UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Inibição do sistema *quorum sensing* AI-1 por *Capsicum frutescens* e *Capsicum annuum* em bactérias Gram-negativas

Milagros Liseth Castillo Rivera

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Uelinton Manoel Pinto

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Inibição do sistema *quorum sensing* AI-1 por *Capsicum frutescens* e *Capsicum annuum* em bactérias Gram-negativas

Milagros Liseth Castillo Rivera

Versão corrigida da Dissertação/Tese conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Uelinton Manoel Pinto

São Paulo
2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletronico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

C352i

Castillo Rivera, Milagros Liseth
Inibição do sistema quorum sensing AI-1 por Capsicum frutescens e Capsicum annuum em bactérias Gram-negativas / Milagros Liseth Castillo Rivera. - São Paulo, 2018.
87 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Pinto, Uelinton Manoel

1. Quorum sensing. 2. Extratos orgânicos de pimentas. 3. Capsaicina. 4. Produção de violaceína. 5. Biofilmes bacterianos. I. T. II. Pinto, Uelinton Manoel , orientador.

Milagros Liseth Castillo Rivera

Inibição do sistema *quorum sensing* AI-1 por *Capsicum frutescens* e *Capsicum annuum* em bactérias Gram-negativas

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Uelinton Manoel Pinto
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Marcelo Palma Sircili
1° Examinador

Profa. Dra. Vanessa Bueris
2° Examinador

Profa. Dra. Maria Cristina Dantas Vanetti
3° Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2018.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, Mery e Fidencio, pela vida, o amor e o apoio constante e incondicional.

Aos meus irmãos Susan, Yeanella, Rocío e Carlos, por serem motivo de alegrías.

À profa. Bernadette D. G. M. Franco, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Microbiologia de Alimentos.

Ao prof. Uelinton Pinto por ter me aceitado como aluna. Por me dar a confiança de aprender sobre um tema totalmente novo para mim. Por cada sugestão e crítica durante este processo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financiero durante o mestrado.

À profa. Neuza Aymoto Hassimotto, pelo apoio e dedicação no preparo e avaliação dos extratos das pimentas.

Ao prof. Eduardo Purgatto, pela disponibilização do padrão capsaicina.

Aos técnicos, Elias da Silva Araujo e Aline de Oliveira Santos, pelo auxílio na liofilização das pimentas.

Ao prof. Felipe Rebello Lourenço, pelo apoio e auxílio na análise estatística dos dados e por todas as sugestões.

Aos profesores Marcelo Palma Sircili, Mariza Landgraf e Maria Cristina Dantas Vanetti, pelas oportunas sugestões e críticas deste trabalho no Exame de Qualificação.

À profa. Vanessa Bueris, pelo auxílio, motivação e dedicação na realização do ensaio de Microscopia Confocal.

Ao técnico Alexsander Seixas de Souza do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan, pelo auxílio no uso do microscopio confocal.

À Katia e Lúcia, pelo treinamento e auxílio constantes na manipulação dos equipamentos, materiais e ambientes do Laboratório.

A cada um dos meus colegas que trabalharam ou trabalham no Laboratório, por terem resolvido dúvidas em momentos difíceis, pela disponibilidade e por terem apontado novas ideias ao meu trabalho.

Ao Jhosep, por ser o amigo e companheiro de horas incertas. Por ter discutido com entusiasmo várias ideias do meu trabalho.

RESUMO

CASTILLO RIVERA, M. L. **Inibição do sistema *quorum sensing* AI-1 por *Capsicum frutescens* e *Capsicum annuum* em bactérias Gram-negativas.** 2018. 87f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A inibição do *quorum sensing* (QS) altera a comunicação bacteriana, reduzindo a expressão de fatores de virulência e a formação de biofilmes, o que pode conferir menor pressão seletiva em comparação aos antibióticos tradicionais. As frutas e hortaliças constituem uma fonte rica em compostos com propriedades potenciais de inibição do QS. Entretanto, há pouca referência sobre o potencial de pimentas do gênero *Capsicum* e de seus compostos isolados como inibidores do QS. Esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de extratos orgânicos obtidos das variedades de pimenta-malagueta e pimentão vermelho sobre o sistema QS dependente do sinalizador AI-1 (acil homoserina lactona - AHL) em bactérias Gram-negativas. Os extratos foram obtidos por extração em fase sólida e separados em uma fração metanólica e outra amônica; sendo os compostos característicos identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (MIC) e pela curva de crescimento de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, *Serratia liquefaciens* MG1 e *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. O efeito anti-QS dos extratos foi avaliado pelos testes de difusão em ágar e quantificação da produção de violaceína em meio líquido por *C. violaceum* e sobre a formação de biofilme, avaliado pelo ensaio de cristal violeta e microscopia confocal, em *S. liquefaciens* e *P. aeruginosa* nas temperaturas 30 ºC e 37 ºC. Os resultados obtidos pela CLAE indicaram que o extrato metanólico de pimenta-malagueta (EMPM) continha capsaicinoides como a capsaicina e dihidrocapsaicina, luteolina e outros compostos não identificados; já o extrato amônico desta não continha os compostos capsaicinoides. Ambos os extratos de pimentão vermelho continham luteolina e compostos não identificados, mas não apresentaram capsaicinoides. Como o EMPM era representativo dos demais extratos, por conter tanto capsaicinóides quanto luteolina, o foco deste trabalho foi avaliar os efeitos do EMPM sobre fenótipos microbianos nas concentrações 5; 2,5; 1,25 e 0,625 mg/ml, além de utilizar a capsaicina como controle comparativo em concentrações equivalentes às do extrato (25, 50 e 100 µg/ml). Os resultados da atividade antimicrobiana mostraram inibição parcial do crescimento das bactérias nas concentrações sub-MIC (MIC >5 mg/ml) de 5 e 2,5 mg/ml de EMPM. A capsaicina também inibiu parcialmente o crescimento das bactérias a 100 µg/ml, com exceção de *S. liquefaciens* a 37 ºC, cujo crescimento foi induzido em 50 e 25 µg/ml. A produção de violaceína foi reduzida pelo EMPM a 1,25 e 0,625 mg/ml, sem afetar o crescimento de *C. violaceum*. Ensaios com *C. violaceum* CV026, estirpe biosensora capaz de produzir o pigmento na presença de AI-1 exógeno, sugerem que o possível mecanismo de atuação do extrato sobre o sistema QS em *C. violaceum* 12472 é sobre a síntese do sinalizador, já que não foi observada inibição da produção de violaceína em CV026 pelo extrato. Contrariamente, a capsaicina incrementou a produção do pigmento na estirpe 12472, mas ensaios com a estirpe CV026 indicaram que a capsaicina não atua como sinalizador do QS, uma vez que esta não induziu a produção de violaceína nesta estirpe. Já a formação de biofilme foi incrementada na presença do EMPM, sendo consideravelmente maior em *P. aeruginosa* a 30 ºC. Igualmente, observou-se indução da formação de biofilme por capsaicina

em *S. liquefaciens* (37 ºC) e *P. aeruginosa* (30 ºC). Porém, a capsaicina não teve efeito sobre a formação de biofilme de *S. liquefaciens* quando cultivada a 30 ºC, nem *P. aeruginosa* a 37 ºC. Os resultados revelam que a produção de violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472 é inibida pelo EMPM, mas não pela capsaicina. Já, o EMPM e a capsaicina, de forma geral, não inibem a formação de biofilme de *S. liquefaciens* MG1 nem *P. aeruginosa* PAO1. Outros estudos são necessários para elucidar os mecanismos pelos quais o EMPM e a capsaicina agem sobre os fenótipos avaliados neste trabalho.

Palavras-chaves: *Quorum sensing*, extrato metanólico, pimenta-malagueta, capsaicina, produção de violaceína, formação de biofilme.

ABSTRACT

CASTILLO RIVERA, M. L. **Inhibition of AI-1 quorum-sensing system by *Capsicum frutescens* and *Capsicum annuum* in Gram-negative bacteria**. 2018. 87f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Quorum sensing inhibition alters bacterial communication by reducing virulence factors expression and biofilm formation, exerting less selective pressure compared to antibiotics. Fruits and vegetables are rich sources of compounds with potential QS-inhibition properties. However, there are few references about the potential of peppers belonging to the genus *Capsicum* and its isolated compounds as QS inhibitors. This study aimed to assess the effect of organic extracts obtained from *Capsicum* varieties, *pimenta-malagueta* (red chili) and *pimentão vermelho* (red bell pepper), on the AI-1 dependent QS system. The extracts were obtained by solid phase extraction and split into a methanolic and an ammonic fraction. Characteristic compounds were identified and quantified by high performance liquid chromatography (HPLC). The antimicrobial activity of the extracts was assessed by determining the minimal inhibitory concentration (MIC) and the growth curve of *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, *Serratia liquefaciens* MG1 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. The anti-QS effect of the extracts was evaluated by the agar diffusion assay and the quantification of violacein production was assessed in liquid medium by *C. violaceum*, as well as in the biofilm formation test determined by the crystal violet assay and confocal microscopy with *S. liquefaciens* and *P. aeruginosa* at 30 ºC and 37 ºC. HPLC results showed that the methanolic extract of *pimenta-malagueta* (EMPM) contained capsaicinoids such as capsaicin and dihidrocapsaicin, luteolin and other unidentified compounds in lower concentrations; while its ammonic extract did not have capsaicinoids. Both *pimentão vermelho* extracts contained luteolin and other unidentified compounds in low concentrations, but they did not contain capsaicinoids. As EMPM was representative among the extracts because it contained capsaicinoids and luteolin, the focus of this work was to assess the effect of EMPM over microbial phenotypes at concentrations of 5, 2.5, 1.25 and 0.625 mg/ml, using capsaicin as a comparative control at equivalent concentrations to those in EMPM (25, 50 and 100 µg/ml). Antimicrobial activity assays showed a partial inhibition growth of bacteria at sub-MIC concentrations (MIC >5 mg/ml) of EMPM at 5 and 2.5 mg/ml. Similarly, capsaicin partially inhibited bacterial growth at 100 µg/ml, except for *S. liquefaciens* at 37 ºC in which growth was induced at 50 and 25 µg/ml. Violacein production was reduced by EMPM at 1,25 and 0,625 mg/ml without affecting *C. violaceum* growth. Assays with *C. violaceum* CV026, a biosensor strain that produces violacein in the presence of exogenous AI-1, suggest that EMPM reduced violacein production in *C. violaceum* 12472 by interfering with the AI-1 synthesis. In contrast, capsaicin incremented violacein synthesis in strain 12472, but experiments with strain CV026 revealed that capsaicin does not function as an analog of AI-1. Biofilm formation was increased in EMPM presence, being remarkably superior in *P. aeruginosa* cultivated at 30 ºC, as opposed to cultivation at 37 ºC. Similarly, capsaicin induced biofilm formation in *S. liquefaciens* (37 ºC) and *P. aeruginosa* (30 ºC). However, capsaicin did not affect biofilm formation on *S. liquefaciens* cultured at 30 ºC, neither on *P. aeruginosa* at 37 ºC. These results show that violacein production in *C. violaceum* ATCC 12472 is inhibited by EMPM, but not by capsaicin. In general, EMPM and capsaicin did not

inhibit biofilm formation in *S. liquefaciens* MG1 neither in *P. aeruginosa* PAO1. More studies are necessary to elucidate the mechanisms by which EMPM and capsaicin affect the studied phenotypes in this work.

Keywords: quorum sensing, methanolic extract, *pimenta-malagueta*, capsaicin, violacein production, biofilm formation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistemas de *quorum sensing* bacteriano.....15

Tabela 2. Compostos inibidores do *quorum sensing* provenientes de fontes naturais, conhecidos por inibir a formação de biofilmes bacterianos.....21

Tabela 3. Compostos que induzem a formação de biofilme em diferentes bactérias e as concentrações que estimulam este efeito.....22

Tabela 4. Extratos produzidos a partir de pimenta-malagueta e pimentão vermelho.....28

Tabela 5. Compostos majoritários (expressos em mg por 100 mg de extrato) presentes nos extratos de pimenta-malagueta e pimentão vermelho.....36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formas de inibição do sistema *quorum sensing*. A inibição pode acontecer se os autoindutores liberados no meio externo são degradados (A), se há uma redução da síntese do autoindutor (B) ou por meio da inibição do receptor (C). Elaboração própria.....20

Figura 2. Estrutura química de 4-bromo-3-butil-5-(dibromometileno)-2(5H)-furanona (C-30), furanona halogenada produzida por *Delisea pulchra*. Fonte: Rasmussen et al. (2000).....20

Figura 3. Estruturas de alguns capsaicinoides e autoindutores tipo I. As espécies que produzem as AHLs e seus receptores homólogos de LuxR estão em itálico e entre parênteses, respectivamente. HSL: Homoserina lactona. Fonte: Luo, Peng e Li (2011) e Janssens et al. (2008).....25

Figura 4. Cromatogramas obtidos pela CLAE dos compostos presentes em (a) EMPM a 285 nm, (b) EAPM a 328 nm, (c) EMPV e (d) EAPV a 370 nm. CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência. EMPM: Extrato metanólico de pimenta-malagueta. EAPM: Extrato amônico de pimenta-malagueta. EMPV: Extrato metanólico de pimentão vermelho. EAPV: Extrato amônico de pimentão vermelho. C: capsaicina; DH: dihidrocapsaicina; L: luteolina. As porcentagens indicam a distribuição da luteolina total presente no extrato.....33

Figura 5. Efeito do extrato metanólico de pimenta-malagueta (A) e da capsaicina (B) sobre o crescimento de *C. violaceum* ATCC 12472 em diferentes concentrações (expressas em mg/ml e µg/ml respectivamente). DMSO 2,5% e DMSO 1% representam o controle do crescimento bacteriano sem extrato.....37

Figura 6. Efeito do extrato metanólico de pimenta-malagueta (EMPM) sobre o crescimento de *P. aeruginosa* e *S. liquefaciens* em diferentes concentrações (expressas em mg/ml) nas temperaturas de 30 ºC e 37 ºC. DMSO 2,5% representa o crescimento bacteriano sem extrato.....40

Figura 7. Efeito da capsaicina sobre o crescimento de *S. liquefaciens* e *P. aeruginosa* em diferentes concentrações (expressas em µg/ml) nas temperaturas de 30 ºC e 37 ºC. DMSO 1% representa o crescimento bacteriano sem capsaicina.....43

Figura 8. Teste de difusão em ágar para produção de violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472 em presença do EMPM, nas concentrações de 5; 2,5 e 1,25 mg/ml (A, B e C respectivamente), e da capsaicina, nas concentrações de 250, 125 e 62,5 µg/ml (D, E e F respectivamente), após 24 horas de incubação a 30 ºC. Furanona C30: controle da inibição da produção de violaceína. DMSO: controle de toxicidade para o extrato e a capsaicina, nas concentrações de 2,5; 1,25 e 0,625% (a, b e c respectivamente). Km: controle de inibição do crescimento bacteriano.....44

Figura 9. Efeito do extrato metanólico da pimenta-malagueta (A) e da capsaicina (B) em diferentes concentrações (expressas em mg/ml e µg/ml, respectivamente) na produção de violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472. (C) Efeito do extrato metanólico de pimenta-malagueta em diferentes concentrações na produção de violaceína em *C. violaceum* CV026 na presença do autoindutor C6-HSL. DMSO 2,5% e DMSO 1% representam o crescimento bacteriano sem EMPM e sem capsaicina. Médias seguidas pelas mesmas letras pertencentes ao mesmo tratamento não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$).....46

Figura 10. Efeito do extrato metanólico de pimenta-malagueta (EMPM) em diferentes concentrações (expressas em mg/ml) sobre a formação de biofilme em *S. liquefaciens* e *P. aeruginosa* nas temperaturas de incubação 30 ºC e 37 ºC, segundo o ensaio de cristal violeta. DMSO 2,5% representa o crescimento bacteriano sem extrato. Médias seguidas pelas mesmas letras, pertencentes à mesma temperatura de incubação, não diferem estatisticamente (p≥0,05).....49

Figura 11. Imagens obtidas por Microscopia Confocal do biofilme formado pelas estirpes *S. liquefaciens* MG1 e *P. aeruginosa* PAO1 após 24 horas sob tratamento de extrato metanólico de pimenta-malagueta (EMPM) em diferentes concentrações (expressas em mg/ml) nas temperaturas de 30 ºC e 37 ºC. DMSO 2,5% representa o biofilme formado sem extrato. Nd - não determinado. A barra de escala é de 25 µm.....51

Figura 12. Efeito da capsaicina em diferentes concentrações (expressas em µg/ml) sobre a formação de biofilme em *S. liquefaciens* e *P. aeruginosa* nas temperaturas de incubação 30 ºC e 37 ºC, segundo o ensaio de cristal violeta. DMSO 1% representa o crescimento bacteriano sem capsaicina. Médias seguidas pelas mesmas letras, pertencentes à mesma temperatura de incubação, não diferem estatisticamente (p≥0,05).....53

Figura 13. Imagens obtidas por Microscopia Confocal do biofilme formado pelas estirpes *S. liquefaciens* MG1 e *P. aeruginosa* PAO1 após 24 horas sob tratamento de capsaicina em diferentes concentrações (expressas em µg/ml) nas temperaturas de 30 ºC e 37 ºC. DMSO 1% representa o biofilme formado sem capsaicina. A barra de escala é de 25 µm.....54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....14
1.1 *Quorum sensing*.....15
1.2 Inibição do *quorum sensing*.....19
1.3 Pimentas: o gênero *Capsicum*.....23
2 OBJETIVOS.....26
2.1 Objetivos específicos.....26
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....27
3.1 Estirpes bacterianas.....27
3.2 Preparo dos extratos.....27
3.2.1 *Material vegetal*.....27
3.2.2 *Obtenção dos extratos*.....27
3.2.3 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....28
3.3 Atividade antimicrobiana.....29
3.3.1 *Avaliação do crescimento bacteriano e determinação da concentração inibitória mínima (MIC)*.....29
3.4 Determinação *in vitro* da atividade anti-*quorum sensing*.....30
3.4.1 *Teste de difusão em ágar para produção de violaceína em C. violaceum*.....30
3.4.2 *Quantificação da produção de violaceína por C. violaceum*.....30
3.4.3 *Efeito do extrato metanólico de pimenta-malagueta e da capsaicina sobre a formação de biofilmes*.....31
3.4.3.1 *Ensaio de cristal de violeta*.....31
3.4.3.2 *Ensaio de Microscopia Confocal*.....32
3.5 Análise estatística.....32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....33
4.1 Caracterização dos compostos presentes nas pimentas.....33
4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC).....36
4.3 Efeito do extrato metanólico de pimenta-malagueta e da capsaicina sobre o crescimento bacteriano.....36
4.4 Teste de difusão em ágar para produção de violaceína em *C. violaceum*.....44
4.5 Quantificação da produção de violaceína por *C. violaceum*.....44
4.6 Formação de biofilmes: quantificação e visualização.....48
5 CONCLUSÕES.....60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....61
APÊNDICES.....68

1. INTRODUÇÃO

O descobrimento da penicilina, junto a outros antibióticos como as sulfonamidas, significou uma revolução no tratamento de doenças infecciosas devido à eficácia sobre micro-organismos patogênicos. Porém, o uso indiscriminado dos antibióticos favoreceu a emergência de espécies bacterianas resistentes à ação dessas drogas. Essa situação tornou-se um importante problema de saúde a nível mundial devido às complicações que as bactérias resistentes a antibióticos provocam, ocasionando a morte de milhões de pessoas, sendo difícil a sua erradicação pois cada vez o número de antibióticos efetivos contra tais bactérias é menor (SAGA; YAMAGUCHI, 2009; KALIA, 2013).

Diferentes estratégias vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de tratar as doenças infecciosas utilizando métodos alternativos ao uso de antibióticos. Entre elas, a denominada estratégia anti-virulência, que consiste na interferência nos mecanismos de virulência e nas vias de sinalização celular, é particularmente interessante visto que não provocaria a mesma pressão seletiva dos antibióticos tradicionais, incrementaria o número de fármacos disponíveis e, ao mesmo tempo, manteria a microbiota do hospedeiro por ser uma estratégia específica ao micro-organismo patogênico (CLATWORTHY; PIERSON; HUNG, 2007; RASKO; SPERANDIO, 2010; KALIA, 2013; HIRAKAWA; TOMITA, 2013; LASARRE; FEDERLE, 2013; ALLEN et al., 2014).

Em 1905, Erwin F. Smith afirmava que uma multidão de bactérias seria mais forte que umas poucas e que unidas elas superariam qualquer obstáculo; essa afirmação já se referia a um comportamento de grupo e não meramente individual como normalmente pensado para esse grupo de organismos (DALE; PARK, 2010). Anos mais tarde, o comportamento de grupo seria considerado como uma forma de comunicação entre as células bacterianas com o objetivo de regular a expressão de alguns genes. A esse comportamento, deu-se o nome de *quorum sensing*, pela necessidade de haver um número mínimo de células para uma efetiva comunicação (FUQUA; WINANS; GREENBERG, 1994). Dentre os fenótipos regulados por esse mecanismo estão fatores de virulência como toxinas, proteases e fatores de evasão do sistema imune, assim como a formação de biofilmes. Assim, o *quorum sensing* se tornou um mecanismo com significativas consequências para a medicina humana e veterinária, a agricultura e também a segurança alimentar, tendo possivelmente efeito na deterioração dos alimentos (SMITH; FRATAMICO; NOVAK, 2004; SKANDAMIS; NYCHAS, 2012; LASARRE; FEDERLE, 2013).

Devido à relevância que têm os fenótipos regulados pelo *quorum sensing*, a pesquisa de mecanismos que interfiram nessa comunicação bacteriana aumentou expressivamente nos últimos anos. Nesse contexto, o estudo de plantas com potencial efeito anti-*quorum sensing* (denominado *quorum quenching* em inglês) adquire importância. Assim, estudos desenvolvidos com extratos de diversos alimentos de origem vegetal como alho, rabanete, baunilha, camomila, cenoura, amora-vermelha, soja, entre outros, mostram que tais vegetais apresentam compostos com ação inibitória sobre o *quorum sensing* (RASMUSSEN et al., 2005; KALIA, 2013; OLIVEIRA et al., 2016; RODRIGUES et al., 2016a,b).

1.1 *Quorum sensing*

O *quorum sensing* é um tipo de sinalização celular que regula a expressão de genes em função do número de células bacterianas (densidade populacional) presentes no meio (FUQUA; WINANS; GREENBERG, 1994). Esse processo exige a presença de moléculas, similares a feromônios, conhecidas como autoindutores ou sinalizadores, que são produzidas pelas bactérias e que mantem um fluxo constante de entrada e saída das células. Quando a concentração limiar dessas moléculas é atingida, estes autoindutores ingressam à célula e se unem a uma proteína receptora que regula a transcrição de genes regulados pelo *quorum sensing*. Existem diferentes tipos de sistemas *quorum sensing* segundo a característica química dos autoindutores (**Tabela 1**). As moléculas sinalizadoras mais predominantes são as AHLs (homoserina lactona aciladas) e os peptídeos autoindutores, utilizados comumente por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente. Outro sinalizador de interesse é o AI-2 que participa na sinalização interespécies (CAMILLI; BASSLER, 2006). Além disso, há outras moléculas que participam como autoindutores em diferentes micro-organismos (**Tabela 1**).

Tabela 1. Sistemas de *quorum sensing* bacteriano.

Tipo de sinalizador QS	Autoindutor	Micro-organismos representativos	Fenótipos regulados	Referências
Comunicação intraespécies				
AI-1	Acil-homoserina lactonas (AHLs)	Gram-negativas	Fatores de virulência, biofilme, conjugação, motilidade tipo *swarming*, bioluminescência, entre outros.	NG; BASSLER, 2009; BISWA; DOBLE, 2013

Variantes do AI-1	*p*-Coumaril-HSL Cinamoil-HSL Isovaleril-HSL *N*-Carboxil-acil-HSL	*Rhodopseudomonas palustris* CGA009 *Bradyrhizobium* spp. *B. japonicum* USDA110 *Methanothrix harundinacea*	Expressão genética global Não identificado Não identificado Crescimento filamentoso	SCHAEFER et al., 2008; AHLGREN et al., 2011; LINDEMANN et al., 2011; ZHANG et al., 2012.
Família DSF	Cis-ácido graxo insaturado	*Xanthomonas* spp., e *Burkholderia cenocepacia*	Virulência, biofilme e tolerância aos antibióticos	DENG et al., 2011.
Família CAI-1	α-Hidroxicetonas	*Vibrio* spp. e *Legionella pneumophila*	Virulência e biofilme	KELLY et al., 2009; GOODING et al., 2010.
Peptídeos autoindutores	Oligopeptídeos lineares ou cíclicos	Gram-positivas; só uma bactéria Gram-negativa: *Thermotoga maritima*	Virulência, biofilme, esporulação e produção de exopolissacarídeos	SAENZ et al., 2000; JOHNSON et al., 2005.
PQS	Quinolona ou compostos de tiazole	*Pseudomonas aeruginosa*	Virulência e formação de biofilme	PESCI et al., 1999; LEE et al., 2013.
Comunicação interespécies				
AI-2	S-THMF-borato, R-THMF	Gram-negativas e Gram-positivas	Fatores de virulência e formação de biofilme	PEREIRA; THOMPSON; XAVIER et al., 2013.
AI-3	Desconhecido	*Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC)	Virulência	WALTERS; SPERANDIO, 2006.
Indol	2,3-Benzopirrol	Gram-negativas e Gram-positivas	Virulência e formação de biofilme	LEE; LEE, 2010.

AI-1: Autoindutor-1, AI-2: Autoindutor-2, AI-3: Autoindutor-3, HSL: homoserina lactona acilada, DSF: fator de sinal difuso, CAI-1: autoindutor-1 de *Cholerae*, S-THMF-borato: (2S,4S)-2-Metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahidrofurano-borato, R-THMF: (2R,4S)-2-Metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahidrofurano, PQS: sinalizador de quinolona de *Pseudomonas*. Fonte: Tang e Zhang (2014, p. 3248).

As moléculas de AHLs são compostas por um anel de homoserina lactona e uma cadeia de ácidos graxos, cujo número de carbonos varia entre quatro e 18, além de modificações por saturação e oxidação na posição do carbono 3. Elas são sintetizadas por meio de uma reação de acilação entre a S-adenosil-metionina (SAM) e a proteína carregadora acil-acil (ACP), as quais dão origem ao anel lactona e a cadeia de ácidos graxos,

respectivamente (MORÉ et al., 1996; WHITEHEAD et al., 2001; LAZDUNSKI; VENTRE; STURGIS, 2004; NI et al., 2009; LASARRE; FEDERLE, 2013; KALIA, 2014).

O sistema *quorum sensing* da bactéria marinha *Vibrio fischeri* foi o primeiro descrito e, portanto, é modelo para os demais sistemas QS em bactérias Gram-negativas (NEALSON; HASTINGS, 1979; EBERHARD et al., 1981; FUQUA; GREENBERB, 2002). Esse modelo é composto pela molécula sinalizadora N-3-oxo-hexanoil-L-HSL (pertencente às AHLs), uma enzima sintase de AHLs (LuxI) e uma proteína receptora ativadora transcricional (LuxR). A enzima LuxI sintetiza a N-3-oxo-hexanoil-L-HSL e esta é liberada no meio extracelular por difusão passiva. Uma vez que estas moléculas atingem uma concentração limiar, devido ao aumento exponencial no número de células bacterianas, elas retornam ao meio intracelular e se ligam a proteína LuxR, provocando uma mudança conformacional na mesma que passa a atuar como ativadora da transcrição dos genes envolvidos com a bioluminescência: fenótipo aproveitado por *Euprymna scolopes*, uma espécie de lula, em cujo órgão luminoso *V. fischeri* convive em simbiose (NEALSON; HASTINGS, 1979; EBERHARD et al., 1981; FUQUA; GREENBERB, 2002).

Existem diversas espécies bacterianas com sistemas homólogos a LuxI/LuxR que permitem a regulação de fenótipos variados. Tal é o caso da bactéria oportunista *P. aeruginosa* que utiliza dois sistemas, LasI/LasR e RhlI/RhlR, para regular coordenadamente a expressão de fatores de virulência como elastases, proteases, exotoxinas, ramnolipídeos, piocianina, motilidade e a formação de biofilmes. *Serratia liquefaciens* é também um patógeno oportunista, cuja atividade *quorum sensing* está relacionada com o sistema SwrI/SwrR e os autoindutores N-butanoil-HSL (C4-HSL) e N-hexanoil-HSL (C6-HSL), que estão associados com a formação de biofilmes, a produção de enzimas hidrolíticas e a motilidade tipo *swarming* devido à produção do biosurfactante *serrawettin* W2 (RASMUSSEN et al., 2000, LABBATE et al., 2004). Alguns desses fenótipos, como a produção de enzimas proteolíticas e a formação de biofilme, são de especial interesse pela sua influência na atividade microbiana em alimentos (MACHADO et al., 2015; BAI; RAI, 2011; LASARRE; FEDERLE, 2013; KALIA, 2014).

Costerton et al. (1995) definem o biofilme como populações bacterianas envolvidas numa matriz, podendo estar aderidas entre si ou a superfícies ou interfaces, sendo essa matriz constituída de polímeros como polissacarídeos, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA). Ao contrário das células planctônicas, os biofilmes mostram maior resistência ao efeito dos antibióticos e a imunidade do hospedeiro, sendo a sua erradicação mais difícil (BOYLE et al.,

2013; HENRIQUES; VASCONCELOS; CERCA, 2013). Alguns mecanismos que explicariam esta resistência seriam a baixa difusão do antibiótico devido à matriz do biofilme, a variada taxa de crescimento dos micro-organismos que estão presentes no biofilme, células em diferentes estágios fisiológicos (como células dormentes e as células persistentes), entre outras mudanças fisiológicas como a expressão de genes de resistência (SHROUT et al., 2011; HENRIQUES; VASCONCELOS; CERCA, 2013).

A formação de biofilme é um processo que consta de várias etapas. No inicio, células planctônicas estão livres no meio, enquanto algumas vão se aderindo na superfície de forma reversível. Em um momento do processo, algumas células se aderem irreversivelmente à superfície. Conforme essas células aderidas vão se multiplicando, acontece a produção de uma matriz de polímeros extracelulares que mantém as células juntas, formando microcolônias, as quais atingirão uma formação madura do biofilme em forma tridimensional. Finalmente, algumas células podem-se liberar do biofilme por dispersão e colonizar novas superfícies (XAVIER et al., 2003; RÖMLING; BALSALOBRE, 2012; HENRIQUES; VASCONCELOS; CERCA, 2013; RUMBAUGH; AHMAD, 2014). *P. aeruginosa* e *S. liquefaciens* são dois patógenos oportunistas com capacidade de formar biofilmes. Estas bactérias podem se desenvolver em diferentes ambientes como o solo ou água, e colonizar superfícies de diversas áreas hospitalares (BÉDARD; PRÉVOST; DÉZIEL, 2016), dispositivos médicos (HENRIQUES; VASCONCELOS; CERCA, 2013) ou na indústria alimentícia (SHI; ZHU, 2009), podendo causar infecções graves e persistentes em muitos indivíduos (MULCAHY; ISABELLA; LEWIS, 2014).

O *quorum sensing* tem uma função importante na formação do biofilme. Assim, alguns fatores regulados pelo *quorum sensing* como os rhamnolipidios, a motilidade tipo *swarming*, a lectina galactofílica (LecA), a pioverdina (sideróforo de ferro) e o operon que codifica o polissacarídeo extracelular Psl têm uma relevante participação na formação de biofilme de *P. aeruginosa* (SHROUT et al., 2011). Por outro lado, conforme Van Houdt, Givskov e Michiels (2007), o *quorum sensing* também interfere em diferentes etapas do desenvolvimento do biofilme de *S. liquefaciens* a exemplo da motilidade tipo *swarming*, a adesão, a maturação do biofilme e o desprendimento celular da superfície. Por tais motivos, estudar compostos que inibam esta sinalização celular seria de grande importância.

Outra espécie com sistema homólogo LuxI/R é *Chromobacterium violaceum*: uma bactéria Gram-negativa presente em ecossistemas de regiões tropicais e subtropicais, tanto no solo como em água (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM,

2003). Por meio do mecanismo do *quorum sensing*, esta bactéria regula a produção de violaceína, um pigmento roxo insolúvel em água, além de outros fenótipos como a formação de biofilme e a produção de quitinase (STAUFF; BASSLER, 2011). *C. violaceum* possui o sistema CviI/CviR, encarregado da síntese e da resposta reguladora do autoindutor N-hexanoil-HSL (C6-HSL). Dentre as estirpes biosensoras que permitem a detecção de HSL aciladas está a *C. violaceum* CV026. Esta bactéria é uma mutante isogência de *C. violaceum* ATCC 31532 por meio de uma inserção do transposon mini-Tn5 no gene *cviI*. Assim, o mutante CV026 é incapaz de sintetizar a molécula sinalizadora C6-HSL. Entretanto, na presença de C6-HSL exógeno ou outras AHLs de cadeia curta, ela produz o pigmento roxo violaceína. Essa característica permite que a cepa CV026 seja utilizada em testes de detecção de HSL aciladas de cadeia curta de quatro a oito carbonos, assim como ensaios de inibição do QS (MOROHOSHI et al., 2008, RUMBAUGH, 2011; STAUFF; BASSLER, 2011).

1.2 Inibição do *quorum sensing*

Os mecanismos de interferência no sistema *quorum sensing* visam alterar ou interromper as etapas de síntese de AHLs, ou acúmulo desses sinais ou mesmo a detecção desses pelo receptor (**Figura 1**). No primeiro caso, existem análogos de SAM como a sinefungina que inativa a enzima RhlI, impedindo a produção de butiril-HSL em *P. aeruginosa* (PARSEK et al., 1999; LASARRE; FEDERLE, 2013). As lactonases, acilases e oxidorredutases são enzimas que degradam as AHLs liberadas no meio extracelular. Por exemplo, a lactonase AiiA, isolada de *Bacillus* sp., hidrolisa o anel do sinalizador 3-oxo-hexanoil-HSL, autoindutor utilizado pela bactéria *Erwinia caratovora*, causadora de doenças em batatas (LASARRE; FEDERLE, 2013).

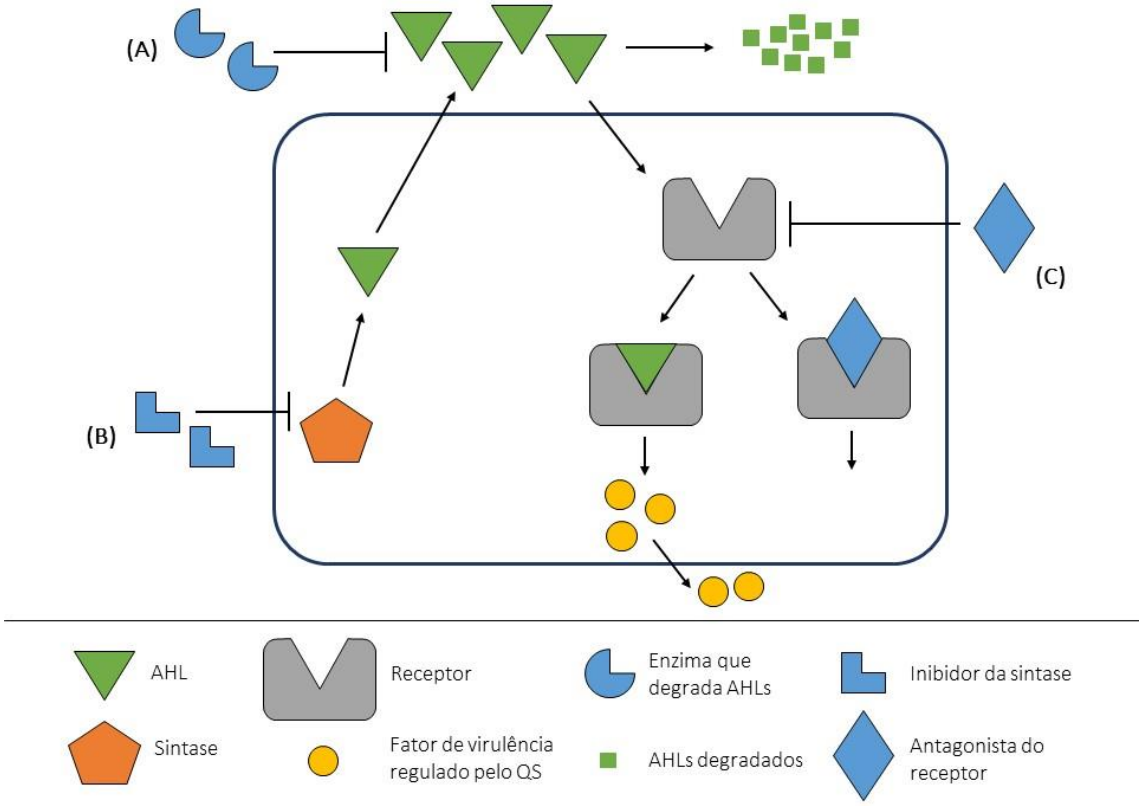


Figura 1. Formas de inibição do sistema *quorum sensing*. A inibição pode acontecer se os autoindutores liberados no meio externo são degradados (A), se há uma redução da síntese do autoindutor (B) ou por meio da inibição do receptor (C). Elaboração própria.

As furanonas halogenadas, produzidas pela alga marinha *Delisea pulchra*, são efetivas na interferência da ligação de AHL ao receptor. Experimentos com furanonas sintéticas, como a furanona C-30 (**Figura 2**), indicam uma inibição do *quorum sensing* em *P. aeruginosa*, com expressão reduzida de genes de virulência e maior permeabilidade do biofilme ao tratamento com o antibiótico tobramicina (MANEFIELD et al., 2002; RASMUSSEM et al., 2005; ROMERO; ACUÑA; OTERO, 2012; LASARRE; FEDERLE, 2013; KALIA, 2014).

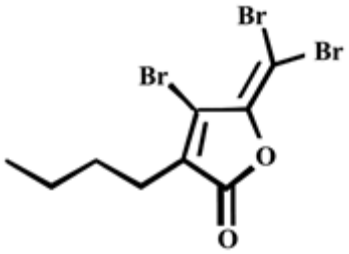


Figura 2. Estrutura química de 4-bromo-3-butil-5-(dibromometileno)-2(5H)-furanona (C-30), furanona halogenada produzida por *Delisea pulchra*. Fonte: Rasmussen et al. (2000).

A convivência milenar entre plantas e bactérias permitiu o desenvolvimento de mecanismos de defesa pelas plantas contra bactérias patogênicas, sendo um deles a produção

de compostos com propriedades anti-*quorum sensing* (MCCARTHY; O'GARA, 2015). Várias dessas moléculas têm sido isoladas de alimentos como a cebola (pantolactona e ácido mirístico), a canela (cumarina), o café (cafeína), a toranja (furanocumarinas), o brócolis (sulforafano e erucin), entre outros (**Tabela 2**) (HELMAN; CHERNIN, 2015; MCCARTHY; O'GARA, 2015). O alho, um alimento com propriedades antimicrobianas conhecidas, contém a molécula sulfurada *ajoene* com capacidade de interferir na expressão de fatores de virulência como os rhamnolipídeos e de atuar sinergicamente com a tobramicina na redução da formação de biofilme em *P. aeruginosa* (RASMUSSEN et al., 2005; JAKOBSEN et al., 2012; ROMERO; ACUÑA; OTERO, 2012; KALIA, 2014; LASARRE; FEDERLE, 2013).

Tabela 2. Compostos inibidores do *quorum sensing* provenientes de fontes naturais, conhecidos por inibir a formação de biofilmes bacterianos.

Fonte natural	**Composto**	**Micro-organismo**	**Referências**
Delisea pulchra (Macroalga)	Furanona	*Aeromonas hydrophila*, *E. coli*	REN et al., 2001; PONNUSAMY et al., 2010.
Alho	*Ajoene*	*P. aeruginosa* PAO1	BJARNSHOLT et al., 2005; RASMUSSEN et al., 2005; JAKOBSEN et al., 2012.
Laranja	*Naringin*	*Yersinia enterocolitica*	TRUCHADO et al., 2012.
Penicillium sp.	*Patulin, clavin,* ácido penicílico	*P. aeruginosa*	RASMUSSEN et al., 2005.
Baunilha	Vanilina	*A. hydrophila*	PONNUSAMY et al., 2009.
Manjericão	Ácido rosmarínico	*P. aeruginosa*	ANNAPOORANI et al., 2012.
Diospyros dendo (Árvore)	Ácido ursólico	*E. coli*	REN et al., 2005.
Termanilia chebula betz (Fruta)	Ácido ellagico (ácido benzóico)	*Burkholderia cepacia*	HUBER et al., 2003.
Chá verde	Galato de epigalocatequina	*Staphylococcus aureus, B. cepacia*	HUBER et al., 2003; BLANCO et al., 2005.
Canela	Cinamaldeído	*P. aeruginosa*	NIU et al., 2006.
Grapefruit	*Furocoumarin*	*E. coli*	GIRENNAVAR et al., 2008.
Psoralea corylifolia L. (Planta medicinal)	Psoraleno	*E. coli*	GIRENNAVAR et al., 2008.

Extrato rico em ***ellagitannins*** (Romã)	*Urolithin*	*Y. enterocolitica*	GIMÉNEZ-BASTIDA et al., 2012.
Açafrão-da-terra	Curcumina	*P. aeruginosa, E. coli, Proteus mirabilis, Serratia marcescens*	PACKIAVATHY et al., 2014.
Cominho	Metil-eugenol	*P. aeruginosa*	PACKIAVATHY et al., 2012.

Fonte: Sadekuzzaman et al. (2015)

Dentre dos compostos naturais que inibem o sistema *quorum sensing*, existe um número importante que pode impedir ou reduzir a formação de biofilmes bacterianos (**Tabela 2**). Por exemplo, além de inibir as motilidades tipo *swarming* e *swimming* e a produção de exopolissacarídeos e alginato, a curcumina destaca-se por seu potencial para inibir a formação de biofilme das bactérias uropatogénicas *P. aeruginosa*, *E. coli*, *P. mirabilis* e *S. marcescens* (PACKIAVATHY et al., 2014). No entanto, assim como há moléculas que podem interromper a formação de biofilmes, existem alguns autores que tem identificado compostos que aumentam ou induzem a formação destas comunidades bacterianas (**Tabela 3**). Deste modo, vários flavonoides, conhecidos por inibir os receptores LasR/RhlR de forma alostérica (PACZKOWSKI et al., 2017), também atuam incrementando a formação de biofilme, a exemplo da quercetina e apigenina (**Tabela 3**). Similarmente, o ácido rosmarínico inibiu ou induziu a formação de biofilme de *P. aeruginosa* (**Tabelas 2** e **3**), sendo que o efeito depende da concentração utilizada (CORRAL-LUGO et al., 2016).

Tabela 3. Compostos que induzem a formação de biofilme em diferentes bactérias e as concentrações que estimulam este efeito.

Composto	**Concentração**	**Bactéria - temperatura**	**Método**	**Referências**
Flavonoides (apigenina, daidzeína, fisetina, genisteína, 6-hidroxiflavona, kaempferol, luteolina, quercetina, 6-aminoflavona) Ácido betulínico Ácido tânico	100 µg/ml	*P. aeruginosa* PA14 - 37 ºC.	Ensaio de cristal violeta em placa de 96 poços	CHO et al., 2013.
Vanilina Epicatequina	750-1500 µg/ml 750-1500 µg/ml	*P. aeruginosa* PAO1 - 30 ºC	Ensaio de cristal violeta em placa	PLYUTA et al., 2013.

Ácido sinápico Ácido clorogênico Ácido ferúlico Ácidos fenólicos cinâmico, 4-hidroxibenzóico e gálico	200-400 µg/ml 100-400 µg/ml 400 µg/ml 25–100 µg/ml	*Agrobacterium tumefaciens* C58 - 30 ºC	de 96 poços	
Genisteína Ácido protocatequico Extrato de *cranberry* Ácido p-hidroxibenzóico Resveratrol	500 µg/ml 1500 µg/ml 1700 µg/ml 1000 µg/ml 100 µg/ml	*Staphylococcus epidermidis* CECT 231 - 37 ºC	Ensaio de cristal violeta em placa de 96 poços	MORÁN et al., 2014.
Ácido rosmarínico	0,05 – 2 mM	*P. aeruginosa* PAO1 - 30 ºC	Ensaio de cristal violeta em tubos de borosilicato	CORRAL-LUGO et al., 2016.
Arabinogalactano, pectina e xilano	0,5% (p/v)	*Bacillus subtilis* - 30 ºC	Ensaios com formação de película.	BEAUREGARD et al., 2013.

1.3 Pimentas: o gênero *Capsicum*

As pimentas pertencem ao gênero *Capsicum* da família *Solanaceae*. Existem cinco diferentes espécies de pimentas conhecidas por serem cultivadas e domesticadas pelos antigos indígenas da América do Sul e América Central. Estas espécies são *C. annuum*, amplamente cultivada (ex. pimentão, jalapeño), *C. baccatum* (ex. 'dedo-de-moça'), *C. chinense* (ex. habanero, pimenta de cheiro), *C. frutescens* (ex. pimenta-malagueta, Tabasco) e *C. pubescens* (ex. rocoto, manzano) (RUSSO, 2012). As pimentas *Capsicum* são utilizadas como condimentos devido ao aroma, cor e sabor que conferem. No Brasil, a pimenta consumida no país todo é a pimenta-malagueta, principalmente na região Nordeste. No entanto, a região Norte prefere as pimentas-de-cheiro, murupi, cumari-do-pará, peixe-boi, olho-de-ganso e murici. No Sudeste, as mais comuns são dedo-de-moça, cambuci (chapéu-de-frade) e cumari verdadeira; enquanto a região Sul opta por pimenta dedo-de-moça e chifre-de-veado. Já na região Centro-Oeste prevalecem as pimentas-de-cheiro, bode, cumari-do-pará e fidalga (REIFSCHNEIDER; NASS; HENZ, 2015).

As pimentas constituem uma boa fonte de antioxidantes, com destaque para os flavonoides, carotenoides, vitamina C e também os capsaicinoides. Entretanto, não são consideradas como fonte de flavonoides em comparação com outros alimentos como a batata

doce e os aspargos (RUSSO, 2012). As pimentas apresentam prevalentemente dois tipos de flavonoides de especial interesse: flavonas e agliconas de flavonol. Dentre as flavonas, destacam-se a luteolina e seus derivados, assim como a apigenina, as O-glicosil flavonas e C-glicosil flavonas. Por outro lado, o grupo das agliconas de flavonol inclui a quercetina e seus derivados, além de sinapoil e feruloil glicosídeos. Além do efeito antioxidante, os carotenoides conferem a coloração característica das pimentas. Assim, os principais carotenoides responsáveis pela cor de pimentas vermelhas são três: capsantina, capsorubina e capsantina 5,6-epóxido (RUSSO, 2012).

A pungência é uma característica própria das pimentas, com exceção daquelas conhecidas como doces (e.g. pimentão). Isto é devido à presença de compostos alcaloides, concentrados na placenta da fruta, denominados capsaicinoides, sendo a capsaicina o componente mais ativo, seguido pela dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homodihidrocapsaicina, entre outros. Esses capsaicinoides são constituídos por uma porção de vanilil-amina e uma cadeia de ácidos graxos, a qual produz uma variedade estrutural de tais compostos. Tal estrutura química apresenta similaridade com a dos autoindutores tipo 1, conforme a **Figura 3** (LUO; PENG; LI, 2011; RUSSO, 2012; JANSSENS et al., 2008).

Em anos recentes, as propriedades farmacológicas da espécie *C. annuum* têm sido estudadas, encontrando-se atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, cardioprotetora e anticancerígena (KHAN et al., 2014). Tais efeitos também são atribuídos aos capsaicinoides (LUO; PENG; LI, 2011). Adicionalmente, o extrato de *C. annuum* mostrou efeito inibitório sobre a produção de toxinas do cólera em cepas de *Vibrio cholerae* (CHATTERJEE et al., 2010). Em relação ao potencial das pimentas *Capsicum* e os capsaicinoides como inibidores do *quorum sensing*, há poucas referências que relatam tal atividade. Assim, no estudo de Rasmussen et al. (2005) foram avaliados os extratos de pimentão amarelo (uma variedade de *C. annuum*) e *Red chili.* Apesar do estudo ter indicado que o extrato apresentou atividade inibitória sobre o *quorum sensing*, o fenômeno não foi investigado em maior profundidade. Ainda mais, a semelhança observada entre as estruturas químicas dos capsaicinoides e dos autoindutores tipo 1 (**Figura 3**) gera uma grande possibilidade desses compostos inibirem o sistema *quorum sensing*.

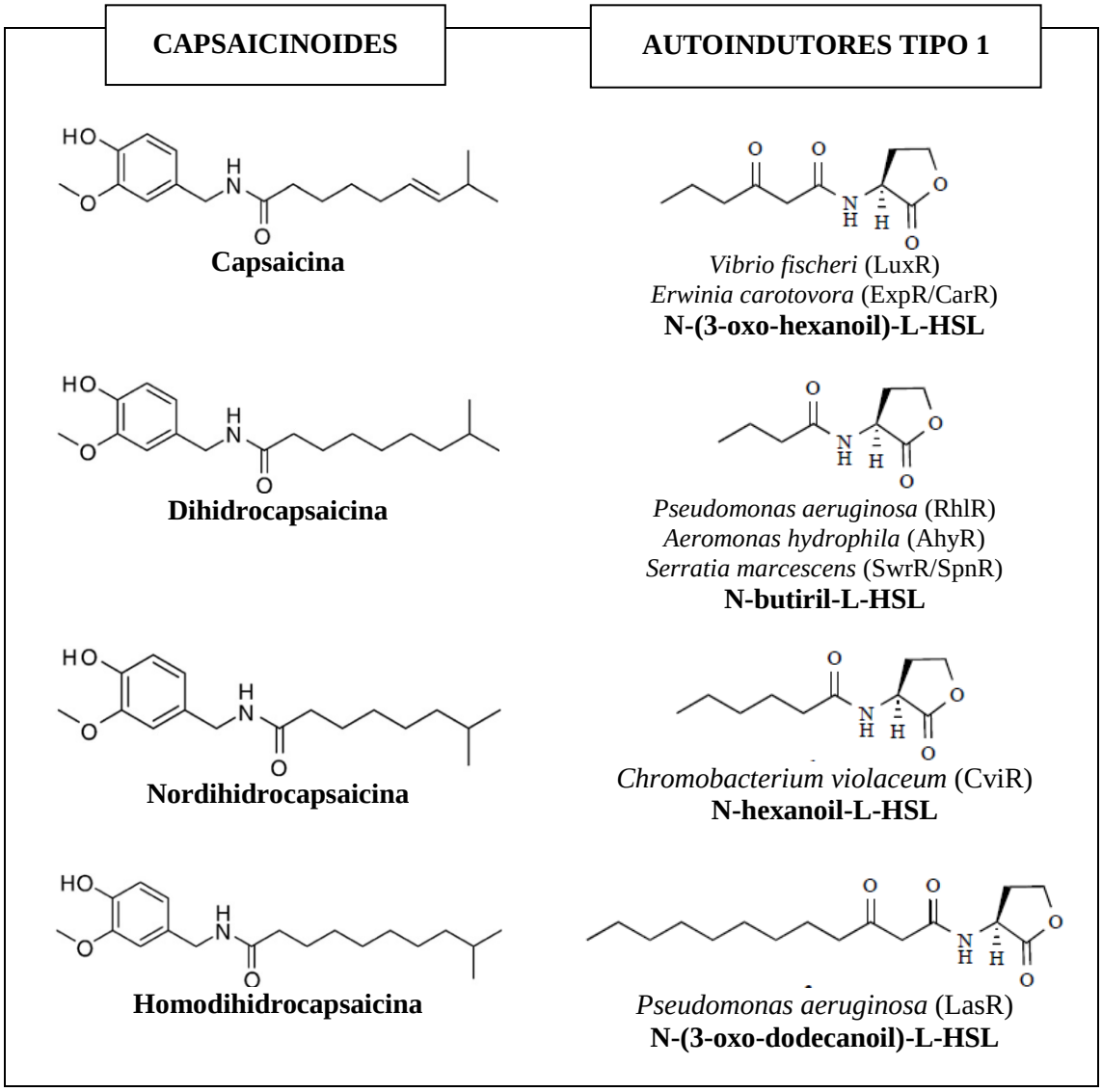


Figura 3. Estruturas de alguns capsaicinoides e autoindutores tipo I. As espécies que produzem as AHLs e seus receptores homólogos de LuxR estão em itálico e entre parênteses, respectivamente. HSL: Homoserina lactona. Fonte: Luo, Peng e Li (2011) e Janssens et al. (2008).

Este estudo visa avaliar o potencial antimicrobiano das pimentas, assim como o efeito sobre fenótipos regulados pelo *quorum sensing* para ampliar o conhecimento sobre as propriedades desta planta. Além disso, o fato de haver pouca referência sobre a atividade *quorum quenching* de pimentas e seu constituinte característico capsaicina, torna este estudo original e promissor. A similaridade da capsaicina com os autoindutores tipo 1 reforça o interesse de estudar o efeito deste composto em fenótipos regulados pelo *quorum sensing*. Deste modo, este trabalho poderá servir como base para possíveis aplicações no ramo das indústrias alimentícias e farmacêuticas.

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo avaliar o efeito inibitório dos extratos das variedades de pimenta malagueta (*Capsicum frutescens*) e pimentão vermelho (*Capsicum annuum*) e seus constituintes isolados sobre o sistema *quorum sensing* dependente do sinalizador AI-1 em bactérias Gram-negativas.

2.1 Objetivos específicos

- Identificar os compostos majoritários presentes nos extratos.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos.
- Avaliar o efeito dos extratos e da capsaicina sobre a produção de violaceína em *C. violaceum*.
- Avaliar o efeito dos extratos e da capsaicina sobre a formação de biofilmes bacterianos em *P. aeruginosa* e *S. liquefaciens*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Estirpes bacterianas

As estirpes bacterianas utilizadas neste trabalho foram *C. violaceum* ATCC 12472, *C. violaceum* CV026, *S. liquefaciens* MG1, as quais foram incubadas a 30 ºC, enquanto a cultura de *P. aeruginosa* PAO1 foi cultivada a 37 ºC. Estas duas últimas espécies também foram estudadas nas temperaturas de 30 ºC e 37 ºC em ensaios com o extrato metanólico de pimenta-malagueta (EMPM). As bactérias foram cultivadas em caldo ou ágar Luria Bertani (LB), cuja composição foi peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, cloreto de sódio NaCl 0,5% e ágar 1,2%. Quando necessário, o meio para a bactéria *C. violaceum* CV026 foi adicionado de canamicina a 20 µg/ml.

3.2 Preparo dos extratos

3.2.1 Material vegetal

No início do trabalho, se decidiu estudar os extratos de dois tipos de pimentas: a pimenta-malagueta (*Capsicum frutescens*) e o pimentão vermelho (*Capsicum annuum*). Essas pimentas foram adquiridas no Mercado Central de São Paulo (CEAGESP) da cidade de São Paulo.

As pimentas foram lavadas e sanitizadas com solução de hipoclorito de sódio a 0,33% (p/v) por 10 minutos. Uma vez que os pedúnculos e as folhas foram removidos manualmente, as pimentas foram cortadas em pedaços pequenos e congeladas a -20 ºC. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas e, em seguida, trituradas com almofariz e pistilo para o processo de extração.

O padrão capsaicina foi adquirido da Sigma-Aldrich, e preparou-se uma solução estoque de 10 mg/ml em dimetilsulfóxido (DMSO) 99,9%, mantendo a concentração máxima final deste solvente de 1% nos ensaios.

3.2.2 Obtenção dos extratos

Os extratos foram preparados no Laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Realizou-se uma extração em fase sólida (SPE), conforme descrito por Arabbi, Genovese e Lajolo (2004), com algumas adaptações para as pimentas em análise. Cinco gramas de pimenta liofilizada foram homogeneizados três vezes com metanol/água 7:3 (v/v).

Em seguida, o extrato foi filtrado com pressão reduzida utilizando papel filtro Whatman 6. O conteúdo de metanol foi evaporado em rota-evaporador a 40 ºC.

Esse extrato foi aplicado em alíquotas em coluna de poliamida, previamente condicionada com metanol e água. Depois, a coluna foi lavada com água, então os flavonoides e a capsaicina (presente na pimenta-malagueta conforme ensaios preliminares) foram eluidos com metanol. Em seguida, os compostos restantes foram eluidos com metanol:hidróxido de amônia 99,5:0,5 (v/v). Estas amostras foram secas em um concentrador centrífugo à vácuo *SpeedVac* e resuspendidas em metanol para quantificação por CLAE-DAD (cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodos). As amostras secas constituem os extratos, os quais foram diluídos previamente em meios apropriados (**Tabela 4**) obtendo uma solução estoque de 10 mg/ml (base seca de extrato por ml de meio), para então serem utilizados nos testes de atividade antimicrobiana e anti-*quorum sensing*.

Tabela 4. Extratos produzidos a partir de pimenta-malagueta e pimentão vermelho.

Amostra	Peso inicial (g)	Solvente de extração	Nome do extrato[1]	Rendimento por extrato[2] (%)	Meio de diluição
Pimenta-malagueta	5	Metanol	EMPM	11,86	DMSO 5% e caldo LB
		Metanol com amônia (0,5%)	EAPM	6,38	Caldo LB
Pimentão vermelho	5	Metanol	EMPV	4,98	DMSO 5% e caldo LB
		Metanol com amônia (0,5%)	EAPV	3,22	Caldo LB

[1] EMPM: extrato metanólico de pimenta-malagueta. EAPM: extrato amônico de pimenta-malagueta. EMPV: extrato metanólico de pimentão vermelho. EAPV: extrato amônico de pimentão vermelho. [2] Indica o peso do extrato seco obtido dividido pelo peso da amostra de pimenta liofilizada, expresso em porcentagem. DMSO: Dimetilsulfóxido, LB: Luria Bertani.

3.2.3 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A quantificação e a identificação dos flavonoides foram realizadas através de CLAE em cromatógrafo modelo Infinity 1260 (Agilent Technologies), equipado com injetor automático, bomba quaternária e detector com arranjo de diodo (DAD), controlado pelo *software* próprio da Agilent. A coluna utilizada foi a Prodigy 5µ ODS_3 (250 x 4,60 mm) (Phenomenex Ltd., Reino Unido) com fluxo de 1 ml/min, temperatura de corrida 25 ºC, e a eluição sendo realizada com gradiente de solventes constituído por A: ácido fórmico 0,5% em água e B: ácido fórmico 0,5% em acetonitrila. O gradiente de solventes consistiu em 10% de B no início, 10% em 5 minutos, 20% em 15 minutos, 25% em 25 minutos, 45% a 33 minutos,

de 50% em 38 minutos, 90% em 43 minutos, 90% em 44 minutos e 10% em 45 minutos (tempo de corrida, 45 minutos). A corrida foi monitorada nos comprimentos de onda de 270, 328 e 370 nm. A identificação dos picos foi realizada por comparação do tempo de retenção e similaridade com espectro de absorção de padrões comerciais e os espectros contidos na biblioteca do próprio equipamento, previamente inseridos na análise. Para quantificação, foram utilizados os padrões do flavonoide quercetina e da capsaicina (Sigma, Chemical Co., St. Louis, EUA) e expressa como quercetina equivalente e capsaicina equivalente, respectivamente.

3.3 Atividade antimicrobiana

3.3.1 Avaliação do crescimento bacteriano e determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

O crescimento bacteriano e a concentração inibitória mínima, em presença do EMPM e da capsaicina, foram estudados por meio do método de microdilução em caldo, segundo a metodologia descrita por Wiegand, Hilpert e Hancock (2008), com algumas modificações. Assim, o ensaio foi desenvolvido em placas de 96 poços, sendo testadas as concentrações de 5; 2,5; 1,25 e 0,625 mg/ml do extrato e 100, 50 e 25 µg/ml de capsaicina. Nos poços das concentrações 5 mg/ml e 100 µg/ml colocou-se 50 µl da solução estoque respectiva. Para as seguintes concentrações, com poços contendo previamente 50 µl de caldo LB, realizou-se diluições seriadas de 1:2, a partir das concentrações 2,5 mg/ml e 50 µg/ml, as quais continham 50 µl da solução estoque respectiva mais 50 µl de caldo LB, deixando no final um volume de 50 µl em cada poço. Culturas de *C. violaceum* ATCC 12472, *S. liquefaciens* MG1 e *P. aeruginosa* PAO1 previamente incubadas por 18 horas em caldo LB foram diluídas em solução salina (0,85%) e ajustadas na densidade óptica (DO) 0,1 a 600 nm ($1x10^8$ UFC/ml). Posteriormente, cada cultivo foi diluído em caldo LB na proporção de 1:100 e colocou-se 50 µl desta diluição em cada poço, obtendo uma concentração bacteriana final aproximada de 5 x 10^5 UFC/ml e as concentrações finais indicadas do extrato e da capsaicina. Os controles foram o crescimento da bactéria em caldo LB contendo DMSO a 2,5% para o extrato e DMSO a 1% para a capsaicina. Porém, o crescimento bacteriano também foi avaliado em concentrações menores de DMSO e em caldo LB (ver **Apêndices A - C**). Finalmente, as placas foram incubadas a 30 ºC, no caso de *C. violaceum*, e em ambas temperaturas 30 ºC e 37 ºC, no caso de *S. liquefaciens* e *P. aeruginosa*. Para avaliar o crescimento bacteriano, a DO a 595 nm foi determinada a cada duas horas por 16 horas em leitora de microplacas *Multiskan FC Thermo*

Scientific. Logo, a MIC foi determinada medindo a DO a 595 nm após 24 horas de incubação. Realizaram-se três repetições, em triplicata.

3.4 Determinação *in vitro* da atividade anti-*quorum sensing*

3.4.1 Teste de difusão em ágar para produção de violaceína em *C. violaceum*

O ensaio de difusão em ágar foi feito segundo Tan, Yin e Chan (2012), com algumas modificações. A cultura de *C. violaceum* ATCC 12472 foi crescida *overnight* em caldo LB, a 30 ºC. Em seguida, um volume de 1 ml desse cultivo foi adicionado a 20 ml de ágar LB (ágar 0,75%) fundido e distribuído em placa de Petri estéril. Os poços foram feitos com ajuda de uma ponteira esterilizada, nos quais se colocou 40 µl do extrato nas concentrações de 5; 2,5 e 1,25 mg/ml e os controles de furanona C30 a 50 µM ((Z-)-4-Bromo-5-(bromometileno-2(5h)-furanona) (controle positivo para inibição do QS), canamicina 100 µg/ml (controle crescimento) e DMSO a 2,5% (controle negativo). As placas foram incubadas a 30 ºC por 24 horas. No caso da capsaicina, o ensaio foi realizado nas concentrações de 250, 125 e 62,5 µg/ml, tendo como controles soluções de DMSO a 2,5% e furanona C30 a 50 µM.

3.4.2 Quantificação da produção de violaceína por *C. violaceum*

O teste foi realizado conforme Tan, Yin e Chan (2012, 2013), com modificações. O EMPM e o padrão de capsaicina, nas concentrações 5; 2,5; 1,25 e 0,625 mg/ml e 100, 50 e 25 µg/ml, respectivamente, foram colocados em placa de 96 poços seguindo o procedimento indicado no **item 3.3.1**. Uma cultura de *C. violaceum* ATCC 12472 foi crescida por 18 horas em caldo LB a 30 ºC. Em seguida, a cultura foi diluída em caldo LB e ajustada para uma DO de 0,1 a 600 nm, para finalmente serem adicionados 10 µl dessa diluição em cada poço completando com caldo LB um volume total de 100 µl. A estirpe biosensora *C. violaceum* CV026 também foi testada seguindo o mesmo procedimento com adição do autoindutor C6-HSL na concentração final de 100 nM por poço.

Os controles foram o crescimento bacteriano em caldo LB contendo DMSO 2,5% para o EMPM e DMSO 1% para a capsaicina. Porém, o crescimento bacteriano também foi avaliado em concentrações menores de DMSO e em caldo LB (ver **Apêndice D**). Poços contendo o extrato e a capsaicina nas concentrações testadas foram incubados sem inóculo para corrigir os valores de DO. Além disso, os poços das colunas e filas externas foram preenchidos com água ou caldo estéril para evitar a desidratação do conteúdo dos poços do teste. Em seguida, as placas foram incubadas a 30 ºC em incubadora sob agitação de 130 rotações por minuto (rpm). Após 24 horas, as placas foram completamente secas a 60 ºC.

Finalmente, DMSO puro (100 µl) foi adicionado a cada poço e a placa foi colocada em agitação a 150 rpm por aproximadamente 12 horas, para dissolução do pigmento. A absorbância de cada poço foi medida a 595 nm usando o leitor de microplacas *Multiskan FC Thermo scientific*. Realizaram-se três repetições, em triplicata.

3.4.3 Efeito do extrato metanólico de pimenta-malagueta e da capsaicina sobre a formação de biofilmes

3.4.3.1 *Ensaio de cristal de violeta*

A quantificação da formação de biofilme sob efeito do EMPM e da capsaicina foi feita segundo descrito por Stepanović et al. (2000), com algumas modificações. Em placas de 96 poços, colocou-se previamente o EMPM e a capsaicina nas concentrações 5; 2,5; 1,25 e 0,625 mg/ml e 100, 50 e 25 µg/ml, respectivamente, conforme o **item 3.3.1**. As culturas das bactérias crescidas por 18 horas em caldo LB foram ajustadas a uma DO de 0,1 a 600 nm e inoculou-se uma alíquota de 20 µl, completando com caldo LB o volume total de 200 µl por poço. De forma semelhante, os poços das colunas e filas externas foram preenchidos com água ou caldo esterilizado para evitar a desidratação do conteúdo dos poços do teste. As estirpes *P. aeruginosa* PAO1 e *S. liquefaciens* MG1 foram estudadas em duas temperaturas cada uma: 30 ºC e 37 ºC.

Após 24 horas de incubação, os sobrenadantes foram descartados e os poços lavados três vezes com 200 µl de PBS (tampão fosfato salino) esterilizado. As bactérias aderidas à superfície dos poços foram fixadas com 200 µl de metanol por 15 minutos, então o volume de metanol foi descartado e as placas foram secas a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 200 µl de uma solução de cristal violeta a 0,3% (p/v) em cada poço em temperatura ambiente por cinco minutos. O excesso de cristal violeta foi removido e enxaguado cinco vezes com PBS esterilizado. Finalmente, 200 µl de ácido acético a 33% (v/v) foram adicionados a cada poço e deixados, agir por 30 minutos, aproximadamente, para extrair o corante aderido às células. A densidade ótica de cada poço foi medida a 595 nm usando o leitor de microplacas *Multiskan FC Thermo Scientific*.

Os controles foram o crescimento bacteriano em caldo LB contendo DMSO 2,5% para o EMPM e DMSO 1% para a capsaicina. Porém, o crescimento bacteriano também foi avaliado em concentrações menores de DMSO e em caldo LB (ver **Apêndices E** e **F**). Poços contendo o extrato e a capsaicina nas concentrações testadas foram incubados sem inóculo para corrigir os valores. Vale ressaltar que o descarte dos volumes dos poços em cada uma das

etapas indicadas anteriormente se realizou por pipetagem. Realizaram-se três repetições em triplicata.

3.4.3.2 *Ensaio de Microscopia Confocal*

A microscopia confocal (CLSM, por suas siglas em inglês *Confocal Laser Scanning Microscopy*) foi realizada conforme Packiavathy et al. (2014), com algumas modificações, para a análise do biofilme das estirpes *P. aeruginosa* PAO1 e *S. liquefaciens* MG1, estudadas cada uma em duas temperaturas: 30 ºC e 37 ºC. Numa placa de 24 poços contendo uma lamínula de vidro em cada poço, colocou-se um volume total de 400 µl contendo caldo LB, EMPM ou capsaicina nas concentrações 5; 2,5; 1,25 e 0,625 mg/ml e 100, 50 e 25 µg/ml, respectivamente, e 40 µl de inóculo previamente ajustado numa DO de 0,1 a 600 nm. Os controles foram o crescimento bacteriano em caldo LB contendo DMSO 2,5% para o EMPM e DMSO 1% para a capsaicina. Porém, o crescimento bacteriano também foi avaliado em concentrações menores de DMSO e em caldo LB (ver **Apêndice G**).

Após incubação por 24 horas nas temperaturas indicadas previamente, se descartou o sobrenadante, sendo os poços lavados cinco vezes com PBS. Em seguida, 200 µl de uma solução de formaldeído 4% com PBS foram adicionados a cada poço e incubados por duas horas a temperatura ambiente para fixar o biofilme na lamínula. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e os poços contendo as lamínulas foram lavados cinco vezes com PBS. Então, cada lamínula foi corada com 40 ul de uma solução de iodeto de propidio (1:1000) por 20 minutos. Após o descarte do sobrenadante, as lamínulas foram lavadas com PBS e finalmente visualizadas no CLSM.

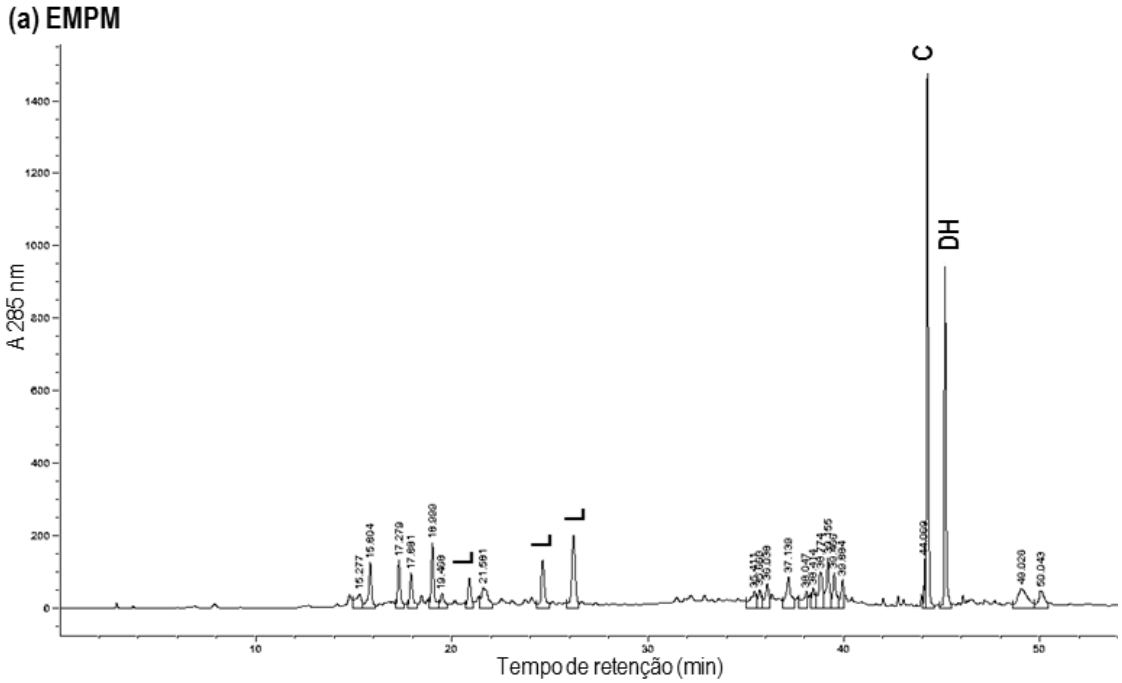
3.5 Análise estatística

Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de probabilidade. A significância para os diferentes tratamentos foi analisada pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando o software estatístico Minitab versão 17.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

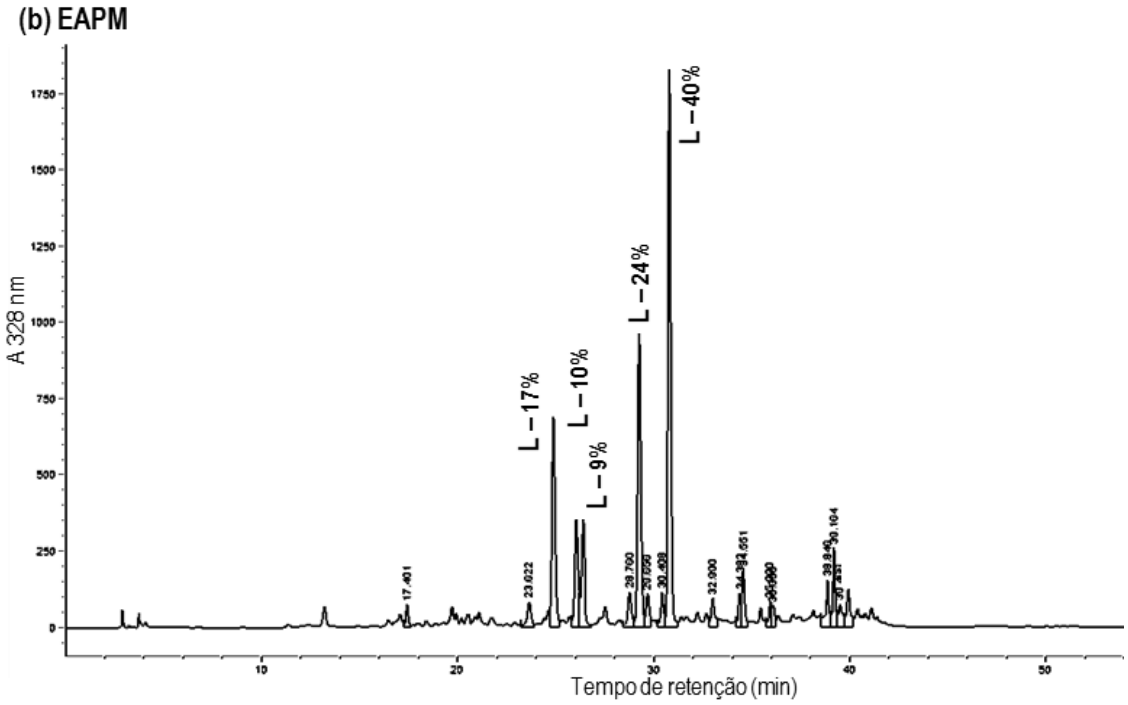
4.1 Caracterização dos compostos presentes nas pimentas

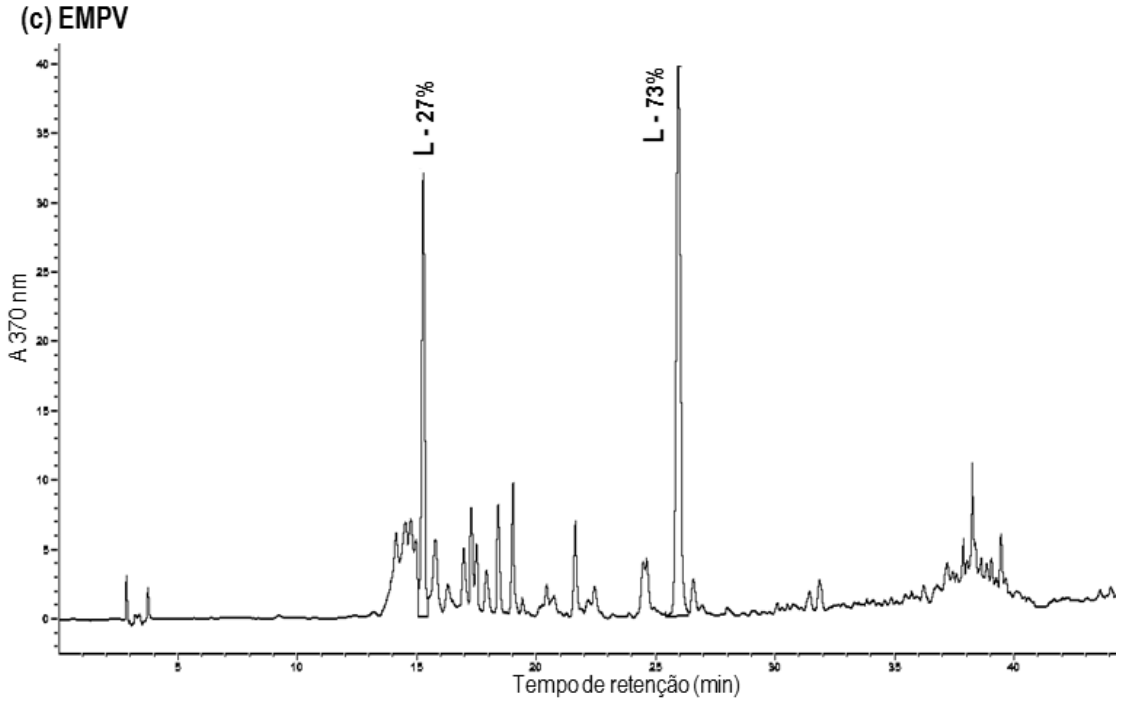
Os cromatogramas dos extratos metanólicos e amônicos da pimenta-malagueta e do pimentão vermelho estão mostrados na **Figura 4**. Dentre os flavonoides, a luteolina, pertencente ao grupo das flavonas, foi detectada em todos os extratos, em diferentes concentrações, sendo maior no extrato amônico de pimenta-malagueta (**Tabela 5)**. Os capsaicinoides estiveram presentes unicamente no extrato metanólico de pimenta-malagueta, destacando-se a capsaicina. Os compostos presentes em baixa concentração não foram identificados.



Continua

Continuação da Figura 4





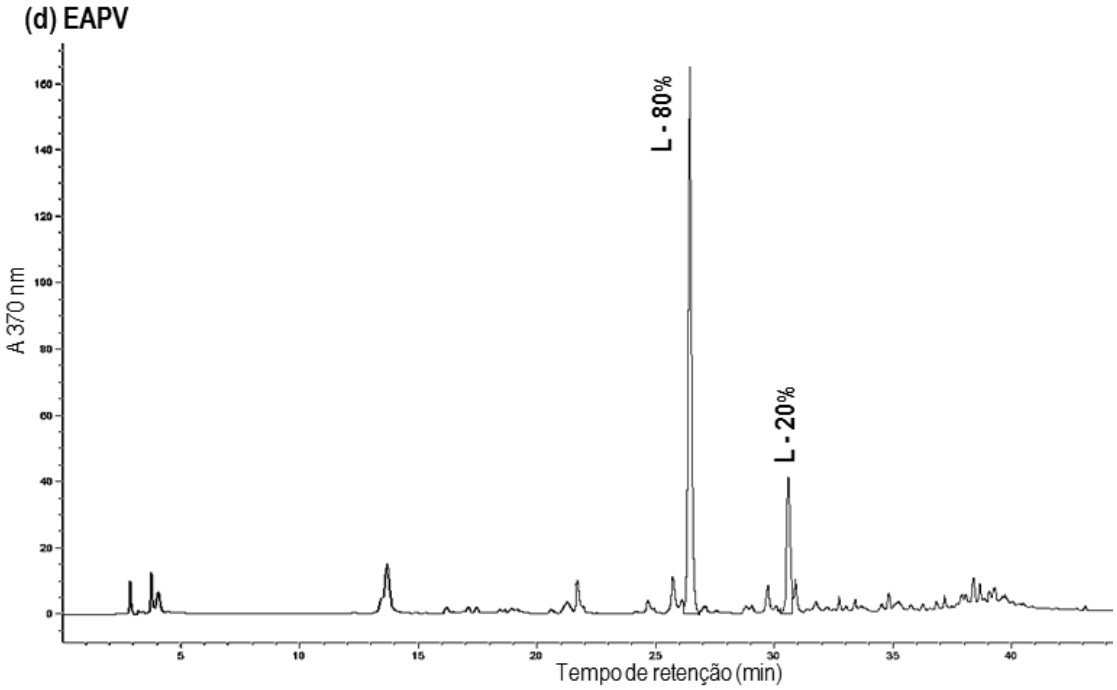


Figura 4. Cromatogramas obtidos pela CLAE dos compostos presentes em (a) EMPM a 285 nm, (b) EAPM a 328 nm, (c) EMPV e (d) EAPV a 370 nm. CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência. EMPM: Extrato metanólico de pimenta-malagueta. EAPM: Extrato amônico de pimenta-malagueta. EMPV: Extrato metanólico de pimentão vermelho. EAPV: Extrato amônico de pimentão vermelho. C: capsaicina; DH: dihidrocapsaicina; L: luteolina. As porcentagens indicam a distribuição da luteolina total presente no extrato.

O conteúdo de flavonoides e capsaicinoides presentes nos extratos metanólicos e amônicos de *C. frustescens* e *C. annuum* estão mostrados na **Tabela 5**. Os dados indicam que a cada 100 mg do EMPM encontrou-se 2,18 mg de capsaicina e 1,39 mg de dihidrocapsaicina. Os resultados são similares aos reportados por Nascimento et al. (2014) que encontraram 3,11 e 1,50 mg de capsaicina e dihidrocapsaicina, respectivamente, por cada 100 mg de extrato de pimenta-malagueta obtido com hexano. Porém, estes mesmos autores vereficaram que o extrato obtido com acetonitrila apresentou concentrações maiores de capsaicina e dihidrocapsaicina: 10,98 e 4,20 mg/100 mg de extrato, respectivamente. Apesar de ter sido obtido com solventes diferentes, o capsaicinoide presente em maior concentração em extratos de pimenta-malagueta é a capsaicina. Os flavonoides, representados pela luteolina, foram detectados em maiores concentrações nos extratos metanólico e amônico da pimenta-malagueta (**Tabela 5**).

Tabela 5. Compostos majoritários (expressos em mg por 100 mg de extrato) presentes nos extratos de pimenta-malagueta e pimentão vermelho.

Compostos	**Extratos**[1]			
	EMPM	EAPM	EMPV	EAPV
Capsaicina	2,18	nd[2]	nd	nd
Dihidrocapsaicina[3]	1,39	nd	nd	nd
Luteolina[1]	0,20434	0,56532	0,03562	0,05095

[1] Extrato metanólico de pimenta-malagueta (EMPM), extrato amônico de pimenta-malagueta (EAPM), extrato metanólico de pimentão vermelho (EMPV) e extrato amônico de pimentão vermelho (EAPV). [2] Não detectado. [3] Dihidrocapsaicina expressa em equivalentes de capsaicina. [4] Luteolina expressa em equivalentes de quercetina.

No caso do pimentão vermelho, nem o extrato metanólico e nem o amônico apresentaram capsaicina ou dihidrocapsaicina, como esperado. Além disso, as concentrações de luteolina presentes nos extratos da pimenta-malagueta foram consideravelmente maiores do que nos extratos do pimentão vermelho.

Considerando que o EMPM apresentou capsaicinoides e uma concentração de luteolina alta em comparação aos extratos de pimentão vermelho, decidiu-se focar os ensaios de atividade antimicrobiana e anti-*quorum sensing* com o extrato metanólico de pimenta-malagueta, assim como seu constituinte majoritário, a capsaicina. Testes com os extratos EAPM, EMPV e EAPV também foram realizados, e os resultados estão mostrados nos **Apêndices (H – M)** desta dissertação.

4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

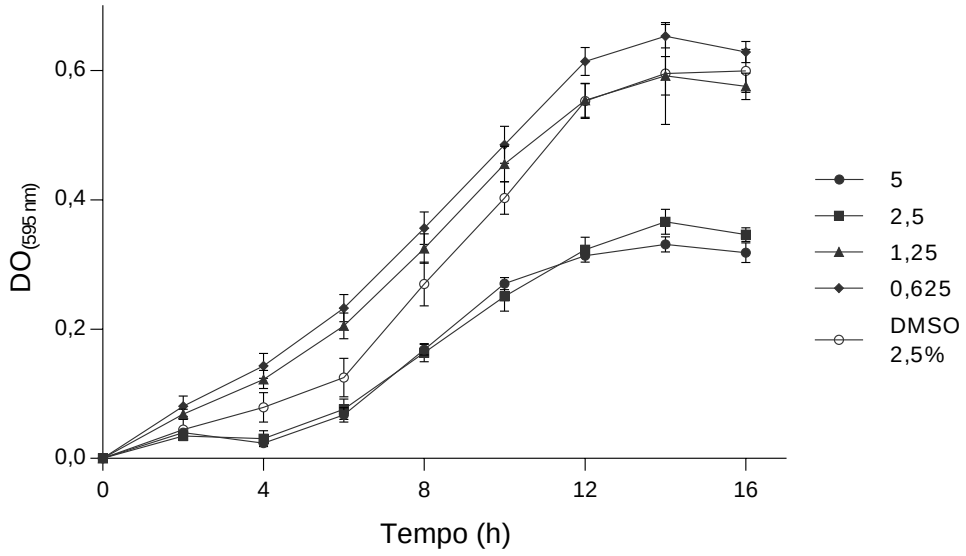
Os resultados mostram que nenhuma das concentrações avaliadas, tanto de EMPM (5; 2,5; 1,25 e 0,625 mg/ml) quanto da capsaicina (100, 50 e 25 µg/ml), inibiram totalmente o crescimento bacteriano. Portanto, as MICs do EMPM e da capsaicina não foram determinados nas condições estudadas. No entanto, se infere que a MIC é superior a 5 mg/ml e 100 µg/ml, para o EMPM e a capsaicina respectivamente, sendo que as concentrações avaliadas neste trabalho foram sub-MIC.

4.3 Efeito do extrato metanólico de pimenta-malagueta e da capsaicina sobre o crescimento bacteriano

O efeito do extrato metanólico de pimenta-malagueta e da capsaicina sobre a cinética de crescimento bacteriano foi monitorado durante 16 horas. As concentrações avaliadas de EMPM foram 5; 2,5; 1,25 e 0,625 mg/ml, enquanto que a capsaicina foi estudada nas concentrações 100, 50 e 25 µg/ml. Tais concentrações de capsaicina estão presentes de forma equivalente nas concentrações 5; 2,5 e 1,25 mg/ml de EMPM respectivamente, conforme a

Tabela 5. Esse experimento objetivou obter informações relativas à toxicidade do extrato e da capsaicina sobre os micro-organismos avaliados. Nos experimentos de inibição do *quorum sensing*, apenas concentrações que não inibem o crescimento microbiano devem ser utilizadas, conforme argumentado por Defoirdt, Brackman e Coenye (2013).

(A) EMPM



(B) Capsaicina

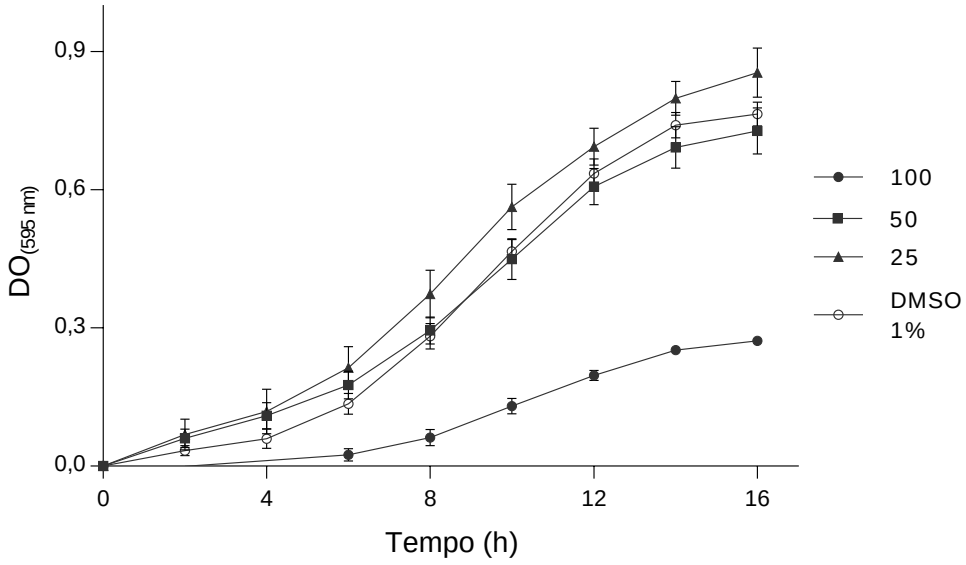


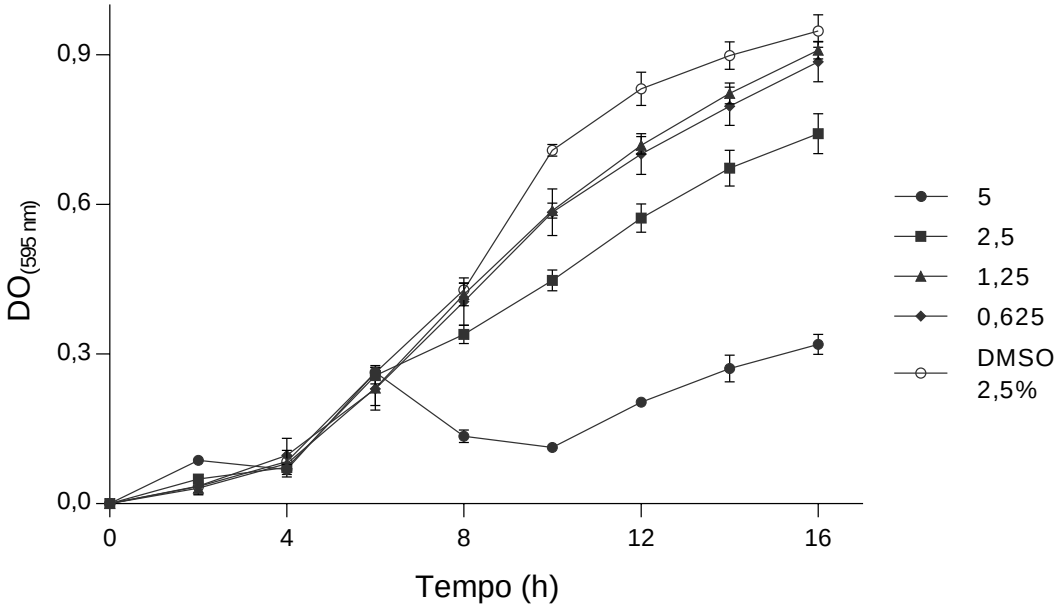
Figura 5. Efeito do extrato metanólico de pimenta-malagueta (A) e da capsaicina (B) sobre o crescimento de *C. violaceum* ATCC 12472 em diferentes concentrações (expressas em mg/ml e µg/ml respectivamente). DMSO 2,5% e DMSO 1% representam o controle do crescimento bacteriano sem extrato.

Os experimentos de crescimento de *C. violaceum* ATCC 12472 foram realizados com o objetivo de determinar se as concentrações de EMPM ou capsaicina influenciavam o crescimento bacteriano. Assim, os dados revelam que as concentrações 5 e 2,5 mg/ml de EMPM tiveram efeito inibitório significativo ($p<0,05$) sobre o crescimento, enquanto as concentrações 1,25 e 0,625 mg/ml mostraram um efeito semelhante ao controle (**Figura 5A**). De forma semelhante, a capsaicina na concentração de 100 µg/ml provocou um efeito inibitório no crescimento, enquanto que o crescimento a 50 e 25 µg/ml foi similar ao controle (**Figura 5B**). Esses resultados mostram que o EMPM e a capsaicina em altas concentrações exercem efeito inibitório sobre o crescimento de *C. violaceum*, enquanto em concentrações menores observa-se um crescimento similar ao controle. Vale ressaltar que o efeito inibitório observado é parcial, já que há crescimento do micro-organismo, embora seja inferior ao controle.

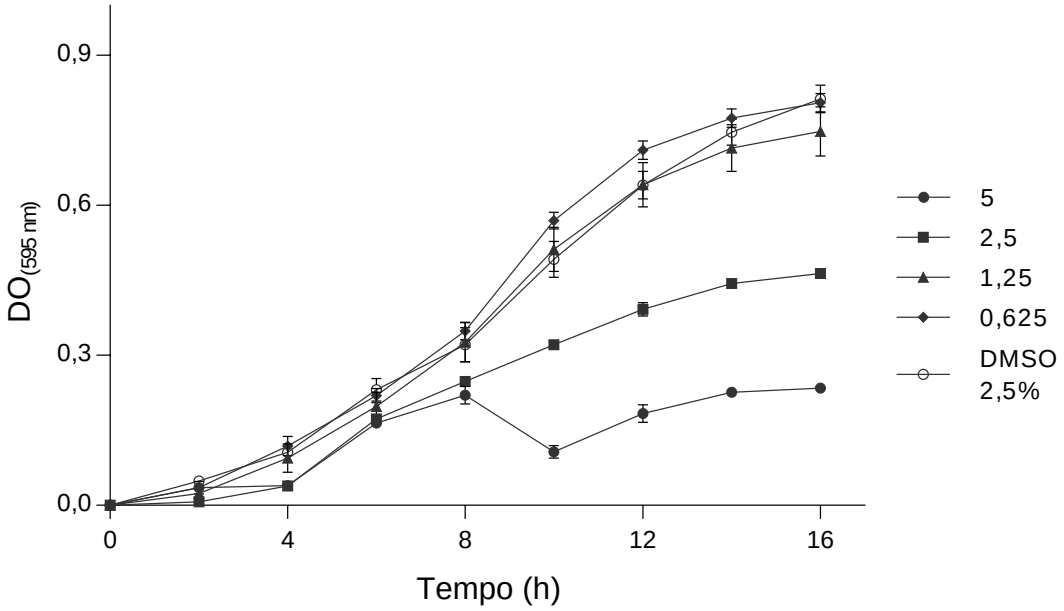
O efeito do extrato metanólico de pimenta-malagueta também foi avaliado sobre o crescimento planctônico de *S. liquefaciens* MG1 e *P. aeruginosa* PAO1 a 30 ºC e 37 ºC, cujos resultados são mostrados na **Figura 6**. Em ambas temperaturas, 30 ºC e 37 ºC (**Figuras 6A** e **B** respectivamente), o crescimento de *S. liquefaciens* foi inibido significativamente nas concentrações de 5 e 2,5 mg/ml em relação ao controle ($p<0,05$). Porém, é possível observar que nas primeiras horas, o crescimento foi similar em todas as concentrações do extrato, assim como no controle, diferenciando-se após as 6 horas em diante. Cabe destacar também que, em ambas temperaturas de incubação, o crescimento da bactéria foi diferente nas concentrações 5 e 2,5 mg/ml ($p<0,05$). Já nas concentrações 1,25 e 0,625 mg/ml o crescimento foi semelhante entre elas e também em relação ao controle. Esses dados revelam que nas temperaturas 30 ºC e 37 ºC, o crescimento de *S. liquefaciens* MG1 é parcialmente inibido nas concentrações 5 e 2,5 mg/ml, mas é similar nas concentrações 1,25 e 0,625 mg/ml em relação ao controle sem tratamento.

O crescimento de *P. aeruginosa* a 30 ºC (**Figura 6C**) mostra que as concentrações 1,25 e 0,625 mg/ml do EMPM tiveram um efeito similar sobre o crescimento em relação ao controle. No entanto, o crescimento foi diferente do controle nas concentrações 5 e 2,5 mg/ml. Por outro lado, o crescimento de *P. aeruginosa* na temperatura de 37 ºC (**Figura 6D**) foi inibido nas concentrações 5; 2,5 e 1,25 mg/ml em comparação ao controle ($p<0,05$). Já o crescimento de *P. aeruginosa* a 37 ºC na concentração 0,625 mg/ml foi similar ao controle.

(A) *S. liquefaciens* MG1 (30 ºC)



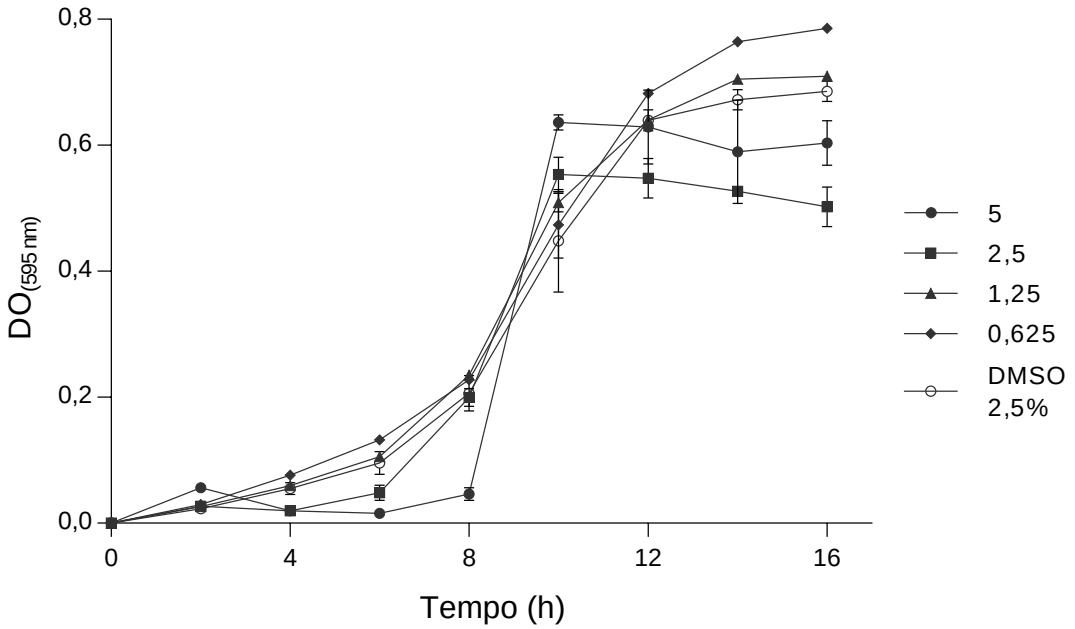
(B) *S. liquefaciens* MG1 (37 ºC)



Continua

Continuação da Figura 6

(C) *P. aeruginosa* PAO1 (30 ºC)



(D) *P. aeruginosa* PAO1 (37 ºC)

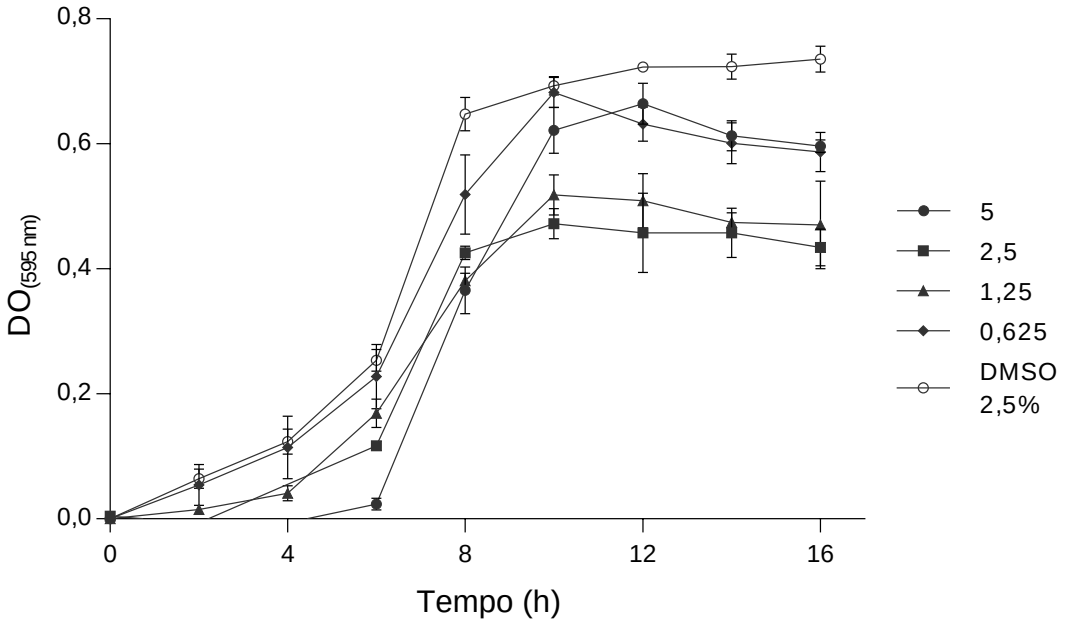
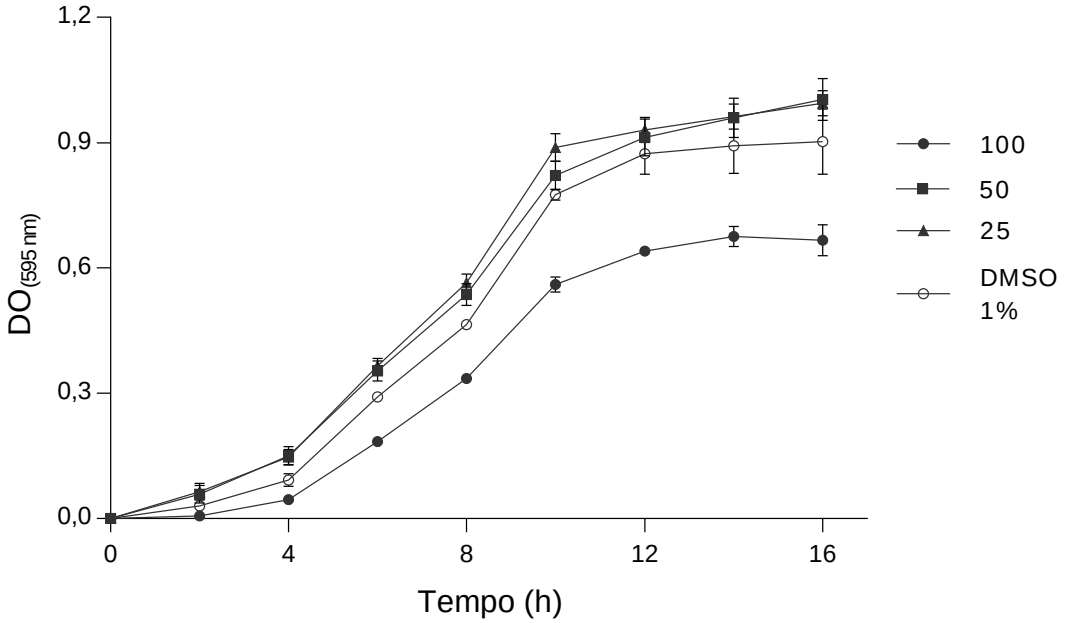


Figura 6. Efeito do extrato metanólico de pimenta-malagueta (EMPM) sobre o crescimento de *P. aeruginosa* e *S. liquefaciens* em diferentes concentrações (expressas em mg/ml) nas temperaturas de 30 ºC e 37 ºC. DMSO 2,5% representa o crescimento bacteriano sem extrato.

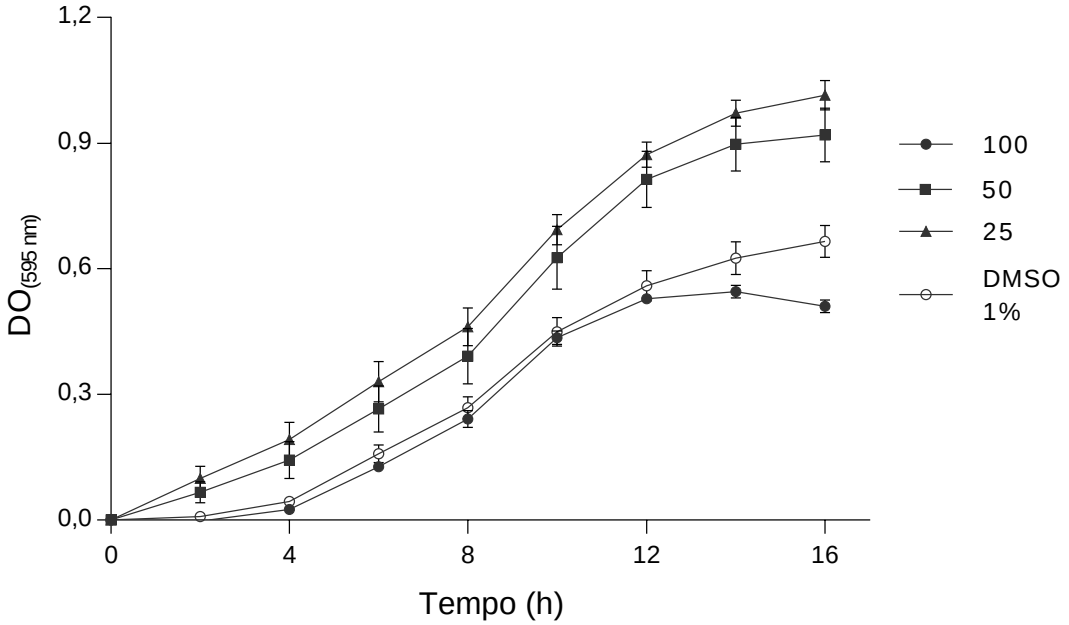
O efeito de três diferentes concentrações de capsaicina também foi avaliado sobre o crescimento das estirpes *S. liquefaciens* MG1 e *P. aeruginosa* PAO1 nas temperaturas 30 ºC e 37 ºC (**Figura 7**). Assim, observa-se que o crescimento de *S. liquefaciens* a 30 ºC foi inibido parcialmente a 100 µg/ml, enquanto que nas concentrações 50 e 25 µg/ml foi semelhante ao controle DMSO 1%. Quando tratada a 37 ºC, o crescimento de *S. liquefaciens* na concentração 100 µg/ml exhibiu inibição parcial nas últimas horas de cultivo. Por outro lado, as concentrações 50 e 25 µg/ml induziram significativamente ($p<0,05$) o crescimento bacteriano (**Figura 7B**). No momento, não se conhecem as razões para explicar o comportamento microbiano nas condições avaliadas. Entretanto, o maior crescimento nas concentrações de 25 e 50 µg/ml pode vir a influenciar os fenótipos avaliados neste trabalho. Por isso, as curvas de crescimento são extremamente importantes para uma real avaliação dos efeitos provocados pela capsaicina sobre os micro-organismos.

O crescimento de *P. aeruginosa* PAO1 foi inibido na concentração de 100 µg/ml de capsaicina, tanto na temperatura de 30 ºC quanto 37 ºC (**Figuras 7C e D**). É possível observar que o crescimento da bactéria nas concentrações de 25 e 50 µg/ml de capsaicina foi semelhante ao controle, em ambas as temperaturas avaliadas (**Figuras 7C e D**). Portanto, os ensaios fenotípicos realizados na concentração de 100 µg/ml precisam ser avaliados quanto ao potencial de inibição do crescimento desta bactéria.

(A) *S. liquefaciens* MG1 (30 ºC)



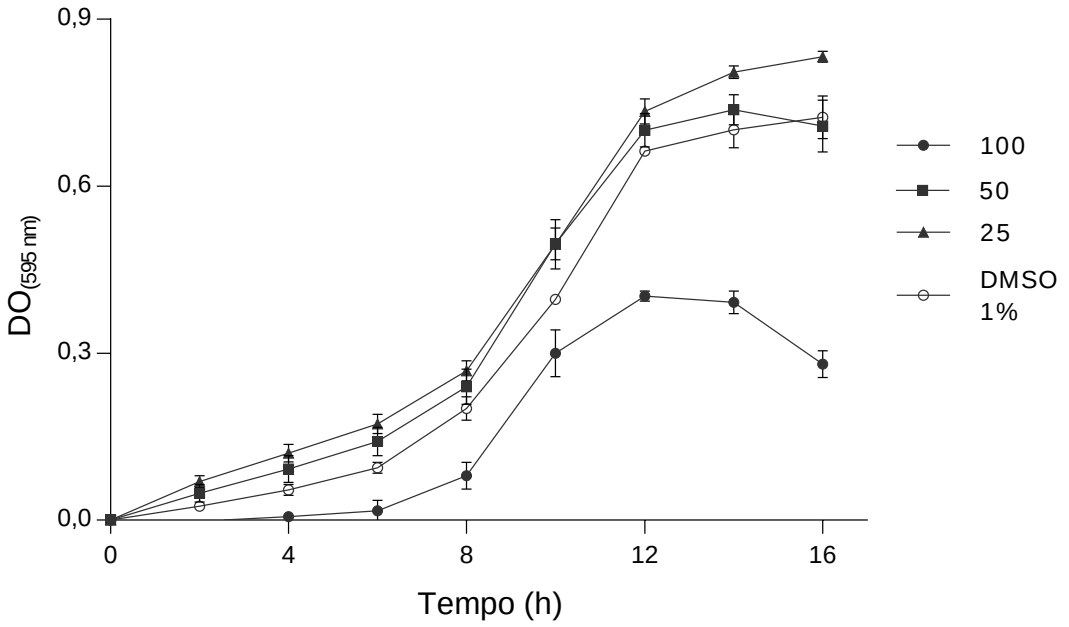
(B) *S. liquefaciens* MG1 (37 ºC)



Continua

Continuação da Figura 7

(C) *P. aeruginosa* PAO1 (30 ºC)



(D) *P. aeruginosa* PAO1 (37 ºC)

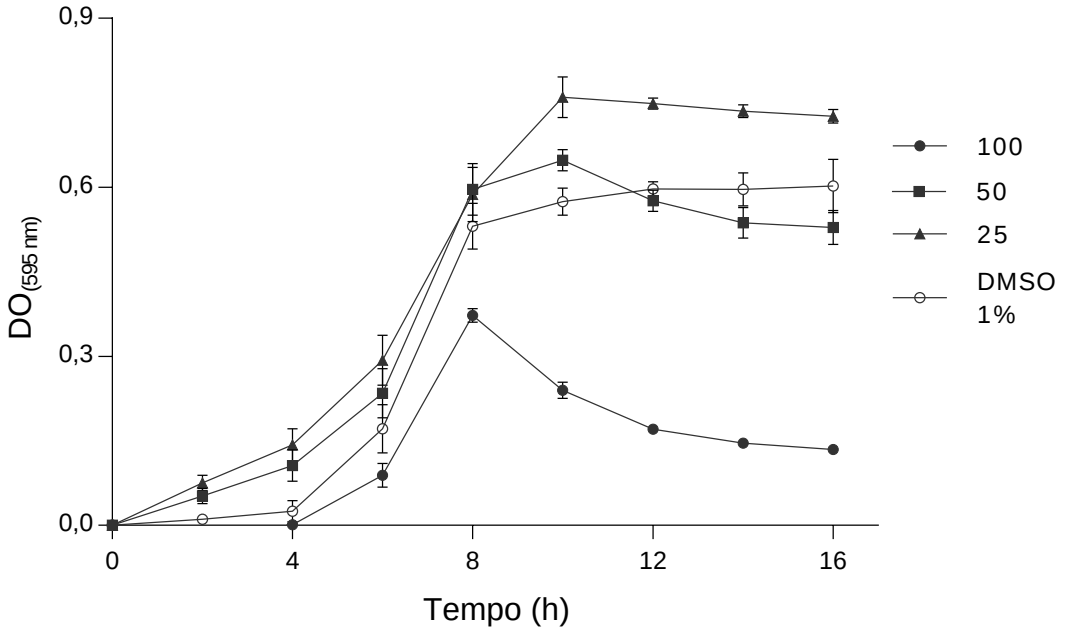


Figura 7. Efeito da capsaicina sobre o crescimento de *S. liquefaciens* e *P. aeruginosa* em diferentes concentrações (expressas em µg/ml) nas temperaturas de 30 ºC e 37 ºC. DMSO 1% representa o crescimento bacteriano sem capsaicina.

4.4 Teste de difusão em ágar para produção de violaceína em *C. violaceum*

A produção de violaceína em *C. violaceum* é um fenótipo regulado pelo *quorum sensing* e tem sido amplamente utilizada como método de avaliação da inibição do *quorum sensing* por diversos autores (TAN; YIN; CHAN, 2012, 2013; LIU et al., 2013; KALIA, 2013; SKOGMAN et al., 2016). Portanto, o EMPM e a capsaicina, em diferentes concentrações, foram avaliados quanto ao seu potencial de inibição da produção deste pigmento. O EMPM nas concentrações de 5; 2,5 e 1,25 mg/ml não mostrou efeito sobre a produção de violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472 neste ensaio. Do mesmo modo, a capsaicina nas concentrações de 250, 125 e 62,5 µg/ml não alterou a produção de violaceína. Esses resultados indicam que o EMPM e a capsaicina não influenciam esse fenótipo regulado pelo *quorum sensing*, nas condições avaliadas (**Figura 8**). Entretanto, conforme discutido por Oliveira et al. (2017), o resultado obtido por esta metodologia, não é definitivo, pois algumas moléculas presentes em extratos orgânicos podem não difundir bem no ágar.

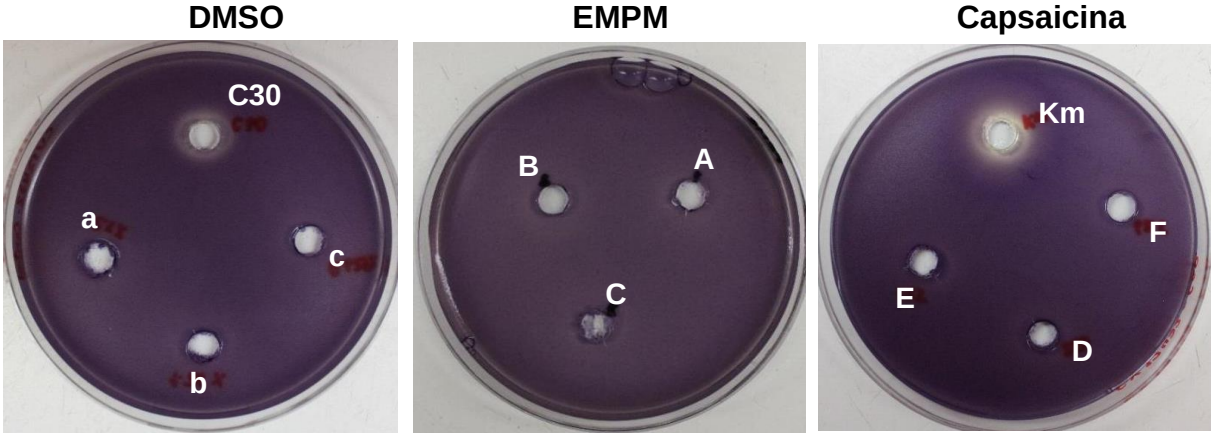


Figura 8. Teste de difusão em ágar para produção de violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472 em presença do EMPM, nas concentrações de 5; 2,5 e 1,25 mg/ml (A, B e C respectivamente), e da capsaicina, nas concentrações de 250, 125 e 62,5 µg/ml (D, E e F respectivamente), após 24 horas de incubação a 30 ºC. Furanona C30: controle da inibição da produção de violaceína. DMSO: controle de toxicidade para o extrato e a capsaicina, nas concentrações de 2,5; 1,25 e 0,625% (a, b e c respectivamente). Km: controle de inibição do crescimento bacteriano.

4.5 Quantificação da produção de violaceína por *C. violaceum*

Os efeitos do extrato metanólico de pimenta-malagueta e da capsaicina sobre a produção de violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472 foram quantificados, conforme apresentado nas **Figuras 9A** e **9B**. É possível observar que o EMPM inibiu significativamente ($p<0,05$) a produção de violaceína em todas as concentrações testadas em comparação ao controle. Por outro lado, as concentrações 5 e 2,5 mg/ml de EMPM inibiram o crescimento de *C. violaceum* (**Figura 5A**), o que poderia explicar a inibição da produção de violaceína. Já nas

concentrações de 1,25 e 0,625 mg/ml, houve inibição da síntese do pigmento (**Figura 9A**) sem inibição do crescimento microbiano (**Figura 5A**). Esses resultados sugerem que o EMPM contém compostos que, individualmente ou em conjunto, agem de forma inibitória sobre o sistema *quorum sensing* de *C. violaceum.*

A inibição da produção de violaceína pode ser resultante da inibição da produção de C6-HSL por CviI, da estabilidade do autoindutor ou por inibição da detecção de C6-HSL por CviR em *C. violaceum* (BURT et al., 2014). O ensaio realizado com *C. violaceum* ATCC 12472 não é capaz de revelar por qual mecanismo de inibição um dado composto atua. Assim, foi realizado o ensaio de inibição da produção de violaceína em *C. violaceum* CV026, estirpe incapaz de produzir AHLs. Neste ensaio, C6-HSL é adicionada ao meio para indução da produção de violaceína. Caso haja algum composto que iniba a detecção de C6-HSL por CviR, a produção de violaceína é reduzida (LASARRE; FEDERLE, 2013; KALIA, 2013). Uma diminuição do pigmento roxo foi também observada na estirpe biosensora *C. violaceum* CV026 (**Figura 9C**) na presença das concentrações mais elevadas de EMPM. Porém, nas concentrações que não inibem o crescimento microbiano, ou seja, 1,25 e 0,625 mg/ml, houve pouca ou nenhuma inibição da produção de violaceína indicando que o possível mecanismo de atuação do extrato no sistema *quorum sensing* em *C. violaceum* é sobre a síntese de AHL, já que na estirpe selvagem que necessita produzir sua própria AHL, houve maior inibição.

Resultados similares ao efeito inibitório do extrato metanólico de pimenta-malagueta sobre a produção de violaceína foram mencionados em estudos realizados com extratos de frutas como a laranja (TRUCHADO et al., 2012) e frutas vermelhas (VATTEM et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2016, 2017; RODRIGUES et al., 2016a,b), plantas medicinais como *Cassia alata* (REKHA et al., 2017) e *Combretum albiflorum* (VANDEPUTTE et al., 2010), especiarias como o orégano (ALVAREZ et al., 2014) e a baunilha (CHOO; RUKAYADI; HWANG, 2006).

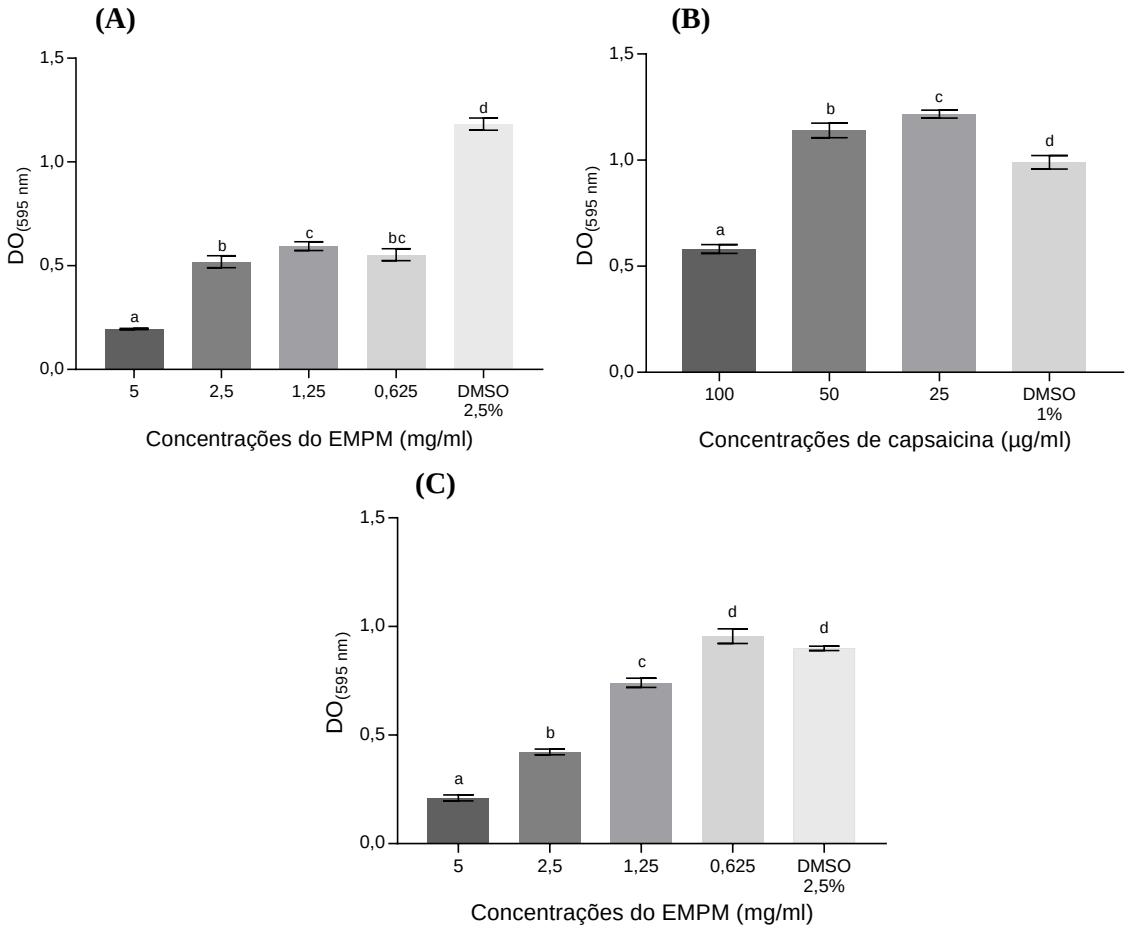


Figura 9. Efeito do extrato metanólico da pimenta-malagueta (A) e da capsaicina (B) em diferentes concentrações (expressas em mg/ml e µg/ml, respectivamente) na produção de violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472. (C) Efeito do extrato metanólico de pimenta-malagueta em diferentes concentrações na produção de violaceína em *C. violaceum* CV026 na presença do autoindutor C6-HSL. DMSO 2,5% e DMSO 1% representam o crescimento bacteriano sem EMPM e sem capsaicina. Médias seguidas pelas mesmas letras pertencentes ao mesmo tratamento não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$).

Como o principal constituinte do EMPM é a capsaicina, conforme verificado na **Figura 4**, a atividade anti-*quorum sensing* desta molécula também foi avaliada utilizando o ensaio de produção de violaceína. Três concentrações diferentes foram avaliadas, sendo a de 100 µg/ml equivalente ao teor de capsaicina presente em 5 mg/ml de EMPM (**Tabela 5**). De acordo com esses resultados, a capsaicina diminuiu a produção do pigmento na concentração 100 µg/ml o que seria consequência da inibição do crescimento de *C. violaceum* ATCC 12472 na mesma concentração (**Figura 5B**). Nas concentrações 50 e 25 µg/ml, a síntese do pigmento roxo foi estatisticamente superior ao controle ($p<0,05$). Isto sugere que a capsaicina estaria aumentando a produção de violaceína nestas concentrações. Caso esta hipótese fosse verdadeira, a adição de capsaicina à estirpe CV026 poderia confirmar tal afirmação. Portanto, para avaliar se esse aumento da produção de violaceína também ocorre na estirpe *C.*

violaceum CV026, incapaz de produzir o pigmento na ausência de AHLs, o mesmo ensaio foi desenvolvido com as concentrações 100, 50, 25 e 12,5 µg/ml de capsaicina. A produção do pigmento não foi observada em nenhuma das concentrações testadas (dados não mostrados), indicando que a capsaicina não atua como indutor do QS via proteína CviR. O aumento da produção de violaceína na estirpe ATCC 12472 pode estar relacionado com outros mecanismos diferentes do *quorum sensing*. De fato, muitos fatores podem influenciar a produção de violaceína como exemplificado por Choi et al. (2015) que citam efeitos da agitação do meio de cultivo, do tamanho do inóculo e do conteúdo de nutrientes.

Há poucos estudos que relatam resultados similares aos observados com a capsaicina, como o trabalho realizado por Mahmoudi (2015) que evidenciou a indução da síntese de violaceína em *C. violaceum* CV026 em presença do extrato de alface, sugerindo que tal extrato apresentaria compostos que atuam de forma semelhante a AHLs. Liu et al. (2013) também relataram um acréscimo significativo da produção de violaceína por *C. violaceum* ATCC 12472 em concentrações subinibitórias dos antibióticos canamicina (1,3 µg/ml), amicacina (4 µg/ml), gentamicina (4 µg/ml), tetraciclina (0,125 µg/ml) e eritromicina (0,5 µg/ml), assim como um aumento da transcrição do gene sintase *cviI* em presença da canamicina, concluindo que a indução da produção de violaceína por antibióticos é mediada pelo mecanismo do *quorum sensing*.

Os resultados mostrados na **Figura 9** indicam que o EMPM apresentaria algum composto que inibe a produção de violaceína, excetuando-se a capsaicina, como já discutido. Assim, outro composto presente no EMPM foi a luteolina (**Figura 4**), uma flavona comumente encontrada nas espécies de *Capsicum* (RUSSO, 2012). Há pouca referência sobre o efeito inibitório da luteolina no sistema *quorum sensing* bacteriano, porém esse flavonoide tem sido descrito como uma molécula indutora dos genes de nodulação (*nod*) na rizobactéria *Rhizobium meliloti*, cuja ação gera a síntese de um sinal que atua favorecendo a fixação do nitrogênio na raiz da alfafa (PETERS; FROST; LONG, 1986; BAKER, 1992). Considerando que a luteolina atua como um sinal regulando a expressão de genes em *R. meliloti*, seria interessante avaliar a ação dessa molécula sobre fenótipos regulados pelo *quorum sensing* como os estudados neste trabalho.

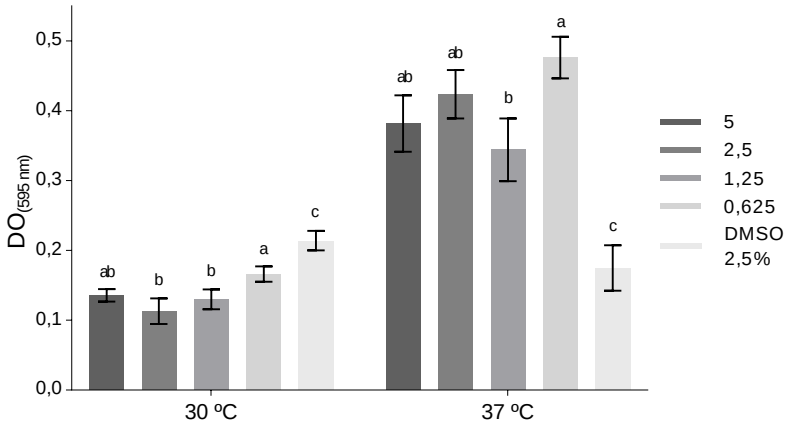
4.6 Formação de biofilmes: quantificação e visualização

A formação de biofilmes é um dos fenótipos modulados pelo QS e sua inibição é importante em diversas áreas. As **Figuras 10** e **11** apresentam os resultados da ação do EMPM sobre a formação de biofilme em *S. liquefaciens* MG1 e *P. aeruginosa* PAO1, duas bactérias modelo do sistema QS. Além do mais, *P. aeruginosa* é um importante patógeno oportunista e a bactéria mais estudada na área de comunicação célula-célula.

As diferentes concentrações de EMPM diminuíram significativamente ($p<0,05$) a biomassa de biofilme segundo o ensaio de cristal violeta em *S. liquefaciens* crescida a 30 ºC, em comparação ao controle na ausência de extrato (**Figura 10A**). Esses resultados não foram confirmados pelo ensaio de microscopia confocal (**Figura 11A**) que mostra uma maior produção de biofilme nas concentrações de 5 e 2,5 mg/ml em comparação ao controle e às demais concentrações. Paradoxalmente, o crescimento planctônico de *S. liquefaciens* foi inibido nas concentrações 5 e 2,5 mg/ml (**Figura 6A**), indicando que o EMPM contém compostos que em maiores concentrações estimulam a formação de um biofilme mais denso. Entretanto, esses resultados não explicam as diferenças observadas entre o ensaio com cristal violeta e de microscopia. É importante ressaltar que o ensaio realizado com cristal violeta foi feito em superfície de poliestireno, enquanto o ensaio de microscopia foi feito em vidro, o que poderia justificar as diferenças observadas. Além do mais, os valores de densidade ótica observados pelo ensaio de cristal violeta a 30 ºC foram relativamente baixos, especialmente se comparados aos valores a 37 ºC ou com o ensaio realizado com *P. aeruginosa*, conforme mostrado adiante.

O tratamento de *S. liquefaciens* com o EMPM a 37 ºC exibiu uma biomassa de biofilme, em cada concentração testada, superior ($p<0,05$) ao controle (**Figura 10A**). Assim, a formação de biofilme a 37 ºC foi maior que a 30 ºC, na presença de EMPM. As imagens da CLSM mostram que o biofilme formado por *S. liquefaciens*, na presença de EMPM, também foi maior do que o controle em temperatura mais elevada (**Figura 11B**). Nas diferentes concentrações de EMPM, a formação de biofilme a 37 ºC foi similar. Novamente, estes resultados contrastam com os resultados do crescimento planctônico de *S. liquefaciens*, na presença de concentrações de 5 e 2,5 mg/ml de EMPM, que mostraram inibição do crescimento a 37 ºC (**Figura 6B**).

(A) *S. liquefaciens* MG1



(B) *P. aeruginosa* PAO1

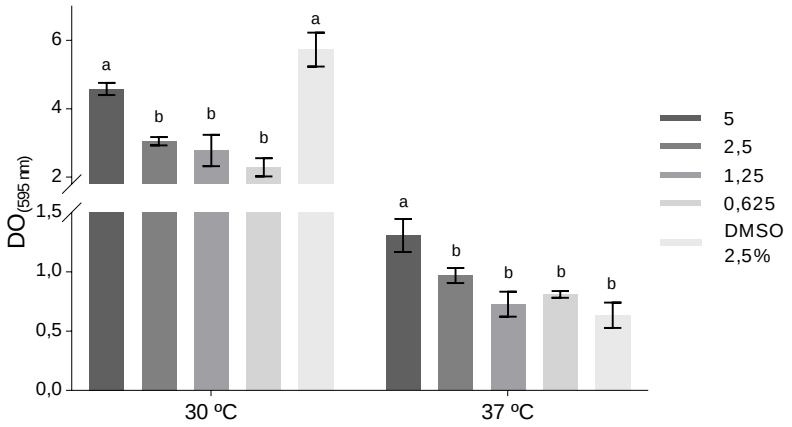


Figura 10. Efeito do extrato metanólico de pimenta-malagueta (EMPM) em diferentes concentrações (expressas em mg/ml) sobre a formação de biofilme em *S. liquefaciens* e *P. aeruginosa* nas temperaturas de incubação 30 ºC e 37 ºC, segundo o ensaio de cristal violeta. DMSO 2,5% representa o crescimento bacteriano sem extrato. Médias seguidas pelas mesmas letras, pertencentes à mesma temperatura de incubação, não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$).

Em referência à formação de biofilme de *P. aeruginosa* PAO1, independentemente do efeito de EMPM, a biomassa formada a 30 ºC foi consideravelmente maior que a de 37 ºC, conforme o teste de cristal violeta (**Figura 10B**). Na temperatura de 30 ºC, o EMPM reduziu a biomassa de *P. aeruginosa* nas concentrações 2,5, 1,25 e 0,625 mg/ml em comparação ao controle sem extrato ($p<0,05$), porém o biofilme formado em 5 mg/ml foi similar ao controle (**Figura 10B**). Por outro lado, as imagens da microscopia confocal revelam um biofilme robusto na presença das concentrações do EMPM comparado com o controle, cujos dados são mostrados na **Figura 11C.** Desta forma, esses resultados não são correspondidos com os do ensaio de cristal violeta. Já a formação de biofilme de *P. aeruginosa* a 37 ºC foi maior na concentração 5 mg/ml de EMPM em relação às demais concentrações e o controle ($p<0,05$), não havendo diferença entre estas últimas segundo o ensaio de cristal violeta (**Figura 10B**). As imagens da CLSM revelam que, em presença das concentrações do EMPM, o biofilme foi maior do que o controle sem extrato (**Figura 11D**). Tanto o ensaio de cristal violeta quanto de microscopia confirmam que os biofilmes formados por *P. aeruginosa* a 30 ºC são mais robustos que a 37 ºC. De forma semelhante, é possível observar que os biofilmes de *P. aeruginosa* são mais robustos que aqueles de *S. liquefaciens*.

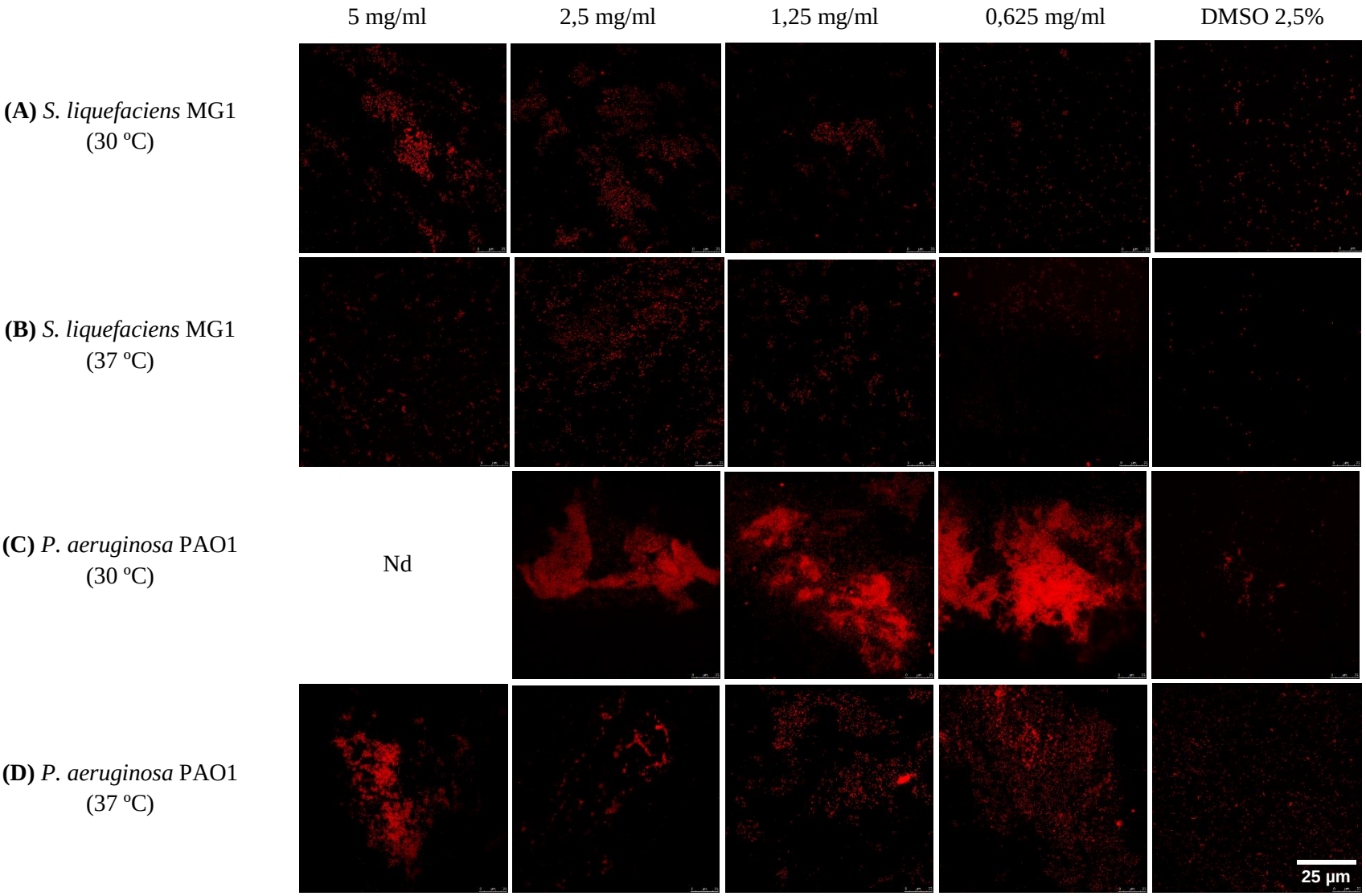
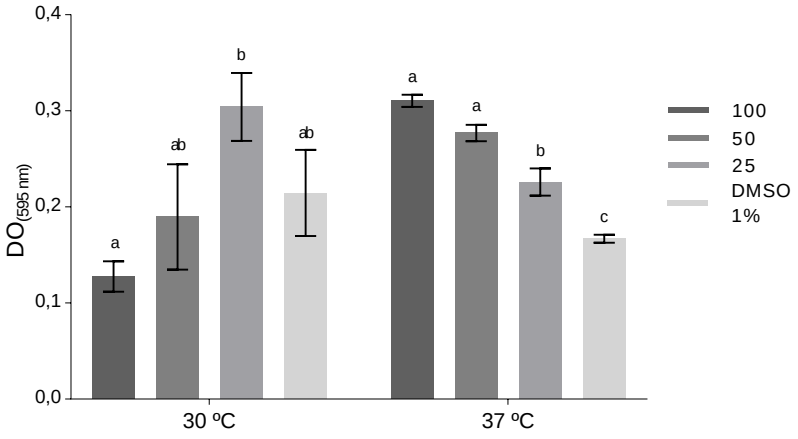


Figura 11. Imagens obtidas por Microscopia Confocal do biofilme formado pelas estirpes *S. liquefaciens* MG1 e *P. aeruginosa* PAO1 após 24 horas sob tratamento de extrato metanólico de pimenta-malagueta (EMPM) em diferentes concentrações (expressas em mg/ml) nas temperaturas de 30 ºC e 37 ºC. DMSO 2,5% representa o biofilme formado sem extrato. Nd - não determinado. A barra de escala é de 25 µm.

O efeito da capsaicina também foi avaliado sobre a formação de biofilme de *S. liquefaciens* MG1 e *P. aeruginosa* PAO1 em concentrações equivalentes às presentes no EMPM, nas temperaturas de 30 ºC e 37 ºC, como mostram as **Figuras 12** e **13**. Pelo ensaio de cristal violeta, as diferentes concentrações de capsaicina não mostraram efeito significativo ($p \geq 0,05$) sobre o biofilme de *S. liquefaciens* a 30 ºC (**Figura 12A**). Do mesmo modo, as imagens da CLSM revelam apenas células aderidas na lamínula, sem diferenças entre o tratamento e o controle (**Figura 13A**). Esses resultados sugerem que a indução da formação de biofilme observada com o EMPM não é devida à capsaicina, apesar de ter sido avaliada em concentrações equivalentes ao extrato e nas mesmas condições. Em contraste, a imagem de CLSM do biofilme formado por *S. liquefaciens* a 37 ºC mostrou que o mesmo é notoriamente maior na presença de 100 µg/ml de capsaicina (**Figura 13B**), embora o ensaio de cristal violeta tenha evidenciado uma diferença significativa ($p < 0,05$) em todas as concentrações em relação ao controle (**Figura 12A**). Tais dados sugerem que o aumento da formação de biofilme de *S. liquefaciens* a 37 ºC em presença do EMPM pode ser devido à capsaicina.

O efeito da capsaicina, composto majoritário do EMPM, também foi avaliado sobre a formação de biofilme em *P. aeruginosa* a 30 ºC e 37 ºC. Os resultados mostram que o biofilme formado a 30 ºC foi notoriamente maior do que a 37 ºC, confirmando assim os resultados exibidos anteriormente (**Figuras 10** e **11**). Além disso, o ensaio de cristal violeta revelou que as concentrações de capsaicina não tiveram efeito inibitório significativo ($p \geq 0,05$) na formação de biofilme a 30 ºC (**Figura 12B**). Contudo, as imagens da CLSM exibem um biofilme mais denso do que o controle nas concentrações de 100 e 50 µg/ml (**Figura 13C**). Esses resultados são ainda mais pertinentes quando se observa que em 100 µg/ml de capsaicina há uma diminuição do crescimento planctônico de *P. aeruginosa* (**Figura 7C**). Em suma, esses dados permitem afirmar que a indução da formação de biofilme observada em presença do EMPM se deve à capsaicina, composto majoritário presente no extrato (**Tabela 5**). Por outro lado, o biofilme formado por *P. aeruginosa* a 37 ºC, em cada uma das concentrações avaliadas de capsaicina, não mostrou diferença significativa em relação ao controle, conforme o ensaio de cristal violeta (**Figura 12B**). Esse resultado foi confirmado pela microscopia confocal (**Figura 13D**). Tais dados sugerem que o incremento da formação de biofilme de *P. aeruginosa* a 37 ºC, observado em presença do EMPM, se deve a vários ou um único composto presente no extrato, diferente da capsaicina.

(A) *S. liquefaciens* MG1



(B) *P. aeruginosa* PAO1

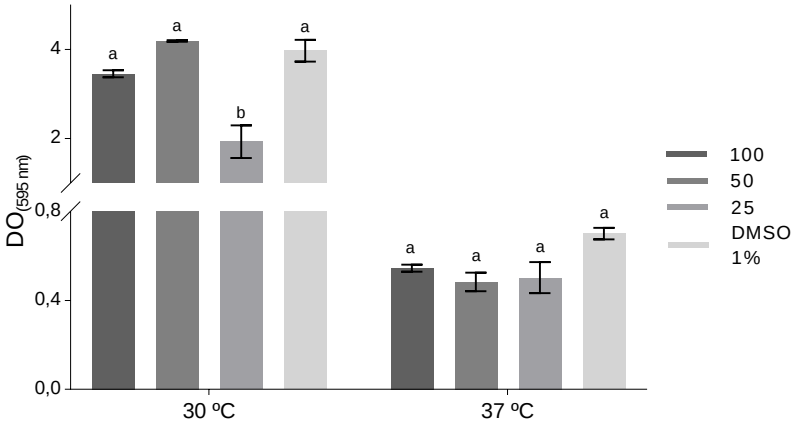


Figura 12. Efeito da capsaicina em diferentes concentrações (expressas em µg/ml) sobre a formação de biofilme em *S. liquefaciens* e *P. aeruginosa* nas temperaturas de incubação 30 ºC e 37 ºC, segundo o ensaio de cristal violeta. DMSO 1% representa o crescimento bacteriano sem capsaicina. Médias seguidas pelas mesmas letras, pertencentes à mesma temperatura de incubação, não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$).

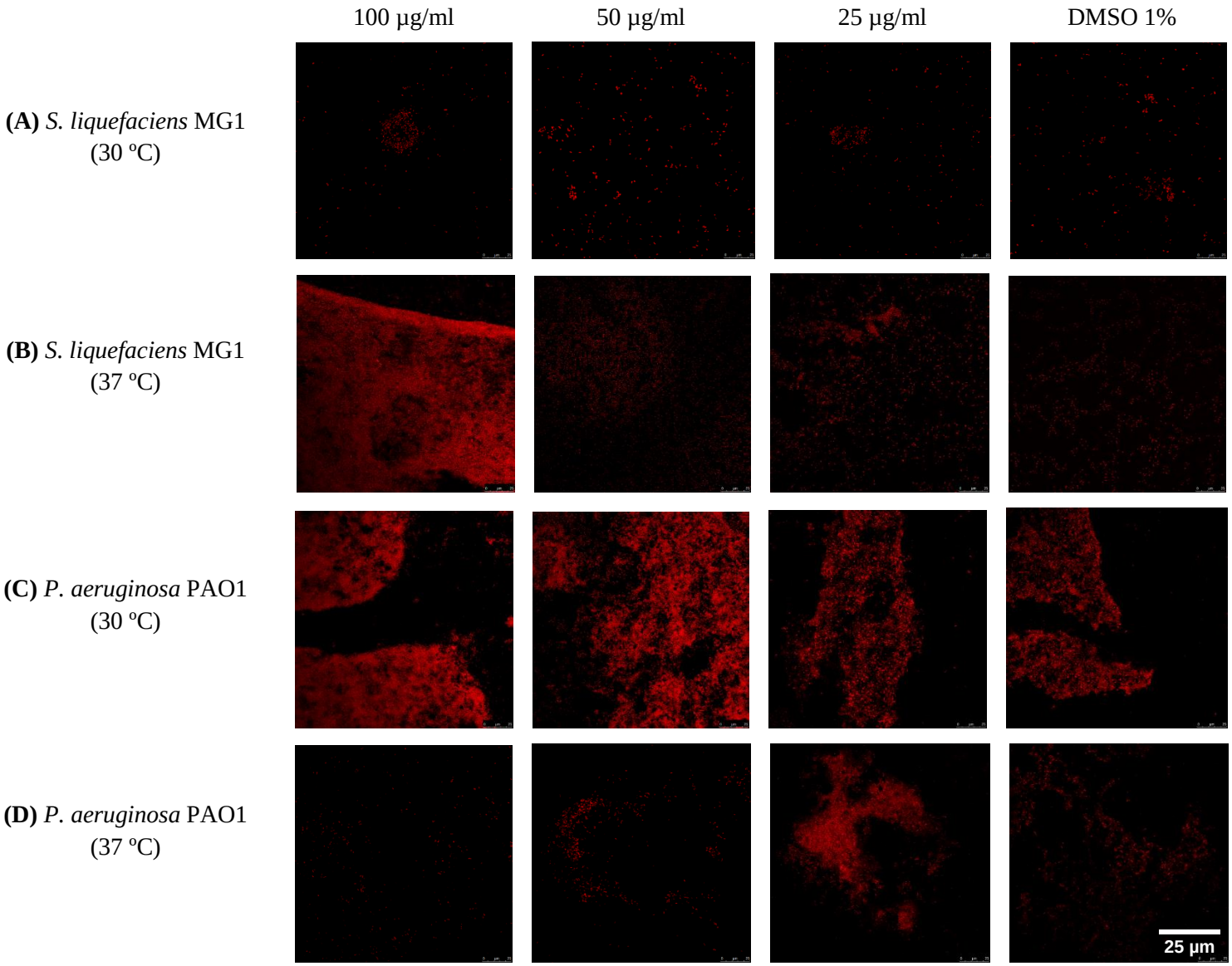


Figura 13. Imagens obtidas por Microscopia Confocal do biofilme formado pelas estirpes *S. liquefaciens* MG1 e *P. aeruginosa* PAO1 após 24 horas sob tratamento de capsaicina em diferentes concentrações (expressas em µg/ml) nas temperaturas de 30 ºC e 37 ºC. DMSO 1% representa o biofilme formado sem capsaicina. A barra de escala é de 25 µm.

Os dados deste estudo revelam que a formação de biofilme apresenta diferenças que dependem da temperatura de cultivo, conforme observado a 30 ºC e 37 ºC para ambas as bactérias estudadas. Resultados similares também foram descritos em outras bactérias, como *V. cholerae* e *Pseudomonas mandelii*, tratadas em diferentes temperaturas (TOWNSLEY; YILDIZ, 2015; VÁSQUEZ-PONCE et al., 2017). No caso de *P. aeruginosa*, os nossos dados mostram que a formação de biofilme foi consideravelmente maior a 30 ºC. Esse resultado contrasta com o relatado por Kannan e Gautam (2015), que observaram uma maior biomassa formada a 37 ºC do que a 28 ºC, 33 ºC e 42 ºC. Em contraste, o biofilme formado por *S. liquefaciens* na ausência de extrato ou capsaicina (biofilme controle) foi similar nas temperaturas 30 ºC e 37 ºC. Porém, Remuzgo-Martínez et al. (2015) mostraram que isolados clínicos de *S. liquefaciens* formavam biofilmes mais densos a 24 ºC do que a 37 ºC em superfícies de material plástico. Essas evidências indicam que a temperatura de incubação é um fator determinante na formação de biofilmes bacterianos, uma vez que os micro-organismos podem se adaptar de maneira distinta no ambiente ou hospedeiro, isto é, em temperaturas diferentes. Portanto, avaliar a formação de biofilmes, levando em consideração o estudo do efeito de temperaturas de incubação variadas no desenho experimental é importante e pode gerar resultados interessantes.

Em geral, os resultados de formação de biofilme obtidos tanto pelo ensaio de cristal violeta como pela microscopia confocal não se correspondem, diferente dos resultados mostrados por Packiavathy et al. (2014). Assim, no caso específico de *S. liquefaciens* e *P. aeruginosa* cultivadas na presença de EMPM a 30 ºC e *P. aeruginosa* cultivada na presença de capsaicina a 30 ºC e 37 ºC, a formação de biofilme avaliado por ambos métodos foi diferente. O ensaio de cristal violeta é uma técnica que permite quantificar de forma indireta a biomassa de biofilme (matriz extracelular polimérica, células vivas e mortas) por meio da adsorção e dessorção do corante impregnado no biofilme (AZEREDO et al., 2017). Não obstante, essa técnica apresenta algumas desvantagens como a superestimação ou subestimação dos valores de absorbância dependente do processo de lavagem (STEPANOVIĆ et al., 2007; AZEREDO et al., 2017). Esta característica poderia explicar parcialmente a incongruência entre os resultados obtidos por cristal violeta e microscopia confocal. O tipo de material onde se desenvolveram os biofilmes também seria um diferencial, pois o ensaio de cristal violeta foi realizado utilizando placas fabricadas em poliestireno, enquanto a microscopia confocal foi realizada em lamínulas de vidro. Tais afirmações são corroboradas pelo trabalho de Renner e Weibel (2011), que indica a superfície

do material como um fator que também influencia na formação do biofilme, podendo haver diferencias entre os biofilmes desenvolvidos sobre superfícies distintas. Deste modo, o estudo da formação de biofilmes utilizando variados tipos de materiais aporta informação valiosa no entendimento destas comunidades bacterianas.

De modo geral, os resultados apresentados do ensaio de cristal violeta revelam que *P. aeruginosa* produz mais biofilme do que *S. liquefaciens*. Porém, o estudo de Tang et al. (2013) mostrou que os biofilmes de *Pseudomonas* spp. e *Serratia* spp., dois isolados de fontes ambientais, foram similares. Contrariamente, Cleto et al. (2012) relataram que isolados de *Serratia* spp., provenientes de uma planta processadora de leite previamente sanitizada, formavam mais biofilme do que as *Pseudomonas* spp. isoladas da mesma amostra. Contudo, a literatura mostra que *P. aeruginosa* PAO1 é uma ótima formadora de biofilme (SHROUT et al., 2011; MELIANI; BENSOLTANE, 2015; RASAMIRAVAKA et al., 2015) confirmando os resultados apresentados neste estudo. Por outro lado, Labbate et al. (2004) encontraram que o biofilme de *S. liquefaciens* MG1 é formado unicamente de células filamentosas após 24 horas de crescimento, alcançando a maturidade às 72 horas de incubação. Esse fenômeno explicaria a pouca densidade dos biofilmes de *S. liquefaciens* observados neste trabalho, já que o tempo de incubação foi de 24 horas.

Diversos compostos provenientes de fontes naturais como as plantas e algas têm sido amplamente estudados com o objetivo de identificar moléculas que inibem o sistema *quorum sensing*. Essa procura tem permitido também a identificação de compostos que inibem a formação de biofilme, por ser um fenótipo regulado por tal mecanismo de sinalização celular (**Tabela 2**). Por exemplo, tanto o extrato de alho como a molécula *ajoene*, presente nesta planta, mostraram sinergia com o antibiótico tobramicina para reduzir a formação de biofilme de *P. aeruginosa*, assim como outros fatores de virulência regulados pelo *quorum sensing* como os ramnolipídeos (RASMUSSEN et al., 2005; JAKOBSEN et al., 2012). Outras plantas como frutas e especiarias foram descritas por terem inibido a formação de biofilme de diferentes bactérias, isto é, via distintos sistemas *quorum sensing* (**Tabela 2**).

Os dados do presente estudo mostram que o EMPM e a capsaicina aumentaram a formação do biofilme em *P. aeruginosa* a 30 ºC, enquanto o biofilme de *S. liquefaciens* é incrementado em presença da capsaicina a 37 ºC. Efeitos similares foram relatados por Cho et al. (2013) que avaliaram o ácido betulínico, o ácido tânico e nove flavonoides na formação de biofilme em *P. aeruginosa* PA14. Também, Plyuta et al. (2013) reportaram um incremento significativo da formação de biofilme de *P. aeruginosa* PAO1 em presença de diferentes

compostos (**Tabela 3**). Os autores demonstraram que tais compostos não agem como análogos das AHLs e que provavelmente estimulam a síntese de AHLs em *P. aeruginosa*. Adicionalmente, Corral-Lugo et al. (2016) relataram o ácido rosmarínico como um composto que induz a formação de biofilme e a produção de piocianina e elastase em *P. aeruginosa* PAO1. A indução da formação de biofilme foi observada numa faixa de 0,05 a 2 mM durante as primeiras 8 horas de incubação a 30 ºC. Os autores encontraram que o ácido rosmarínico atua como um composto análogo a C4-HSL, ligando-se ao RhlR. Além disso, o ácido rosmarínico estimula a transcrição de RhlR de forma superior a C4-HSL. Aparentemente, isto seria utilizado pelas plantas como um mecanismo de defesa frente a um processo infeccioso, visto que os genes regulados pelo *quorum sensing* seriam expressos prematuramente. Conforme as evidências apresentadas, existem compostos que induzem a formação de biofilme, embora sejam pouco pesquisados. Deste modo, mais estudos são necessários para determinar os mecanismos pelos quais *P. aeruginosa* e *S. liquefaciens* incrementam a formação de biofilme em presença da capsaicina ou do EMPM.

Existe um grande entusiasmo por encontrar novas formas de inibir a formação de biofilme já que estas comunidades tornam as bactérias mais resistentes frente aos tratamentos utilizados para a sua erradicação, como os antibióticos. No entanto, pouco tem sido descrito sobre compostos que tenham induzido a formação de biofilme em bactérias (**Tabela 3**). Assim, Beauregard et al. (2013) observaram que a formação de biofilmes em *Bacillus subtilis* é induzida na presença dos polissacarídeos arabinogalactano, pectina e xilano e cuja indução é devida ao incremento na síntese da matriz extracelular, pois tais polissacarídeos servem como fonte de carbono. Kaplan (2011) descreve a indução da formação de biofilme de *P. aeruginosa* por diversas classes de antibióticos em concentrações sub-MIC. Os mecanismos que explicam tal efeito variam conforme o antibiótico testado. Por exemplo, a tobramicina provoca uma redução dos níveis do mensageiro intracelular diguanilato cíclico (c-di-GMP), enquanto a indução da formação de biofilme por gentamicina estaria envolvida com genes da biogênese fimbrial, produção de alginato, regulação da motilidade, metabolismo da energia, entre outros genes. Tais dados são interessantes uma vez que a tobramicina também é utilizada para inibir a formação de biofilme (JAKOBSEN et al., 2012). Essas evidências sugerem que a indução da formação de biofilmes bacterianos, devido à presença de certos compostos, aconteceria por diferentes mecanismos, os quais merecem ser estudados em maior profundidade. Tal conhecimento poderá ampliar o entendimento sobre estas comunidades

bacterianas, possibilitando o desenvolvimento de estratégias que permitam combater a formação de biofilmes.

Dentre os resultados descritos neste trabalho, foi possível observar que a mesma concentração que inibiu parcialmente o crescimento planctônico, induziu a formação de biofilme. Tal é o caso de *P. aeruginosa* a 30 ºC e *S. liquefaciens* a 37 ºC, crescidas na presença de 100 µg/ml de capsaicina. Em geral, este fenômeno também foi observado nas concentrações 5 e 2,5 mg/ml de EMPM. Resultados similares foram descritos por Sudagidan e Yemenicioğlu (2012), em cujos ensaios foi avaliado o crescimento e a formação de biofilmes de isolados da bactéria *S. aureus*, provenientes de leite cru e queijos, na presença de lisozima. Esta informação permite notar a importância de estudar o crescimento planctônico bacteriano junto com ensaios que avaliem o efeito de compostos sobre a capacidade de formação de biofilmes, pois as concentrações que inibem o crescimento bacteriano não necessariamente reduzem a formação de biofilmes, podendo até induzir a formação desses.

Os mecanismos que explicam o efeito do EMPM e da capsaicina sobre a formação de biofilmes bacterianos não foram elucidados neste trabalho. Assim, Shrout et al. (2011) afirmaram que as condições de crescimento podem modular o mecanismo do *quorum sensing*, tendo efeitos sobre a formação do biofilme. Então, os resultados deste trabalho poderiam ser explicados por alterações no sistema *quorum sensing* em presença do extrato ou da capsaicina. Existem estudos que indicam que o *quorum sensing* é ativado em algumas etapas específicas durante a formação do biofilme (RUMBAUGH; AHMAD, 2014). Deste modo, a formação de biofilme de *P. aeruginosa* depende do *quorum sensing* especificamente nas fases de maduração e dispersão, enquanto que em *S. liquefaciens* aparece na maturação (RUMBAUGH; AHMAD, 2014). Esta forma de entendimento do *quorum sensing* e sua função durante a formação destas comunidades é particularmente contrária ao indicado por Shrout et al. (2011). Esses autores afirmam que entender com exatidão como o *quorum sensing* funciona dentro destas comunidades bacterianas não seria tão fácil de decifrar. Considerando que a multiplicação celular acontece desde o inicio da formação do biofilme, o mecanismo do *quorum sensing* poderia ser ativado mais cedo e estar regulando a formação do biofilme em todas as etapas, provavelmente com maior ou menor participação em algumas.

Embora existam poucos estudos que determinem o efeito de extratos de pimentas do gênero *Capsicum* sobre o sistema *quorum sensing*, este estudo é o primeiro a avaliar o efeito de extratos de pimenta-malagueta na produção de violaceína. Adicionalmente, este trabalho é pioneiro no estudo do efeito da capsaicina em fenótipos que são regulados pelo *quorum*

sensing como a produção de violaceína e a formação de biofilmes em *S. liquefaciens* e *P. aeruginosa*. De acordo com os resultados apresentados, nem o EMPM e nem a capsaicina se revelaram como fortes inibidores do sistema *quorum sensing* em *C. violaceum, S. liquefaciens* e *P. aeruginosa*, quando utilizados em concentrações sub-letais.

5. CONCLUSÕES

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

- Os compostos majoritários presentes nos extratos de pimenta-malagueta são a luteolina, capsaicina e dihidrocapsaicina;
- O EMPM e a capsaicina inibem parcialmente o crescimento de *C. violaceum*, *S. liquefaciens* e *P. aeruginosa* em concentrações sub-MIC.
- O EMPM possui efeito inibitório sobre a produção de violaceína em *C. violaceum*; porém, a capsaicina não exibe o mesmo efeito;
- O EMPM e a capsaicina não inibem a formação de biofilme de *S. liquefaciens* e *P. aeruginosa*;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, R. C. et al. Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 300-8, 2014.

ALVAREZ, M. V. et al. Oregano essential oil-pectin edible films as anti-quorum sensing and food antimicrobial agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 699, 2014.

ANTUNES, A. A. ***Chromobacterium violaceum*: Caracterização cultural, bioquímica, molecular e detecção da produção de polihidroxialcanoato-PHA**. 2006. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1124-31, 2004.

AZEREDO, J. et al. Critical review on biofilm methods. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 313-351, 2017.

BAI A. J.; RAI, V. R. Bacterial quorum sensing and food industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 184-194, 2011.

BAKER, M. E. Evolution of regulation of steroid-mediated intercellular communication in vertebrates: insights from flavonoids, signals that mediate plant-*rhizobia* symbiosis. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 41, n. 3-8, p. 301-8, 1992.

BEAUREGARD, P. B. et al. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 17, p. E1621-30, 2013.

BÉDARD, E.; PRÉVOST, M.; DÉZIEL, E. *Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings. **MicrobiologyOpen**, v. 5, n. 6, p. 937-956, 2016.

BOYLE, K. E. et al. Exploiting social evolution in biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 207-12, 2013.

BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 20, p. 11660-5, 2003.

BURT, S. A. et al. The natural antimicrobial carvacrol inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and reduces bacterial biofilm formation at sub-lethal concentrations. **PLoS one**, v. 9, n. 4, p. e93414, 2014.

CAMILLI, A.; BASSLER, B. L. Bacterial small-molecule signaling pathways. **Science**, v. 311, n. 5764, p. 1113-6, 2006.

CHATTERJEE, S. et al. Capsaicin, a potential inhibitor of cholera toxin production in *Vibrio cholerae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 306, n. 1, p. 54-60, 2010.

CHO, H. S. et al. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation by plant metabolite ε-viniferin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 29, p. 7120-6, 2013.

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

CHOO, J. H.; RUKAYADI, Y.; HWANG, J. K. Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 637-41, 2006.

CLATWORTHY, A. E.; PIERSON, E.; HUNG, D. T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 9, p. 541-8, 2007.

CLETO, S. et al. Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. **PLoS one**, v. 7, n. 6, p. e40189, 2012.

CORRAL-LUGO, A. et al. Rosmarinic acid is a homoserine lactone mimic produced by plants that activates a bacterial quorum-sensing regulator. **Science Signaling**, v. 9, n. 409, p. ra1, 2016.

COSTERTON, J. W. et al. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-45, 1995.

DALE, J.; PARK, S. **Molecular genetics of bacteria**. 5th ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2010. 388p.

DEFOIRDT, T.; BRACKMAN, G.; COENYE, T. Quorum sensing inhibitors: how strong is the evidence? **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 12, p. 619-24, 2013.

EBERHARD, A. et al. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. **Biochemistry**, v. 20, n. 9, p. 2444-9, 1981.

FUQUA, W. C.; WINANS, S. C.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 2, p. 269-75, 1994.

FUQUA, C.; GREENBERG, E. P. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 9, p. 685-95, 2002.

HELMAN, Y.; CHERNIN, L. Silencing the mob: disrupting quorum sensing as a means to fight plant disease. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, n. 3, p. 316-29, 2015.

HENRIQUES, A.; VASCONCELOS, C.; CERCA, N. A importância dos biofilmes nas infeções nosocomiais - o estado da arte. **Arquivos de Medicina**, v. 7, n. 1, p. 27-36, 2013.

HIRAKAWA, H.; TOMITA, H. Interference of bacterial cell-to-cell communication: a new concept of antimicrobial chemotherapy breaks antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 114, 2013.

JAKOBSEN, T. H. et al. Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2314-25, 2012.

JANSSENS, J. C. et al. Small molecules for interference with cell-cell-communication systems in Gram-negative bacteria. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 21, p. 2144-56, 2008.

KALIA, V. C. Quorum sensing inhibitors: an overview. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 224-45, 2013.

KALIA, V. C. **Quorum sensing vs quorum quenching: a battle with no end in sight**. New York: Springer, 2014. 391p.

KANNAN, A.; GAUTAM, P. A quantitative study on the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Springerplus**, v. 4, p. 379, 2015.

KAPLAN, J. B. Antibiotic-induced biofilm formation. **International Journal of Artificial Organs**, v. 34, n. 9, p. 737-51, 2011.

KHAN, F. A. et al. Pharmacological importance of an ethnobotanical plant: *Capsicum annuum* L. **Natural Product Research**, v. 28, n. 16, p. 1267-74, 2014.

LABBATE, M. et al. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 3, p. 692-8, 2004.

LASARRE, B.; FEDERLE, M. J. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 1, p. 73-111, 2013.

LAZDUNSKI, A. M.; VENTRE, I.; STURGIS, J. N. Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 7, p. 581-92, 2004.

LIU, Z. et al. Antibiotics at subinhibitory concentrations improve the quorum sensing behavior of *Chromobacterium violaceum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 341, n. 1, p. 37-44, 2013.

LUO, X. J.; PENG, J.; LI, Y. J. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 650, n. 1, p. 1-7, 2011.

MACHADO, S. G. et al. *Pseudomonas* spp. and *Serratia liquefaciens* as predominant spoilers in cold raw milk. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 8, p. M1842-9, 2015.

MAHMOUDI, E. Signaling molecules from *Lactuca sativa* L. induced quorum sensing phenotypes in bacteria. **Journal of Plant Protection Research**, v. 55, n. 2, p. 166-171, 2015.

MANEFIELD, M. et al. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. **Microbiology**, v. 148, n. Pt 4, p. 1119-27, 2002.

MCCARTHY, R. R.; O'GARA, F. The impact of phytochemicals present in the diet on microbial signalling in the human gut. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 684-691, 2015.

MELIANI, A.; BENSOLTANE, A. Review of *Pseudomonas* attachment and biofilm formation in food industry. **Poultry, Fisheries and Wildlife Sciences**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2015.

MORÁN, A. et al. Non-toxic plant metabolites regulate *Staphylococcus* viability and biofilm formation: a natural therapeutic strategy useful in the treatment and prevention of skin infections. **Biofouling**, v. 30, n. 10, p. 1175-82, 2014.

MORÉ, M. I. et al. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. **Science**, v. 272, n. 5268, p. 1655-8, 1996.

MOROHOSHI, T. et al. N-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. **FEMS Microbiology Letters**, v. 279, n. 1, p. 124-30, 2008.

MULCAHY, L. R.; ISABELLA, V. M.; LEWIS, K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. **Microbial Ecology**, v. 68, n. 1, p. 1-12, 2014.

NASCIMENTO, P. L. et al. Quantification, antioxidant and antimicrobial activity of phenolics isolated from different extracts of *Capsicum frutescens* (Pimenta Malagueta). **Molecules**, v. 19, n. 4, p. 5434-47, 2014.

NEALSON, K. H.; HASTINGS, J. W. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. **Microbiological Reviews**, v. 43, n. 4, p. 496-518, 1979.

NI, N. et al. Inhibitors and antagonists of bacterial quorum sensing. **Medicinal Research Reviews**, v. 29, n. 1, p. 65-124, 2009.

OLIVEIRA, B. D. et al. Antioxidant, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of *Rubus rosaefolius* phenolic extract. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 59-66, 2016.

OLIVEIRA, B. D. et al. Microbial control and quorum sensing inhibition by phenolic compounds of acerola (*Malpighia emarginata*). **International Food Research Journal**, v. 24, n. 5, p2228-2237, 2017.

PACKIAVATHY, I. A. et al. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin - an anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. **Food Chemistry**, v. 148, p. 453-60, 2014.

PACZKOWSKI, J. E. et al. Flavonoids Suppress *Pseudomonas aeruginosa* Virulence through Allosteric Inhibition of Quorum-sensing Receptors. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 292, p. 4064-4076, 2017.

PARSEK, M. R. et al. Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 8, p. 4360-5, 1999.

PETERS, N. K.; FROST, J. W.; LONG, S. R. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. **Science**, v. 233, n. 4767, p. 977-80, 1986.

PLYUTA, V. et al. Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 121, n. 11, p. 1073-81, 2013.

RASAMIRAVAKA, T. et al. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 759348, 2015.

RASMUSSEN, T. B. et al. How *Delisea pulchra* furanones affect quorum sensing and swarming motility in *Serratia liquefaciens* MG1. **Microbiology**, v. 146 Pt 12, p. 3237-44, 2000.

RASMUSSEN, T. B. et al. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 5, p. 1799-814, 2005.

RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategy to combact bacteria-mediated disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 2, p.117-128, 2010.

REIFSCHNEIDER, F. J. B.; NASS, L. L.; HENZ, G. P. **Uma pitada de biodiversidade na mesa dos brasileiros**. Brasília, DF. 2015. 139p.

REKHA, P. D. et al. A medicinal herb *Cassia alata* attenuates quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 231-238, 2017.

REMUZGO-MARTÍNEZ, S. et al. Biofilm formation and quorum-sensing-molecule production by clinical isolates of *Serratia liquefaciens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 10, p. 3306-15, 2015.

RENNER, L. D.; WEIBEL, D. B. Physicochemical regulation of biofilm formation. **Materials Research Society bulletin**, v. 36, n. 5, p. 347-355, 2011.

RODRIGUES, A. C. et al. Anti-quorum sensing activity of phenolic extract from *Eugenia brasiliensis* (Brazilian cherry). **Food Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 337-343, 2016.

RODRIGUES, A. C. et al. Quorum Quenching and Microbial Control through Phenolic Extract of Eugenia Uniflora Fruits. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 10, p. M2538-M2544, 2016.

ROMERO, M.; ACUÑA, L.; OTERO, A. Patents on quorum quenching: interfering with bacterial communication as a strategy to fight infections. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 2-12, 2012.

RÖMLING, U.; BALSALOBRE, C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. **Journal of Internal Medicine**, v. 272, n. 6, p. 541-61, 2012.

RUMBAUGH, K. P. **Quorum sensing: methods and protocols**. New York: Humana Press, 2011. 315p.

RUMBAUGH, K. P. E.; AHMAD, I. E. **Antibiofilm Agents: from diagnosis to treatment and prevention**. New York: Springer, 2014. 497p.

RUSSO, V. M. **Peppers: botany, production and uses**. Wallingford, Oxfordshire, UK; Cambridge, MA: CABI, 2012. 280p.

SADEKUZZAMAN, M. et al. Current and recent advanced strategies for combating biofilms. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, p. 491-509, 2015.

SAGA, T.; YAMAGUCHI, K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. **Japan Medical Association Journal**, v. 52, n. 2, p. 103-108, 2009.

SHI, X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 9, p 407-413, 2009.

SHROUT, J. D. et al. The contribution of cell-cell signaling and motility to bacterial biofilm formation. **Materials Research Society bulletin**, v. 36, n. 5, p. 367-373, 2011.

SKANDAMIS, P. N.; NYCHAS, G. J. Quorum sensing in the context of food microbiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5473-82, 2012.

SKOGMAN, M. E. et al. Flavones as quorum sensing inhibitors identified by a newly optimized screening platform using *Chromobacterium violaceum* as reporter bacteria. **Molecules**, v. 21, n. 9, 2016.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; NOVAK, J. S. Quorum sensing: a primer for food microbiologists. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 5, p. 1053-70, 2004.

STAUFF, D. L.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*: DNA recognition and gene regulation by the CviR receptor. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 15, p. 3871-8, 2011.

STEPANOVIĆ, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-9, 2000.

STEPANOVIĆ, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 115, n. 8, p. 891-9, 2007.

SUDAGIDAN, M.; YEMENICIOĞLU, A. Effects of nisin and lysozyme on growth inhibition and biofilm formation capacity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk and cheese samples. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 9, p. 1627-33, 2012.

TAN, L. Y.; YIN, W. F.; CHAN, K. G. Silencing quorum sensing through extracts of *Melicope lunu-ankenda*. **Sensors**, v. 12, n. 4, p. 4339-51, 2012.

TAN, L. Y.; YIN, W. F.; CHAN, K. G. *Piper nigrum*, *Piper betle* and *Gnetum gnemon*--*natural* food sources with anti-quorum sensing properties. **Sensors**, v. 13, n. 3, p. 3975-85, 2013.

TANG, L. et al. Extracellular DNA in adhesion and biofilm formation of four environmental isolates: a quantitative study. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 86, n. 3, p. 394-403, 2013.

TANG, K.; ZHANG, X. H. Quorum quenching agents: resources for antivirulence therapy. **Marine Drugs**, v. 12, n. 6, p. 3245-82, 2014.

TOWNSLEY, L.; YILDIZ, F. H. Temperature affects c-di-GMP signalling and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 4290-305, 2015.

TRUCHADO, P. et al. Inhibition of quorum sensing (QS) in *Yersinia enterocolitica* by an orange extract rich in glycosylated flavanones. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 36, p. 8885-94, 2012.

VAN HOUDT, R.; GIVSKOV, M.; MICHIELS, C. W. Quorum sensing in *Serratia*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 407-24, 2007.

VANDEPUTTE, O. M. et al. Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum-sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 243-53, 2010.

VÁSQUEZ-PONCE, F. et al. Alginate overproduction and biofilm formation by psychrotolerant *Pseudomonas mandelii* depend on temperature in Antarctic marine sediments. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 28, p. 27-34, 2017.

VATTEM, D. A. et al. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. **Fitoterapia**, v. 78, n. 4, p. 302-10, 2007.

WHITEHEAD, N. A. et al. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 365-404, 2001.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK, R. E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature Protocols**, v. 3, n. 2, p. 163-75, 2008.

XAVIER, J. B. et al. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**, v. 76, p. 2-13, 2003.

APÊNDICE A - Controles do crescimento de *C. violaceum*.

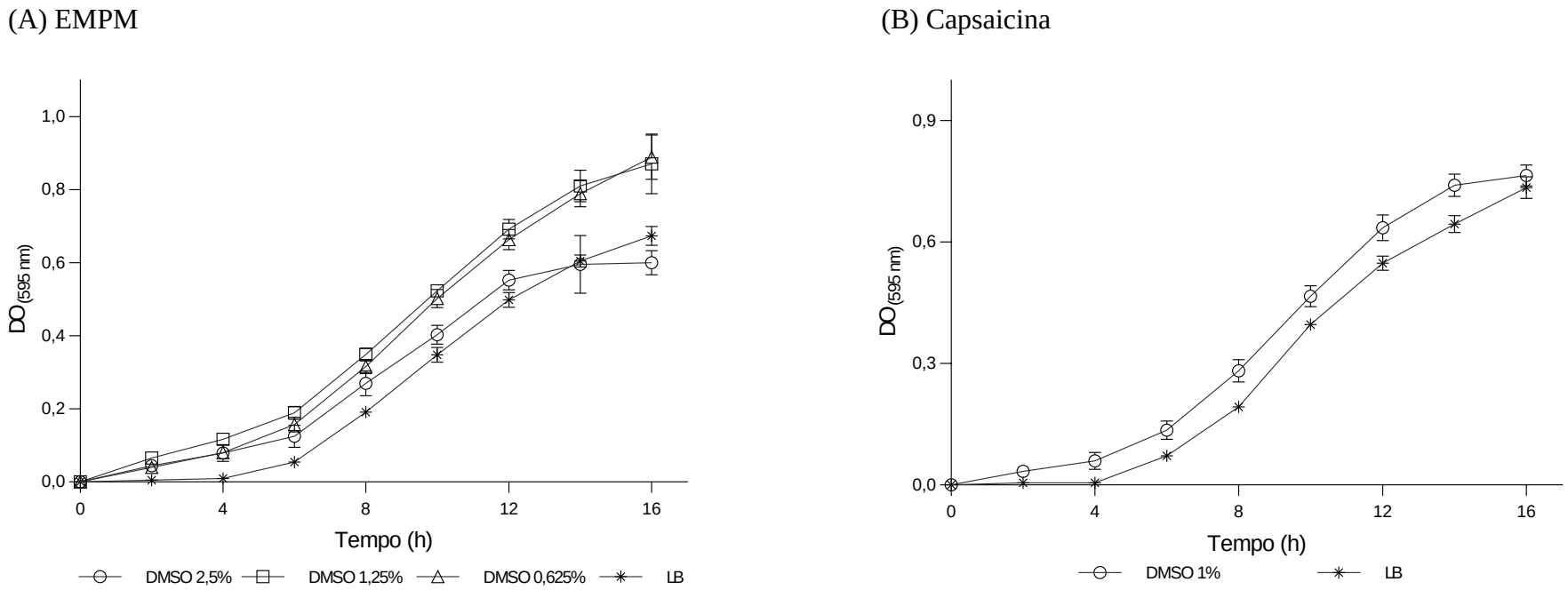


Figura 1. Controles de crescimento de *C. violaceum* ATCC12472 para o EMPM (A) e para a capsaicina (B). As concentrações utilizadas de EMPM, 5; 2,5 e 1,25 mg/ml, continham DMSO nas concentrações 2,5; 1,25 e 0,625%, sendo o crescimento em LB considerado como o equivalente de 0,625 mg/ml de EMPM pois a volume de DMSO foi baixa. Os controles de capsaicina foram o crescimento em DMSO 1% (a concentração mais alta presente nas concentrações testadas de capsaicina) e LB.

APÊNDICE B - Controles do crescimento de *S. liquefaciens* a 30 ºC e 37 ºC.

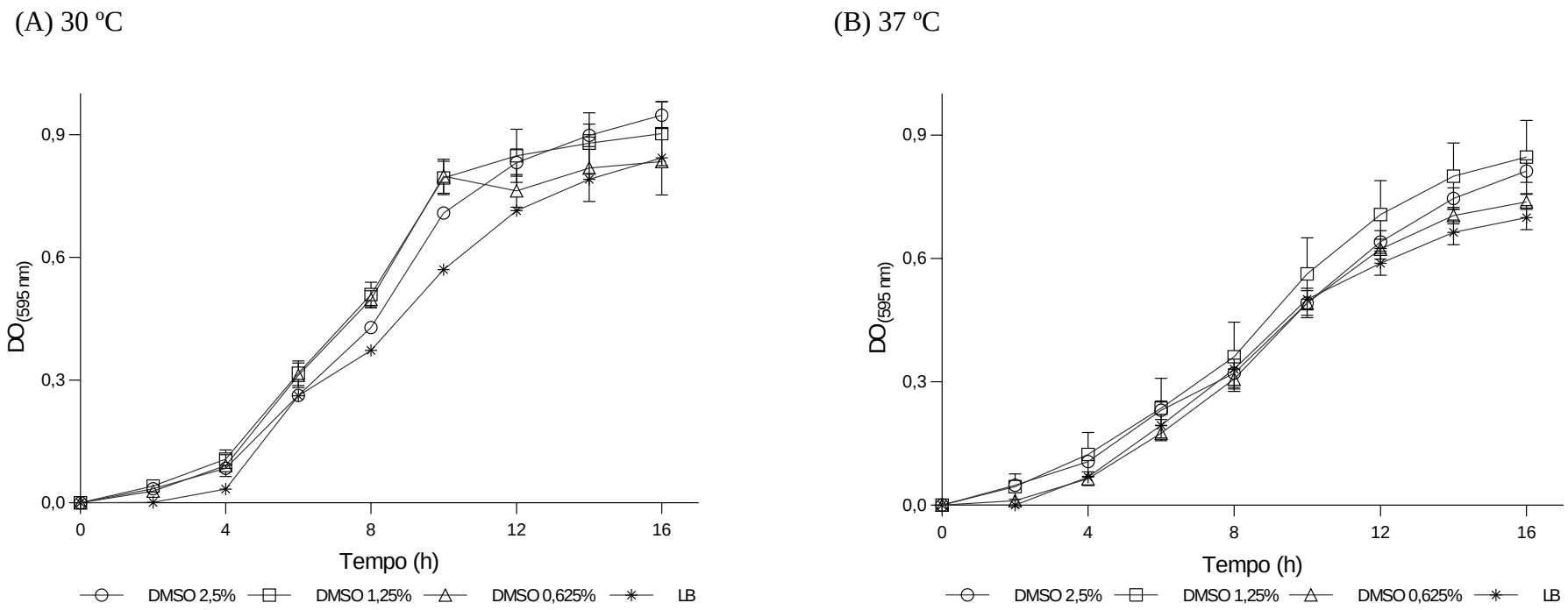


Figura 1. Controles de crescimento de *S. liquefaciens* MG1 em presença de EMPM a 30 ºC (A) e 37 ºC (B). As concentrações utilizadas de EMPM, 5; 2,5 e 1,25 mg/ml, continham DMSO nas concentrações 2,5; 1,25 e 0,625%. LB: controle de crescimento sem EMPM nem DMSO.

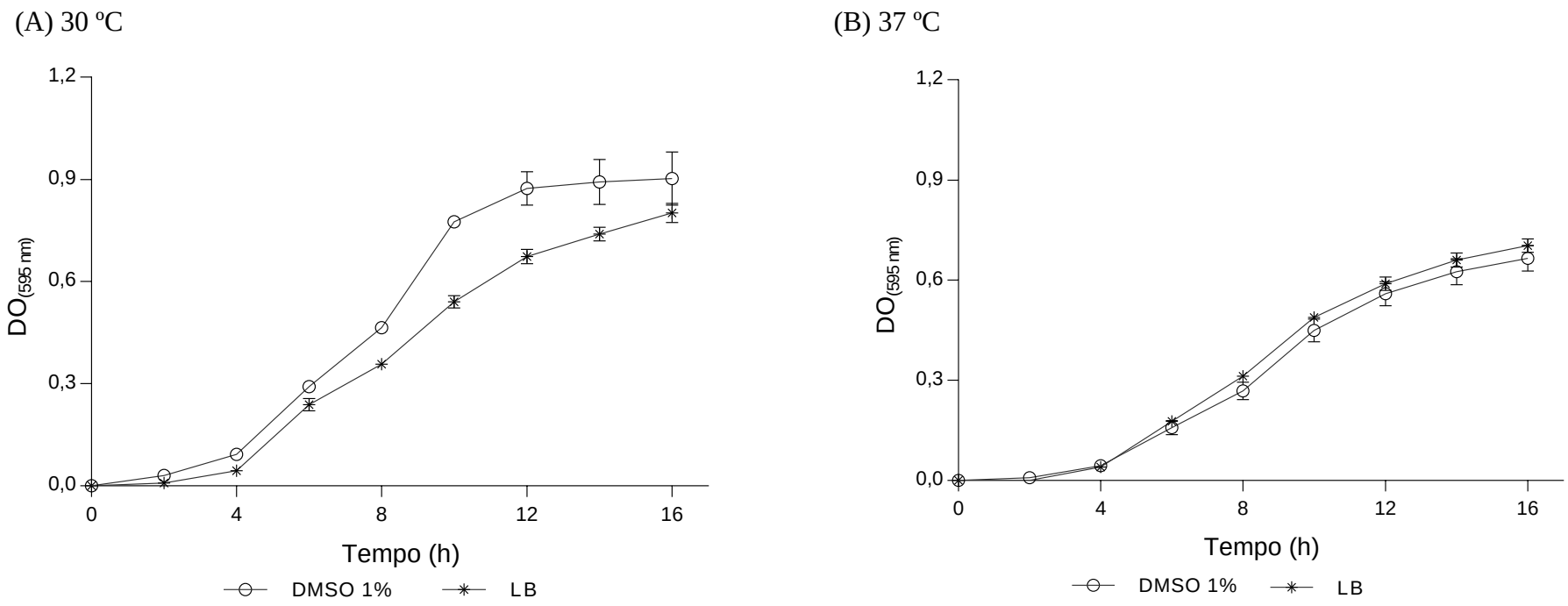


Figura 2. Controles de crescimento de *S. liquefaciens* MG1 em presença da capsaicina a 30 ºC (A) e 37 ºC (B). Os controles de capsaicina foram o crescimento em DMSO 1% (a concentração mais alta presente nas concentrações testadas de capsaicina) e LB.

APÊNDICE C - Controles do crescimento de *P. aeruginosa* a 30 ºC e 37 ºC.

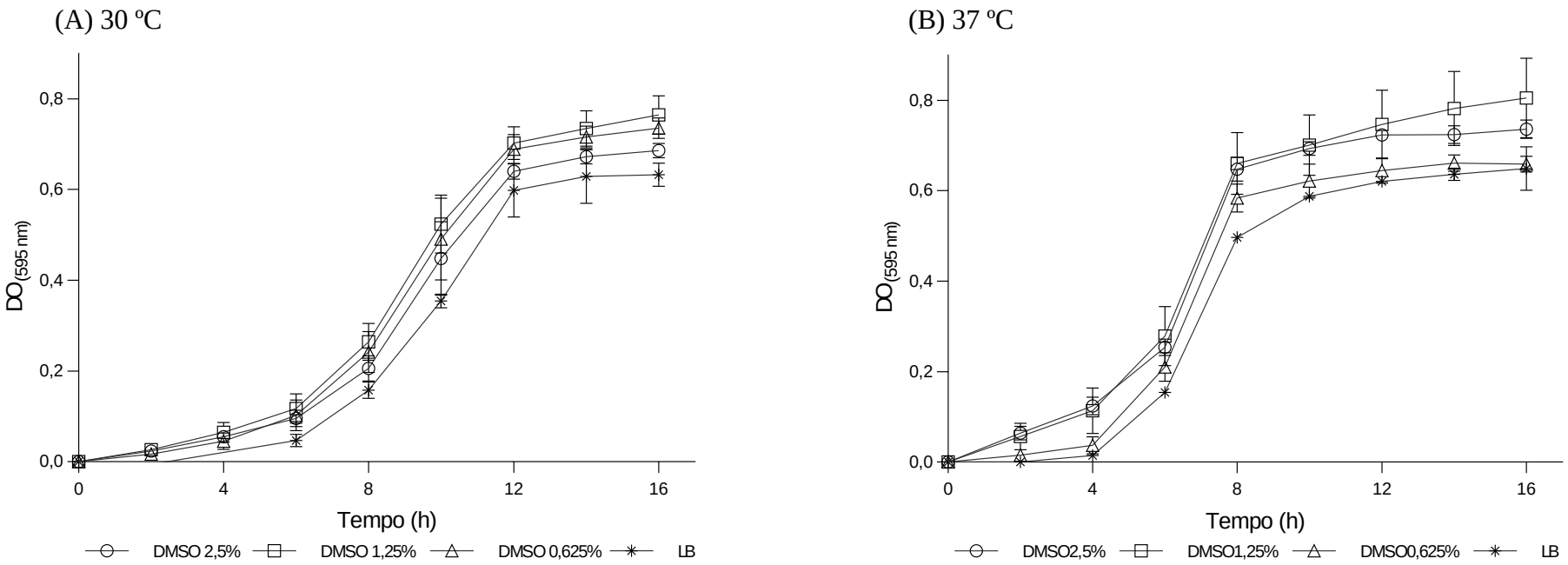


Figura 1. Controles de crescimento de *P. aeruginosa* PAO1 em presença de EMPM a 30 ºC (A) e 37 ºC (B). As concentrações utilizadas de EMPM, 5; 2,5 e 1,25 mg/ml, continham DMSO nas concentrações 2,5; 1,25 e 0,625%. LB: controle de crescimento sem EMPM nem DMSO.

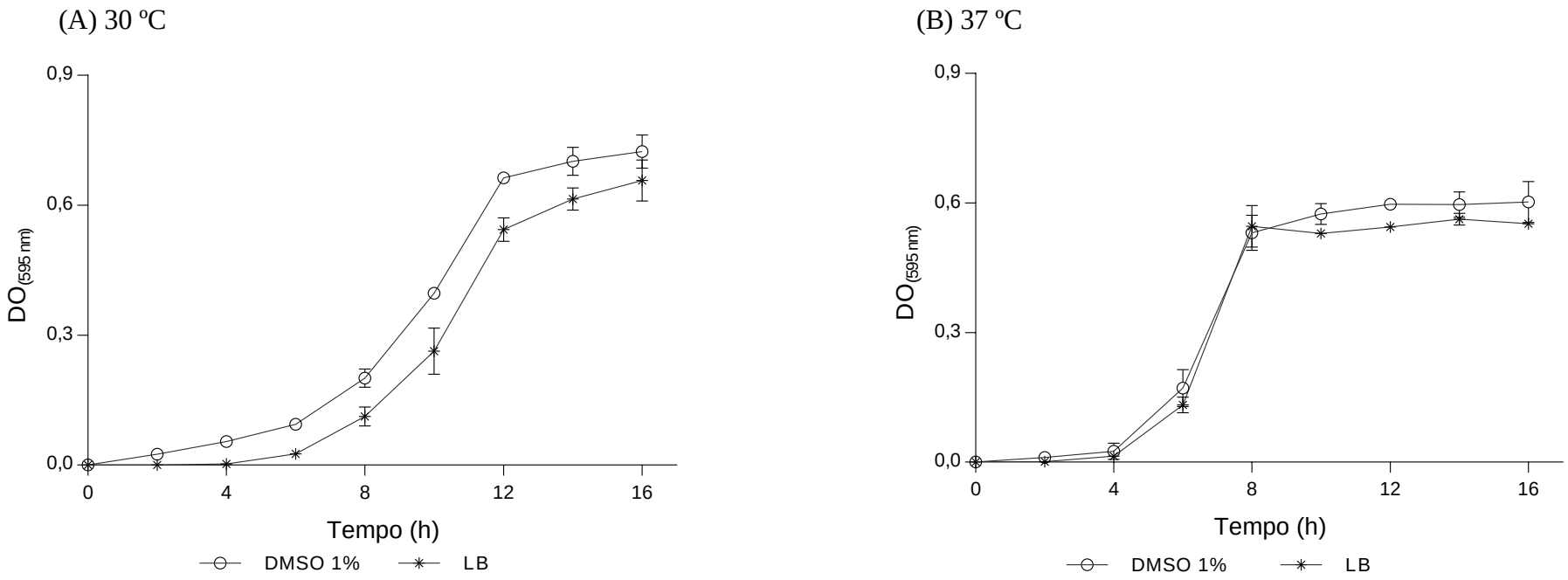


Figura 2. Controles de crescimento de *P. aeruginosa* PAO1 em presença da capsaicina a 30 ºC (A) e 37 ºC (B). Os controles de capsaicina foram o crescimento em DMSO 1% (a concentração mais alta presente nas concentrações testadas de capsaicina) e LB.

APÊNDICE D - Controles utilizados na quantificação de violaceína produzida por *C. violaceum* em presença de EMPM e da capsaicina.

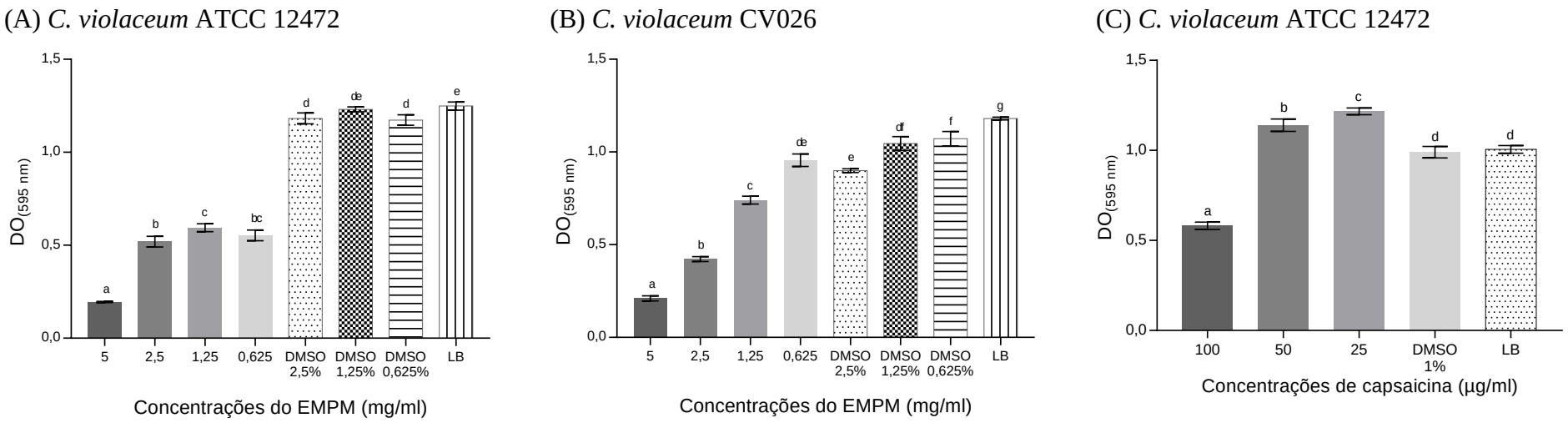
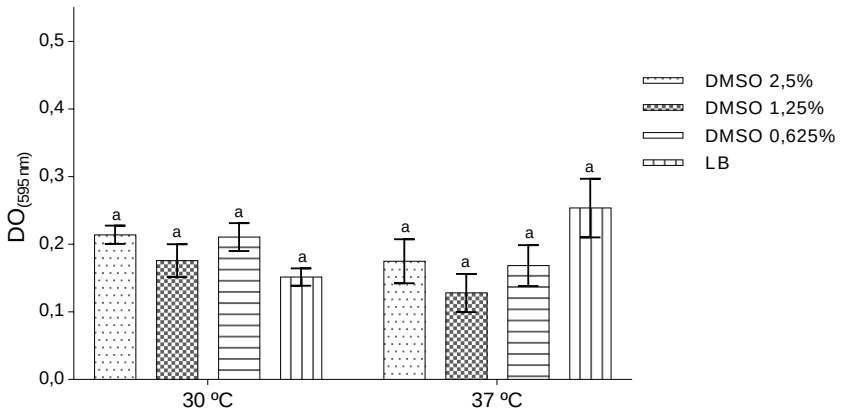


Figura 1. Efeito do extrato metanólico de pimenta-malagueta (EMPM) em diferentes concentrações (expressas em mg/ml) na produção de violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472 (A) e *C. violaceum* CV026 (B) após 24 horas de incubação a 30 ºC em comparação com os controles de DMSO, nas concentrações equivalentes presentes nas concentrações de EMPM. (C) Efeito da capsaicina em comparação com os controles sem capsaicina (DMSO 1% e LB). As médias pertencem a três ensaios em triplicata. Médias seguidas pelas mesmas letras pertencentes ao mesmo tratamento não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$).

APÊNDICE E - Controles utilizados na formação de biofilmes de *S. liquefaciens* e *P. aeruginosa* em presença de EMPM.

(A) *S. liquefaciens* MG1



(B) *P. aeruginosa* PAO1

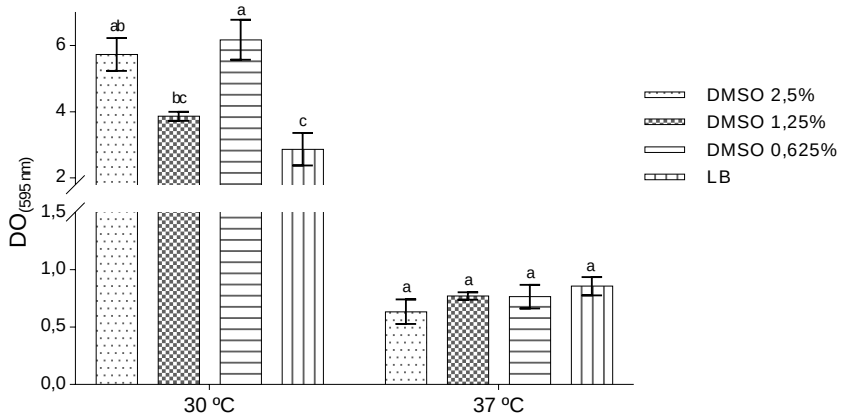


Figura 1. Efeito do dimetilsulfóxido (DMSO) em concentrações equivalentes às presentes nas concentrações de EMPM avaliadas sobre a formação de biofilme de *S. liquefaciens* MG1 (A) e *P. aeruginosa* PAO1 (B) nas temperaturas de incubação de 30 ºC e 37 ºC após 24 horas, segundo o ensaio de cristal. LB: controle sem DMSO nem EMPM. As médias pertencem a três ensaios em triplicata. Médias seguidas pelas mesmas letras pertencentes ao mesmo tratamento não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$).

APÊNDICE F - Controles utilizados na formação de biofilmes de *S. liquefaciens* e *P. aeruginosa* em presença de capsaicina.

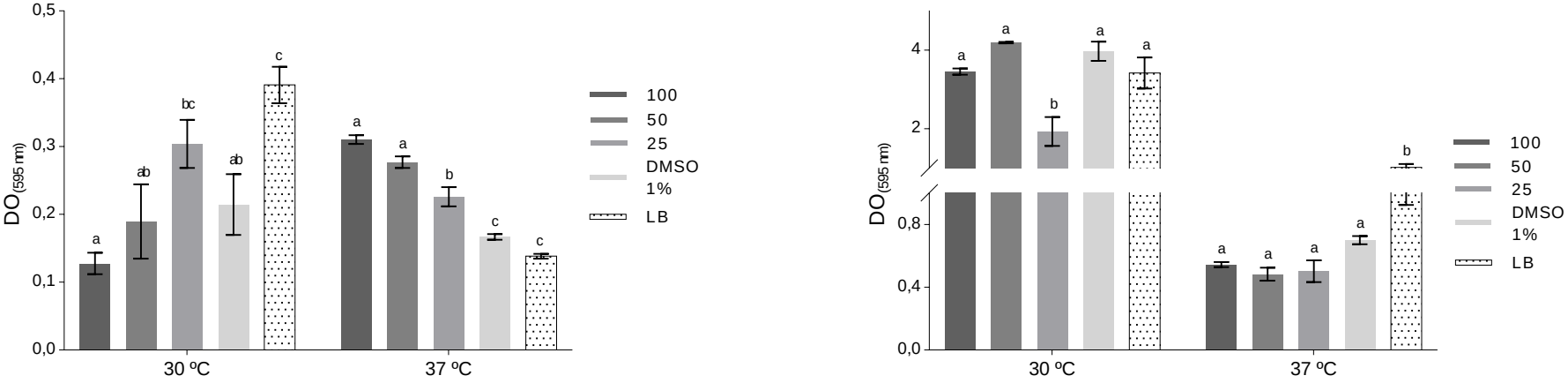


Figura 1. Efeito da capsaicina em diferentes concentrações (expressas em µg/ml) sobre a formação de biofilme em *S. liquefaciens* e *P. aeruginosa* nas temperaturas de tratamento 30 ºC e 37 ºC, segundo o ensaio de cristal violeta. DMSO 1% e LB representam o crescimento bacteriano sem capsaicina. Médias seguidas pelas mesmas letras, pertencentes à mesma temperatura de tratamento, não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$).

APÊNDICE G - Controles utilizados na formação de biofilmes de *S. liquefaciens* e *P. aeruginosa* segundo a microscopia confocal.

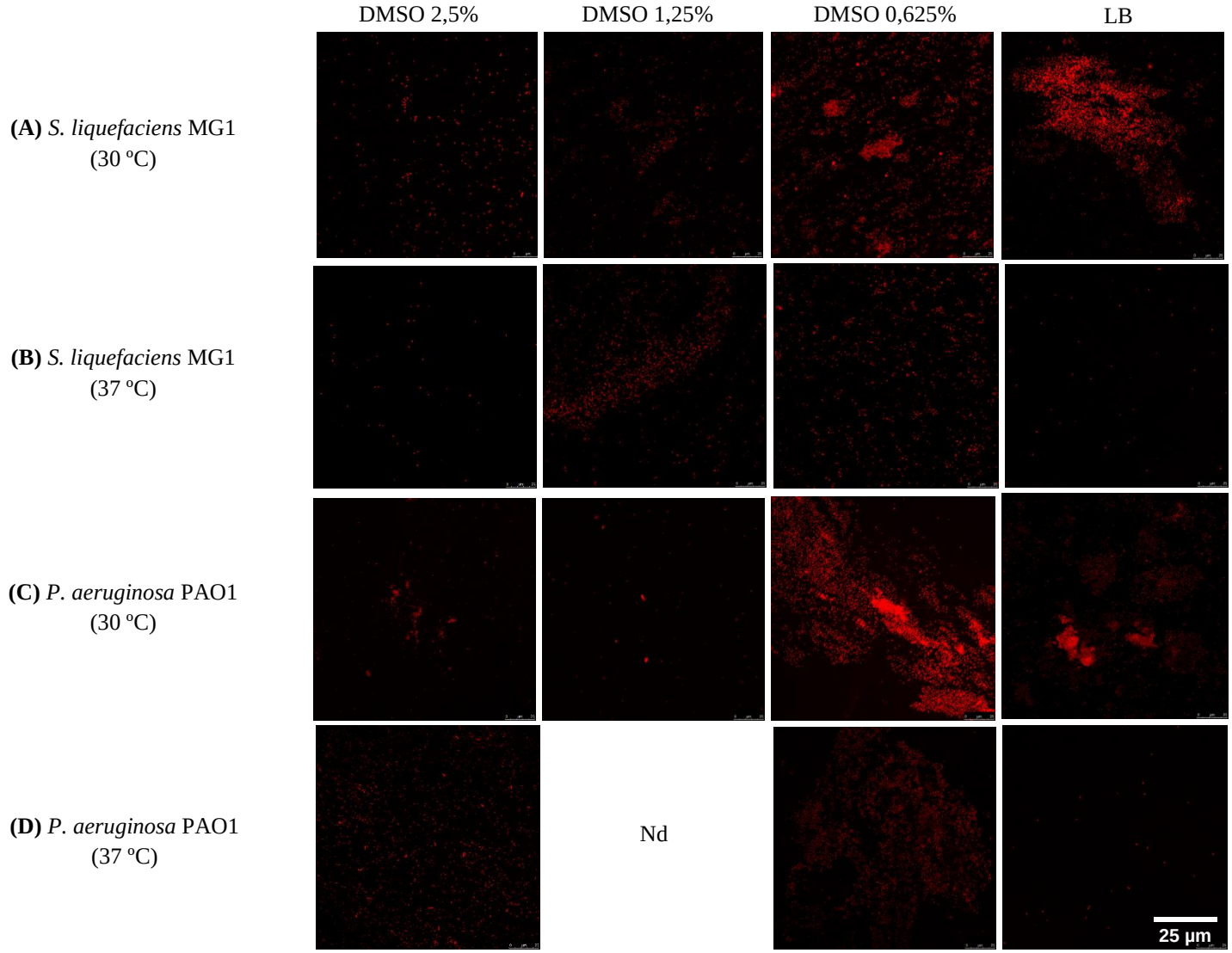


Figura 1. Efeito do dimetilsulfóxido (DMSO) em concentrações equivalentes às presentes nas concentrações de EMPM avaliadas sobre a formação de biofilme de *S. liquefaciens* MG1 e *P. aeruginosa* PAO1 nas temperaturas de incubação de 30 ºC e 37 ºC após 24 horas, segundo a microscopia confocal. LB: controle sem DMSO nem EMPM. Nd: Não determinado. A barra de escala é de 25 µm.

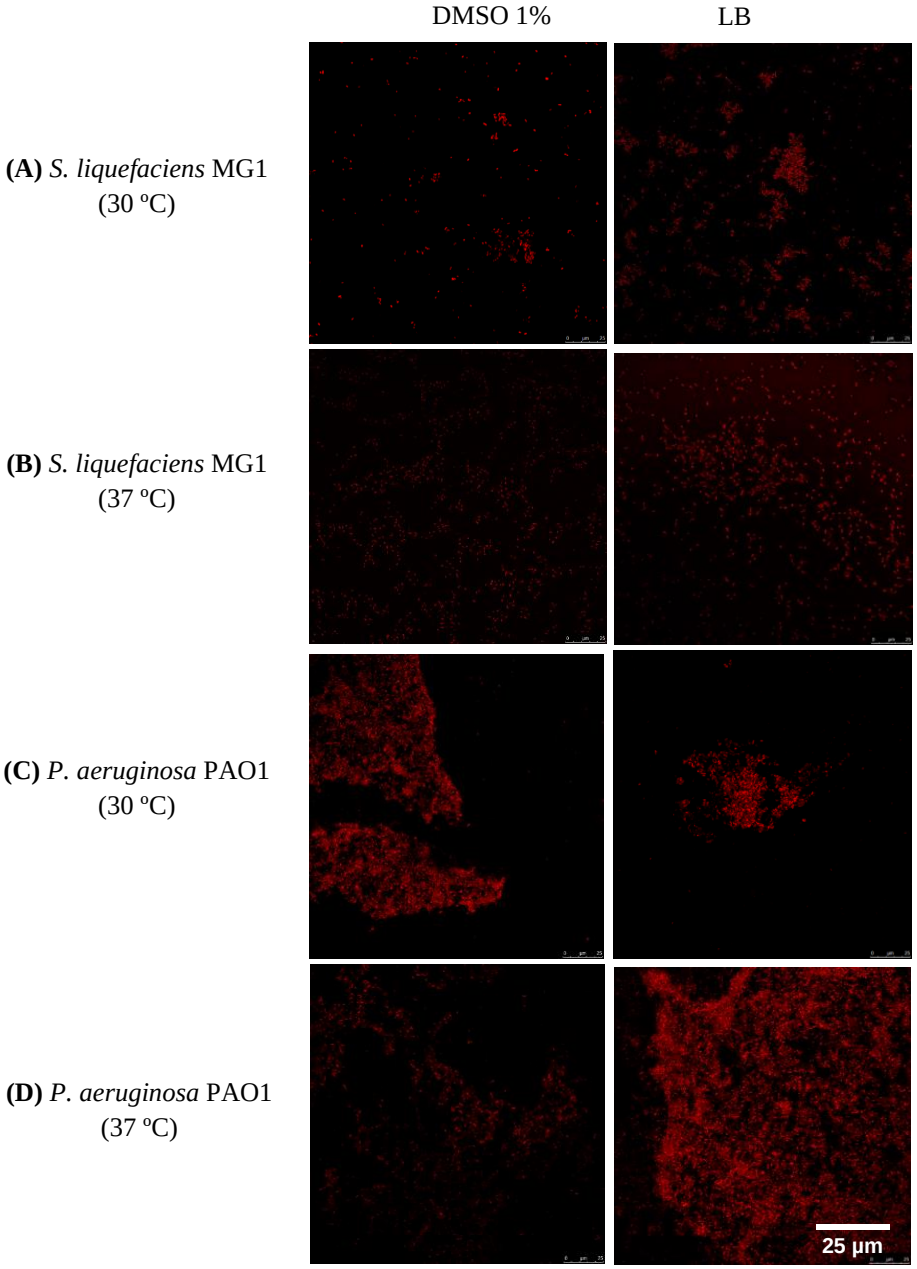


Figura 2. Efeito do dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% sobre a formação de biofilme de *S. liquefaciens* MG1 e *P. aeruginosa* PAO1 nas temperaturas de incubação de 30 ºC e 37 ºC após 24 horas, segundo a microscopia confocal. LB: controle sem DMSO. A barra de escala é de 25 µm.

APÊNDICE H - Teste de difusão em ágar para produção de violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472 em presença dos extratos

Os dados da Figura 1 deste apêndice revelam que não houve inibição da produção de violaceína pelos diferentes extratos testados. O controle positivo furanona C30 inibiu a produção de violaceína, conforme esperado.

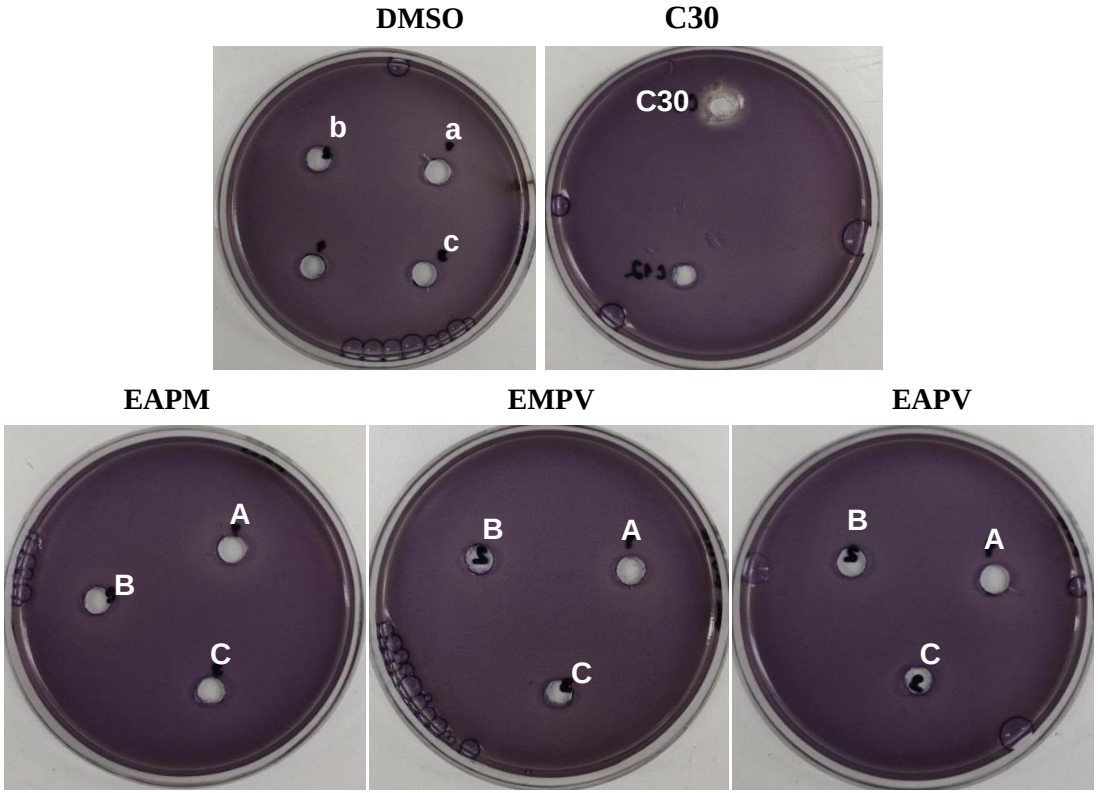


Figura 1. Teste de difusão em ágar para produção de violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472 em presença dos extratos nas concentrações de 5; 2,5 e 1,25 mg/ml (A, B e C respectivamente) após 24 horas de incubação a 30 ºC. Furanona C30: controle da inibição da produção de violaceína. DMSO: controle de toxicidade dos extratos metanólicos nas concentrações de 2,5; 1,25 e 0,625% (a, b e c respectivamente). EMPM: Extrato metanólico de pimenta-malagueta. EAPM: Extrato amônico de pimenta-malagueta. EMPV: Extrato metanólico de pimentão vermelho. EAPV: Extrato amônico de pimentão vermelho.

APÊNDICE I - Quantificação de violaceína produzida por *C. violaceum* ATCC 12472 em presença dos extratos

Os dados deste apêndice revelam que os diferentes extratos apresentaram leve inibição da produção de violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472. Esses dados devem ser avaliados levando em consideração a cinética de crescimento nas concentrações inibitórias.

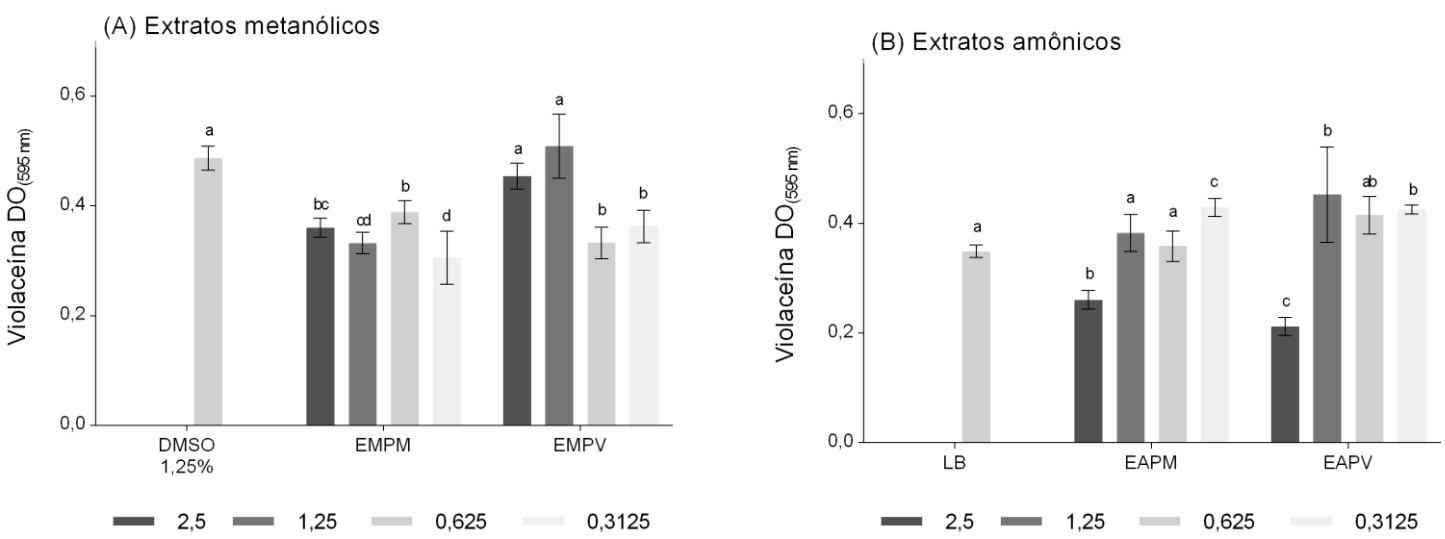


Figura 1. Efeito dos extratos de pimenta-malagueta e pimentão vermelho em diferentes concentrações (expressas em mg/ml) na produção de violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472 após 24 horas de incubação a 30 ºC. (A) Efeito dos extratos metanólicos de pimenta-malagueta (EMPM) e de pimentão vermelho (EMPV) em comparação com o controle sem tratamento (DMSO 1,25%). (B) Efeito dos extratos amônicos de pimenta-malagueta (EAPM) e de pimentão vermelho (EAPV) em comparação com o controle sem tratamento (LB). As médias pertencem a um ensaio em sextuplicata. Médias seguidas pelas mesmas letras pertencentes ao mesmo tratamento não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$).

APÊNDICE J - Motilidade tipo *swarming* de bactérias patogênicas em presença dos extratos

Os dados revelam que, de forma geral, não houve alteração da motilidade na presença dos extratos.

P. aeruginosa PAO1 *S. liquefaciens* MG1 *S. marcescens* UFOP1

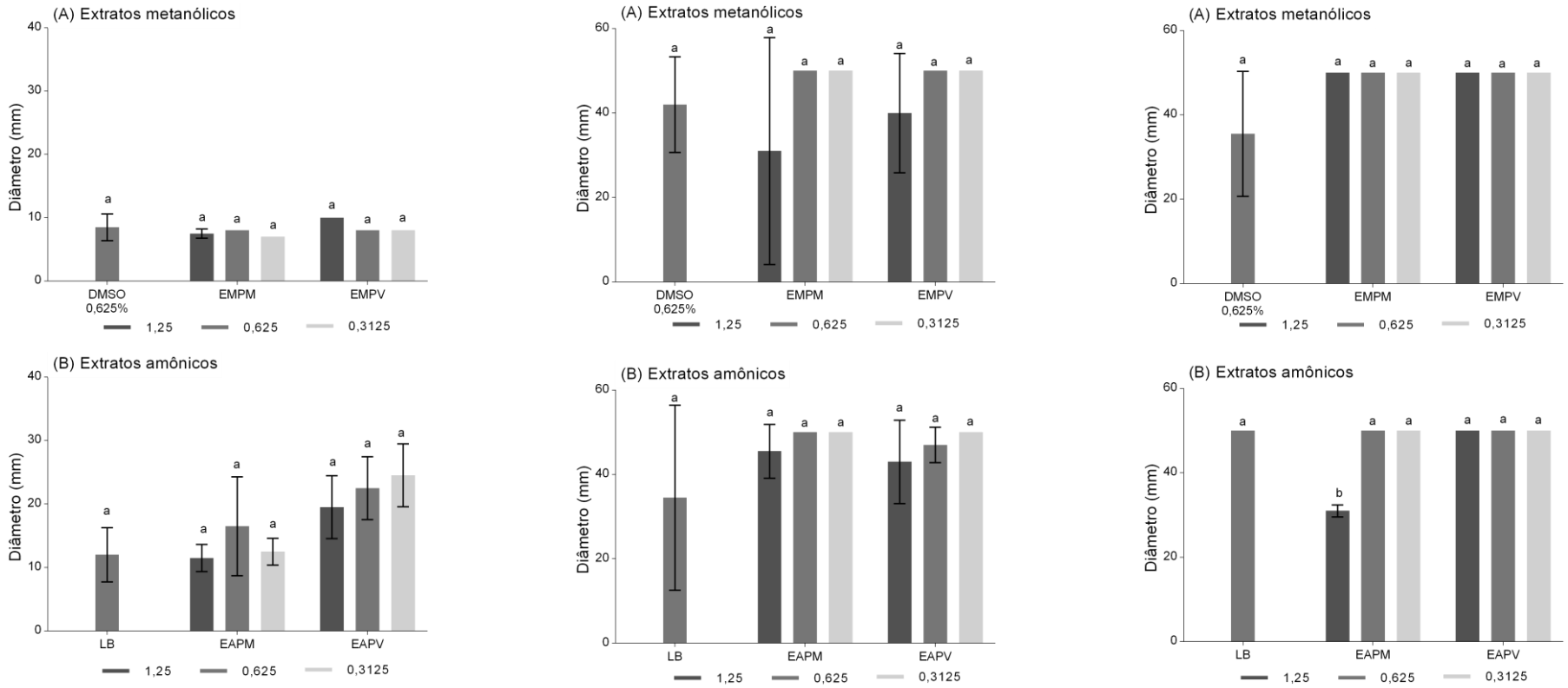


Figura 1. Efeito dos extratos de pimenta-malagueta e pimentão vermelho em diferentes concentrações (expressas em mg/ml) na motilidade *swarming* (definida como o diâmetro da área formada pela motilidade após 12 horas de incubação) de *P. aeruginosa* PAO1 (crescida a 37 ºC), *S. liquefaciens* MG1 e *S. marcescens* UFOP1 (ambas crescidas a 30 ºC). (A) Efeito dos extratos metanólicos de pimenta-malagueta (EMPM) e de pimentão vermelho (EMPV) em comparação com o controle sem tratamento (DMSO 0,625%). (B) Efeito dos extratos amônicos de pimenta-malagueta (EAPM) e de pimentão vermelho (EAPV) em comparação com o controle sem tratamento (LB). As médias pertencem a um ensaio em duplicata. Médias seguidas pelas mesmas letras pertencentes ao mesmo tratamento não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$).

APÊNDICE K - Motilidade tipo *swarming* de *S. marcescens* UFOP1 em presença dos extratos

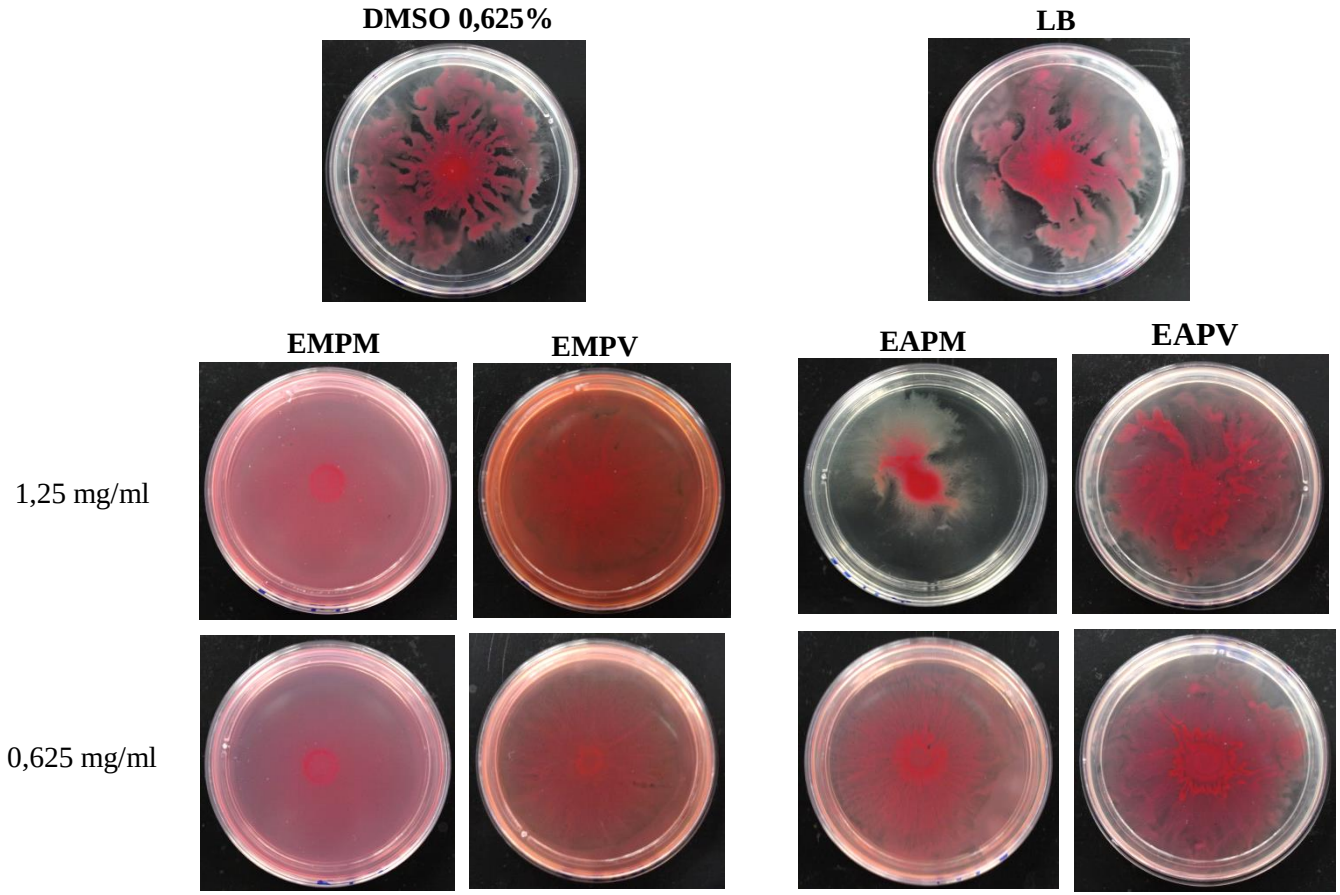
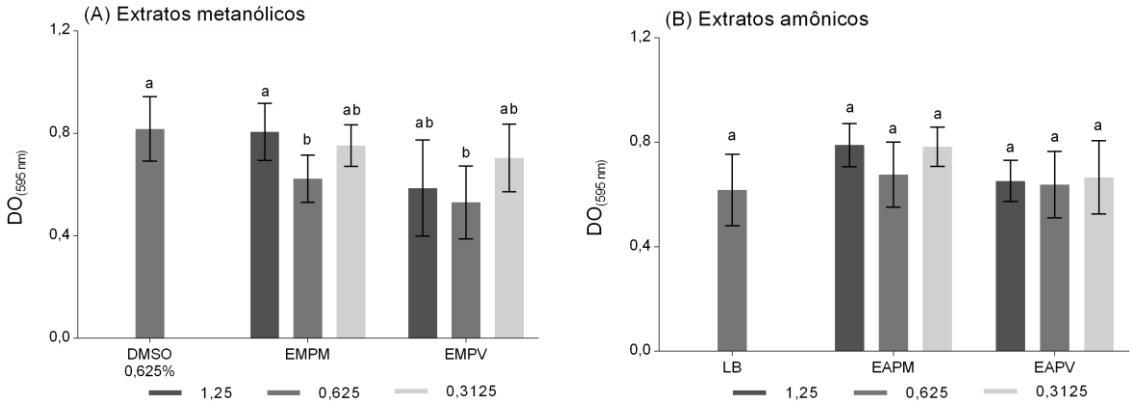


Figura 1. Motilidade *swarming de S. marcescens* UFOP1 em presença dos extratos de pimenta-malagueta e pimentão vermelho nas concentrações 1,25 e 0,625 mg/ml após 12 horas de incubação a 30 ºC. Note-se a diferencia morfológica do *swarm* em comparação com os controles (DMSO 0,625% e LB). EMPM: Extrato metanólico de pimenta-malagueta. EAPM: Extrato amônico de pimenta-malagueta. EMPV: Extrato metanólico de pimentão vermelho. EAPV: Extrato amônico de pimentão vermelho.

APÊNDICE L - Formação de biofilme de bactérias patogênicas em presença dos extratos

P. aeruginosa PAO1



S. liquefaciens MG1

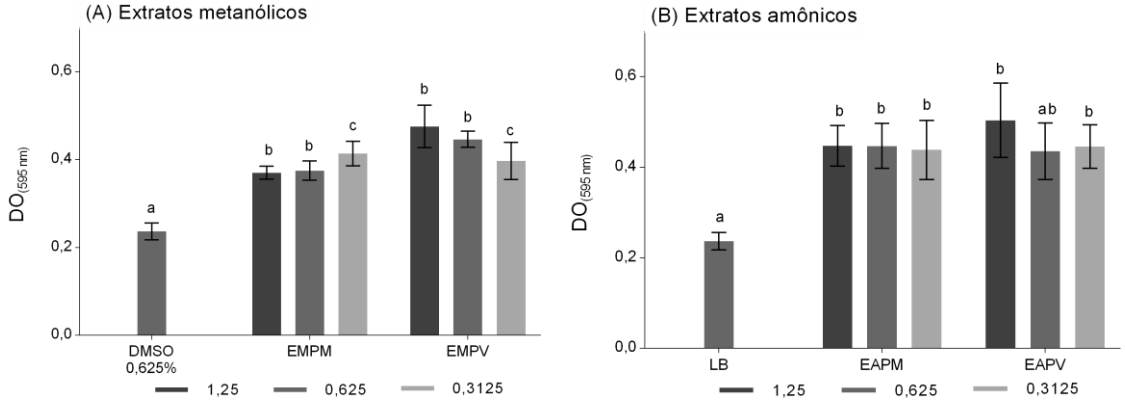


Figura 1. Efeito dos extratos de pimenta-malagueta e pimentão vermelho em diferentes concentrações (expressas em mg/ml) na formação de biofilme em *P. aeruginosa* PAO1 e *S. liquefaciens* MG1 após 24 horas a 37 ºC e 30 ºC respectivamente, conforme o ensaio de cristal violeta. (A) Efeito dos extratos metanólicos de pimenta-malagueta (EMPM) e de pimentão vermelho (EMPV) em comparação com o controle sem tratamento (DMSO 0,625%). (B) Efeito dos extratos amônicos de pimenta-malagueta (EAPM) e de pimentão vermelho (EAPV) em comparação com o controle sem tratamento (LB). As médias pertencem a um ensaio em octuplicata. Médias seguidas pelas mesmas letras pertencentes ao mesmo tratamento não diferem estatisticamente ($p \geq 0,05$).

APÊNDICE M - Curvas de crescimento de bactérias Gram-negativas em presença dos extratos

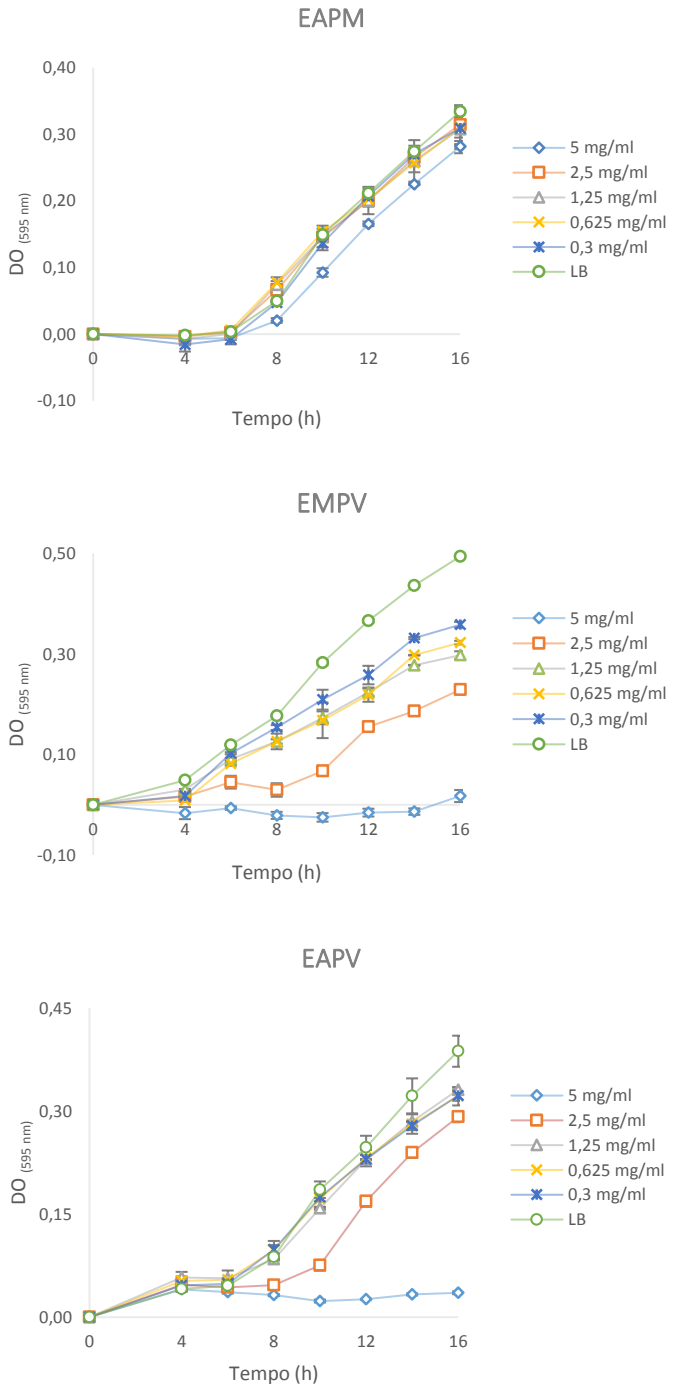


Figura 1. Efeito do extrato amônico de pimenta-malagueta (EAPM) e dos extratos metanólico e amônico de pimentão vemelho, EMPV e EAPV respectivamente, sobre o crescimento de *C. violaceum* ATCC 12472 em diferentes concentrações (expressas em mg/ml) durante 16 horas de incubação a 30 ºC. O controle sem o extrato é LB. As médias pertencem a um ensaio em duplicata.

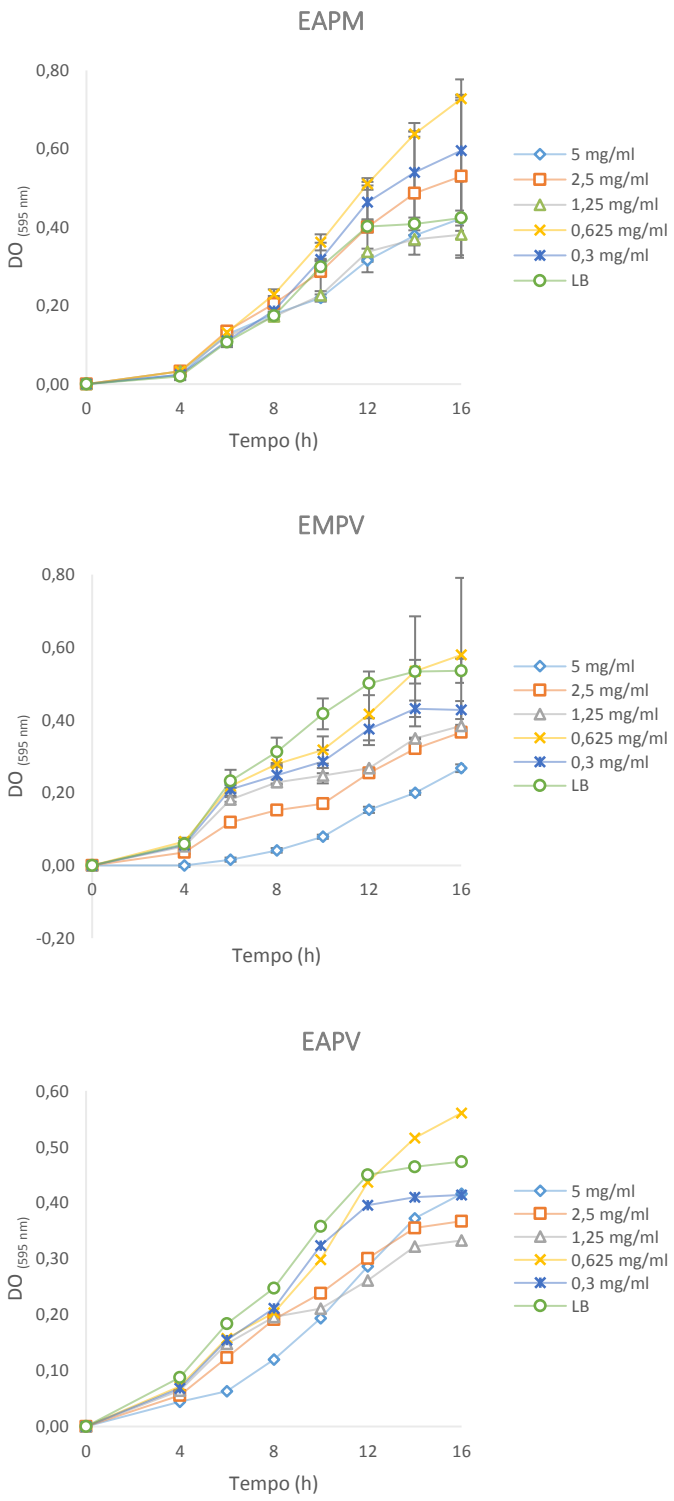


Figura 2. Efeito do extrato amônico de pimenta-malagueta (EAPM) e dos extratos metanólico e amônico de pimentão vemelho, EMPV e EAPV respectivamente, sobre o crescimento de *S. liquefaciens* MG1 em diferentes concentrações (expressas em mg/ml) durante 16 horas de incubação a 30 ºC. O controle sem o extrato é LB. As médias pertencem a um ensaio em duplicata.

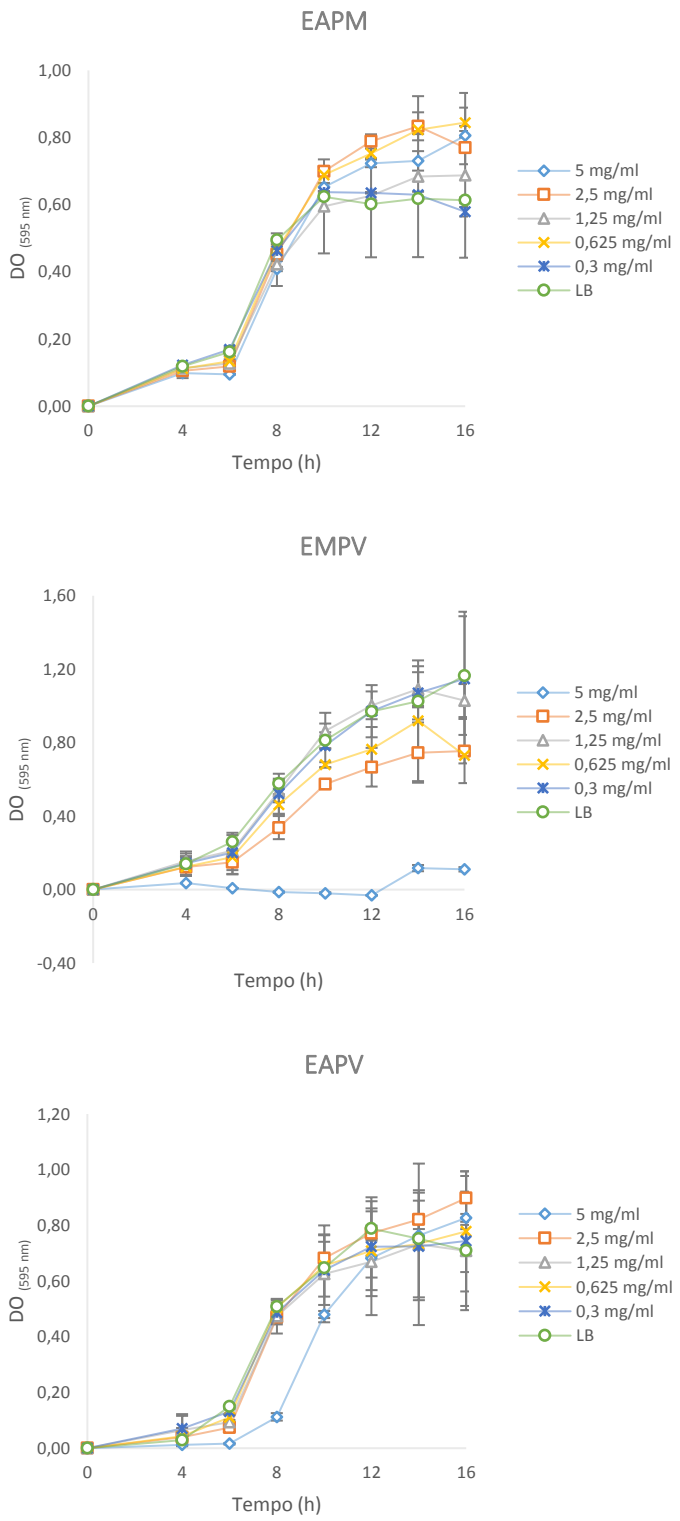


Figura 3. Efeito do extrato amônico de pimenta-malagueta (EAPM) e dos extratos metanólico e amônico de pimentão vemelho, EMPV e EAPV respectivamente, sobre o crescimento de *P. aeruginosa* PAO1 em diferentes concentrações (expressas em mg/ml) durante 16 horas de incubação a 37 ºC. O controle sem o extrato é LB. As médias pertencem a um ensaio em duplicata.

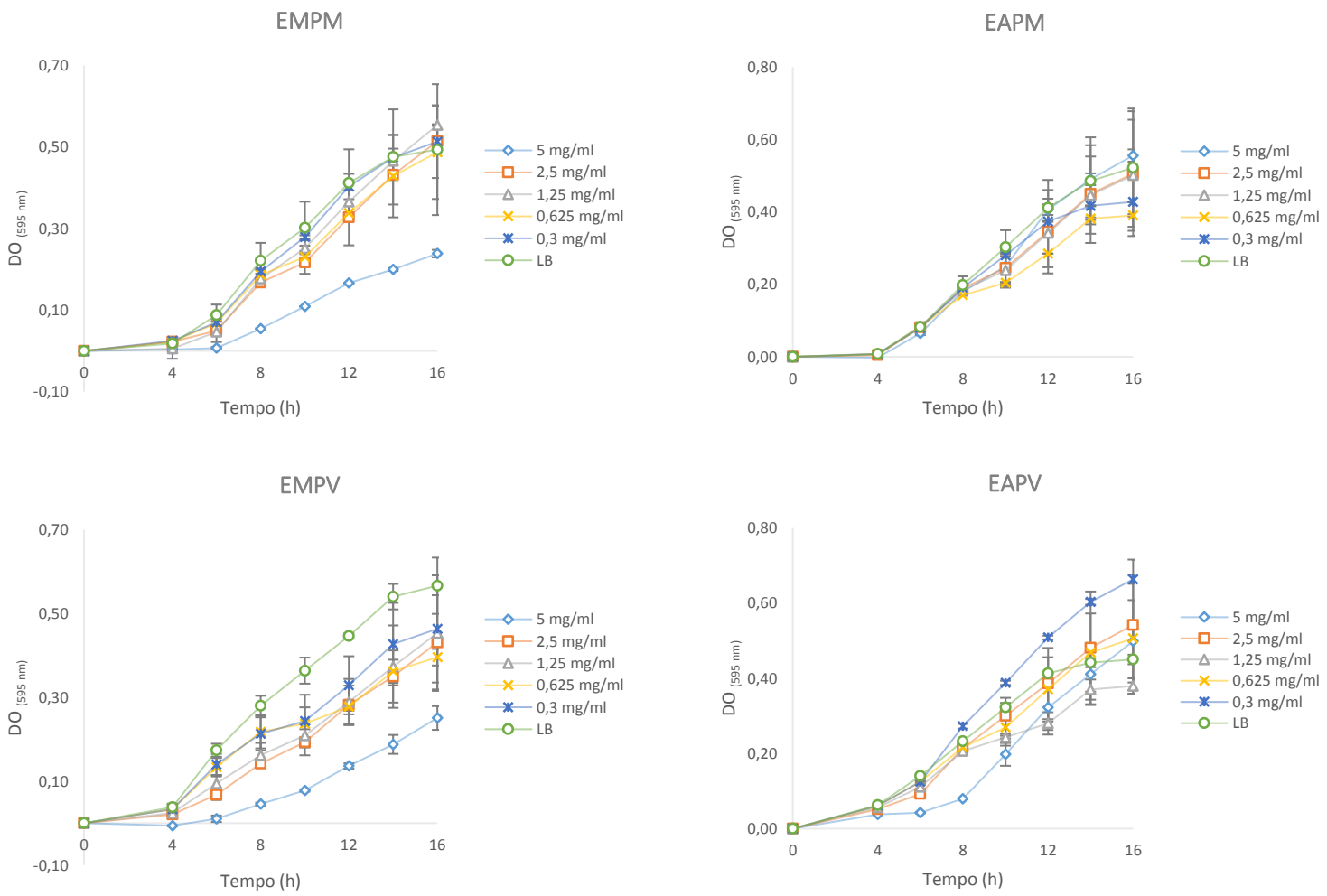


Figura 4. Efeito dos extratos de pimenta-malagueta e de pimentão vermelho sobre o crescimento de *S. marcescens* UFOP1 em diferentes concentrações (expressas em mg/ml) durante 16 horas de incubação a 30 ºC. O controle sem o extrato é LB. As médias pertencem a um ensaio em duplicata.

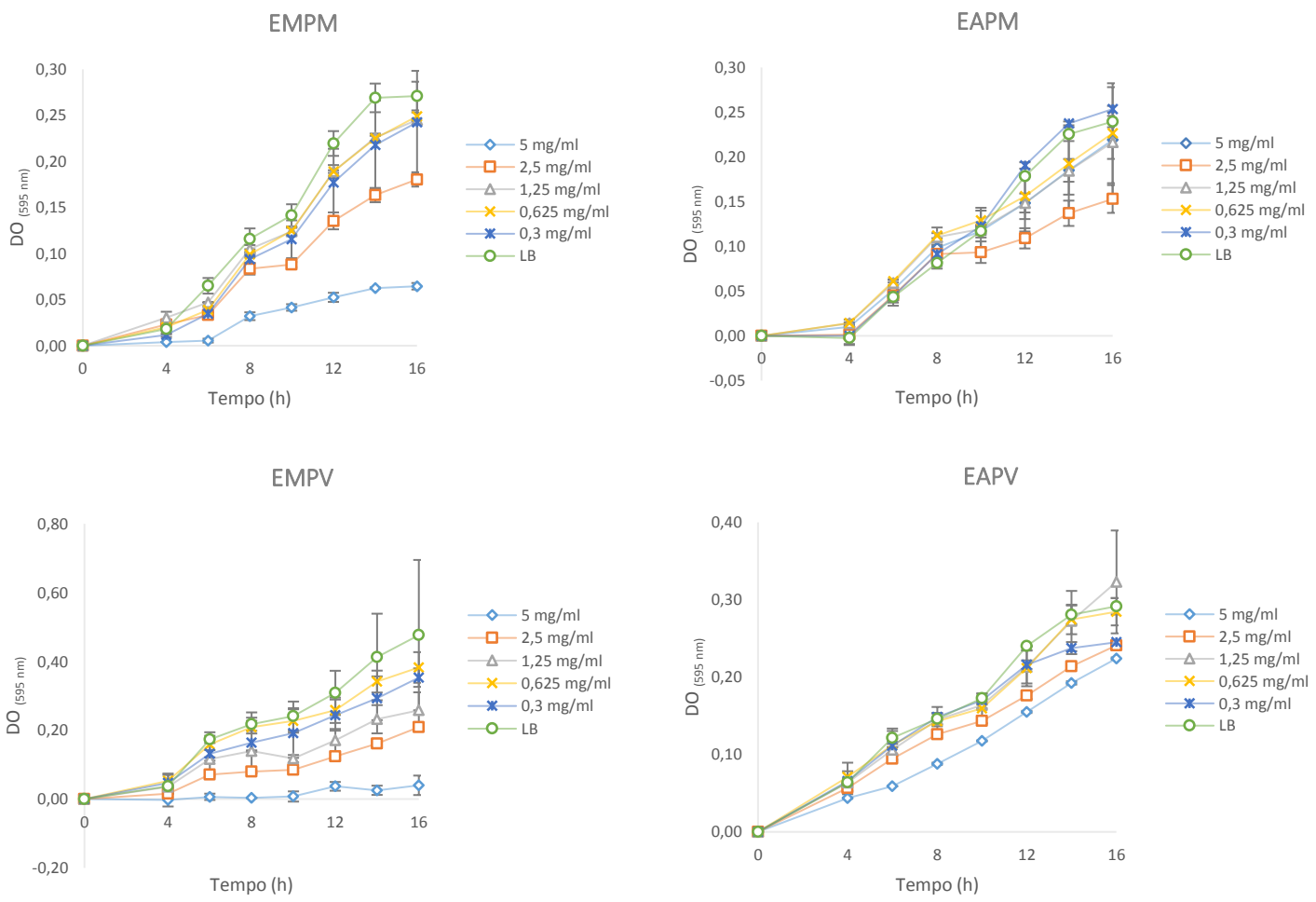


Figura 5. Efeito dos extratos de pimenta-malagueta e de pimentão vermelho sobre o crescimento de *Hafnia alvei* 071 em diferentes concentrações (expressas em mg/ml) durante 16 horas de incubação a 30 ºC. O controle sem o extrato é LB. As médias pertencem a um ensaio em duplicata.