UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ANDRÉIA CRISTINA NAKASHIMA VAZ

Ação do ácido indol-3-acético sobre *Staphylococcus aureus*

Pirassununga
2012

Andréia Cristina Nakashima Vaz

Ação do ácido indol-3-acético sobre *Staphylococcus aureus*

(VERSÃO CORRIGIDA)

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientadora: Profa. Dra. Mariza Pires de Melo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

V393a

Vaz, Andréia Cristina Nakashima

Ação do ácido indol-3-acético sobre *Staphylococcus aureus* / Andréia Cristina Nakashima Vaz. --
Pirassununga, 2012.

137 f.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Ciências Básicas.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Mariza Pires de Melo.

1. Antioxidante 2. Biofilme 3. Intoxicação alimentar
4. Integridade de membrana 5. Meticilina 6. Virulência.
I. Título.

Hoje me sinto mais forte,

mais feliz quem sabe

Eu só levo a certeza de que

muito pouco eu sei, eu nada sei...

(Almir Sater e Renato Teixeira)

Dedico esta obra

À minha família, presente

em todos os momentos .

Ao Marcelo, por ser minha base forte

em todas as horas.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra. Maríza Pires de Melo, pela paciência,
compreensão e ensinamentos.

À Silvana Piccoli Pugine, pelo companheirismo e
ensinamentos.

À Márcia Ramos Monteiro da Silva, minha “amiga-irmã”,
pelo companheirismo.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Albuquerque, por ter aberto para
mim as portas desta nova etapa.

À Profa. Dra. Andréa Rentz Ribeiro, por ter iniciado meu
caminho na pesquisa.

Ao Prof. Dr. Marcelo Landim Brísola, pelo incentivo
frequente.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado a graça de viver... por ter me dado a força de lutar pelos meus desejos... por ter colocado pessoas tão especiais em minha vida ... por ter me dado oportunidades de viver e crescer!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo financiamento do projeto de pesquisa e incentivo à experimentação acadêmica.

À CAPES, pela bolsa de estudos.

À Profa. Dra. Mariza Pires de Melo, pela oportunidade de trabalhar com pessoas tão queridas.

Aos professores da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Heidge Fukumasu, pelos ensinamentos, apoio e, claro, pela paciência de ter que me aturar batendo repetidas vezes na porta de sua sala.

À Profa. Dra. Ana Maria Centola Vidal Martins e ao Prof. Dr. Adriano Bonfim Carregaro, pela compreensão.

À todos da secretaria de pós-graduação, em especial à Layla e à Conceição, pelo socorro nas horas de ansiedade.

À Silvana Piccoli Pugine, que tantas vezes me socorreu...é claro que, às vezes, para conseguir o socorro, era necessário pegar senha! (agora sou uma viciada em joguinhos por sua culpa!rsrsrs)

À Marcia Ramos Monteiro da Silva, por ter me ouvido tantas vezes...amiga, você é muito especial para mim! (Quando voltaremos à Ubatuba?...viagem inesquecível!rsrsrsrs)

À Luciane Tavares da Cunha, pela amizade e pelos “serviços didático-internéticos” a mim prestados. E como esquecer dos almoços (na mesa da professora....ops!)...tempinho bom!

Aos meus companheiros de laboratório, Luciane Tavares da Cunha, Eliane Maria Ferrarezzo, Patrícia Goldschmidt Lins, Juliana Lisboa Biotto Carvalho Bueno, Alessandra Aparecida da Silva, Romy Ueki, Roberto Ramos Monteiro da Silva. Cada dia um aprendizado. Aprendizado nem sempre de técnicas ou acadêmico mas muitas vezes, ensinamentos de vida!!

À Fabiana Bressan (Martini), pela grande ajuda com o citômetro.

À Silvia Serafin, pela amizade e ajuda no laboratório.

À Danielle Passareli, pela amizade e companheirismo. Amizade que começou no finzinho da tese e que espero não ter fim.

À Júlia Cristina Benassi, pela amizade e companheirismo no trabalho diário.

À estagiária Marluci Palazzolli da Silva, pelo trabalho e dedicação.

À estagiária Suellen Eugênio Mateus, pela competência e companheirismo que, mais do que uma simples pessoa para acompanhar o experimento, se tornou uma amiga a quem muito estimo.

À Pamela J. Montes Girao e Paulo, pela amizade (uiuiui!!!).

À Roberta S. S. Santana, pelas explicações sobre o funcionamento da faculdade e pela companhia nos almoços do RU.

Ao Margutti e Rafaela, pela companhia nos almoços do RU, amizade e incentivo à atividade esportiva.

À Ivete, pela ajuda doméstica e pelas “terapias”.

Aos amigos de pós-graduação, pelos bons momentos.

Aos membros que compõem a banca, titulares e/ou suplentes, pela disposição e ensinamentos a mim dirigidos.

Aos funcionários do ZAB, pelos serviços prestados.

Às meninas da limpeza, por mudarem os horários de faxina nos dias de experimentos.

Ao Marcelo Landim Brisola, meu maior incentivador. Aquele que me apóia em tudo que faço... que me faz olhar longe... que me faz olhar para mim!

À todos que, de alguma forma, contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Agradeço à todos!!!

Há um tempo, não muito distante, isto era apenas um sonho...

Muito Obrigada!

O tempo passa muito rápido!

Num instante, estamos correndo feito doídos!

São experimentos que não dão certo... energia elétrica que acaba quando não deve... carrinho de espectrofotômetro que quebra bem nas últimas análises... reagente que acaba (e eu só precisava de

5 μ L!)...e a bactéria? Essa é realmente sem noção!!!

Tudo bem.

O tempo passa muito rápido!

Num instante, estamos juntos!

São lanches repartidos... terapias (em grupo ou individuais)...festinhas de aniversário (de regime ou não)...fofocas...piadas...risadas...choro...expectativas...

conselhos...apoio...amizade!

Realmente o tempo passa muito rápido.

Que bom, que posso levar comigo a lembrança desta experiência tão

boa de ter convívio com vocês!

Obrigada à todos do Laboratório de Química Biológica e afins!!

RESUMO

VAZ, A. C. N. **Ação do ácido indol-3-acético sobre *Staphylococcus aureus*** [Action of acid indole-3-acetic acid on *Staphylococcus aureus*]. 2012. 137 f.

Tese (Doutorado em Zootecnia – Qualidade e Produtividade Animal) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

O objetivo foi avaliar a ação do ácido indol-3-acético (AIA) na ausência e presença da peroxidase de raiz forte (HRP) sobre a viabilidade de cepas certificadas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (produtora de biofilme), ATCC 14458 (portadora do gene *seb*), ATCC 43300 (portadora do gene *mecA*) e ATCC 29213 (controle). Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) e, após, escolheu-se uma concentração subinibitória para avaliar a capacidade de formação de biofilme, atividade de enzimas antioxidantes, integridade de DNA, integridade de membrana para todas as cepas e avaliação da expressão do gene *seb* da cepa ATCC 14458. A CIM observada foi de 40 mM de AIA para cepa ATCC 6538, 60 mM para ATCC 43300, 50 mM para ATCC 14458 e ATCC 29213. No entanto, houve diferença significativa ($P < 0,05$), na presença de HRP, somente para as cepas ATCC 14458 e 43300. A concentração subinibitória de AIA utilizada foi de 30 mM para ATCC 6538 e ATCC 14458, e de 40 mM para ATCC 43300 e ATCC 29213. A capacidade de formação de biofilme pelo *S. aureus* (biofilme positivo) não foi alterada pela presença de AIA ou AIA/HRP. A atividade específica de catalase e superóxido dismutase foi aumentada pela ação de AIA/HRP ($P < 0,05$) para todas as cepas, porém, não houve diferença ($P > 0,05$) entre AIA e AIA/HRP. O DNA manteve-se íntegro, porém, houve diminuição na integridade de membrana ($P < 0,05$) para todas as cepas cultivadas na concentração subinibitória de AIA, sendo este efeito potencializado na presença de HRP somente para ATCC 43300. Houve redução na expressão do gene *seb* da cepa ATCC 14458 ($P < 0,05$). Conclui-se que o AIA, associado à HRP apresenta efeito bacteriostático em cepas de *Staphylococcus aureus* portadoras de diferentes fatores de virulência.

Palavras-chaves: antioxidante; biofilme; intoxicação alimentar; integridade de membrana; metilicina; virulência;

ABSTRACT

VAZ, A. C. N. **Action of acid indole-3-acetic acid on *Staphylococcus aureus*** [Ação do ácido indol-3-acético sobre *Staphylococcus aureus*]. 2012. 137 f.

Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

The objective was to evaluate the action of indole-3-acetic acid (IAA) in the absence and presence of horseradish peroxidase (HRP) on the viability of certified strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (producer of biofilm), ATCC 14458 (carrying the *seb* gene), ATCC 43300 (carrying the *mecA* gene) and ATCC 29213 (control). Concentration was determined minimum inhibitory (CIM) and, after, we chose a concentration subinibitória to assess the ability of biofilm formation, activity of antioxidant enzymes, integrity DNA, membrane integrity for all strains and evaluation of gene expression *seb* of strain ATCC 14458. The MIC for the strains ATCC 6538 was 40 mM IAA, for the strains ATCC 14458 and 29213 was 50 mM and for the strain ATCC 43300 was 60 mM IAA, however, significant differences ($P < 0.05$) compared to the addition of HRP to the culture medium, was found only for the doses of MIC of the strains ATCC 14458 and 43300. The concentration subinibitória IAA used was 30 mM for ATCC 6538 and ATCC 14458, and 40 mM to ATCC 43300 and ATCC 29213. The ability of biofilm formation by *S. aureus* (biofilm-positive) was not altered by the presence of IAA or IAA/HRP in the culture medium. The activity of catalase and superoxide dismutase was influenced by the action of IAA and IAA/HRP ($P < 0.05$), but there was no difference ($P \geq 0.05$) between IAA and IAA/HRP. The DNA remained intact, however, there were changes ($P < 0.05$) in the membrane integrity of microorganisms to sub-inhibitory concentrations of IAA and IAA/HRP, as well as the expression of the *seb* gene was lower ($P < 0.05$) in microorganisms treated with IAA and IAA/HRP. It is concluded that the IAA has bacteriostatic effect on *S. aureus* carrying different virulence factors.

Key-words: antioxidante; biofilm; food poisoning; membrane integrity; methicilin; virulence.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA.....	ácido indol-3-acético
HRP	horsedish peroxidase (peroxidase de raiz forte)
BHI.....	brain heart-infusion (caldo cérebro-coração)
TSB.....	tryptone soya broth (caldo triptona de soja)
PBS.....	phosphate buffered saline (tampão fosfato salina)
NBT	<i>Nitro Blue Tetrazolium</i>
EDTHA.....	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
PI	propidium iodide (iodeto de propídio)
ATCC	American Type Culture Collection
DNA	deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)
RNA	ribonucleic acid (ácido ribonucléico)
EROs	espécies reativas de oxigênio
CAT	catalase
SOD	superóxido dismutase
GSH-Rd	glutathiona redutase
GSH-Px.....	glutathiona peroxidase
GSH.....	glutathiona reduzida
PEN	penicilina
OX	oxacilina
MET	metecilina
AMP	ampicilina
CFO	cefoxitina
GEN.....	gentamicina

CIM	Concentração Inibitória Mínima
D.O.	densidade óptica
mM	milimolar
nm.....	nanomolar
μM.....	micromolar
μL	microlitro
μg	micrograma
mL	mililitro
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
p/v.....	peso/volume
UI	unidades internacionais
UV/VIS.....	ultravioleta/visível
pb.....	pares de bases
CCS	contagem de células somáticas
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema com modos e sítios de ação de antibacterianos (adaptado de QUINN et al., 2005).	30
Figura 2	Esfregaços utilizando cepas de <i>S. aureus</i> realizados em lâminas de microscopia e corados pelo método de Gram. Aparecimento de cocos corados em roxo em forma de “cachos de uva”. (1000x).	31
Figura 3	Caracterização de <i>S. aureus</i> . (A) crescimento de colônias típicas de <i>S. aureus</i> em Agar Baird Parker. (B) fermentação de manitol (1. Agar manitol fermentado e 2. Agar manitol). (C) presença da catalase. (D) presença da termonuclease. (E) produção de coagulase. (F) presença do fator clumping. (G) produção de acetoina.	34
Figura 4	Formação de biofilme em Agar Congo Red. (1) Colônias negras são positivas para a produção de biofilme. (2) Colônias vermelhas não são produtoras de biofilme	37
Figura 5	Síntese de AIA à partir do aminoácido triptofano (adaptado de MARCHIORO, 2005; KAI ET AL., 2007).	44
Figura 6	Esquemas químicos de auxinas naturais e sintéticas (adaptado de MARCHIORO, 2005).	45
Figura 7	Representação esquemática do grupamento heme de peroxidase de raiz forte (Adaptado de Veitch, 2004)	46
Figura 8	Ilustração inicial da planta de raiz forte, de 1633 (<i>Herball, ou historie generall de plantas, de Gerard</i>) (Adaptado de Veitch, 2004).....	47
Figura 9	Ciclo catalítico da HRP, dependente de peróxido de hidrogênio. (adaptado de CUNHA, 2010).	48
Figura 10	Radicais livres formados pela oxidação do AIA (Adaptado de Folkes e Wardman, 2001)	50

Figura 11	Esquema de redução do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O_2) e conseqüente formação de espécies reativas de O_2 (Adaptado de Ferreira e Matsubara, 1997).....	52
Figura 12	Radicais formados a partir do oxigênio (Adaptado de Resende et al., 2003). .	53
Figura 13	Reação de fenton e de Haber-Weiss (Adaptado de ferreira e Matsubara, 1997)	54
Figura 14	Esquema da atuação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase (Adaptado de Rover Jr. et al., 2001).....	55
Figura 15	Equipamentos utilizados no experimento. (A) Shaker TE-420 (Tecnal) e (B) Centrífuga CT- 5000 (Cientec).....	61
Figura 16	Placa para determinação de CIM.....	65
Figura 17	Placa para determinação de CIM, com adição de resazurina.....	66
Figura 18	Placa após incubação por 18 horas, à 37°C.....	67
Figura 19	Espectrofotômetro Beckman Coulter DU-800 (UV/VIS).....	68
Figura 20	Estrutura química do corante <i>Propidium Iodide</i> (PI). Adaptado de STRAÜBER; MÜLLER, 2010.....	75
Figura 21	Avaliação visual da capacidade de formação de biofilme pelas cepas de <i>S. aureus</i> incubadas e expostas ao corante cristal violeta. Linhas de A-D e de E-H representam as repetições de dois cultivos diferentes da mesma cepa. Colunas: 1-2 cepa ATCC 12228; 3-4 cepa ATCC 6538; 5-6 cepa ATCC 14458; 7-8 cepa ATCC 29213; 8-10 cepa ATCC 25923; 11-12 cepa ATCC 43300	81
Figura 22	Placas de petri com meio ágar Muller-Hinton, 24 horas após a incubação com os discos de antibióticos. Penicilina (PEN, 10 µg), oxacilina (OX, 1 µg), cefoxitina (CFO, 30 µg), ampicilina (AMP, 10 µg), gentamicina (1GEN, 10 µg), metilicina (MET, 5 µg).....	83
Figura 23	Determinação da concentração mínima inibitória com a utilização da solução indicadora resazurina em meio TSB na presença de: AIA 70 mM + HRP 1 uM (A1);	

AIA 70 mM (**A2**); HRP 1 uM (**A3**); *S. aureus* (**A4**); *S. aureus* + gentamicina 9,4 µg/mL (**A5**); *S. aureus* + HRP 1 uM (**A6**); *S. aureus*, a partir da linha B, na ausência (colunas ímpares) ou presença (colunas pares) de HRP 1 uM contendo AIA 0,5 mM (**B1 e B2**), 4 mM (**B3 e B4**), 10 mM (**B5 e B6**), 20 mM (**C1 e C2**), 30 mM (**C3 e C4**), 40 mM (**C5 e C6**), 50 mM (**D1 e D2**), 60 mM (**D3 e D4**) e 70 mM (**D5 e D6**). Seta indica CIM para o AIA na ausência de HRP..... 88

Figura 24 Ação de AIA na ausência e presença de HRP 1µM sobre as unidades formadoras de colônias, em meio líquido por 24 horas, de *S. aureus* biofilme positivo (ATCC 6538), gene *tst* positivo (ATCC 14458), gene *mecA* positivo (43300) e para a cepa ATCC 29213 (biofilme negativo, *tst* negativo e oxacilina/gentamicina/meticilina negativo). Valores expressos como média ± erro padrão. (n=8)..... 92

Figura 25 - Ação de AIA e AIA/HRP sobre a capacidade de formação de biofilme pela cepa *S. aureus* ATCC 6538 (biofilme positivo) após incubação por 24 horas, seguida da exposição do microrganismo ao cristal violeta. Coluna: **1**- meio de cultura (TSB); **2**- cepa ATCC 12228 (controle negativo); **3-7**- cepa ATCC 6538 sendo **3**- controle (ausência de AIA ou AIA/HRP), **4**- AIA 30 mM, **5**- AIA 30 mM/HRP 1 µM, **6**- AIA 40 mM, **7**- AIA 40 mM/HRP 1 µM ; **8-12**- cepa ATCC 29213 sendo **8**- controle (ausência de AIA ou HRP), **9**- AIA 30 mM, **10**- AIA 30 mM/HRP 1 µM, **11**- AIA 40mM, **12**- AIA 40mM/HRP 1µM. Linhas de **A-D** e de **E-H** representam as repetições de dois cultivos diferentes da mesma cepa (ou ensaio)..... 99

Figura 26 Ação do sistema AIA/HRP na integridade do DNA de *S. aureus* após 24 horas de incubação em TSB: **(a)** Padrão DNA 100 pares de base (pb); **(b)** *S. aureus* (6538) após incubação em TSB; **(c)** *S. aureus* (6538) após incubação na presença de AIA 30 mM; **(d)** *S. aureus* (6538) após a incubação na presença de AIA 30 mM e HRP 1 µM; **(e)** *S. aureus* (6538) após incubação na presença de AIA 40 mM; **(f)** *S. aureus* (6538) após a incubação na presença de AIA 40 mM e HRP 1 µM ; **(g)** *S. aureus* (14458) após incubação em TSB; **(h)** *S. aureus* (14458) após incubação na presença de AIA 40 mM; **(i)** *S. aureus* (14458) após a incubação na presença de AIA 40 mM e HRP 1 µM; **(j)** *S. aureus* (14458) após incubação na presença de AIA 50 mM; **(l)**

S. aureus (14458) após a incubação na presença de AIA 50 mM e HRP 1 μ M 106

Figura 27 Ação do sistema AIA/HRP na integridade do DNA de *S. aureus* após 24 horas de incubação em TSB: **(a)** Padrão DNA 100 pares de base (pb); **(b)** *S. aureus* (43300) após incubação em TSB; **(c)** *S. aureus* (43300) após incubação na presença de AIA 40 mM; **(d)** *S. aureus* (43300) após a incubação na presença de AIA 40 mM e HRP 1 μ M; **(e)** *S. aureus* (43300) após incubação na presença de AIA 50 mM; **(f)** *S. aureus* (43300) após a incubação na presença de AIA 50 mM e HRP 1 μ M ; **(g)** *S. aureus* (29213) após incubação em TSB; **(h)** *S. aureus* (29213) após incubação na presença de AIA 40 mM; **(i)** *S. aureus* (29213) após a incubação na presença de AIA 40 mM e HRP 1 μ M; **(j)** *S. aureus* (29213) após incubação na presença de AIA 50 mM; **(l)** *S. aureus* (29213) após a incubação na presença de AIA 50 mM e HRP 1 μ M..... 107

Figura 28 Integridade de membrana por citometria de fluxo. Os dados estão apresentados com porcentagem (%) de eventos $\pm$ erro padrão. Médias, com letras diferentes, no mesmo gráfico, apresentam diferença significativa ($P \leq 0,05$). (n=8)..... 110

Figura 29 Extração do RNA total de *S.aureus* ATCC 14458 para análise da expressão da toxina SEB: **(a)** Padrão de RNA, **(b)** *S. aureus* após incubação em TSB, **(c)** *S. aureus* após incubação com AIA 30 mM e HRP 1 μ M. 111

Figura 30 Corrida em gel de agarose 1%, após análise de PCR-real time. **(a)** Padrão de RNA, **(b)** gene *gyrB* de *S. aureus* (ATCC 14458, controle), **(c)** gene *seb* de *S. aureus* (ATCC 14458)..... 112

Figura 31 Expressão do gene *seb* 113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentração subinibitória utilizada nas respectivas cepas bacterianas.....	69
Tabela 2	<i>Primers</i> utilizados no estudo	78
Tabela 3	Quantificação de biofilme das cepas certificadas.....	82
Tabela 4	Antibiograma baseado no diâmetro do halo de difusão do disco de penicilina (PEN), oxacilina (OX), cefoxitina (CFO), ampicilina (AMP), gentamicina (GEN), metilicina (MET) na placa de petri contendo ágar Muller-Hinton após 24 horas de incubação das cepas de <i>S. aureus</i>	84
Tabela 5	Cepas utilizadas no estudo e seus respectivos fatores de virulência	86
Tabela 6	Porcentagem de inibição	91
Tabela 7	Concentrações de AIA e AIA/HRP (MIC).	93
Tabela 8	Valores de densidade óptica (D.O.) utilizados para determinação do MIC....	95
Tabela 9	Concentrações subinibitórias utilizadas nos testes após a determinação de CIM para as cepas estudadas.....	97
Tabela 10	Quantificação de biofilme da cepa ATCC 6538 e ATCC 29213	99
Tabela 11	Ação de AIA na ausência e presença de HRP 1 μ M sobre a atividade da catalase de <i>S. aureus</i> , avaliada após incubação por 24 horas	102
Tabela 12	Ação de AIA na ausência e presença de HRP 1 μ M sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) de <i>S. aureus</i> , avaliada após incubação por 24 horas.	103

SUMÁRIO

	RESUMO	xi
	ABSTRACT	xii
	LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
	LISTA DE FIGURAS.....	xv
	LISTA DE TABELAS	xix
1	INTRODUÇÃO.....	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	MASTITE BOVINA INFECCIOSA	27
2.1.1	Tratamento da mastite infecciosa	29
2.2	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	31
2.2.1	Fatores de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i>	35
2.2.1.1	Produção de biofilme	35
2.2.1.2	Presença do gene <i>mecA</i>	38

2.2.1.2	Presença do gene <i>seb</i>	40
2.3	ÁCIDO INDOL- 3-ACÉTICO (AIA).....	42
2.4	PEROXIDASE DE RAIZ FORTE (HRP)	46
2.5	SISTEMA AIA/HRP	49
2.6	ESPÉCIES REATIVAS DE ÓXIGÊNIO (ERO).....	51
3	OBJETIVOS	56
3.1	OBJETIVO GERAL	56
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
4	FLUXOGRAMA DE TRABALHO	57
5	MATERIAL E MÉTODOS	58
5.1	REAGENTES E MEIOS DE CULTURA	58
5.1.1	Preparo de AIA	58
5.1.2	Preparo de HRP	59
5.2	MICROORGANISMOS CERTIFICADOS	59
5.2.1	Criopreservação dos microrganismos	60
5.2.2	Cultivo dos microrganismos	61
5.3	ANÁLISES REALIZADAS COM OS MICRORGANISMOS.....	62

5.3.1	Determinação quantitativa da formação biofilme	62
5.3.2	Teste de sensibilidade a antimicrobianos (antibiograma)	63
5.4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE AIA, NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE HRP	64
5.4.1	Determinação da CIM de AIA com a utilização do corante resazurina	64
5.4.2	Determinação da CIM de AIA com a utilização de espectrofotômetro	66
5.5	ANÁLISES REALIZADAS COM OS MICRORGANISMOS CERTIFICADOS APÓS A INCUBAÇÃO COM AS CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE AIA	68
5.5.1	Determinação quantitativa da formação de biofilme	69
5.5.2	Atividade das enzimas antioxidantes produzidas pelos microrganismos	70
5.5.2.1	Extração das enzimas antioxidantes	70
5.5.2.2	Atividade específica da enzima catalase (CAT).....	71
5.5.2.3	Atividade específica da enzima superóxido dismutase (SOD)	71
5.5.2.4	Determinação de proteínas totais.....	72
5.5.3	Integridade de DNA	73
5.5.3.1	Preparo das amostras.....	73
5.5.3.2	Extração do DNA	74
5.5.3.3	Corrida eletroforética em gel de agarose 1%	74
5.5.4	Integridade de membrana por citometria de fluxo	74

5.5.5	Expressão do gene <i>seb</i>	76
5.5.5.1	Preparo das amostras.....	76
5.5.5.2	Extração do RNA total.....	76
5.5.5.3	Análise da expressão da toxina SEB.....	77
5.5.5.4	Obtenção do DNAc.....	78
5.5.5.5	Quantificação do gene <i>seb</i> através do PCR-real time.....	79
5.6	ANÁLISE DOS RESULTADOS	79
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
6.1	ANÁLISES REALIZADAS COM OS MICRORGANISMOS CERTIFICADOS	80
6.1.1	Determinação quantitativa da formação de biofilme	80
6.1.2	Teste de sensibilidade a antimicrobianos (antibiograma)	82
6.1.3	Determinação de CIM de AIA com a utilização do corante resazurina	86
6.1.4	Determinação de CIM de AIA com a utilização de espectrofotômetro	89
6.2	ANÁLISES REALIZADAS COM OS MICRORGANISMOS CERTIFICADOS APÓS A INCUBAÇÃO COM AS CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE AIA	96
6.2.1	Determinação quantitativa da formação de biofilme	98
6.2.2	Atividade das enzimas antioxidantes produzidas pelos microrganismos	100

6.2.3	Integridade de DNA.....	105
6.2.4	Integridade de membrana por citometria de fluxo.....	107
6.2.5	Expressão do gene <i>seb</i>.....	111
7	CONCLUSÕES.....	115
8	REFERÊNCIAS.....	116

1 INTRODUÇÃO

A contínua resistência dos microrganismos, tanto aos antibióticos convencionais quanto àqueles das novas classes, evidencia a necessidade de desenvolver-se novas estratégias terapêuticas (PINTO et al., 2001; BEZERRA et al., 2009), sendo o AIA (ácido indol-3-acético), associado ou não à HRP (peroxidase de raiz forte), uma possível alternativa.

Recente estudo mostrou a eficiência do AIA na concentração de 1 mM, combinado com a peroxidase de raiz forte 1 μ M, ao inibir o crescimento e multiplicação (*in vitro*) de *S. aureus* (PUGINE, 2008). Neste estudo, observou-se que o sistema AIA/HRP inibe a formação de colônias e reduz drasticamente a integridade e polaridade da membrana celular de *S. aureus* recuperados de bovinos portadores de mastite clínica.

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é um importante patógeno causador de uma ampla variedade de enfermidades como a mastite bovina. A prevalência de múltiplas classes de resistência aos antibióticos tem complicado os tratamentos, além de aumentar a morbidez e a mortalidade associada com patologias *estafilocócicas* (BOZDOGAN e APPELBAUM, 2004; MEKA et al., 2004). Dentre os fatores de virulência apresentados pelo *S. aureus*, podemos destacar: a produção de biofilme, a produção da toxina SEB e a presença do gene *mecA*.

A produção de biofilme pode ser responsável pela persistência de infecções bacterianas, aumento na aderência do microrganismo e proteção contra as substâncias antimicrobianas (BECKER et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2007). A produção da toxina SEB, está envolvida em processos de intoxicação alimentar (HRSTKA et al., 2006) e a presença do gene *mecA*, é responsável pela resistência intrínseca a antimicrobianos β -lactâmicos (penicilinas) em amostras de *S. aureus* (COELHO et al., 2007b). Este gene é codificador de

uma proteína de baixa afinidade a estes antimicrobianos, a PBP2a. Existe a possibilidade de transmissão zoonótica de cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes à oxacilina, indicando a necessidade de monitorar os perfis de isolamento e suscetibilidade aos antimicrobianos na prática veterinária (SOARES et al., 2008; KOHNER et al., 2006).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MASTITE BOVINA INFECCIOSA

A mastite bovina infecciosa é uma doença causada pela infecção no úbere das vacas que contamina o leite produzido, afetando, além da sua qualidade, a produção de gordura e a duração da lactação. Também pode ocasionar o descarte precoce de vacas (PEREIRA et al., 2001a; MAGALHÃES et al., 2006). É considerada a principal doença que afeta os rebanhos leiteiros no Brasil, levando ao aumento dos gastos com veterinários e medicamentos, elevando os custos de produção (PINTO et al., 2001; COELHO et al., 2007).

Ela pode ser dividida em dois tipos: clínica, quando o animal apresenta sinais da enfermidade (como inchaço das glândulas mamárias ou presença de grumos no leite); e/ou subclínica, quando o animal não apresenta nenhum sintoma, mas ocorre queda da produção de leite, e a doença é detectada por testes específicos (PEREIRA et al., 2001a; PASCHOAL et al., 2003). Uma das formas mais eficazes de diagnosticar a mastite subclínica é a contagem de células somáticas (CCS). Esta pode ser uma medida do padrão de qualidade e um indicativo da perda da produção pois está relacionada com a composição, rendimento industrial e segurança alimentar deste alimento (BUENO et al., 2005). Células somáticas são, na maioria, leucócitos do organismo da vaca presentes no leite ou, ainda, células secretoras descamadas (PEREIRA et al., 2001a; SPEXOTO et al., 2005; MAGALHÃES et al., 2006). Esta contagem é, normalmente, inferior a 300.000 células/mL de leite, porém, quando o úbere está infectado, esta contagem passa a ser bem maior (PASCHOAL et al., 2003).

A mastite é considerada um dos principais problemas de ordem infecciosa de bovinos produtores de leite (STAMFORD et al., 2006) sendo causada por inúmeros microrganismos como bactérias, fungos, vírus e algas (WATTS, 1988; COSTA et al., 1993; CULLOR et al., 1993; CUNHA et al., 2010), mas os *S. aureus* são os agentes etiológicos mais isolados em vários países do mundo, sendo que sua difícil redução está associada com sua capacidade de sobreviver em células de tecido bovino (HÉBERT et al., 2000; VASUDEVAN et al., 2003; SÁ et al., 2004; NADER FILHO et al., 2007). Segundo Peixoto et al. (2010), o principal patógeno envolvido nos casos de mastite subclínica em rebanhos ovinos e caprinos do sertão da Bahia e Pernambuco é o *Staphylococcus* spp., sendo que a maior frequência é de *S. aureus*.

Os principais sítios de localização destes microrganismos são o úbere e tetos e as principais vias de transmissão são os bocais da ordenhadeira e as mãos dos ordenhadores (FERREIRA et al., 2006). Após penetrar a glândula mamária através do canal do teto e adaptar-se ao ambiente do úbere, o *S. aureus* pode multiplicar-se rapidamente e iniciar uma reação inflamatória que resulta em danos ao tecido (HÉBERT et al., 2000) sendo que, a presença destes microrganismos, em amostras de leite, merece atenção no que diz respeito à saúde pública (FREITAS et al., 2008), devido ao risco potencial de transmissão de patógenos ao homem, seja pelo leite ou derivados (STAMFORD et al., 2006), levando à intoxicações alimentares causadas pela ingestão de toxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação.

A prevenção de mastite bovina e a produção de leite de alta qualidade são estratégias que favorecem o desenvolvimento de propostas que atendam à demanda do consumidor (NAGAHATA et al., 2007). Diante destas afirmativas, fica clara a necessidade de implantação de um controle higiênico-sanitário do leite para consumo humano durante as

etapas de produção, industrialização e comercialização, contribuindo para a diminuição dos focos contaminantes.

2.1.1 Tratamento da mastite infecciosa

O método de controle da mastite infecciosa é, basicamente, a prevenção de novas infecções. Uma das maneiras de prevenir estas infecções é a adoção de medidas higiênico-sanitárias, porém, novas infecções podem ocorrer. Nestes casos, é utilizado o descarte dos animais ou a antibioticoterapia (Figura 1). O uso de antibióticos exerce um importante papel na possibilidade de redução das infecções intramamárias e a consequente eliminação das prováveis fontes de infecção (PINTO et al., 2001 e NADER FILHO et al., 2007). O uso de agentes antimicrobianos na medicina veterinária e na produção de animais de corte, podem levar a uma resistência aos antimicrobianos em humanos e animais (BOZDOGAN e APPELBAUM, 2004; MEKA et al., 2004; VAUTOR et al., 2007). Além disto, os resíduos destas drogas podem interferir em processos de fermentação na indústria do leite (DIAZ et al., 2010), além de representar riscos à saúde do consumidor (PINTO et al., 2001).

A utilização de determinado antimicrobiano, assim como a escolha correta, depende de testes de susceptibilidade pois o uso inadequado de antibióticos propicia o aparecimento de cepas multi-resistentes, comprometendo a eficiência de tratamentos e, na mastite bovina, muitas vezes, interfere na produção de derivados do leite (PINTO et al., 2001; BERNARDO et al., 2004 e DIAZ et al., 2010). A indicação terapêutica também deve estar baseada nos valores obtidos por testes de concentração inibitória mínima (CIM), de cada antibiótico, pois a

dosagem do medicamento, no local da infecção, deve ser maior que a CIM do mesmo (BRITO et al., 2001).

Figura 1 Esquema com modos e sítios de ação de antibacterianos (adaptado de Quinn et al., 2005).

A dificuldade de obtenção de dados confiáveis de antibiograma para isolados de campo, torna difícil a escolha de um agente antimicrobiano eficaz. Portanto, em condições reais, as terapias antimicrobianas são ineficazes, resultando em inúmeros tratamentos que não levam à cura de mastites bovinas (MELCHIOR et al., 2007). Com isso, observa-se a

necessidade de realização periódica de testes *in vitro* para detectar as variações de sensibilidade e resistência de *S. aureus* e, conseqüentemente, o desenvolvimento de uma intervenção terapêutica confiável, que terá implicações importantes para a economia leiteira através dos programas de controle da mastite bovina causada pelo *Staphylococcus* spp., assim como para o bem-estar animal (MEDEIROS et al., 2009).

2.2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

O gênero *Staphylococcus* caracteriza-se por microrganismos gram-positivos, imóveis e de formato esférico, com cerca de 1 µm de diâmetro (Figura 2). Apresenta-se em cachos, isolados, aos pares, tétrades ou cadeias (BROOKS et al., 2009).

Figura 2 Esfregaço de *S. aureus*, corado pelo método de Gram. Aparecimento de cocos corados em roxo em forma de “cachos de uva”. (1000x).

Este microrganismo está amplamente distribuído, podendo viver em uma grande variedade de ambientes (RODE et al., 2007) sendo encontrado como comensais na pele de animais e de humanos, assim como em membranas mucosas da trato respiratório e urogenital (QUINN et al., 2005).

Este gênero de bactérias é composto por diversas espécies e subespécies, sendo a espécie *S. aureus* a mais comumente relacionada com enfermidades, no mundo, que acometem humanos e animais, podendo causar infecções cutâneas, oportunistas e, até mesmo, fatais (NEVES et al., 2007). São bactérias mesófilas, apresentando temperatura de crescimento na faixa de 7° C a 48° C, com pH de 4 a 9, sendo ótimo entre 6 e 7 (FRANCO e LANDGRAF, 2003; JAY, 1996). Produz enterotoxinas entre 10°C e 46°C, com temperatura ótima entre 40°C e 45°C. Possuem parede celular espessa, composta por glicopeptídeos teicóicos e proteína A, que dificultam sua lise (FRANCO e LANDGRAF, 2003).

A identificação de *S. aureus*, em laboratório, é realizada através do método de coloração de Gram (Figura 2) e observação de características específicas de crescimento (REISCHL et al., 2000) em ágar Baird Parker, enriquecido com gema de ovo e telurito de potássio (Figura 3A), assim como a fermentação de ágar Manitol (Figura 3B) (DOWNES e ITO, 2001; SILVA et al., 2001). Estes métodos devem ser seguidos por provas bioquímicas (LACHICA et al., 1971; SPERBER e TATINI, 1975; MAC FADDIN, 1980; BARROW e FELTHAM, 1995), conforme descrito a seguir:

1. Atividade da Catalase (Figura 3G): A presença da catalase é caracterizada pela formação de bolhas na presença do peróxido de hidrogênio. As bolhas ocorrem durante a liberação de oxigênio ocorrida na degradação do peróxido de hidrogênio pela catalase presente no microrganismo (MAC FADDIN, 1980).

2. Presença da Coagulase (figura 3D): A coagulase presente nos *S. aureus*, coagula o plasma e contribui para a formação das paredes de fibrina ao redor das lesões estafilocócicas, ajudando na persistência destes microrganismos e proteção contra a fagocitose (TRABULSI E ALTERTHUM, 2008; BROOKS et al., 2009). É caracterizada pela formação de coágulos, durante um período de 24 horas, e detecta a coagulase livre, que é secretada pelo microrganismo para o plasma (QUINN et al., 2005).

3. Fator *Clumping* (Figura 3F): A formação de coágulos, em um curto espaço de tempo (aproximadamente, duas horas) evidencia a presença de uma coagulase ligada ou fator *clumping* (fator de aglutinação) na superfície da bactéria (QUINN et al, 2005).

4. Termonuclease (Figura 3C): É caracterizada pela formação de um halo róseo com mais de 1 mm de diâmetro ao redor do orifício em ágar adicionado de azul de toluidina e DNA, que contém o microrganismo. O halo se dá pela conversão do ácido desoxirribonucléico pela ação da DNase presente no microrganismo (OLIVEIRA et al., 1999).

5. Produção de acetoína (Figura 3E): É caracterizada pela coloração rósea na superfície de tubos contendo caldos à base de peptona e glicose adicionados de 0,6 mL de α -naftol a 5% (p/v) em álcool absoluto e 0,2 mL de hidróxido de potássio à 40 % (p/v). O teste de produção de acetoína é de fácil execução, baixo custo e é considerado uma característica chave para a espécie de *S. aureus* (KLOOS, 1990).

Figura 3 Caracterização de *S. aureus*. (A) crescimento de colônias típicas de *S. aureus* em ágar Baird Parker. (B) fermentação de manitol (1. ágar manitol fermentado e 2. ágar manito). (C) presença da termolisinase. (D) produção de coagulase. (E) produção de acetoina. (F) presença do fator clumping. (G) presença da catalase.

Quando a caracterização, em laboratório, apresenta testes inconclusivos para o teste de coagulase em isolados suspeitos de *S. aureus*, os testes de DNase e endonuclease termoestável são comumente utilizados para confirmação do diagnóstico (REISCHL et al., 2000).

A espécie *Staphylococcus aureus* é capaz de secretar várias exotoxinas, como hemolisinas, enterotoxinas, coagulase, TSST-1 e proteína A, que contribuem para sua patogenicidade (QIU et al., 2010).

2.2.1 Fatores de virulência de *S. aureus*

S. aureus produz numerosos fatores de virulência (PIECHOWCZ et al., 2008), no meio extracelular que desempenham um papel essencial na colonização e inativação de células hospedeiras (POCSFALVI et al., 2008) e, dentre estes fatores, pode-se destacar a produção de biofilme, a produção de enterotoxinas (entre elas, a *seb*, envolvida nos casos de intoxicação alimentar) e a presença do gene *mecA* (responsável pela resistência intrínseca a antimicrobianos β -lactâmicos em amostras de *S. aureus* spp.). Estes fatores de virulência produzidos por isolados clínicos de *S. aureus*, de humanos e animais, contribuem para a patogenicidade destes aos organismos hospedeiros (ZSCHOCK et al., 2000). A patogenicidade de *S. aureus* é composta por um complexo processo que envolve a produção coordenada dos fatores de virulência. Estes fatores apresentam papéis sobrepostos e podem agir sozinhos ou em grupo (POCSFALVI et al., 2008).

2.2.1.1 Produção de Biofilme

Algumas cepas de *S. aureus* produzem polissacarídeos extracelulares que podem formar uma cápsula ou biofilme ao redor da célula (STEPANOVIC et al., 2000; FOX et al.,

2005; TOTÉ et al., 2008). A formação deste biofilme é regulada por polissacarídeos de adesão intracelular, expressos pelo produto do gene *icaABCD*. O produto deste gene, associado à síntese de polissacarídeos/adesinas, constituem o *locus* de adesão intercelular de espécies de *Staphylococcus* (ARCIOLA et al., 2001; GAD et al., 2009).

Esta formação confere maior aderência do microrganismo em seu hospedeiro favorecendo o estabelecimento de infecções importantes causadas por *S. aureus*, além de ser um fator limitante no tratamento destas doenças (CHRISTENSEN et al., 1985; DIAZ et al., 2010). Dentro dos biofilmes, as bactérias adotam um fenótipo que pode diminuir a taxa de crescimento, limitando a eficiência de antibióticos que têm a parede celular como alvo e biocidas, que exigem crescimento ativo de células assim como a presença de células persistentes, além de redução do metabolismo oxidativo, limitando a absorção dos aminoglicosídeos (BEENKEN et al., 2004; McLAUGHLIN e HOOGEWERF, 2006).

A presença de *S. aureus* capazes de formar biofilme desempenha um papel importante na mastite de ruminantes. O biofilme facilita a aderência e colonização da glândula mamária, contribuindo para a adesão e proliferação, facilitando sua persistência no animal e dificultando a erradicação do patógeno, resultando na maior resistência a antibióticos, já que as drogas não são capazes de atingir as bactérias no interior dos biofilmes. Isto caracteriza uma vantagem seletiva para os estafilococos isolados de mastite (BECKER et al., 1998; VAUTOR et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007 e LIBERTO et al., 2009).

A formação do biofilme (Figura 4) pode prosseguir por caminhos diferentes e a sua detecção pode variar de acordo com a contagem do tempo mas, basicamente passa por dois passos: a bactéria, primeiro, ataca a superfície a ser colonizada e, em seguida, prolifera e se acumula, dentro dos biofilmes (RHODE et al., 2001; GAD et al., 2010).

Foi observado que a estrutura química do exopolissacarídeo e a estrutura do biofilme, contribuem para a exclusão dos agentes antibióticos. Esta exclusão torna-se mais efetiva quando se trata de biofilmes mais antigos. Ao contrário, quando as células se apresentam jovens, com biofilmes em formação, são mais susceptíveis à antibioticoterapia (ALBESA et al., 2004).

Figura 4 Formação de biofilme em ágar Congo Red.
(1) Colônias negras são positivas para a produção de biofilme.
(2) Colônias vermelhas não são produtoras de biofilme .

A síntese do polissacarídeo capsular é mediada pelo *operon ica*. Após a ativação deste, uma adesina polissacarídea intercelular é sintetizada e isto adere as bactérias uma a uma, formando multicamadas. Esta adesina é composta de glicosaminoglicanos b-1,6-ligados e é codificada pelo *locus* intercelular de adesão (ICA), principalmente pelo gene *icaA*. A expressão isolada do *icaA* induz uma baixa atividade enzimática, mas a coexpressão com o gene *icaD* aumenta significativamente esta atividade, que está relacionada com a expressão fenotípica do polissacarídeo capsular (ARCIOLA et al., 2001; VASUDEVAN et al., 2003). Os microrganismos aderem primeiro entre si, e, em seguida, elaboram o biofilme. Estas fases

finais da aderência bacteriana são mediadas por adesina polissacarídica intercelular, que é sintetizada por produtos do *operon ica* ABCD (LIBERTO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2007).

O tratamento antimicrobiano de mastites bovinas causadas por *S. aureus* é normalmente baseado nos testes de susceptibilidade sugeridos pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), porém, vários estudos apresentam discrepância entre os resultados observados em campo daqueles padronizados por este padrão, pois, os tratamentos apresentam boa sensibilidade *in vitro*, mas, decepcionam na prática. Acredita-se que a formação de biofilme está associada a este problema, já que os testes atuais de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias com estas características não são suficientemente confiáveis para a aplicação de rotina (MELCHIOR et al., 2007; SCHILLACI et al., 2010).

2.2.1.2 Presença do gene *mecA*

Staphylococcus aureus representa um importante patógeno e os antibióticos β -lactâmicos são amplamente utilizados nas infecções causadas por este microrganismo. O modo de ação dos antibióticos β -lactâmicos envolve ligação a receptores celulares que são conhecidos como proteínas de ligação à penicilina (*penicillin binding proteins* – PBPs), inibindo a síntese da parede celular bacteriana (QUINN et al., 2005; BROOKS et al., 2009). Dentre estes antimicrobianos está a meticilina, usada desde 1961, porém, o aumento de cepas resistentes (meticilina-resistentes-MRSA) tem se tornado um problema de abrangência mundial, principalmente por aumentar as infecções hospitalares resistentes à antibioticoterapia convencional, dificultando o controle das mesmas (REISCHL et al., 2000; SAIFUL et al., 2006; SKOV et al., 2009).

Microrganismos que produzem β -lactamases (enzimas que destroem as penicilinas) são resistentes aos antibióticos β -lactâmicos já que estas realizam a clivagem do anel β -lactâmico destes antibióticos, tornando-os ineficazes (QUINN et al., 2005; BROOKS et al., 2009).

A resistência de *Staphylococcus* spp. aos β -lactâmicos é heterogênea, conferida principalmente pelo gene *mecA*, codificador de uma proteína de baixa afinidade a este antimicrobiano, a PBP2a (proteína de ligação com a penicilina). O gene *mecA* encontra-se em um fragmento grande de DNA, denominado região *mec*. Nesta região são encontrados dois genes regulatórios denominados de *mecI* e *mecRI*, que formam o complexo cromossômico SCCmec, essencial na resistência de *S. aureus* à meticilina (BERGER-BÄCHI e ROHRER, 2002; MENG et al., 2009). A expressão deste fenótipo pode variar de acordo com as condições de cultura, como temperatura, osmolaridade e homegeneidade genética (MIMICA et al., 2007). Existe a possibilidade de transmissão zoonótica de cepas de *Staphylococcus* spp. resistentes aos β -lactâmicos, indicando a necessidade de monitorar os perfis de isolamento e suscetibilidade aos antimicrobianos na prática veterinária (JUREEN et al., 2001; KOHNER et al., 2006; SOARES et al., 2008).

Dentre as maneiras de identificação das cepas de *S. aureus* MRSA (meticina-resistentes), a identificação do gene *mecA* é considerada como “padrão ouro”, mas a maioria dos laboratórios de análises clínicas não dispõem de equipamentos para a metodologia molecular (PALAZZO et al., 2007).

Portanto, o antibiograma ainda é peça fundamental para o diagnóstico dos MRSA sendo que estes apresentam uma resistência múltipla às drogas. Esta resistência é definida quando aparece para duas ou mais diferentes classes de antibióticos (macrolídeos, lincosamídeos, fluoroquinolonas, tetracilinas, aminoglicosídeos e cloranfenicol). O CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) recomenda a utilização de discos de cefoxitina

para prever a resistência à metilina ao invés de discos de oxacilina (ALMER et al., 2002; MIMICA et al., 2007).

2.2.1.3 Presença do gene *seb*

O leite, considerado indispensável na nutrição por conter importantes nutrientes, é um excelente substrato para o crescimento de muitas bactérias patogênicas como o *S. aureus* (RALL et al., 2008). Rebanhos leiteiros contaminados oferecem riscos à população consumidora de produtos lácteos contaminados (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004).

A contaminação por estes microrganismos, presente em aproximadamente 45% das toxiinfecções no mundo, pode acontecer pelo consumo de alimentos contaminados (*in natura*) ou durante os estágios de produção e armazenamento (STAMFORD et al., 2006).

Intoxicação alimentar estafilocócica (IAE) é causada por membros da família dos superantígenos de *S. aureus* chamados de enterotoxinas estafilocócicas e resulta do consumo de alimentos contaminados com estas toxinas (cerca de 25 µg de enterotoxina B). Tem início rápido (entre 1 e 6 horas) apresentando sintomas como náusea, vômitos, diarreia e dores abdominais, podendo persistir de 24 a 48 horas, ou até 7 a 10 dias (BROOKS et al., 2009). Cerca de 20 diferentes tipos de enterotoxinas são produzidas por *S. aureus*, das quais, os tipos A (SEA), B (SEB), C (SEC) e D (SED) são mais comumente envolvidas nesta enfermidade (SRINIVASAN, et al., 2006).

Estas enterotoxinas são antígenos poderosos que estimulam a proliferação de células T não específicas. Também são resistentes à enzimas proteolíticas e estáveis ao calor, apresentando peso molecular que varia entre 27 e 31 kDa (MEHROTRA et al., 2000;

KAMBOJ et al., 2006; NEMA et al., 2007; PIECHOWICZ et al., 2008) e são secretadas, principalmente, durante a fase de crescimento pós-exponencial (QIU et al., 2010). Frequentemente elas são reconhecidas como agentes de intoxicação alimentar estafilocócica mas podem estar envolvidas em outros tipos de infecções humanas e animais (ZSCHOCK et al., 2000).

As toxinas estafilocócicas não são inativadas por processos usuais de pasteurização ou esterilização industrial de leite e derivados. Estas toxinas, presentes nos alimentos, podem levar à ocorrência de intoxicações na população, por isto, é importante para a indústria identificar as condições em que o microrganismo é capaz de sobreviver e se multiplicar para evitar problemas no processamento de alimentos, armazenamento e distribuição (RODE et al., 2007). Segundo Stamford et al. (2006), *S. aureus* é prevalente no leite *in natura*. Comparando com outras espécies de *Staphylococcus*, ele apresenta positividade para a produção de enterotoxinas em percentuais acima de 50%.

A enterotoxina SEB, envolvida nos casos de intoxicação alimentar, está envolvida, também, em achados de síndrome de choque tóxico (SÁ et al., 2004), estando presente em, aproximadamente, 50% dos casos não relacionados aos uso de tampões no período menstrual (TRABULSI e ALTERTHUM, 2008). Alguns autores dizem que esta enterotoxina estafilocócica (SEB), pode ser considerada de alto risco, tendo potencial para arma biológica (DINGES et al., 2000).

Porém, a adaptação de *S. aureus* e a expressão de enterotoxinas específicas como, por exemplo, a SEB, pode depender da fonte de tecidos do hospedeiro e do ambiente em que este está acolhido. Alguns especulam que os casos de intoxicação alimentar resultam da expressão simultânea de várias enterotoxinas em uma única cepa patogênica e não apenas de uma. Todavia, ainda não está claro se todas estas toxinas são expressas de verdade e quais os efeitos biológicos que elas podem ter (SERGEEV et al., 2004).

Nema et al. (2007) estudaram um surto de intoxicação alimentar na Índia que ocorreu após a ingestão de uma comida típica a base de batatas. Um grande número de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos foram diagnosticados nas amostras. Todos produziram uma combinação de enterotoxinas SEB e SED, sensíveis à oxacilina e vancomicina. Os isolados, caracterizados por ferramentas de biologia molecular, apresentaram-se altamente resistentes ao calor.

Sá et al. (2004) examinaram 1662 vacas com mastite clínica ou subclínica e, após a realização de testes microbiológicos, um total de 209 amostras de leite passaram pela pesquisa de toxinas estafilocócicas. Foi observado que a enterotoxina SEB estava presente em 55,55% das amostras.

Srinivasan et al. (2006) estudaram a prevalência de 16 enterotoxinas estafilocócicas em amostras de leite de vacas com mastite e observaram que a enterotoxina SEB esteve presente em uma das 78 amostras examinadas, porém, Freitas et al. (2008), realizando um estudo com 11 rebanhos leiteiros da área rural de Pernambuco, Brasil, não encontraram amostras positivas para esta enterotoxina.

2.3 ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO (AIA)

O ácido indol-3-acético (AIA) é um metabólito do aminoácido triptofano produzido nas células vegetais, animais e em alguns microrganismos (GORDON et al., 1972; MILLS et al., 1991). Sua síntese acontece à partir do aminoácido triptofano (Figura 5) e deve-se a presença de peroxidases e de radicais livres que induzem esta conversão oxidativa (MARCHIORO, 2005). Por ser uma auxina, o AIA (Figura 6) é largamente distribuído nos

brotos, folhas jovens e frutos das plantas, atuando na proliferação celular (elongação, divisão e diferenciação) e enraizamento (GORDON et al., 1972; MILLS et al., 1991; CENTELLAS et al., 1999), senescência e abscisão de folhas.

Este importante fitohormônio, que ocorre naturalmente em plantas em crescimento, foi detectado em animais, na urina humana, sangue, líquido e vários outros órgãos. Podendo ser obtido, além da síntese do triptofano (GORDON et al., 1972), a partir de uma dieta rica em caules de vegetais ou ainda, pela absorção intestinal via produção bacteriana (FOLKES e WARDMAN, 2001; DALMAZZO et al., 2011).

O AIA é uma das auxinas que regulam o crescimento e desenvolvimento da planta. Seus níveis são controlados para equilibrar as atividades de biossíntese, metabolismo e transporte, estabelecendo o que é conhecido como homeostase de AIA (KAI et al., 2007). O controle dos níveis de AIA é realizado através de remoção irreversível, que pode acontecer pela oxidação por peroxidases levando à descarboxilação ou pela reação de não descarboxilação formando conjugados não reativos (FOLKES e WARDMAN, 2001).

Figura 5 Síntese de AIA à partir do aminoácido triptofano (Adaptado de Marchioro, 2005; KAI et al., 2007).

Figura 6 Esquemas químicos de auxinas naturais e sintéticas (Adaptado de MARCHIORO, 2005).

2.4 PEROXIDASE DE RAIZ FORTE (HRP)

A peroxidase é uma importante enzima que contém um grupamento heme (Figura 7) capaz de oxidar uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos. Esta vem sendo estudada há séculos, porém, nos últimos anos, foram disponibilizadas novas informações sobre a estrutura tridimensional desta enzima e sua função, oferecendo oportunidades de desenvolver uma engenharia de enzimas para aplicações práticas em produtos naturais e de síntese química, para diagnósticos médicos e biorremediação (VEITCH, 2004).

Figura 7 Representação esquemática do grupamento heme de peroxidase de raiz forte (VEITCH, 2004).

A forma mais comum de peroxidase é a extraída da raiz de *Armoracia rusticana* (Figura 8), cultivada em países de clima frio, mais conhecida como raiz forte ou rábano silvestre. A produção comercial de rábano silvestre ocorre, relativamente, em larga escala, pois a enzima apresenta diversos atrativos para pesquisadores, podendo envolver-se em

diversas reações biológicas como a ligação a anticorpos e outras reações de oxidação, de crescimento e diferenciação celular (VEITCH, 2004; MACIEL et al., 2006).

Figura 8 Ilustração inicial da planta de raiz-forte, de 1633 (Herball, ou historie generall de plantes, de Gerard), adaptado de VEITCH, 2004.

Normalmente, a HRP atua sobre seus substratos através de um ciclo dependente de peróxido de hidrogênio ou hidroperóxidos orgânicos sendo que, durante este ciclo, diferentes

formas de HRP são formadas: nativa (forma ferrosa), HRP-I, HRP-II, HRP-III e a forma ferrosa. A HRP nativa é oxidada pelo peróxido de hidrogênio levando a formação da HRP-I que, com um substrato redutor, passa a HRP-II e volta a forma nativa (DUNFORD, 1991; FOLKES e WARDMAN, 2001). A HRP-III é formada a partir da reação entre a forma ferrosa e oxigênio. A forma ferrosa, altamente reativa, é formada à partir da forma nativa por substrato redutor (BERGLUND et al., 2002). O ciclo catalítico da HRP pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 Ciclo catalítico da HRP (Adaptado de Berglund et al., 2002)

Diversos estudos têm sido conduzidos de forma a obter a peroxidase de outras fontes. Maciel et al. (2006), extraiu a peroxidase de uma árvore leguminosa, nativa do território

brasileiro, a *Copaífera langsdorffii* enquanto que Valderrama et al. (2001), obtiveram o extrato enzimático a partir de casca e polpa de maçãs (*Mallus comunis*), de cultivares Gala e Fuji e Zanatta et al. (2006) fez a extração à partir de polpa de goiaba (*Psidium guajava R.*). Estes estudos buscaram uma alternativa à extração de peroxidase de rábano silvestre, para melhor adequar a origem da extração às condições do Brasil, porém, outros estudos ainda são necessários para avaliar as características e comportamentos enzimáticos destas "novas" peroxidases.

2.5 SISTEMA AIA/HRP

Há uma correlação direta entre os efeitos citotóxicos do AIA e da atividade da peroxidase nas células (DE MELO et al., 2004). A peroxidase, encontrada em plantas na forma de isoenzimas, é capaz de oxidar, o AIA, gerando espécies citotóxicas (FOLKES e WARDMAN, 2001). Além do AIA, as peroxidase podem oxidar inúmeros componentes fenólicos para dímeros ou lignina e p-methylmercapto- α -oxo-butírico para etileno (MACHÁCKOVÁ et al., 1975; ESCOBAR et al., 1992), além de participar da lignificação *crosslinking*, de polímeros da parede celular e da resistência à infecção pela planta (VEITCH, 2004).

Segundo Kim et al. (2006), o AIA sozinho não tem efeito citotóxico e só se torna ativo após a descarboxilação oxidativa induzida por HRP. A oxidação do AIA pela HRP é realizado de forma eficaz, não necessitando de cofatores (WARDMAN, 2002). Esta oxidação produz uma variedade de radicais livres (Figura 10), incluindo radical indolil, radical escatolil, radical peroxil e espécies reativas de oxigênio (ROS), como o ânion superóxido e o peróxido de

hidrogênio. Estes produtos formados são moléculas citotóxicas capazes de induzir injúrias para células sadias ou tumorais (DE MELO et al., 1997; FOLKES e WARDMAN, 2001; VEITCH, 2004; KIM et al., 2006; DALMAZZO et al., 2010).

Figura 10 Radicais livres formados pela oxidação do AIA (Adaptado de Folkles e Wardman, 2001).

Estudos mostram que moléculas similares ao AIA, como o indol-3-carbinol e 3-metileno-2-oxindol, apresentam ação tóxica para células procarióticas e eucarióticas. O indol-3-carbinol apresenta atividade antimicrobiana *in vitro*, pelo rompimento da estrutura que

compõe a membrana celular, contra várias espécies de microrganismos como bactérias gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*; gram-negativas, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*; e fungos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon beigelii* e *Candida albicans* (SUNG e LEE, 2007). Enquanto, que a ação citotóxica do 3-metileno-2-oxindol é conhecida para as células eucarióticas (FOLKES e WARDMAN, 2001).

2.6 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

Espécies reativas de oxigênio (ERO) podem ser definidas como moléculas ou fragmentos de moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados (VALKO et al., 2006). São geradas continuamente no interior das células e podem ser formadas por diversas enzimas oxidases e pela dismutação do ânion superóxido formado por vazamento de elétrons durante a respiração mitocondrial (FRIDOVICH, 1978). As células produzem ERO, tanto como produtos metabólicos, como para sinalizar certos processos celulares. O excesso destas espécies reativas é eliminado pelos antioxidantes endógenos que protegem os tecidos contra danos oxidativos (RESENDE et al., 2003; ELLAH et al., 2008).

Estes radicais são substâncias altamente reativas, formadas pelo oxigênio (Figura 11) e outras moléculas, que são produzidas continuamente durante os processos metabólicos e fisiológicos que contribuem nos processos de resposta imune e inflamatória e no metabolismo dos ácidos graxos insaturados (VALKO et al., 2006; ELLAH et al., 2008).

Figura 11 Esquema de redução do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O) e subsequente formação de espécies reativas de O_2 . (Adaptado de Ferreira e Matsubara, 1997).

A formação de radicais livres de oxigênio (Figura 12) acontece a partir do oxigênio molecular consumido, onde 8-10%, é transformado em radicais de ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), via redução monovalente. A maior fonte de superóxido é o sistema de transporte de elétrons mitocondrial, principalmente a oscilação óxido-redução da ubiquinona. O ânion superóxido é transformada por dismutação espontânea para H_2O_2 , muito rapidamente, e a enzima superóxido dismutase (SOD) acelera ainda mais este processo (BAZSÓ-DOMBI et al., 2000).

Figura 12 Radicais formadas a partir do oxigênio (Adaptado de Resende et al., 2003).

H_2O_2 é uma molécula apolar, decomposta eficientemente pela catalase (CAT), enquanto peróxidos orgânicos são decompostos por outras enzimas, como a glutathione peroxidase. O cérebro é muito pobre em CAT e o consumo de oxigênio é muito alto, aumentando o fluxo de H_2O_2 . A transição de metais como ferro, cobre e manganês pode causar a chamada heterose de H_2O_2 , resultado na divisão da molécula em um íon regular (OH^-), e um radical hidroxil ($\text{OH}^\bullet$) (BAZSÓ-DOMBI et al., 2000; RESENDE et al., 2003; BARREIRO et al., 2006).

As reações de oxidação de biomoléculas a partir do ferro (Fe^{2+}) são chamadas de reação de Fenton ou Haber-Weiss e estão apresentadas nos esquemas da Figura 13 (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), podendo ser diferenciadas pelos diferentes tipos de espécies reativas formam a reação.

Porém, em excesso, quando são produzidos mais rapidamente do que podem ser neutralizados, estes radicais podem perturbar o equilíbrio entre a oxidação e o sistema de defesa antioxidante, causando a proxidação lipídica e oxidativa, causando danos às proteínas, DNA e membranas celulares (KIM et al., 2006; LIN et al., 2006), caracterizando o estresse oxidativo.

Figura 13 Reação de Fenton e de Haber-Weiss (adaptado de Ferreira e Matsubara, 1997).

Outras fontes de espécies reativas celulares são os neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. Uma vez ativados, os macrófagos iniciam um aumento do consumo de oxigênio, dando origem a uma variedade de espécies reativas de oxigênio, incluindo o ânion superóxido, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio (VALKO et al., 2006).

Para se proteger, a célula dispõe de mecanismos de defesa antioxidante. Segundo Ferreira e Matsubara (1997), este sistema pode ser dividido em duas vertentes:

- a) Atua no agente antes que este cause a lesão. Compõem esta defesa a glutathiona reduzida (GSH), a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathiona peroxidase (GSH-Px) e a vitamina E.
- b) Atua no reparo da lesão ocorrida. Esta defesa é constituída pelo ácido ascórbico, glutathiona redutase (GSH-Rd) e pela GSH-Px, entre outros.

Estes agentes são gerados endogenamente, como consequência do metabolismo do O_2 (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). As enzimas atuam de forma a proteger a células destes

“agentes agressores”, ou seja, atuam nestes produtos tóxicos transformando-os em outros não tóxicos para a célula (H_2O e O_2). Assim, podemos dizer que a SOD atua diretamente no $\text{O}_2^{\cdot -}$ (Figura 14), transformando-o em peróxido de hidrogênio e oxigênio, e a catalase converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular.

Figura 14: Esquema da atuação das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase (Adaptado de Rover Jr et al., 2001).

O aumento da atividade destas enzimas antioxidantes (CAT e SOD) prediz que o microrganismo sofreu estresse oxidativo. Esse estresse é caracterizado pelo desequilíbrio entre as velocidades de formação de espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e de espécies antioxidantes, como a enzima catalase e superóxido dismutase (ELLAH et al, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação da concentração inibitória mínima (CIM) de AIA e AIA/HRP na redução da viabilidade de *S. aureus* com característica positiva ou negativa para produção de biofilme e para os genes *mecA* e *seb*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir a concentração inibitória mínima (CIM) de AIA, na ausência e presença de HRP, para as cepas certificadas de *S. aureus* ATCC 6538, ATCC 14458, ATCC 43300 e ATCC 29213 ;
- Verificar a produção de enzimas antioxidantes (CAT e SOD) dos microrganismos, após incubação com AIA, na ausência e presença de HRP, em concentração subinibitória de AIA e HRP 1 μ M;
- Verificar a integridade de membrana e DNA do microrganismo após a incubação com AIA, na ausência e presença de HRP, em concentração subinibitória de AIA e HRP 1 μ M.
- Verificar a expressão do gene *seb* na cepa ATCC 14458 após ação do AIA, na ausência e presença de HRP, em concentração subinibitória de AIA e HRP 1 μ M;

4. FLUXOGRAMA DE TRABALHO

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 REAGENTES E MEIOS DE CULTURA

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Os meios de cultura *Mannitol-Salt Agar* (agar manitol), *Muller-Hinton Agar*, Tryptone Soya Broth (TSB) e *Brain-Heart- Infusion* (BHI) foram adquiridos da Oxoid (Basingstoke, Hampshire, UK).

5.1.1 Preparo de AIA

A solução estoque de AIA 100 mM foi preparada diluindo-se 17,52 g de AIA em 80 mL de TSB, sob agitação constante. Em seguida, foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH 5N) até a completa dissolução do AIA (pH próximo de 12). Após esta fase, o pH foi corrigido para 7,4 com ácido clorídrico (HCl) concentrado. O volume foi completado para 100 mL com TSB e, esterilizados por filtração, utilizando uma membrana estéril, de 0,22 µm de porosidade.

5.1.2 Preparo de HRP

A solução de HRP 1 μ M, utilizada nos experimentos, foi preparada em PBS (*Phosphate Buffer Saline* pH 7,4), a partir de uma solução estoque de 1000 μ M. Para os ensaios, 100 μ L da solução estoque de HRP (1000 μ M) foram misturados com 9900 μ L de PBS e, esterilizados por filtração.

5.2 MICRORGANISMOS CERTIFICADOS

As cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, ATCC 14458, ATCC 43300, ATCC 29213, ATCC 25923 e a cepa de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 foram doadas pela Fundação Oswaldo Cruz, sendo assim diferenciadas:

ATCC 6538: produtora de biofilme (McLAUGHLIN; HOOGEWERF, 2006; TOTÉ et al., 2008)

ATCC 14458: possui o gene *seb*, que expressa a toxina SEB, envolvida na intoxicação alimentar (MEHROTRA et al., 2000; SERGEEV et al, 2004; KAMBOJ et al, 2006; NEMA et al, 2007; POCSFALVI, 2008; QIU et al, 2010).

ATCC 43300: possui o gene *mecA*, que codifica uma proteína de ligação a penicilina com baixa afinidade para β -lactâmicos, conferindo resistência à meticilina (REISCHL et al., 2000; ALMER et al., 2002; PALAZZO et al., 2007; SKOV et al., 2009)

ATCC 29213: não possui o gene *mecA* (ALMER et al., 2002; SAIFUL et al., 2006; SKOV et al., 2009); cepa padrão para os testes de susceptibilidade (BRITO et al., 2001)

ATCC 25923: produtora de biofilme (STEPANOVIC et al., 2000; McLAUGHLIN; HOOGWERF, 2006 e SCHILLACI et al., 2010), não possui o gene *seb* (JUREEN et al., 2001; NEMA, V. et al, 2007), não possui o gene *mecA* (SAIFUL et al., 2006; SKOV et al., 2009). Esta cepa participou somente dos testes de determinação quantitativa de biofilme pois apresenta características semelhantes à demais cepas utilizadas.

ATCC 12228: não produtora de biofilme (OLIVEIRA et al., 2006).

5.2.1 Criopreservação dos Microrganismos

As cepas certificadas, liofilizadas, foram ressuspensas em TSB (conforme indicação da Fundação Oswaldo Cruz) e mantidas sob agitação, lenta e constante, por 18 horas, a 37°C. Após o período de incubação, foram separadas em alíquotas de 1 mL com 10% de glicerol e mantidas em temperatura de -20° C.

5.2.2 Cultivo dos Microrganismos

Para a utilização das cepas bacterianas, uma alíquota de 100 μL da cepa de *Staphylococcus aureus* foi transferida para um frasco contendo 10 mL de meio caldo TSB (*Tryptone Soy Broth*), e mantida sob agitação lenta e constante, a 37°C, *overnight*. Em seguida os microrganismos foram lavados três vezes com PBS, centrifugados por 10 minutos a 1713 x g e o pellet ressuspensionado em PBS. A suspensão de bactéria foi ajustada espectrofotometricamente a 625 nm (Beckman Coulter DU 800, USA) (Figura 15) a uma densidade óptica de 1,6, que corresponde aproximadamente a $1,0 \times 10^9$ UFC/mL (unidades formadoras de colônias por mililitro) (GRESHAM et al., 2000). Para a realização dos ensaios, as amostras foram diluídas a fim de se obter uma concentração final de $3,0 \times 10^3$ UFC/mL.

Figura 15 Equipamentos utilizados no experimento. (A) Shaker TE-420 (Tecnal) e (B) Centrifuga CT- 5000 (Cientec)

5.3 ANÁLISES REALIZADAS COM OS MICRORGANISMOS

As cepas foram adquiridas à partir do fator de virulência apresentado e objeto de estudo deste experimento (conforme explicação do item 5.2). Para verificar se os microrganismos apresentavam características (fatores de virulência) cruzadas, foram realizados os testes de determinação quantitativa de biofilme e sensibilidade aos antimicrobianos (antibiograma).

5.3.1 Determinação quantitativa da formação de biofilme

A determinação quantitativa do biofilme produzido pelas cepas (ATCC 6538, ATCC 14458, ATCC 43300, ATCC 29213 e ATCC 25923) foi realizada por método colorimétrico (Leitor de microplacas, *Multiskan FC -Thermo Scientific*) utilizando placas de poliestireno com 96 poços (CHRISTENSEN et al.,1985). A cepa ATCC 12228 (*S. epidermidis*) foi utilizada como controle negativo para a produção de biofilme.

Para a determinação quantitativa do biofilme, uma alíquota de 100 µL da suspensão bacteriana estoque (criopreservada em glicerol a – 20°C) das cepas foram incubadas em 10 mL de TSB, por 18 horas, permanecendo em agitação lenta e constante, a 37°C. Após a incubação, a cultura do microrganismo foi diluída 1:40 em TSB, suplementado com 0,25% de glicose, e, 200 µL dessa suspensão bacteriana foram incubados em placa de microdiluição (96 “well”) por 18 horas, a 37°C. Após este período, o conteúdo de cada poço foi aspirado e descartado. A placa foi, cuidadosamente, lavada três vezes com 200µL de PBS e seca em

posição invertida a 60°C. A seguir, os poços foram corados com 20µL de solução de cristal violeta 0,5 %, por um minuto, e lavados com PBS. A densidade óptica dos biofilmes bacterianos, aderidos e corados, foi lida a 570 nm em leitora para microplacas. A intensidade de cor azul nos poços da placa de poliestireno indicou a aderência bacteriana e foi agrupada em três categorias de acordo com a reação: não aderente ($DO \leq 0,120$), fracamente aderente ($DO 0,120$ a $0,240$) e fortemente aderente ($DO \geq 0,240$) (CHRISTENSEN et al.,1985). O experimento foi realizado em duplicata e repetido duas vezes.

5.3.2 Teste de sensibilidade a antimicrobianos (antibiograma)

As cepas foram testadas pelo método de difusão em disco, de acordo com as recomendações da NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (2002) e este foi utilizado para verificar a susceptibilidade das cepas de *S. aureus* aos seguintes antibióticos: penicilina (10 µg), oxacilina (1 µg), cefoxitina (30 µg), ampicilina (10 µg), gentamicina (10 µg), metilicina (5 µg).

Para tal, as cepas foram inoculadas em tubos contendo 10 mL de caldo TSB e incubados à 37°C, por 18 horas. A seguir, a cultura foi lavada três vezes com PBS e diluída ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL), seguindo a escala de McFarland. Em seguida, 100 µL da diluição foram espalhados em uma placa de petri contendo ágar Muller-Hinton, tomando-se o cuidado de espalhar todo o conteúdo sobre a superfície do ágar. Sobre o ágar de cada placa semeada, foram depositados seis discos de antibióticos, tomando-se o cuidado de deixar um espaço equidistante entre eles. Essas placas foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Após esse período, os halos de inibição de cada antibiótico foram medidos e comparados com a tabela

do fabricante dos discos (CEFAR). Foi utilizada a cepa de *S. aureus* ATCC 29213 recomendada como controle para testes de susceptibilidade.

5.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE AIA, NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DE HRP 1 μ M

As cepas certificadas foram testadas para a determinação da concentração inibitória mínima de AIA, na ausência e presença de HRP, utilizando dois métodos:

- teste qualitativo: com a utilização do corante resazurina como indicador do crescimento bacteriano.
- teste quantitativo: através da leitura da densidade óptica (D.O.), em espectrofotômetro.

5.4.1 Determinação da CIM de AIA com a utilização do corante resazurina

A concentração inibitória mínima (CIM) de AIA na ausência e presença de HRP, com a utilização do corante resazurina, foi determinada de acordo com Sarker et al. (2007), com algumas modificações.

Em uma placa de microdiluição (24 “well”) foram adicionados diferentes volumes de TSB e da solução de AIA nas concentrações de 0,5, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 mM em

cada poço, adicionados de 200 μL da suspensão de bactéria ($3,0 \times 10^3$ UFC/mL) e 200 μL da solução de HRP (1 μM), quando ensaios realizados na presença de HRP (Figura 16). Em seguida, 20 μL da solução indicadora resazurina (6,76 mg/mL) foram colocados em cada poço e a placa incubada a 37°C em agitação, lenta e constante, por 18 horas (Figura 17).

A mudança da coloração foi avaliada visualmente e qualquer mudança, da cor púrpura para rosa, foi registrada como positiva (crescimento da bactéria). A primeira concentração que apresentou a mudança na coloração foi considerada como CIM para a bactéria utilizada. Para o controle foram realizados os seguintes ensaios, em meio TSB e: 1) AIA (70 mM)/HRP 1 μM na ausência do microrganismo, 2) AIA 70 mM na ausência do microrganismo 3) HRP 1 μM na presença e ausência do microrganismo e 4) antibiótico (9,4 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina) na presença de microrganismo. O ensaio foi realizado em triplicata.

Figura 16 Placa para determinação de CIM.

Figura 17 Placa para determinação de CIM, com adição de resazurina.

5.4.2 Determinação da CIM de AIA com a utilização de espectrofotômetro

Para determinação da CIM de AIA, na ausência e presença de HRP 1 μM , das cepas de *S. aureus* ATCC 6538, ATCC 14458, ATCC 43300 e ATCC 29213 ($3,0 \times 10^3$ UFC/mL), os microrganismos foram incubados em meio TSB contendo AIA em diferentes concentrações de 0,5, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 mM, na ausência e presença de HRP 1 μM , permanecendo em agitação, lenta e constante, por 18 horas, a 37° C.

Para o controle, foram realizados os seguintes ensaios: 1) AIA (70 mM)/HRP 1 μM na ausência do microrganismo, 2) AIA 70 mM na ausência do microrganismo 3) HRP 1 μM na presença e ausência do microrganismo, 3) antibiótico (9,4 $\mu\text{g/mL}$) na presença de

microrganismo e 4) AIA nas concentrações 0,5, 4, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 mM na presença de microrganismo e ausência de HRP (Figura 18).

Figura 18 Placa após incubação por 18 horas, à 37° C.

Após o tempo de incubação as microplacas foram submetidas à leitura da densidade óptica (D.O.) em espectrofotômetro (Beckman Coulter DU-800 (UV/VIS) leitor de microplacas a 625nm (Figura 19). Os valores de D.O. obtidos foram utilizados para a confecção de uma curva de crescimento dos microrganismos. A concentração capaz de inibir em 90% a multiplicação bacteriana foi considerada o CIM, sendo que a inibição do crescimento bacteriano foi evidenciada pela diminuição da turvação do meio.

Para o cálculo da porcentagem de inibição, utilizou-se a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{100 - (D.O. \text{ do tratado} \times 100)}{D.O. \text{ da bactéria}}$$

Figura 19 Espectrofotômetro Beckman Coulter DU-800 (UV/VIS)

5.5 ANÁLISES REALIZADAS COM OS MICRORGANISMOS APÓS INCUBAÇÃO COM AS CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE AIA

Após determinada a CIM (concentração capaz de inibir 90% do crescimento bacteriano), escolheu-se uma concentração subinibitória de AIA, na ausência e presença de HRP, que apresentou uma porcentagem de inibição entre 50% e 65%. Assim, ficou estabelecida uma concentração subinibitória única para cada uma das cepas, ou seja, AIA 30 mM para as cepas ATCC 6538 e ATCC 14458; e AIA 40 mM para as cepas ATCC 43300 e ATCC 29213 (Tabela 1).

Tabela 1 Concentração subinibitória utilizada nas respectivas cepas bacterianas.

Concentração subinibitória	Cepas
30 mM	ATCC 6538
	ATCC 14458
	ATCC 43300
40 mM	ATCC 29213

O efeito destas concentrações sobre as diferentes cepas de *S. aureus* foi avaliada em termos de: produção de biofilme; atividade específica de enzimas antioxidantes (catalase e superóxido dismutase); integridade de DNA; ação de CIM de AIA e AIA/HRP sobre a integridade de membrana e expressão do gene *seb* da cepa ATCC 14458.

5.5.1 Determinação quantitativa da formação de biofilme

A determinação quantitativa do biofilme produzido pela cepa de *S. aureus* ATCC 6538 foi realizada por método colorimétrico (CHRISTENSEN et al., 1985).

A cepa foi incubada em TSB com as concentrações de AIA de 30 mM (dose subinibitória) e 40 mM (dose inibitória) na presença e ausência de HRP 1 μ M, permanecendo em agitação, lenta e constante, por 24 horas, a 37°C. Após a incubação, foi realizado o ensaio para avaliar a capacidade de formação de biofilme, como descrito no item 5.3.1.

Foram realizados ensaios contendo apenas TSB (controle do ensaio) e empregando a cepa *S. aureus* ATCC 29213 (não produtor de biofilme, controle negativo) na presença e ausência de AIA ou AIA/HRP.

5.5.2 Atividade das enzimas antioxidantes produzidas pelos microrganismos

Para determinação da atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), as cepas de *S. aureus* ATCC 6538, ATCC 14458, ATCC 43300 e ATCC 29213 ($3,0 \times 10^3$ UFC/mL) foram incubadas em TSB com a concentração subinibitória de AIA na presença e ausência de HRP 1 μ M, permanecendo em agitação, lenta e constante, por 18 horas, a 37°C.

Após a incubação, os microrganismos foram lavados três vezes com PBS e centrifugados, por 10 minutos, a 1713 $\times g$. O *pellet* obtido foi ressuspensionado em 200 μ L de PBS e armazenado em nitrogênio líquido para posterior extração e determinação da atividade enzimática.

5.5.2.1 Extração das enzimas antioxidantes

Para a extração das enzimas, as amostras foram descongeladas, em gelo, e incubadas com 5 μ L de lisostafina (2,5 UI/ μ L), por 30 minutos, a 37 °C, em agitação constante. Em seguida, centrifugou-se por 15 minutos a 13.000 $\times g$. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e conteúdo de proteínas totais.

5.5.2.2 Atividade específica da enzima catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada espectrofotometricamente (Beckman Coulter DU-800 (UV/VIS), pelo consumo de peróxido de hidrogênio, a 240 nm e 25°C, acompanhada por 3 minutos (BEERS; SIZER, 1952). O meio de ensaio continha tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,0 e peróxido de hidrogênio 10 mM. A atividade da catalase foi expressa em μmol de H_2O_2 consumido por minuto, por miligrama de proteína.

5.5.2.3 Atividade específica da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada espectrofotometricamente (Beckman Coulter DU-800 (UV/VIS) de acordo com a taxa de redução do *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT), pelo ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), a 550 nm e 25°C, acompanhada por 3 minutos (BEUCHAMP; FRIDOVICH, 1971). Nesta metodologia, o sistema xantina-xantina oxidase é utilizado como fonte geradora de ânion superóxido, de acordo com a equação:

O ânion superóxido gerado por este sistema reduz o NBT transformando-o em formazana (composto azul insolúvel indicador da presença do $\text{O}_2^{\cdot-}$), conforme a equação:

Se a SOD estiver presente na amostra, competirá pelo ânion superóxido inibindo a taxa de redução do NBT, ocorrendo a reação:

O meio de reação continha tampão fosfato de sódio 53 mmol/L pH 7,8, NBT 0,1 mmol/L, xantina 0,05 mmol/L, xantina oxidase 0,013 UI/L e EDTA 0,1 mmol/L. Neste ensaio o primeiro passo foi adequar a quantidade de xantina oxidase necessária para que a redução do NBT pelo $\text{O}_2^{\cdot-}$ fosse igual a 0,030 unidade de absorbância por minuto na ausência da amostra. O segundo passo foi adequar a diluição da amostra para que a redução do NBT pelo $\text{O}_2^{\cdot-}$ fosse inibida pela SOD em um valor correspondente entre 20 e 40%. A diluição da amostra foi realizada em tampão fosfato de sódio 10 mmol/L, pH 7,4.

Os cálculos da atividade da SOD foram realizados com base na definição: uma unidade de enzima corresponde a 50% de inibição da taxa de redução do NBT (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2004). A atividade específica da SOD foi expressa em μmol por minuto, por miligrama de proteína.

5.5.2.4 Determinação de proteínas totais

O conteúdo de proteínas das amostras foi determinado, espectrofotometricamente (DU-800, Beckman, USA), pelo método descrito por Bradford (1976), usando soro albumina bovina, para construção da curva padrão. Este método envolve a adição de um corante ácido na solução com proteína e medição da absorbância, após 15 minutos, em espectrofotômetro.

5.5.3 Integridade do DNA

5.5.3.1 Preparo das amostras

Para a análise da integridade do DNA, as cepas de *S. aureus* foram incubadas em TSB, com as concentrações inibitórias e subinibitórias de AIA, na presença e ausência de HRP 1 μM , permanecendo em agitação, lenta e constante, por 18 horas, a 37°C. Após a incubação, os microrganismos foram lavados três vezes com PBS e centrifugados, por 10 minutos, a 1713 x g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi armazenado em nitrogênio líquido, para posterior extração e análise da integridade do DNA.

5.5.3.2 Extração do DNA

Para a extração do DNA das cepas de *S. aureus* foi utilizado o kit *illustra™ bactéria genoCIMPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante, com algumas modificações.

Para a lise do microrganismo, o pellet obtido anteriormente, foi incubado em banho-Maria com 40 μL de EDTA 50 mmol/L pH 8,0 e 5 μL de lisostafina (2,5 UI/ μL), por 30 minutos a 37°C. Após este período foi adicionado 10 μL de proteinase K (20 mg/mL) e a amostra foi incubada por mais 15 minutos a 55°C. Para a purificação do DNA, a amostra foi incubada em colunas, provenientes do kit utilizado, por 10 minutos, com 500 μL de solução

de lise e, em seguida, centrifugada a 11.000 x g por 1 minuto. O material que passou pela coluna foi descartado e o material preso na mesma foi lavado por duas vezes, sendo a primeira com 500 µL de solução de lise e a segunda, com 500 µL de tampão de lavagem. O DNA retido na coluna foi eluído com 200 µL de tampão de eluição. Após 1 minuto de incubação em temperatura ambiente, a coluna foi centrifugada a 11.000 x g por 1 minuto e o material coletado (*pellet*) foi utilizado para quantificação do DNA.

A concentração de DNA obtida foi calculada utilizando-se BioPhotometer® (Eppendorf, USA) através da razão das absorbâncias avaliadas em 260 nm e em 280 nm. A amostra contendo o DNA foi diluída para obter a concentração de 100 ng/µL, como recomendado pelo fabricante.

5.5.3.3 Corrida eletroforética em gel de agarose 1%

O DNA, extraído e quantificado, foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) a 100 Volts por 90 minutos e corado com Brometo de Etídio, utilizando como padrão um marcador de pares de base de 100 pb DNA Ladder (100-2000 pb; Invitrogen, USA).

5.5.4 Integridade de membrana por citometria de fluxo

Para a análise da integridade de membrana, as cepas de *S. aureus* foram incubadas em TSB com as concentrações subinibitórias de AIA, definidas nos itens 5.3.3 e 5.3.4, na

presença e ausência de HRP 1 μ M, permanecendo em agitação, lenta e constante, por 18 horas, a 37°C, utilizando uma placa de poliestireno de 24 poços e o corante PI (Figura 20).

Figura 20 Estrutura química do corante Propidium Iodide (PI).

Adaptado de Straüber; Müller, 2010.

Após o período de incubação, o ensaio foi preparado retirando-se uma alíquota de 500 μ L, de cada um dos 24 poços da placa de poliestireno, e transferindo-os para eppendorfs previamente esterilizados. Estes foram incubados, por 4 minutos, com 5 μ L de PI (4,3 mmol/L).

O equipamento de citometria de fluxo (BD FACSAria, USA) foi utilizado para detectar a fluorescência vermelha do *Propidium Iodide* (PI) (610 nm), em comprimentos de ondas para excitação em 585 nm. Esta fluorescência foi quantificada através do programa BD FACSDiva.

O corante PI (Figura 20) é uma molécula hidrofílica catiônica que tem capacidade de corar os ácidos nucleicos e é amplamente utilizado como indicador da integridade de membrana das células microbianas. Este corante não atravessa a membrana celular saudável, portanto, quando estas se tornam permeáveis, o corante se liga ao DNA e promove a fluorescência vermelha (STRAÜBER; MÜLLER, 2010).

5.5.5 Expressão do gene *seb*

5.5.5.1 Preparo das amostras

Para a análise de expressão do gene *seb*, a cepa certificada ATCC 14458 foi incubada em TSB com a concentração subinibitórias de AIA, na presença de HRP 1 μ M, permanecendo em agitação, lenta e constante, por 18 horas, a 37°C. Após a incubação, os microrganismos foram lavados três vezes com PBS e centrifugados por 10 minutos, a 1713 $\times$ g. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi armazenado em nitrogênio líquido para posterior extração de RNA total e análise da expressão do gene *seb*.

5.5.5.2 Extração do RNA total

As amostras armazenadas em nitrogênio líquido foram descongeladas e centrifugadas. Ao *pellet* foram adicionados 500 μ L de PBS, 10 μ L de lisozima (10 mg/mL) e 10 μ L de lisostafina (2,5 UI/ μ L), homogeneizando-se 10 vezes. As amostras foram incubadas, em banho-maria a 37°C, por 40 minutos, invertendo-se os tubos periodicamente, para lise da parede celular dos *Staphylococcus aureus*.

Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 1713 $\times$ g e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 1 mL de Trizol (Invitrogen, Brasil), homogeneizando-se as amostras e incubando, à temperatura ambiente, por 5 minutos. Em

seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e, novamente incubadas em temperatura ambiente, por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a 12000 $\times$ g por 15 minutos, a 4°C. Em seguida, 300 µL do sobrenadante foram transferidos para tubos estéreis, adicionando-se 500 µL de álcool isopropílico e, após incubação a temperatura ambiente, foram centrifugadas a 12000 $\times$ g, por 10 minutos, a 4°C. As amostras foram lavadas com 1 mL de etanol 75%, centrifugadas e os *pellets* foram homogeneizados com 50 µL de água tratada com DEPC.

A concentração de RNA obtida foi avaliada pelo Nanodrop, através da razão das absorbâncias avaliadas em 260 nm e 280 nm. A qualidade do RNA obtido foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com Brometo de Etídio. A amostra foi armazenada a -80° C para posterior avaliação da expressão da toxina.

5.5.5.3 Análise da expressão da toxina SEB

As amostras de RNA (item 4.5.5.2) foram utilizadas para avaliar a expressão do gene *seb* da cepa de *S. aureus* ATCC 14458, utilizando o 7500 PCR real time (SYRB).

Os produtos das amostras de RNA foram comparados com sequências conhecidas, disponíveis no Gen Bank (acesso número AY852244, para o gene *seb* e NC_002952, para o controle endógeno *gyrB*). Foram utilizados primers direcionados ao gene responsável pela produção da enterotoxina SEB e ao gene endógeno *gyrB*. As sequências utilizadas neste estudo podem ser visualizadas na Tabela 2, sendo que o gene alvo *seb* (QIU et al, 2010) apresenta, aproximadamente, 154 pares de bases e o gene *gyrB*, utilizado como controle endógeno, (SMITH et al., 2010), 385 pares de base.

Tabela 2 - Primers utilizados no estudo.

Primer	Sequência	Gene
<i>seb</i> -f*	5'-TGTTCTGGGTATTTGAAGATGG-3'	<i>seb</i>
<i>seb</i> -r*	5'-CGTTTCATAAGGCGAGTTGTT-3'	<i>seb</i>
<i>gyrB</i> -f*	5'-TTATGGTGCTGGGCAAATACA-3'	<i>gyrB</i>
<i>gyrB</i> -r*	5'-CACCATGTAAACCACCAGATA-3'	<i>gyrB</i>

f* = forward e r* = reverse.

As amostras de RNA foram descongeladas e tratadas com DNase para obtenção do DNAc e posterior análise em PCR-real time.

5.5.5.4 Obtenção do DNAc

A obtenção do DNAc para a reação de PCR foi realizada a partir do RNA total dos isolados, utilizando o kit Hight Capacity RNA-to-cDNA (Biosystems), após tratamento das amostras com DNase.

Para o tratamento com DNase, foram incubados 1000 ng de amostra com 1 µL de tampão da amostra (*10 x rDNase I Reaction Buffer*) e 1 µL DNase (2 unidades por µL). A mistura foi completada com H₂O DEPC (água livre de RNase) até o volume total de 10 µL. A reação foi incubada, por 15 minutos, em temperatura ambiente. Após este período, foram adicionados 1 µL da solução Stop e, novamente incubada à 65°C, em termociclador, por 10 minutos.

Na mistura contendo o RNA total (1000 ng/µL) tratado com DNase, foram adicionados 10 µL de *RT buffer* (2x), 1 µL de *RT Enzyme Mix* (20x) e novamente incubada, em termociclador, por 60 minutos à 37°C, 5 minutos à 65 °C, finalizando com 4°C.

5.5.5.5 Quantificação do gene *seb* através do PCR-real time

Para a quantificação do gene *seb* através de PCR-real time foram incubados 12,5 µL de PCR Master Mix (Power SYBR Green, Biosystem), 0,75 µL de *primer forward*, 0,75 µL de *primer reverse*, 1 µL de amostra DNAc e 10 µL de água DEPC por 10 minutos à 95°C (estágio 1), 1 minuto à 95°C e 1 minuto à 60°C (estágio 2), 15 segundos à 95°C, 1 minuto à 60°C e 15 segundos à 95°C (estágio 3).

As amplificações foram realizadas em triplicata em termociclador 7500 PCR real time (SYRB).

5.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, e os dados foram submetidos a análise de variância. Para comparação das médias dos tratamentos foi utilizado o teste de Tukey. Para homogenizar as variâncias dos grupos experimentais e normalizar as respostas da expressão do gene *seb*, estes dados foram submetidos a uma transformação logarítmica antes de analisados. O nível de significância utilizado em todos os testes foi de 5%.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ANÁLISES REALIZADAS COM OS MICRORGANISMOS

Os microrganismos, adquiridos da Fundação Osvaldo Cruz, foram escolhidos de acordo com os fatores de virulência em estudo, porém, não havia informações se as cepas apresentavam fatores cruzados. Por isso, as cepas foram testadas previamente quanto a formação de biofilme e resistência à meticilina. Após os testes e escolhidas as cepas a serem utilizadas, foram realizadas as análises para determinar a concentração de AIA, associado ou não à HRP, capaz de inibir 90% do crescimento bacteriano (concentração mínima inibitória).

6.1.1 Determinação quantitativa da formação de biofilme

Os valores de D.O. apresentados pelos microrganismos foram comparados com aqueles apresentados por Christensen et al.(1985) e, de acordo com a visualização da coloração azul intensa, característica da interação das bactérias aderidas no fundo da placa com o Cristal Violeta, observou-se que somente a cepa ATCC 6538 formou biofilme (Figura 21). As outras cepas de *S. aureus*, empregadas neste estudo, apresentaram resultados negativos para o teste.

Figura 21 - Avaliação visual da capacidade de formação de biofilme pelas cepas de *S. aureus* incubadas e expostas ao corante cristal violeta. Linhas de **A-D** e de **E-H** representam as repetições de dois cultivos diferentes da mesma cepa. Colunas: **1-2** cepa ATCC 12228; **3-4** cepa ATCC 6538; **5-6** cepa ATCC 14458; **7-8** cepa ATCC 29213; **8-10** cepa ATCC 25923; **11-12** cepa ATCC 43300.

O resultado observado visualmente foi confirmado pela leitura da densidade óptica a 570 nm (Tabela 3). Os resultados mostraram forte aderência da cepa ATCC 6538 ($DO \geq 0,240$) e não aderência das demais cepas utilizadas ($DO \leq 0,120$).

A produção de biofilme apresentada pela cepa ATCC 6538 corrobora com os resultados de McLaughlin; Hoogewerf (2006) e Toté et al. (2008). Assim como a não aderência da cepa 12228 (*Staphylococcus epidermidis*), descrita anteriormente por Oliveira et al. (2006) também foi visualizada aqui neste estudo.

Stepanovic et al. (2000), McLaughlin; Hoogewerf (2006) e Schillaci et al. (2010) descrevem a cepa ATCC 25923 como produtora de biofilme. Porém, no teste de quantificação de biofilme aqui utilizado, esta não apresentou características de aderência.

Tabela 3 Quantificação de biofilme das cepas certificadas

cepa	Densidade óptica (D. O.)	Aderência em placa de poliestireno
ATCC 12228	0,04±0,02	Não aderente
ATCC 6538	0,45±0,02	Fortemente aderente
ATCC 14458	0,03±0,01	Não aderente
ATCC 43300	0,05±0,01	Não aderente
ATCC 29213	0,04±0,01	Não aderente
ATCC 25923	0,03±0,01	Não aderente

Os resultados estão expressos como médias $\pm$ erro padrão para oito leituras obtidas de dois ensaios diferentes. A aderência em placa de poliestireno foi agrupada em categorias, de acordo com a reação: não aderente (D.O. $\leq$ 0,120), fracamente aderente (D.O. 0,120 a 0,240) e fortemente aderente (D.O. $\geq$ 0,240) (CHRISTENSEN et al., 1985).

6.1.2 Teste de sensibilidade a antimicrobianos (antibiograma)

A sensibilidade das cepas de *S. aureus*, no presente estudo, foi testada pelo método de difusão em disco. Observou-se a formação de halo de inibição do disco contendo o antibiótico, sem o surgimento de colônias dentro desses halos (Figura 22).

De acordo com a tabela padrão interpretativa de zona/halos de inibição, fornecida pelo fabricante dos discos para antibiograma, determinou-se a sensibilidade ou resistência das cepas estudadas aos antibióticos utilizados (Tabela 4).

Figura 22 - Placas de petri com meio ágar Muller-Hinton, 24 horas após a incubação com os discos de antibióticos. Penicilina (PEN, 10 µg), oxacilina (OX, 1 µg), cefoxitina (CFO, 30 µg), ampicilina (AMP, 10 µg), gentamicina (1GEN, 10 µg), metilicina (MET, 5 µg).

A cepa ATCC 6538 assim como a cepa ATCC 25923, foi sensível a todos os antibióticos testados, enquanto que a cepa ATCC 43300 apresentou resistência a todos os antibióticos, inclusive à oxacilina. A sensibilidade à metilicina observada na cepa ATCC 25923 corrobora com Saiful et al. (2006) e Skov et al. (2009) que observaram a ausência do gene *mecA* nesta cepa.

Tabela 4 - Antibiógrama baseado no diâmetro do halo de difusão do disco de penicilina (PEN), oxacilina (OX), cefoxitina (CFO), ampicilina (AMP), gentamicina (GEN), metilicina (MET) na placa de petri contendo ágar Muller-Hinton após 24 horas de incubação das cepas de *S. aureus*.

Cepa	PEN	OX	CFO	AMP	GEN	MET
ATCC 6538	S	S	S	S	S	S
ATCC 14458	R	S	S	R	S	R
ATCC 43300	R	R	R	R	R	R
ATCC 29213	R	S	S	R	S	S
ATCC 25923	S	S	S	S	S	S

A letra R representa a resistência e S representa a sensibilidade do microrganismo aos antibióticos testados baseado no diâmetro. Os resultados foram expressos baseados na comparação entre os valores do diâmetro do halo de difusão do disco em relação à tabela padrão fornecida pelo fabricante (n=2).

Já a cepa ATCC 14458, apresentou resistência à penicilina, ampicilina e metilicina, enquanto que a cepa ATCC 29213 apresentou resistência a penicilina e ampicilina. Esta última não apresenta o gene *mecA*, como comprovado por Saiful et al. (2006). Estes autores realizaram estudos para detectar a presença de isolados resistentes à metilicina (MRSA) em *Staphylococcus aureus* isolados de casos hospitalares da Malásia e obtiveram, através do procedimento de PCR, este resultado.

Pelo mesmo método de análise, Skov et al. (2009), observaram que a cepa ATCC 43300 apresenta o gene *mecA*, que lhe confere resistência à metilicina. Portanto, a cepa ATCC 29213, que se apresentou sensível à oxacilina como observado anteriormente por Saiful et al. (2006), pode ser utilizada como controle negativo para a cepa ATCC 43300 nos testes em que for necessário constatar a presença ou ausência do gene *mecA*.

A susceptibilidade à oxacilina está presente em isolados de *S. aureus* MRSA provenientes de ovelhas (VAUTOR et al., 2007) e em amostras provenientes de pacientes em tratamento de infecções respiratórias (ALMER et al., 2002).

A resistência à cefoxitina, observada para a cepa ATCC 43300, prediz a expressão do gene *mecA* melhor do que a resistência à meticilina ou oxacilina (PALAZZO et al., 2007; SKOV et al., 2009).

Piechowicz et al. (2008), observaram alta taxa de sensibilidade aos antibióticos β -lactâmicos utilizados no controle de mastites bovinas causadas por *S. aureus* (ceftriaxona = 81,60%, oxacilina= 84,85%, ampicilina = 72,28% e amoxicilina = 61,49%), assim como Peixoto et al. (2010) ao analisar amostras de *Staphylococcus* spp., provenientes de amostras de leite de rebanhos ovinos e caprinos (ceftriaxona = 81,60%, oxacilina= 84,85%, ampicilina = 72,28% e amoxicilina = 61,49%), sendo que o menor perfil de sensibilidade foi registrado para o antibiótico ácido nalidíxico.

Nader F^o et al. (2007) realizaram o teste de sensibilidade antimicrobiana de 72 cepas de *S. aureus* isoladas do leite de vacas com sinais de mastite e observaram que os princípios ativos que apresentaram maior sensibilidade foram a gentamicina (98,6%), oxacilina (84,7%), ampicilina (72,2%) e a penicilina (2,8%), assim como o observado neste estudo com cepas certificadas onde a gentamicina, cefoxitina e oxacilina apresentaram maior sensibilidade enquanto que a penicilina e ampicilina foram os de menor sensibilidade.

Em estudo realizado com 291 isolados de *Staphylococcus* spp., vindos de rebanhos bovinos leiteiros da região de Pernambuco, Medeiros et al. (2009) encontraram 28,9% de *S. aureus*, dentre os isolados. Foram realizados testes de sensibilidade antimicrobiana, utilizando os antibióticos ampicilina, amoxicilina, cloxacilina, cefquinome e cephalonium, todos pertencentes ao grupo dos β -lactâmicos. A ampicilina foi o antibiótico que apresentou menor percentual de sensibilidade enquanto, cefquinome e cephalonium apresentaram os melhores resultados. Isto se deve ao fato de que a ampicilina é um antibiótico de amplo espectro, o que leva ao uso indiscriminado do medicamento, podendo causar resistência.

Estes resultados confirmam que a escolha aleatória de um antimicrobiano não implica no sucesso do tratamento, principalmente em propriedades onde o uso é freqüente e inadequado. O conhecimento do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de *S. aureus*, de casos de mastite, torna a escolha do medicamento mais eficaz, dificultando o surgimento de cepas resistentes.

Como descrito anteriormente (item 6.1), após realizados os testes de formação de biofilme e resistência à metilicina, foram determinadas as cepas que seriam utilizadas nos testes a seguir. Assim, as cepas utilizadas e seus respectivos fatores de virulência podem ser melhor visualizados na tabela 5. A cepa ATCC 25923 foi excluída do estudo, pois as demais cepas já atendem as necessidades da pesquisa.

Tabela 5 Cepas utilizadas no estudo e seus respectivos fatores de virulência.

cepa	Fator de virulência
ATCC 6538	Produtor de biofilme
ATCC 14458	Portador do gene <i>seb</i>
ATCC 43300	Portador do gene <i>mecA</i>
ATCC 29213	Controle negativo

6.1.3 Determinação de CIM de AIA com a utilização do corante resazurina

A placa de poliestireno de 24 *well*, para a determinação de CIM de AIA, na ausência e presença de HRP 1 μ M, com a utilização do corante resazurina, foi preparada de acordo com a metodologia (item 5.3.3). Os resultados de inibição do crescimento das cepas de *S. aureus* são apresentados na Figura 23, sendo a cor púrpura representativa da inibição do crescimento

bacteriano e o aparecimento da cor rosa registrada como crescimento do microrganismo (SARKER et al., 2007), pois a resazurina (fenoxazin-3-ona) é um corante que indica uma oxido-redução (PALOMINO et al., 2002; MONTEJANO et al., 2005). O uso de um indicador colorimétrico para determinar a atividade bacteriana pode eliminar a necessidade de um leitor espectrofotométrico (LANGFIELD et al., 2004)

Os resultados dos ensaios denominados controles, realizados na ausência do microrganismo, mostraram que o AIA 70 mM, HRP 1µM ou ambos, simultaneamente, não interferem na coloração púrpura característica do teste (D5 e D6). Na linha A e coluna 4 (A4) observa-se o crescimento do microrganismo, avaliado pela coloração rósea, mostrando que as condições utilizadas no estudo estão adequadas. Já em A5 observa-se a inibição do crescimento do microrganismo devido à presença de gentamicina (9,4 µg/mL). A inibição por esta dose de antibiótico (gentamicina 9,4 µg/mL) foi positiva para as cepas ATCC 6538, 14458 e 29213 e negativo para as cepas ATCC 29213 e 43300, resultados similares aos encontrados no teste do antibiograma. Na última coluna da primeira linha (A6), observa-se a cor rosa para todas as cepas empregadas no presente estudo, mostrando que a enzima HRP, sozinha, não interfere no crescimento do *S. aureus*.

A partir da linha B da Figura 23, observam-se os resultados do crescimento do microrganismo incubado em meio contendo AIA, concentrações crescentes, na ausência ou presença de HRP; sendo a cor rosa persistente até a concentração de 30 mM de AIA (de B1 até D3) para a cepa ATCC 6538 (biofilme positivo), até a concentração de 40 mM de AIA (de B1 à D5) para a cepa ATCC 14458 (*tst* positivo) e até a concentração de 50 mM de AIA (de B1 à E1) para as outras duas cepas ATCC 43300 (*mecA* positivo) e ATCC 29213; sendo que a partir dos pontos estabelecidos acima observou-se a ocorrência da cor púrpura, representativa da inibição do crescimento bacteriano. Conclui-se que o CIM para as cepas

ATCC 6538 foi de 40 mM de AIA, para a cepa ATCC 14458 foi de 50 mM de AIA e para as cepas ATCC 43300 e 29213 foi de 60 mM de AIA.

Figura 23 - Determinação da concentração mínima inibitória com a utilização da solução indicadora resazurina em meio TSB na presença de: AIA 70 mM + HRP 1uM (A1); AIA 70 mM (A2); HRP 1uM (A3); *S. aureus* (A4); *S. aureus* + gentamicina 9,4 µg/mL (A5); *S. aureus* + HRP 1uM (A6); *S. aureus*, a partir da linha B, na ausência (colunas ímpares) ou presença (colunas pares) de HRP 1uM contendo AIA 0,5 mM (B1 e B2), 4mM (B3 e B4), 10 mM (B5 e B6), 20 mM (C1 e C2), 30 mM (C3 e C4), 40 mM (C5 e C6), 50 mM (D1 e D2), 60 mM (D3 e D4) e 70 mM (D5 e D6). Seta indica MIC para o AIA na ausência de HRP. (n=2)

Os resultados apresentados na figura 23 evidenciam a ação potencializadora da HRP sobre o efeito bacteriostático do AIA em *S. aureus*, cultivados em TSB. Isto é visível entre as colunas 5 e 6, na linha C (5C e 6C) de ATCC 6538 e ATCC 14458 da figura 23. Elas apresentam resultados de AIA 40 mM (5C) e AIA 40 mM/HRP 1µM, respectivamente.

Entretanto, para ATCC 43300 e ATCC 29213, da figura 3 esta diferenciação não foi claramente visível. Portanto, a utilização do teste colorimétrico, nas condições deste estudo, não foi totalmente conclusiva, visto que a coloração é um pouco confusa nas cepas ATCC 43300 e 29213.

6.1.4 Determinação da CIM de AIA com a utilização de espectrofotômetro

Após o tempo de incubação, as microplacas, preparadas de acordo com a metodologia (item 5.4.2), foram submetidas à leitura da densidade óptica (D.O.), no leitor de microplacas a 625 nm, e estes valores foram utilizados para avaliar a porcentagem de inibição e para a confecção de uma curva de crescimento dos microrganismos.

O AIA apresentou ação inibitória sobre o crescimento das quatro cepas utilizadas no presente estudo. A concentração de AIA ou de AIA/HRP que inibiu, no mínimo, 90% do crescimento microbiano, variou entre os microrganismos estudados (Tabela 6).

Com a utilização de concentrações menores de AIA (0,5 mM; 4 mM e 10 mM), não associado à HRP, houve um discreto crescimento bacteriano para as cepas ATCC 6538 (5,51%; 0,67% e 0,93%, respectivamente) e ATCC 29213 (5,23%; 0,11%, e 1,01%, respectivamente). Para a cepa ATCC 14458, somente as duas primeiras doses (0,5 mM e 4 mM) apresentaram efeito semelhante (3,70% e 6,52%). Diferente das demais, a cepa ATCC 43300 teve diminuição na proliferação bacteriana em todas as concentrações utilizadas (Tabela 6).

Diferente das demais, a cepa ATCC 29213 apresentou crescimento microbiano de 0,33% e 0,05%, com a utilização de AIA 0,5 mM e 4 mM, associado à HRP. Provavelmente,

estas doses iniciais de AIA, associadas à HRP, para a cepa ATCC 29213, não foram suficientes para a formação de espécies reativas de oxigênio.

Observando os gráficos (figura 24), verifica-se uma diminuição gradativa do crescimento dos microrganismos com a utilização de AIA ou de AIA associado à HRP, apresentando um crescimento inversamente proporcional, ou seja, quanto maior a concentração de AIA, menor o crescimento microbiano.

Para as concentrações maiores de AIA, independente da presença de HRP, ou seja, à partir de 50 mM de AIA, é possível observar que o crescimento é nulo.

A diminuição do crescimento bacteriano observado pela exposição do microrganismo ao sistema AIA/HRP, pode ser devido à ação prooxidante do sistema AIA/HRP, que leva à um aumento da formação das espécies reativas de oxigênio (CANDEIAS et al., 1995; ESCOBAR et al., 1992), que se apresentam como potentes radicais citotóxicos (FOLKES; WARDMAN, 2001). Portanto, é sabido que esta interação (AIA/HRP) atua na morte celular porém, a atuação somente do AIA, sobre a morte celular, necessita de melhores reflexões.

A concentração inibitória mínima de AIA variou entre as cepas estudadas (Tabela 7), apresentando a mesma concentração (AIA 50 mM) somente para as cepas ATCC 14458 e ATCC 29213. Para a cepa ATCC 6538, a concentração de AIA considerada como CIM foi de 40 mM e para a cepa ATCC 43300, foi de 60 mM.

Tabela 6 – Porcentagem de inibição

Concentração (AIA)	ATCC 6538		ATCC 14458		ATCC 43300		ATCC 29213	
	% de inibição		% de inibição		% de inibição		% de inibição	
	AIA	AIA/HRP (1 µM)	AIA	AIA/HRP (1 µM)	AIA	AIA/HRP (1 µM)	AIA	AIA/HRP (1 µM)
0,5	-5,51	5,94	-3,70	7,19	1,33	6,92	-5,23	-0,33
4	-0,67	4,63	-6,52	6,84	11,73	31,40	-0,11	-0,05
10	-0,93	6,08	7,75	20,09	25,29	36,10	-1,01	0,97
20	27,34	37,29	26,12	32,74	26,73	37,71	9,00	14,03
30	63,69	89,37	51,92	68,35	47,64	59,33	27,26	49,81
40	97,17	100,21	76,15	91,34	65,94	75,64	63,15	83,53
50	99,06	100,19	91,05	99,46	83,77	99,85	93,57	98,09
60	99,16	100,04	97,20	100,12	93,97	100,04	99,16	100,20
70	98,65	100,03	99,51	99,79	99,23	99,98	99,81	100,00

Valores em negrito indicam a concentração inibitória mínima (CIM) para as diferentes cepas estudadas (n=8)

Figura 24 - Ação de AIA na ausência e presença de HRP (1 μ M) sobre as unidades formadoras de colônias, em meio líquido por 24 horas, de *S. aureus* biofilme positivo (ATCC 6538), gene *tst* positivo (ATCC 14458), gene *mecA* positivo (43300) e para a cepa ATCC 29213 (biofilme negativo, gene *tst* negativo e gene *mecA* negativo). Valores expressos como média $\pm$ erro padrão. (n=8)

Tabela 7 – Concentrações de AIA e AIA/HRP (CIM).

Cepas Certificadas	AIA (mM)	SIST (AIA mM/HRP 1 μ M)
ATCC 6538	< 40	< 40
ATCC14458	< 50	<40
ATCC 43300	<60	<50
ATCC 29213	< 50	< 50

Os valores indicam a dose necessária para inibir 90% do crescimento bacteriano.

As doses de AIA e de AIA associado ou não à HRP, capazes de inibir o crescimento bacteriano, permanecem as mesmas para as cepas ATCC 6538 (AIA 40 mM) e ATCC 29213 (AIA 50 mM). Para as cepas ATCC 14458 e ATCC 43300, a associação com a HRP teve um efeito mais evidente, apresentando uma diminuição de 10 mM na concentração de AIA que inibiu 90% do crescimento bacteriano, sendo 40 mM e 50 mM, respectivamente.

Os valores de D.O. utilizados para os demais cálculos da determinação da concentração inibitória mínima estão apresentados na Tabela 8.

Observando os dados apresentados na Tabela 8, verifica-se que a associação com HRP (1 μ M) com AIA 30 mM foi significativa ($p \leq 0,05$) para todas as cepas, enquanto que a associação com AIA 20 mM e 70 mM não apresentou diferença significativa na redução da proliferação bacteriana.

Para a cepa ATCC 6538, a adição de HRP 1 μ M foi significativa somente na concentração de AIA 30 mM ($p \leq 0,05$), não apresentado o mesmo efeito nas outras concentrações de AIA utilizadas.

Quando utilizou-se a cepa ATCC 29213 incubada com as concentrações de AIA 0,5 mM; 30 mM; 40 mM e 50 mM, associado ao HRP 1 μ M, o efeito de AIA foi potencializado pela peroxidase 1 μ M ($p \leq 0,05$).

Foi observado que a peroxidase não teve efeito significativo sobre o AIA ($p \geq 0,05$) quando este foi utilizado nas concentrações 20 mM e 70 mM, com a cepa ATCC 14458. Este resultado também foi observado para a cepa ATCC 43300, sendo que, para esta, a concentração de AIA 0,5 mM também não foi influenciada, significativamente, ($p \geq 0,05$) pela associação com HRP 1 μ M.

A determinação de CIM com a utilização de espectrofotômetro é mais conclusiva que aquela onde se utiliza o corante resazurina. Entretanto, as concentrações de AIA capazes de inibir o crescimento bacteriano, nas condições deste estudo, foram similares para ambos os métodos.

Pode-se afirmar que o AIA e o AIA/HRP tem efeito bacteriostático sobre os microrganismos, já que Brooks et al. (2009) definem bacteriostático como “termo referente à propriedade pela qual um agente biocida tem a capacidade de inibir a multiplicação bacteriana que recomeça com a retirada do agente”.

A ação bacteriostática do AIA, combinado com HRP, também foi observada por Pugine (2008) ao estudar *S. aureus* e por Cunha et al. (2010), estudando a alga *Prototheca zopfii*, ambos em meio mínimo (PBS). Nestes estudos a concentração de AIA foi de 1 mM e HRP 1 μ M, sendo que a concentração de HRP é idêntica a utilizada no estudo aqui apresentado; sem, entretanto, observar efeito antimicrobiano do AIA isoladamente. Outra diferença básica entre os estudos realizados por estes autores e os aqui apresentados consiste no meio de cultura e no tempo de exposição do microrganismo ao AIA ou AIA/HRP, sendo meio mínimo empregado por eles e o TSB referenciado no presente estudo. Por se tratar de meio mínimo, o tempo de exposição foi de 1,5h para *S. aureus* e 6h para *P. zopfii*.

Tabela 8 Valores de densidade óptica (D.O.) utilizados para determinação do MIC.

Concentração (AIA)	ATCC 6538 (D.O. 620 nm)		ATCC 14458 (D.O. 620 nm)		ATCC 43300 (D.O. 620 nm)		ATCC 29213 (D.O. 620 nm)	
	AIA	AIA/HRP (1 µM)	AIA	AIA/HRP (1 µM)	AIA	AIA/HRP (1 µM)	AIA	AIA/HRP (1 µM)
0	1,14 ± 0,07 ^a	1,14 ± 0,07 ^a	1,14 ± 0,07 ^a	1,14 ± 0,07 ^a	1,14 ± 0,07 ^a	1,14 ± 0,07 ^a	1,14 ± 0,07 ^a	1,14 ± 0,07 ^a
0,5	1,20 ± 0,07 ^a	1,07 ± 0,09 ^a	1,19 ± 0,02 ^a	1,07 ± 0,04 ^b	1,13 ± 0,03 ^a	1,07 ± 0,03 ^a	1,20 ± 0,02 ^a	1,15 ± 0,02 ^b
4	1,15 ± 0,08 ^a	1,09 ± 0,09 ^a	1,22 ± 0,01 ^a	1,07 ± 0,03 ^b	1,01 ± 0,02 ^a	0,79 ± 0,04 ^b	1,14 ± 0,02 ^a	1,15 ± 0,01 ^a
10	1,15 ± 0,06 ^a	1,07 ± 0,06 ^a	1,06 ± 0,03 ^a	0,92 ± 0,05 ^b	0,86 ± 0,03 ^a	0,74 ± 0,02 ^b	1,15 ± 0,01 ^a	1,13 ± 0,02 ^a
20	0,83 ± 0,08 ^a	0,71 ± 0,07 ^a	0,85 ± 0,03 ^a	0,78 ± 0,02 ^a	0,84 ± 0,05 ^a	0,72 ± 0,06 ^a	1,04 ± 0,05 ^a	0,99 ± 0,01 ^a
30	0,41 ± 0,07 ^a	0,12 ± 0,03 ^b	0,56 ± 0,03 ^a	0,37 ± 0,02 ^b	0,60 ± 0,02 ^a	0,47 ± 0,03 ^b	0,83 ± 0,05 ^a	0,58 ± 0,04 ^b
40	0,03 ± 0,02 ^a	0 ± 0,01 ^a	0,28 ± 0,03 ^a	0,11 ± 0,01 ^b	0,39 ± 0,02 ^a	0,29 ± 0,03 ^b	0,42 ± 0,03 ^a	0,19 ± 0,03 ^b
50	0,01 ± 0,01 ^a	0 ± 0,01 ^a	0,11 ± 0,01 ^a	0,02 ± 0,01 ^b	0,19 ± 0,04 ^a	0,01 ± 0,01 ^b	0,08 ± 0,03 ^a	0,03 ± 0,01 ^b
60	0,01 ± 0,01 ^a	0 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,01 ^a	0,01 ± 0,01 ^b	0,08 ± 0,02 ^a	0,01 ± 0,01 ^b	0,01 ± 0,01 ^a	0,01 ± 0,01 ^a
70	0,02 ± 0,01 ^a	0 ± 0,01 ^a	0,01 ± 0,01 ^a	0,02 ± 0,01 ^a	0,02 ± 0,01 ^a	0,01 ± 0,01 ^a	0,01 ± 0,01 ^a	0,01 ± 0,01 ^a

Médias na linha, para a mesma cepa, com letras diferentes, apresentam diferença ($P \leq 0,05$), pela análise de variância. Os valores foram expressos como média ± erro padrão.
(n=8)

A inibição do crescimento bacteriano com terapias alternativas têm sido o objetivo de vários estudos devido à crescente resistência microbiana às terapias atuais. Exemplos desta afirmação são os estudos sobre a utilização de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) e de extratos de própolis sobre o crescimento de microrganismos. A sensibilidade de amostras de *S. aureus*, isolados de casos de mastite bovina clínica e subclínica, ao extrato de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*), foi avaliado por Bezerra et al. (2009). Esta planta, característica da caatinga, pertence à família *Leguminosae* e demonstrou ação antimicrobiana, confirmando o potencial do extrato e sua possível utilização terapêutica. Os resultados de inibição do crescimento bacteriano por diferentes extratos de própolis foi apresentado por Pinto et al. (2001). Estes autores avaliaram a sensibilidade, *in vitro*, de amostras de *S. aureus* isoladas de leite de vacas com mastite, a diferentes extratos de própolis, na concentração de 100 mg/mL.

Pereira et al. (2009) avaliaram a ação antimicrobiana *in vitro* de extratos glicólicos de *Psidium guajava* L. (goiabeira), *Syzygium cumini* L. (jambolão), e *Pimpinella anisum* L. (erva-doce) sobre cepas certificadas de *S. aureus*, obtendo ação antimicrobiana destes extratos. A inibição foi também observada em cepas certificadas de *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* e *Bacillus atrophaeus* (esporos).

6.2 ANÁLISES REALIZADAS COM OS MICRORGANISMOS APÓS INCUBAÇÃO COM CONCENTRAÇÕES SUBINIBITÓRIAS DE AIA

Após as análises de identificação e de determinação da CIM (concentração capaz de inibir, no mínimo, 90% do crescimento bacteriano) de AIA, associado ou não à HRP,

descritas no item 6.1, foram realizados testes para verificar o efeito desta CIM sobre os microrganismos estudados e seus respectivos fatores de virulência.

Porém, foi observado que as UFC de bactérias vivas após a incubação com a CIM (concentração capaz de inibir, no mínimo, 90% do crescimento bacteriano) seria insuficiente para a realização dos testes posteriores. Assim, optou-se por utilizar a concentração imediatamente anterior à CIM, ficando estabelecida uma concentração subinibitória (concentração que apresentou uma porcentagem de inibição entre 50% e 60%) para cada uma das cepas (tabela 9).

Tabela 9 - Concentrações subinibitórias utilizadas nos testes após a determinação de CIM para as cepas estudadas.

Cepas cerificadas	AIA(mM), associado ou não à HRP
ATCC 6538	30
ATCC 14458	30
ATCC 43300	40
ATCC 29213	40

Foram utilizadas as mesmas concentrações de AIA quando este foi associado à HRP.

As cepas foram incubadas nas concentrações indicadas na tabela 9 e posteriormente testadas quanto a:

- determinação quantitativa da formação de biofilme;
- atividade das enzimas antioxidantes produzidas pelos microrganismos;
- integridade de DNA;
- integridade de membrana por citometria de fluxo;
- expressão do gene *seb*.

6.2.1 Determinação quantitativa da formação de biofilme

A ação de AIA ou de AIA/HRP sobre a produção de biofilme de *S. aureus* ATCC 6538 (biofilme positivo) foi avaliada na concentração pré-estabelecida como CIM (AIA 40 mM) e na concentração sub-inibitória (AIA 30 mM). A capacidade de formação de biofilme da cepa biofilme positivo não foi afetada pela incubação com AIA e AIA/HRP nas doses inibitória e sub-inibitória, avaliada pela visualização da cor azul (Figura 25) ou quantificada espectrofotometricamente (Tabela 10).

De acordo com os resultados apresentados na figura 25 é possível observar que a cor azul brilhante apareceu, independentemente da concentração de AIA, na coluna contendo apenas o microrganismo (coluna 3) e nas demais colunas onde o microrganismo foi incubado na presença de AIA, HRP ou AIA/HRP (4-7); sugerindo que a formação de biofilme pelo *S. aureus* não foi alterada pela exposição deste ao microbicida AIA.

Na Tabela 10, a formação de biofilme foi confirmada pelos valores da D.O., onde o ensaio contendo apenas a cepa ATCC 6538, biofilme positivo, apresentou $DO = 0,34$, caracterizando a cepa como altamente aderente (CHRISTENSEN et al., 1985). Os valores de D.O., avaliados após incubação com o AIA, ou com o sistema AIA/HRP (tratamentos), não apresentaram diferença em relação ao controle (ensaio contendo somente o microrganismo ATCC 6538). Neste teste, a cepa ATCC 29213 (biofilme negativo), foi utilizada como controle negativo, demonstrando uma D.O. menor que 0,012 como descrito por OLIVEIRA et al.(2006) e FOX et al. (2005).

Figura 25 - Ação de AIA e AIA/HRP sobre a capacidade de formação de biofilme pela cepa *S. aureus* ATCC 6538 (biofilme positivo) após incubação por 24 horas, seguida da exposição do microrganismo ao cristal violeta. Coluna: **1**- meio de cultura (TSB); **2**- cepa ATCC 12228 (controle negativo); **3-7**- cepa ATCC 6538 sendo **3**- controle (ausência de AIA ou AIA/HRP), **4**- AIA 30 mM, **5**- AIA 30 mM/HRP 1µM, **6**- AIA 40 mM, **7**- AIA 40 mM/HRP 1µM ; **8-12**- cepa ATCC 29213 sendo **8**- controle (ausência de AIA ou HRP), **9**- AIA 30 mM, **10**- AIA 30 mM/HRP 1µM, **11**- AIA 40 mM, **12**- AIA 40 mM/HRP 1µM. Linhas de **A-D** e de **E-H** representam as repetições de dois cultivos diferentes da mesma cepa (ou ensaio).

Tabela 10 – Quantificação de biofilme da cepa ATCC 6538 e ATCC 29213.

Cepa	Tratamento	D.O. em 570 nm	Aderência em placa de poliestireno
ATCC 6538	Controle	0,34 ± 0,03	Fortemente aderente
	AIA 30 mM	0,48 ± 0,01	Fortemente aderente
	AIA30 mM /HRP	0,49 ± 0,03	Fortemente aderente
	AIA 40 mM	0,44 ± 0,03	Fortemente aderente
	AIA 40 mM/HRP	0,33 ± 0,03	Fortemente aderente
ATCC 29213	Controle	0,02 ± 0,01	Não aderente
	AIA 30 mM	0,02 ± 0,01	Não aderente
	AIA 30 mM/HRP	0,02 ± 0,01	Não aderente
	AIA 40 mM	0,03 ± 0,01	Não aderente
	AIA 40 mM/HRP	0,01 ± 0,01	Não aderente

A capacidade de formação de biofilme foi avaliada pela D.O. em 570nm, após incubação por 24 horas nas diferentes doses de AIA e AIA/HRP, seguida da exposição do microrganismo ao corante cristal violeta. O controle representa o ensaio contendo apenas o microrganismo. Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão para oito leituras obtidas de dois ensaios diferentes. A aderência em placa de poliestireno foi agrupada em categorias, de acordo com a reação: não aderente (D.O. ≤ 0,120), fracamente aderente (D.O. 0,120 a 0,240) e fortemente aderente (D.O. ≥ 0,240) (CHRISTENSEN et al.,1985).

Schillaci et al. (2010), avaliando o efeito de *pyrrolomycins* (pertencente à família de antibióticos halogenados derivados de pirrol) sobre *Staphylococcus aureus* (cepas certificadas e isolados de leite de ovelhas), produtores de biofilme, obteve efeitos positivos na diminuição da formação de biofilme. Estes autores concluíram que pyrrolomycins e derivados sintéticos são promissores para o desenvolvimento de novos compostos químicos eficazes contra os biofilmes estafilocócicos.

A detecção de cepas de *Staphylococcus* spp. produtoras de biofilme é um importante procedimento para avaliação de fatores de virulência presentes em mastites patogênicas. Algumas evidências sugerem que *S. aureus* com capacidade de produzir biofilme, tem maior habilidade para iniciar e causar persistência em infecções intramamárias, podendo, ainda, proteger-se contra fagocitoses e terapias antibióticas (FOX et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006).

6.2.2 Atividade das enzimas antioxidantes produzidas pelos microrganismos

As amostras foram preparadas de acordo com o item 5.5.2 e a extração, de acordo com o item 5.5.2.1. Após a extração e quantificação das enzimas antioxidantes (item 5.5.2.2 e 5.5.2.3), os resultados de atividade da catalase e da superóxido dismutase, foram apresentados, respectivamente, nas Tabelas 11 e 12.

A atividade da enzima catalase, para a cepa ATCC 6538, não apresentou diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos e controle (1,04 mmol/min/mg de proteína) ou entre os tratamentos (1,07 mmol/min/mg de proteína, para AIA 30 mM e 0,91 mmol/min/mg de proteína para AIA 30 mM associado à HRP) . Esta cepa apresenta atividade inicial de

catalase (controle) maior que as demais (1,04 mmol/ min/ mg de proteína contra 0,16; 0,17 e 0,19 mmol/min/mg de proteína das cepas ATCC 14458, 43300 e 29213, respectivamente, nas médias de controle), porém, a diferença significativa do controle em relação aos tratamentos foi observada somente nas outras cepas avaliadas.

Para a cepa ATCC 14458, os tratamentos diferiram significativamente do controle (0,16 mmol/min/mg de proteína). Os tratamentos apresentaram valores de 0,54 mmol/min/mg de proteína para AIA 30 mM e 0,39 mmol/ min/ mg de proteína para AIA 30 mM/HRP (1 μ M), sem apresentar diferença significativa entre eles. A maior atividade enzimática foi observada para o tratamento AIA não associado à HRP.

Resultado semelhante foi mostrado pela cepa ATCC 29213. Esta apresentou atividade enzimática inicial (controle) de 0,19 mmol/min/mg de proteína enquanto que para os tratamentos, estes valores foram de 0,55 e 0,53 mmol/min/mg de proteína para AIA e AIA/HRP, respectivamente. Portanto, o controle diferiu ($P < 0,05$) dos tratamentos, mas, entre os tratamentos, não houve diferença ($P > 0,05$).

Na avaliação da atividade enzimática da catalase para a cepa ATCC 43300, observou-se diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos e, destes, em relação ao controle. A atividade para o controle foi de 0,17 mmol/ min/ mg de proteína, aumentando para 1,05 mmol/min/mg de proteína para o tratamento AIA. Para AIA/HRP, a atividade foi de 0,28 mmol/min/mg de proteína. Somente a cepa ATCC 43300 apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos (AIA e AIA/HRP). Para as outras cepas, a diferença apresentada é apenas numérica.

Tabela 11 - Ação de AIA na ausência e presença de HRP 1µM sobre a atividade da catalase de *S. aureus*, avaliada após incubação por 24 horas.

Cepas certificadas	Tratamentos				
	Controle	AIA 30 mM	AIA 30 mM/HRP 1µM	AIA 40 mM	AIA40 mM/HRP 1µM
ATCC 6538	1,04 ± 0,09 ^a	1,07 ± 0,09 ^a	0,91 ± 0,08 ^a	-	-
ATCC 14458	0,16 ± 0,02 ^a	0,54 ± 0,06 ^b	0,39 ± 0,04 ^b	-	-
ATCC 43300	0,17 ± 0,01 ^a	-	-	1,05 ± 0,08 ^b	0,28 ± 0,03 ^c
ATCC 29213	0,19 ± 0,02 ^a	-	-	0,55 ± 0,04 ^b	0,53 ± 0,04 ^b

Controle representa o ensaio contendo apenas o microrganismo. Resultados expressos em mmol/min/mg de proteína como médias ± erro padrão (n=9). Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, representam diferença significativa ($P \leq 0,05$), pela análise de variância.

Tabela 12 - Ação de AIA na ausência e presença de HRP 1µM sobre a atividade da superóxido dismutase (SOD) de *S. aureus*, avaliada após incubação por 24 horas.

Cepas certificadas	Tratamentos				
	Controle	AIA 30 mM	AIA 30 mM/HRP 1µM	AIA 40 mM	AIA 40 mM/HRP 1µM
ATCC 6538	103,21 ± 8,19 ^a	226,79 ± 21,21 ^b	268,09 ± 31,78 ^b	-	-
ATCC 14458	146,62 ± 8,17 ^a	208,96 ± 18,41 ^{ab}	262,89 ± 24,35 ^b	-	-
ATCC 43300	148,55 ± 10,37 ^a	-	-	289,16 ± 26,48 ^b	340,22 ± 53,61 ^b
ATCC 29213	113,59 ± 5,56 ^a	-	-	193,85 ± 18,47 ^b	284,97 ± 35,61 ^b

Controle representa o ensaio contendo apenas o microrganismo. Resultados expressos em U/mg de proteína como médias ± erro padrão (n=8). Letras minúsculas diferentes, na mesma linha, representam diferença significativa ($P \leq 0,05$), pela análise de variância.

Foi observada diferença ($P<0,05$), para todas as cepas estudadas, entre os microrganismos não tratados daqueles incubados com doses subinibitórias de AIA e AIA/HRP. Portanto, é possível afirmar que estes tratamentos induzem o aumento da atividade da enzima catalase.

Ao avaliar a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), observou-se que os valores de atividade de SOD apresentaram-se crescentes, ou seja, os microrganismos incubados com AIA apresentaram maior atividade específica de SOD que o grupo controle ($P<0,05$). Também foi observado um aumento numérico da atividade de SOD do tratamento AIA/HRP em relação ao tratamento AIA, porém, este aumento não foi estatisticamente significativo.

A cepa ATCC 6538 iniciou com a atividade de SOD em 103,21 U/ mg de proteína (controle) . Esta atividade aumentou para 226,79 e 268,09 U/ mg de proteína para AIA e AIA/HRP, respectivamente. A diferença entre os valores de atividade apresentados pelos tratamentos em relação ao controle foi significativo ($P<0,05$) porém, entre os tratamentos, esta diferença significativa não foi observada ($P>0,05$).

O aumento da atividade de SOD, de acordo com os tratamentos, como apresentado para a cepa ATCC 6538 também foi observada para as cepas ATCC 43300 e ATCC 29213. A cepa ATCC 43300 iniciou a atividade em 148,55 U/ mg de proteína (controle), passando a 289,16 U/ mg de proteína (AIA) e 340,22 U/ mg de proteína (AIA/HRP) enquanto que a cepa ATCC 29213 iniciou a atividade em 113,59 U/ mg de proteína (controle), passou a 193,84 U/ mg de proteína (AIA) e 284,97 U/ mg de proteína (AIA/HRP). Ambas apresentaram diferença significativa ($P<0,05$) do tratamento em relação ao controle, porém a diferença apresentada entre os tratamentos não foi significativa ($P>0,05$).

De acordo com os resultados apresentados pela Tabela 12, é possível afirmar que, para a cepa ATCC 14458, o tratamento AIA/HRP (262,89 U/mg de proteína) diferiu

significativamente do controle (146,62 U/ mg de proteína) mas o tratamento AIA (208,79 U/ mg de proteína) não apresentou resultados conclusivos. Portanto, não se pode afirmar que este foi ou não diferente ($P < 0,05$) dos demais.

A atividade de SOD apresentou diferença do controle para os tratamentos AIA e AIA/HRP para todas as cepas, com exceção da cepa ATCC 14458.

Nos estudos realizados por Cunha et al. (2010), observou-se que a presença do sistema AIA/HRP, no meio de incubação da *Prototheca zopfii*, aumentou significativamente a atividade das enzimas antioxidante. No presente estudo, resultado semelhante foi observado, porém, para a atividade de catalase, somente a cepa ATCC 6538, não apresentou diferença significativa e, para a atividade de superóxido dismutase, a diferença não significativa somente foi observada para a cepa ATCC 14458.

Bactérias em cultura ou recém aderidas, quando expostas à antibióticos, geram mais espécies reativas de oxigênio do que aquelas instaladas em biofilmes. Isto ocorre devido ao crescimento aeróbico que estimula a produção de ERO enquanto que no crescimento anaeróbico ou microaeróbico, que se apresenta no interior dos biofilmes, o microrganismos baixa seu metabolismo oxidativo e, por consequencia, diminui o estresse oxidativo gerado pelas drogas (ALBESA et al., 2004).

6.2.3 Integridade do DNA

A integridade de DNA foi realizada de acordo com o item 5.5.3.

Foram utilizadas as concentrações inibitórias e sub-inibitórias de AIA, na ausência e presença de HRP 1 μ M, porém, não houve fragmentação do DNA das cepas estudadas (Figura

26 e 27) em nenhum dos tratamentos. O resultado foi avaliado em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio.

Este resultado sugere que o ácido indol-3-acético, associado ou não à peroxidase de raiz forte, atua na diminuição da proliferação de *S. aureus*, alterando a atividade específica de enzimas antioxidantes (CAT e SOD), mas sem induzir a fragmentação do DNA.

Figura 26. Ação do sistema AIA/HRP na integridade do DNA de *S. aureus* após 24 horas de incubação em TSB: **(a)** Padrão DNA 100 pares de base (pb); **(b)** *S. aureus* (6538) após incubação em TSB; **(c)** *S. aureus* (6538) após incubação na presença de AIA 30 mM; **(d)** *S. aureus* (6538) após a incubação na presença de AIA 30 mM e HRP 1 μ M; **(e)** *S. aureus* (6538) após incubação na presença de AIA 40 mM; **(f)** *S. aureus* (6538) após a incubação na presença de AIA 40 mM e HRP 1 μ M ; **(g)** *S. aureus* (14458) após incubação em TSB; **(h)** *S. aureus* (14458) após incubação na presença de AIA 40 mM; **(i)** *S. aureus* (14458) após a incubação na presença de AIA 40 mM e HRP 1 μ M; **(j)** *S. aureus* (14458) após incubação na presença de AIA 50 mM; **(l)** *S. aureus* (14458) após a incubação na presença de AIA 50 mM e HRP 1 μ M. (n=3)

Os dados observados neste estudo corroboram com os obtidos por Cunha (2010) que, ao estudar o comportamento da *Prototeca Zoffi*, também não observou fragmentação de DNA destes microrganismos incubados com AIA 1 mM associado à HRP (1 μ M). Resultados semelhantes foram apresentados por Pugine (2008), ao estudar isolados de *S. aureus*, provenientes de mastite bovina subclínica, expostos às mesmas concentrações de AIA/HRP.

Mori et al. (1987), observaram a inibição da síntese de DNA e RNA em *Proteus vulgaris* e *Staphylococcus aureus* tratados com flavonóides de plantas, principalmente *epigallocatechin* encontrado em *Elaeagnus glabra* (planta medicinal encontrada na região de Okinawa, Japão).

Figura 27. Ação do sistema AIA/HRP na integridade do DNA de *S. aureus* após 24 horas de incubação em TSB: **(a)** Padrão DNA 100 pares de base (pb); **(b)** *S. aureus* (43300) após incubação em TSB; **(c)** *S. aureus* (43300) após incubação na presença de AIA 40 mM; **(d)** *S. aureus* (43300) após a incubação na presença de AIA 40 mM e HRP 1 μ M; **(e)** *S. aureus* (43300) após incubação na presença de AIA 50 mM; **(f)** *S. aureus* (43300) após a incubação na presença de AIA 50 mM e HRP 1 μ M; **(g)** *S. aureus* (29213) após incubação em TSB; **(h)** *S. aureus* (29213) após incubação na presença de AIA 40 mM; **(i)** *S. aureus* (29213) após a incubação na presença de AIA 40 mM e HRP 1 μ M; **(j)** *S. aureus* (29213) após incubação na presença de AIA 50 mM; **(l)** *S. aureus* (29213) após a incubação na presença de AIA 50 mM e HRP 1 μ M. (n=3)

6.2.4 Integridade de membrana por citometria de fluxo

Os ensaios para integridade de membrana por citometria de fluxo foram realizados de acordo com o item 5.5.3. Os gráficos e valores resultantes deste teste (10000 eventos) podem ser visualizados na figura 28. Foram apresentados os valores de porcentagem de eventos. Os

eventos referem-se à microrganismos que apresentaram danos à membrana e foram aqui apresentados como "microrganismos danificados".

Analisando os resultados apresentados na figura 28 é possível observar que os microrganismos danificados da cepa ATCC 6538 foram de 6,59% para o controle, passando a 5,03% (HRP), 17,89% (AIA) e 32,70% (AIA/HRP). Houve diferença significativa do controle em relação aos tratamentos (HRP, AIA e AIA/HRP) para microrganismos danificados. Esta diferença significativa também foi observada entre todos os tratamentos.

A cepa ATCC 14458 apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) entre o controle e o tratamento AIA/HRP, não diferindo do tratamento HRP. Esta apresentou, para microrganismos danificados, 2,19% (controle), 4,99 % (HRP), 6,13% e 9,73% para AIA e AIA/HRP, respectivamente. Para o tratamento AIA, os resultados apresentados não foram conclusivos. Portanto, apesar da diferença numérica, não se pode afirmar se este tratamento diferiu ou não dos demais.

Para a cepa ATCC 43300, observou-se que o controle difere somente do tratamento AIA/HRP. Para os outros tratamentos AIA e AIA/HRP, houve uma diferença numérica (1,76% para HRP e 9,73% para AIA) mas esta não foi, estatisticamente, significativa ($P > 0,05$).

Os microrganismos danificados da cepa ATCC 29213 foram de 3,91% (controle), 1,36% (HRP), 13,46% (AIA) e 19,89% (AIA/HRP). Houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre o controle e os tratamentos (AIA e AIA/HRP), mas, entre estes tratamentos, esta diferença não foi observada ($P > 0,05$).

Para os microrganismos danificados estudados, a associação de AIA/HRP foi significativa ($P < 0,05$) para todas as cepas utilizadas neste estudo.

A cepa ATCC 6538 foi a única, neste estudo, que apresentou sensibilidade a todos os tratamentos, inclusive quando a HRP foi utilizada sozinha, indicando que esta cepa, apesar de

apresentar a capacidade de formar biofilme, é mais sensível do que as outras estudadas. Isto pode estar relacionado ao fato de que as cepas levam determinado tempo para organizar a matriz de polissacarídeos (ARCIOLA et al., 2001), ficando, neste espaço de tempo, mais desprotegidas em relação ao meio.

Através destes achados, pode-se afirmar que os microrganismos danificados, incubados com doses sub-inibitórias de AIA, na presença de HRP 1 μ M, apresentaram diferença ($P < 0,05$) do grupo controle, com maior porcentagem de bactérias inviáveis, semelhante ao resultado descrito por Pugine (2008) ao estudar a ação de AIA/HRP sobre a integridade de membrana de *S.aureus* incubados em PBS.

Portanto, o ácido indol-3-acético, associado ou não à HRP, não induz a fragmentação do DNA, mas induz danos na membrana dos microrganismos que levam à menor proliferação bacteriana já que diminui o número de indivíduos aptos à multiplicação sendo que, AIA e HRP, associados, induzem a uma diminuição mais evidente. Pugine (2008) e Cunha et al.(2010) também observaram que o sistema AIA/HRP foi eficiente na morte de microrganismos patogênicos, reduzindo sua integridade de membrana, sem alterar a integridade do DNA.

Moléculas similares ao AIA, como o indol-3-carbinol e 3-metileno-2-oxindol, apresentam ação tóxica para células procarióticas e eucarióticas (STILL et al., 1965). O indol-3-carbinol apresenta atividade antimicrobiana *in vitro*, pelo rompimento da estrutura que compõe a membrana celular, contra várias espécies de microrganismos como bactérias gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium*; gram-negativas, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*; e fungos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon beigelii* e *Candida albicans* (SUNG; LEE, 2007).

Figura 28 Integridade de membrana por citometria de fluxo. Os dados estão apresentados como % de eventos $\pm$ erro padrão. Médias, com letras diferentes, no mesmo gráfico, apresentam diferença significativa ($P \leq 0,05$). (n=8)

6.2.5 Expressão do gene *seb*

As amostras utilizadas foram obtidas de acordo com o item 5.5.5.1 e a extração de RNA, de acordo com o item 5.5.5.2. Na Figura 29, é possível observar as bandas 16 S e 23 S, que são correspondentes às regiões conservadas de bactérias (QUINN et al., 2005).

Após a extração do RNA (Figura 29) e tratamento deste com RNase, para posterior obtenção do DNAc (item 5.4.5.4), foram realizadas a análise de PCR-real time para quantificação do gene alvo (*seb*), conforme item 5.5.5.5 e a corrida em gel de agarose 1% (Figura 30), onde é possível identificar as diferentes bandas correspondentes ao gene *seb* (alvo com 154 pb) e gene *gyrB* (controle endógeno com 385 pb).

Figura 29. Extração do RNA total de *S.aureus* ATCC 14458 para análise da expressão da toxina SEB: **(a)** Padrão de RNA, **(b)** *S. aureus* após incubação em TSB, **(c)** *S. aureus* após incubação com AIA 30 mM e HRP (1 μ M).

Figura 30 Corrida em gel de agarose 1%, após análise de PCR-real time. **(a)** Padrão de RNA, **(b)** gene *gyr B* de *S.aureus* (ATCC 14458, controle), **(c)** gene *seb* de *S. aureus* (ATCC 14458). (n=3).

Na figura 31 é possível observar o efeito da incubação do microrganismo com a dose subinibitória de AIA, associado ou não à HRP. A utilização de HRP, sozinha, não altera a expressão do gene *seb*, quando comparado ao grupo controle ($P \geq 0,05$). Neste tratamento observamos que a cepa comporta-se de maneira semelhante àquelas do grupo controle, ou seja, àquelas que foram incubadas somente em TSB.

S. aureus incubado com a CIM de AIA, na ausência e presença de HRP 1 μ M, apresentaram menor expressão do gene alvo (*seb*) em comparação com o microrganismo incubado apenas com meio TSB ($P \leq 0,05$), conforme pode ser visto na figura 31. Estes tratamentos apresentaram 0,23 ciclos log para AIA e 0 ciclos log para AIA/HRP Apesar da diferença numérica entre os tratamentos AIA e AIA/HRP, estes não apresentaram diferença estatística entre si mas somente em relação aos tratamentos controle e HRP sozinha.

Figura 31 Expressão do gene *seb*

A redução na expressão do gene *seb* de cepas de *Staphylococcus aureus* também foi observada por Smith et al. (2010). Estes incubaram os microrganismos com uma dose subletal do antibiótico tigeclina e, após a incubação, realizaram a quantificação do gene *seb* por PCR-real time e confirmaram a redução na expressão gênica de *seb*.

A performance das novas terapias antibióticas não depende somente de sua atividade bactericida ou bacteriostática mas também de sua influência nos fatores de virulência. Assim, pode-se visualizar a importância da redução da expressão do gene *seb* da cepa estudada. Como exemplo podem ser citadas a linezolid (BERNARDO et al., 2004) e clindamicina, que, além de afetar o crescimento bacteriano, inibem a síntese de proteínas bacterianas, significando inibição da produção dos fatores de virulência, que incluem a proteína A, α -hemolina, SEA e SEB (QIU et al., 2010).

Ao induzir o aumento da atividade específica de enzimas antioxidantes (CAT e SOD), as concentrações sub-inibitórias de AIA, associadas ou não à HRP, levaram à uma diminuição na integridade de membrana dos microrganismos, diminuindo sua proliferação. O DNA se

manteve íntegro (pelo método de análise utilizado) mas a síntese de proteínas foi afetada, fazendo com que os microrganismos ATCC 14458, incubados com concentrações subinibitórias de AIA, na ausência e presença de HRP 1 μ M, apresentassem uma menor expressão das proteínas codificadas pelo gene *seb*.

Após as análises efetuadas, podemos dizer que a concentração sub-inibitória de AIA, na presença ou ausência de HRP apresentou os seguintes efeitos sobre as cepas de *Staphylococcus aureus* estudadas:

- ✓ biofilme não foi alterado;
- ✓ aumento da atividade específica das enzimas antioxidantes (catalase e superóxido dismutase);
- ✓ DNA manteve-se íntegro;
- ✓ Diminuição da integridade de membrana tendo como consequência a redução da proliferação bacteriana;
- ✓ Diminuição da expressão do gene *seb*.

7 CONCLUSÕES

A utilização de AIA ou de AIA/HRP em tratamentos *in vitro* é válida para elucidar os mecanismos de morte e viabilidade celular de bactérias, gerando informações que podem ser úteis na descoberta de novos produtos bactericidas ou bacteriostáticos para a utilização *in vivo*, seja em animais ou em humanos.

Estes resultados não elucidam o mecanismo bacteriostático de AIA, associado ao não à HRP sobre cepas de *S. aureus*, mas abrem caminhos para novos estudos pois a variação dos resultados, de acordo com a cepa utilizada, mostrou a riqueza de detalhes do universo bacteriano. Nele, um ser microscópico é capaz de “driblar” os mecanismos de ataque elaborados pelo homem, após anos de estudo, e desenvolver novas estratégias de defesa, permanência e ataque ao seu hospedeiro.

8 REFERÊNCIAS

AKINEDEN, O.; HASSAN, A. A.; SCHNEIDER, E.; USLEBER, E. Enterotoxigenic properties of *Staphylococcus aureus* isolated from goats' milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**., v. 124, p. 211-216, 2008.

ALBESA, I.; BECERRA, M. C.; BATTÁN, P. C.; PÁEZ, P. L. Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**., v. 317, p. 605-609, 2004.

ALMER, L. S.; SHORTRIDGE, V. D.; NILIUS, A. M.; BEYER, J. M.; SONI, N. B.; BUI, M. H.; STONE, G. G.; FLAMM, R. K. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 43, p. 225-232, 2002.

AMARAL, J. B.; CHARLES, T. P.; PAIVA e BRITO, M. A. V. Detecção de soroalbuminas e imunoglobulinas no leite bovino como indicadores de mastite subclínica. **Ciência rural**, v. 25, p. 93-97, 1995.

ARCIOLA, C.R.; BALDASSARI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. **Journal Clinical Microbiology**., v. 39, p. 2151-2156, 2001.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, p.113-123, 2006.

BARROW, G. I.; FELTHAM, R. K. **Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University, 1995. 331p.

BAZSÓ-DOMBI, E.; ORAVECZ, K.; JENEY, F.; NAGY, K.; ZS.-NAGY, I. On the useful role of OH⁻ free radicals in differentiation of cultured human fibroblasts. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v.31, p.233-242, 2000.

BECKER, K.; ROTH, R.; PETERS, G. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: Use of two multiplex PCR enzyme immunoassay for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.2548-2553, 1998.

BEENKEN, K. E.; DUNMAN, P. M.; McALEESE, F.; MACAPAGAL, D.; MURPHY, E.; PROJAN, S. J.; BLEVINS, J. S.; SMELTZER, M. S. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* biofilms. **Journal of bacteriology**, v.186, p.4665-4684, 2004.

BEERS, R.F.; SIZER, J.W. **Journal of Biological Chemistry**, v.195, p.133-140, 1952.

BERGER-BÄCHI, B.; ROHRER, S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. **Archives of Microbiology**, v.178, p.165-171, 2002.

BERGLUND, G. I.; CARLSSON, G. H.; SMITH, A. T.; SZÖKE, H.; HENRIKSEN, A.; HAJDU, J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. **Nature**, v.417, p.463-468, 2002.

BERNARDO, K.; PAKULAT, N.; FLEER, S.; SCHNAITH, A.; UTERMÖHLEN, O.; KRUT, O.; MÜLLER, S.; KRÖNKE, M. Subinhibitory Concentrations of Linezolid Reduce *Staphylococcus aureus* Virulence Factor Expression. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.546-555, 2004.

BEUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.44, p.276-287, 1971.

BEZERRA, D. A. C.; PEREIRA, A. V.; LÔBO, K. M. S.; RODRIGUES, O. G.; ATHAYDE, A. C. R.; MOTA, R. A.; MEDEIROS, E. S.; RODRIGUES, S. C. Atividade biológica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p.814-817, 2009.

BOZDOGAN, B.; APPELBAUM, P. C. Onxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. **International Journal of Antimicrobial agents**, v.23, p.113-119, 2004.

BRADFORD, M.M. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; SILVA, M. A. S.; CARMO, R. A. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, p.531-537, 2001.

BROOKS, G. F.; CARROL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Jawetz, Melnick e Adelberg. Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, v.1, 2009, 817p.

BUENO, V. F. F.; MESQUITA, A. J.; NICOLAU, E. S.; OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, J. P.; NEVES, R. B. S.; MANSUR, J. R. G.; THOMAZ, L. W. Contagem celular somática: relação com a composição centesimal do leite e período do ano no Estado de Goiás. **Ciência Rural**, v.35, p.848-854, 2005.

CANDEIAS, L. P.; FOLKES, L. K.; PORSSA, M.; PARRICK, J.; WARDMAN, P. Enhancement of lipid peroxidation by indole-3-acetic acid and derivatives: substituent effects. **Free Radical Research**, v.23, p.403-418, 1995.

CENTELLAS, A. Q.; FORTES, G. R. L.; MULLER, N. T. G.; ZANOL, G. C.; FLORES, R.; GOTTINARI, R. A. Efeito de auxinas sintéticas no enraizamento in vitro da macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.181-186, 1999.

CHAMBERS, H. F. Methicillin-resistant staphylococci. **Clinic Microbiology**, v.1, p.173-186, 1988.

CHRISTENSEN, G.D.; SIMPSON, W.A.; YOUNGER, J.J.; BADDOUR, L.M.; BARRETT, F.F.; MELTON, D.M.; BEACHEY, D.H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**, v.22, p.996-1006, 1985.

COELHO, M.L.V.; NASCIMENTO, J.S.; FAGUNDES, P.C.; MADUREIRA, D.J.; OLIVEIRA, S.S.; BRITO, M.A. V.P.; BASTOS, M.C.F. Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis **Instituto Pasteur**, v.158, p.625-630, 2007.

COELHO, S.M.O.; MORAES, R.A.M.; SOARES, L.C.; PEREIRA, I.A.; GOMES, L.P.; SOUZA, M.M.S. Mapeamento do perfil de resistência e detecção do gene *mecA* em

Staphylococcus aureus e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. **Ciência Rural**, v.37, p.195-200, 2007.

COSTA, E. O.; GANDRA, C. R.; PIRES, M. F.; COUTINHO, S. D.; CASTILHO, W.; TEIXEIRA, C. M. Survey on bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v.124, p.13-17, 1993.

CULLOR, J. S. The control, treatment and prevention of the various types of bovine mastitis. **Veterinary Medicine Food-Animal Practice**, p.571-579, 1993.

CUNHA, L.T.; PUGINE, S.M.P.; MONTEIRO, M.R.M.; COSTA, E.J.X; DE MELO, M.P. Microbicidal action of indole-3-acetic acid combined with horseradish peroxidase on *Prototheca zopfii* from bovine mastitis. **Mycopathologia**, v.169, p.99-105, 2010.

DALMAZZO, L. F. F.; SANTANA-LEMO, B. A.; JÁCOMO, R. H.; GARCIA, A. B.; REGO, E. M.; FONSECA, L. M.; FALCÃO, R. P. Antibody-targeted horseradish peroxidase associated with indole-3-acetic acid induces apoptosis *in vitro* in hematological malignancies **Leukemia Research**, v.35, p.657-662, 2011.

DE MELO, M. P. PITHON-CURI, T. C.; CURI, R; DI MASCIO, P.; CILENTO, G. Peroxidase activity may play a role in the cytotoxic effect of indole acetic acid. **Photochemistry and Photobiology**, v.65, p.338-341, 1997.

DE MELO, M. P.; LIMA, T. M.; PITHON-CURI, T. C.; CURI, R. The mechanism of indole acetic acid cytotoxicity. **Toxicology Letters**, v.148, p.103-111, 2004.

DIAZ, M. A. N.; ROSSI, C. C.; MENDONÇA, V. R.; SILVA, D. M.; RIBON, A. O. B.; AGUILAR, A. P.; MUÑOZ, G. D. Screening of medicinal plants for antibacterial activities

on *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, p.724-728, 2010.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P.M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, p. 16-34, 2000.

DOWNES, F. P.; ITO, H. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4.ed. Washington: American Public Health Association, 2001. p. 676.

DUNFORD, H. B. Horseradish peroxidase: Structure and kinetic properties. In: EVERSE, J.; EVERSE, K.; GRISHAM, M. B. **Peroxidases in Chemistry and Biology**, v.2, p.1-24, 1991.

ELLAH, M. R. A.; OKADA, K.; GORYO, M.; OISHI, A.; YASUDA, J. Superoxide dismutase activity as a measure of hepatic oxidative stress in cattle following ethionine administration. *The Veterinary Journal* (2008), doi:10.1016/j.tvjl.2008.05.013.

ESCOBAR, J. A.; VÁSQUEZ-VIVAR, J.; CILENTO, G. Free radicals and excited species in the metabolism of indole-3-acetic acid and its ethyl Ester by horseradish peroxidase and by neutrophils. **Photochemistry and Photobiology**, v.55, p.895-902, 1992.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v.34, p.1315-1320, 2004.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.61-68, 1997.

FERREIRA, L. M.; NADER FILHO, A.; OLIVEIRA, E.; ZAFALON, L. F.; SOUZA, V. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em casos de mastite subclínica bovina. **Ciência Rural**, v.36, p.1228-1234, 2006.

FERREIRA, W. A.; VASCONCELOS, W. S.; FERREIRA, C. M.; SILVA, M. F. P.; GOMES, J. S.; ALECRIM, M. G. C. Prevalência de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA) em pacientes atendidos em ambulatório de dermatologia geral em Manaus-Amazonas. **Revista de Patologia Tropical**, v.38, p.83-92, 2009.

FRANCO, B. G. M.; LANDGRAF, M. **Microniologia dos Alimentos**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2003, p. 181.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F.R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal Clinic Pathology**, v.42, p.872-874, 1989.

FREITAS, M. F. L.; LUZ, I. S.; SILVEIRA-FILHO, V. M.; P. Jr., J. W.; STAMFORD, T. L.M.; MOTA, R. A.; SENA, M. J.; ALMEIDA, A. M. P.; BALBINO, V. Q.; LEAL-BALBINO, T. C. Staphylococcal toxins genes in strains isolated from cows with subclinical mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, p.617-621, 2008.

FOLKES, L.K.; WARDMAN, P. Oxidative activation of indole-3-acetic acids to cytotoxic species – a potential new role for plant auxins in câncer therapy. **Biochemical Pharmacology**, v.61, p.129-136, 2001.

FOX, L.K.; ZADOKS, R.N.; GASKINS, C.T. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. **Veterinary Microbiology**, v.107, p.295-299, 2005.

FRIDOVICH, I. The biology of oxygen radicals. **Science**, v.201, p.875-880, 1978.

GAD, G. F. M.; EL-FEKY, M. A.; EL-REHEWY, M. S.; HASSAN, M. A.; ABOLELLA, H., EL-BAKY, R. M. A. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. **Jounal Infect Dev Ctries**, v.3, p.342-351, 2009.

GAD, G. F. M.; EL-GHAFAR, A.EL-DOMANY, R. A. A.; HASHEM Z. S. Epidemiology and antimicrobial resistance of staphylococci isolated from different infectious diseases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.333-344, 2010.

GORDON, S. A.; BARR, S.; FRY, R. J. M. Origin of urinary auxin in germfree and conventional mouse. **American Journal of Physiology**, v.222, p.399-403, 1972.

GRESHAM, H.D.; LOWRANCE, J.H.; CAVER, T.E.; WILSON, B.S.; CHEUNG, A.L.; LINDBERG, F.P. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. **Journal of Immunology**, v.164, p.3713-3722, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymology**, v.186, p.1-85, 1990.

HÉBERT, A.; SAYASITH, K.; SENÉCHAL, S.; DUBREUIL, P.; LAGACÉ, J. Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow Milk. **FEMS Microbiology Letters**, v.193, p.57-62, 2000.

HRSTKA, R. RUZICKOVA, V.; PETRAS, P.; PANTUCEK, R. ROSYPAL, S.; DOSKAR, J. Genotypic characterization of toxic shock syndrome toxin-1-producing strains of *Staphylococcus aureus* isolated in the Czech Republic. **International Journal of Medical Microbiology**, v.296, p.49-54, 2006.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VADENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINAR, G. *egc*, A highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **The Journal of Immunology**, v.166, p.669-677, 2001.

JONES, C. L.; KHAN, S. A. Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v.166, p.29-33, 1986.

JUREEN, R.; BOTTOLFSSEN, K. L.; GREWAL, H.; DIGRANES, A. Comparative evaluation of a commercial test for rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **APMIS**, v.109, p.787-790, 2001.

KAI, K.; HORITA, J.; WAKASA, K.; MIYAGAWA, H. Three oxidative metabolites of indole-3-acetic acid from *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, v.68, p.1651-1663, 2007.

KAMBOJ, D. V.; NEMA, V.; PANDEY, A. K.; GOEL, A. K.; SING, L. Heterologous expression of staphylococcal enterotoxin B (seb) gene for antibody production. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.9, p.551-558, 2006.

KIM, D.; JEON, S.; JEONG, Y.; KIM, S.; KWON, S.; PARK, K. Hydrogen peroxide is a mediator of indole-3-acetic acid/horseradish peroxidase-induced apoptosis. **FEBS Letters**, v.580, p.1439-1446, 2006.

KLOSS, W. E. Systematics and the natural history of staphylococci. **Journal of Applied Bacteriology**, v.69, p.25-37, 1990.

KOHNER, P.; UHL, J.; KOLBERT, C.; PERSING, D.; COCKERILL, F. Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* gene analysis for determining oxacilin (methicillin)

resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.9, p.551-558, 2006.

LACHICA, R. V. F.; GENIGEORGIS, C.; HOEPRICH, P. D. Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. **Applied Microbiology**, v.21, p.585-587, 1971.

LANGFIELD, R.D.; SCARANO, F.J.; HEITZMAN, M.E.; KONDO, M.; HMMOND, G.B.; NETO, C.C. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galioides*. **Journal Ethnopharmacol.**, v. 94, p. 279-281, 2004.

LaPLANTE, K. L.; RYBAKI, M. J. Impact of high-inoculum *Staphylococcus aureus* on the activities of nafcillin, vancomycin, linezolid, and daptomycin, alone and in combination with gentamicin, in an *in vitro* pharmacodynamic model. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.48, p.4665-4672, 2004.

LIBERTO, M. C.; MATERA, G.; QUIRINO, A.; LAMBERTI, A. G.; CAPICOTTO, R.; PUCCIO, R.; BARRECA, G. S.; FOCA, E.; CASCIO, A.; FOCA, A. Phenotypic and genotypic evaluation of slime production by conventional and molecular microbiological techniques. **Microbiological Research**, v.164, p.522-528, 2009.

LIN, H.; DECUYPERE, E.; BUYSE, J. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 144, p.11-17, 2006.

LOUIE, L.; MATSUMURA, S. O.; CHOI, E.; LOUIE, M.; SIMOR, E. Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.2170-2173, 2000.

MAC FADDIN, J. F. Pruebas bioquímicas para La identificación de bacterias de importância clínica. Buenos Aires: Editora Médica Panamericana, 1980, p. 301.

MACHÁCKOVÁ, I.; GANCEVA, K.; ZMRHAL, Z. The role of peroxidase in the metabolism of indole-3-acetic acid and phenols in wheat. **Phytochemistry**, v.14, p.1251-1254, 1975.

MACIEL, H. P. F.; GOUVÊA, C. M. C. P.; PASTORE, G. M. Obtenção de nova fonte de peroxidase de folha de *Copaifera langsdorffii* desf. com alta atividade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.735-739, 2006.

MAGALHÃES, H. R.; EL FARO, L.; CARDOSO, V. L.; PARO DE PAZ, C. C.; CASSOLI, L. D.; MACHADO, P. F. Influência de fatores de ambiente sobre a contagem de células somáticas e sua relação com perdas na produção de leite de vacas da raça Holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.415-421, 2006.

MARCHIORO, L. E. T. **Produção de ácido indol acetic e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. 2005. 74f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

McLAUGHLIN, R. A.; HOOGEWERF, A. J. Interleukin-1b-induced growth enhancement of *Staphylococcus aureus* occurs in biofilm but not planktonic cultures. **Microbial Pathogenesis**, v.41, p.67-79, 2006.

MEDEIROS, E. S.; MOTA, R. A.; SANTOS, M. V.; FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO Jr. J. W.; TELES, J. A. A. Perfil de sensibilidade microbiana *in vitro* de linhagens de *Staphylococcus spp.* isoladas de vacas com mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.569-574, 2009.

MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W.M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.1032-1035, 2000.

MEKA, V. G.; PILLAI, S. K.; SAKOULAS, G.; WENNERSTEN, C.; VENKATARAMAN, L.; DEGIROLAMI, P. C.; ELIOPOULOS, G. M.; MOELLERING Jr., R. C.; GOLD, H. S. Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. **The Journal of infectious diseases** , v.190, p.311-317, 2004.

MELCHIOR, M. B.; FINK-GREMMEELS, J.; GAASTRA, W. Extended antimicrobial susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis growing in biofilms. **Veterinary Microbiology** , v.125, p.141-149, 2007.

MENG, J.; WANG, H.; HOU, Z. CHEN, T.; FU, J.; MA, X.; HE, G.; XUE, X.; JIA, M.; LUO, X. Novel anion liposome-encapsulated antisense oligonucleotide restores susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and rescues mice from lethal sepsis by targeting *mecA*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** , v.53, p.2871-2878, 2009.

MERLINO, J.; WATSON, J.; ROSE, B.; BEARD-PEGLER, M.; GOTTLIEB, T.; BRADBURY, R.; HARBOUR, C. Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant and non-multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Central Sydney, Austrália. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** , v.49, p.793-801, 2002.

MILLS, M. H.; FINLAY, D. C.; HADDAD, P. R.. Determination of melatonin and monoamines in rat pineal using reversed-phase ion-interaction chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography Biomedical Applications**, v.564, p.93-102, 1991.

MIMICA, M. J.; BEREZIN, E. N.; CARVALHO, R. L. B.; MIMICA, I. M.; MIMICA, L. M. J.; SÁFADI, M. A. P.; SCHENEIDER, E.; CAIAFFA-FILHO, H. H. Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from pediatric patients: is the cefoxitin disk diffusion test accurate enough? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 11, p. 415-417, 2007.

MONTEJANO, H. A.; GERVALDO, M.; BERTOLOTTI, S. G. The excited states quenching of resazurin and resorufin and resorufin by *p*- benzoquinones in polar solvents. **Dyes and Pigments**, v. 64, p. 117-124, 2005.

MORI, A.; NISHINO, C.; ENOKI, N.; TAWATA, S. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. **Phytochemistry**, v.26, p.2231-2234, 1987.

NADER FILHO, A.; FERREIRA, L.M.; AMARAL, L.A.; JUNIOR ROSSI, O.D.; OLIVEIRA, R.P. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. **Arquivo Instituto de Biologia**, v.74, p.1-4, 2007.

NAGAHATA, H.; ITO, H.; MARUTA, H.; NISHIKAWA, Y.; SUSUKINO, H.; MATSUKI, S.; HIGUGHI, H.; OKUHIRA, T.; ANRI, A. Controlling highly prevalent *Staphylococcus aureus* mastitis from the dairy farm. **Theriogenology Journal of Veterinary Medicine Science**, v.69, p.893-898, 2007.

NEBE-VON-CARON, G.; STEPHENS, P. J.; HEWITT, C. H.; POWELL, J. R.; BADLEY, R. A. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. **Journal of microbiological methods**, v.42, p.97-114, 2000.

NEMA, V.; AGRAWAL, R.; KAMBOJ, D. V.; GOEL, A. K.; SINGH, L. Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. **International Journal of Food Microbiology**, v.117, p.29-35, 2007.

NEVES, M. C.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; ALVES, E. C. C.; LEMOS, M. V. F. Detecção de genes de resistência antimicrobiana em cromossomos e plasmídeos de *Staphylococcus* spp. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v.74, p.207-213, 2007.

NOVO, D. J.; PERLMUTTER, N. G.; HUNT, R. H.; SHAPIRO, H. M. Multiparameter flow cytometric analysis of antibiotic effects on membrane potential, membrane permeability, and bacterial counts of *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus*. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v.74, p.207-213, 2007.

OLIVEIRA, J. S.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; CHIANCA, T. C. M. Estudo da flora microbiana de pessoal de enfermagem de uma unidade de centro cirúrgico de um hospital universitário de belo Horizonte. **Revista Mineira de Enfermagem** , v.3, p.13-19, 1999.

OLIVEIRA, M.; BEXIGA, R.; NUNES, S.F.; CARNEIRO, C.; CAVACO, L.M; BERNARDO, F.; VILELA, C.L. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates **Veterinary Microbiology**, v.118, p.133-140, 2006.

OLIVEIRA, M.; NUNES, S. F.; CARNEIRO, C.; BEXIGA, R.; BERNARDO, F.; VILELA, C. L. Time course of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**, v.124, p.187-191, 2007.

PALAZZO, I. C. V.; REHDER, A.; DARINI, A. L. C. Quantitative disk diffusion as a convenient method for determining minimum inhibitory concentrations of oxacillin for staphylococci strains. **Journal of Microbiological Methods**, v.71, p.186-190, 2007.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46. n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PASCHOAL, J. J.; ZANETTI, M. A.; CUNHA, J. A. Suplementação de selênio e vitamina E sobre a contagem de células somáticas no leite de vacas da raça holandesa. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.2032-2039, 2003 (Supl. 2).

PEIXOTO, R. M.; FRANÇA, C. A.; JÚNIOR, A. F. S.; VESCHI, J. L.A.; COSTA, M. M. Etiologia e perfil de sensibilidade antimicrobiana dos isolados bacterianos da mastite em pequenos ruminantes e concordância de técnicas empregadas no diagnóstico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.735-740, 2010.

PEREIRA, A. R.; MACHADO, P. F.; SARRIES, G. A. Contagem de células somáticas e características produtivas em vacas da raça holandesa em lactação. **Scientia Agricola**, v.58, p.649-654, 2001.

PEREIRA, C. A.; VILELA, P. G. F.; OLIVEIRA, L. D.; JORGE, A. O. C. Ação antimicrobiana in vitro de extratos glicólicos de *Psidium guajava* L., *Syzygium cumini* L., e *Pimpinella anisum* L. **Revista do Instituto Adolf Lutz**, v.68, p.102-108, 2009.

PIECHOWICZ, L.; GARBACZ, K.; GALINSKI, J. *Staphylococcus aureus* of phage type 187 isolated from people occurred to be a genes carrier of enterotoxin C and toxic shock syndrome

toxin-1 (TSST-1). **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.211, p.273-282, 2008.

POCSFALVI, G.; CACACE, G.; CUCCURULLO, M.; SERLUCA, G.; SORRENTINO, A.; SCHLOSSER, G.; BLAIOTTA, G.; MALORNI, A.. Proteomic analysis of exoproteins expressed by enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. **Proteomics**, v.8, p.2462-2476, 2008.

PINTO, M. S.; FARIA, J. E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S. T. A.; PEREIRA, C. S.; GIOSO, M. M. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal Research and Animal Science**, v.38, p.278-283, 2001.

PUGINE, S.M.P. **Efeito do sistema ácido-3-acético/peroxidase de raiz forte sobre a viabilidade de *Staphylococcus aureus***. 2008. 95f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

PUGINE, S.M.P.; BRITO, P.P.; ALBA-LOUREIRO, T.C.; COSTA, E.J.X.; CURI, R. DE MELO, M.P. Effect of indole-3-acetic administration by gavage and by subcutaneous injection on rat leukocytes. **Cell Biochemistry and Function**, v.25, p.723-730, 2007.

QIU, J.; WANG, D.; XIANG, H.; FENG, H.; JIANG, Y.; XIA, L.; DONG, J.; LU, J.; YU, L.; DENG, X. (2010) Subinhibitory concentrations of thymol reduce enterotoxins A and B and α -hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates. PLoS ONE 5(3): e9736. doi: 10.1371/journal.pone.0009736.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, v. 1, 2005, 512 p.

RALL, V. L. M.; VIEIRA, F. P.; RALL, R.; VIEITIS, R. L.; FERNANDES Jr., A.; CANDEIAS, J. M. G.; CARDOSO, K. F. G.; ARAÚJO Jr., J. P. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. **Veterinary Microbiology**, v.132, p.408-413, 2008.

RYFFEL, C.; KAYSER, F. H.; BERGER-BACHI, B. Correlation between regulation of *mecA* transcription and expression of methicillin resistance in staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.36, p.25-31, 1992.

REISCHL, U.; LINDE, H.-J.; METZ, M.; LEPPMEIER, B.; LEHN, N. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.2429-2433, 2000.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.123-130, 2003.

RHODE, H.; KNOBLOCH, J. K.M.; HORSTKOTTE, M. A.; MACK, D. Correlation of biofilm expression types of *Staphylococcus epidermidis* with polysaccharide intercellular adhesin synthesis: evidence for involvement of *icaADBC* genotype-independent factors. **Medic Microbiology Immunology**, v.190, p.105-112, 2001.

RODE, T.M.; LANGSRUD, S.; HOLCK, A.; MORETRO, T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions **International Journal of Food Microbiology**, v.116, p.372-383, 2007.

ROVER Jr., L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v.24, p.112-119, 2001.

SÁ, M. E. P.; CUNHA, M. L. R. S.; ELIAS, A. O.; VICTÓRIA, C.; LANGONI, H. Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastitis subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, p.320-326, 2004.

SAIFUL, A.J.; MASTURA, M.; ZARIZAL, S.; MAZURAH, M.I.; SHUHAIMI, M.; ALI, A.M. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using mecA/nuc genes and antibiotic susceptibility profile of Malaysian clinical isolates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22, p.1289-1294, 2006.

SARKER, S.D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtite plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the vitro antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, v.42, p.321-324, 2007.

SCHILLACI, D.; PETRUSO, S.; RAIMONDI, M. V.; CUSIMANO, M. G.; CASCIOFERRO, S.; SCALISI, M.; LA GIGLIA, M. S.; VITAL, M. Pyrrolomycins as potential anti-staphylococcal biofilms agents. **Journal of Bioadhesion and biofilm researchs**, v.26, p.433-438, 2010.

SERGEEV, N.; VOLOKHOV, D.; CHIZHIKOV, V.; RASOOLY, A. Simultaneous analysis of multiple staphylococcal enterotoxin genes by an oligonucleotide microarray assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.2134-2143, 2004.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**, São Paulo: Livraria Varela, 2001, p. 317.

SMITH, K.; GOULD, K. A.; RAMAGE, G.; GEMMELL, C. G. HINDS, J.; LANG, S. Influence of tigecycline on expression of virulence factors in biofilm-associated cells of

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.380-387, 2010.

SOARES, L. C.; PEREIRA, I. A.; COELHO, S. M. O.; CUNHA, C. M. M.; OLIVEIRA, D. F. B.; MIRANDA, A. N.; SOUZA, M. M. S. Caracterização fenotípica da resistência a antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos isolados de amostras animais e humanas. **Ciência Rural**, v.38, p.1346-1350, 2008.

SOUZA, M. V.; REIS, C.; PIMENTA, F. C. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. **Revista de Patologia Tropical**, v.34, p.27-36, 2005.

SPERBER, W. H.; TATINI, S. R. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. **Applied Microbiology**, v.29, p.502-505, 1975.

SPEXOTO, A. A.; OLIVEIRA, C. A. F.; OLIVAL, A. A. Aplicação do sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle em propriedade leiteira tipo A. **Ciência Rural**, v.35, p.1424-1430, 2005.

SRINIVASAN, V.; SAWANT, A. A.; GILLESPIE, B. E.; HEADRICK, S. J.; CEASARIS, L.; OLIVER, S. P. Prevalence of enterotoxin and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. **Foodborne pathogens and disease**, v.3, p.274-283, 2006.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.41-45, 2006.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC- VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v.40, p.175-179, 2000.

STILL, C. C.; FUKUYAMA, T. T.; MOYED, H. S. Inhibitory oxidation products of indole-3-acetic acid. Mechanism of action and route of detoxification. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 240, p. 2612-2618, 1965

STRAÜBER, H.; MÜLLER, S. Viability States of Bacteria – Specific Mechanisms of Selected Probes. **Journal of the International Society for Advancement of Cytometry**, v.77A, p.623-634, 2010.

SUNG, W.S.; LEE, D.G. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.30, p.1865–1869, 2007.

SKOV, R.; SMYTH R.; YUSOF, A.; KARLSSON, A.; MILLS, K.; FRIMODT-MOLLER, N.; KAHLMETER, G. Effects of temperature on the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* using cefoxitin disc diffusion testing with Iso-Sensitest agar. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, p.699–703, 2009.

TOMASZ, A.; DRUGEON, H. B.; LENCASTRE, H. M.; JABES, D.; McDOUGALL, L.; BILLE, J. New mechanism for Methillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.33, p.1869-1874, 1989.

TOTÉ, K.; BERGHE, D.V.; MAES, L.; COS, P. A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. **Letters in Applied Microbiology**, v.46, p.249-254, 2008.

VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v.65, p.249-259, 2004.

VALDERRAMA, P.; MARANGONI, F.; CLEMENTE, E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, p.321-325, 2001.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZACOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, p.1-40, 2006.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M. K. M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K. S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v.92, p.179-185, 2003.

VAUTOR, E.; CARSENTI-DELLAMONICA, H.; SABAH, M.; MANCINI, G.; PÉPIN, M.; DELLAMONICA, P. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from dairy sheep farms (*agr* group, adherence, slime, resistance to antibiotics). **Small Ruminant Research**, v.72, p.197-199, 2007.

WARDMAN, P. Indole-3-acetic acids and horseradish peroxidase: a new produg/enzyme combination for targeted cancer therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v.8, p.1363-1374, 2002.

WATTS, J. L. Etiological agents of bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v.16, p.41-66, 1988.

ZANATTA, C. L.; ZOTARELLI, M. F.; CLEMENTE, E. Peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em polpa de goiaba (*Psidium guajava* R.). **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v.26, p.705-708, 2006.

ZSCHOCK, M.; BOTZLER, D.; BLOCHER, S.; SOMMERHAUSER, J.; HAMANN, H. P. Detection of genes for enterotoxins (*ent*) and toxic shock syndrome toxin-1 (*tst*) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase-chain-reaction. **International Dairy Journal**, v.10, p.569-574, 2000.