}$  (Figura 5).

Figura 5 - Via biossintética da violaceína.



Fonte: Dantas *et al.* (2012).

A biossíntese ocorre da seguinte forma: VioA codifica uma enzima L-triptofano oxidase que oxida as moléculas de triptofano originando o ácido 3-indol pirúvico (IPA); em seguida, o gene VioB codifica uma enzima poliketídeo sintase que atua no acoplamento de duas moléculas de IPA, formando um intermediário do ácido

cromopirrólico; o gene VioE é responsável por uma mudança conformacional que leva à síntese da prodeoxiviolaceína; o gene VioD codifica uma enzima monoxigenase capaz de hidroxilar um dos anéis indólicos da prodeoxiviolaceína, formando o ácido proto-violaceínico; o gene VioC codifica outra monoxigenase que age sobre o outro anel indólico, formando o ácido violaceínico, intermediário que sofre oxidação espontânea e origina a VIO (LIMA, 2013; DANTAS *et al.*, 2012; LEAL, 2011).

O mecanismo regulatório da biossíntese da violaceína na bactéria ocorre por um sistema de *Quorum sensing* e, uma vez que é bastante fácil observar a produção desse metabólito pelo microrganismo, devido sua coloração, ele tornou-se um indicador útil de moléculas de *Quorum sensing* e seus inibidores (WANG *et al.*, 2016; CHOI *et al.*, 2015a; OCA MEJÍA *et al.*, 2015).

O mecanismo de *Quorum sensing* é uma forma de comunicação célula a célula capaz de regular a expressão de conjuntos de genes especializados em resposta à densidade celular. As bactérias produzem pequenas moléculas auto-indutoras que atravessam as células e se acumulam no ambiente proporcionalmente a densidade celular. As concentrações dessas moléculas sinalizadoras são detectadas pelo mecanismo de *Quorum sensing* e servem de sinal para regular a transcrição de genes-alvo que garantem alguma vantagem para a célula, permitindo que as bactérias se ajustem às suas necessidades (GHOSH *et al.*, 2014; LEAL, 2011).

Na biossíntese da violaceína, as moléculas sinalizadoras são as N-hexanoil homoserina lactonas (AHLs). A proteína receptora destas moléculas e a enzima responsável pela produção das mesmas são codificadas pelos genes *cviR* e *cviI*, respectivamente. A sinalização ocorre em função de variações ambientais, como flutuações no pH, temperatura, presença de nutrientes, entre outros. Na biossíntese da violaceína, por exemplo, a presença de glicose no meio inibe sua produção, enquanto que a presença de sacarose e glicerol induz o processo. Além disso, temperatura em torno de 30°C favorece a síntese da violaceína (OCA MEJÍA *et al.*, 2015; KAMAEVA, VASILCHENKO e DERYABIN, 2014; OLIVEIRA, 2005).

### **2.2.3. Atividades biológicas**

A violaceína exibe muitas propriedades biológicas já relatadas na literatura, tais como largo espectro de atividade antibacteriana (CHOI *et al.*, 2015b; MARTINS JÚNIOR, 2009), antimicobacteriana (MOJIB *et al.*, 2010) antiviral (ANDRIGHETTI-

FROHNER *et al.*, 2003), antifúngica (AGATE *et al.*, 2016; ANJU *et al.*, 2015; SASIDHARAN *et al.*, 2015; BECKER *et al.*, 2009), antiprotozoária (LOPES *et al.*, 2009; LEON *et al.*, 2001; ANTONIO, 1994), imunomoduladora (VERINAUD *et al.*, 2015), analgésica e antipirética (ANTONISAMY, IGNACIMUTHU, 2010), antioxidante (LEAL *et al.*, 2015; LEAL, 2011), além de ação antiulcerogênica (ANTONISAMY *et al.*, 2014; ANTONISAMY *et al.*, 2009) e significativa toxicidade para várias linhagens de células tumorais (ALSHATWI *et al.*, 2016; HASHIMI *et al.*, 2015; MASUELLI *et al.*, 2016; MEHTA *et al.*, 2015; PLATT *et al.*, 2014; QUEIROZ *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2009). Embora a violaceína tenha uma ampla gama de atividades, os seus alvos celulares e moleculares permanecem desconhecidos e são alvos de inúmeros estudos.

Os primeiros relatos do potencial antimicrobiano da violaceína ocorreram por meio da observação de que lesões de pele causadas pela *C. violaceum* não apresentavam contaminação por outros microrganismos (LIMA, 2013). Estudos posteriores revelaram importante atividade antimicrobiana *in vitro* da violaceína, principalmente frente a cepas de microrganismos Gram positivo, como contra *Staphylococcus aureus* (MARTINS JÚNIOR, 2009).

Lima (2013) relatou acentuado efeito antimicrobiano da violaceína contra *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Enterococcus* resistente à vancomicina (VRE), microrganismos causadores frequentes de infecções hospitalares. Relatou ainda que a violaceína causa alterações morfológicas na parede celular destes microrganismos e afeta a expressão de proteínas e genes MRSA.

Batista (2014) observou que a violaceína apresenta atividade antimicrobiana sobre cepas de *S. aureus* planctônicas e produtoras de biofilme, sendo sua ação mais efetiva no início da fase exponencial de crescimento do microrganismo e dependente da concentração. Constatou ainda que a violaceína age sobre o envoltório celular, alterando a morfologia e a permeabilidade da membrana plasmática, permitindo o extravasamento de material genético; atua ainda modulando a expressão de fatores de virulência do *S. aureus*.

### **2.3. *Staphylococcus epidermidis***

O corpo humano é habitat natural de inúmeras populações bacterianas que compõem a sua microbiota e favorecem a saúde humana, mas que também apresentam



potencial de causar doenças. Em virtude disso, nos últimos anos, tem se intensificado estudos que tentam associar os microrganismos encontrados em diversas regiões do corpo com diferentes condições de saúde (CHESSA; GANAU; MAZZARELLO, 2015).

Microrganismos que anteriormente eram vistos como comensais e inócuos, agora são descritos como potenciais patógenos oportunistas, relacionados a diferentes infecções, com importância mundial. Dentre tais microrganismos, podemos citar aqueles pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, com destaque para o *S. aureus* e *S. epidermidis*, constituintes da microbiota da pele humana. Recentemente, têm-se observado um aumento no número de infecções hospitalares associadas a esses dois microrganismos, estando entre os principais agentes causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde (CHESSA; GANAU; MAZZARELLO, 2015; NANVAR *et al.*, 2014; OTTO, 2009).

### **2.3.1. Características gerais**

O gênero *Staphylococcus* é composto por mais de 40 espécies de cocos Gram positivo, anaeróbios facultativos, catalase positivo, que não apresentam motilidade e não formam esporos. Este gênero pode ser classificado em dois grupos principais, com base na presença ou ausência da enzima coagulase: o grupo de *Staphylococcus* coagulase positivo, representado pelo *S. aureus*; e o grupo de *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN), com destaque para *S. epidermidis*, que está associado à maioria das infecções desse grupo (NANVAR *et al.*, 2014; OTTO, 2009).

*S. epidermidis* é encontrado no epitélio humano, principalmente na região das axilas, cabeça e narinas. Acredita-se que, nesse habitat, ele apresenta função probiótica, impedindo que o hospedeiro seja colonizado por outros patógenos mais virulentos (CHESSA; GANAU; MAZZARELLO, 2015; OTTO, 2009). Essa bactéria utiliza a glicose para crescer em condições anaeróbias, enquanto que, em condições aeróbias, usa diferentes carboidratos, como frutose, maltose, sacarose e glicerol (NANVAR *et al.*, 2014).

Em virtude da expressão de vários fatores de virulência e da sua capacidade de colonizar diferentes superfícies, pela formação de biofilmes, *S. epidermidis* é considerado um preocupante causador de infecções relacionadas à assistência à saúde. Além disso, o surgimento de estirpes resistente a diversos antimicrobianos, nas últimas décadas, vem criando desafios na escolha da terapêutica. Esses fatores tornam cada vez

mais importantes os estudos que buscam o desenvolvimento de novos fármacos eficazes contra *S. epidermidis*.

### **2.3.2. Fatores de virulência**

A sobrevivência do microrganismo no hospedeiro e o consequente estabelecimento da infecção dependem da habilidade do patógeno de evadir o sistema de defesa e de invadir o tecido do hospedeiro (SALABERRY, 2014). Essas habilidades dependem da expressão de fatores de virulência pelos microrganismos. Tais fatores são, portanto, estratégias, estruturas ou produtos expressos pelos microrganismos que elevam sua patogenicidade (GUASTALLI, 2010).

Os principais fatores de virulência do *S. epidermidis* são: biofilme, PIA (polissacarídeo intracelular de adesão), Bap (proteína associada ao biofilme), toxinas, modulinas solúveis em fenol, delta toxina, lipases e proteases (NANVAR *et al.*, 2014).

Michelim *et al.* (2005), ao estudar infecções por *S. epidermidis* em unidades de cuidados intensivos, relatou uma elevada frequência de multirresistência (76,5%) associada à expressão de fatores, como hemolisinas, lipases, proteases e adesinas relacionados, respectivamente, com: ações neurotóxicas e com resposta inflamatória grave; com a capacidade de invadir a derme e epiderme do hospedeiro e sobreviver em tecidos com altas concentrações de lipídeos; com o papel essencial em causar danos aos tecidos do hospedeiro e na resposta inflamatória, ao degradar peptídeos sinalizadores no processo imunológico de defesa; com a facilidade de formação de biofilmes e, consequentemente, proliferação sobre superfícies de implantes médicos e cateteres, por exemplo.

Embora diversos fatores de virulência do *S. epidermidis* tenham sido descritos na literatura, a capacidade de formação de biofilmes é considerada como o fator mais importante na patogenicidade dessa espécie e, portanto, é descrito mais detalhadamente a seguir.

### **2.3.3. Biofilme**

#### **2.3.3.1. Considerações gerais**

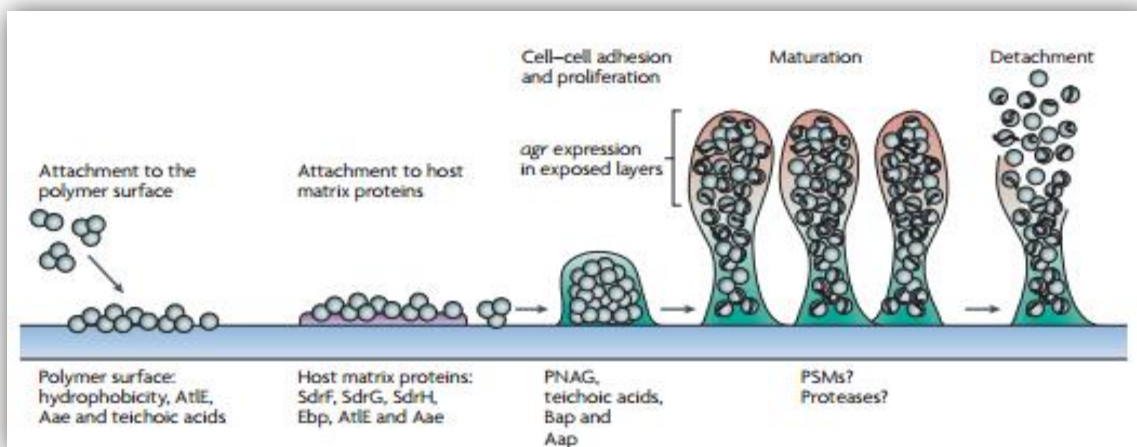
Os biofilmes consistem em aglomerados multicelulares de bactérias em superfícies, com incorporação em uma matriz extracelular, que confere proteção para a

bactéria contra os mecanismos de defesa do hospedeiro e contra agentes antimicrobianos (NAMVAR *et al.*, 2014). É importante o estudo de bactérias formadoras de biofilmes porque essas são, segundo a literatura, de 10 a 100 vezes mais resistentes aos antimicrobianos que as bactérias não formadoras (AGUILA-ARCOS *et al.*, 2015).

### 2.3.3.2.. Mecanismo de formação

O processo de formação do biofilme segue algumas etapas. Inicialmente, ocorre a adesão microbiana e a colonização de uma superfície, seguido da proliferação celular e a agregação em multicamadas, ocorre então a maturação e, por fim, o descolamento do biofilme e liberação das células (Figura 6) (PINHEIRO *et al.*, 2014).

Figura 6 – Desenvolvimento de biofilme em *S. epidermidis*.



Fonte: Otto (2009).

Para que isso ocorra, há a necessidade de forças de adesão (para a colonização e interação entre as células), forças perturbadoras (para que se formem canais com fluidos que levarão nutrientes para as células e darão a estrutura tridimensional do biofilme maduro) e forças destrutivas (para o destacamento de grupos celulares do biofilme que limita a expansão do mesmo, mas promove a disseminação da infecção) (OTTO, 2009).

Quando um dispositivo médico é colocado no paciente, os constituintes presentes nos fluidos corporais cobrem o implante e mudam suas propriedades de superfície, facilitando a adesão do microrganismo. As bactérias apresentam diversas

proteínas na sua superfície que reconhecem e se ligam às proteínas da matriz extracelular do hospedeiro. Em *Staphylococcus*, duas proteínas são importantes, a SSP-1 e SSP-2 (PINHEIRO *et al.*, 2014).

A produção do PIA é outra etapa muito importante, pois o mesmo é responsável pela adesão entre as células e o agrupamento em multicamadas. Sua produção é mediada por genes (*ica*) que fazem parte de um operon (*icaADBC*), além do gene *icaR*, que tem função reguladora. Outras proteínas adesivas também contribuem para a formação do biofilme, como a proteína associada ao acúmulo e proteína associada ao biofilme (*Bap* em *S. epidermidis*). Entretanto, o operon *ADBC* é o principal fator responsável pela formação do biofilme em *S. epidermidis*, principalmente em infecções associadas a cateteres (PINHEIRO *et al.*, 2014).

Os mecanismos de maturação e de liberação do biofilme ainda são mal compreendidos, mas acredita-se que esteja envolvida a expressão de peptídeos com atividade proteolítica sobre as camadas do biofilme. Sabe-se que a liberação do biofilme em *S. epidermidis* é controlada por sistema *quorum sensing* (OTTO, 2009; OTTO, 2012).

#### 2.3.3.3. Produção de biofilmes e resistência a antibióticos

As bactérias integrantes de um biofilme estão protegidas da ação do sistema imune do hospedeiro e também de fármacos antimicrobianos. Essas bactérias, no geral, são mais resistentes aos antibióticos que as bactérias planctônicas, o que é explicado por mecanismos como reduzida penetração do fármaco, ligação dos antibióticos a componentes do biofilme e expressão alterada de genes (PINHEIRO *et al.*, 2014).

Além disso, para a formação do biofilme, a bactéria apresenta adaptações em todo o seu genoma, como na biossíntese de ácidos nucleicos, proteínas e da parede celular. Essas modificações genéticas justificam a limitação da atividade de antibióticos que agem sobre células com metabolismo e crescimento ativos (OTTO, 2009).

Farina *et al.* (2013) relatou, em estudo no Paraguai, que 40,6% dos SCN isolados de pacientes hospitalizados e ambulatoriais eram *S. epidermidis*, sendo que 73,1% desses produziam biofilme. A presença do gene *mecA* foi identificada em 69,2% dos *S. epidermidis*, sendo que desses 83% produziam biofilme. Concluiu, portanto, que o principal fator de virulência associado à resistência do *S. epidermidis* é a produção de

biofilme, visto que tal fator é mais acentuado naqueles microrganismos resistentes a meticilina.

Sahal e Bilkay (2014), ao estudarem cepas de *S. epidermidis* isoladas de amostras hospitalares na Turquia, identificaram que, dentre *S. epidermidis* não formadores de biofilme, 65% apresentaram resistência a todos os fármacos betalactêmicos testados (penicilina, oxacilina, amoxicilina, ácido clavulônico) e 60% era multirresistente. Já entre os formadores de biofilme essas frequências eram de 80% e 100%, respectivamente.

Percebe-se, então, que a produção de biofilme tem um papel nas características de resistência antimicrobiana do *S. epidermidis* e é um fator preocupante quando associado à infecções relacionadas à assistência à saúde.

#### **2.4. Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS)**

No passado, quando se isolava algum *Staphylococcus* coagulase negativo (SCN) nos laboratórios de microbiologia se considerava caso de contaminação e, portanto, estes microrganismos não eram centro de atenção. Entretanto, atualmente, esses patógenos são reconhecidos como importantes causadores de infecções, principalmente em pacientes imunocomprometidos ou que usam implantes médicos, como cateteres e próteses (FARINA *et al.*, 2013; MONTUFAR ANDRADE *et al.*, 2016).

Nos países em desenvolvimento, a maior parte dos microrganismos isolados de infecções hospitalares são cocos Gram positivo, incluindo os SCN. Fatores como imunossupressão, hospitalização em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e o uso de cateteres estão associados a infecções sanguíneas por SCN (MONTUFAR ANDRADE *et al.*, 2016).

*S. epidermidis* é o principal agente relacionado a infecções que envolvem dispositivos médicos, como cateteres venosos centrais ou periféricos. Esse microrganismo também é encontrado em *shunts*, próteses articulares, infecções de sítio cirúrgico, lentes de contato contaminadas, sonda vesicais, entre outros. Alguns estudos mostram que essas infecções são causadas pelas cepas presentes na pele do próprio paciente ou dos profissionais da saúde que interagem com ele, que contaminam o dispositivo durante sua inserção (CHESSA; GANAU; MAZZARELLO, 2015; NANVAR *et al.*, 2014; OTTO, 2009).

Lima e Oliveira (2010) relatam que a prótese articular acarreta prejuízo na função dos granulócitos locais, que se acumulam, se degranulam parcialmente, reduzem a produção de superóxido desmutase e, portanto, são menos eficazes no processo de defesa contra patógenos. Dessa forma, a presença da prótese reduz em mais de 100.000 vezes a quantidade de inóculo necessário para que aconteça a infecção, o que facilita a proliferação por bactérias como *S. aureus* e *S. epidermidis*, que são predominantes nas infecções de próteses articulares.

Marconi *et al.* (2009), ao estudar infecções relacionadas a cateteres em recém-nascidos, encontrou que a espécie mais prevalente foi *S. epidermidis*, isolada em 75% dos casos. O fato de que tal microrganismo é a espécie predominante na microbiota do recém-nascido associado à capacidade de algumas cepas apresentarem maior patogenicidade, devido à capacidade de adesão, justificam o resultado encontrado pelo autor.

Segundo Flores-Paez *et al.* (2015), apesar de ser um comensal comum da conjuntiva sadia, *S. epidermidis* pode causar infecções no olho, como conjuntivite, blefarite, úlceras da córnea e endoftalmite, associadas ao uso de lentes de contato ou durante cirurgia ocular. Alguns estudos relatam elevada incidência de infecção ocular por *S. epidermidis*, sendo, em alguns casos, relatadas percentagens superiores às infecções oculares por *S. aureus* (BHOOMIBUNCHOO *et al.* 2013; MOLONEY; PARK *et al.*, 2014).

Rigatti *et al.* (2010) ao estudar bacteremias por SCN encontrou *S. epidermidis* como patógeno predominante, responsável por 67% dos casos, e observou um elevado índice de resistência desse microrganismo a diversos fármacos antimicrobianos.

Kou *et al.* (2015) relata em seu estudo a preocupação do *S. epidermidis* como contaminante de bolsas de concentrados de plaquetas (PCs), que representa o maior risco de infecção pós-transfusional em países desenvolvidos. Segundo o autor, *S. epidermidis* é o principal SCN isolado a partir de PCs e está envolvido em reações transfusionais fatais em todo o mundo.

A erradicação desta população é contra indicada, visto que a mesma pode ser substituída por microrganismos mais nocivos ao organismo, portanto, deve-se encontrar um equilíbrio com tais bactérias por meio de ações preventivas como a esterilização dos equipamentos médicos e a devida higiene dos pacientes e dos profissionais da saúde (CHESSA; GANAU; MAZZARELLO, 2015).

## 2.5. Resistência a antimicrobianos

Um dos assuntos mais importantes em microbiologia é o surgimento de resistência microbiana a fármacos antimicrobianos, principalmente quando relacionado a patógenos nosocomiais. É um assunto preocupante visto que esse processo ocorre, muitas vezes, mais rapidamente do que o desenvolvimento de novas drogas.

Nas últimas décadas, o aumento no uso de dispositivos médicos, associado ao uso indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro, principalmente em pacientes imunocomprometidos, foram importantes para a caracterização do *S. epidermidis* como agente patogênico oportunista com crescente resistência a antibióticos, especialmente os betalactâmicos. *S. epidermidis* pode apresentar resistência aos betalactâmicos por meio de três mecanismos principais: produção de enzimas betalactamases, modificação no sítio de ação do fármaco e pela alteração da permeabilidade (NANVAR *et al.*, 2014).

A presença de matriz exopolissacarídea e a capacidade de formação de biofilme apresentadas pelo *S. epidermidis* são importantes fatores que favorecem a resistência deste microrganismo, visto que reduzem a capacidade de penetração de antibióticos, dificultando a ação dos mesmos (NANVAR *et al.*, 2014).

O desenvolvimento das penicilinas antiestafilocócicas, como a meticilina, trouxeram novas opções, apesar disso, em 1961 foi relatado o primeiro caso de resistência a meticilina. A razão de resistência a esse fármaco foi crescente, sendo que, em 1999, em torno de 50% dos isolados de *S. epidermidis* já era resistente a esse fármaco. Atualmente, entre 75% e 90% das cepas de *S. epidermidis* isoladas de infecções hospitalares são resistentes a meticilina. Nestes casos, os fármacos de escolha disponíveis são os glicopeptídeos, como a vancomicina (CHESSA; GANAU; MAZZARELLO, 2015; MONTUFAR ANDRADE *et al.*, 2016; NANVAR *et al.*, 2014).

Sahal e Bilkay (2014) mostraram que a vancomicina é o antibiótico mais eficiente para inibir *S. epidermidis* e, portanto, a opção terapêutica de escolha, visto que ao realizar teste de antibiograma em amostras de isolados clínicos, todas as cepas foram sensíveis à vancomicina, enquanto que 65% de todas as cepas e 80% das cepas formadoras de biofilme apresentaram resistência a todos os antibióticos betalactâmicos testados no estudo.

É preocupante o fato de serem descritos casos que necessitam de concentrações mais altas de vancomicina para inibir seu crescimento e, principalmente, cepas resistentes a tal fármaco.

Montufar Andrade *et al.* (2016) relatou, em estudo na Colômbia, que 29,2% dos SCN isolados de casos de infecções hospitalares apresentaram Concentração Inibitória Mínima (CIM) para vancomicina  $\geq 2\mu\text{g/mL}$ , além disso, 45% era resistente a clindamicina, 58% a ciprofloxacino e 73,7% a metilicina, sendo que 71,1% destes SCN eram *S. epidermidis*.

Fajardo Olivares *et al.* (2011), em estudo na Espanha, relatou que 61% dos SCN isolados em infecções em Unidades de Terapia Intensiva tinham perdido a sensibilidade à vancomicina (CIM  $\geq 2\mu\text{g/mL}$ ), 64% eram resistentes ao ciprofloxacino e 11,5% à linezolida, sendo que 63% destes SCN eram *S. epidermidis*.

Farina *et al.* (2013), em estudo na Turquia, relatou que os isolados de *S. epidermidis* apresentaram alta resistência a maioria dos antimicrobianos testados, sendo 96,2% resistente à penicilina, 65,4% à oxacilina, 76,9% à ciprofloxacino, 53,8% a eritromicina, 30,8% ao clotrimazol, 26,9% a rifampicina e cloranfenicol e 23,1% à gentamicina.

Diante desses estudos, percebe-se como a resistência microbiana é um problema que merece atenção especial, sendo importante a aquisição de medidas de controle de uso desses fármacos e também a realização de pesquisas que visem o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

Sendo *S. epidermidis* um patógeno com crescente resistência aos fármacos antimicrobianos, principalmente quando se refere a infecções associadas a implantes e dispositivos médicos, e com capacidade de formação de biofilme, importante fator de virulência que favorece a resistência deste microrganismo aos antibióticos, tornam-se importantes estudos que avaliem a ação antimicrobiana de novas substâncias sobre este patógeno.

O presente estudo, portanto, tem sua relevância diante da problemática da resistência crescente de *S. epidermidis* aos antimicrobianos de uso clínico e a necessidade de desenvolvimento de novas substâncias eficazes sobre tal patógeno, principalmente com ação sobre os formadores de biofilme.



### **3. OBJETIVOS:**

#### **3.1. GERAL:**

Avaliar a atividade antimicrobiana da violaceína sobre cepas planctônicas e em biofilme de *Staphylococcus epidermidis*.

#### **3.2. ESPECÍFICOS:**

- Determinar a atividade antimicrobiana da VIO, *in vitro*, sobre cepas de *S. epidermidis*;
- Determinar a atividade antibiofilme da VIO sobre cepas de *S. epidermidis*;
- Avaliar o efeito modulador da VIO na atividade de antimicrobianos de uso clínico sobre cepas planctônicas e biofilme de *S. epidermidis*;

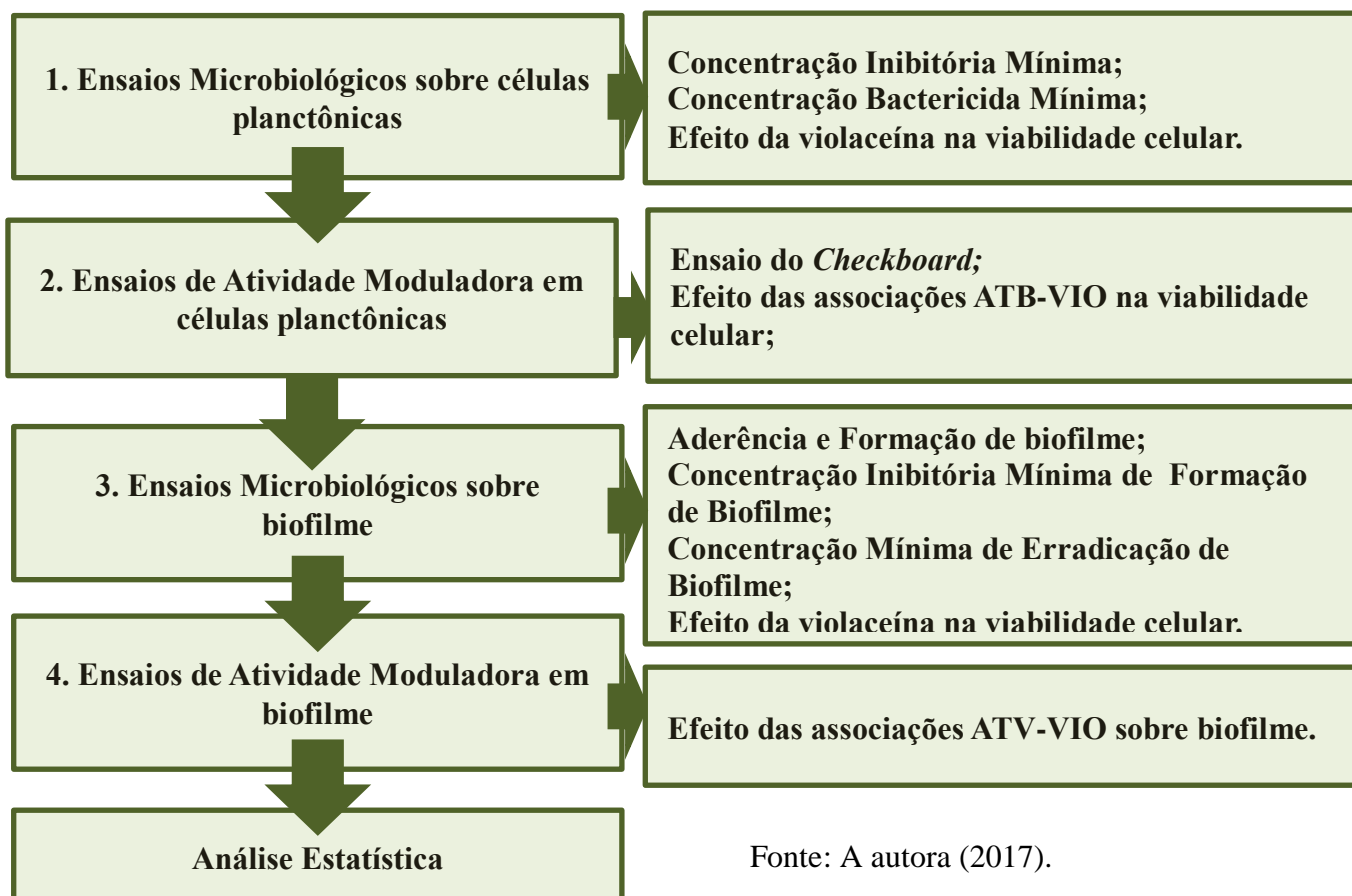
## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Desenho do estudo

Foi realizada uma pesquisa do tipo experimental, na qual foi testada a atividade antimicrobiana da VIO, obtida de *C. violaceum*, sobre cepas-padrão de *S. epidermidis* formadores e não formadores de biofilme.

O projeto foi executado em quatro etapas: inicialmente foram realizados os ensaios microbiológicos para determinar as concentrações inibitória e bactericida mínimas da VIO para as cepas de *S. epidermidis* e os estudos de viabilidade celular após exposição dos microrganismos à VIO. Na segunda etapa, foram realizados os ensaios de atividade moduladora em células planctônicas. Na terceira etapa foram realizados os ensaios microbiológicos sobre biofilme de *S. epidermidis*, para determinação das concentrações mínimas de inibição e de erradicação do biofilme e os estudos de viabilidade celular após exposição do biofilme à VIO. Por fim, foram realizados os ensaios de atividade moduladora da VIO sobre antimicrobianos de uso clínico, sobre células em biofilme (Figura7).

Figura 7 – Fluxograma da Estratégia Experimental

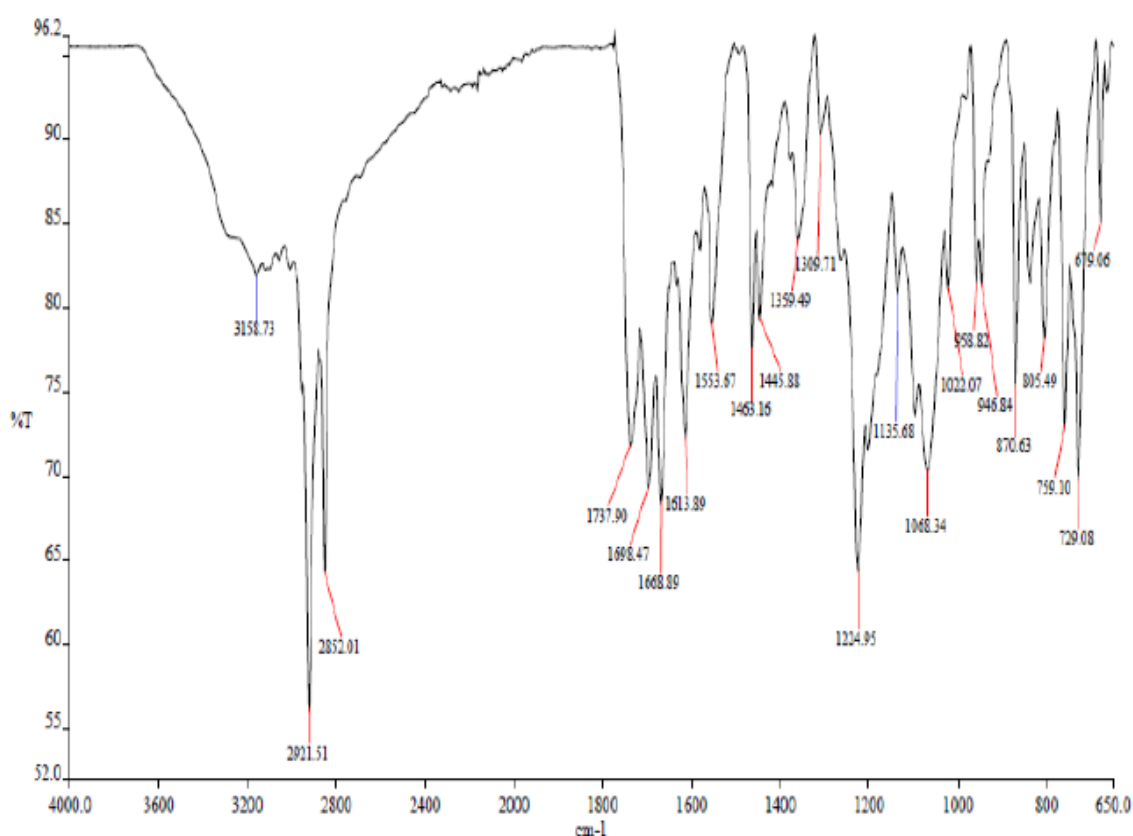


Fonte: A autora (2017).

## 4.2. Obtenção da VIO

A VIO utilizada foi cedida pela colaboradora e pesquisadora Andressa Hellen de Moraes Batista, do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da UFC. O microrganismo *C. violaceum* ATCC 12472, do qual foi extraída a VIO, foi obtido do Laboratório de Genética Molecular da UFC. A extração foi realizada no Laboratório de Genética Molecular e a purificação no Laboratório de Análise Fitoquímica de Plantas Medicinais da UFC. A caracterização foi realizada por espectroscopia na região do infravermelho, conforme recomendado por Rettori e Durán (1998), no Laboratório de Espectrometria de Massa do Nordeste da UFC (Figura 8).

Figura 8 – Espectro de absorção na região do infravermelho da VIO.



## 4.3. Microrganismos, meios de cultura e reagentes

Os microrganismos de referência testados foram: *S. epidermidis* ATCC 12228 (não formador de biofilme) e *S. epidermidis* ATCC 35984 (formador de biofilme), obtidos da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária – CMRVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro.

Os meios de cultura foram adquiridos da Himedia, os reagentes da Laborclin LTDA e os antimicrobianos da Aldrich Co. LLC.

#### 4.4. Determinação de atividade antimicrobiana da VIO

Todos os ensaios microbiológicos sobre células planctônicas e sobre biofilme, e de atividade moduladora foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LabMicro) da Universidade Federal do Ceará. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e em dois diferentes momentos. Foram testados os seguintes grupos: não tratado (grupo controle), tratado com VIO e tratado com antibiótico de referência (grupos experimentais). Os diferentes grupos foram posteriormente comparados pela análise estatística.

##### 4.4.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Esse ensaio foi realizado para determinar qual a menor concentração de VIO capaz de inibir o crescimento microbiano. A CIM da VIO para as cepas em estudo foi determinada pelo método de microdiluição em caldo de cultura *Brain Heart Infusion* (caldo BHI) de acordo com a Norma M7-A6, Vol. 23 N° 2 (CLSI, 2009) utilizando-se, para isso, microplacas com 96 poços, estéreis e com tampas apropriadas.

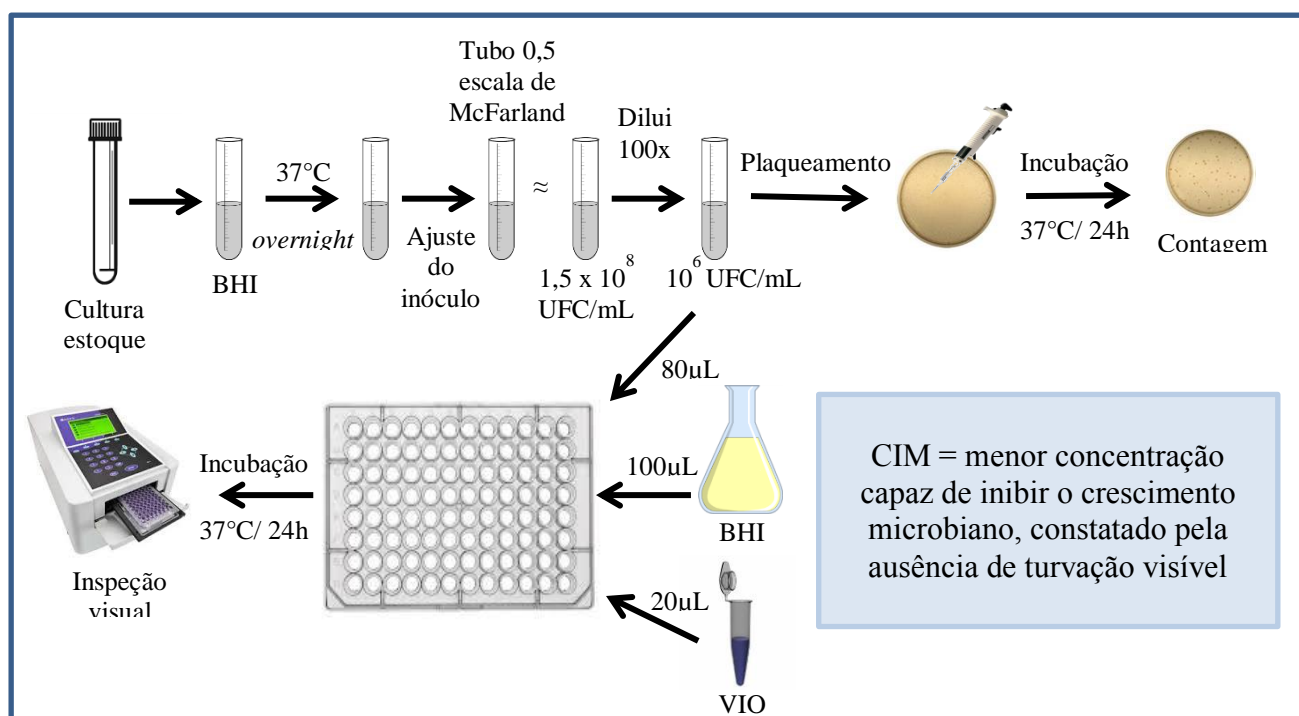
Colônias isoladas de cada cepa foram ativadas por incubação a 37°C, *overnight*, em caldo BHI. Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em solução salina 0,85% estéril, de modo a se obter uma turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). A suspensão obtida foi diluída 100 vezes em meio BHI estéril, resultando em uma cultura com aproximadamente  $10^6$  UFC/ml (essa suspensão foi utilizada nos demais ensaios).

Aos poços da microplaca foram adicionados 100 µL de caldo BHI, 20 µL de VIO em diferentes concentrações (40µg/mL a 0,019µg/mL) e 80 µL da suspensão microbiana ( $10^6$  UFC/mL). As microplacas foram incubadas durante 24 horas em estufa bacteriológica a 37°C. Após esse período foi realizada a inspeção visual do crescimento microbiano e a leitura das absorbâncias em leitora de Elisa Bio-Tek a 620nm.

Foram realizados controle de turvação (meio + VIO), controle de crescimento (meio + suspensão microbiana) e controle do meio de cultura.

A determinação da população microbiana presente no inóculo inicial foi realizada por contagem de colônias em *Ágar Plate-Count* (ROMEIRO, 2007) e utilizada para determinação da CBM (BARON; FINEGOLD, 1994). A CIM foi considerada a menor concentração de VIO capaz de inibir o crescimento das cepas testadas, constatado pela ausência de turvação visível (Figura 9).

Figura 9 – Fluxograma da determinação da CIM.

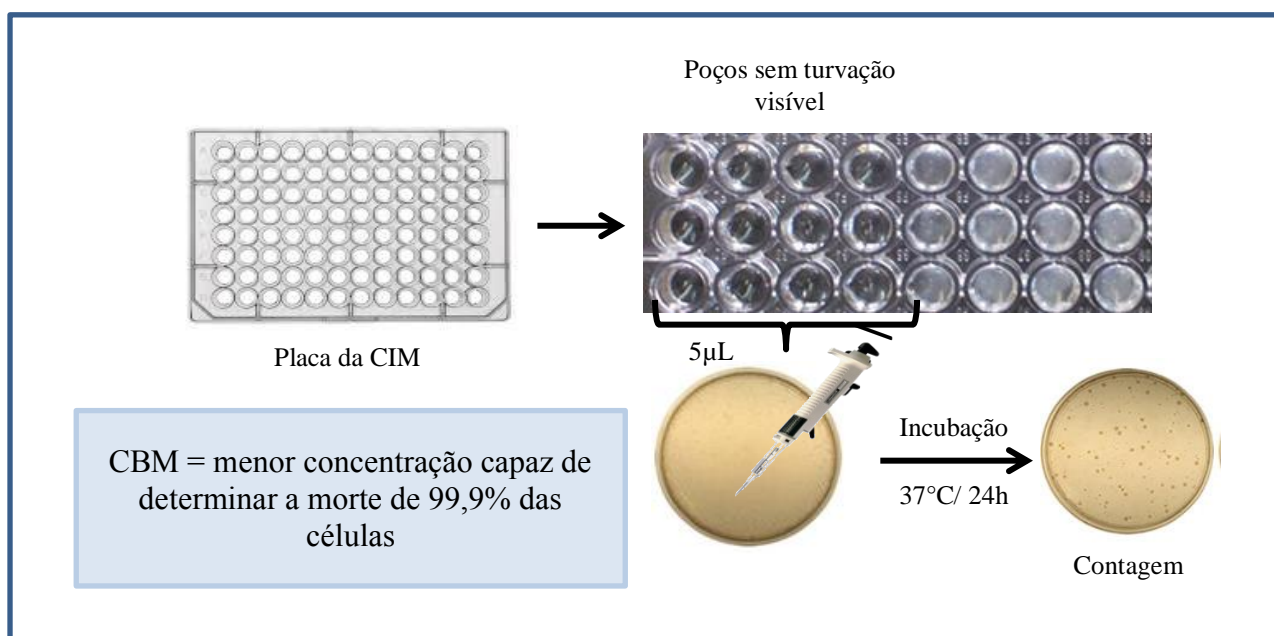


Fonte: A autora (2016).

#### 4.4.2. Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Esse ensaio foi realizado para determinar qual a menor concentração de VIO capaz de matar os microrganismos. A partir dos poços das microplacas usadas para a determinação da CIM, que não apresentarem crescimento microbiano visível, foram retiradas alíquotas de 5 µL e foram depositadas na superfície do ágar *Plate-Count* pela técnica da microgota (ROMEIRO, 2007). Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C e após 24h, foi realizada a contagem das colônias crescidas na superfície do ágar). A concentração de VIO capaz de determinar uma redução do crescimento microbiano  $\geq 99,9\%$  do inóculo inicial foi considerada a CBM (BARON; FINEGOLD, 1994) (Figura 10).

Figura 10 – Fluxograma da determinação da CBM.



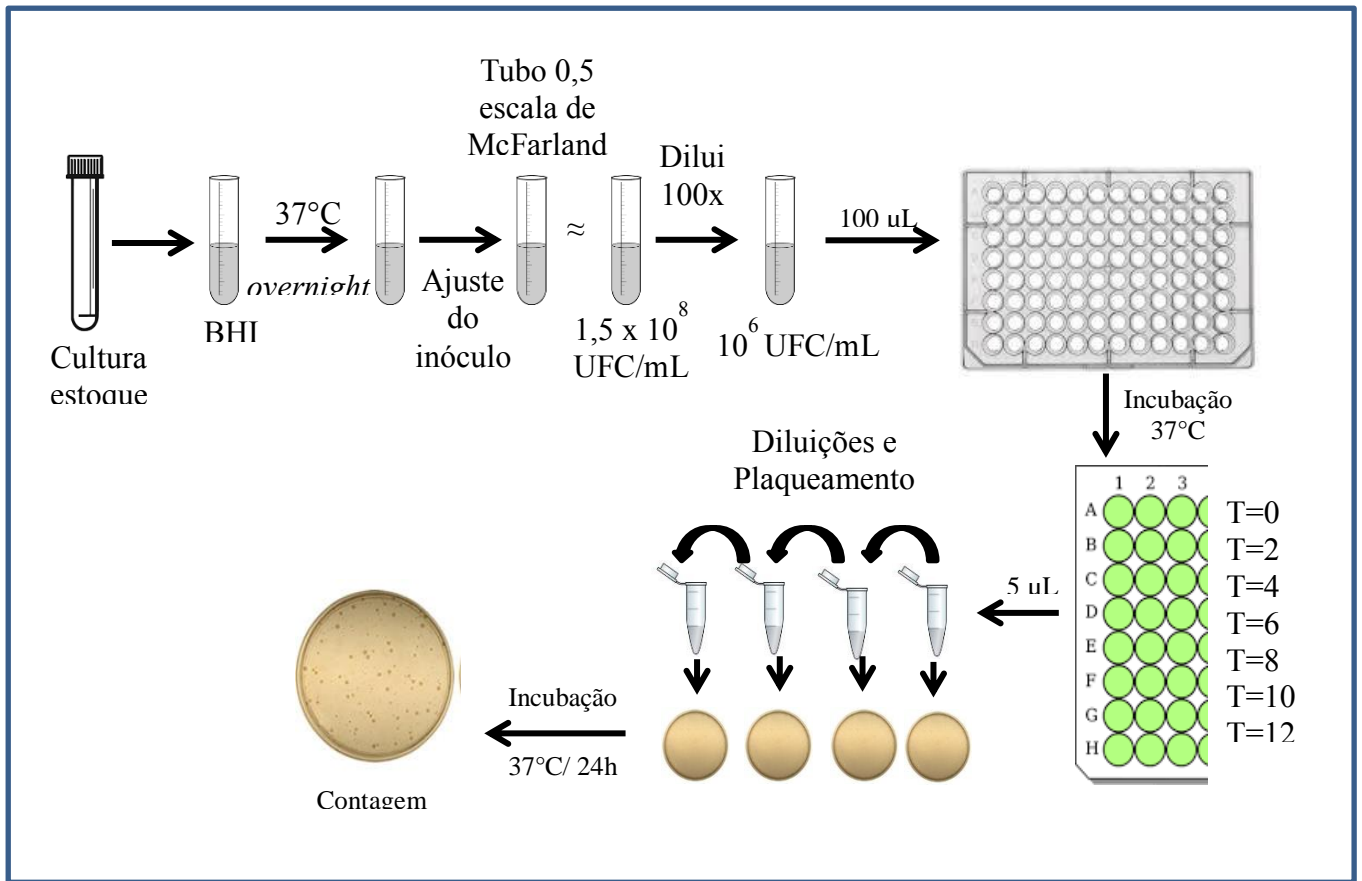
Fonte: A autora (2016).

#### 4.4.3. Efeito da VIO na viabilidade celular

##### 4.4.3.1. Determinação das curvas de crescimento microbiano

Curvas de crescimento de *S. epidermidis* foram previamente determinadas para que fossem obtidas culturas microbianas nas fases de crescimento exponencial e estacionário. As suspensões microbianas, obtidas conforme descrito no item 4.4.1, foram distribuídas em microplacas e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C. O crescimento microbiano foi acompanhado pela contagem de colônias em meio sólido pela técnica da microgota (ROMEIRO, 2007) e leitura de absorbância a 620nm, no início da incubação e após 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24h. Os resultados foram expressos em UFC/mL (MITIC-CULAFIC *et al.*, 2007) (Figura 11).

Figura 11 – Fluxograma da determinação das curvas de crescimento microbiano.

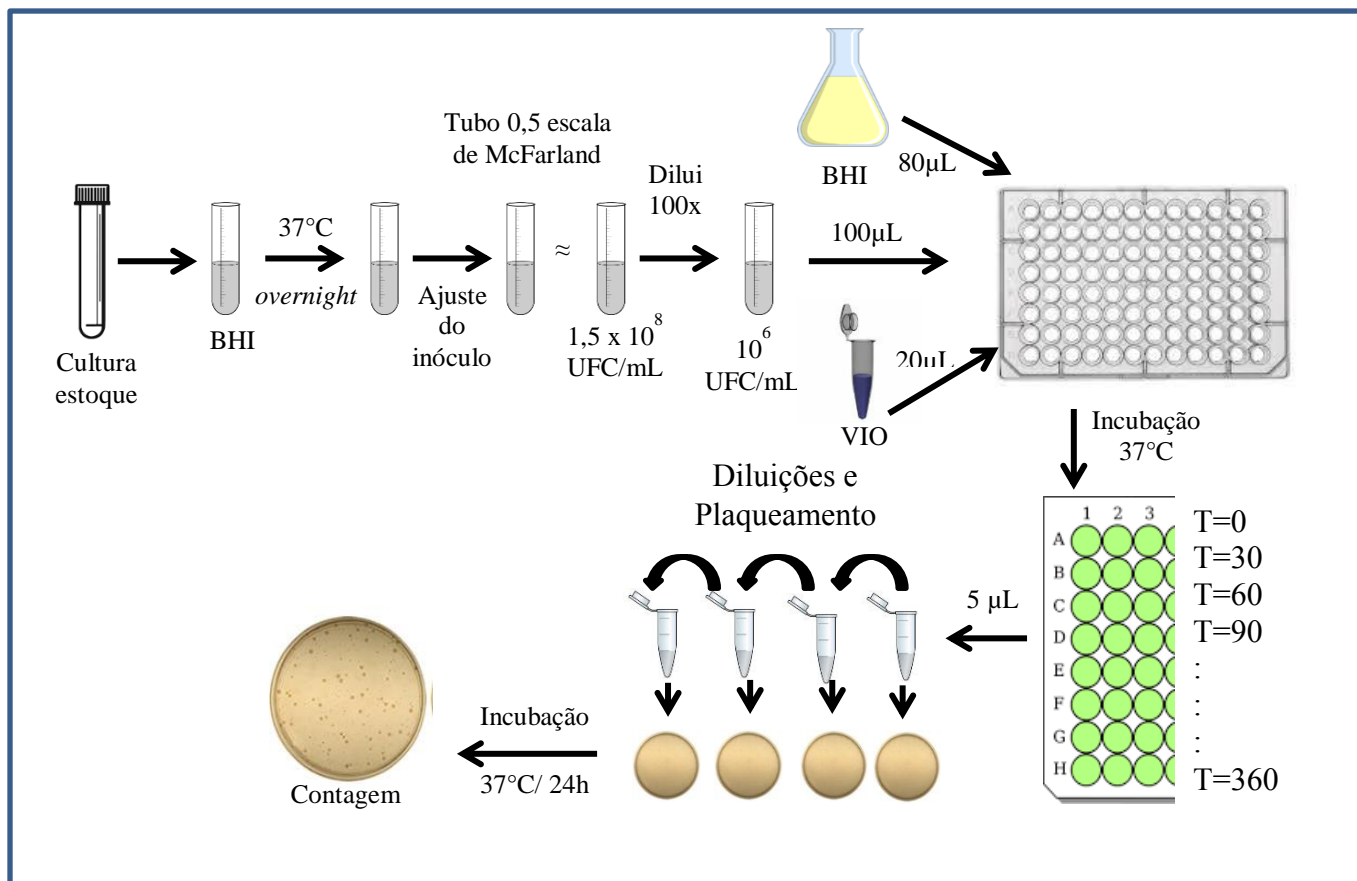


Fonte: A autora (2016).

#### 4.4.3.2. Efeito do tempo de exposição a VIO na viabilidade microbiana

Este ensaio foi realizado para identificar em quanto tempo a VIO inibe o crescimento e mata as cepas testadas. Alíquotas de 20µL da VIO, em concentrações iguais a 1/2xCIM, CIM, 2x CIM e 4x CIM, foram adicionadas a poços de microplacas contendo 100µL de caldo BHI e 80µL de suspensão microbiana. As microplacas foram incubadas a 37°C e alíquotas de 5µL foram retiradas e diluídas em solução salina 0,85% estéril que foram semeadas em ágar *Plate-Count* pela técnica da microgota (ROMEIRO, 2007), no tempo zero e em intervalos de tempo de 30 minutos até um período de 6 horas. A contagem das colônias crescidas foi realizada após 24 horas de incubação e os resultados foram expressos em UFC/mL (MITIC-CULAFIC *et al.*, 2007) (Figura 12).

Figura 12 - Fluxograma da determinação do efeito do tempo de exposição à VIO na viabilidade microbiana.



Fonte: A autora (2016).

#### 4.5. Avaliação da atividade antibiofilme

##### 4.5.1. Avaliação das cepas quanto à aderência e a formação de biofilme

Inicialmente, as cepas em estudo foram analisadas quanto à capacidade de aderir e formar biofilme, como descrito por Stepanovic *et al.* (2000). Para isso, foram utilizadas microplacas estéreis de fundo plano, com 96 poços.

As cepas foram semeadas por esgotamento em Ágar *Tripsine Soy* (TSA) e incubadas por 24 h a 37°C. Após esse período, as colônias foram repicadas para tubos contendo caldo *Tripsine Soy* (TSB) suplementado com 1% (p/v) de glicose e incubadas por 24 h. Em seguida, as culturas foram diluídas em TSB de forma a obter um inóculo de  $10^6$  UFC/mL. Foram adicionados 200 µL do inóculo às microplacas, que foram incubadas por 24 h a 37°C.

A massa de biofilme foi quantificada pela técnica do cristal violeta: os poços foram lavados com solução salina 0,85% estéril. Para a fixação das células aderidas foi



usado metanol a 99%. Após 15 min, o metanol foi retirado e a placa seca a temperatura ambiente. Alíquotas de 200 µL de solução de cristal violeta (CV) a 2% (v/v) foram adicionadas e após 15 minutos, o excesso foi removido. O CV foi liberado pela adição de 160 µL de ácido acético a 33%. A leitura da DO foi realizada, após 15 min, em leitora de Elisa Bio-Tek, no comprimento de onda de 570 nm (STEPANOVIĆ *et al.*, 2000) (Figura 13).

As amostras foram classificadas, segundo Stepanovic *et al.* (2000), como:

$DO \leq DO_C$  (não ADERENTE);

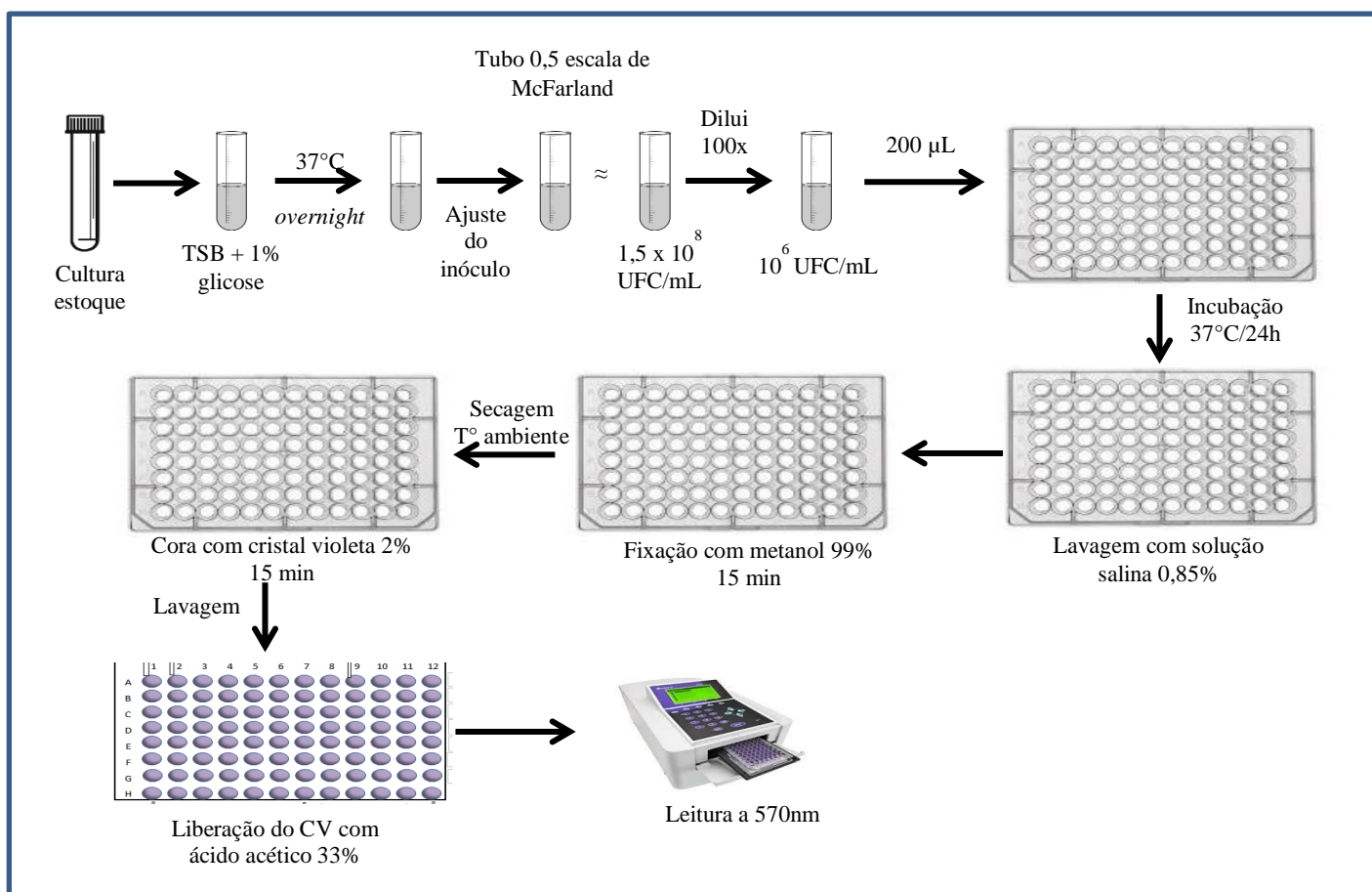
$DO_C < DO \leq 2x DO_C$  (fracamente ADERENTE);

$2x DO_C < DO \leq 4x DO_C$  (moderadamente ADERENTE);

$4x DO_C < DO$  (fortemente ADERENTE).

DO corresponde a densidade ótica das cepas testadas e  $DO_C$  corresponde a do controle (contendo apenas meio de cultura TSB).

Figura 13 – Fluxograma de classificação das cepas quanto à aderência e formação de biofilme.

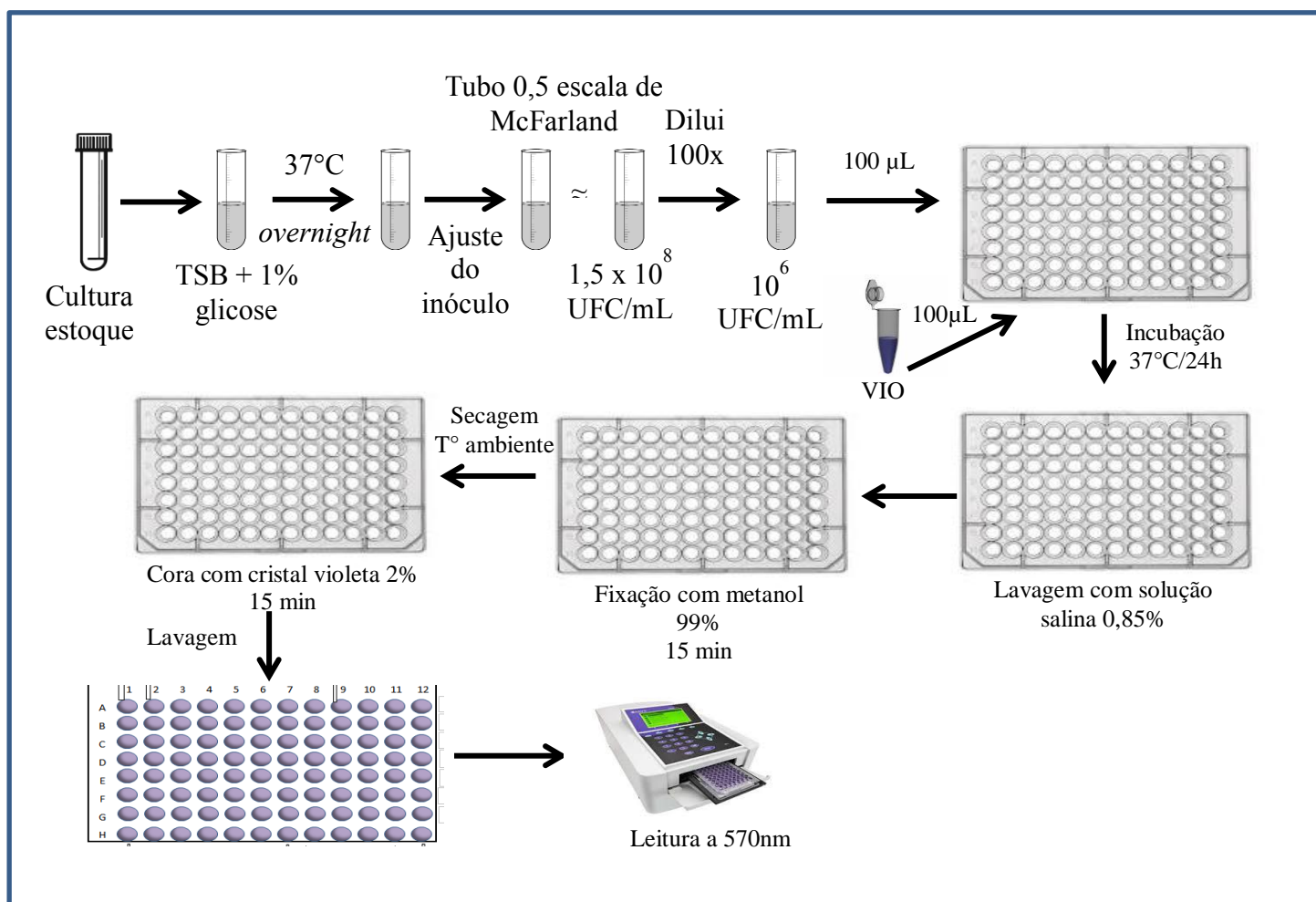


Fonte: A autora (2016).

#### 4.5.2. Concentração Inibitória Mínima de Formação de Biofilme (CIMB)

Esse ensaio foi realizado para determinar qual a menor concentração de VIO capaz de inibir a formação de biofilme pelo microrganismo. A determinação da CIMB foi realizada conforme metodologia de Nostro *et al.* (2004). Culturas microbianas foram obtidas conforme item 4.5.1. Aliquotas de 100  $\mu\text{L}$  da cultura microbiana e 100  $\mu\text{L}$  de cada concentração de VIO (0,156 $\mu\text{g/mL}$  a 320 $\mu\text{g/mL}$ ) foram adicionadas aos poços de microplacas de 96 poços. Após 24h de incubação a 37°C a massa de biofilme foi quantificada pela técnica do cristal violeta, descrita no item 4.5.1 (STEPANOVIĆ *et al.*, 2000). A CIMB foi a menor concentração capaz de inibir a formação do biofilme (PETTIT *et al.*, 2005) (Figura 14).

Figura 14 – Fluxograma de determinação da CIMB.



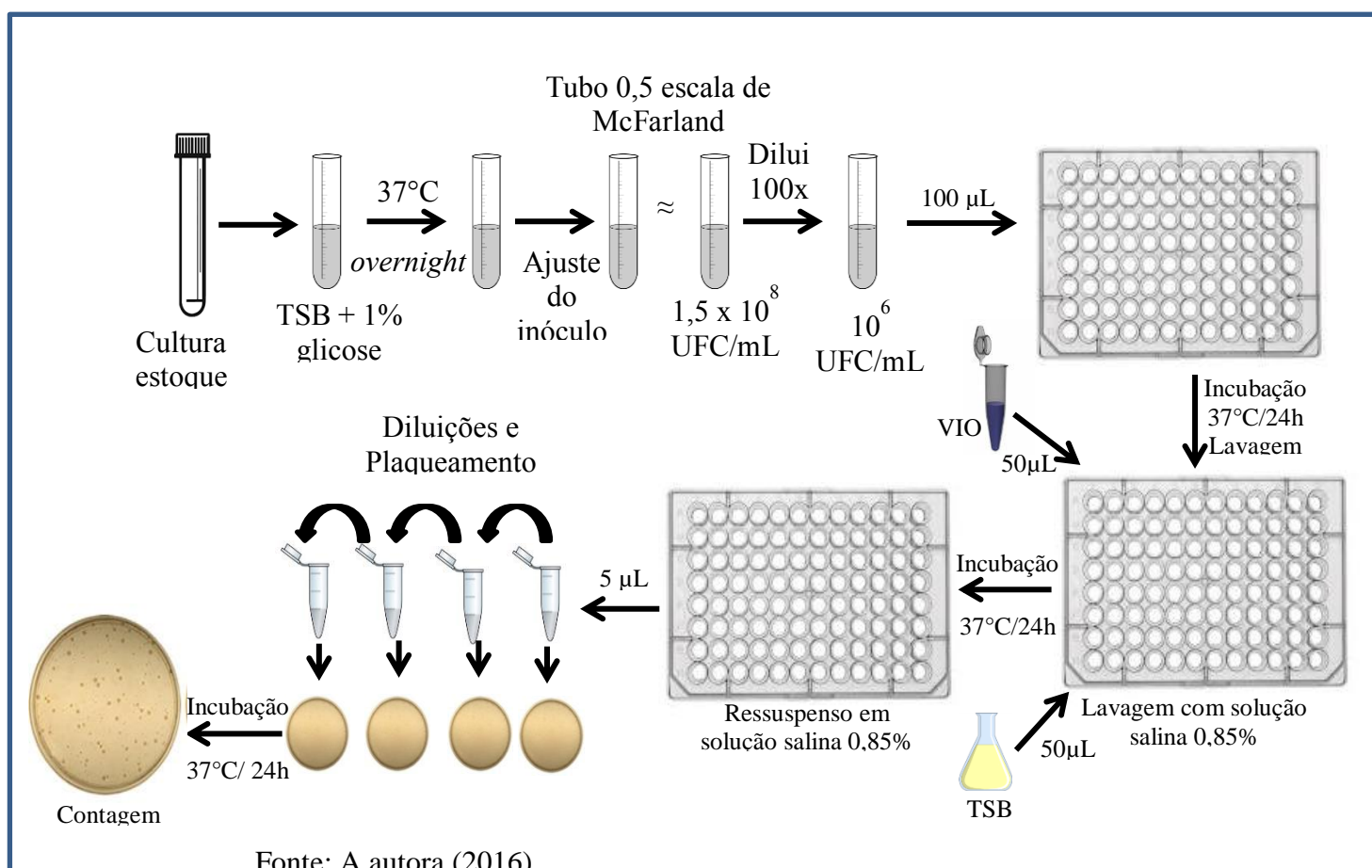
Fonte: A autora (2016).

#### 4.5.3. Concentração Mínima de Erradicação de Biofilme (CMEB)

Esse ensaio foi realizado para determinar qual a menor concentração de VIO capaz de erradicar o biofilme já formado. A determinação da CMEB de VIO foi realizada conforme descrita por Kwieciński *et al.* (2009). Culturas microbianas foram obtidas de acordo com o item 5.4.1. Aliquotas de 100 µL de cultura foram transferidas para microplacas e incubadas por 24h a 37°C. Após esse período foi realizada a inspeção visual do crescimento microbiano.

Depois de formado, o biofilme foi lavado com água ultrapura e o meio de cultura foi descartado. Para cada poço contendo biofilme foram adicionados 50 µL de TSB e 50 µL de VIO em diferentes concentrações (20µg/mL a 320µg/mL). As microplacas foram incubadas por 24h a 37°C e, após esse período, biofilme de cada poço foi ressuspenso em solução salina 0,85%. Aliquotas de 5 µL das diluições seriadas das suspensões de biofilme foram semeadas em ágar *Plate-Count* pela técnica da microgota (ROMEIRO, 2007). Após incubação durante 24 horas a 37°C foi realizada a contagem de colônias. A CMEB foi considerada a concentração de VIO capaz de erradicar o biofilme já formado (KWIECIŃSKI *et al.*, 2009) (Figura 15).

Figura 15 – Fluxograma de determinação da CMEB.

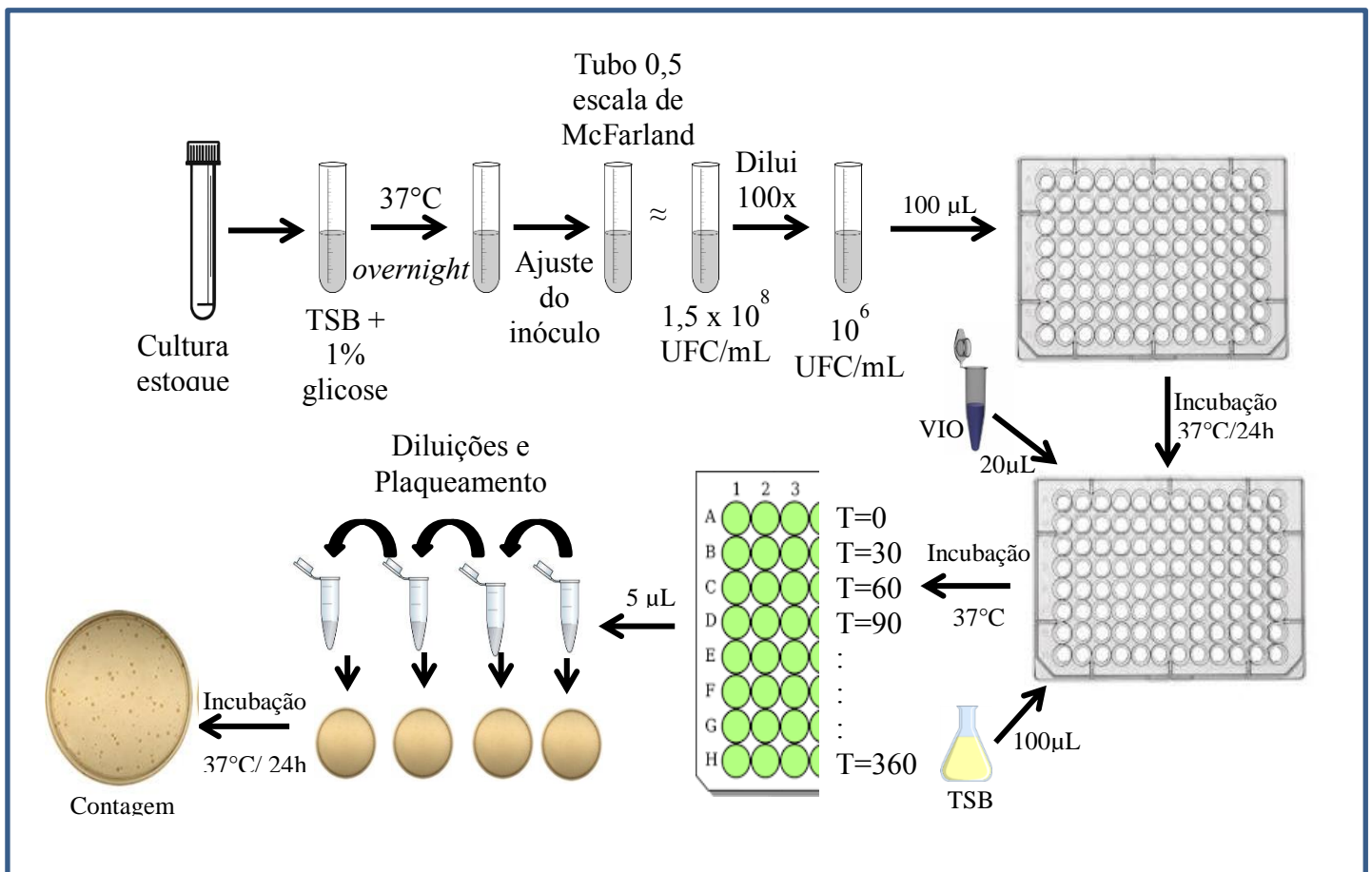


Fonte: A autora (2016).

#### 4.5.4. Efeito do tempo de exposição à VIO na viabilidade microbiana em biofilme

Este ensaio foi realizado para determinar o efeito do tempo de exposição à VIO na viabilidade microbiana em biofilme. Alíquotas de 20µL da VIO, em concentrações iguais a 1/2x CMEB, CMEB e 2x CMEB, foram adicionadas a poços de microplacas contendo 100µL de caldo TSB e biofilme maduro, formado conforme item 4.5.3. As microplacas foram incubadas a 37°C e alíquotas de 5µL foram retiradas e diluídas em solução salina 0,85% estéril que foram semeadas em ágar *Plate-Count* pela técnica da microgota (ROMEIRO, 2007), no tempo zero e em intervalos de tempo de 30 minutos até um período de 6 horas. A contagem das colônias crescidas foi realizada após 24 horas de incubação e os resultados foram expressos em UFC/mL (KWIECINSKI *et al.*, 2009) (Figura 16).

Figura 16 – Fluxograma de determinação do efeito do tempo de exposição à VIO na viabilidade microbiana em biofilme.



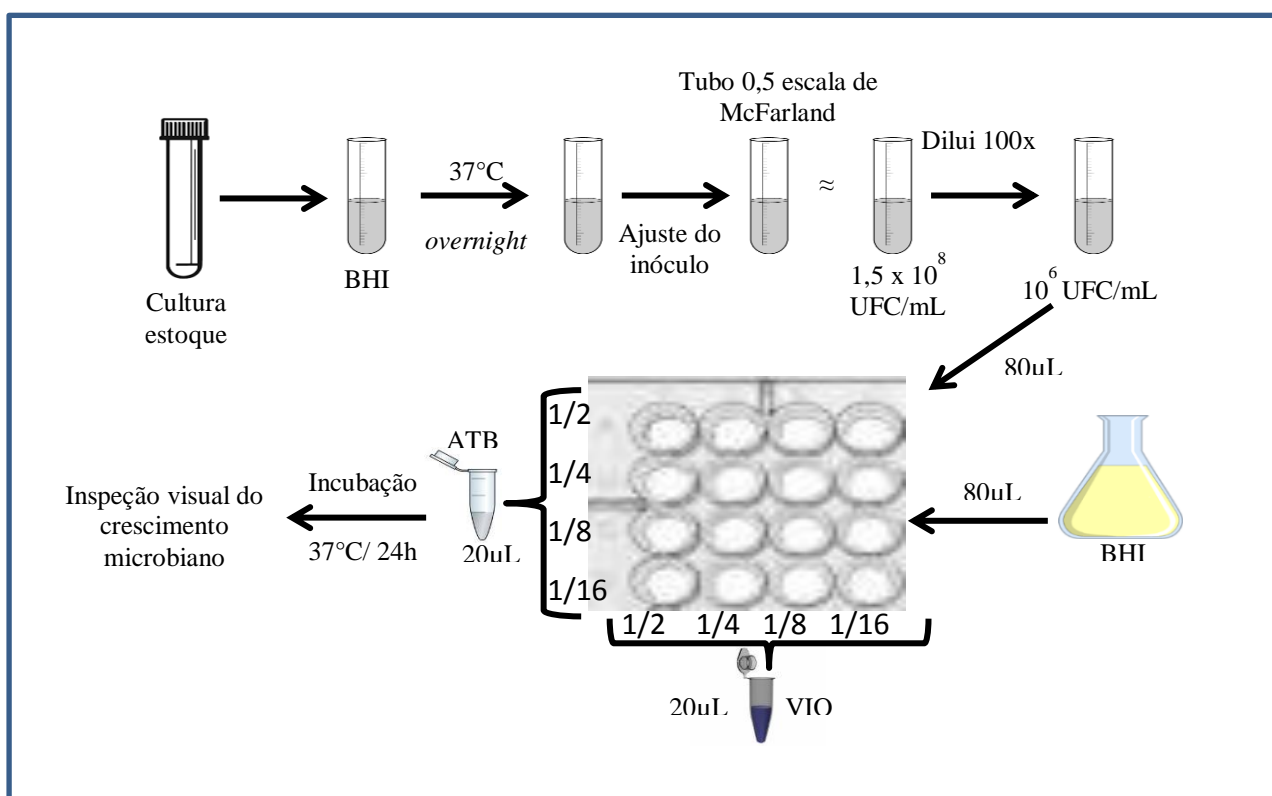
Fonte: A autora (2016).

#### 4.6. Atividade moduladora da VIO sobre antibióticos (ATB) de uso clínico em células planctônicas

##### 4.6.1. Método do Checkerboard

Este ensaio foi realizado para avaliar se a VIO é capaz de modular positivamente a atividade antimicrobiana de diferentes antimicrobianos. Para isso foi realizado o método de *Checkerboard*, conforme Cleeland e Squires (1991). Aos poços das microplacas foram adicionadas alíquotas de 80µL das culturas microbianas (item 4.4.1), 80µL de caldo BHI, 20µL de VIO e 20µL do ATB. As concentrações finais de VIO e do ATB foram iguais a 1/2, 1/4, 1/8 e 1/16 x CIM. Após incubação das microplacas por 24 horas a 35°C, foi realizada a inspeção visual do crescimento microbiano (Figura 17).

Figura 17 – Fluxograma do ensaio do *Checkerboard*.



Fonte: A autora (2016).

Para avaliar o efeito das associações foram calculados os Índices de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), conforme Shin e Lin (2004):

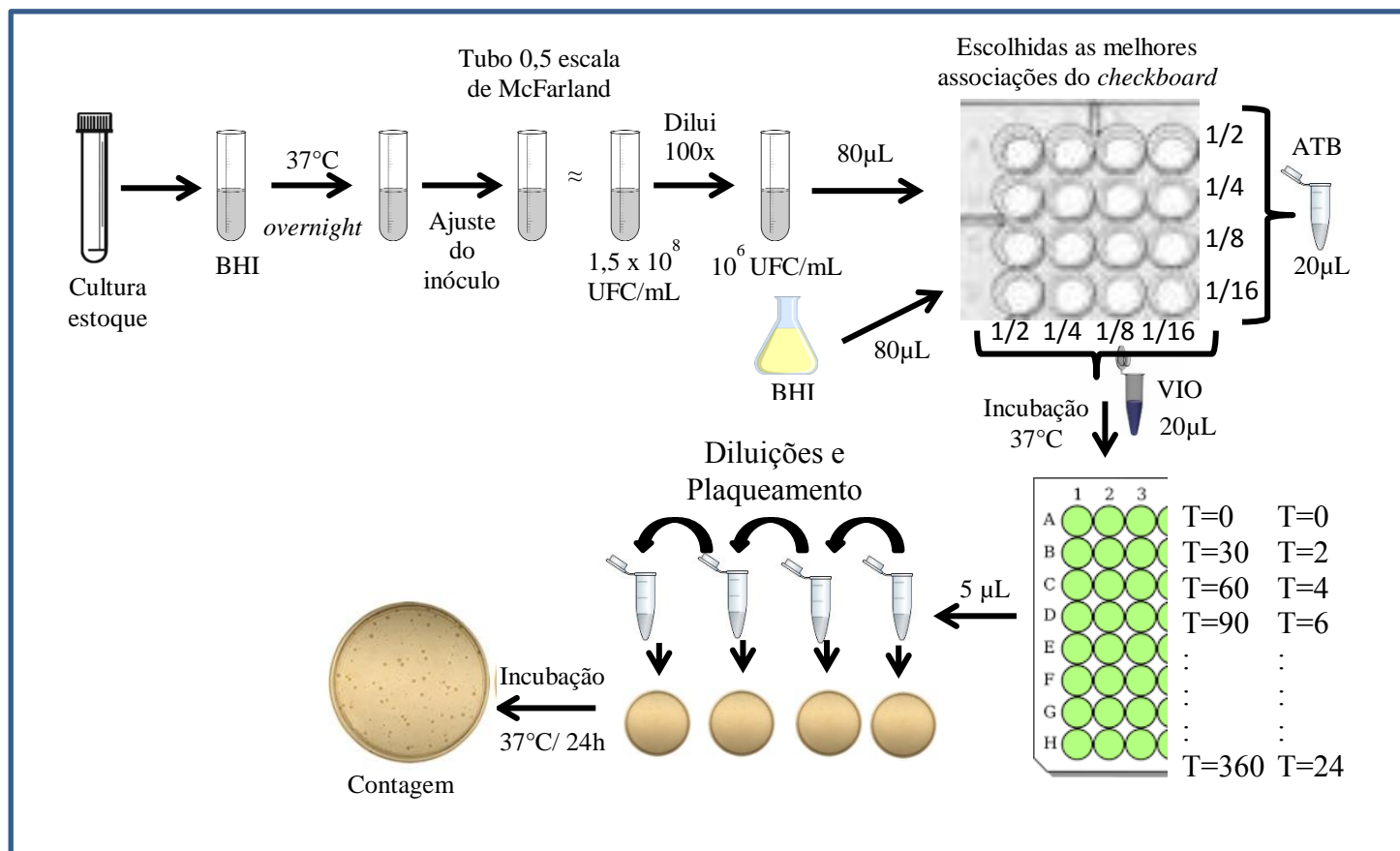
$$ICIF = CIF_{VIO} + CIF_{ATB} = [VIO]/CIM_{VIO} + [ATB]/CIM_{ATB}.$$

Onde: [VIO] e [ATB] são as menores concentrações da VIO e do ATB, respectivamente, na associação, com atividade antimicrobiana;  $CIM_{VIO}$  e  $CIM_{ATB}$  é a CIM da VIO e do ATB;  $CIF_{VIO}$  e  $CIF_{ATB}$  é a Concentração Inibitória Fracionada da VIO e do ATB. O Índice CIF foi interpretado como: efeito sinérgico para  $ICIF \leq 0,5$ , aditivo ou indiferente para  $ICIF > 0,5$  e  $< 1,0$ , e antagônico para  $ICIF \geq 1,0$  (EUCAST, 2003).

#### ***4.6.2. Determinação do efeito do tempo de exposição à associação violaceína-antibiótico (VIO-ATB) na viabilidade microbiana***

Para realização desse ensaio foram escolhidas as duas melhores associações, para cada cepa, encontradas no teste do *checkboard*. Alíquotas de 20 $\mu$ L da VIO e do ATB, isoladamente e em associação, foram adicionadas aos poços da microplaca de 96 poços contendo 80 $\mu$ L de caldo BHI e 80  $\mu$ L das suspensões microbianas ( $10^6$  UFC/mL). As microplacas foram incubadas a 35°C por dois períodos de tempos diferentes: até 6h e até 24h. No ensaio com incubação até 6h, foram retiradas alíquotas de 5  $\mu$ L no início da incubação (tempo zero) e a cada 30 minutos até 6h. No ensaio com incubação até 24h, foram retiradas alíquotas de 5  $\mu$ L no início da incubação (tempo zero), a cada 2h até 12h, e no tempo de 24h de incubação. As alíquotas de 5 $\mu$ L foram diluídas em solução salina 0,85% estéril e semeadas em ágar *Plate-Count* pela técnica da microgota (ROMEIRO, 2007). Após 24h de incubação a 35°C foi realizada a contagem de colônias crescidas na superfície do meio (Figura 18).

Figura 18 - Fluxograma de determinação do efeito do tempo de exposição à associação VIO-ATB na viabilidade microbiana.

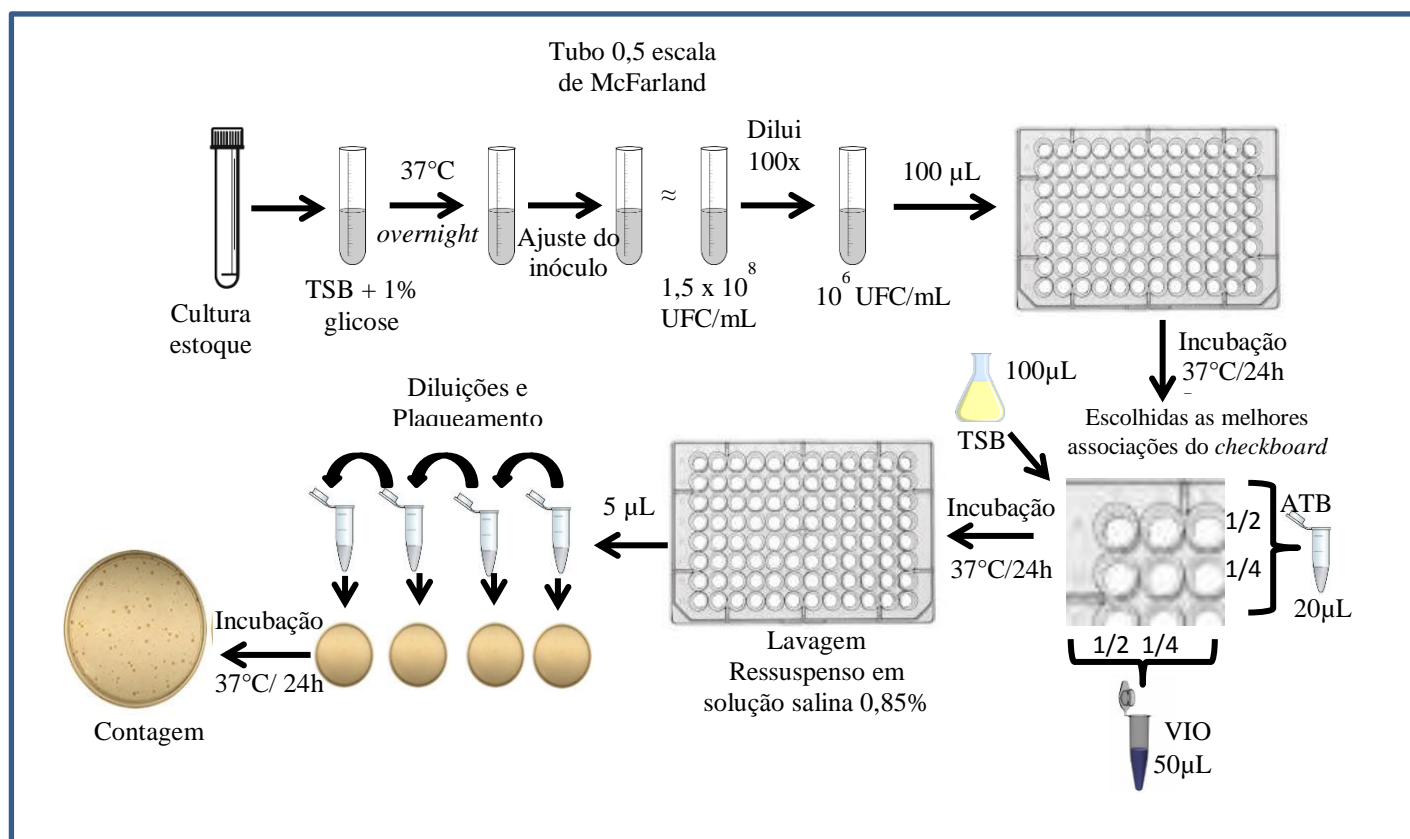


#### 4.7. Atividade moduladora da VIO sobre antibióticos (ATB) de uso clínico sobre biofilme

Este ensaio foi realizado para avaliar se a VIO é capaz de modular positivamente a atividade antimicrobiana de diferentes antimicrobianos sobre biofilme de *S. epidermidis*. Para isso foi realizado ensaio conforme descrito por Gomes *et al.* (2012). O biofilme de *S. epidermidis* foi formado conforme descrito no item --. Depois de formado, o biofilme foi lavado com salina 0,85% e o meio de cultura foi descartado. Para cada poço contendo biofilme foram adicionados 100 µL de TSB, 50 µL de VIO (1/2x CMEB e 1/4x CMEB) e 50 µL do ATB (1/2x CMEB e 1/4x CMEB), isolados e em associação. As associações escolhidas foram as que apresentaram melhor resultado no ensaio do *checkboard* com células planctônicas. As microplacas foram incubadas por 24h a 37°C e, após esse período, biofilme de cada poço foi lavado e ressuspensão em solução salina 0,85%. Aliquotas de 5 µL das diluições seriadas das suspensões de

biofilme foram semeadas em ágar *Plate-Count* pela técnica da microgota (ROMEIRO, 2007). Após incubação durante 24 horas a 37°C foi realizada a contagem de colônias (Figura 19).

Figura 19 – Fluxograma para determinação da ação moduladora da VIO sobre ATB de uso clínico sobre biofilme de *S. epidermidis*.



Fonte: A autora (2016).

#### 4.8. Análise estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados obtidos foram expressos como a Média ± Erro Padrão da Média. As médias dos diferentes tratamentos (grupo sem tratamento, tratado com VIO e tratado com ATB convencional) foram comparadas pela análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Dunnet ou pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ . Foi utilizado o programa *GraphPad Prism 6* e os resultados foram representados por meio de gráficos e tabelas.



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Atividade antimicrobiana da VIO

#### 5.1.1. Concentrações Inibitória e Bactericida Mínimas (CIM e CBM)

A VIO apresentou ótima atividade antimicrobiana sobre as cepas de *S. epidermidis*, com CIM igual a 10 µg/mL e 20 µg/mL para *S. epidermidis* ATCC 12228 (não formador de biofilme) e *S. epidermidis* ATCC 35984 (formador de biofilme), respectivamente, e CBM igual a 20 µg/mL para ambos (Tabela 1).

**Tabela 2** – CIM e CBM de VIO para cepas de *S. epidermidis*.

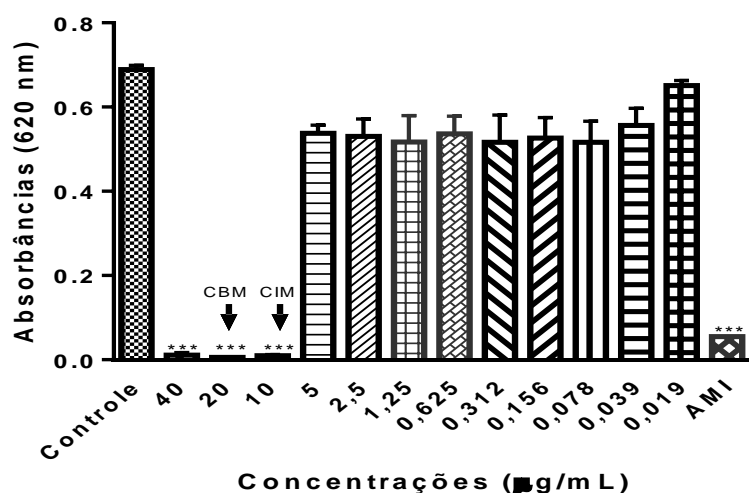
Cepas microbianas	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	10	20
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	20	20

*S. epidermidis* ATCC 12228: não formador de biofilme.

*S. epidermidis* ATCC 35984: formador de biofilme.

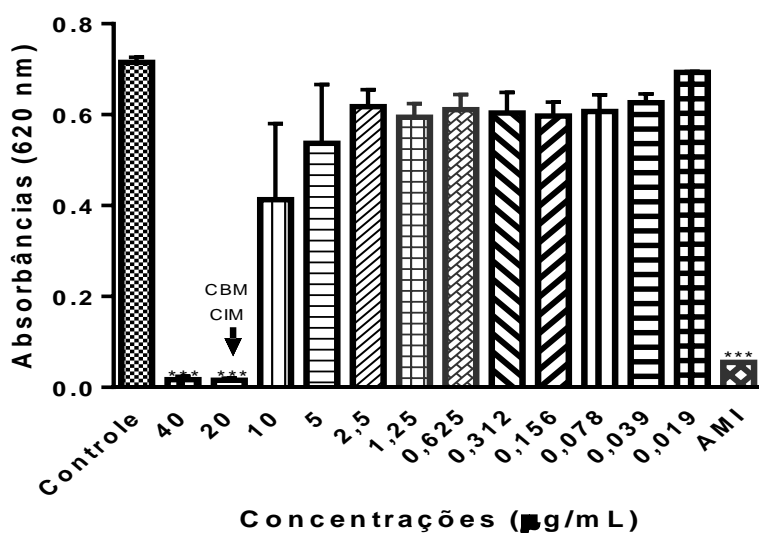
As leituras de densidade ótica a 620nm das microplacas confirmaram os valores de CIM determinados na inspeção visual do crescimento, evitando possíveis erros de interpretação ocasionados pela turvação observada nos poços nos quais a VIO foi adicionada em concentrações maiores (Gráficos 1 e 2).

**Gráfico 1:** Atividade antimicrobiana da VIO sobre *S. epidermidis* ATCC 12228.



Os valores estão expressos pela média  $\pm$  EPM de três ensaios, em triplicata cada. AMI (amicacina, CIM=3,125  $\mu\text{g/mL}$ ). Controle: meio de cultura + microrganismo. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnet e valor de  $*p < 0,05$  quando comparado ao controle.

**Gráfico 2:** Atividade antimicrobiana da VIO sobre *S. epidermidis* ATCC 35984.

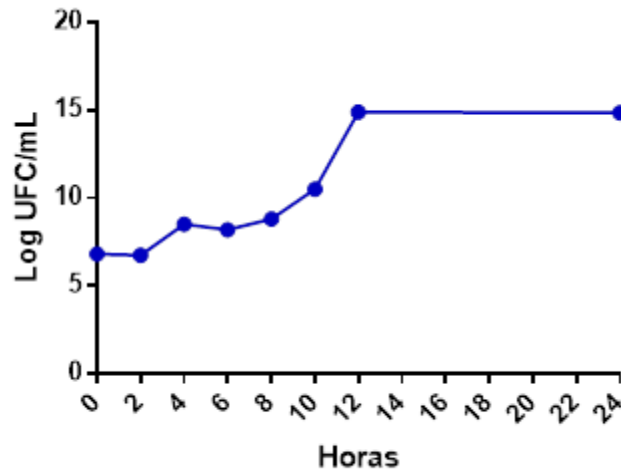


Os valores estão expressos pela média  $\pm$  EPM de três ensaios, em triplicata cada. AMI (amicacina, CIM=6,25  $\mu\text{g/mL}$ ). Controle: meio de cultura + microrganismo. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnet e valor de  $*p < 0,05$  quando comparado ao controle.

### 5.1.2. Curvas de crescimento microbiano

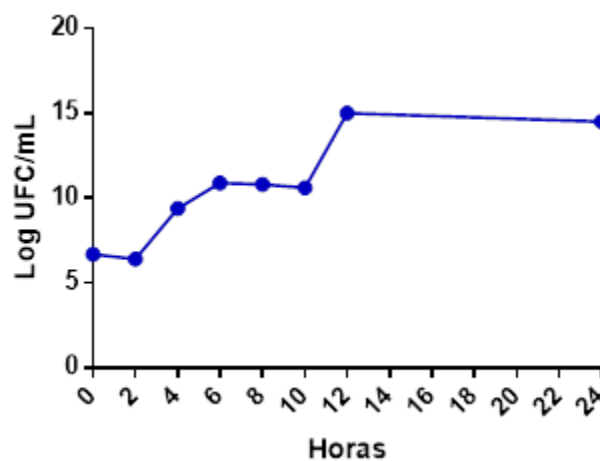
As cepas testadas apresentam padrão de crescimento semelhante. Quando ativadas *overnight*, atingem as fases de crescimento exponencial e estacionário após 2 e 12 horas de incubação, respectivamente (Gráfico 3 e 4).

**Gráfico 3** - Curva de crescimento da cepa *S. epidermidis* ATCC 12228.



Os valores representam média  $\pm$  EPM de dois experimentos, em duplicata cada.

**Gráfico 4** - Curva de crescimento da cepa *S. epidermidis* ATCC 35984.



Os valores representam média  $\pm$  EPM de dois experimentos, em duplicata cada.

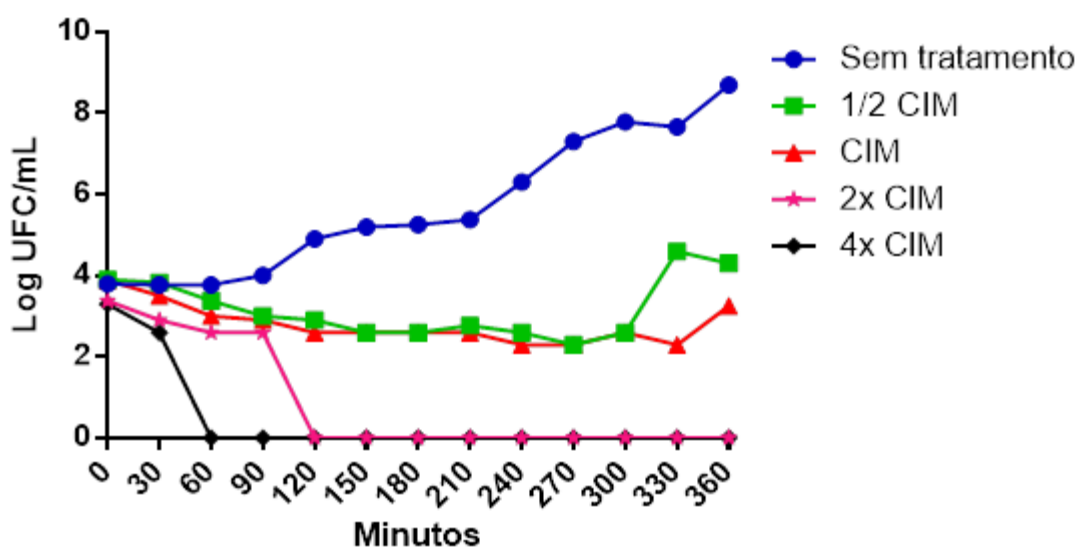
### 5.1.3. Efeito do tempo de exposição à VIO na viabilidade de *S. epidermidis*

No ensaio de tempo de morte (*time kill assay*), quando as cepas foram expostas a 1/2 CIM de VIO, foi constatada inibição de crescimento durante 5h e 5h30min para *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. epidermidis* ATCC 35984, respectivamente.

Quando expostos à CIM da VIO, houve inibição do crescimento durante todo o tempo (6h) para *S. epidermidis* ATCC 12228 e perda de viabilidade após 3h para *S. epidermidis* ATCC 35984. Além disso, a CIM (10 µg/mL) de VIO para *S. epidermidis* ATCC 12228 foi capaz de reduzir em 33,3% o crescimento celular nas duas primeiras horas de incubação. Já para *S. epidermidis* ATCC 35984, a CIM (20 µg/mL) da VIO reduziu em 40,7 % o crescimento microbiano, também com duas horas de contato.

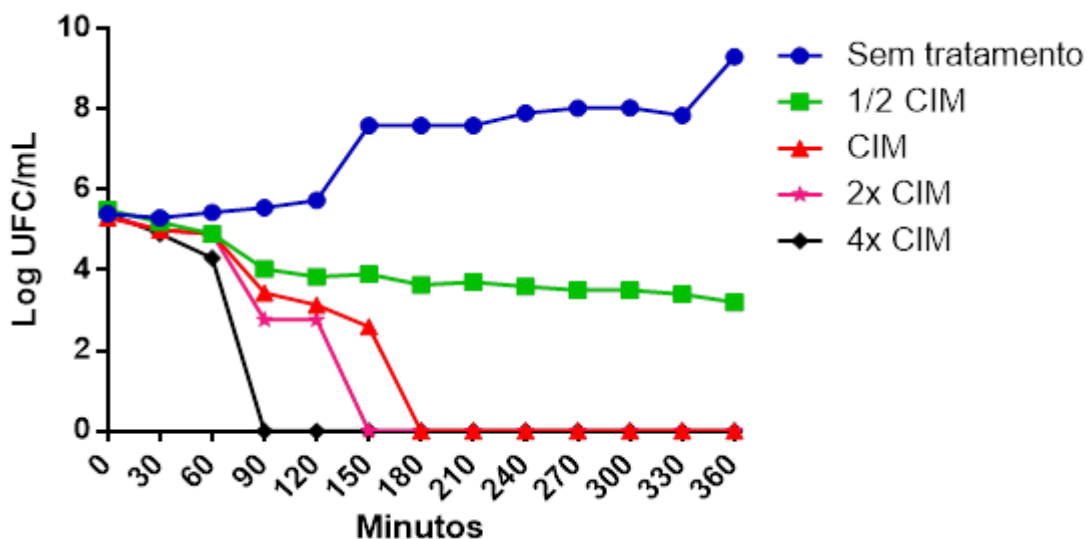
Quando expostos à concentrações iguais à 2x CIM e 4x CIM da VIO, houve perda de viabilidade celular após 2h e 1h para *S. epidermidis* ATCC 12228, respectivamente, e após 2h30min e 1h30min para *S. epidermidis* ATCC 35984, respectivamente (Gráfico 5 e 6).

**Gráfico 5-** Efeito do tempo de exposição a diferentes concentrações de VIO na viabilidade de *S. epidermidis* ATCC 12228.



Os valores estão expressos pela média  $\pm$  EPM de dois ensaios, em duplicata cada. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnet com  $p < 0,05$ , quando comparado ao controle. CIM = 10 µg/mL.

**Gráfico 6** - Efeito do tempo de exposição a diferentes concentrações de VIO na viabilidade de *S. epidermidis* ATCC 35984.



Os valores estão expressos pela média  $\pm$  EPM de dois ensaios, em duplicata cada. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnet com  $p < 0,05$ , quando comparado ao controle. CIM = 20  $\mu\text{g/mL}$ .

### 5.2. Efeito modulador de VIO na atividade antimicrobiana de ATB de uso clínico

Os ensaios de atividade moduladora evidenciaram elevado efeito sinérgico entre a VIO e a maioria dos antimicrobianos de uso clínico testados.

Para *S. epidermidis* ATCC 12228, a VIO apresentou efeito sinérgico e aditivo sobre 81,8% (n=9) e 18,2% (n=2) dos ATBs testados, respectivamente, não apresentando antagonismo em nenhuma associação VIO-ATB. Nas associações que ocorreram efeito sinérgico, a VIO foi capaz de reduzir em 16 vezes a CIM de cinco ATBs (55,5%): gentamicina, ceftazidima, vancomicina, cefalotina e oxacilina; reduziu em 8 vezes a CIM de um ATB (11,1%): meropenem; e reduziu em 4 vezes a CIM de três ATBs (33,3%): ampicacina, cefepime e ceftriaxona (Tabela 2 e Gráfico 7).

Tabela 2 – Efeito modulador da VIO na atividade antimicrobiana de ATBs de uso clínico sobre o crescimento de *S. epidermidis* ATCC 12228.

<b>Antibióticos</b>	<b>CIF VIO</b>	<b>CIF ATB</b>	<b>ICIF</b>	<b>Efeito</b>
<b>Piperacilina+ Tazobactam</b>	0,0625	0,5	0,5625	Aditivo
<b>Amicacina</b>	0,0625	0,25	0,3125	Sinérgico
<b>Gentamicina</b>	0,125	0,0625	0,1875	Sinérgico
<b>Ciprofloxacino</b>	0,25	0,5	0,75	Aditivo
<b>Cefepime</b>	0,0625	0,25	0,3125	Sinérgico
<b>Ceftazidima</b>	0,125	0,0625	0,1875	Sinérgico
<b>Vancomicina</b>	0,125	0,0625	0,1875	Sinérgico
<b>Meropenem</b>	0,0625	0,125	0,1875	Sinérgico
<b>Ceftriaxona</b>	0,0625	0,25	0,3125	Sinérgico
<b>Cefalotina</b>	0,125	0,0625	0,1875	Sinérgico
<b>Oxacilina</b>	0,125	0,0625	0,1875	Sinérgico

A tabela mostra somente as associações das menores concentrações em que houve inibição do crescimento microbiano.

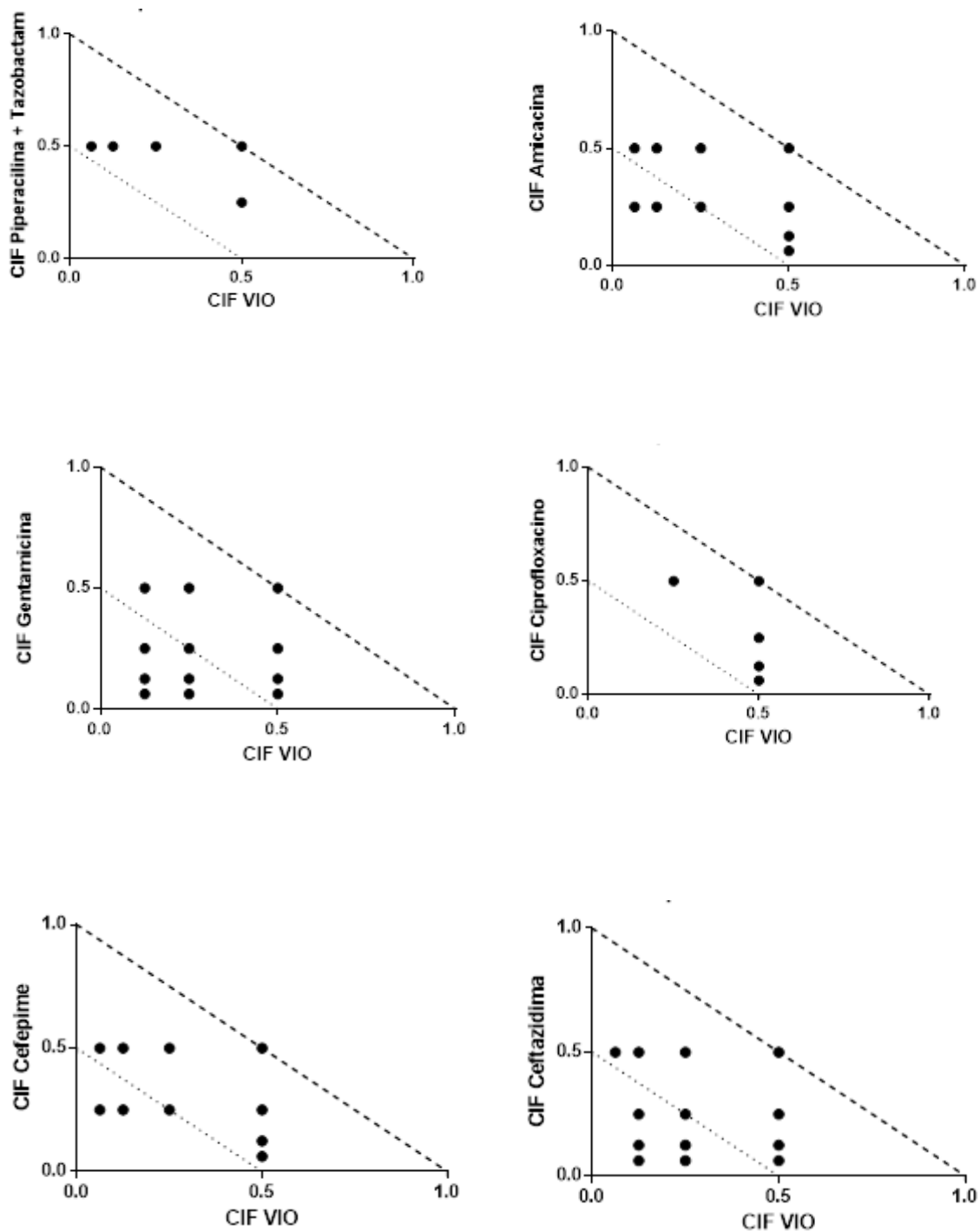
CIM VIO: CIM da violaceína isolada ( $\mu\text{g/mL}$ ); CIM ATB: CIM dos antibióticos isolados ( $\mu\text{g/mL}$ );

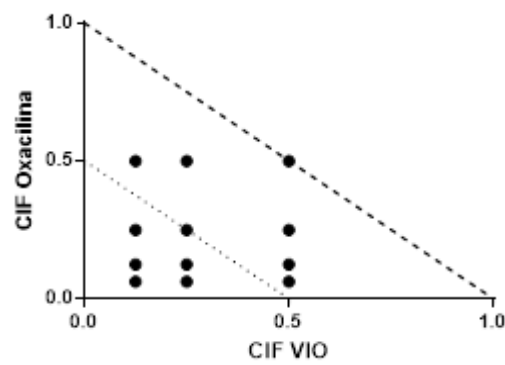
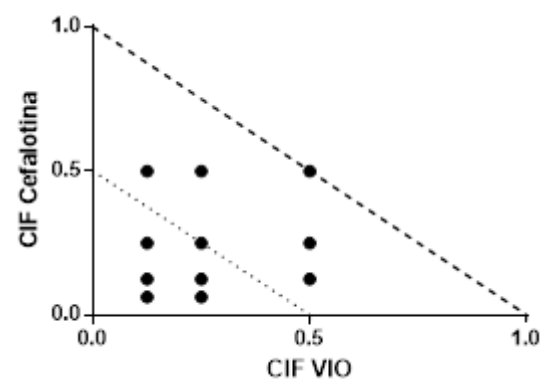
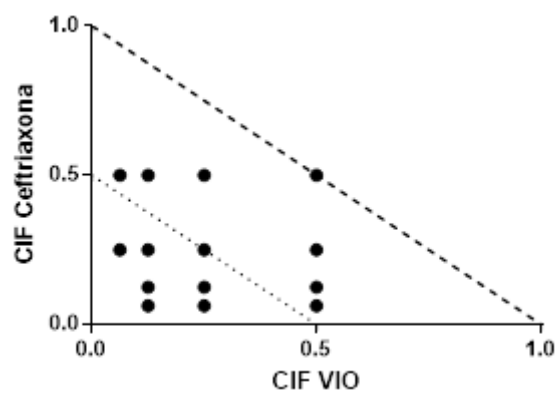
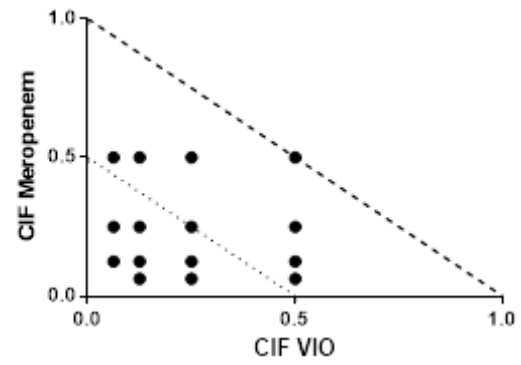
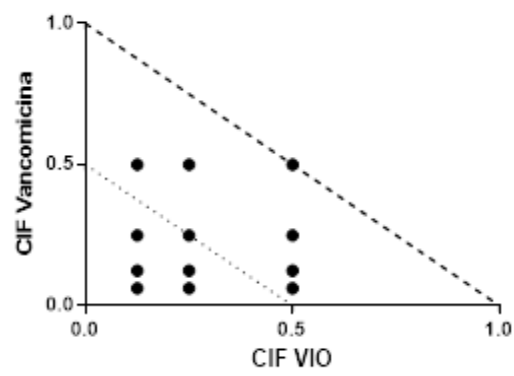
[VIO]: CIM da violaceína na associação ( $\mu\text{g/mL}$ ); [ATB]: CIM dos antibióticos na associação ( $\mu\text{g/mL}$ );

CIF VIO = [VIO]/CIM VIO; CIF ATB = [ATB]/CIM ATB; ICIF = CIF VIO + CIF ATB;

ICIF  $\leq$  0,5: sinergismo; ICIF  $>$  0,5 e  $<$  1,0: aditivo ou indiferente; ICIF  $\geq$  1,0: antagonismo (Eucast, 2003).

**Gráfico 7** – Isobologramas mostrando o efeito das associações VIO-ATB na inibição do crescimento de *S. epidermidis* ATCC 12228.





Os pontos representam os valores de CIF das associações em que o crescimento microbiano foi inibido.



Para *S. epidermidis* ATCC 35984, houve efeito sinérgico e aditivo em 54,5% (n=6) e 18,2% (n=2), respectivamente. Nas demais associações, entre VIO e os ATBs piperacilina + tazobactam, amicacina e gentamicina (27,3%; n=3), não houve inibição do crescimento. A VIO reduziu em 16 vezes a CIM dos seis fármacos com os quais apresentou sinergismo: ciprofloxacino, cefepime, ceftazidima, vancomicina, meropenem e cefalotina (Tabela 3 e Gráfico 8)

**Tabela 3 - Efeito modulador da VIO na atividade antimicrobiana de ATBs de uso clínico sobre o crescimento de *S. epidermidis* ATCC 35984.**

<b>Antibióticos</b>	<b>CIF VIO</b>	<b>CIF ATB</b>	<b>ICIF</b>	<b>Efeito</b>
<b>Piperacilina+ Tazobactam</b>	-	-	-	-
<b>Amicacina</b>	-	-	-	-
<b>Gentamicina</b>	-	-	-	-
<b>Ciprofloxacino</b>	0,0625	0,0625	0,125	Sinérgico
<b>Cefepime</b>	0,25	0,0625	0,3125	Sinérgico
<b>Ceftazidima</b>	0,25	0,0625	0,3125	Sinérgico
<b>Vancomicina</b>	0,25	0,0625	0,3125	Sinérgico
<b>Meropenem</b>	0,0625	0,0625	0,125	Sinérgico
<b>Ceftriaxona</b>	0,125	0,5	0,625	Aditivo
<b>Cefalotina</b>	0,25	0,0625	0,3125	Sinérgico
<b>Oxacilina</b>	0,25	0,5	0,75	Aditivo

A tabela mostra as associações das menores concentrações em que houve inibição do crescimento microbiano.

- Não houve inibição do crescimento em nenhuma das associações;

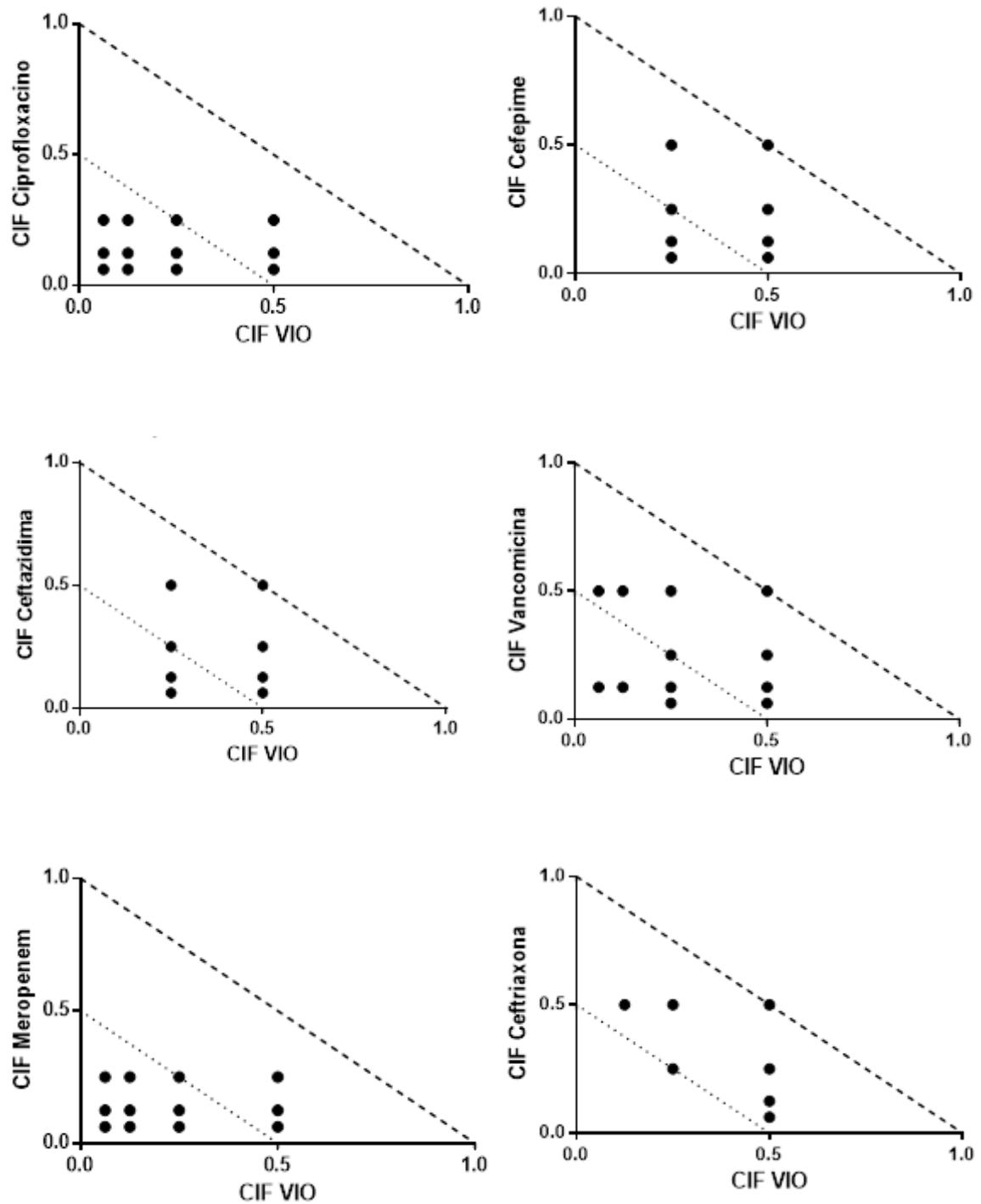
CIM VIO: CIM da violaceína isolada ( $\mu\text{g/mL}$ ); CIM ATB: CIM dos antibióticos isolados ( $\mu\text{g/mL}$ );

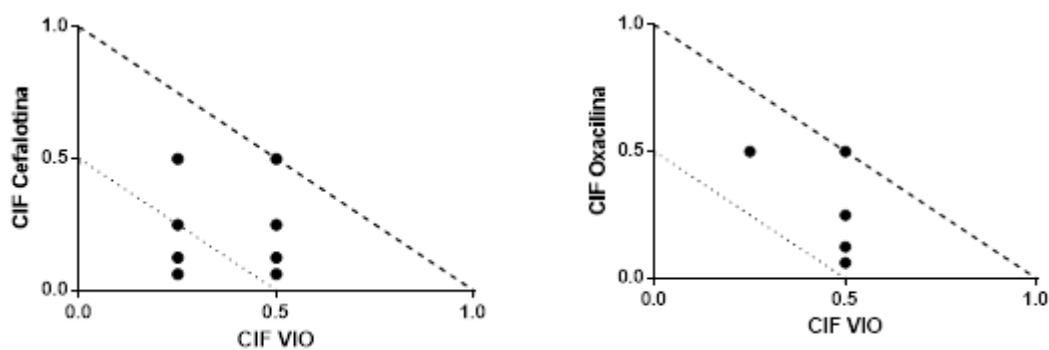
[VIO]: CIM da violaceína na associação ( $\mu\text{g/mL}$ ); [ATB]: CIM dos antibióticos na associação ( $\mu\text{g/mL}$ );

CIF VIO = [VIO]/CIM VIO; CIF ATB = [ATB]/CIM ATB; ICIF = CIF VIO + CIF ATB;

ICIF  $\leq$  0,5: sinergismo; ICIF  $>$  0,5 e  $<$  1,0: aditivo ou indiferente; ICIF  $\geq$  1,0: antagonismo (Eucast, 2003).

**Gráfico 8** – Isobologramas mostrando o efeito da associação VIO-ATB na inibição do crescimento do *S. epidermidis* ATCC 35984.





Os pontos representam os valores de CIF das associações em que o crescimento microbiano foi inibido.

### 5.3. Efeito do tempo de exposição a associação VIO-ATB na viabilidade microbiana

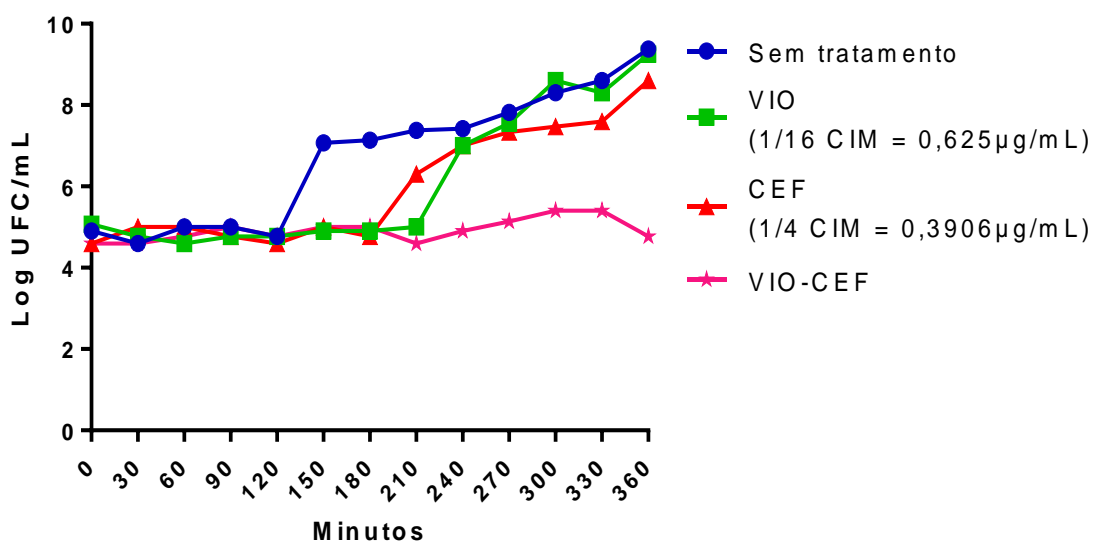
Para a determinação do efeito do tempo de exposição à associação VIO-ATB na viabilidade microbiana foram seleccionadas duas associações sinérgicas com menores concentrações de VIO para cada microrganismo encontradas pelo ensaio do *Checkboard*:

- *S. epidermidis* ATCC12228: VIO (1/16 CIM) + cefepime (CEF) (1/4CIM) e VIO (1/16 CIM) + meropenem (MER) (1/8 CIM);

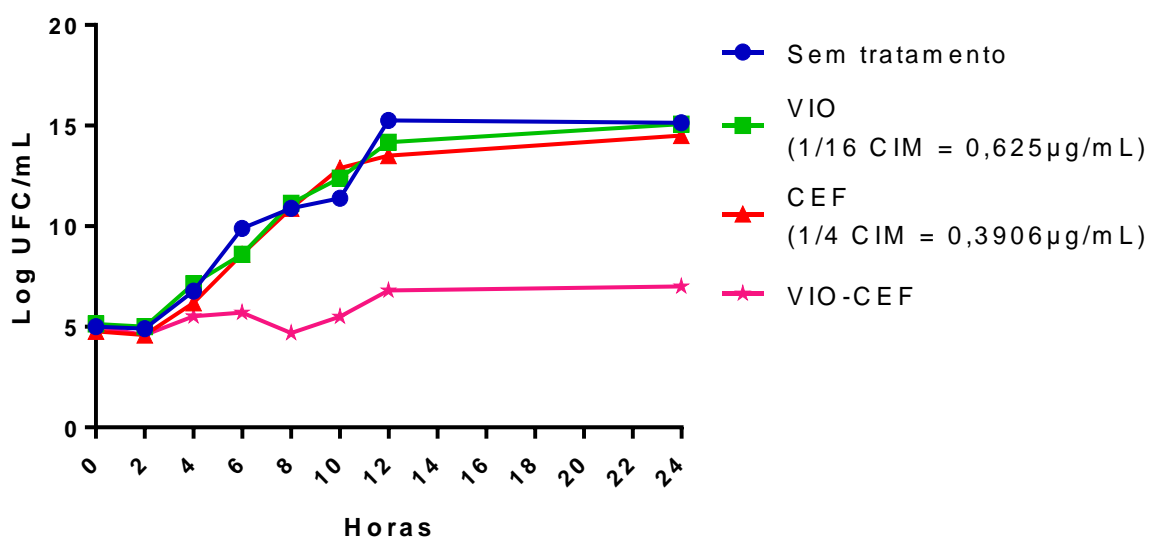
- *S. epidermidis* ATCC 35984: VIO (1/16 CIM) + ciprofloxacino (CIP) (1/16 CIM) e violaceína (1/16 CIM) + meropenem (MER) (1/16 CIM).

No ensaio de tempo de morte (*time kill assay*) da associação VIO-ATBs, com incubação de até 6h, evidenciou-se que a VIO sozinha, em concentração igual a 1/16 CIM, é capaz de inibir o crescimento microbiano do *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. epidermidis* ATCC 35984 por 210 minutos (3h30min) e 150 minutos (2h30min), respectivamente. Com incubação de até 24h, evidenciou-se que todas as associações inibem o crescimento microbiano durante todo o período (Gráficos 9 a 12).

**Gráfico 9-** Efeito do tempo de exposição à associação VIO-CEF na viabilidade de *S. epidermidis* ATCC 12228.



(a)

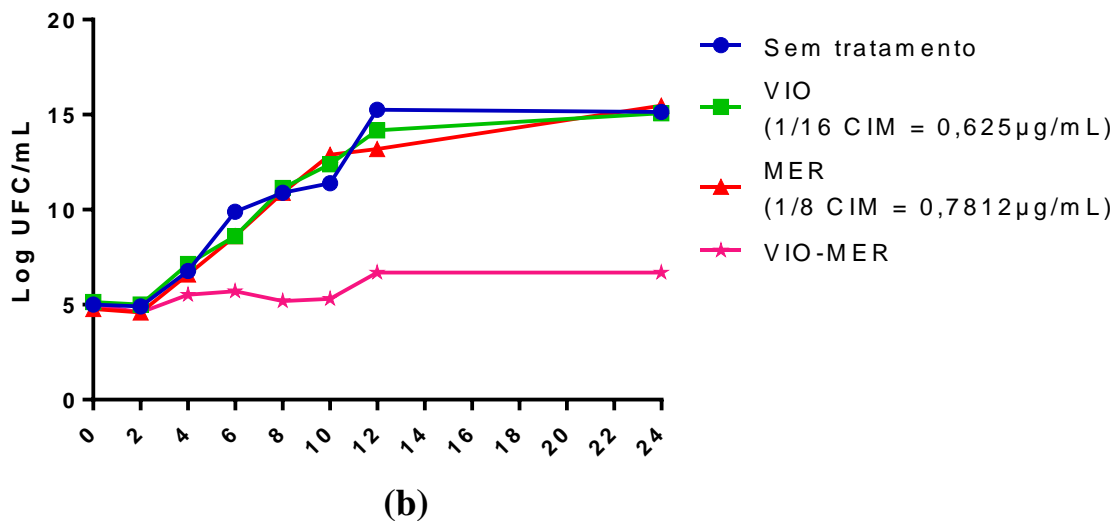
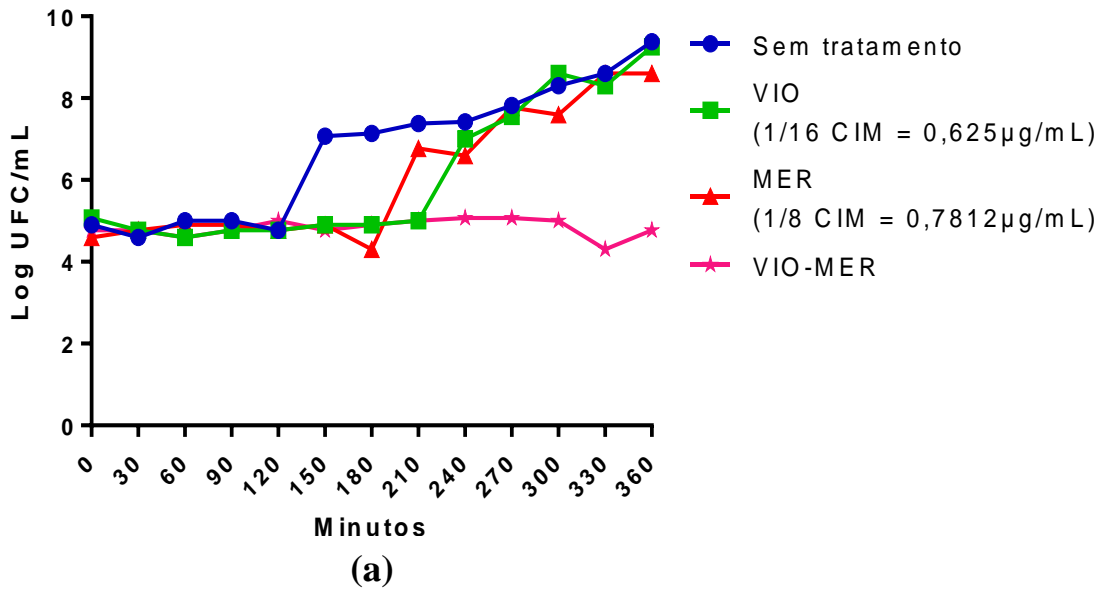


(b)

Os valores estão expressos pela média  $\pm$  EPM de dois ensaios, em duplicata cada. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnet, com  $p < 0,05$ , em comparação ao controle (sem tratamento).

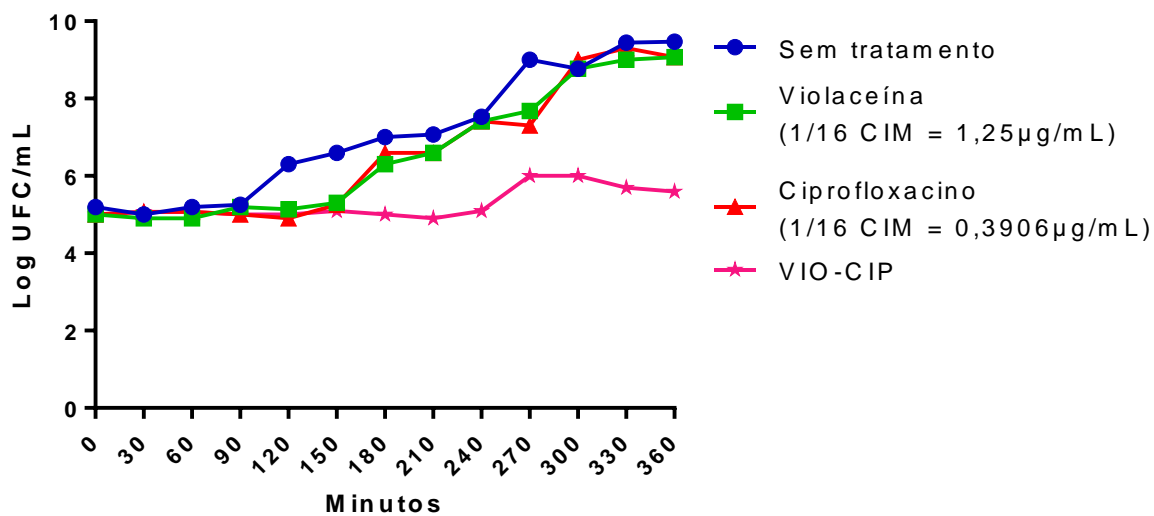
(a): ensaio de até 360 minutos (6h) de incubação. (b): ensaio de 24 horas de incubação.

**Gráfico 10-** Efeito do tempo de exposição à associação VIO-MER na viabilidade de *S. epidermidis* ATCC 12228.

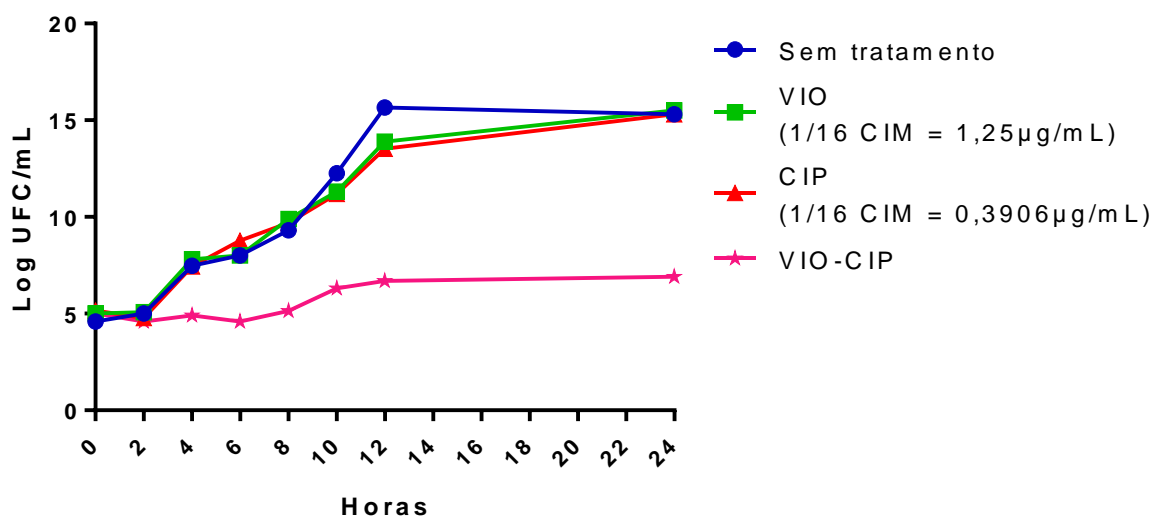


Os valores estão expressos pela média  $\pm$  EPM de dois ensaios, em duplicata cada. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnet, com  $p < 0,05$ , em comparação ao controle (sem tratamento). (a): ensaio de até 360 minutos (6h) de incubação. (b): ensaio de 24 horas de incubação.

**Gráfico 11-** Efeito do tempo de exposição à associação VIO-CIP na viabilidade de *S. epidermidis* ATCC 35984.



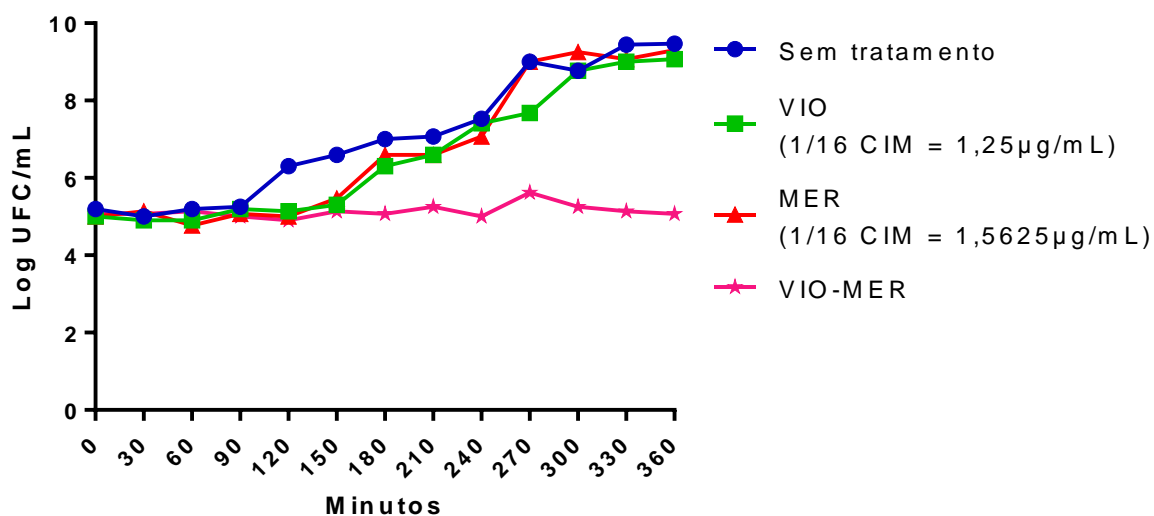
(a)



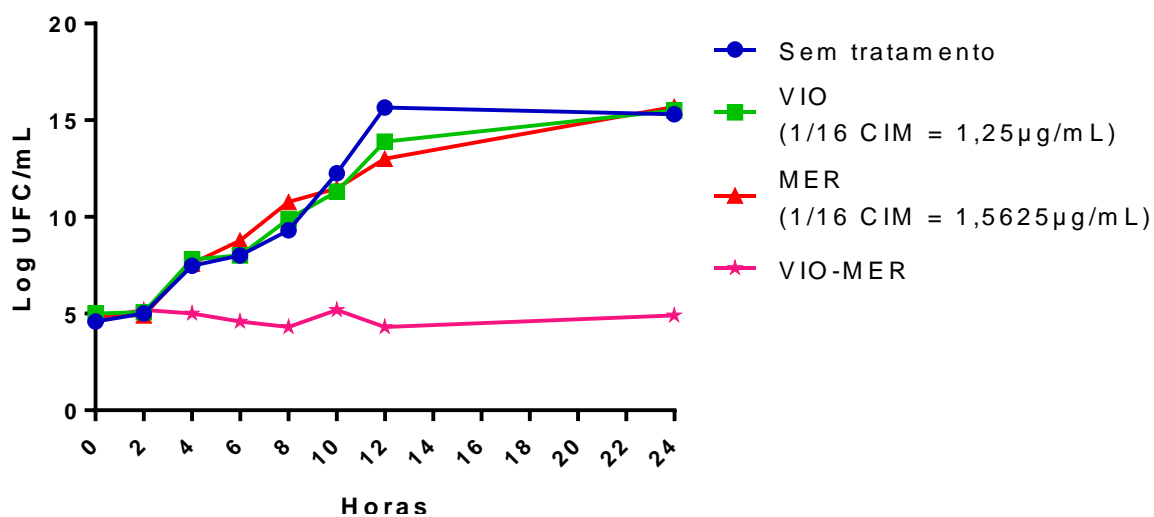
(b)

Os valores estão expressos pela média  $\pm$  EPM de dois ensaios. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnet, com  $p < 0,05$ , em comparação ao controle (sem tratamento). (a): ensaio de até 360 minutos (6h) de incubação. (b): ensaio de 24 horas de incubação.

**Gráfico 12-** Efeito do tempo de exposição à associação VIO-MER na viabilidade celular do *S. epidermidis* ATCC 35984.



(a)



(b)

Os valores estão expressos pela média  $\pm$  EPM de dois ensaios. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Dunnet, com  $p < 0,05$ , em comparação ao controle (sem tratamento). (a): ensaio de até 360 minutos (6h) de incubação. (b): ensaio de 24 horas de incubação.

## 5.4. Atividade antibiofilme

### 5.4.1. Classificação das cepas quanto aderência e formação de biofilme

Os microrganismos foram testados quanto à aderência e formação de biofilme e percebeu-se que a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 é fortemente aderente (Gráfico 13 e Tabela 4), o que já era esperado conforme caracterização dessa cepa pelo *American Type Culture Collection*, portanto, esta foi a cepa selecionada para realização dos ensaios de ação antibiofilme (CIMB, CMEB e *time-kill*).

Gráfico 13 – Cepas de *S. epidermidis* quanto à aderência e formação de biofilme.

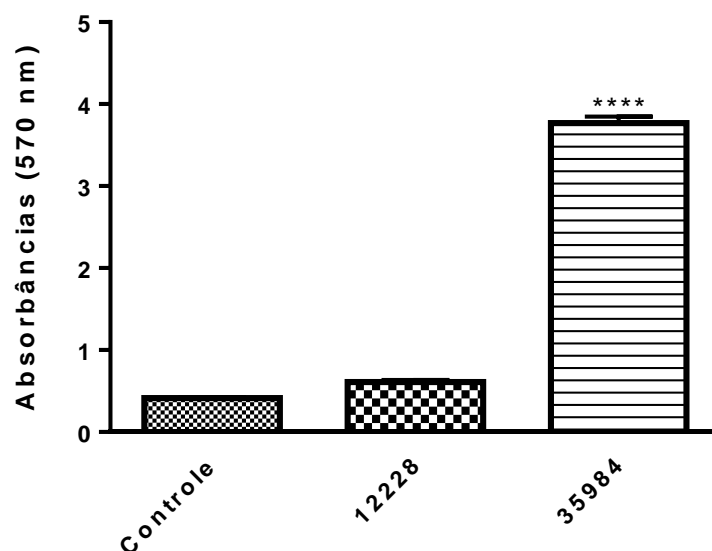


Tabela 4 – Classificação das cepas de *S. epidermidis* quanto à aderência do biofilme.

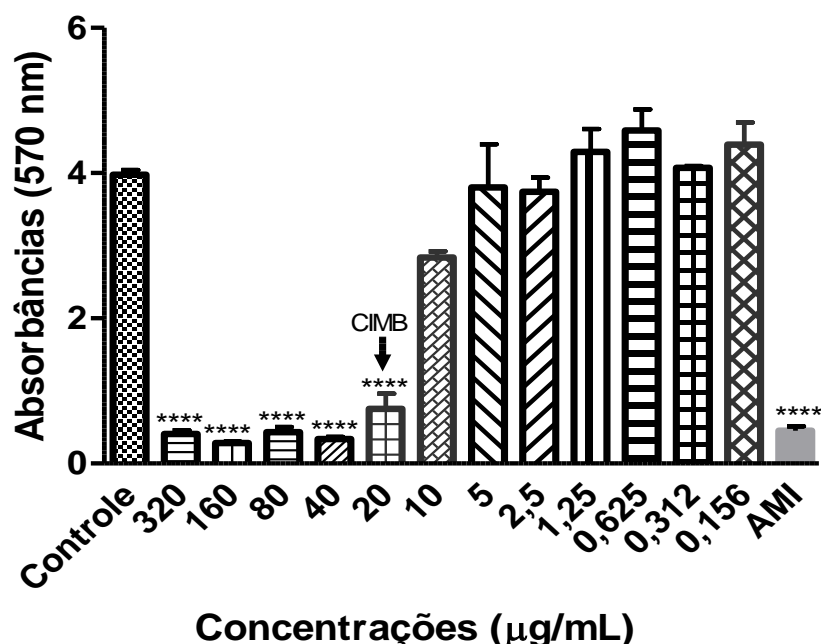
Cepas microbianas	(DO)	Classificação
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	0,611	Fracamente aderente
<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984	3,77	Fortemente aderente
Controle	0,412	Não aderente



#### 5.4.2. Concentração Inibitória Mínima de Formação do Biofilme

A CIMB foi considerada a menor concentração de VIO capaz de impedir a formação de biofilme. A CIMB da VIO para *S. epidermidis* ATCC 35984 foi de 20µg/mL, concentração equivalente à CIM obtida nos ensaios com células planctônicas (Gráfico 14).

Gráfico 14 – CIMB da VIO para *S. epidermidis* ATCC 35984.



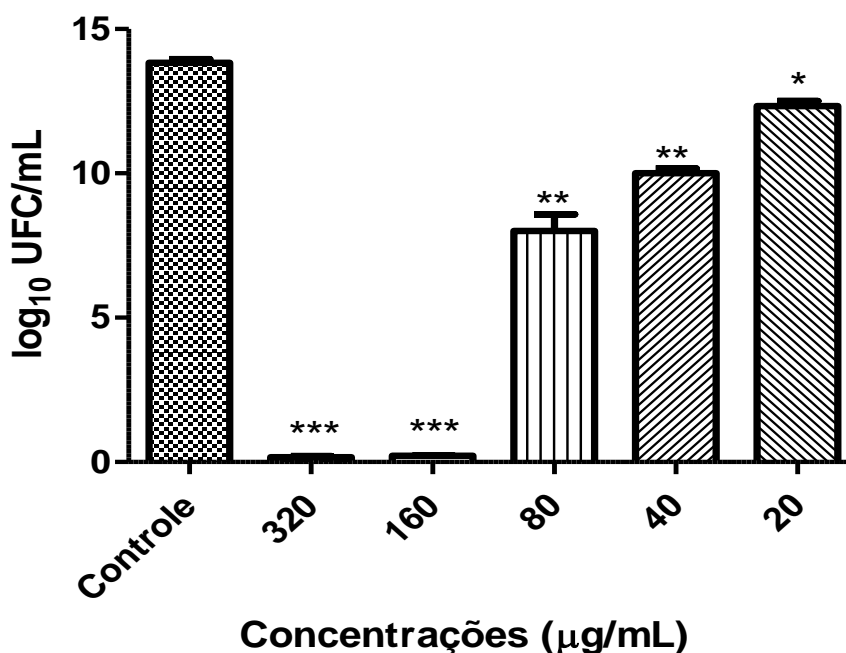
A CIMB foi determinada pela medida da densidade ótica em leitora de ELISA (Bio-Tek) a 570nm. Os valores foram expressos pela média  $\pm$  EPM de três ensaios. Controle: meio de cultura + microrganismo. A análise foi realizada por ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet e valor de  $*p < 0,05$ , em comparação ao controle.

Além de avaliarmos o potencial de inibir a formação do biofilme, foi avaliada a capacidade da VIO agir sobre biofilme previamente formado.

#### 5.4.3. Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme

A CMEB foi considerada a menor concentração de VIO capaz de erradicar o crescimento microbiano já formado em biofilme. A CMEB da VIO para *S. epidermidis* ATCC 35984 foi de 160µg/mL (Gráfico 15).

Gráfico 15 – Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme da VIO sobre *S. epidermidis* ATCC 35984.



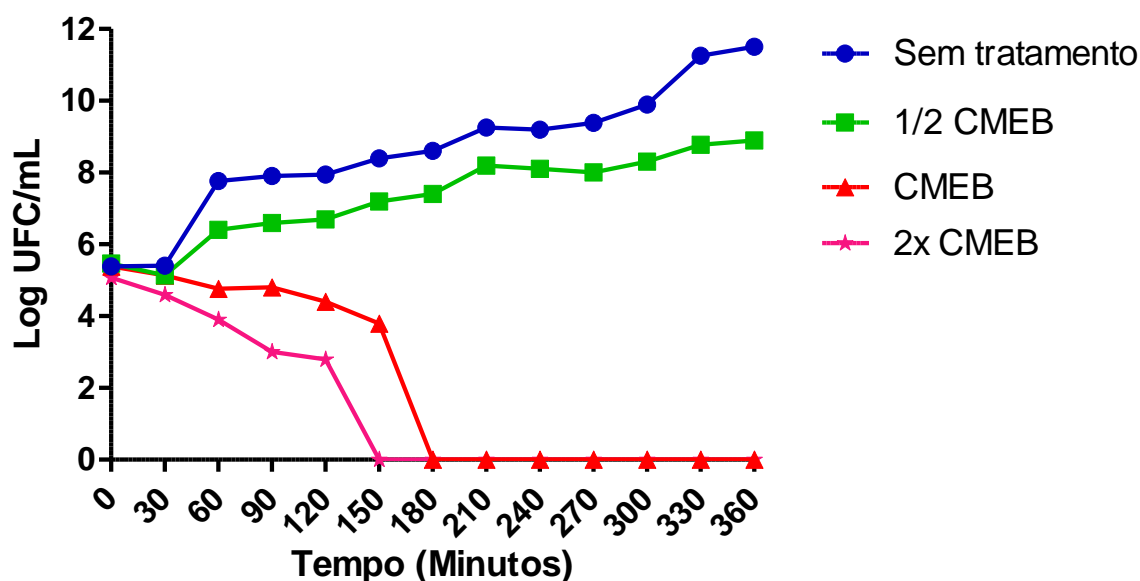
A viabilidade do biofilme remanescente foi avaliada pela contagem de colônias em ágar. Os valores foram expressos pela média  $\pm$  EPM de três ensaios. Controle: biofilme maduro de 24h. A análise foi realizada por ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet e valor de  $*p < 0,05$ , em comparação ao controle.

Diante da ação da VIO sobre a formação de biofilme e sobre biofilme já formado de *S. epidermidis* ATCC 35984, foi avaliada a viabilidade celular em biofilme em função do tempo de exposição à VIO.

#### 5.4.4. Efeito do tempo de exposição à VIO na viabilidade microbiana em biofilme

Em concentração equivalente à  $\frac{1}{2}$  CMEB não ocorreu erradicação do biofilme microbiano, entretanto, com 6h de incubação houve redução de  $4\log_{10}$  UFC/mL em comparação ao controle (sem tratamento). Em concentrações iguais à CMEB e à 2x CMEB houve erradicação do biofilme em 3h e 2h30min de incubação, respectivamente (Gráfico 16). Portanto, a velocidade de erradicação do biofilme já formado é dependente da concentração da VIO.

Gráfico 16 – Efeito do tempo de exposição à VIO na viabilidade de biofilme de *S. epidermidis* ATCC 35984.



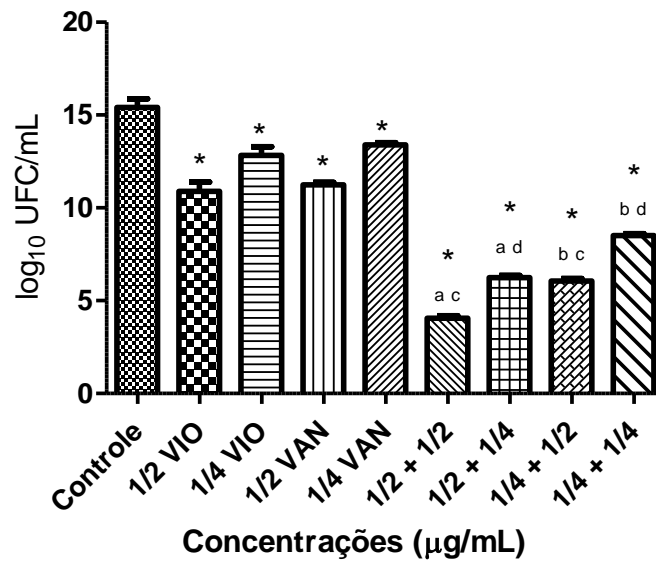
Os valores foram expressos pela média  $\pm$  EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, seguido de pós-teste de Dunnet e valor de  $*p < 0,05$ , em comparação ao controle. 1/2x CMEB = 80 $\mu$ g/mL; CMEB = 160 $\mu$ g/mL; 2x CMEB = 320 $\mu$ g/mL.

##### 5.5. Ação moduladora da VIO sobre antimicrobianos de uso clínico sobre biofilme de *S. epidermidis*.

Para avaliação do efeito modulador da VIO sobre antimicrobianos de uso clínico sobre biofilme microbiano, foram selecionadas quatro associações do ensaio do *checkboard* que apresentaram sinergismo com fármacos de diferentes classes, sendo elas VIO-CEF (cefalosporina), VIO-CIP (fluoroquinolona), VIO-MER (carbapenêmico) e VIO-VAN (glicopeptídeo).

A única associação capaz de erradicar completamente o biofilme já formado foi VIO-CIP. Entretanto, em todas as associações houve redução significativa da viabilidade microbiana em biofilme em comparação ao controle sem tratamento e em 81,25% (n=13) das associações houve redução significativa da viabilidade microbiana em comparação às duas substâncias isoladamente e, portanto, houve sinergismo (Gráficos 17-20 e Tabela 5).

Gráfico 17 – Efeito da associação VIO-VAN na viabilidade celular de biofilme de *S. epidermidis* ATCC 35984.



1/2 VIO = 1/2xCMEB da VIO; 1/4 VIO = 1/4xCMEB da VIO;

1/2 VAN = 1/2xCMEB do VAN; 1/4 VAN = 1/4xCMEB do VAN;

1/2 + 1/2 = 1/2xCMEB da VIO + 1/2xCMEB do VAN; 1/2 + 1/4 = 1/2xCMEB da VIO + 1/4xCMEB do VAN;

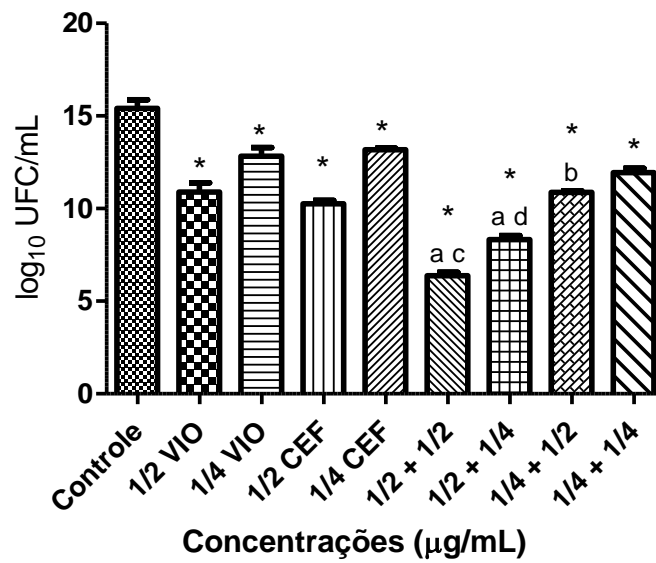
1/4 + 1/2 = 1/4xCMEB da VIO + 1/2xCMEB do VAN; 1/4 + 1/4 = 1/4xCMEB da VIO + 1/4xCMEB do VAN;

Os valores estão expressos pela média ± EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey e valor de: \* p<0,05 quando comparado ao controle;

<sup>a</sup> p<0,05 quando comparado à 1/2 VIO; <sup>b</sup> p<0,05 quando comparado à 1/4 VIO;

<sup>c</sup> p<0,05 quando comparado à 1/2 VAN; <sup>d</sup> p<0,05 quando comparado à 1/4 VAN.

Gráfico 18 – Efeito da associação VIO-CEF na viabilidade celular de biofilme de *S. epidermidis* ATCC 35984.



1/2 VIO = 1/2xCMEB da VIO; 1/4 VIO = 1/4xCMEB da VIO;

1/2 CEF = 1/2xCMEB do CEF; 1/4 CEF = 1/4xCMEB do CEF;

1/2 + 1/2 = 1/2xCMEB da VIO + 1/2xCMEB do CEF; 1/2 + 1/4 = 1/2xCMEB da VIO + 1/4xCMEB do CEF

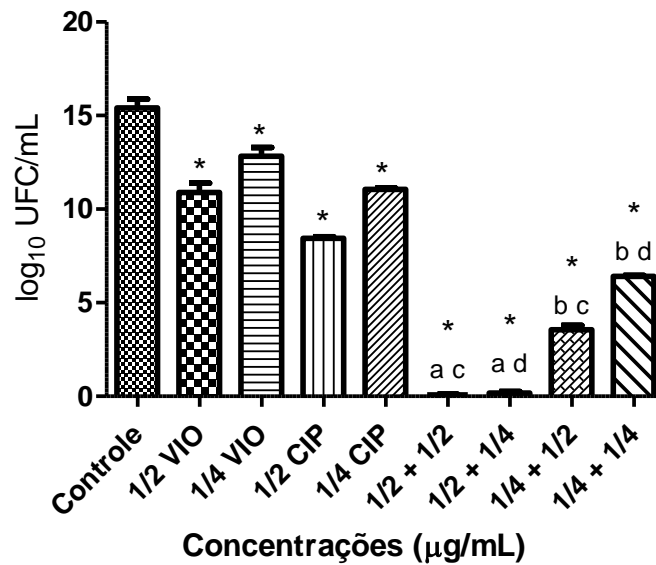
1/4 + 1/2 = 1/4xCMEB da VIO + 1/2xCMEB do CEF; 1/4 + 1/4 = 1/4xCMEB da VIO + 1/4xCMEB do CEF

Os valores estão expressos pela média ± EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey e valor de: \* p<0,05 quando comparado ao controle;

<sup>a</sup> p<0,05 quando comparado à 1/2 VIO; <sup>b</sup> p<0,05 quando comparado à 1/4 VIO;

<sup>c</sup> p<0,05 quando comparado à 1/2 CEF; <sup>d</sup> p<0,05 quando comparado à 1/4 CEF.

Gráfico 19 – Efeito da associação VIO-CIP na viabilidade celular de biofilme de *S. epidermidis* ATCC 35984.



1/2 VIO = 1/2xCMEB da VIO; 1/4 VIO = 1/4xCMEB da VIO;

1/2 CEF = 1/2xCMEB do CIP; 1/4 CEF = 1/4xCMEB do CIP;

1/2 + 1/2 = 1/2xCMEB da VIO + 1/2xCMEB do CIP; 1/2 + 1/4 = 1/2xCMEB da VIO + 1/4xCMEB do CIP;

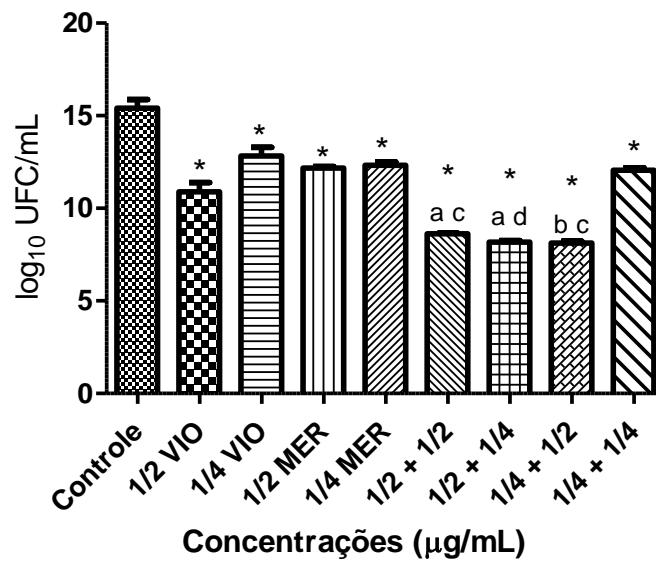
1/4 + 1/2 = 1/4xCMEB da VIO + 1/2xCMEB do CIP; 1/4 + 1/4 = 1/4xCMEB da VIO + 1/4xCMEB do CIP;

Os valores estão expressos pela média ± EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey e valor de: \* p<0,05 quando comparado ao controle;

<sup>a</sup> p<0,05 quando comparado à 1/2 VIO; <sup>b</sup> p<0,05 quando comparado à 1/4 VIO;

<sup>c</sup> p<0,05 quando comparado à 1/2 CIP; <sup>d</sup> p<0,05 quando comparado à 1/4 CIP.

Gráfico 20 – Efeito da associação VIO-MER na viabilidade celular de biofilme de *S. epidermidis* ATCC 35984.



1/2 VIO = 1/2xCMEB da VIO; 1/4 VIO = 1/4xCMEB da VIO;

1/2 CEF = 1/2xCMEB do MER; 1/4 CEF = 1/4xCMEB do MER;

1/2 + 1/2 = 1/2xCMEB da VIO + 1/2xCMEB do MER; 1/2 + 1/4 = 1/2xCMEB da VIO + 1/4xCMEB do MER;

1/4 + 1/2 = 1/4xCMEB da VIO + 1/2xCMEB do MER; 1/4 + 1/4 = 1/4xCMEB da VIO + 1/4xCMEB do MER;

Os valores estão expressos pela média ± EPM de três ensaios. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey e valor de: \* p<0,05 quando comparado ao controle;

<sup>a</sup> p<0,05 quando comparado à 1/2 VIO; <sup>b</sup> p<0,05 quando comparado à 1/4 VIO;

<sup>c</sup> p<0,05 quando comparado à 1/2 MER; <sup>d</sup> p<0,05 quando comparado à 1/4 MER.

Tabela 5 – Redução da viabilidade celular (em  $\log_{10}$  UFC/mL) após exposição às associações VIO-ATB em comparação ao controle, à VIO e ao ATB isolados.

Associação	VIO isolada	ATB isolado	Controle
<b>VIO-VAN</b>			
1/2 + 1/2	8,3	6,7	11,4
1/2 + 1/4	6,3	7,3	9,4
1/4 + 1/2	6,6	4,7	9,4
1/4 + 1/4	4,6	5,3	7,4
<b>VIO-CEF</b>			
1/2 + 1/2	6	4	9,1
1/2 + 1/4	4,3	5	7,4
1/4 + 1/2	2	0,3	4,8
1/4 + 1/4	0,6	1	3,4
<b>VIO-CIP</b>			
1/2 + 1/2	12,6	8,3	15,7
1/2 + 1/4	12,6	11	15,7
1/4 + 1/2	8,6	4	11,4
1/4 + 1/4	6,6	4,7	9,4
<b>VIO-MER</b>			
1/2 + 1/2	4	3,7	7,1
1/2 + 1/4	4,3	4,3	7,4
1/4 + 1/2	4,6	4	7,4
1/4 + 1/4	0,6	0,3	3,4

\* Resultados expressos em  $\log_{10}$  UFC/mL.

\*\* Redução  $\geq 2\log_{10}$  UFC/mL são consideradas significativas, ou seja, confirmam a ocorrência de sinergismo (JAYARAMAN *et al.*, 2010).



## 6. DISCUSSÃO

A VIO é um pigmento violeta produzido por bactérias de diferentes gêneros, como a *C. violaceum*. Tal pigmento apresenta papel fisiológico no metabolismo destas bactérias ainda questionado, mas apresenta diversas atividades biológicas importantes já descritas, como seu potencial antimicrobiano.

Estudos revelam importante atividade antibacteriana *in vitro* da VIO sobre microrganismos Gram-positivo, com destaque para *S. aureus*, entretanto, em relação a bactérias Gram-negativo, a VIO apresenta menor potencial antibacteriano (MARTINS JÚNIOR, 2009). Relata-se que a menor sensibilidade das bactérias Gram-negativo a moléculas com caráter hidrofóbico, como a VIO, seja decorrente da presença de membrana externa nestes microrganismos, que dificulta a entrada de substâncias insolúveis em água (FLUIT; VISSER; SCHMITZ, 2001; BURT, 2004; BAPTISTA, 2013). Em relação ao *S. epidermidis*, não está descrita a ação deste pigmento especificamente sobre células planctônicas e biofilme de *S. epidermidis*.

No presente estudo, constatamos que a VIO apresenta excelente ação antimicrobiana sobre o patógeno Gram-positivo *S. epidermidis*, pois em baixas concentrações apresentou ação bacteriostática e bactericida, segundo os ensaios de CIM e CBM. Estes ensaios são técnicas quantitativas que possibilitam conhecer as menores concentrações capazes de inibir e erradicar o crescimento microbiano, portanto, são essenciais para a determinação do potencial antimicrobiano das substâncias. Além disso, o ensaio da CIM é uma técnica mais sensível e que necessita de pequenas quantidades da substância teste, em comparação a outras técnicas, como a de difusão em ágar, por isso, é mais indicada (MARTINS *et al.*, 2010).

A concentração mínima necessária para inibir o crescimento do microrganismo foi menor para a cepa *S. epidermidis* ATCC 12228 (10 µg/mL) em comparação com a cepa *S. epidermidis* ATCC 35984 (20 µg/mL), o que pode ser atribuído a sua capacidade de formar biofilme (Gráficos 1 e 2).

Batista (2014) também demonstrou a necessidade de maiores CIM de VIO para cepas de *S. aureus* formadoras de biofilme, quando comparadas a cepas não produtoras. Para a formação do biofilme, a bactéria sofre adaptações em todo o seu genoma, como na biossíntese de ácidos nucleicos, proteínas e da parede celular, que justificam a limitação da atividade das substâncias antimicrobianas sobre tais microrganismos (OTTO, 2009).

Alguns estudos relatam a boa atividade antimicrobiana da VIO sobre outros patógenos Gram-positivo, como os experimentos de Lima (2013) que mostram sua ação antimicrobiana sobre *Enterococcus faecalis*, com CIM de 57µg/mL e CBM de 115 µg/mL.

Sabendo que *S. epidermidis* está entre os principais patógenos causadores de infecções associadas a dispositivos e implantes médicos, em decorrência, principalmente, da sua capacidade de formação de biofilme, que é um dos agentes infecciosos mais isolados em UTIs e em amostras de pacientes com sepse, e que tal patógeno tem apresentado taxas crescentes de resistência aos fármacos antimicrobianos, os resultados de CIM e CBM da VIO sobre tal bactéria direcionaram a realização de ensaios mais detalhados para se compreender o efeito deste pigmento sobre tal microrganismo (SANTOS *et al.*, 2015).

O conhecimento da cinética de crescimento microbiano é importante para entender o crescimento microbiano e identificar as diferentes fases de crescimento e morte, informações essenciais para a realização de alguns ensaios microbiológicos e para determinação dos mecanismos de ação, visto que determinam a taxa de crescimento microbiano e os tempos de incubação necessários para cada ensaio (SALES, 2014). As duas cepas testadas, *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. epidermidis* ATCC 35984, ativadas *overnight*, atingiram as fases de crescimento exponencial e estacionário após 2 horas e 12 horas de incubação, respectivamente (Gráficos 3 e 4).

A atividade bactericida e bacteriostática de substâncias pode ser determinada por meio de ensaios de tempo de morte (*time kill assay*), método *in vitro* que permite identificar a velocidade da ação antimicrobiana da substância estudada, informação que não é obtida nos ensaios de determinação das concentrações inibitória e bactericida mínimas (AIYEGORO; AFOLAYAN; OKOH, 2009).

O ensaio de tempo de morte mostrou que a VIO apresenta elevado potencial antimicrobiano, pois sua ação bacteriostática e bactericida sobre as cepas testadas ocorreu com curtos tempos de exposição. A ação bacteriostática quando em CIM ocorreu por até 24h para ambas as cepas testadas, mas foi evidenciada ação bacteriostática também em concentrações subinibitórias (1/2xCIM), por um período de tempo de 5h e 6h, para *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. epidermidis* ATCC 35984, respectivamente (Gráficos 5 e 6).

Além disso, a ação bactericida da VIO, constatada em 2h para *S. epidermidis* ATCC 12228 e em 3h para *S. epidermidis* ATCC 35984, ocorreu mais

rapidamente quando se aumentou a concentração, portanto, o efeito antibacteriano desse pigmento é dependente da concentração (Gráficos 5 e 6).

Outros estudos também demonstraram a rápida atividade bactericida da VIO sobre *S. aureus*, variando entre 2 e 4 horas de exposição para diferentes cepas (BATISTA, 2014; LIMA 2013).

Os ensaios de atividade moduladora sobre células planctônicas evidenciaram que a VIO é capaz de modular sinergicamente a ação de diversos antimicrobianos de uso clínico para *S. epidermidis* formador e não formador de biofilme, reduzindo os valores de CIM para estes microrganismos em até 16 vezes. Houve sinergismo entre a VIO e antimicrobianos de diferentes classes, como penicilinas (oxacilina), aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina), cefalosporinas de diferentes gerações (cefepime, ceftazidima, ceftriaxona, cefalotina), glicopeptídeos (vancomicina), carbapenêmicos (meropenem) para *S. epidermidis* ATCC 12228 (Tabela 2 e Gráfico 7). E entre a VIO e as classes das quinolonas (ciprofloxacino), cefalosporinas de diferentes gerações (cefepime, ceftazidima, cefalotina), glicopeptídeos (vancomicina) e carbapenêmicos (meropenem) para *S. epidermidis* ATCC 35984 (Tabela 3 e Gráfico 8).

Subramaniam, Ravi e Sivasubramanian (2014) relataram que a VIO interage sinergicamente com a maioria dos antibióticos comerciais, aumentando o potencial antimicrobiano destas drogas sobre *Salmonella typhi*, *Vibrio cholera*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* e *S. aureus*. Anju *et al.* (2015) relataram efeito sinérgico entre VIO e azóis (cetoconazol, fluconazol, clotrimazol e itraconazol) sobre o fungo dermatófito *Trichophyton rubrum*.

Diante da crescente resistência bacteriana a múltiplas drogas, combinações sinérgicas entre novas moléculas e os medicamentos comerciais podem ser boas alternativas para o controle de tais microrganismos.

O ensaio de tempo de morte (*time kill assay*) pode ser realizado para determinar combinações sinérgicas entre substâncias, para confirmar o que foi encontrado no teste do *checkboard*, além de identificar a velocidade da ação bactericida das associações. A taxa de mortalidade bacteriana é identificada pela contagem de células viáveis (UFC/mL) em diferentes tempos e considera-se sinergismo quando ocorre uma redução  $\geq 2\log_{10}$  UFC/mL decorrente da exposição à associação em comparação à inibição decorrente das substâncias isoladamente (JAYARAMAN *et al.*, 2010).

Na avaliação da influência do tempo de exposição na atividade das associações foram selecionadas duas associações, para cada uma das cepas testadas, com as menores concentrações de VIO que foram capazes de modular sinergicamente a ação do antibiótico, obtidas pelo método do *checkboard*. Para *S. epidermidis* ATCC12228, as associações escolhidas foram VIO (1/16 CIM) - CEF (1/4CIM) e VIO (1/16 CIM) - MER (1/8 CIM); para *S. epidermidis* ATCC 35984, as associações selecionadas foram VIO (1/16 CIM) - CIP (1/16 CIM) e VIO (1/16 CIM) -MER (1/16 CIM).

Nenhuma das associações testadas (VIO-CEF e VIO-MER para *S. epidermidis* ATCC 12228; e VIO-CIP e VIO-MER para *S. epidermidis* ATCC 35984) conseguiram ocasionar a morte celular, isso ocorreu porque foram escolhidas as associações com as menores concentrações de VIO (1/16 x CIM). Apesar disso, todas as associações testadas foram capazes de inibir significativamente o crescimento microbiano, reduzindo no mínimo  $2\log_{10}$  UFC/mL, quando comparado à inibição decorrente das substâncias separadamente, nas mesmas concentrações que na associação, confirmando o que foi encontrado no teste do *checkboard* (Gráficos 9 a 12).

Combinações sinérgicas de dois ou mais agentes antimicrobianos são interessantes em virtude de fatores como a prevenção do surgimento de cepas resistentes, a diminuição da toxicidade, visto que o mesmo efeito é obtido com doses bem menores, além de, muitas vezes, expandir o espectro de ação em relação às substâncias isoladas (ROCHA, 2012).

Considerando o excelente potencial antimicrobiano da VIO sobre cepas planctônicas de *S. epidermidis* e sendo este microrganismo de importância médica, principalmente, pela sua capacidade de formar biofilme, foi avaliada a ação antimicrobiana da VIO sobre biofilme de *S. epidermidis*.

Inicialmente as cepas foram classificadas quanto a sua capacidade de aderir e formar biofilme na microplaca, sendo escolhida a cepa de *S. epidermidis* ATCC 35984 para a realização dos demais ensaios de avaliação da atividade antibiofilme por ser fortemente aderente (Gráfico 13).

Os ensaios de avaliação da ação antibiofilme são realizados em meio de cultura caldo TSB suplementado com glicose 1% (p/v), pois a glicose favorece a formação de biofilme pelo *S. epidermidis* (OTTO, 2008; BOLES; HORSWILL, 2011).

Os ensaios de determinação da CIMB mostraram que a mesma concentração de VIO necessária para inibir o crescimento microbiano em células planctônicas de *S.*

*epidermidis*, é capaz de impedir o desenvolvimento de biofilme por esta bactéria, o que sugere que a VIO interfere no início da formação do biofilme (Gráfico 14). Esse resultado demonstra a atividade antimicrobiana e o potencial antibiofilme da VIO.

Quando foi avaliada a ação da VIO sobre biofilme de *S. epidermidis* já formado, concentrações iguais a 1/2 x CMEB, 1/4 x CMEB e 1/8 x CMEB da VIO foram capazes de reduzir, respectivamente, em 4,8log<sub>10</sub> UFC/mL, 3,8log<sub>10</sub> UFC/mL e 1,5log<sub>10</sub> UFC/mL a viabilidade do biofilme bacteriano em comparação ao controle sem tratamento. Apesar disso, foram necessárias concentrações oito vezes maiores que a CIM e CBM para que ocorresse a total erradicação do biofilme (Gráfico 15).

Esse resultado era esperado, visto que os biofilmes são aglomerados bacterianos, aderidos a uma superfície, e incorporados a uma matriz extracelular, o que fornece proteção tanto contra substâncias antimicrobianas como contra os mecanismos de defesa do hospedeiro. Portanto, os biofilmes são estruturas mais resistentes e necessitam de concentrações mais elevadas para sua erradicação, cerca de 10 a 1000 vezes maiores, em comparação a células planctônicas (AGUILA-ARCOS *et al.*, 2015; OTTO, 2012).

Estudos comprovam a maior resistência de células em biofilme, em comparação a células planctônicas, como o de Sahal e Bilkay (2014), os quais mostraram que entre todas as cepas de *S. epidermidis* isolados de amostras clínicas, 60% foram resistentes a 3 ou mais classes de antibióticos, já quando se refere a cepas de *S. epidermidis* fortemente aderentes e formadoras de biofilme essa porcentagem foi de 100%. Além disso, mostraram que entre *S. epidermidis* formadores de biofilme, 20% apresentaram resistência a 7 classes de antimicrobianos (aminoglicosídeos, betalactâmicos, macrolídeos, tetraciclina, fluoroquinolonas, lincosaminas e sulfonamidas), sendo estas cepas as mesmas que apresentaram máxima formação de biofilme.

Alguns mecanismos que conferem características protetoras aos biofilmes são: a matriz pode representar uma barreira mecânica dificilmente penetrada pelas células do sistema imune, além disso, a matriz limita a difusão para alguns antibióticos, contribuindo para a resistência do biofilme. Além disso, as células em biofilme apresentam diferenças fisiológicas em relação às células planctônicas, por exemplo, as bactérias em biofilme apresentam atividade reduzida de alguns processos celulares, como replicação do DNA, divisão celular e síntese proteica, portanto, antibióticos que

atuem nesses processos, podem ter seu potencial antimicrobiano reduzido (OLIVEIRA, 2012; OTTO, 2012).

A taxa de crescimento de células em biofilme, por ser menor que em células planctônicas, é considerada como um mecanismo de resistência bacteriano a fármacos cujo efeito é dependente da taxa de crescimento microbiano. Batista (2014), ao estudar o efeito da VIO sobre diferentes cepas de *S. epidermidis*, observou que a cepa que apresentou maior taxa de crescimento (*S. aureus* ATCC 6538P), ou seja, metabolismo mais ativo, foi a mais sensível à ação da VIO.

O crescimento microbiano e o efeito do tempo de exposição à VIO na viabilidade bacteriana em biofilme foram avaliados pelo ensaio *time-kill*, que mostrou que quanto maior a concentração da VIO, mais rapidamente ocorreu a erradicação das células bacterianas (Gráfico 16). Percebe-se, portanto, que o efeito da VIO sobre biofilme bacteriano é dependente da concentração, assim como sobre células planctônicas.

Sabendo que a formação de biofilme é o principal fator de virulência do *S. epidermidis* (NANVAR *et al.*, 2014), que é responsável pela capacidade deste microrganismo causar infecções associadas a dispositivos médicos (CHESSA; GANAU; MAZZARELLO, 2015), e que está intimamente relacionada à resistência desse patógeno aos antibióticos (PINHEIRO *et al.*, 2014), são importantes estudos que avaliem a ação de substâncias sobre biofilme de *S. epidermidis*. A VIO apresentou boa ação antibiofilme, entretanto foram necessárias concentrações elevadas para erradicação bacteriana em biofilme já formado, portanto, foi realizado ensaio de sinergismo em biofilme para avaliar se menores concentrações de VIO são capazes de erradicar o biofilme, quando associado à antibiótico de uso clínico.

Para os ensaios de sinergismo sobre biofilme foram selecionadas associações com antibióticos de quatro classes diferentes que apresentaram efeito sinérgico no ensaio do *checkboxboard* sobre células planctônicas.

A maioria das associações (81,25%) apresentou redução  $\geq 2\log_{10}$  UFC/mL na viabilidade celular do biofilme em comparação aos compostos isoladamente e, portanto, foram consideradas associações significativamente diferentes e sinérgicas (Gráficos 17-20 e Tabela 5) (JAYARAMAN *et al.*, 2010).

Estudos têm mostrado que concentrações subinibitórias de alguns antimicrobianos tem ocasionado aumento na persistência do biofilme em *S. epidermidis*. Isso pode explicar a resistência à terapia antimicrobiana e a não erradicação do biofilme

de *S. epidermidis* quando associado violaceína com os fármacos cefepime, vancomicina e meropenem (BONFANTI, 2015).

As associações 1/2VIO - 1/2CIP e 1/2VIO – 1/4CIP foram capazes de erradicar completamente o biofilme de *S. epidermidis* já formado. O fármaco ciprofloxacino age inibindo as enzimas topoisomerase II bacteriana (DNA girase) e topoisomerase IV, que são essenciais para os processos de replicação, transcrição, reparo e recombinação do DNA bacteriano, ou seja, essenciais para a viabilidade celular (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Estudos afirmam que os fármacos rifampicina, vancomicina e daptomicina se difundem facilmente na matrix do biofilme de *S. epidermidis* (DUNNE; MASON; KAPLAN, 1993; LEITE *et al.*, 2011). Em contraste, outros estudos mostraram que ciprofloxacino apresenta boa penetração em biofilme bacteriano de *S. epidermidis*, em comparação a outros fármacos, como oxacilina, cefotaxima e vancomicina, além do excelente efeito sinérgico deste fármaco com outras substâncias, como a N-acetilcisteína, tanto sobre a inibição da formação de biofilme, como sobre biofilmes já formados (EL-FEKY *et al.*, 2009; SINGH; RAY; SHARMA, 2010).

A boa penetração do ciprofloxacino em biofilme de *S. epidermidis* relatada por alguns autores pode ter facilitado a entrada da VIO no biofilme e a consequente erradicação do mesmo. Percebe-se que entre os demais fármacos que foram testados, a associação com vancomicina foi a que apresentou melhor efeito sinérgico, visto que promoveu a maior redução no número de  $\log_{10}$  UFC/mL (Tabela 5). O mesmo pode ter ocorrido nesta associação, visto que a vancomicina também é relatada como um fármaco que apresenta fácil penetração no biofilme de *S. epidermidis*, conforme citado anteriormente.

Existem limitadas opções terapêuticas para tratamento de infecções causadas por *S. epidermidis*, visto que a maioria das cepas isoladas é resistente à meticilina, necessitando de terapia com glicopeptídeo. A vancomicina surge como fármaco de escolha nesses casos, principalmente em infecções de próteses articulares, cateteres e endocardites (BONFANTI, 2015). Diante disso, a associação VIO-VAN merece destaque, visto que a VIO foi capaz de potencializar a ação do fármaco considerado de escolha no tratamento de tais infecções.

Outros estudos tem revelado melhor efeito antimicrobiano de diferentes associações de substâncias sobre biofilme de *S. epidermidis*, em comparação às substâncias isoladas (LEITE *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2012). Esses resultados são

importantes, pois mostram que diante da dificuldade de desenvolvimento de novos fármacos e do longo caminho a ser percorrido até a chegada de um novo medicamento no mercado, a associação entre fármacos já comercializados é uma alternativa terapêutica, principalmente em caso de cepas resistentes.

Em relação à VIO, percebe-se que o estudo do seu efeito sinérgico com outros fármacos sobre *S. epidermidis*, principalmente sobre células em biofilme, apresentou bons resultados que devem continuar sendo investigados, visto que é um pigmento que tem boa ação antimicrobiana, como foi mostrado, e que pode ter sua ação sobre biofilme potencializada, inclusive reduzindo a resistência aos fármacos já utilizados na terapêutica.



## 7. CONCLUSÃO

A VIO apresentou excelente atividade antimicrobiana sobre cepas planctônicas de *S. epidermidis*, apresentando ação bactericida entre 2 e 3 horas de exposição. Em associação com antibióticos de uso clínico, as concentrações necessárias para inibir o crescimento microbiano foram reduzidas em até 16 vezes.

A VIO também apresentou boa atividade sobre biofilme de *S. epidermidis*, no entanto foi necessária concentração oito vezes maior que a CIM para a completa erradicação do biofilme já formado. Houve redução no número de células viáveis no biofilme quando a VIO foi associada a antibióticos de uso clínico de diferentes classes, ocorrendo erradicação das células quando utilizada a associação VIO-CIP.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante da preocupação do *S. epidermidis* ser um importante patógeno causador de infecções relacionadas a dispositivos médicos e da sua crescente resistência aos fármacos disponíveis no mercado, percebe-se que a VIO é uma substância promissora para o desenvolvimento de um novo fármaco antimicrobiano com ação sobre este patógeno, inclusive sobre seu biofilme, ou mesmo para ser associada a fármacos já comercializados.

É interessante que outros estudos sejam realizados visando entender como este pigmento modula a ação de outros antibióticos e investigar o mecanismo de ação do mesmo sobre *S. epidermidis*.

## REFERÊNCIAS

AGATE, L.; BEAM, D.; BUCCI, C.; DUKASHIN, Y.; BEH, R.J.; O'BRIEN, K.; JUDE, B.A. *The search for violacin-producing microbes to combat Batrachochytrium dendrobatidis: A collaborative research Project between secondary school and college research students.* **Journal of Microbiology & Biology Education**, v.17, n.1, p. 70-73, Mar 2016.

AGUILA-ARCOS, S. *et al.* *A commensal strain of Staphylococcus epidermidis overexpresses membrane proteins associated with pathogenesis when grown in biofilms.* **J Membrane Biol.** v. 248, n. 3, p. 431-42, Apr 2015.

AIYEGORO, O.; AFOLAYAN, A.; OKOH, A. *In vitro antibacterial time kill studies of leaves extracts of Helichrysum longifolium.* **J Med Pl Res**, v.3, n.6, p. 462-467, 2009.

ALSHATWI, A.A.; SUBASH-BABU, P.; ANTONISAMY, P. *Violacein induces apoptosis in human breast cancer cells through up regulation of BAX, p53 and down regulation of MDM2.* **Experimental and Toxicology Pathology**, v. 68, n. 1, p. 89-97, 2016.

ANDRIGHETTI-FROHNER, C.R. *et al.* *Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by Chromobacterium violaceum.* **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 6, p. 843-848, Sept. 2003.

ANJU, S. *et al.* *Synergistic combination of violacein and azoles that leads to enhanced killing of major human pathogenic dermatophytic fungi Trichophyton rubrum.* **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v.5, n.57, 2015.

ANTÔNIO, R.V. **Biossíntese de violaceína por *Chromobacterium violaceum*: Síntese e atividades biológicas de um provável intermediário.** 1994. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas-Área Bioquímica) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

ANTONISAMY, P; IGNACIMUTHU, S. *Immunomodulatory, analgesic and antipyretic effects of violacein isolated from Chromobacterium violaceum.*

**Phytomedicine**, v. 17, n.3, p. 300-304, Mar 2010.

ANTONISAMY, P. *et al. Gastroprotective activity of violacein isolated from Chromobacterium violaceum on indomethacin-induced gastric lesions in rats: Investigation of potential mechanisms of action.* **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

ANTONISAMY, P; KANNAN, P.; IGNACIMUTHU, S. *Anti-diarrhoeal and ulcer-protective effects of violacein isolated from Chromobacterium violaceum in Wistar rats.* **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.23, n.4, p. 483-490, 2009.

AZEVEDO, M.M.M. **Sistemas poliméricos de liberação controlada utilizando micro e nanopartículas encapsulando violaceína: caracterização, atividade biológica, consequências e perspectivas.** 2005. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

BALLESTRIERO, F. *et al. Antinematode activity of violaceína and the role of the insulin/IGF-I pathway in controlling violaceína sensitivity in Caenorhabditis elegans.* **PLOS One**, v.9, n.10, 2015.

BALIBAR, C.J.; WALSH, C.T. *In vitro biosynthesis of violacein from L-tryptophan by the enzymes VioA-E from Chromobacterium violaceum.* **Biochemistry**. v.45, n. 51, p. 15444-15457, Dec 2006.

BAPTISTA, M.G.F.M. **Mecanismos de resistência aos antibióticos.** 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.

BARON, E. J. P., I.R.; FINEGOLD, S.M. . **Diagnostic Microbiology.** 9. Mosby, St., 1994.

BATISTA, A. H. M. **Atividade antimicrobiana e mecanismo de ação da violaceína sobre cepas de *Staphylococcus aureus* produtoras de biofilme**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

BECKER, M.H.; BRUCKER, R.M.; SCHWANTES, C.R.; HARRIS, R.N.; MINBIOLE, K.P.C. *The bacterially produced metabolite violacein is associate with survival of amphibians infected with a lethal fungus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.75, n.21, p.6635-6638, Nov. 2009.

BHOOMIBUNCHOO, C. *et al. Infectious endophthalmitis: review of 420 cases*. **Clinical Ophthalmology**, v. 7, p.247-252, 2013. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/profile/Yosanan\\_Yospaiboon/publication/235604046\\_Infectious\\_endophthalmitis\\_Review\\_of\\_420\\_cases/links/004635302c14c7f4e6000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Yosanan_Yospaiboon/publication/235604046_Infectious_endophthalmitis_Review_of_420_cases/links/004635302c14c7f4e6000000.pdf)>. Acesso em: 13/06/16

BOLES, B. R.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcal biofilm disassembly*. **Trends Microbiol**, v. 19, n. 9, p. 449-55, Sep 2011. ISSN 1878-4380 (Electronic) 0966-842X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21784640>>.

BONFANTI, J.W. **Efeitos de concentrações subinibitórias de vancomicina na formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT, C. *The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 20, p. 11660-5, Sep 30 2003. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14500782>>.

BROWN, K.L.; STEIN, A.; MORRELL, D.S. *Ecthyma gangrenosum and septic shock syndrome secondary to Chromobacterium violaceum*. **J Am Acad Dermatol.**, v.54, n.5, p. 224-8, 2006.

BURT, S. *Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods- a review*. **International journal of food microbiology**, v.94, n.3, p.223-25, 2004.

CASTRO, D.; CORDEIRO, I.B.; TAQUITA, P.; EBERLIN, M.N.; GARCIA, J.S.; SOUZA, G.H.M.F.; ARRUDA, M.A.Z.; ANDRADE, E.V.; FILHO, S.A.; CRAINEY, J.L.; LOZANO, L.L.; NOGUEIRA, P.A.; ORLANDI, P.P. *Proteomic analysis of Chromobacterium violaceum and its adaptability to stress*. **BMC Microbiology**, v.15, n.272, 2015.

CHESSA, D.; GANAU, G.; MAZZARELLO, V. *An overview of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus with a focus on developing countries*. **J Infect Dev Ctries**, v. 9, n. 6, p. 547-50, Jul 2015.

CHOI, S.Y. *et al. High-level production of violacein by the newly isolated Duganella violaceinigra str. NI28 and its impact on Staphylococcus aureus*. **Sci. Rep.**, v.5, 2015b.

CHOI, S.Y. *et al. Violacein: Properties and production of a versatile bacterial pigment*. **BioMed Research International**, v. 2015, article ID 465056, 8 p., 2015a.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. *Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections*. **Antibiotics in laboratory medicine**, v. 3, p. 739-787, 1991.

CLSI, C. A. L. S. I. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement*. CLSI M07-A8. . Wayne, PA: 2009.

COSTA, P.S.; NASCIMENTO, A.M.A.; LIMA-BITTENCOURT, C.L.; CHARTONE-SOUZA, E.; SANTOS, F.R.; VILAS-BOAS, A. *Chromobacterium sp. From the tropics: detection and diversity of phytase activity*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p.84-88, 2011.

CRECZYNSKI-PASA, T. B.; ANTONIO, R. V. *Energetic metabolism of Chromobacterium violaceum*. **Genet Mol Res**, v. 3, n. 1, p. 162-6, 2004. ISSN 1676-5680 (Electronic) 1676-5680 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15100996>>.

DUNNE, W.M.; MASON, E.O.; KAPLAN, S.L. *Diffusion of rifampin and vancomycin through a Staphylococcus epidermidis biofilm*. **Antimicrob. Agents Chemother.** V.37, n.12, p.2522-2526, 1993.

EL-FEKY, M.A.; EL-REHEWY, M.S.; HASSAN, M.A.; ABOLELLA, H.A.; ABDEI-BAKY, R.M.; GAD, G.F. *Effect of Ciprofloxacin and N-acetylcysteine on Bacterial Adherence and Biofilm Formation on Ureteral Stent Sufarces*. **Polish Journal of Microbiology**, v.58, n.3, p. 261-267, 2009.

EUCAST. *Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agentes by broth diluition*. **Clinical Microbiology Journal**, v. 9, n. 8m p. 1-7, 2003.

DANTAS, C. *et al. The violacein biosynthesis monitored by multi-wavelength fluorescence spectroscopy*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 11, p. 2054-2064, Nov 2012.

DURÁN, N. *et al. Violacein: properties and biological activities*. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 48, p. 127-133, Nov 2007.

FARINA, N. *et al. Staphylococcus coagulasa-negativa clinicamente significativos. Especies más frecuentes y factores de virulência*. **Rev Chilena Infectol**, v. 30, n. 5, p.480-488, 2013.

FAJARDO OLIVARES, M. *et al. Activity of vancomycin, ciprofloxacin, daptomycin, and linezolid against coagulase-negative staphylococci bacteremia*. **Rev Esp Quimioter**, v.24, n. 2, p.74-8, Jun 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21666998>>. Acesso em: 08/10/16.

FLORES-PÁEZ, L.A.; ZEMTENOS, J.C.; ALCÁNTAR-CURIEL, M.D.; VARGAS-MENDOZA, C.F.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, S.; CANCINO-DIAZ, M.E.; JAN-

ROBIERO, J.; CANCINO-DIAZ, J.C. *Molecular and phenotypic characterization of Staphylococcus epidermidis isolates from healthy conjunctiva and a comparative analysis with isolates from ocular infection*. **PLOS One**. V.10, n.8, p.1-13, Aug 2015.

FLUIT, A.C.; VISSER, M.R.; SCHMITZ, F.J. *Molecular detection of antimicrobial resistance*. **Clin Microbiol Rev.**, v.14, n.4, p. 836-871, 2001.

GABRIEL, J.E.; GUERRA-SLOMPO, E.P.; SOUZA, E.M.; CARVALHO, F.A.L.; MADEIRA, H.M.F.; VASCONCELOS, A.T.R. *Superoxide radical-generating compounds activate a predicted promoter site for paraquat-inducible genes of the Chromobacterium violaceum bacterium in a dose-dependent manner*. **Genetics and Molecular Research**, v.14, n.3, p.10139-10144, 2015.

GHOSH, R. *et al.* *Guava leaf extract inhibits Quorum-sensing and Chromobacterium violaceum induced lysis of human hepatoma cells: whole transcriptome analysis reveals differential gene expression*. **PLoS One**, v. 9, n. 9, Sep 2014.

GOMES, F.; LEITE, B.; TEIXEIRA, P.; AZEVEDO, J.; OLIVEIRA, R. *Farnesol in combination with N-acetylcysteine against Staphylococcus epidermidis planktonic and biofilm cells*. **Brazilian Journal of Microbiology**, p.235-242, 2012.

GUASTALI, E. A. L. Estudo dos fatores de virulência, sorogrupos, patogenicidade e susceptibilidade antimicrobiana das cepas de Escherichia coli isoladas de pintainhas de reposição de postura. 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2010.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**, v.33, n.3, p.667-679, 2010.

HASHIMI, S.M.; XU, T.; WEI, M.Q. *Violacein anticancer activity is enhanced under hypoxia*. **Oncology Reports**, v. 33, p. 1731-1736, 2015.



HERRERA, M.L.; CATARINELLA, G.; MORA, D.; OBANDO, C.; MOYA, T. *Chromobacterium violaceum*: Sensibilidade Antimicrobiana. **Revista Médica del Hospital Nacional de Niños**, v.40, n.1, p.5-8, 2005.

JAYARAMAN, P. *et al.* Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. **Int. J. Biol. Sci**, v.6, n.6, p.556-568, 2010.

KAMAEVA, A.A.; VASILCHENKO, A.S.; DERYABIN, D.G.; *Atomic Force Microscopy Reveals a Morphological Differentiation of Chromobacterium violaceum Cells Associated with Biofilm Development and Directed by N-Hexanoyl-L-Homoserine Lactone*. **PLOS One**, v.9, n. 8, Aug 2014.

KOU, Y. *et al.* Fatal false-negative transfusion infection involving a buffy coat platelet pool contaminated with biofilm- positive *Staphylococcus epidermidis*: a case report. *Transfusion*, v.55, n. 10, p. 2384-9, May 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25988568>>. Acesso em: 13/06/16.

KWIECIŃSKI, J.; EICK, S.; WÓJCIK, K. *Effects of tea tree (Melaleuca alternifolia) oil on Staphylococcus aureus in biofilms and stationary growth phase*. **International journal of antimicrobial agents**, v. 33, n. 4, p. 343-347, 2009.

LEAL, A.M.S.L. **Avaliação do caráter oxidante da violaceína**. 2011. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011.

LEAL, A.M.S. *et al.* *Violacein induces cell death by triggering mitochondrial membrane hyperpolarization in vitro*. **BMC Microbiology**, v.15, n.1, 2015.

LEITE, B.; GOMES, F.; TEIXEIRA, P.; SOUZA, C.; PIZZOLITTO, E.; OLIVEIRA, R. *In vitro* activity of daptomycin, linezolid and rifampicin on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Curr Microbiol**, v.63, p.313-317, 2011.

LEITE, B.; GOMES, F.; TEIXEIRA, P.; SOUZA, C.; PIZZOLITTO, E.; OLIVEIRA, R. *Combined effect of linezolid and N-acetylcysteine against Staphylococcus epidermidis biofilms*. **Enferm Infec Microbiol Clin**, v.31, n.10, p.655-659, 2013.

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**, v.48, p.445-458, 2001.

LIMA, B.A. **Análise dos mecanismos da atividade antimicrobiana da violaceína sobre *Staphylococcus aureus***. 2013. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

LIMA, A. L. L. M.; OLIVEIRA, P.R.D. Atualização em infecções em próteses articulares. **Rev Bras Ortop**, v.45, n. 6, p.520-3, 2010. Disponível em: <[http://www.rbo.org.br/PDF/45-6/atualizacao\\_em\\_infecoes.pdf](http://www.rbo.org.br/PDF/45-6/atualizacao_em_infecoes.pdf)>. Acesso em: 13/06/16.

LIN, Y.; MAJUMDAR, S.S.; HENNESSY, J.; BAIRD, R.W. *The spectrum of Chromobacterium violaceum infections from a single geographic location*. **Am J Trop Med Hyg**, v.94, n.4, p.710-716, Feb 2016.

LOPES, S.C.P. *et al.* *Violacein extracted from Chromobacterium violaceum inhibits Plasmodium growth in vitro and in vivo*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**; v. 53, n. 4, p.2149-2152, May 2009.

MARCONI, C. *et al.* *Usefulness of cateter tip cultura in the diagnosis of neonatal infections*. **J Pediatr**, v. 85, n. 1, p. 80-83, 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0021-75572009000100014&script=sci\\_arttext&tlng=es](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0021-75572009000100014&script=sci_arttext&tlng=es)>. Acesso em: 13/06/16.

MARTINS, D. *et al.* *Antitumoral activity of L-ascorbic acid-poly- D,L-(lactide-co-glycolide) nanoparticles containing violacein*. **Int J Nanomedicine**, v. 5, p. 77-85, 2010. ISSN 1178-2013 (Electronic)1176-9114 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20161989>>.

MARTINS JÚNIOR, D. **Atividade antimicrobiana da violaceína pura ou em nanoformulação**. 2009. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

MASUELLI, L. *et al.* *Violacein, an indole-derived purple-colored natural pigment produced by Janthinobacterium lividum, inhibits the growth of head and neck carcinoma cell lines both in vitro and in vivo*. **Tumour Biol.**, v. 37, n. 3, p. 3705-17, Mar 2016.

MEHTA, T.; VERGRUYSSSE, K.; JOHNSON, T.; EJIORFOR, A.O.; MYLES, E.; QUICK, Q.A. *Violacein induces p44/42 mitogen-activated protein kinase-mediated solid tumor cell death and inhibits cell migration*. **Molecular Medicine Reports**, v.12, p. 1443-1448, 2015.

MELO, P.S.; De AZEVEDO, M.M.; FRUNGILLO, L.; ANAZETTI, M.C.; MARCATO, P.D.; DURAN, N. *Nanocytotoxicity: violaceín and violacein-loaded poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles acting on human leukemic cells*. **J Biomed Nanotechnol**, v.5, n.2, p.192-201, Apr 2009.

MICHELIM, L. *et al.* *Pathogenicity factors and antimicrobial resistance of Staphylococcus epidermidis associated with nosocomial infections occurring in intensive care units*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 17-23, 2005.

MITIC-CULAFIC, D. *et al.* *Different DNA extraction methods for paraffin-embedded pathological samples*. **Iran J Pathol**, v.2, n.4, p. 159-164, 2007.

MOJIB, N. *et al.* *Antimycobacterial activity in vitro of pigments isolated from Antarctic bacteria*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 4, p. 531-540, Nov 2010.

MOLONEY, T.P.; PARK, J. *Microbiological isolates and antibiotic sensitivities in culture-proven endophthalmitis: a 15-year review*. **Br J Ophthalmol.**, v.98, n.11, p.1492-7, Nov. 2014.

MONTUFAR ANDRADE, F. E. *et al.* Bacteremia por *Staphylococcus* coagulase negativo com concentração inibitoria mínima para vancomicina  $\geq 2$ . **Infectio**, v. 20, n. 1, p. 3-8, March 2016.

NAMVAR, A.E. *et al.* *Clinical characteristics of Staphylococcus epidermidis: a systematic review.* **Hygiene and Infection Control**, v.9, n.3, Sep 2014.

NOSTRO, A, *et al.* *Susceptibility of Staphylococci to orégano essential oil, Carvacrol and Timol.* **FEMS Microbiology Letters**, Londres, v. 230, n. 2, p. 191-195, jan. 2004.

OCA-MEJÍA, M.M. *et al.* *Influence of quorum sensing in multiple phenotypes of the bacterial pathogen Chromobacterium violaceum.* **Pathog. Dis.**, v. 73, n. 2, p. 1-4, Mar 2015.

OLIVEIRA, C. G. **Regulação gênica da biossíntese de violaceína e Quorum sensing em Chromobacterium violaceum.** 2005. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

OLIVEIRA, M.M.C. **Estudo da suscetibilidade de Staphylococcus epidermidis a tratamento hiperbárico.** 2012. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica)-Universidade do Minho, Braga, 2012.

OTTO, M. *Staphylococcal biofilms.* **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 322, p. 207-28, 2008. ISSN 0070-217X (Print) 0070-217X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18453278> >.

OTTO, M. *Molecular basis of Staphylococcus epidermidis infections.* **Sem Immunopathol.** v. 34, n. 2, p. 201-214, March 2012.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis – the ‘accidental’ pathogen.* **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 555-67, Aug 2009.

PANT, N.D.; SHARMA, M. *Urinary tract infection caused by Chromobacterium violaceum.* **International Journal of General Medicine**, v.8, p.293-295, 2015.

PETTIT, R. K., *et al.* *Microplate alamar blue assay for Staphylococcus epidermidis biofilm susceptibility testing.* **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 2612–2617, 2005.

PINHEIRO, L. *et al.* Reduced susceptibility to vancomycin and biofilm formation in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* isolated from blood cultures. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 871-878, Nov 2014.

PLATT, D.; AMARA, S.; MEHTA, T.; VERCUYSSSE, K.; MYLES, E.L.; JOHNSON, T.; TIRIVEEDHI, V. *Violacein inhibits matrix metalloproteinase mediated CXCR4 expression: Potencial anti-tumor effect in cancer invasion and metastasis.* **Biochem Biophys Res Commun**, v.455, p.107-112, Dec 2014.

QUEIROZ, K.C.S.; MILANI, R.; RUELA-DE-SOUSA, R.R.; FUHLER, G.M.; JUSTO, G.Z.; ZAMBUZZI, W.F.; DURAN, N.; DIKS, S.H.; SPEK, C.A.; FERREIRA, C.V.; PEPPELENBOSCH, M.P. *Violacein induces death of resistant leukaemia cells via kinome reprogramming, endoplasmic reticulum stress and golgi apparatus collapse.* **PLOS One**, v.7, n.10, Oct 2012.

RETTORI, D.; DURÁN, N. *Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*.* **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 14, n. 5, p. 685-688, 1998.

RIGATTI, Fabiane *et al.* Bacteremias por *Staphylococcus* coagulase negativos oxacilina resistentes em um hospital escola na cidade de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba , v. 43, n. 6, p. 686-690, Dec. 2010 . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822010000600017&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822010000600017&lng=en&nrm=iso)>. access on 14 June 2016.

ROCHA, L.Q. **Interferência do óleo essencial do quimiotipo II de *Lippia alba* (MILL.) N.E. Brown na atividade antimicrobiana da oxacilina sobre *Staphylococcus aureus* oxacilina-resistente.** 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências

Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

ROMEIRO, R. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**: UFV Viçosa, 2007.

SAHAL, G.; BILKAY, I.S. *Multi drug resistance in biofilm forming clinical isolates of Staphylococcus epidermidis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 539-544, 2014.

SALABERRY, S. R. S. **Fatores de virulência de *Staphylococcus ssp.* e viabilidade celular na mastite subclínica de cabras**. 2014. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

SALES, G.W.P. **Avaliação da atividade antimicrobiana e do mecanismo de ação do óleo essencial extraído da casca de frutos da *Hymenaea courbail* L.** 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

SANTOS, A.V.; SILVA, A.A.O.; SOUSA, A.F.L.; CARVALHO, M.M.; CARVALHO, L.R.B.; MOURA, M.E.B. Perfil epidemiológico da sepse em um hospital de urgência. **REPIS**. P. 19-30, 2015.

SASIDHARAN, A. *et al.* *Antifungal activity of violacein purified from a novel strain of Chromobacterium sp. NIIST (MTCC 5522)*. **J. Microbiol.**, v.53, n.10, p.694-701, Oct 2015.

SHINODA, K. *et al.* *Biosynthesis of violacein: a genuine intermediate, protoviolaceinic acid, produced by VioABDE, and insight into VioC function*. **Chem. Commun. (Camb)**. v. 40, p. 140-142, Oct 2007.

SHIN, S.; LIM, S. *Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against Trichophyton spp.* **J Appl Microbiol**, v.97, n. 6, p. 1289-96, 2004.

SINGH, R.; RAY, P.; DAS, A.; SHARMA, M. *Penetration of antibiotics through Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms.* **J Antimicrob Chemother**, v.65, n.9, p.1955-8, Sep 2010.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* *A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation.* **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

SUBRAMANIAM S.; RAVI, V.; SIVASUBRAMANIAN, A. *Synergistic antimicrobial profiling of violacein with commercial antibiotics against pathogenic micro-organisms.* **Pharm. Biol.**, v.52, n. 1, p. 86-90, Jan 2014.

VERINAUD, L. *et al.* *Violacein treatment modulates acute and chronic inflammation through the suppression of cytokine production and induction of regulatory T cells.* **PLoS One**. v.10, n.5, May 2015.

WANG, X.; HINSHAW, K.C.; MACDONALD, S.J.; CHANDLER, J.R. *Draft genome sequence of Chromobacterium violaceum strain CV017.* **Genome Announcements**, v.4, n.2, 2016.