UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Área de Bromatologia

Quorum quenching por compostos fenólicos em bactérias biossensoras e de origem alimentar

Catarina Angeli Santos

Dissertação para obtenção final do Título de Mestre
Orientador: Prof. Uelinton M. Pinto, Ph.D.

São Paulo - SP

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Área de Bromatologia

Quorum quenching por compostos fenólicos em bactérias biossensoras e de origem alimentar

Catarina Angeli Santos

Versão corrigida

Dissertação para obtenção final do Título de Mestre
Orientador: Prof. Uelinton M. Pinto, Ph.D.

São Paulo - SP

2021

Catarina Angeli Santos

Quorum quenching por compostos fenólicos em bactérias biossensoras e de origem alimentar

Comissão julgadora
da
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Uelinton Manoel Pinto

Orientador/presidente

_____

1° examinador

_____

2° examinador

_____

3° examinador

_____

4° examinador

São Paulo, _____ de _____de 2021.

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

S582q

Santos, Catarina Angeli
Quorum quenching por compostos fenólicos em bactérias biossensoras e de origem alimentar / Catarina Angeli Santos. - São Paulo, 2021.
92 p.

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

1. Atividade antimicrobiana. 2. Compostos fenólicos. 3. Quorum quenching. 4. Quorum sensing. I. T. II. Pinto, Uelinton Manoel, orientador.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar e iluminar meu caminho para perseverar e concluir mais uma etapa.

Aos meus pais Simone e Assis por ser meu pilar, sempre me dando apoio e incentivo. Obrigada pelos conselhos e puxões de orelha. Obrigada a Júlia, minha caçula querida pelo carinho e apoio.

Ao meu orientador Uelinton M. Pinto pelo exemplo, que me possibilitou o crescimento profissional e pessoal, pela ajuda e confiança para desenvolver esse trabalho e tornar esse sonho possível.

Aos professores do departamento pelos ensinamentos tanto acadêmico quanto para a vida.

À Kátia Leani e dona Lúcia, funcionárias do laboratório de microbiologia pela ajuda e paciência.

Aos meus companheiros de pesquisa Ana Paulina, Ximena, Jéssica, Diogo, Gabriela, Augusto por toda ajuda dentro e fora do laboratório.

À minha amiga querida Emília por todo apoio e risadas durante essa aventura de vir a São Paulo e a todos os amigos que me ajudaram a chegar até aqui.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Pesquisa (CNPq) pela contribuição financeira por meio de auxílios – Processos 422242/2018-7 e 457794/2014-3 e do Programa Cotas do Programa de Pós-graduação – Processo 167149/2018-0.

Ao FORC (Food Research Center) pela contribuição financeira para o desenvolvimento deste projeto. À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela contribuição ao projeto – Processo 2013/07914-8.

À Universidade de São Paulo pela oportunidade de realizar um sonho, por todos os amigos que ganhei e as experiências que me incentivaram a apenas crescer.

RESUMO

SANTOS, C. A. ***Quorum quenching* por compostos fenólicos em bactérias biossensoras e de origem alimentar**. 2021. 91p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, SP, 2021.

As bactérias utilizam um sistema de comunicação intercelular denominado *quorum sensing* (QS) mediado por sinais químicos chamados de autoindutores. Entre os fenótipos regulados pelo QS destacam-se a produção de fatores de virulência, formação de biofilmes, compostos antimicrobianos e a motilidade. Diante da relevância desses fenótipos, há um grande interesse em encontrar substâncias que interfiram nesta comunicação. A inibição do QS é conhecida como *quorum quenching* (QQ). Dessa forma, este estudo objetivou avaliar o potencial de inibição do QS por compostos fenólicos em bactérias biossensoras do QS e de relevância em alimentos. Inicialmente, foi realizado um estudo *in silico* de ancoragem molecular de 79 compostos fenólicos pré-selecionados com seis variantes estruturais do ativador transcricional do QS CviR, de *Chromobacterium violaceum*, a fim de selecionar os compostos de maior potencial de inibição do QS. A atividade antimicrobiana dos compostos selecionados foi investigada pela concentração inibitória mínima (MIC) e pela determinação do crescimento microbiano em caldo de cultura. O efeito inibitório sobre o QS e fatores de virulência foi testado sobre a produção de violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472 e 026, formação de biofilme e motilidade tipo *swarming* e *swimming* em *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella enterica* serovar Montevideo e *Serratia marcescens*, além de avaliar a sensibilidade térmica e ao antibiótico canamicina dessas estirpes junto com os compostos fenólicos. A partir dos resultados da ancoragem molecular, cinco compostos foram selecionados para estudos *in vitro*: curcumina, capsaicina, resveratrol, ácido gálico e floridzina. Estes compostos se ligaram com boa afinidade, menor energia potencial, a pelo menos quatro variantes estruturais de CviR. As curvas de crescimento demonstraram que o ácido gálico apresentou MIC de 9,4 mM para *C. violaceum* ATCC 12472 e 026. Porém, os demais compostos apresentaram MIC superior à maior concentração testada. Os resultados de inibição da produção de violaceína mostraram que curcumina a 25 µM, capsaicina a 70 µM e resveratrol a 6 µM inibiram até 50% da produção do pigmento para a estirpe ATCC 12472. Adicionalmente, curcumina a 5 µM inibiu a produção de violaceína na estirpe 026. Com relação à inibição da formação de biofilme, resveratrol inibiu até 80% em *A. hydrophila*; capsaicina e curcumina até 40% em *S.* Montevideo; resveratrol e capsaicina inibiram até 60% em *S. marcescens*. No teste de motilidade, curcumina inibiu completamente a formação de *swarming* em *S. marcescens*, e não foi observada inibição pelos demais compostos nos outros micro-organismos avaliados. Curcumina e resveratrol foram capazes de aumentar a sensibilidade à canamicina nas estirpes avaliadas, em diferentes graus de inibição. Entretanto, não houve inibição no teste de sensibilidade térmica para as estirpes em estudo. Os resultados obtidos para os compostos curcumina e resveratrol podem impulsionar novos estudos de sinergismo com antibióticos, atividade anti-QS e possíveis aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica.

Palavras – Chave: Atividade antimicrobiana; Curcumina; Resveratrol; *Quorum sensing*.

ABSTRACT

SANTOS, C. A. ***Quorum quenching* by phenolic compounds in biosensor and foodborne bacteria.** 2021. 91p. Thesis (Master's degree). Graduate Program in Food Science. Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, SP, 2021.

Bacteria use an intercellular communication system termed quorum sensing (QS) mediated by chemical signals called autoinducers. Among the phenotypes regulated by QS, the production of virulence factors, biofilms, antimicrobial compounds, and motility stand out. Given the relevance of these phenotypes, there is a great interest in finding substances that interfere in this communication. The inhibition of quorum sensing is known as quorum quenching (QQ). This study evaluated the potential for QS inhibition by phenolic compounds in QS biosensor bacteria and foodborne microorganisms. Initially, an *in silico* molecular docking study of 79 pre-selected phenolic compounds with six structural variants of the *Chromobacterium violaceum* QS transcriptional factor CviR was carried out to select the compounds with the greatest potential for QS interference. The antimicrobial activity of the selected compounds was investigated by the minimum inhibitory concentration (MIC) and by the determination of microbial growth in broth. The inhibitory effect on QS regulated phenotypes and virulence factors was tested on violacein production in *C. violaceum* ATCC 12472 and 026, biofilm formation and swarming and swimming motility in *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella enterica* serovar Montevideo and *Serratia marcescens*, in addition to evaluating thermal sensitivity and microbial inhibition by kanamycin of these strains combined with phenolic compounds. Five compounds were selected in molecular docking studies for *in vitro* tests: curcumin, capsaicin, resveratrol, gallic acid and phloridizin. These compounds bound with good in silico affinity to at least four CviR structural variants. The growth curves showed that gallic acid had a MIC of 9.4 mM on *C. violaceum* ATCC 12472 and 026. However, the other compounds had a MIC higher than the highest tested concentration. The results for violacein inhibition showed that curcumin at 25 µM, capsaicin at 70 µM and resveratrol at 6 µM inhibited up to 50% of pigment production in strain ATCC 12472. Additionally, curcumin at 5 µM inhibited the production of violacein in strain 026. Regarding the inhibition of biofilm formation, resveratrol inhibited up to 80% in *A. hydrophila*; capsaicin and curcumin up to 40% in *S.* Montevideo; resveratrol and capsaicin inhibited up to 60% in *S. marcescens*. In the motility test, curcumin completely inhibited swarming in *S. marcescens*, and no inhibition of the other compounds was observed for the other microorganisms. Curcumin and resveratrol were able to increase the sensitivity to kanamycin in the evaluated strains, with different degrees of inhibition. However, there was no inhibition in the thermal sensitivity test. The results obtained for the compounds curcumin and resveratrol can stimulate further studies of synergisms with anti-QS activity and applications in the food and pharmaceutical industries.

Keywords: Antimicrobial activity; Phenolic compounds; Curcumin; Resveratrol; Quorum sensing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas básicas dos principais autoindutores. AI-1 composto pelas homoserinas lactonas aciladas (AHL); AI-2 composto pelo furanosil borato diéster; e AI-3 composta pela família das pirazinonas.....04

Figura 2: Ancoragem molecular da estrutura 3QP1 da proteína CviR de *C. violaceum* com 3-oxo-C12-HSL, capsaicina, curcumina, floretina, resveratrol, ácido gálico e furanona C30. Representação de superfície (A-G) da estrutura 3QP1 da proteína CviR de *C. violaceum*, representações de superfície e esqueleto (H-N) e representação de esqueleto (O-U) com ligação de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos e os compostos fenólicos selecionados. Representação da superfície cinza – proteína CviR; representação de superfície amarela – 3-oxo-C12-HSL; representação de superfície vermelha – capsaicina; representação de superfície laranja – curcumina; representação de superfície azul – floretina; representação de superfície verde – resveratrol; representação de superfície rosa – ácido gálico; representação de superfície violeta – furanona C30; seta preta indica o sítio de ligação; seta amarela indica os compostos; linha tracejada azul indica ligação de hidrogênio.....23

Figura 3: Curvas de crescimento para *C. violaceum* ATCC 12472 durante 12h de incubação a 30°C em diferentes concentrações dos compostos. Controle= LB mais DMSO 1%; (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) floridzina; (D) ácido gálico; (E) resveratrol.....25

Figura 4: Curvas de crescimento para *C. violaceum* 026 durante 12h de incubação a 30°C em diferentes concentrações do composto. Controle= LB mais DMSO 1%; (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) floridzina; (D) ácido gálico; (E) resveratrol.....26

Figura 5: Curvas de crescimento para *S. marcescens* MG1 durante 12h de incubação a 30°C em diferentes concentrações do composto. Controle= LB mais DMSO 1%; (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) floridzina; (D) ácido gálico; (E) resveratrol.....27

Figura 6: Curvas de crescimento para *S.* Montevideo durante 12h de incubação a 30°C em diferentes concentrações do composto. Controle= LB mais DMSO 1%; (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) floridzina; (D) ácido gálico; (E) resveratrol.....28

Figura 7: Curvas de crescimento para *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36 durante 12h de incubação a 30°C em diferentes concentrações do composto. Controle= LB mais DMSO 1%; (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) floridzina; (D) ácido gálico; (E) resveratrol.....29

Figura 8: Efeito dos compostos selecionados sobre a produção do pigmento violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472 expressos em porcentagem de produção. (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) floridzina; (D) ácido gálico; (E) resveratrol. Controle = produção de violaceína sem adição de composto. Médias seguidas por diferentes letras diferem estatisticamente ($p < 0,05$).....30

Figura 9: Efeito dos compostos selecionados sobre a produção do pigmento violaceína em *C. violaceum* 026 expressos em porcentagem de produção. (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) floridzina; (D) ácido gálico; (E) resveratrol. Controle = produção de violaceína sem adição de composto. Médias seguidas por diferentes letras diferem estatisticamente ($p < 0,05$).....32

Figura 10: Efeito de diferentes compostos sobre a motilidade tipo *swarming* de *S. marcescens* MG1. (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) resveratrol. Controle = controle crescimento bacteriano; C-30 = controle furanona halogenada C-30 com bactéria; Médias seguidas por diferentes letras diferem estatisticamente ($p < 0,05$).....34

Figura 11: Efeito de diferentes compostos sobre a motilidade tipo *swarming* de *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36. (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) resveratrol. Controle = controle crescimento bacteriano; C-30 = controle furanona halogenada C-30 com bactéria; Médias seguidas por diferentes letras diferem estatisticamente ($p < 0,05$).....35

Figura 12: Efeito de diferentes compostos sobre a motilidade tipo *swimming* de *S. marcescens* MG1. (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) resveratrol. Controle = controle crescimento bacteriano; C-30 = controle furanona halogenada C-30 com bactéria; Médias seguidas por diferentes letras diferem estatisticamente ($p < 0,05$).....36

Figura 13: Efeito de diferentes compostos sobre a motilidade tipo *swimming* de *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36. (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) resveratrol. Controle = controle crescimento bacteriano; C-30 = controle furanona halogenada C-30 com bactéria; Médias seguidas por diferentes letras diferem estatisticamente ($p < 0,05$).....37

Figura 14: Efeito de diferentes compostos sobre a formação de biofilme de *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36. (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) resveratrol. Controle = controle crescimento bacteriano; Médias seguidas por diferentes letras diferem estatisticamente ($p < 0,05$).....38

Figura 15: Efeito de diferentes compostos sobre a formação de biofilme de *S.* Montevideo. (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) resveratrol. Controle = controle crescimento bacteriano; Médias seguidas por diferentes letras diferem estatisticamente ($p < 0,05$).....40

Figura 16: Efeito de diferentes compostos sobre a formação de biofilme de *S. marcescens* MG1. (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) resveratrol. Controle = controle crescimento bacteriano; Médias seguidas por diferentes letras diferem estatisticamente ($p < 0,05$).....42

Figura 17: Curvas de crescimento para *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36 durante 24h de incubação a 37°C em diferentes concentrações do composto curcumina em µM (indicado na legenda) e o antibiótico canamicina indicado pelas letras: (A) 4 µg/ml; (B) 8 µg/ml; (C) 16 µg/ml; (D) 32 µg/ml; (E) 64 µg/ml; (F) 128 µg/ml; (G) 256 µg/ml; (H) 512 µg/ml. 0= LB mais canamicina e bactéria; Controle= LB mais DMSO 1%.....44

Figura 18: Curvas de crescimento de *S.* Montevideo durante 24h de incubação a 37°C em diferentes concentrações do composto curcumina em µM (indicado na legenda) e o antibiótico canamicina indicado pelas letras (A) 4 µg/ml; (B) 8 µg/ml; (C) 16 µg/ml; (D) 32 µg/ml; (E) 64

µg/ml; (F) 128 µg/ml; (G) 256 µg/ml; (H) 512 µg/ml. 0= LB mais canamicina e bactéria; Controle= LB mais DMSO 1%.....46

Figura 19: Curvas de crescimento para *S. marcescens* MG1 durante 24h de incubação a 30°C em diferentes concentrações do composto curcumina em µM (indicado na legenda) e o antibiótico canamicina indicado pelas letras: (A) 4 µg/ml; (B) 8 µg/ml; (C) 16 µg/ml; (D) 32 µg/ml; (E) 64 µg/ml; (F) 128 µg/ml; (G) 256 µg/ml; (H) 512 µg/ml. 0= LB mais canamicina e bactéria; Controle= LB mais DMSO 1%.....47

Figura 20: Curvas de crescimento para *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36 durante 24h de incubação a 37°C em diferentes concentrações do composto resveratrol em µM (indicado na legenda) e o antibiótico canamicina indicado pelas letras: (A) 4 µg/ml; (B) 8 µg/ml; (C) 16 µg/ml; (D) 32 µg/ml; (E) 64 µg/ml; (F) 128 µg/ml; (G) 256 µg/ml; (H) 512 µg/ml. 0= LB mais canamicina e bactéria; Controle= LB mais DMSO 1%.....49

Figura 21: Curvas de crescimento para *S.* Montevideo durante 24h de incubação a 37°C em diferentes concentrações do composto resveratrol em µM (indicado na legenda) e o antibiótico canamicina indicado pelas letras: (A) 4 µg/ml; (B) 8 µg/ml; (C) 16 µg/ml; (D) 32 µg/ml; (E) 64 µg/ml; (F) 128 µg/ml; (G) 256 µg/ml; (H) 512 µg/ml. 0= LB mais canamicina e bactéria; Controle= LB mais DMSO 1%.....50

Figura 22: Curvas de crescimento para *S. marcescens* MG1 durante 24h de incubação a 30°C em diferentes concentrações do composto resveratrol em µM (indicado na legenda) e o antibiótico canamicina indicado pelas letras: (A) 4 µg/ml; (B) 8 µg/ml; (C) 16 µg/ml; (D) 32 µg/ml; (E) 64 µg/ml; (F) 128 µg/ml; (G) 256 µg/ml; (H) 512 µg/ml. 0= LB mais canamicina e bactéria; Controle= LB mais DMSO 1%.....52

Figura 23: Curvas de sobrevivência de *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36 durante 120 min a 50°C em diferentes concentrações do composto em µM (indicado na legenda); (A) curcumina; (B) resveratrol; Controle= LB mais bactéria.....54

Figura 24: Curvas de sobrevivência de *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36 durante 120 min a 60°C em diferentes concentrações do composto em µM (indicado na legenda); (A) curcumina; (B) resveratrol; Controle= LB mais bactéria.....54

Figura 25: Curvas de sobrevivência *S.* Montevideo durante 120 min a 50°C em diferentes concentrações do composto em µM (indicado na legenda); (A) curcumina; (B) resveratrol; Controle= LB mais bactéria.....55

Figura 26: Curvas de sobrevivência *S.* Montevideo durante 120 min a 60°C em diferentes concentrações do composto em µM (indicado na legenda); (A) curcumina; (B) resveratrol; Controle= LB mais bactéria.....55

Figura 27: Curvas de sobrevivência *S. marcescens* MG1 durante 120 min a 50°C em diferentes concentrações do composto em µM (indicado na legenda); (A) curcumina; (B) resveratrol; Controle= LB mais bactéria.....56

Figura 28: Curvas de sobrevivência *S. marcescens* MG1 durante 120 min a 60°C em diferentes concentrações do composto em µM (indicado na legenda); (A) curcumina; (B) resveratrol; Controle= LB mais bactéria.....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 (Anexo): Compostos fenólicos selecionados a partir da literatura.....72

Tabela 2: Micro-organismos utilizados neste estudo, juntamente com suas características e condições de cultivo.....13

Tabela 3: Ancoragem molecular dos dez compostos fenólicos pré-selecionados, homosserina lactonas e furanonas com maior afinidade e as estruturas proteicas de CviR de *C. violaceum* (Parte 1 - 3QP1, 3QP2, 3QP4).....18

Tabela 4: Ancoragem molecular dos dez compostos fenólicos pré-selecionados, homoserina lactonas e furanonas com maior afinidade e as estruturas proteicas de CviR de *C. violaceum* (Parte 2 - 3QP5, 3QP6, 3QP8).....20

Tabela 5: Concentração inibitória mínima dos compostos selecionados *in silico*.....24

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

WHO – Organização Mundial de Saúde. Do inglês *World Health Organization*.

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças. Do inglês *Center for Disease Control and Prevention.*

AHL – Homosserina lactona acilada. Do inglês *Acil homosserine lactone*.

QS – *Quorum sensing*.

QQ – *Quorum quenching*.

AI – Autoindutor.

SAM – S-adenosilmetionina.

EHEC – Enterohemorrágica.

LEE – *Locus Enterocyte Effacement.*

QSI – Inibidor do *quorum sensing*. Do inglês *Quorum Sensing Inhibitor*.

GRAS – Geralmente reconhecido como seguro. Do inglês *Generally Recognized As Safe*.

GLASS – Sistema Global de Vigilância Antimicrobiana da WHO. Do inglês *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System.*

MIC – Mínima concentração inibitória. Do inglês *Minimal Inibitory Concentration*.

OD – Densidade óptica. Do inglês *Optical Density*.

PDB – Bando de dados de proteínas. Do inglês *Protein Data Bank.*

LB – *Luria Bertani*.

UFC – Unidades formadoras de colônia.

CLSI - *Clinical & Laboratory Standards Institute.*

MBC – Concentração mínima bactericida. Do inglês *Minimal Bactericidal Concentration*.

MIC – Concentração mínima inibitória. Do inglês *Minimal Inhibitory Concentration.*

DMSO – Dimetilsulfóxido.

C6-HSL – N-*Hexanoyl-L-homoserine lactone*.

EPS – Exopolissacarídeo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
1.1. *Quorum sensing* 2
1.1.1. Tipos de autoindutores 3
1.1.2. Inibidores do *quorum sensing* 4
1.2. Compostos fenólicos 6
1.3. Resistência a antibióticos 8
1.4. *Quorum sensing* na deterioração de alimentos 9
2. OBJETIVOS 11
2.1. Geral 11
2.2. Específicos 11
3. MATERIAL E MÉTODOS 12
3.1. Seleção dos compostos fenólicos 12
3.2. Micro-organismos utilizados neste estudo 12
3.3. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC) 13
3.4. Atividade anti-QS dos compostos fenólicos 13
3.4.1. Detecção de inibidores do QS dependente do AI-1 - Inibição da produção do pigmento violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472 e 026 14
3.5. Ensaio de motilidade tipo *swarming* e *swimming* 14
3.6. Ensaio de formação de biofilmes 14
3.7. Ensaio de sensibilidade a antibióticos 15
3.7.1. Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima 15
3.7.2. Sensibilidade das bactérias aos compostos fenólicos e canamicina 16
3.8. Sensibilidade térmica de bactérias tratadas com compostos fenólicos 16
3.9. Análise estatística 17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 17
4.1. Seleção dos compostos fenólicos por ancoragem molecular 17
4.2. Concentração inibitória mínima (MIC) e curvas de crescimento 24
4.3. Determinação da atividade anti-QS dos compostos fenólicos 30
4.3.1. Inibição da produção do pigmento violaceína em *C. violaceum* 30
4.4. Motilidade tipo s*warming* e *swimming* 33
4.4.1. Motilidade tipo *swarming* 33
4.4.2. Motilidade tipo *swimming* 35

4.5. Formação de biofilme 37
4.6. Resistência a Antibiótico canamicina 43
4.6.1. Curcumina 43
4.6.2. Resveratrol 48
4.7. Sensibilidade térmica 53
5. CONCLUSÃO 57
6. REFERÊNCIAS 57

1. INTRODUÇÃO

A detecção de quórum, conhecida como *quorum sensing* (QS), é um mecanismo de comunicação intercelular em micro-organismos que coordena comportamentos em nível de população (Ge *et al.*, 2020). Essas associações podem ser benéficas ou não. A comunicação entre bactérias patogênicas traze impactos negativos, tanto para a economia quanto para a saúde. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (do inglês WHO – *World Health Organization*), anualmente cerca de 5,7 milhões de pessoas vão a óbito devido a doenças infecciosas, muitas delas causadas por bactérias resistentes a antibióticos (WHO, 2018; Kalia *et al.*, 2019).

O uso excessivo e indevido de antibióticos na medicina, agricultura e pecuária, juntamente com os mecanismos de adaptação microbiana, tornou a resistência antimicrobiana uma ameaça global. De acordo com o *Antibiotic Resistance Threats Report* de 2019 do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês CDC – *Center for Disease Control and Prevention*), mais de 2,8 milhões de infecções são causadas por bactérias resistentes a antibióticos nos EUA a cada ano, e mais de 35.000 pessoas morrem em decorrência disso (CDC, 2019). Assim, buscam-se de alternativas que exerçam menor pressão seletiva sobre os micro-organismos.

Diante da relevância dos fenótipos regulados pelo QS, inclusive para a microbiologia dos alimentos, há um grande interesse em desenvolver sistemas capazes de interferir nessa comunicação celular. Assim, o QS tem sido alvo para o desenvolvimento de terapias alternativas ou adjuvantes ao uso de antibióticos. Dentre eles, destacam-se inibidores da síntese de autoindutores, inativadores enzimáticos desses sinais e moléculas com efeito antagônico aos autoindutores (LaSarre & Federle, 2013; Allen *et al.*, 2014, Kalia *et al.*, 2019).

Muita atenção foi dada às espécies vegetais pelas suas diversas moléculas sintetizadas pelo metabolismo secundário, para prevenir e controlar estresses bióticos e abióticos (Belhaoues *et al.*, 2020). Estes compostos apresentam diversas atividades biológicas benéficas como atividade antimicrobiana, proteção contra o estresse oxidativo e ação antiproliferativa, muitas dessas atribuídas ao seu alto potencial redox (Manach *et al.*, 2004), gerando grande valor para indústria de alimentos. Aliado à crescente conscientização dos consumidores sobre os riscos causados pelas substâncias químicas utilizadas como conservantes de alimentos, o mercado exige que novos estudos sejam realizados sobre os antimicrobianos, com menos efeitos colaterais sobre a saúde humana (Papadopoulou *et al.*, 2005).

1.1.Quorum sensing

O *quorum sensing* (QS) é utilizado por uma grande variedade de bactérias e lhes permite modificar coletivamente o comportamento em resposta a alterações na densidade celular, modulando a expressão gênica. Esta comunicação é mediada por pequenas moléculas acumuladas durante a multiplicação microbiana (Mukherjee & Bassler, 2019).

O QS envolve a produção, secreção e detecção de moléculas de sinalização extracelulares, conhecidas como autoindutores (AI). Normalmente essas moléculas se difundem livremente pela membrana, acumulando no ambiente em que o micro-organismo se multiplica, até atingirem um limiar basal, necessário para a sua detecção. Ao atingir essa concentração, o sinal é detectado por uma proteína receptora do QS que provoca uma cascata de transdução de sinal a jusante, desencadeando a expressão gênica. Essa comunicação pode ocorrer entre células da mesma espécie ou diferentes (Papenfort & Bassler, 2016; Mukherjee & Bassler, 2019). Ao monitorar o acúmulo de autoindutores específicos, as bactérias conseguem perceber mudanças na densidade de sua população e na complexidade de diferentes espécies ao redor e responder como um grupo, de acordo com a situação (Ng *et al.*, 2011; Hawver *et al.*, 2016).

O QS foi descoberto como um mecanismo regulador da indução da bioluminescência, pela primeira vez, na bactéria marinha Gram negativa *Vibrio fischeri*, onde a produção de luz é induzida pela densidade celular através da expressão do *operon* da luciferase. Esta bactéria emprega um sistema QS do tipo LuxI/LuxR para controlar a produção de bioluminescência (Nealson & Hastings, 1979; Hawver *et al.*, 2016). Ao pesquisar outras bactérias, foi observado similaridade nesse tipo de sistema baseado no par de proteínas LuxI/LuxR, em que LuxI é uma sintase responsável pela biossíntese de homosserinas lactonas aciladas (AHL) e o receptor LuxR atua como regulador transcricional modulado por AHLs. Vários pares LuxI/LuxR podem coexistir em um genoma, gerando uma rede integrada de QS para controle do comportamento microbiano, como é o caso para o patógeno *Pseudomonas aeruginosa* (Lee & Zhang, 2015; Papenfort & Bassler, 2016; Cellini *et al.*, 2020).

Existem também micro-organismos que possuem homólogos adicionais de LuxR, proteína receptora do QS, mas não possuem o LuxI cognato. Estes são incapazes de sintetizar autoindutores, mas podem responder às AHL liberadas por outras espécies presentes no ambiente (Almeida *et al.*, 2018a; Cellini *et al.*, 2020). Os genes e funções regulados pelo QS são diversos e podem ser classificados em quatro grupos funcionais: comportamento celular, como formação e dispersão de biofilme, motilidade e adesão; manutenção e proliferação celular, como produção de

exoenzimas, síntese de sideróforos, esporulação e resistência a ácidos; transferência horizontal de genes (competência, conjugação plasmídica); e interações com o hospedeiro e outros micro-organismos, como fatores de virulência, produção de antibióticos, bioluminescência, exo-polissacarídeos, entre outros (Jimenez *et al.*, 2010; Monnet *et al.*, 2014, Grandclément *et al.*, 2016).

O QS também permite que as bactérias "percebam" o ambiente em que se encontram, além de ser um processo regulatório a partir da densidade populacional. Os autoindutores podem servir como uma sonda para detectar sinais ambientais, como estresse com antibióticos, pH e assim por diante. Essa teoria, conhecida como "sensor de difusão", foi criada para explicar uma das finalidades do QS, relacionada à percepção espacial, criando o conceito de "sensor de eficiência". Esse conceito propõe que as bactérias consigam perceber a densidade celular, distribuição espacial e limitações no ambiente que possam interferir na transferência do autoindutor (Hense *et al.*, 2007; Grandclément *et al.*, 2016). Um estudo avaliando a indução de competência regulada pelo QS em *Streptococcus pneumoniae*, mostrou que este fenótipo pode ser influenciado simultaneamente pela densidade celular, pH externo, estresse induzido por antibióticos e histórico celular, indicando que os autoindutores possuem mais de uma função e permitindo que as células integrem sinais externos em sua resposta de detecção de quórum (Moreno-Gámez *et al.*, 2017).

1.1.1. Tipos de autoindutores

As bactérias Gram positivas e as Gram negativas apresentam diferentes sistemas de comunicação para regular as diversas funções fisiológicas, conforme apresentado na **Figura 1**. Nas Gram negativas, a sinalização geralmente é mediada por moléculas de acil homoserina lactona (AHL), também conhecida como autoindutor-1 (AI-1). Essas moléculas sinalizadoras são sintetizadas a partir de metabólitos comuns, como ácidos graxos e S-adenosilmetionina (SAM); a variação existente entre essas moléculas ocorre tanto pela composição quanto pelo tamanho dos ácidos graxos, que podem variar de 4 a 18 carbonos, e conter substituições na cadeia (Tiaden *et al.*, 2010; Ryan *et al.*, 2015; Hawver *et al.*, 2016; Quecán *et al.*, 2018).

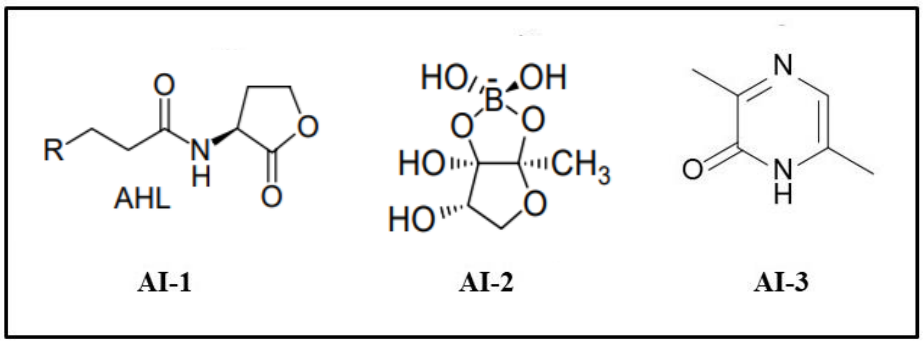

Figura 1: Estruturas básicas dos principais autoindutores. AI-1 composto pelas homoserinas lactonas aciladas (AHL); AI-2 composto pelo furanosil borato diéster; e AI-3 composta pela família das pirazinona. Fonte: Williams *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2020.

Nas Gram positivas a comunicação é mediada por peptídeos de baixo peso molecular. Na maioria dos casos, o sinalizador é sintetizado como um precursor peptídico mais longo que é, em seguida, exportado e modificado após sua secreção por um transportador específico (Monnet *et al.*, 2014; Hawver *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2020). Outras moléculas como furanosil borato diéster, também conhecido como autoindutor-2 (AI-2), estão associadas aos dois grupos bacterianos permitindo as comunicações intra e interespecífica (Sola *et al.*, 2012; Quecán *et al.*, 2018, 2019). O AI-2 foi originalmente identificado como um tetra-hidrofurano borado, que atualmente descreve uma mistura equilibrada de conversão entre compostos, borados ou não. Esses compostos são formados a partir da ciclização espontânea da molécula 4,5-di-hidroxi-2,3-pentanodiona (DPD) sintetizada via proteína LuxS sintase (Surette *et al.*, 1999; Grandclément *et al.*, 2016).

Existem também outras moléculas, de estruturas ainda desconhecidas, que funcionam como sinalizadores em uma variedade de micro-organismos. Entre eles, o autoindutor-3 (AI-3), recentemente elucidado e caracterizado em *Escherichia coli* EHEC, sendo um metabólito envolvido na patogênese (Kim *et al.*, 2020). Este autoindutor possui análagos da família das pirazinonas, e são derivados de produtos de treonina desidrogenase (Tdh) e reações de tRNA sintetase “abortadas”, estando presentes em uma variedade de patógenos Gram negativos e Gram positivos. Na *E. coli* EHEC, o AI-3 regula positivamente o *Locus Enterocyte Effacement* (LEE), codificando o sistema de secreção tipo III e efetores responsáveis pela colite hemorrágica e pela formação de lesões no trato intestinal (Carlson-Banning & Sperandio, 2018; Kim *et al.*, 2020).

1.1.2. Inibidores do quorum sensing

A inibição da comunicação QS também é chamada de *quorum quenching* (QQ) e pode ocorrer de diversas formas, principalmente pela inibição da síntese de autoindutores pelas

proteínas sintases, degradação dessas moléculas, competição pela ligação às proteínas receptoras interferindo na sua ligação aos promotores de genes e, consequentemente, inibindo a sua expressão. Essas moléculas interferentes são chamadas de inibidores do QS (QSI – do inglês *Quorum Sensing Inhibitor*) (Lade *et al.*, 2014; Zhang & Li, 2015). Os QSI incluem enzimas (lactonases, acilases, oxidorredutases), metabólitos provenientes de plantas que sintetizam QSIs (compostos fenólicos e óleos essenciais) e antagonistas (furanonas e similares) (Kalia *et al.*, 2013; Zhang & Li, 2015; Brackman *et al.*, 2009; Quecán *et al.*, 2019; Rivera *et al.*, 2019). Esses metabólitos, quando utilizados em concentrações não letais, inibem os fatores de virulência essenciais para o estabelecimento da infecção e patogênese pelo direcionamento de vias metabólicas não essenciais, reduzindo a pressão seletiva para desenvolver resistência (Ahmed *et al.*, 2019).

As furanonas halogenadas são amplamente conhecidas como QSI e foram inicialmente isoladas de algas vermelhas australianas (*Delisea pulchra*). Sua atividade QQ e de seus análogos possuem efeito inibitório devido à sua semelhança estrutural com as AHLs, competindo pela proteína do tipo LuxR. As furanonas também interrompem a via biossintética de AI-2, modificando e inativando covalentemente a proteína LuxS (Zang *et al.*, 2009; Zhang & Li, 2015; Petrovié *et al.*, 2019).

Muitas enzimas envolvidas na modificação ou degradação da AHL foram relatadas, sendo divididas em quatro classes funcionais: lactonases que abrem o anel da homoserina lactona da AHL; acilases que clivam a ligação acila, liberando homoserina lactona e ácido graxo; as redutases que convertem a substituição 3-oxo da AHL por 3-hidroxil; e oxidases que catalisam a oxidação da cadeia acila. Essas enzimas podem ser encontradas em bactérias, procariotos e eucariotos, como forma de defesa. Algumas bactérias também são capazes de degradar seu próprio sinal de AHL, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Agrobacterium tumefaciens* limitando a resposta ao QS (Bijtenhoorn *et al.*, 2011, Grandclément *et al.*, 2016; Kalia *et al.*,2019).

Sabe-se também que as plantas são as principais fontes de QSI naturais. As plantas evoluíram eficientemente para controlar os sistemas bacterianos de QS e se protegerem de patógenos, além de apresentarem a vantagem de serem consumidas por seres humanos. Assim, os compostos ativos que possuem atividade inibidora podem ser considerados seguros (GRAS) e podem apresentar baixa toxicidade para as células humanas, embora sejam necessários mais estudos de toxicidade (Hentzer & Givskov, 2003; Hussain *et al.*, 2018). Os QSI podem ser

extraídos de todos os tecidos vegetais como os frutos, sementes, casca, folhas, flores, raízes e rizomas.

Os compostos QSI identificados na literatura possuem estruturas diversas, sendo em sua maioria compostos cíclicos, como derivados fenólicos ou cíclicos de nitrogênio, além de terpenos de óleos essenciais e alguns compostos não cíclicos, como compostos organossulfurados (Bjarnsholt *et al.*, 2005; Vattem *et al.*, 2007; Jakobsen *et al.*, 2012; Truchado *et al.*, 2012a; Alvarez *et al.*, 2014; Kumar *et al.*, 2014; Packiavathy *et al.*, 2014; Husain *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2015; Yin *et al.*, 2015; Corral *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017; Quecán *et al.*, 2019; Rivera *et al.*, 2019).

O acesso às estruturas cristalinas das proteínas sintase e receptora, como por exemplo, LasI e LasR de *Pseudomonas aeruginosa*, CviI e CviR de *Chromobacterium violaceum*, juntamente com a disponibilidade de programas computacionais, como triagem virtual baseada na estrutura e ligações (*molecular docking*), se tornaram úteis na identificação de mais moléculas com potenciais habilidades anti-QS (Ahmed *et al.*, 2019).

1.2. Compostos fenólicos

As plantas produzem compostos provenientes do seu metabolismo secundário, que aumentam significativamente a capacidade de adaptação em ambientes desfavoráveis. Esses metabólitos (alcaloides, fenóis, flavonoides, quinonas, taninos, terpenos e lecticinas) são bem conhecidos como forma de defesa contra herbívoros e micro-organismos (Nazir *et al.*, 2020). Os compostos fenólicos são a segunda maior família de bioativos vegetais, depois dos terpenóides. Eles compartilham uma estrutura química comum caracterizada pela presença de pelo menos um anel benzênico ligado a um ou mais grupos hidroxila, podendo ter vários grupos substituintes como carbonilas, metoxilas ou outras estruturas cíclicas não aromáticas (Castro *et al.*, 2004; Gutiérrez-Del-Rio *et al.*, 2018).

Esta família contém mais de 10.000 compostos descritos atualmente, das quais várias são encontradas em partes comestíveis das plantas. Podem ser encontrados em uma gama de alimentos e bebidas como verduras, frutas, vinho, chocolate, cerveja, sucos, café e chás (Gutiérrez-Del-Rio *et al.*, 2018). São fitoquímicos agrupados em subfamílias, com base nas variações estruturais das moléculas, como estrutura química, número de anéis fenólicos e dos elementos estruturais que ligam esses anéis, como ácidos fenólicos, lignanas, estilbenos e flavonoides (Cheynier, 2005). Eles são divididos em dois grandes grupos: a) os flavonoides: flavanonas, flavonas,

dihidroflavonoides, flavonóis, flavanol, antocianinas, isoflavonas e proantocianinas; e b) não flavonoides: fenóis simples, ácido benzóico, taninos hidrolisáveis, acetofenonas e ácidos fenilacéticos, ácidos cinâmicos, cumarinas, benzofenonas, xantonas, estilbenos, chalconas, lignanas e secoiridóides (Rosa *et al.*, 2010).

Os flavonoides representam cerca de 60% dos polifenóis da dieta, presentes predominantemente nas partes comestíveis das plantas, como folhas, frutas e sementes. Diversos estudos avaliam sua atividade antimicrobiana (Borges *et al.*, 2013, 2014; Barreca *et al.*, 2014, Duarte *et al.*, 2015; Ding *et al.*, 2017; Bali *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2020) e mostram que sua eficiência é atribuída à capacidade de aumentar a permeabilidade e a ruptura da membrana plasmática, interagindo com as proteínas presentes na parede celular bacteriana. Além disso, estudos mostram que os flavonoides também têm atividades anti-inflamatórias e antitumorais (Bjarnsholt *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011, Packiavathy *et al.*, 2014; Nazir *et al.*, 2020).

O suco de uva vermelha é rico em diversos compostos fenólicos, como resveratrol, ácido elágico, quercetina, miricetina, catequina e epicatequina, sendo capaz de inativar altas populações *in vitro* de *Chronobacter sakazakii*, sugerindo seu uso como conservante de alimentos para fórmulas infantis (Kim *et al.*, 2010). O resveratrol também possui atividade antimicrobiana descrita contra vários patógenos e QQ na inibição da formação de biofilme e na dispersão de biofilmes estabelecidos (Duarte *et al.*, 2015).

A quercetina, um dos principais polifenóis da cebola, mostra efeitos inibitórios sobre a DNA girase de *E. coli*, aumento da permeabilidade da membrana e redução do seu potencial, impedindo a síntese de ATP na bactéria (Vaquero & Nadra, 2008). A quercetina também apresenta atividade antipatogênica contra infecções por *P. aeruginosa* PAO1, e pode inibir mecanismos de QS (Bali *et al.*, 2019).

Destaca-se também o polifenol curcumina, componente principal do rizoma *Curcuma longa*, que mostrou várias propriedades farmacêuticas, tais como atividade antitumoral, anti-HIV-1, antibacteriana, e anti-QS para diversos fenótipos regulados por esse sistema de comunicação em *P. aeruginosa* PAO1, *E. coli*, *S. marcescens* e *Proteus mirabilis* (Ding *et al.*, 2017). O ácido gálico é um ácido fenólico naturalmente encontrado em diversos alimentos e frequentemente utilizado pela indústria de alimentos como agente aromatizante, além de causar alterações irreversíveis no perfil de permeabilidade, ruptura e formação de poros nas membranas celulares bacterianas (Sorrentino *et al.*, 2018).

A capsaicina e luteolina são polifenóis abundantes em diversas espécies de pimenta, principalmente as do gênero *Capsicum*, com capacidade de inibir o crescimento microbiano, atividade antioxidante, anti-inflamatória, cardioprotetora, neuro-protetora e anticancerígena (Basith *et al.*, 2016; Rivera *et al.*, 2019). A floretina e sua forma glicosilada, floridzina, são dihidrochalconas, uma classe de flavonoides, encontrados predominantemente em maçãs e seus derivados, ambos compostos possuem atividade antimicrobiana em bactérias Gram positivas e Gram negativas (Barreca *et al.*, 2014).

Todos esses exemplos mostram a importância dos compostos fenólicos em relação à inibição do crescimento bacteriano e QQ, isoladamente ou em conjunto com outros compostos, como uma alternativa promissora aos conservantes sintetizados quimicamente utilizados atualmente.

1.3. Resistência a antibióticos

A resistência antimicrobiana é uma das maiores ameaças à saúde global e a disseminação de micro-organismos resistentes no meio ambiente, sendo um grande problema de saúde pública. Segundo o Sistema Global de Vigilância Antimicrobiana da OMS (GLASS), houve uma ocorrência generalizada de resistência a antibióticos entre 500.000 pessoas com suspeita de infecções bacterianas em 22 países nos anos de 2017-2018. As bactérias resistentes mais relatadas foram *E. coli, Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae,* seguidas por *Salmonella* spp. (WHO, 2018). As espécies identificadas como críticas, onde é necessário o desenvolvimento de novos antimicrobianos são: *Acinetobacter baumannii* e *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos e enterobactérias resistentes a carbapenêmicos e produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) (Saeki *et al.*, 2020).

Os antimicrobianos continuam sendo a principal opção de tratamento para infecções bacterianas. Porém, com as crescentes resistências a múltiplas drogas, novas alternativas são necessárias para tratar infecções e disseminação de bactérias multirresistentes. A principal vantagem dos inibidores do QS é a menor pressão seletiva exercida por esses em relação aos antibióticos tradicionais, uma vez que o bloqueio de um fator de virulência não afetaria a sobrevivência e o crescimento natural do micro-organismo alvo, não favorecendo a seleção da resistência bacteriana (Saeki *et al.*, 2020).

Em estudo conduzido por Silva *et al.* (2017), os flavonoides floretina, hesperidina, naringenina, miricetina e quercetina diminuíram de 4 a 16 vezes a MIC do antibiótico norfloxacina

contra *S. aureus*. Além disso, naringenina, floretina, hesperidina e miricitrina modularam a resistência à norfloxacina ao diminuir a expressão do gene *norA* através da inibição da superexpressão do sistema de bombas de efluxo (Silva *et al.*, 2017). Outro estudo observou que os ácidos sináptico, cafeico, vanílico e gálico apresentaram efeitos inibitórios sinérgicos contra *Campylobacter jejuni* quando testado em combinação com ciprofloxacina e eritromicina, indicando que esses compostos podem afetar a permeabilidade da membrana (Oh & Jeon, 2015).

O extrato metanólico do bagaço de uva, rico em compostos fenólicos, apresentou interações sinérgicas entre seus compostos mais abundantes (quercetina, ácido gálico, luteolina e ácido protocatecuico) combinado com diferentes classes de antibióticos como β-lactâmicos, quinolonas, fluoroquinolona, tetraciclina e cloranfenicol em cepas de *S. aureus* e *E. coli* (Sanhueza *et al.*, 2017). Outro exemplo é o lúpulo, rico em chalconas preniladas que possuem atividade antimicrobiana e sinérgica combinada aos antibióticos rifampicina, oxacilina, ciprofloxacina, gentamicina e vancomicina frente a diversas bactérias Gram positivas e negativas, entre eles *S. aureus* MRSA, podendo ser oito vezes mais ativo quando combinado (Bocquet *et al.*, 2019).

Os compostos capazes de modular positivamente a eficiência dos antibióticos são chamados de adjuvantes antibióticos, e geralmente agem aumentando a ação antibacteriana da droga ou bloqueando o principal mecanismo de resistência do micro-organismo. Os principais tipos de adjuvantes antibióticos utilizados são: permeabilizadores da membrana externa (colistina, aminoglicosídeos, poliaminas e peptídeos catiônicos), inibidores da bomba de efluxo (por exemplo, tetraciclinas, piperidinas, quinolonas e aminoglicosídeos) e inibidores da β-lactamase (sulfonas à base de penicilina, diazabicicloroctanos e ácidos bromáticos) (Lima *et al.*, 2019). A literatura indica que os compostos fenólicos são bons candidatos como adjuvantes quando administrados juntamente com antibióticos, atuando de forma a potencializar a sua ação (Sanhueza *et al.*, 2017). No entanto, mais estudos são necessários para avaliar os mecanismos e eficiência desses compostos.

1.4. *Quorum sensing* na deterioração de alimentos

A deterioração dos alimentos é caracterizada por qualquer alteração que ocorre nos alimentos, tornando o produto inaceitável para o consumidor. Ela pode ser causada por danos físicos, como alteração na umidade, quedas, alteração de temperatura; alterações químicas, como oxidação, alteração na cor; formação de gás e/ou líquido; microbiológicas, como formação de odores e cores desagradáveis decorrente do crescimento produção de metabólitos; e reações enzimáticas de enzimas endógenas que um produto pode conter. A deterioração causada por

micro-organismos é a forma mais comum e pode manifestar como formação de biofilmes, alterações de textura, sabores e odores (Galié *et al.*, 2018; Machado *et al.*, 2020).

Sabe-se que o QS está presente nas etapas que envolvem a deterioração de alimentos. A formação de proteases extracelulares é um dos importantes fatores relacionados à deterioração dos alimentos, e pode ser regulada pelo QS, como observado por Christensen *et al.* (2003) ao investigar a expressão de protease extracelular mediada por QS em *Serratia proteamaculans*. Os micro-organismos secretam as proteases que decompõem as proteínas presentes nos alimentos em peptídeos menores e aminoácidos, além de compostos voláteis, nitrogênio e enxofre por meio de uma série de etapas do metabolismo bacteriano, resultando na deterioração dos alimentos (Ding *et al.*, 2017).

A deterioração causa grande preocupação à indústria alimentícia, uma vez que promove significativas perdas econômicas e pode, ainda, ter consequências para a saúde pública como intoxicações alimentares. A detecção de sinalizadores do sistema QS em alimentos deteriorados adicionou uma nova dimensão para estudar o processo de deterioração (Bai & Rai, 2011). Essa comunicação celular na ecologia microbiana de alimentos tem recebido atenção e diversos estudos sugerem que a interferência nessa comunicação pode ser uma estratégia eficaz para prevenir a deterioração de alimentos por bactérias. Essa regulação tem sido associada a fenótipos relacionados à deterioração dos alimentos, como atividades pectinolíticas, lipolíticas, proteolíticas e quitinolíticas, e formação de biofilmes. Em diversos alimentos como vegetais, carne, peixe, aves e leite foram encontrados moléculas de autoindutores (Nazzaro *et al.*, 2013; Martins *et al.* 2018).

A deterioração de vegetais é causada principalmente por enzimas bacterianas pectinolíticas, que causam o colapso da estrutura da parede celular. As enzimas extracelulares pectina-liase, poligalacturonase, celulase e proteases são produzidas pelo patógeno *Erwinia carotovora* e regulados pelo QS (Tiwari *et al.*, 2016). *Pseudomonas* spp. e *Enterobacteriaceae* fazem parte da microbiota dominante de carnes resfriadas, são conhecidas por serem produtores de enzimas proteolíticas e formação de biofilme, contribuindo para a deterioração. Liu *et al.* (2006) detectaram AHL em carnes deterioradas com concentrações consideráveis de ambos os micro-organismos suportando atividade proteolítica significativa.

O leite e produtos lácteos são alimentos que podem estar contaminados com patógenos, como *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus* spp., *Salmonella* spp., *P. fluorescens* e *C. jejuni*. Algumas dessas bactérias podem produzir lipases, leticinases, glicosidases, proteinases e fosfolipases que contribuem para a deterioração desses alimentos, e a produção

dessas enzimas pode ser regulada pelo QS (Galié *et al.*, 2018). AHLs foram detectadas em alimentos lácteos deteriorados por bactérias psicrotróficas e foi comprovado que a concentração de AHLs aumenta com o grau de deterioração desses alimentos (Lei *et al.*, 2019). Os peixes também podem ser veículos de patógenos produtores de AHLs, entre eles *Aeromonas salmonicida, Vibrio anguillarum, Vibrio harveyi, Vibrio salmonicida* e *Yersinia ruckeri.* Não se sabe ainda quais fenótipos específicos são regulados pelo QS, mas alguns desses fenótipos estão associados à virulência, como produção de proteases, sideróforos e de toxinas. Em peixes infectados com *Yersinia ruckeri* foram detectadas AHLs, o que indica o papel regulatório do QS no processo de deterioração de peixes (Li *et al.*, 2016; Machado *et al.*, 2020).

Diante do exposto, evidencia-se a importância de estudar formas de inibição do QS em bactérias de relevância em alimentos, utilizando diferentes triagens a fim de avaliar sua natureza inibitória.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o potencial *quorum quenching* de compostos fenólicos em bactérias biossensoras e de origem alimentar.

2.2. Específicos

- Selecionar compostos fenólicos por meio de análise de ancoragem molecular (*in silico*) com ativadores transcricionais do QS;
- Determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* (MIC e curvas de crescimento) de compostos selecionados;
- Determinar a atividade QQ dos compostos fenólicos por meio da inibição da produção de violaceína, biofilme e motilitade em estirpes selecionadas;
- Avaliar o efeito antimicrobiano e sinergismos de estirpes tratadas com compostos fenólicos e antibiótico;
- Determinar a sensibilidade térmica em estirpes tratadas com inibidores do QS.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção dos compostos fenólicos

Diante da diversidade de compostos fenólicos disponíveis e do alto custo dos padrões comerciais, foi efetuado um trabalho de ancoragem molecular entre 79 compostos pré-selecionados a partir da literatura (**Tabela 1 – Anexo**) e que estão presentes em alimentos de origem vegetal e outras plantas, com potencial atividade antimicrobiana e QQ e seis variantes estruturais do ativador transcricional do *quorum sensing* CviR de *C. violaceum* (3QP1, 3QP2, 3QP4, 3QP5, 3QP6 e 3QP8), para auxiliar na escolha dos compostos com maior probabilidade de inibição do *quorum sensing*. Para isso, utilizou-se a estratégia adotada em dois estudos recentes de ancoragem molecular (Almeida *et al.*, 2016, 2018a). As estruturas moleculares dos compostos fenólicos, homoserina lactonas e furanonas foram obtidas a partir do Composto Identificador do banco de dados PubChem (http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/), e as estruturas das proteínas CviR foram obtidas do banco de dados Protein Data Bank (PDB) (https://www.rcsb.org/). A ancoragem molecular foi realizada usando a ferramenta "*Dock Ligands*" da *CLC Drug Discovery Workbench* 3.0.2 *software*, sendo executadas 1000 interações para cada composto e proteína. A pontuação gerada imita a mudança de energia potencial quando o composto e a proteína interagem com base em ligações de hidrogênio, íons metálicos e interações estéricas, em que valores mais negativos correspondem a maiores afinidades de ligação. As cinco melhores pontuações de acoplamento foram usadas em cada estrutura macromolecular, e foi realizada a inspeção visual dos sítios ativos de ligação das proteínas CviR com os compostos para selecionar o melhor acoplamento.

Após seleção *in silico* dos compostos de maior potencial inibitório, cinco foram adquiridos, pertencentes às diferentes classes, a saber: curcumina (PubChem CID: 969516), capsaicina (PubChem CID: 1548943), ácido gálico (PubChem CID: 370), resveratrol (PubChem CID: 445154) e floridizina (PubChem CID: 4789). Os compostos capsaicina, curcumina e resveratrol foram adquiridos da Sigma Aldrich (Brasil). Ácido gálico e floridizina foram obtidos gentilmente fornecidos pela profa. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

3.2. Micro-organismos utilizados neste estudo

Foram utilizados neste estudo micro-organismos modelos do sistema de comunicação *quorum sensing*, *C. violaceum* ATCC 12472 e 026, e de relevância em alimentos: *S. marcescens* MG1, *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36 e *S.* Montevideo (**Tabela 2**).

Tabela 2: Micro-organismos utilizados neste estudo, juntamente com suas características e condições de cultivo.

Estirpe	Características	Condições de cultivo	Referência
Aeromonas hydrophila IOC/FDA 110-36	Bactéria patogênica de importância alimentar	LB a 37°C	Rodrigues *et al.*, (2016)
Chromobacterium violaceum ATCC 12472	Estirpe selvagem produtora de violaceína. Também utilizada para estudos de inibição do QS	LB a 30°C	Rivera *et al.* (2019)
Chromobacterium violaceum 026	Mutante da estirpe selvagem *C. violaceum* ATCC 31532. Não é capaz de produzir AHLs, mas responde a AHLs exógenas.	LB + canamicina a 20µg/ml a 30 °C	Rivera *et al.* (2019)
Salmonella Montevideo	Bactéria patogênica de importância alimentar, isolada de frango cru.	LB A 37°C	Lalsiamthara e Lee, (2017)
Serratia marcescens MG1	Bactéria produtora de biofilme, pigmento prodigiosina e motilidade tipo *swarming*. Também utilizada para estudos de inibição do QS	LB a 30°C	Salini e Pandian, (2015)

LB: *Luria Bertani*;

3.3. Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)

A atividade antimicrobiana foi avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima – MIC (Wiegand *et al.*, 2008) e curvas de crescimento com os micro-organismos nas condições de cultivo previamente indicados. As curvas de crescimento foram obtidas para avaliar efeitos sobre a cinética de crescimento em condições sub-inibitórias (Defoirdt *et al.*, 2013). Testes preliminares foram realizados para obter as concentrações de cada composto para cada micro-organismo. Os resultados obtidos serviram de base para escolha das concentrações a serem utilizadas nos ensaios de QQ.

3.4. Atividade QQ dos compostos fenólicos

Foi realizada uma triagem com as estirpes *C. violaceum* ATCC 12472 e uma mutante *C. violaceum* 026 para aumentar as chances de obtenção de inibidores que sejam específicos a um

dado sistema e inibidores que tenham efeitos mais amplos de ação sobre o sistema de QS dependente de AI-1.

3.4.1. Detecção de inibidores do QS dependente do AI-1 - Inibição da produção do pigmento violaceína em C. violaceum ATCC 12472 e 026

A produção do pigmento roxo violaceina em *C. violaceum* ATCC 12472 e 026 é controlada pelo QS. A inibição da produção de violaceína foi quantificada em meio líquido, pela extração do pigmento, e lida no espectofotômetro OD 595 nm, conforme descrito por Oliveira *et al.* (2016). Como controle positivo da inibição do sistema *quorum sensing*, o composto (Z-)-4-Bromo-5-(bromomethylene)-2(5H)-furanone (C30) foi utilizado na concentração de 0,1mM (Santos *et al.*, 2020).

3.5. Ensaio de motilidade tipo *swarming* e *swimming*

O teste foi avaliado nos micro-organismos *S. mascescens* MG1 e *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36, realizado conforme descrito por Oliveira *et al.* (2016), com modificações. Para o ensaio de motilidade tipo *swarming* foram utilizados 4 ml de ágar semi-sólido *Luria-Bertani* (LB) 0,5 % (p/v) adicionado de compostos fenólicos em concentrações sub-letais (sub-MIC). Para o ensaio do tipo *swimming* foram utilizados 6 ml de ágar semi-sólido LB 0,3% (p/v) nas mesmas condições. Posteriormente, os tubos foram homogeneizados, em agitador de tubos tipo vortex, e vertidos em placas de Petri, previamente esterilizadas, e mantidas em repouso. Após 10 minutos em câmara de fluxo laminar para solidificação do ágar, foram inoculados 2 µL da cultura (10^8 UFC/ml) na região central do ágar (*spot*). As placas foram incubadas por 12h na temperatura ótima de crescimento do micro-organismo, conforme relatado nas condições de cultivo (**Tabela 2**). Como controle positivo para inibição da motilidade tipo *swarming* e *swimming* foi utilizado ágar LB contendo furanona C-30 na concentração de 0,1 mM e como controle negativo foi utilizado ágar LB semi-sólido sem adição de composto. Os resultados de inibição da motilidade foram analisados visualmente comparando o diâmetro de crescimento da bactéria em relação ao crescimento sem adição de composto fenólico.

3.6. Ensaio de formação de biofilmes

O efeito da inibição por compostos fenólicos sobre a formação de biofilmes de *S. marcescens* MG1, *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36 e *S.* Montevideo foi avaliado, conforme descrito por Oliveira *et al.* (2016). Em placa de microtitulação de 96 poços foram adicionados 200

µL de caldo de cultura *Luria-Bertani* (LB) adicionados de diferentes concentrações sub-letais (sub-MIC) de compostos fenólicos selecionados. Em seguida, foram inoculados 20 µL de micro-organismo teste ajustado conforme solução Mcfarland 0,5 (10^5 UFC/ml) e a incubação feita na temperatura ótima de crescimento dos micro-organismos. Após incubação de 24h, o meio de cultura foi descartado e as placas foram lavadas três vezes com 200 µl de solução salina 0,9% (p/v) estéril. As células sésseis foram coradas com 200 µl de cristal violeta 0,1 % (p/v) por 30 minutos, sendo posteriormente, removido e os orifícios lavados três vezes com solução salina. Em seguida, o cristal violeta retido pelas células aderidas foi dissolvido em 200 µl de etanol (95 %) e a densidade óptica (DO) medida a 595 nm. O controle negativo foi avaliado nas mesmas condições descritas sem adição de composto fenólico. Os resultados foram expressos em porcentagem, comparando a inibição dos compostos fenólicos em relação ao controle negativo.

3.7. Ensaio de sensibilidade a antibióticos

3.7.1. Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima

Foram determinadas a concentração inibitória mínima (MIC) e a concentração bactericida mínima (MBC) do antibiótico e/ou compostos fenólicos contra todas as cepas utilizadas. O antibiótico utilizado foi canamicina, obtido da Sigma Aldrich (Brasil). Para a determinação da MIC e MBC, o ensaio de determinação foi seguido conforme estabelecido pelo CLSI (2007), usando o método de micro-diluições em caldo, em placas de 96 poços, em diferentes faixas de concentração. Para cada poço foi adicionada 100 µl de caldo LB suplementado com diferentes concentrações de antibiótico (4 a 512 µg/ml) e 10 µl de suspensão bacteriana, ajustada conforme escala de McFarland 0,5 (10^5 UFC/ml). O controle negativo foi realizado nas mesmas condições sem adição de antibiótico. As placas foram incubadas na temperatura ótima de crescimento por 24h. Os resultados foram obtidos por inspeção visual. Onde ao houve turvamento do poço foi considerado MIC.

Nas concentrações onde não houve turvação, foram retirados 2 µl e inoculado em ágar LB para visualização de crescimento. MBC foi determinado como sendo a concentração que não apresentou crescimento da bactéria. Os resultados foram expressos em µg/ml e todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.7.2. Sensibilidade das bactérias aos compostos fenólicos e canamicina

A sinergia entre os compostos fenólicos selecionados e o antibiótico canamicina foi avaliada pelo método "*Checkboard*" descrito por Sanhueza *et al.* (2017) para *S. marcescens* MG1, *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36 e *S.* Montevideo. Resumidamente, foram preparadas 3 diluições em série, em duplicata, de composto fenólico e 8 diluições em série do antibiótico canamicina. Em uma placa de 96 poços, 90 µl de caldo LB suplementado com diferentes concentrações de composto fenólico nas linhas e diferentes concentrações de antibiótico nas colunas. As últimas linhas horizontais e verticais foram deixadas com apenas um agente e as linhas a seguir continham uma quantidade fixa de um agente e concentrações crescentes do segundo agente. Na seleção da faixa de concentrações, foram consideradas as MICs obtidas para cada agente testado e bactérias testadas. As concentrações de resveratrol utilizadas variaram de 25 a 100 µM, as de curcumina variaram de 1,5 a 50 µM e para canamicina de 4 a 512 µg/ml. Para cada poço, adicionaram-se 10 µl de suspensão bacteriana ajustada conforme a escala de McFarland 0,5 (10^5 UFC/ml). As placas foram incubadas por 24 h na temperatura ótima de crescimento e medidas a 595 nm em leitor de placa (Thermos Labsystems Multiskan FC Model), medindo o crescimento a cada 2h por 24h. Todos os testes foram realizados em triplicata em três repetições diferentes. Os resultados foram expressos por curvas de crescimento e MIC visual.

3.8. Sensibilidade térmica de bactérias tratadas com compostos fenólicos

O efeito da inibição por compostos fenólicos sobre a sensibilidade térmica de *S. marcescens* MG1, *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36 e *S.* Montevideo foi avaliado conforme descrito por Maté *et al.* (2016), com modificações. As estirpes foram cultivadas "*overnight"* na temperatura ótima de crescimento (**Tabela 2**) em caldo LB. Em tubos de vidro foram adicionados 2,7 ml de caldo LB estéril, suplementado com os compostos fenólicos selecionados em concentrações sub-MIC, onde não houve inibição do crescimento da bactéria. Os tubos foram colocados em banho aquecido até atingir a temperatura pré-determinada (50° C e/ou 60° C). Uma vez que a temperatura atingida a estabilidade do meio de aquecimento (± 0,05° C), foram inoculados 0,3 ml de cultura celular (aprox. 10^8 UFC/ml). Em intervalos pré-ajustados de 30 min, amostras de 0,1 ml foram coletadas em tubos de ensaio e realizadas diluição seriada em solução salina 0,9% (p/v). As células sobreviventes foram enumeradas em placas de Petri contendo LB ágar, após incubação de 12h/30°C ou 37°C. Os resultados foram expressos em curvas de sobrevivência. Cada tratamento foi realizado em triplicata.

3.9. Análise estatística

Os dados foram avaliados pelo programa GraphPad Prism® 8 através de 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.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção dos compostos fenólicos por ancoragem molecular

A ancoragem molecular para seleção dos compostos fenólicos foi realizada com 79 compostos pré-selecionados, a partir de dados da literatura (**Tabela 1 - Anexo**), e seis variantes estruturais do ativador transcricional do *quorum sensing* CviR de *C. violaceum* (3QP1, 3QP2, 3QP4, 3QP5, 3QP6 e 3QP8 – obtidos do PDB- www.rcsb.org) para auxiliar na escolha dos compostos com maior probabilidade de inibição do QS (**Tabela 3** e **4**). Também foi avaliada a afinidade de acil homoserinas lactonas (AHL) com diferentes tamanhos de cadeia e furanonas como controles. A partir dos resultados da ancoragem molecular, além do custo e disponibilidade comercial, cinco compostos foram selecionados para estudos *in vitro*: curcumina (PubChem CID: 969516), capsaicina (PubChem CID: 1548943), resveratrol (PubChem CID: 445154) e floridzina (PubChem CID: 4789), composto glicosilado do floretina (PubChem CID: 4788). Estes compostos ancoraram com boa afinidade a pelo menos quatro das seis variantes estruturais de CviR avaliadas (**Tabela 3 e 4**). Além disso, também foi selecionado ácido gálico (PubChem CID: 370) já disponível no laboratório.

Tabela 3: Ancoragem molecular dos dez compostos fenólicos pré-selecionados, homoserina lactonas e furanonas com maior afinidade e as estruturas proteicas de CviR de *C. violaceum* (Parte 1 - 3QP1, 3QP2, 3QP4).

Molecula	Classificação	Pubchem CID	3QP1					3QP2					3QP4				
			Binding residue	Hydrogen bond score	Steric interaction score	Score	Rank	Binding residue	Hydrogen bond score	Steric interaction score	Score	Rank	Binding residue	Hydrogen bond score	Steric interaction score	Score	Rank
N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone	**AHL**	**3246941**	**Y80, W84, Y88, D97, S155**	**-10,00**	**-77,53**	**-83,91**	**1**	**Y80, W84, Y88, D97, S155**	**-10,00**	**-77,26**	**-82,53**	**3**	**Y80, W84, Y88, D97, S155**	**-9,87**	**-79,46**	**-85,61**	**1**
N-(3-hydroxydodecanoyl)-DL-homoserine lactone	AHL	11507677	Y80, W84, Y88, D97, S155	-10,00	-78,69	-82,29	2	Y80, W84, D97, S155	-9,49	-78,24	-83,73	1	Y80, W84, D97, S155	-10	-79,94	-84,55	3
N-dodecanoyl-DL-homoserine lactone	AHL	11565426	Y80, W84, D97, S155	-8,00	-78,52	-81,99	3	Y80, W84, D97, S155	-8,00	-79,34	-82,61	2	Y80, W84, D97, S155	-8	-81,3	-85,43	2
Demethoxycurcumin	Polifenol	5469424	M135	-1,00	-82,22	-80,73	4	M135	-1,3	-82,05	-80,76	4	M135	-0,52	-82,36	-80,79	7
Bisdemethoxycurcumin	Polifenol	5315472	M135	-1,59	-79,65	-79,25	5	M135	-1,73	-78,99	-78,92	5	M135	-0,68	-81,26	-80,49	8
N-(3-hydroxydecanoyl)-DL-homoserine lactone	AHL	71353010	Y80, W84, D97, S155	-10,00	-72,18	-79,00	6	Y80, W84, Y88, D97, S155	-10,00	-73,92	-78,08	7	Y80, W84, Y88, D97, S155	-8,8	-76,31	-81,61	4
N-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone	AHL	10221060	Y80, W84, Y88, D97, S155	-9,86	-71,88	-77,80	7	Y80, W84, D97, S155	-8,00	-73,49	-78,50	6	Y80, W84, D97, S155	-8	-75,77	-80,87	6
N-decanoyl-DL-homoserine lactone	AHL	11644562	Y80, W84, D97, S155	-8,00	-74,05	-77,43	8	Y80, W84, D97, S155	-8,00	-73,11	-77,77	8	Y80, W84, D97, S155	-8	-75,71	-81,4	5
N-(3-oxooctanoyl)-L-homoserine lactone	AHL	127293	Y80, W84, Y88, D97, S155	-10,00	-67,36	-74,29	9	Y80, W84, Y88, D97, S155	-10,00	-66,65	-73,09	11	Y80, W84, Y88, D97, S155	-10	-67,2	-73,81	12
4-bromo-5-(bromomethylene)-3-dodecyl-2(5H)-furanone	**Antagonista**	**10180544**	**W84**	**-4,00**	**-73,35**	**-73,68**	**10**	**S155**	**-2**	**-74,01**	**-73,76**	**10**	**S155**	**-2**	**-76,83**	**-77,4**	**10**

N-octanoyl-DL-homoserine lactone	AHL	3474204	Y80, W84, D97, S155	-8,00	-66,75	-73,26	11	Y80, W84, S155	-8,00	-66,11	-72,47	12	Y80, S155	-8	-66,43	-73,19	13
Dihydrocapsaicin	Biflavonoide	107982	Y88	-4,00	-72,21	-71,64	12	W84, Y88	-6,00	-70,39	-72,38	13	Y80, W84, S155	-5,74	-70,41	-72,62	15
Matairesinol	Lignana	119205	W84, Y88, D97	-5,11	-69,79	-70,49	13	W84,Y88, D97	-5,35	-74,63	-76,76	9	W84, Y88, D97	-4,48	-76,65	-77,9	9
Capsaicin	**Polifenol**	**1548943**	**W84, Y88**	**-4,00**	**-71,98**	**-70,39**	**14**	**Y88, N92**	**-1,71**	**-73,06**	**-70,65**	**15**	**W84, Y88**	**-4**	**-72,4**	**-71,74**	**16**
Curcumin	**Polifenol**	**969516**	**N92**	**-4,00**	**-66,89**	**-66,93**	**17**	**W84**	**-2,18**	**-74,33**	**-71,54**	**14**	**N92**	**-0,83**	**-76,01**	**-73,12**	**14**
N-(3-hydroxyhexanoyl)-DL-homoserine lactone	AHL	70185030	Y80, W84, Y88, D97, S155	-9,84	-58,56	-66,60	18	Y80, W84, Y88, D97, S155	-10,00	-57,65	-65,71	24	Y80, W84, Y88, S155	-9,63	-58,67	-66,49	28
N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone	AHL	688505	Y80, W84, Y88, D97, S155	-10,00	-59,19	-66,57	19	Y80, W84, Y88, D97, S155	-9,43	-57,93	-64,58	31	Y80, W84, Y88, D97, S155	-9,73	-59,1	-66,22	31
N-(3-hydroxyoctanoyl)-DL-homoserine lactone	AHL	11586792	W84, Y88, D97	-9,80	-59,10	-65,65	21	Y80, Y88, S155	-7,72	-60,94	-66,46	22	Y80, Y88, S155	-8	-60,52	-66,47	29
Secoisolariciresinol	Lignana	65373	W84, D97	-3,16	-66,44	-64,93	23	W84	-2	-73,98	-70,05	16	Y88, D97	-4	-73,91	-69,96	18
N-hexanoyl-DL-homoserine lactone	AHL	3462373	Y80, W84, D97, S155	-8,00	-58,09	-64,90	24	Y80, W84, D97, S155	-8,00	-57,33	-63,91	33	Y80, W84, D97, S155	-8	-57,94	-64,77	32
Phloretin	**Flavonoide**	**4788**	**Y88, M135**	**-3,81**	**-67,71**	**-64,84**	**25**	**M135**	**-2**	**-69,74**	**-65,66**	**25**	**Y88, M135**	**-4**	**-68,96**	**-66,4**	**30**
Mangostin	Xantona	5281650	Y80, S155	-3,84	-57,02	-57,70	37	Y80, S155	-4	-66,88	-67,34	18	Y80, S155	-3,94	-67,28	-67,79	23
Naringenin	Flavonoide	42607905	L85	-2,00	-45,48	-43,34	61	Y80, Y88, D97, S155	-8,61	-53,93	-60,85	39	L85, M135	-1,27	-67,77	-67,84	22

Os compostos selecionados estão em negrito.

Tabela 4: Ancoragem molecular dos dez compostos fenólicos pré-selecionados, homoserina lactonas e furanonas com maior afinidade e as estruturas proteicas de CviR de *C. violaceum* (Parte 2 - 3QP5, 3QP6, 3QP8).

Molécula	Classificação	Pubchem CID	3QP5					3QP6					3QP8				
			Binding residue	Hydrogen bond score	Steric interaction score	Score	Rank	Binding residue	Hydrogen bond score	Steric interaction score	Score	Rank	Binding residue	Hydrogen bond score	Steric interaction score	Score	Rank
N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone	**AHL**	**3246941**	**W84, D97, S155**	**-5,99**	**-73,9**	**-75,2**	**7**	**Y80,W84, Y88, D97, S155**	**-10**	**-83,75**	**-89,6**	**1**	**Y80, W84, D97, S155**	**-8**	**-81,38**	**-85,6**	**3**
N-(3-hydroxydodecanoyl)-DL-homoserine lactone	AHL	11507677	W84, Y88, D97, S155	-10	-70,01	-75,4	6	Y80, W84, Y88, D97, S155	-10	-83,25	-88,97	2	Y80, W84, S155	-10	-79,99	-86,2	2
N-dodecanoyl-DL-homoserine lactone	AHL	11565426	W84, D97, S155	-6	-71,8	-72,03	11	Y80, W84, D97, S155	-8	-82,31	-87,18	3	Y80, W84, S155	-7,53	-81,67	-86,87	1
Demethoxycurcumin	Polifenol	5469424	L85, M135	-3,41	-69,13	-71,17	15	S89, M135	-4	-87,95	-85,33	4	S89, M135	-7,62	-77,15	-81,58	5
Bisdemethoxycurcumin	Polifenol	5315472	L85, M135	-3,53	-68,36	-71,33	14	Y88, M135	-3,27	-83,58	-83,36	7	Y80, M135, S155	-6	-78,12	-81,99	4
N-(3-hydroxydecanoyl)-DL-homoserine lactone	AHL	71353010	W84, Y88, D97, S155	-8,63	-63,32	-68,93	21	Y80, W84, Y88, D97, S155	-10	-77,17	-85,11	5	Y80, W84, Y88, D97, S155	-9,85	-74,01	-81,54	6
N-(3-oxodecanoyl)-L-homoserine lactone	AHL	10221060	W84, D97, S155	-5,96	-67,54	-70,1	18	Y80, W84, Y88, D97, S155	-10	-77,23	-83,99	6	Y80, W84, Y88, D97, S155	-9,96	-74,07	-80,88	8
N-decanoyl-DL-homoserine lactone	AHL	11644562	W84, D97, S155	-6	-66,79	-69,89	19	Y80, W84, D97, S155	-8	-77	-82,21	8	Y80, W84, S155	-8	-75,61	-81,28	7
N-(3-oxooctanoyl)-L-homoserine lactone	AHL	127293	W84, Y88, D97, S155	-8	-60,09	-65,42	25	Y80, W84, Y88, D97, S155	-10	-68,58	-75,47	11	Y80, W84, Y88, D97, S155	-9,96	-66,93	-74,21	12
4-bromo-5-(bromomethylene)-3-dodecyl-2(5H)-furanone	**Antagonista**	**10180544**	**-**	**0**	**-80,21**	**-75,52**	**5**	**S155**	**-2**	**-77,57**	**-76,86**	**9**	**S155**	**-2**	**-74,37**	**-72,78**	**17**
N-octanoyl-DL-homoserine lactone	AHL	3474204	W84, D97, S155	-6	-59,8	-63,52	27	Y80, W84, S155	-8	-68,38	-75,11	13	Y80, W84, S155	-7,77	-68,25	-73,55	15
Dihydrocapsaicin	Polifenol	107982	Y88	0	-74,53	-70,5	17	S89	-1,95	-76,76	-75,42	12	S89	-0,75	-72,46	-69,51	16
Matairesinol	Lignana	119205	N92,	-3,08	-77,44	-	3	W84, Y88,	-5,02	-70,45	-72,2	15	W84, Y88,	-5,56	-71,52	-	14

			M89			77,27		D97					D97			73,76	
Capsaicin	**Polifenol**	**1548943**	**W84**	**-2**	**-73,36**	**-70,62**	**16**	**S89**	**-1,89**	**-77,38**	**-76,67**	**10**	**S89**	**-1,68**	**-76,08**	**-73,8**	**13**
Curcumin	**Polifenol**	**969516**	**N92**	**-4**	**-72,51**	**-73,05**	**8**	**N92**	**-2**	**-78,26**	**-73,37**	**14**	**W84**	**-3,54**	**-77,12**	**-75,82**	**11**
N-(3-hydroxyhexanoyl)-DL-homoserine lactone	AHL	70185030	W84, S155	-6	-54,28	-58,11	43	Y80, W84, Y88, D97, S155	-9,95	-60,56	-69,15	18	Y80, W84, Y88, S155	-9,96	-60,42	-69,01	23
N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone	AHL	688505	W84, Y88, D97, S155	-7,98	-53,55	-58,97	40	Y80, W84, Y88, D97, S155	-10	-60,08	-67,4	20	Y80, W84, Y88, D97, S155	-10	-59,6	-66,67	25
N-(3-hydroxyoctanoyl)-DL-homoserine lactone	AHL	11586792	Y80, Y88, D97	-5,32	-57,67	-60,9	34	Y88, Y80, S155	-7,73	-63,05	-68,87	19	Y80, Y88, S155	-7,18	-64,22	-69,18	22
Secoisolariciresinol	Lignana	65373	Y80, W84, S155	-7,08	-61,61	-65,55	24	S89	-3,78	-76,39	-70,2	16	D97	-2	-70,84	-69,9	21
N-hexanoyl-DL-homoserine lactone	AHL	3462373	W84, S155	-5,87	-53,6	-57,53	44	W84, Y80, D97, S155	-8	-60,47	-66,92	21	Y80, W84, S155	-7,87	-60,43	-66,69	24
Phloretin	**Flavonoide**	**4788**	**W84, Y88, D98, M135**	**-8**	**-62,54**	**-63,1**	**28**	**Y80, W84, M135, S155**	**-7,59**	**-70,51**	**-70,19**	**17**	**M135**	**-1,36**	**-70,07**	**-65,29**	**27**
Mangostin	Xantona	5281650	W84,Y88	-2,44	-82,17	-79,29	1	Y80, S155	-5,51	-63,46	-64,39	23	Y80, S155	-4	-65,14	-65,72	26
Naringenin	Flavonoide	42607905	Y80, Y88, D97, S155	-12,19	-61,51	-71,69	12	L85, S89, M135, S155	-9,77	-51,62	-59,65	34	M135	-0,68	-67	-64,89	28

Os compostos selecionados estão em negrito.

A **Figura 2** exemplifica como essas interações ocorrem *in silico*, onde os compostos selecionados interagem com a proteína 3QP1, além dos controles 3-oxo-C12-HSL (PubChem CID: 3246941) e Furanona C30 (PubChem CID: 10180544). A 3-oxo-C12-HSL apresentou menor *GScore* para as estruturas 3QP1 (-83,91), 3QP4 (-85,61) e 3QP6 (-89,6), o que significa uma maior capacidade de interação. Nas demais estruturas, esta AHL ficou entre os três melhores GScores, com exceção da estrutura 3QP5, onde ficou classificada em sétimo lugar com *GScore* de -75,2. Os compostos fenólicos capsaicina, curcumina e floretina tiveram maior *GScore* que a 3-oxo-C12-HSL, ou seja, apresentando menor afinidade. Entretanto, no geral, apresentaram boa afinidade nas seis estruturas avaliadas. Já o resveratrol apresentou boa afinidade em quatro estruturas (3QP1, 3QP2, 3QP4 e 3QP6). Os fitoquímicos como os compostos fenólicos, podem possuir analogia estrutural com as AHLs, gerando competição com as moléculas sinalizadoras para se ligarem aos receptores do QS (Aswathanarayan e Vittal, 2018) indicando interações positivas com as estruturas de proteína CviR, homóloga de LuxR.

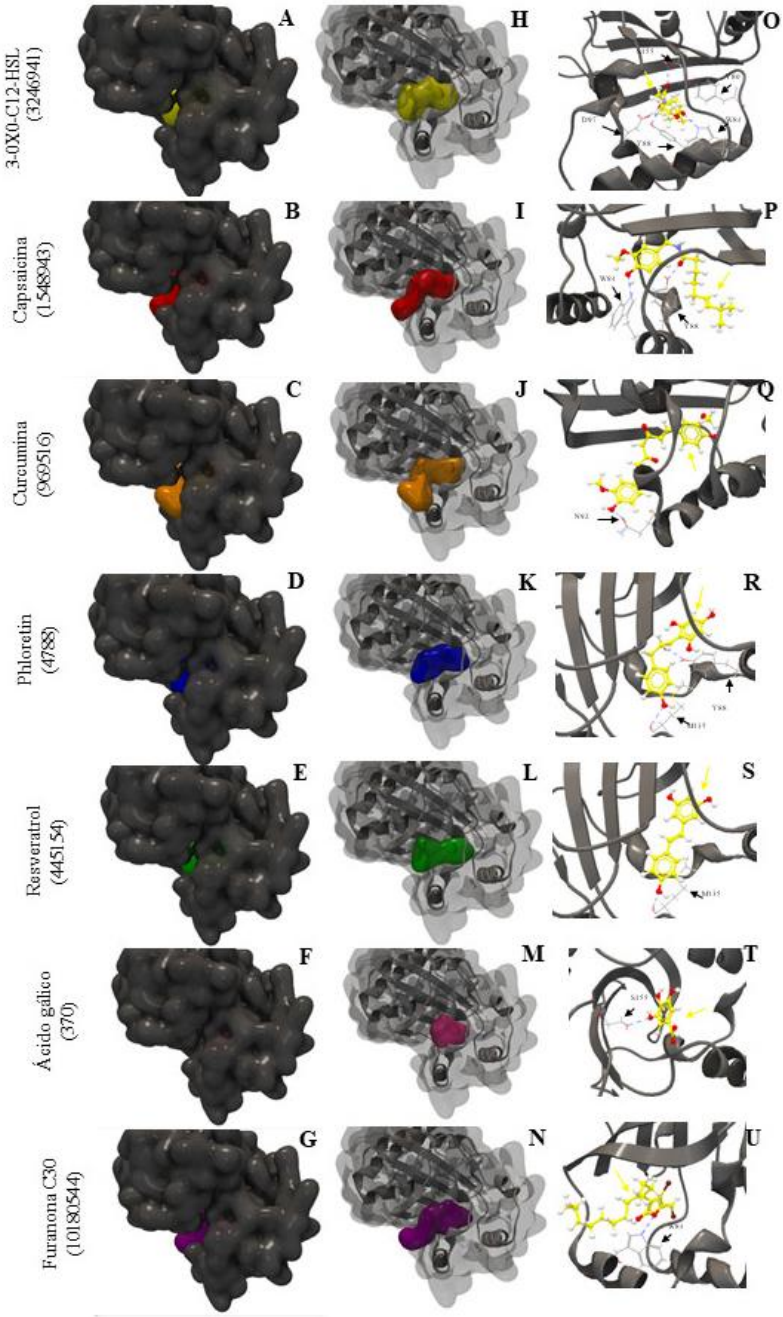

Figura 2: Ancoragem molecular da estrutura 3QP1 da proteína CviR de *C. violaceum* com 3-oxo-C12-HSL, capsaicina, curcumina, floretina, resveratrol, ácido gálico e furanona C30. Representação de superfície (A-G) da estrutura 3QP1 da proteína CviR de *C. violaceum*, representações de superfície e esqueleto (H-N) e representação de esqueleto (O-U) com ligação de hidrogênio entre os resíduos de aminoácidos e os compostos fenólicos selecionados. Representação da superfície cinza – proteína CviR; representação de superfície amarela – 3-oxo-C12-HSL; representação de superfície vermelha – capsaicina; representação de superfície laranja – curcumina; representação de superfície azul – floretina; representação de superfície verde – resveratrol; representação de superfície rosa – ácido gálico; representação de superfície violeta – furanona C30; seta preta indica o sítio de ligação; seta amarela indica os compostos; linha tracejada azul indica ligação de hidrogênio.

4.2. Concentração inibitória mínima (MIC) e curvas de crescimento

A partir dos compostos selecionados do teste *in silico*, foram avaliados a concentração inibitória mínima (MIC do inglês *Minimal Inhibitory Concentration*) e o efeito na inibição do crescimento microbiano dos mesmos frente aos micro-organismos *C. violaceum* ATCC 12472, *C. violaceum* 026, *S. marcescens* MG1, *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36 e *S.* Montevideo, apresentados na **Tabela 5**. Também são mostrados os efeitos dos compostos selecionados sobre o crescimento microbiano de todas as bactérias avaliadas durante 12 h, através das curvas de crescimento (**Figuras 3, 4, 5, 6** e **7).** Pode-se observar que apenas o ácido gálico apresentou MIC de 9,4 mM sobre *C. violaceum* ATCC 12472 e 026. Porém, os demais compostos apresentaram MIC superior à maior concentração testada para todos os micro-organismos avaliados. Concentrações ainda maiores não foram testadas devido a problemas de solubilidade dos compostos nos meios utilizados. Os compostos fenólicos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, Brasil), de forma que a concentração final não ultrapassasse 1% nos testes, uma vez que o próprio solvente poderia interferir na multiplicação microbiana. Os controles negativos também foram adicionados de DMSO na mesma concentração dos testes com compostos fenólicos.

Tabela 5: Concentração inibitória mínima dos compostos selecionados *in silico.*

Micro-organismo	**MIC (mM)**				
	Curcumina	**Capsaicina**	**Floridzina**	**Resveratrol**	**Ácido gálico**
A. hydrophila IOC/FDA 110-36	>0,1	>1,0	>0,9	>0,1	>9,4
C. violaceum ATCC12472	>0,1	>1,0	>0,9	>0,1	9,4
C. violaceum O26	>0,1	>1,0	>0,9	>0,1	9,4
S. Montevideo	>0,1	>1,0	>0,9	>0,1	>9,4
S. marcescens MG1	>0,1	>1,0	>0,9	>0,1	>9,4

A partir das **Figuras 3** e **4,** pode-se observar que apenas o ácido gálico, na concentração de 9,4 mM, apresentou total inibição sobre a multiplicação de *C. violaceum* ATCC 12472 e 026, sendo esta a MIC desse composto. Os demais compostos não apresentaram MIC nas concentrações testadas, porém a cinética de crescimento da bactéria foi afetada negativamente, principalmente para resveratrol, capsaicina e curcumina, indicando inibição parcial em relação ao controle (sem adição de composto). Assim, nas demais triagens para determinação da atividade

anti-QS foram utilizadas concentrações que não afetam a multiplicação da bactéria, para evitar potenciais efeitos tóxicos dos compostos selecionados.

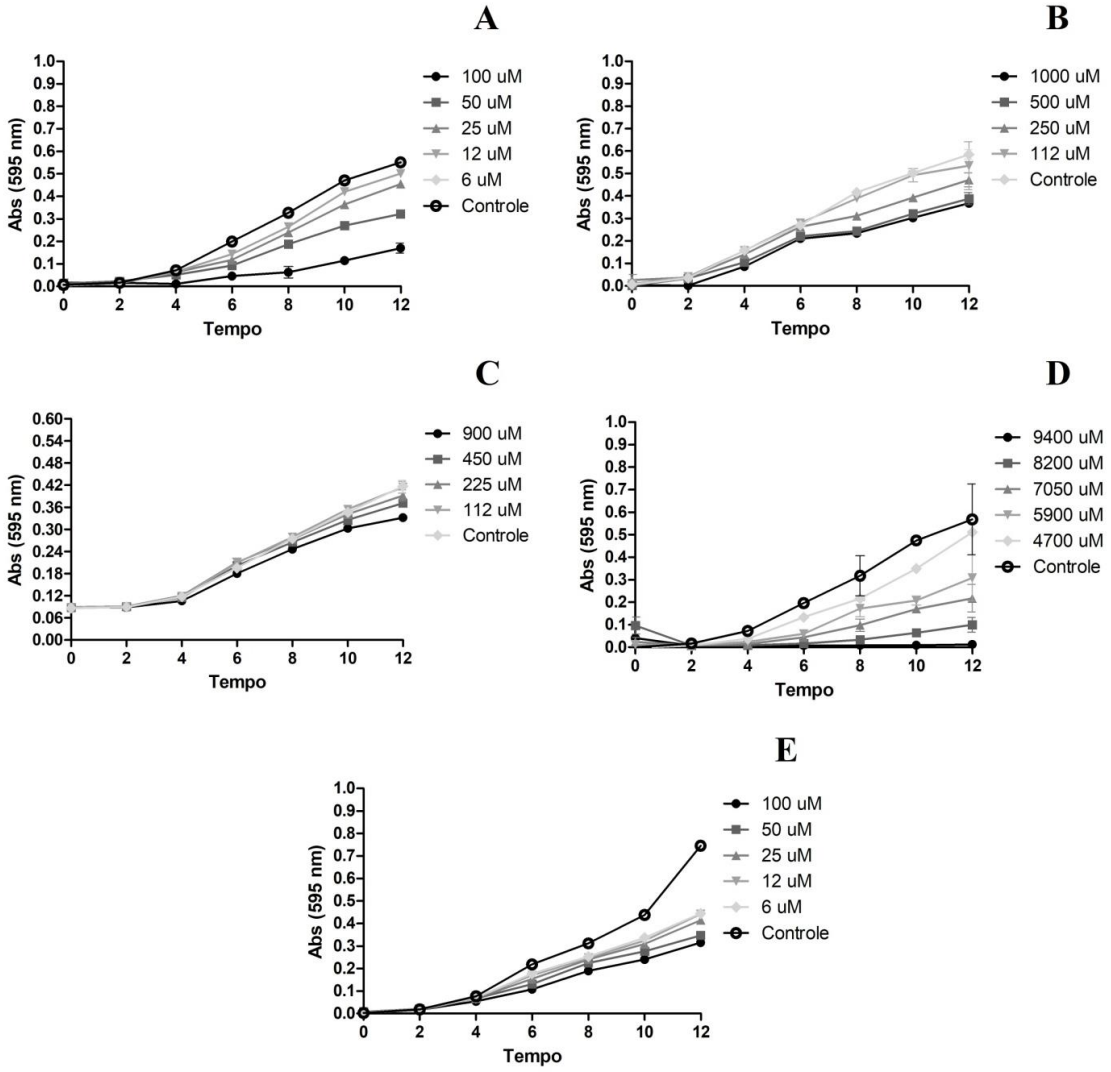

Figura 3: Curvas de crescimento para *C. violaceum* ATCC12472 durante 12h de incubação a 30°C em diferentes concentrações dos compostos. Controle= LB mais DMSO 1%; (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) floridzina; (D) ácido gálico; (E) resveratrol.

Bali *et al.* (2019) avaliaram a concentração inibitória mínima de curcumina e ácido gálico em *C. violaceum* ATCC 12472 e observaram valores de MIC do ácido gálico >1500 µg/ml, equivalente a >8,8 mM, e 1500 µg/ml para curcumina, equivalente a 4,1 mM. Seus resultados corroboram o presente estudo. Os ácidos fenólicos podem afetar as propriedades físico-químicas da superfície celular bacteriana, principalmente a hidrofobicidade. Também podem alterar os receptores de elétrons, componentes polares e não polares das bactérias (Borges *et al.*, 2013). Packiavathy *et al.* (2014) avaliando atividade anti-QS de curcumina, encontrou MIC de 384

µg/ml, equivalente a 1,04 mM, para *C. violaceum* 026, valor maior ao testado no presente estudo, indicando o potencial antimicrobiano de maneira dependente da concentração.

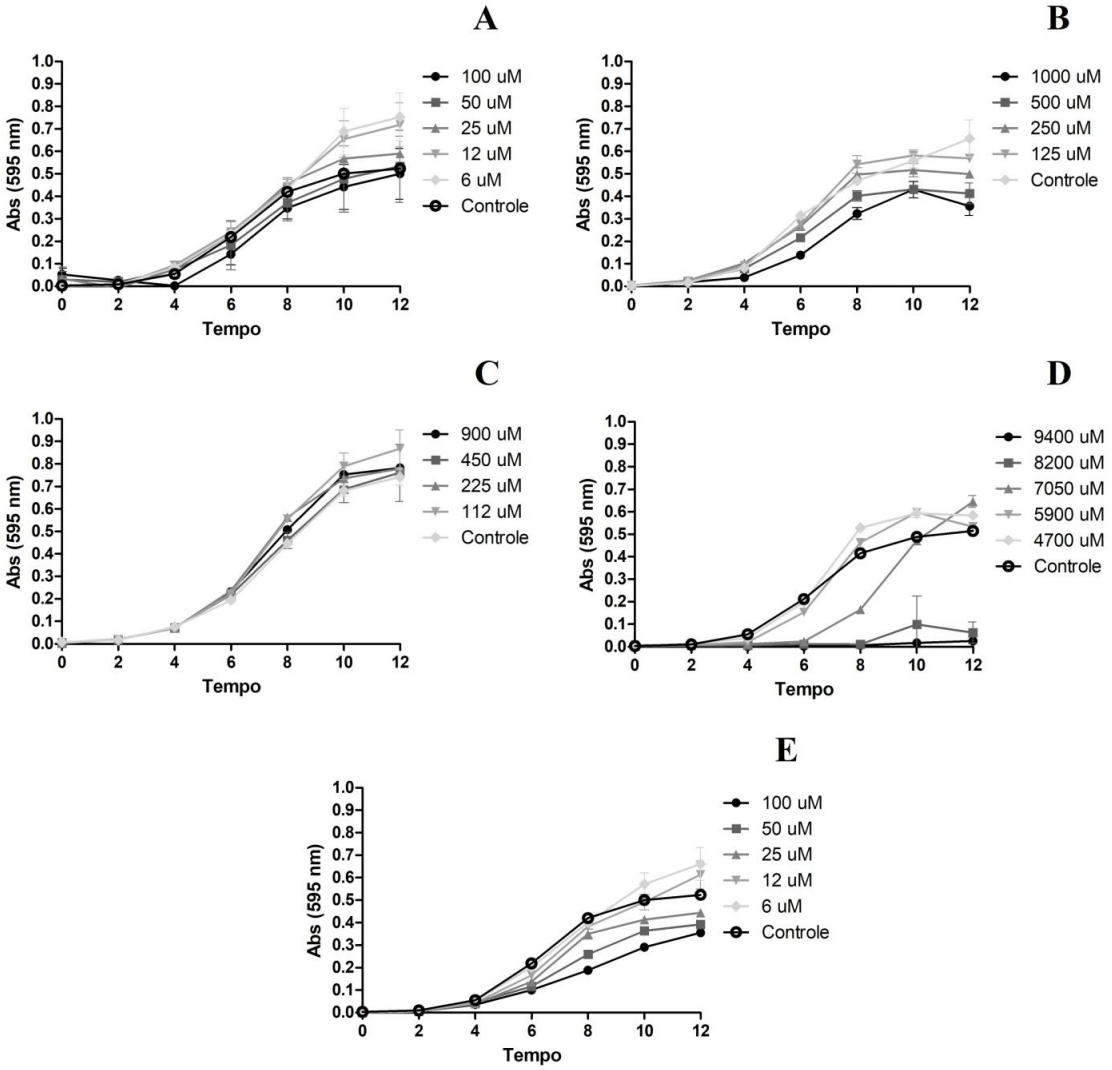

Figura 4: Curvas de crescimento para *C. violaceum* 026 durante 12h de incubação a 30°C em diferentes concentrações do composto. Controle= LB mais DMSO 1%; (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) floridzina; (D) ácido gálico; (E) resveratrol.

Rivera *et al.* (2019) estudaram componentes do extrato de pimenta *Capsicum frutescens* e verificaram que a capsaicina na concentração de 100 µg/ml, equivalente a 0,34 mM, inibiu parcialmente o crescimento da *C. violaceum* ATCC 12472 e 026, resultados similares ao encontrado no presente estudo. De acordo com Silva *et al.* (2018), os compostos fenólicos possuem efeitos antimicrobianos, podendo causar danos estruturais ou funcionais à membrana celular da bactéria.

A floridzina apresentou menor atividade antimicrobiana nas concentrações e micro-organismos testados (**Figuras 3C, 4C, 5C, 6C, 7C**) em comparação com os outros compostos. Barreca *et al.* (2014) avaliando a atividade antimicrobiana de floridzina e floretina, sua forma aglicona, frente a diversas bactérias Gram positivas e Gram negativas, observaram que a adição de glicose na estrutura básica da chalcona provoca uma redução da atividade antimicrobiana. Além disso, observaram também que a floretina é particularmente ativa contra bactérias Gram positivas. Assim, justifica-se a pouca atividade frente aos micro-organismos testados em nosso estudo, onde são todos Gram negativos. Interessantemente, Quecán *et al.* (2019) também observaram que a glicosilação da quercetina reduz o efeito antimicrobiano e anti-QS da molécula.

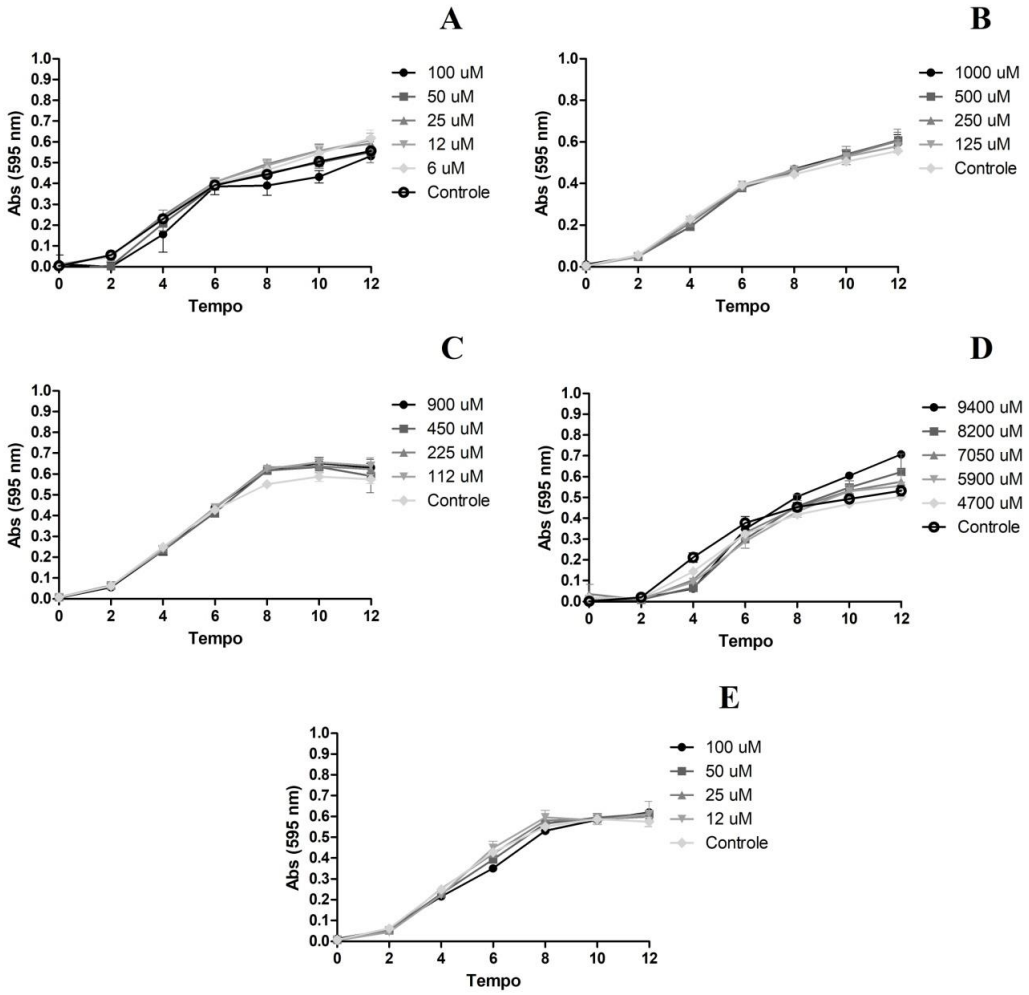

Figura 5: Curvas de crescimento para *S. marcescens* MG1 durante 12h de incubação a 30°C em diferentes concentrações do composto. Controle= LB mais DMSO 1%; (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) floridzina; (D) ácido gálico; (E) resveratrol.

A **Figura 5** apresenta as curvas de crescimento *S. marcescens* MG1 frente aos compostos selecionados. Pode-se observar que não houve inibição em nenhuma das concentrações avaliadas

para todos compostos. O ácido gálico chegou a induzir levemente o crescimento de *S. marcescens* MG1, mesmo na maior concentração testada. Em comparação com a *C. violaceum* ATCC 12472 e 026, onde a MIC foi 9,4, percebe-se o diferente comportamento e sensibilidade dos micro-organismos. Rivera *et al.* (2019) também avaliaram a MIC de capsaicina frente a *S. marcescens* MG1 e observaram que a maior concentração avaliada, 100 µg/ml (0,34 mM), inibiu parcialmente o crescimento, porém nas concentrações menores percebeu-se uma indução do crescimento microbiano. Packiavathy *et al.* (2014) avaliaram a atividade QQ de curcumina e observaram a MIC de 384 µg/ml, equivalente a 1,04 mM, concentração maior que a testada no presente trabalho.

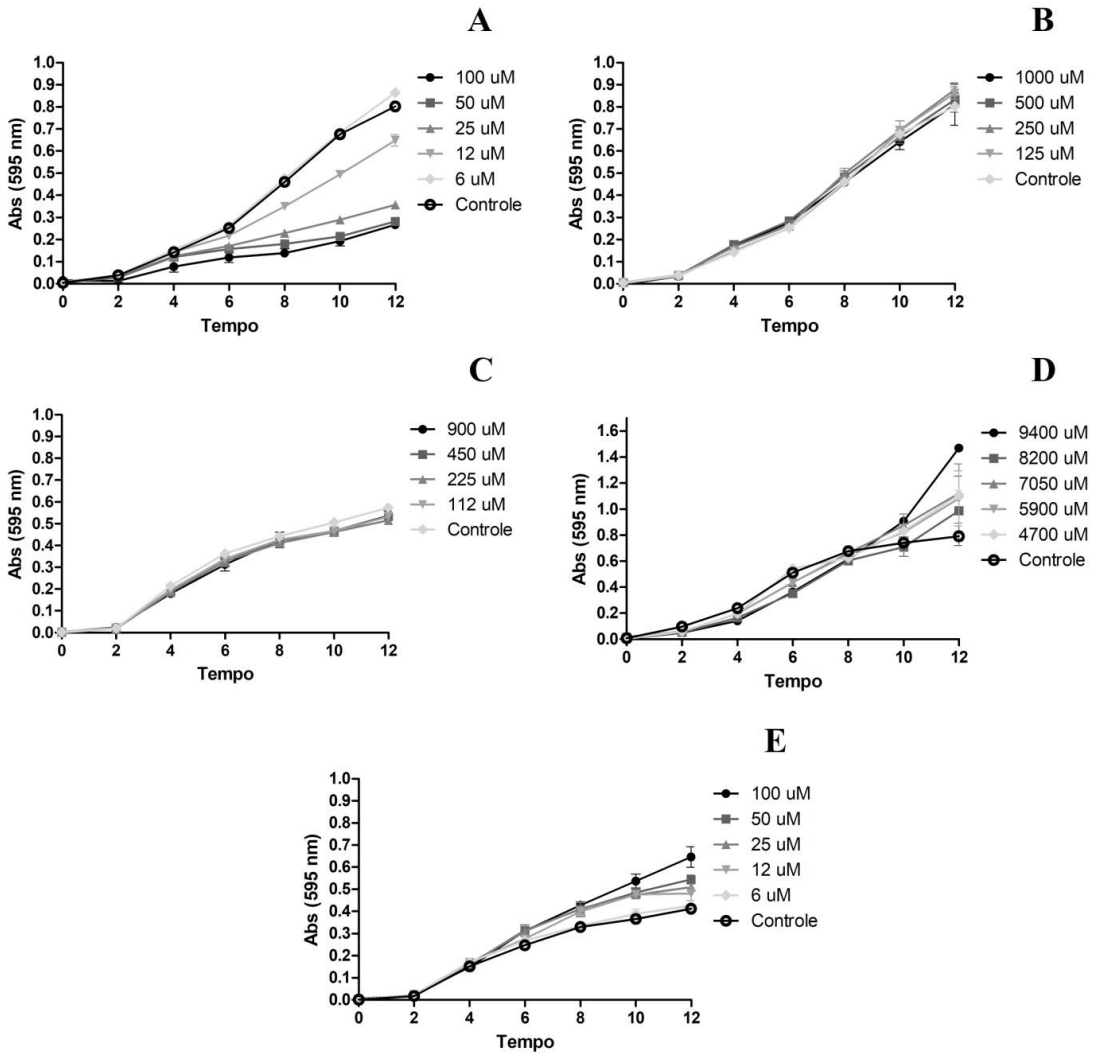

Figura 6: Curvas de crescimento para *S.* Montevideo durante 12h de incubação a 30°C em diferentes concentrações do composto. Controle= LB mais DMSO 1%; (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) floridzina; (D) ácido gálico; (E) resveratrol.

As **Figuras 6** e **7** mostram as curvas de crescimento de *S.* Montevideo, isolado de frango cru (**Tabela 2**) e *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36. Assim como observado em *S. marcescens* MG1, não houve inibição em nenhuma das concentrações avaliadas para todos os compostos. Apenas curcumina (**Figura 6A** e 7**A**) apresentou uma inibição parcial nas maiores concentrações em ambos os micro-organismos, e capsaicina (**Figura 7B**) na maior concentração, 1 mM, após 8 horas de incubação que apresentou leve inibição em *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36. Capsaicina, floridzina e ácido gálico (**Figura 6B, 6C** e **6D**), nas concentrações testadas, as curvas mostraram crescimento concomitante com o controle em *S.* Montevideo, e resveratrol (**Figura 6E** e **6E**) chegou a induzir o crescimento, indicando baixa sensibilidade desses micro-organismos frente a este composto.

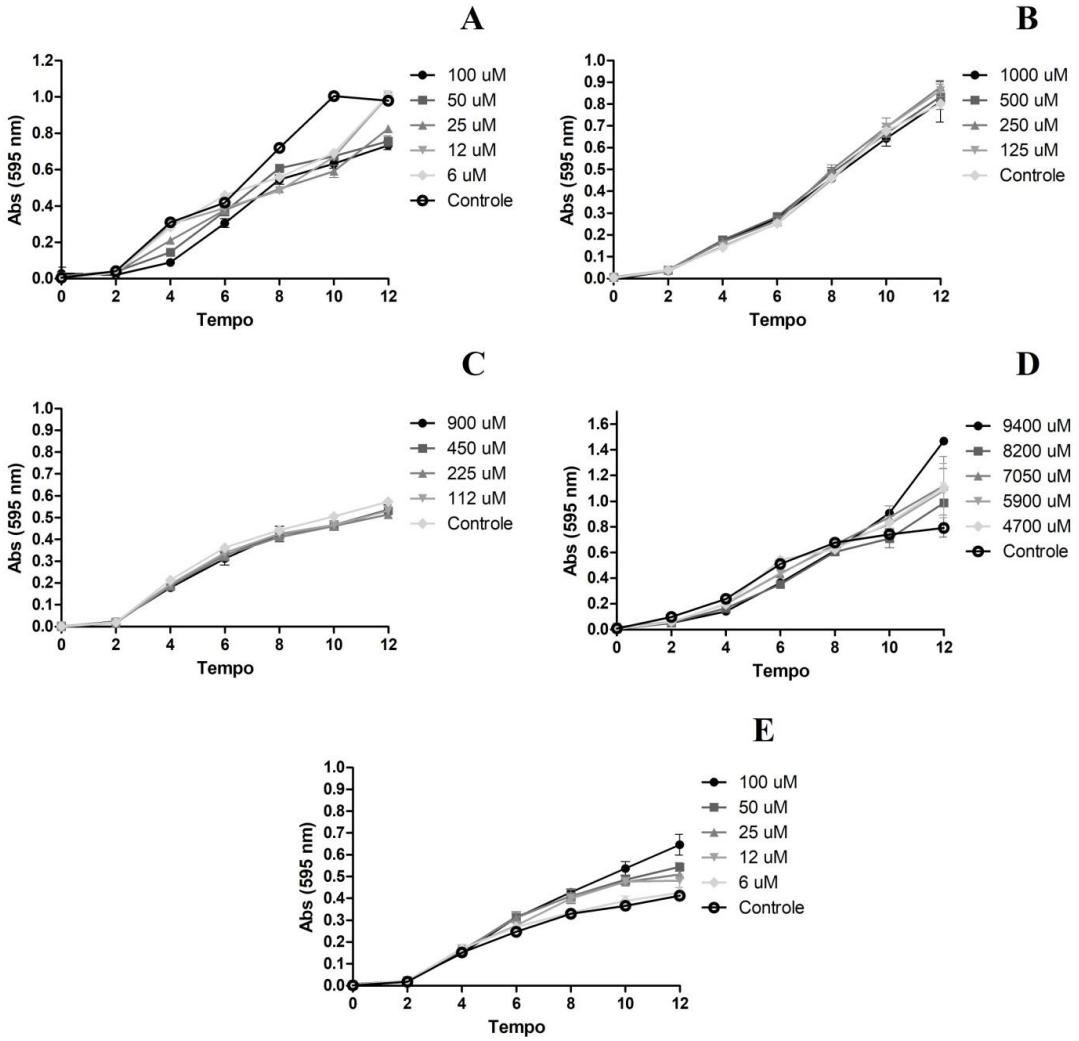

Figura 7: Curvas de crescimento para *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36 durante 12h de incubação a 30°C em diferentes concentrações do composto. Controle= LB mais DMSO 1%; (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) floridzina; (D) ácido gálico; (E) resveratrol.

4.3. Determinação da atividade anti-QS dos compostos fenólicos

4.3.1. Inibição da produção do pigmento violaceína em C. violaceum

A partir dos testes de MIC e curvas de crescimento, utilizaram-se concentrações sub-MIC, que não afetam o crescimento microbiano. A **Figura 8** apresenta o efeito dos compostos selecionados *in silico*, na inibição da produção do pigmento roxo violaceína, produzida pela *C. violaceum* ATCC 12472, fenótipo regulado pelo sistema QS através do *operon vioABCDE* (Ravichandran *et al.*, 2018). Pode-se observar que, curcumina a 12 µM, capsaicina a 70 µM chegaram a inibir 40% da produção do pigmento, e resveratrol em todas as concentrações testadas chegou a inibir 60% sem afetar o crescimento microbiano, indicando que a inibição da produção de violaceína implica na interferência do sistema QS em *C. violaceum* ATCC 12472. Ácido gálico e floridzina em todas as concentrações testadas não apresentaram inibição.

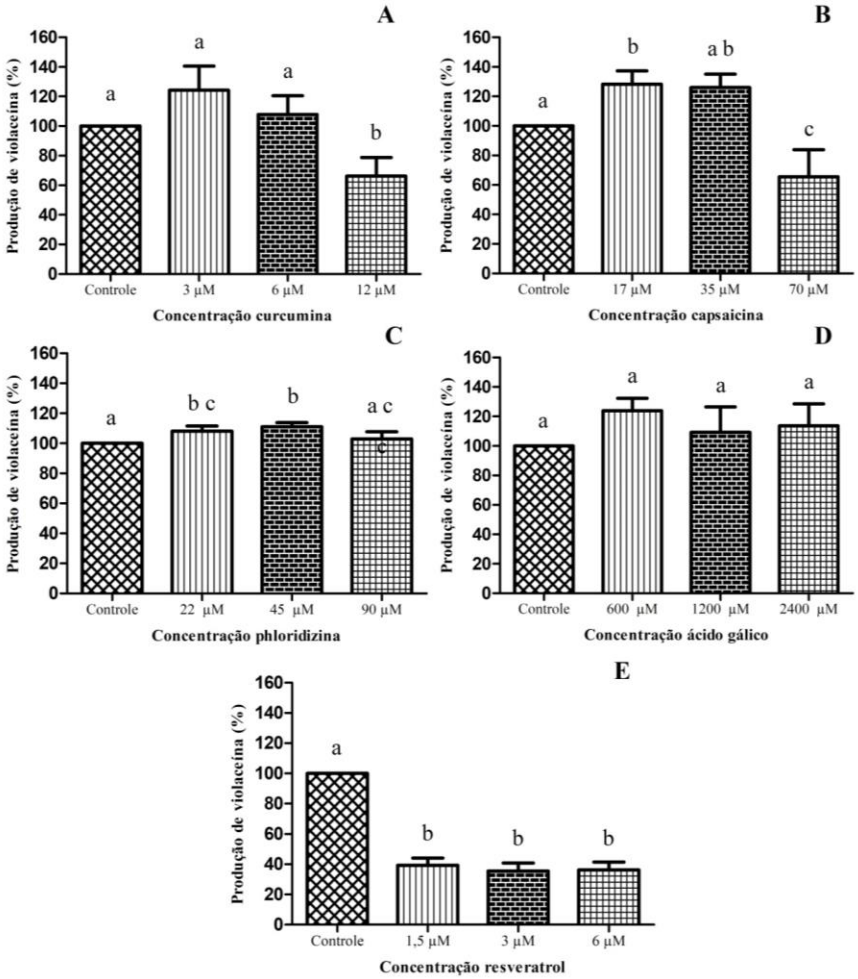

Figura 8: Efeito dos compostos selecionados sobre a produção do pigmento violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472 expressos em porcentagem de produção. (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) floridzina; (D)

ácido gálico; (E) resveratrol. Controle = produção de violaceína sem adição de composto. Médias seguidas por diferentes letras diferem estatisticamente ($p<0,05$).

Bali *et al.* (2019) também encontraram resultados positivos para curcumina em *C. violaceum* ATCC 12472, onde a inibição ocorreu de maneira dependente da concentração. Eles avaliaram concentrações maiores (2mM, 1,02 mM e 0,51 mM) às utilizadas neste estudo (0,012 mM, 0,006 mM e 0,003 mM), mostrando que em menores concentrações a curcumina pode ser considerada um poderoso inibidor do QS neste micro-organismo. Deve-se considerar também que em concentrações maiores, observamos neste estudo inibição parcial do crescimento microbiano, o que afeta de forma não específica o fenótipo avaliado. Bali *et al.* (2019) avaliaram a concentração inibitória mínima onde não havia crescimento visível da bactéria, mas não avaliaram se houve inibição parcial do crescimento, comparado ao controle. Assim a inibição da atividade QS também pode ser atribuída à inibição parcial do crescimento microbiano.

Avaliando a inibição da violaceína por capsaicina, Rivera *et al.* (2019) não encontraram resultados de inibição; porém as concentrações utilizadas por Rivera *et al.* (2019) foram menores que às utilizadas neste estudo, assim concentrações mais altas, como 70 µM, poderiam apresentar atividade anti-QS.

Duarte *et al.* (2015) também encontraram resultados positivos para o resveratrol na inibição de violaceína, corroborando o potencial deste composto. Eles sugeriram ainda que sua atividade QQ se deve à sua capacidade de mimetizar os sinais de QS e interromper a comunicação (Wang *et al.*, 2006; Duarte *et al.*, 2015). Floridzina e ácido gálico não apresentaram atividade anti-QS na inibição da violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472. Borges *et al.* (2014) e Bali *et al.* (2019) também relataram que o ácido gálico não exibia atividade QQ na estirpe biossensora *C. violaceum,* corroborando com os dados deste estudo.

A **Figura 9** apresenta o efeito dos compostos selecionados *in silico* na inibição do pigmento roxo violaceína, produzido por *C. violaceum* 026 na presença de C6-HSL. *C. violaceum* 026 é um mutante no gene *cviI,* resultando na perda da capacidade de produzir o autoindutor, enquanto mantém a capacidade de recepção pelo gene funcional *cviR* de AHLs exógenos de cadeia curta, 4 a 6 carbonos de cadeia lateral, e produz o pigmento violaceína (Zhang *et al.*, 2016).

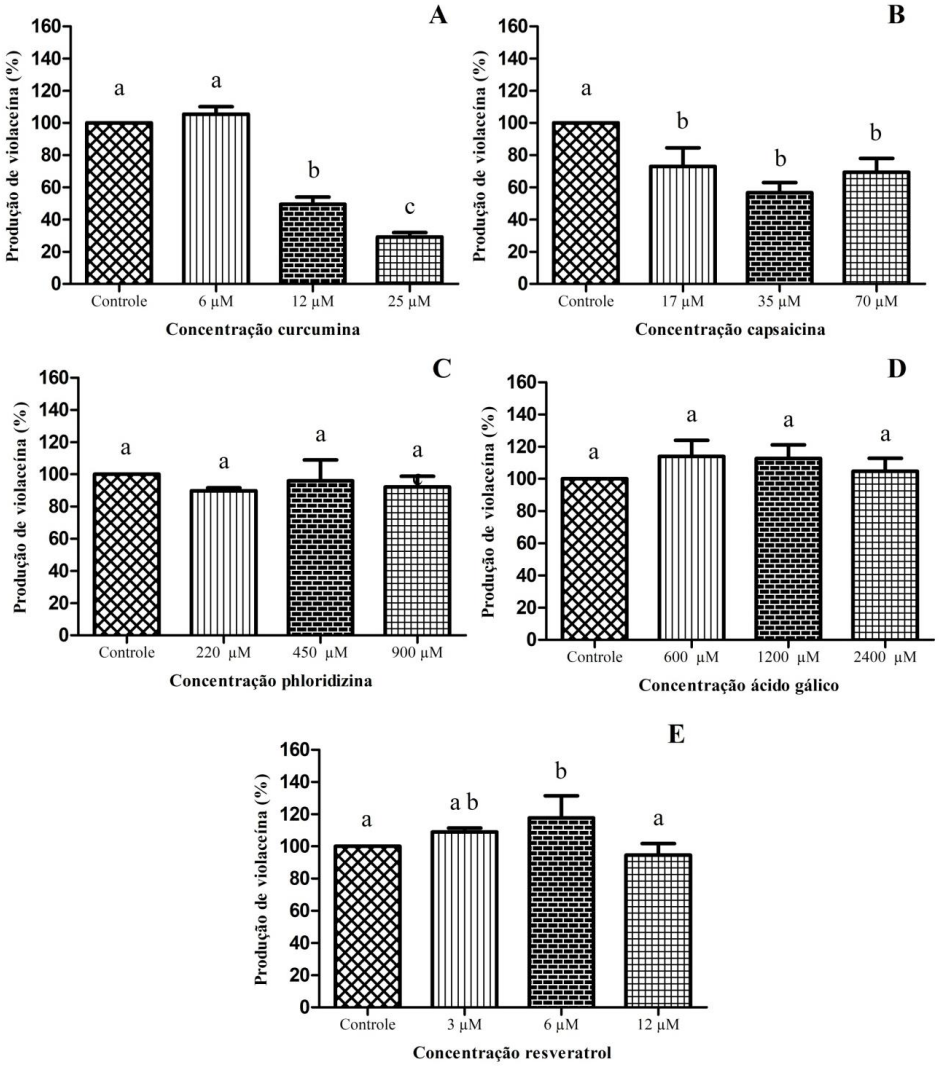

Figura 9: Efeito dos compostos selecionados sobre a produção do pigmento violaceína em *C. violaceum* 026 expressos em porcentagem de produção. (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) floridzina; (D) ácido gálico; (E) resveratrol. Controle = produção de violaceína sem adição de composto. Médias seguidas por diferentes letras diferem estatisticamente (p<0,05).

Dentre os compostos avaliados, apenas curcumina e capsaicina apresentaram inibição na produção de violaceína. A curcumina apresentou inibição dependente da concentração, aonde a maior concentração de 25 µM chegou a inibir 75% da produção de violaceína, mostrando o potencial inibitório. Brackman *et al.* (2009) e Packiavathy *et al.* (2014) também observaram resultados de inibição de violaceína por curcumina em *C. violaceum* 026, entretanto eles avaliaram concentrações maiores às utilizadas neste estudo.

O teste realizado apenas com *C. violaceum* ATCC 12472 não é capaz de mostrar por qual mecanismo o composto inibe o QS, pois a inibição da produção de violaceína pode se dar pela redução da produção do autoindutor (inibição da sintese de AHL por CviI) ou pela interferência no

ativador transcricional dependente de AHL, a proteína CviR. Assim, o ensaio complementar com *C. violaceum* 026, uma estirpe mutante incapaz de produzir AHLs, mas mantendo a capacidade de responder a AHLs exógenos, pode ser bastante informativo. Se houver algum composto que interfira na detecção de C6-HSL por CviR, a produção de violaceína deve ser reduzida nesta estirpe (LaSarre & Federle, 2013; Rivera *et al.*, 2019). Assim, a curcumina e capsaicina tem potencial anti-QS dependente do autoindutor 1 (AI-1) via CviR. Os testes *in silico* (**Figura 2**) corroboram estes achados.

4.4. Motilidade tipo s*warming* e *swimming*

A partir dos testes anteriores foi-se descartando os compostos que não apresentavam atividade anti-QS. Assim para os testes de motilidade tipo *swarming* e *swimming* e biofilme foram utilizados os compostos curcumina, capsaicina e resveratrol.

4.4.1. Motilidade tipo swarming

A motilidade tipo *swarming* caracteriza-se por uma movimentação organizada na superfície, depende de contato célula a célula e ocorre extensa flagelação. Também conhecida por enxameação, está associada a maior virulência e resistência aos antibióticos por vários micro-organismos e é considerada uma adaptação favorável aos desafios que surgem em ambientes dinâmicos (Rütschlin & Böttcher, 2019). Este fenótipo é regulado pelo QS e desempenha um importante papel na colonização bacteriana da superfície, além de contribuir para a formação de biofilmes e infecções (Carette *et al.*, 2020), sendo importante a interferência deste fenótipo como alternativa para reduzir ou prevenir infecções baseadas em biofilme. As **Figuras 10 e 11** mostram o efeito dos compostos fenólicos frente à motilidade tipo *swarming* dos micro-organismos *S. marcescens* MG1 e *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36, respectivamente. A estirpe de *S.* Montevideo não apresentou o fenótipo de motilidade tipo *swarming* (resultados não mostrados).

A curcumina (**Figura 10A**) em todas as concentrações avaliadas inibiu efetivamente a motilidade *swarming* de *S. marcescens* MG1, não tendo diferença significativa com o controle positivo furanona C30 na concentração de 100 µM ($p<0,05$), um conhecido inibidor de QS, indicando seu potencial anti-QS. Nas concentrações de 50 a 100 µg/ml (135 a 270 µM), nosso estudo corrobora com Packiavathy *et al.* (2014), onde avaliaram a inibição da curcumina em diversos fenótipos regulados pelo QS frente a bactérias uropatogênicas, entre eles a inibição na motilidade *swarming* de *S. marcescens, E. coli, P. aeruginosa* PAO1 e *P. mirabilis*. Uma das justificativas é o poder que a curcumina tem de reduzir a produção de polissacarídeos

extracelulares de patógenos uropatogênicos, limitando sua atividade de motilidade (Zheng *et al.*, 2020). Entretanto capsaicina e resveratrol (**Figura 10B** e **10C**), nas concentrações avaliadas, não apresentaram inibição para *S. marcescens* MG1 (p<0,05).

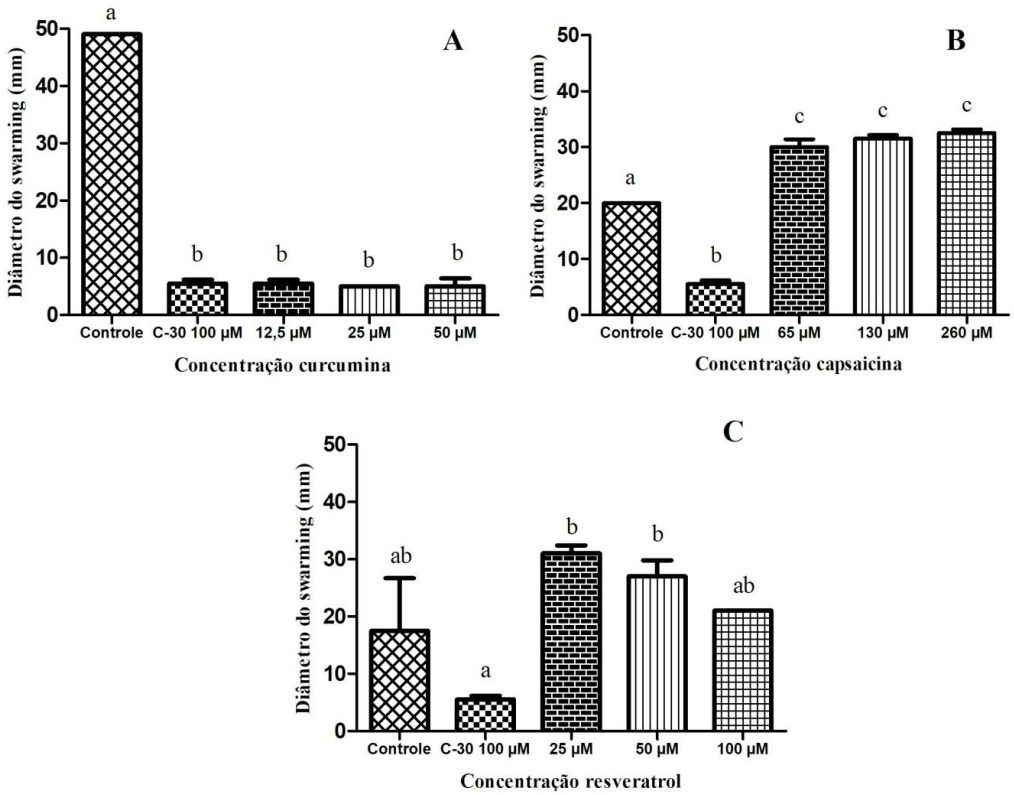

Figura 10: Efeito de diferentes compostos sobre a motilidade tipo *swarming* de *S. marcescens* MG1. (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) resveratrol. Controle = controle crescimento bacteriano; C-30 = controle furanona halogenada C-30 com bactéria; Médias seguidas por diferentes letras diferem estatisticamente (p<0,05).

A **Figura 11A, 11B** e **11C** mostra que para *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36, os compostos fenólicos não apresentaram inibição nas concentrações avaliadas, aonde curcumina chegou a induzir o fenótipo. Alguns estudos mostraram o aumento da motilidade *swarming* e *swimming* ao inibir a produção de autoindutores (AHL) (Husain *et al.*, 2008), similar ao observado na **Figura 11A**. Mangoudehi *et al.* (2020) observaram inibição significativa da motilidade *swarming* em *A. hydrophila* na concentração de 32 µg/ml (86 µM) de curcumina, superior à utilizada neste estudo, indicando seu potencial inibitório dependente de concentração.

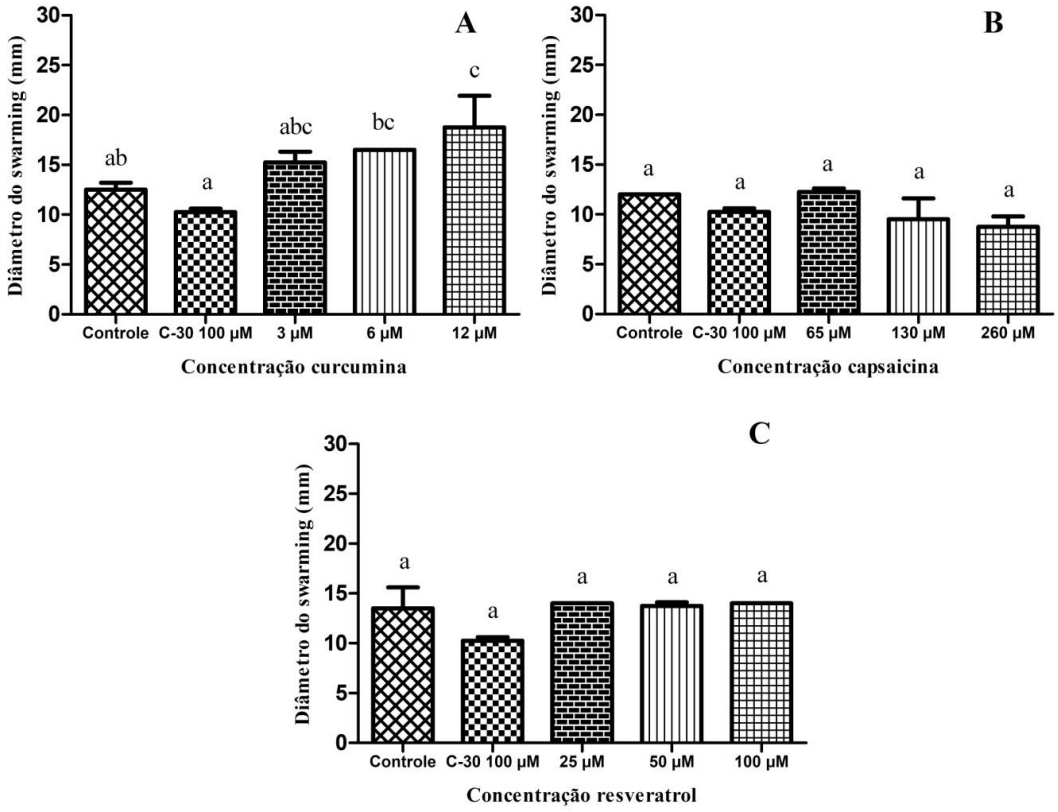

Figura 11: Efeito de diferentes compostos sobre a motilidade tipo *swarming* de *Aeromonas hydrophila* IOC/FDA 110-36. (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) resveratrol. Controle = controle crescimento bacteriano; C-30 = controle furanona halogenada C-30 com bactéria; Médias seguidas por diferentes letras diferem estatisticamente (p<0,05).

4.4.2. Motilidade tipo swimming

As **Figuras 12 e 13** apresentam a motilidade tipo *swimming* dos micro-organismos *S. marcescens* MG1 e *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36, respectivamente. Os compostos selecionados não apresentaram inibição neste fenótipo nas concentrações avaliadas (p<0,05). O'May & Tufenkji (2011) também observaram que proantocianidinas, derivados de amora, e o tanino hidrolisável da romã inibiram completamente a motilidade *swarming*, mas não bloquearam a motilidade *swimming*. Lee *et al.* (2013) também observaram que o trans-resveratrol, estilbeno presente no extrato da planta *Carex dimorpholepis*, possuiu maior atividade QQ na motilidade *swarming* do que na motilidade *swimming* indicando que, apesar de serem fenótipos de movimentação, possuem mecanismo diferentes de ativação.

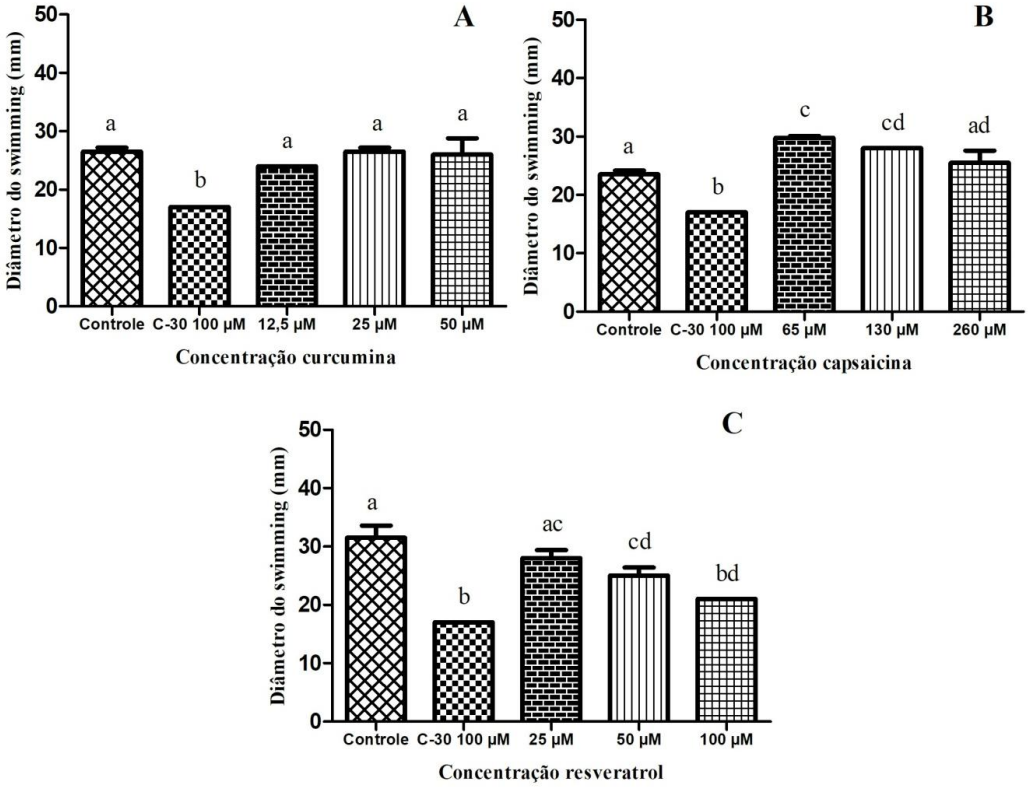

Figura 12: Efeito de diferentes compostos sobre a motilidade tipo *swimming* de *S. marcescens* MG1. (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) resveratrol. Controle = controle crescimento bacteriano; C-30 = controle furanona halogenada C-30 com bactéria; Médias seguidas por diferentes letras diferem estatisticamente (p<0,05).

Ding *et al.* (2018) observaram inibição de 30% e 73% na motilidade tipo *swimming* de *A. hydrophila* e *Serratia grimesii*, respectivamente, por lipossomas de curcumina. Eles observaram que o encapsulamento desse composto aumenta sua conservação e solubilidade, indicando a tecnologia que poderia ser aplicada para melhorar a ação dos compostos fenólicos. Mangoudehi *et al.* (2020) também observaram inibição por curcumina (135 a 270 µM) na motilidade *swimming* de *S. marcescens*, *E. coli*, *P. aeruginosa* PAO1 e *P. mirabilis*, concentrações maiores que as utilizadas em nosso estudo.

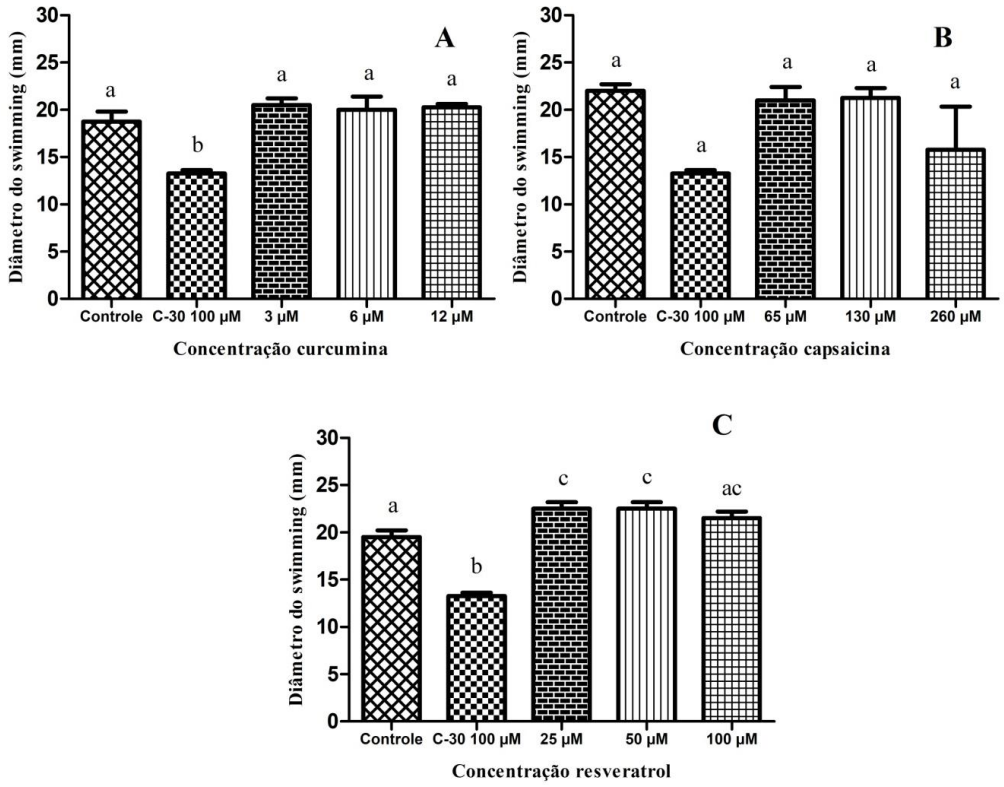

Figura 13: Efeito de diferentes compostos sobre a motilidade tipo *swimming* de *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36. (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) resveratrol. Controle = controle crescimento bacteriano; C-30 = controle furanona halogenada C-30 com bactéria; Médias seguidas por diferentes letras diferem estatisticamente ($p<0,05$).

4.5. Formação de biofilme

A **Figura 14** mostra o efeito de curcumina, capsaicina e resveratrol sobre a formação da biomassa do biofilme de *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36.

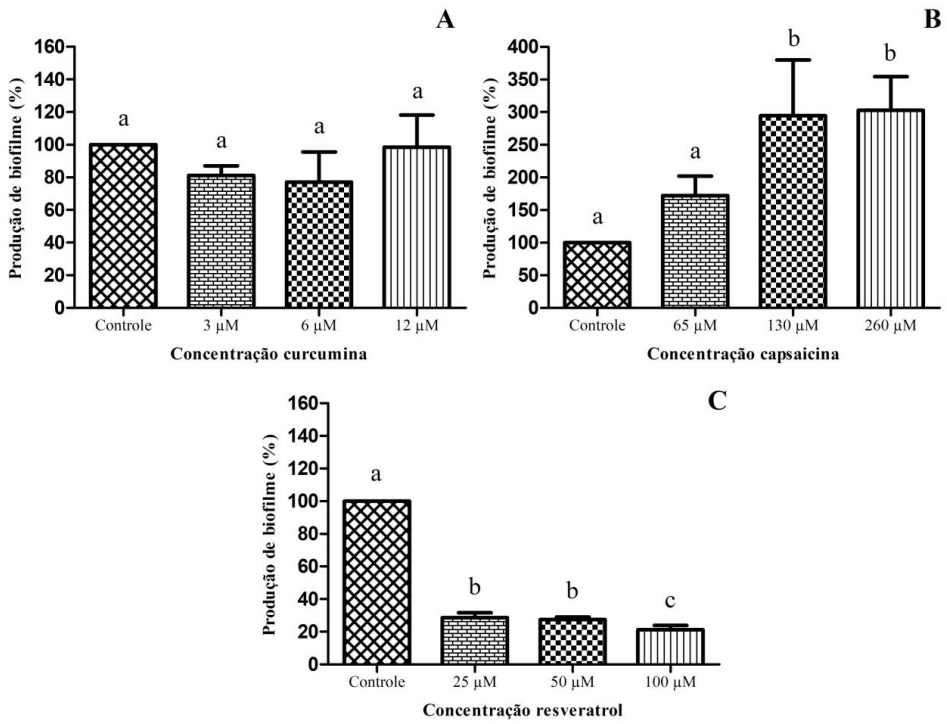

Figura 14: Efeito de diferentes compostos sobre a formação de biofilme de *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36. (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) resveratrol. Controle = controle crescimento bacteriano; Médias seguidas por diferentes letras diferem estatisticamente (p<0,05).

Pode-se observar que curcumina (**Figura 14A**) e capsaicina (**Figura 14B**), nas concentrações testadas, não inibiram a formação de biofilme. A capsaicina chegou a induzir a formação, conforme aumentava a concentração desse composto. Mangoudehi *et al.* (2020) avaliando diferentes concentrações de curcumina em *A. hydrophila* ATCC 7966 e isolados de peixes, observaram que os mesmos tratados com 16 µg/ml de curcumina (43,4 µM) chegaram a inibir 67% do biofilme. Lade *et al.* (2015) também encontraram resultados positivos na inibição de biofilme em diferentes cepas de *A. hydrophila* por curcumina a 100-175 µg/ml (270-575 µM), chegando a inibir 52%, mostrando que os efeitos QQ ocorrem de maneira dependente da concentração, resultados diferentes ao encontrado nesse estudo. Entretanto, deve-se levar em consideração a cor desse composto, um intenso amarelo, que pode comprometer os resultados visuais. Ambos os estudos avaliaram a MIC por teste visual, podendo supor que a cor amarela pode interferir na visualização do crescimento da bactéria.

O resveratrol (**Figura 14C**) em todas as concentrações avaliadas reduziu significativamente em até 80% a formação do biofilme a 100 µM. Resultados semelhantes foram encontrados para outros micro-organismos como: *L. monocytogenes*, com redução de 70-80% a formação do biofilme a 0,88 mM (Vasquez-Armenta *et al.*, 2018); *Campylobacter* spp. e

Arcobacter butzleri onde houve inibição da formação e promoção da dispersão do biofilme (Duarte *et al.*, 2015); inibição do biofilme de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) (Qin *et al.*, 2014) e *E. coli* O157:H7 (Lee *et al.*, 2013), mostrando o potencial anti-QS do resveratrol.

Em *A. hydrophila*, o sistema QS é principalmente dependente dos genes *ahyI/ahyR*, homólogos da família *luxI/luxR*. Sua principal molécula de sinalização é a butanoil-homoserina lactona (C4-HSL) e, em seguida, hexanoil-homoserina lactona (C6-HSL) produzida em menor concentração. Vários fatores de virulência são regulados por esses genes, incluindo exoproteases, secreção dos efetores do sistema de secreção tipo VI, motilidade e formação de biofilme (Reis *et al.*, 2016; Mangoudehi *et al.*, 2020). Os resultados obtidos indicam que o resveratrol pode competir com essas moléculas sinalizadoras pelo *pocket* de ligação da proteína receptora (**Figura 2**), como observado no teste de inibição do pigmento violaceína em *C. violaceum* ATCC 12472, onde os autoindutores de cadeia curta (C4 a C8) podem se ligar à proteína receptora e inibir o fenótipo (Chen *et al.*, 2011).

A **Figura 15** mostra o efeito dos compostos curcumina, capsaicina e resveratrol sobre a formação da biomassa de biofilme de *S.* Montevideo. Pode-se observar que a curcumina (**Figura 15A**), nas concentrações avaliadas, chegou a inibir até 27% a formação de biofilme em relação ao controle ($p<0,05$).

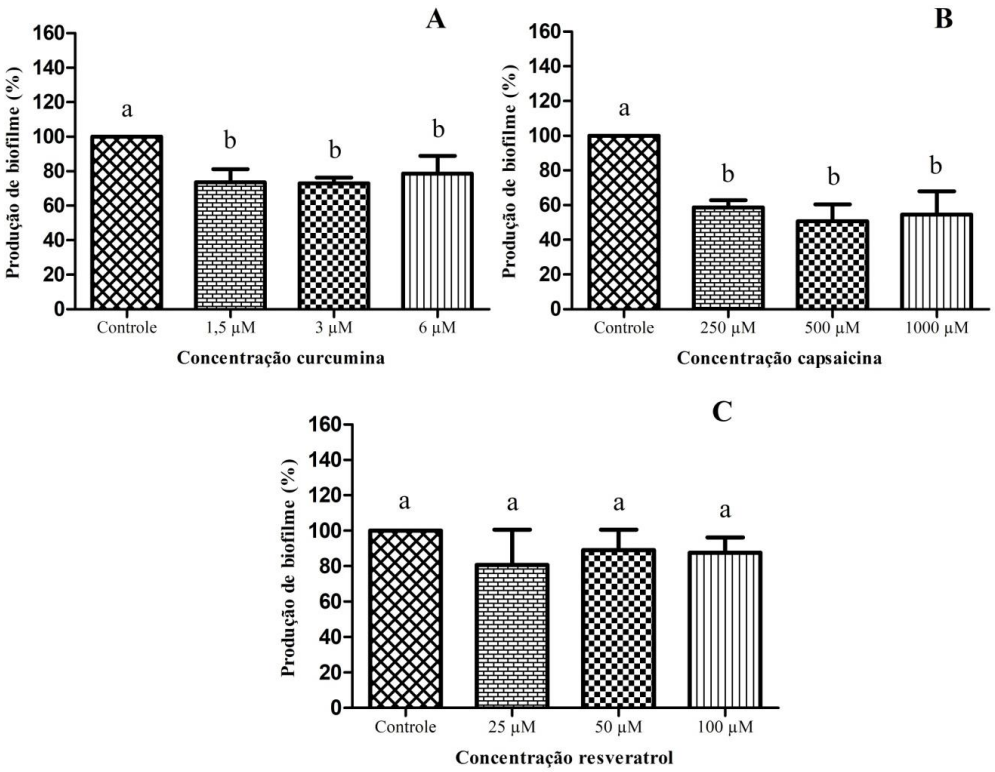

Figura 15: Efeito de diferentes compostos sobre a formação de biofilme de *S.* Montevideo. (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) resveratrol. Controle = controle crescimento bacteriano; Médias seguidas por diferentes letras diferem estatisticamente (p<0,05).

A eficácia da cúrcuma e seu princípio ativo curcumina contra diversos organismos infecciosos provavelmente resulta de múltiplos mecanismos. Entre eles incluem a capacidade da curcumina de perturbar as membranas bacterianas, inibir o mecanismo de replicação, alterar a expressão gênica, além de inibir a formação de biofilme (Vaughn *et al.*, 2017). Packiavathy *et al.* (2014) observaram redução nas microcolônias e a interrupção da arquitetura nos biofilmes dos patógenos tratados com curcumina, enquanto nos controles formou-se uma espessa camada de biofilmes. Eles também observaram que o tratamento com 100 µg/ml (270 µM) de curcumina reduziu em quase 90% a biomassa do biofilme em *P. aeruginosa, S. marcescens, E. coli e P. mirabilis*, mostrando o potencial anti-biofilme dependente da concentração.

A capsaicina em todas as concentrações avaliadas inibiu a formação de biofilme em relação ao controle (p<0,05). Não houve variação significativa entre as concentrações avaliadas (250 a 1000 µM) (**Figura 15B)**. A capsaicina geralmente é usada como aditivo e aromatizante de alimentos, e possui importantes ações farmacológicas, como atividade bacteriostática contra bactérias Gram negativas e efeitos anti-inflamatórios (Zhou *et al.*, 2014). Até agora existem poucos estudos avaliando o papel da capsaicina em biofilmes de *S.* Montevideo, entretanto estudos

comprovam que a capsaicina inibe a adesão, o crescimento e a formação de biofilme de bactérias Gram negativas como *Pseudomonas putida, V. matriegens, V. parahaemolyticus* (Xu *et al.*, 2005) e *Porphyromonas gingivalis* (Zhou *et al.*, 2014).

Os componentes essenciais para a formação de biofilme de *Salmonella* spp. são as fimbrias e celulose, uma vez que os mutantes deficientes nesses componentes são defeituosos na formação de biofilme. Foi observado que o gene *csgD* é responsável pela síntese da fímbria e pela regulação dos componentes da matriz em *Salmonella* spp. O gene *csgD* também aprimora a expressão do gene *adrA*, que regula a síntese de celulose (Steenackers *et al.*, 2012; Jang & Mosolygó, 2020).

Pode-se observar que o resveratrol (**Figura 15C**) não inibiu a formação de biofilme de *S.* Montevideo nas concentrações avaliadas ($p<0,05$). Entretanto, um estudo avaliando o principal composto da uva *Vitis vinifera*, o resveratrol, foi eficiente na inibição da adesão de *C. jejuni* em superfícies bióticas e abióticas nas concentrações sub-inibitórias, sugerindo seu potencial como extensivo agente anti-biofilme neste micro-organismo (Klancnik *et al.*, 2017). A **Figura 16** mostra o efeito dos compostos curcumina, capsaicina e resveratrol sobre a formação de biofilme de *S. marcescens* MG1. Neste micro-organismo o QS desempenha um papel importante na regulação de muitos aspectos do ciclo de vida do biofilme, seja na fixação inicial, formação de microcolônias e na arquitetura tridimensional (Rice *et al.*, 2005).

Pode-se observar que a curcumina (**Figura 16A**), nas concentrações avaliadas, não inibiu a formação de biofilme ($p<0,05$). Packiavathy *et al.* (2014) avaliaram o desenvolvimento de biofilme por bactérias uropatogênicas tratadas com curcumina e observaram que a concentração de 100 µg/ml (270 µM) diminuiu a biomassa em 76% de *S. marcescens*, além de diminuiur a produção de EPS e interromper os biofilmes maduros desse micro-organismo, mostrando que em concentrações maiores a curcumina pode ter atividade anti-biofilme.

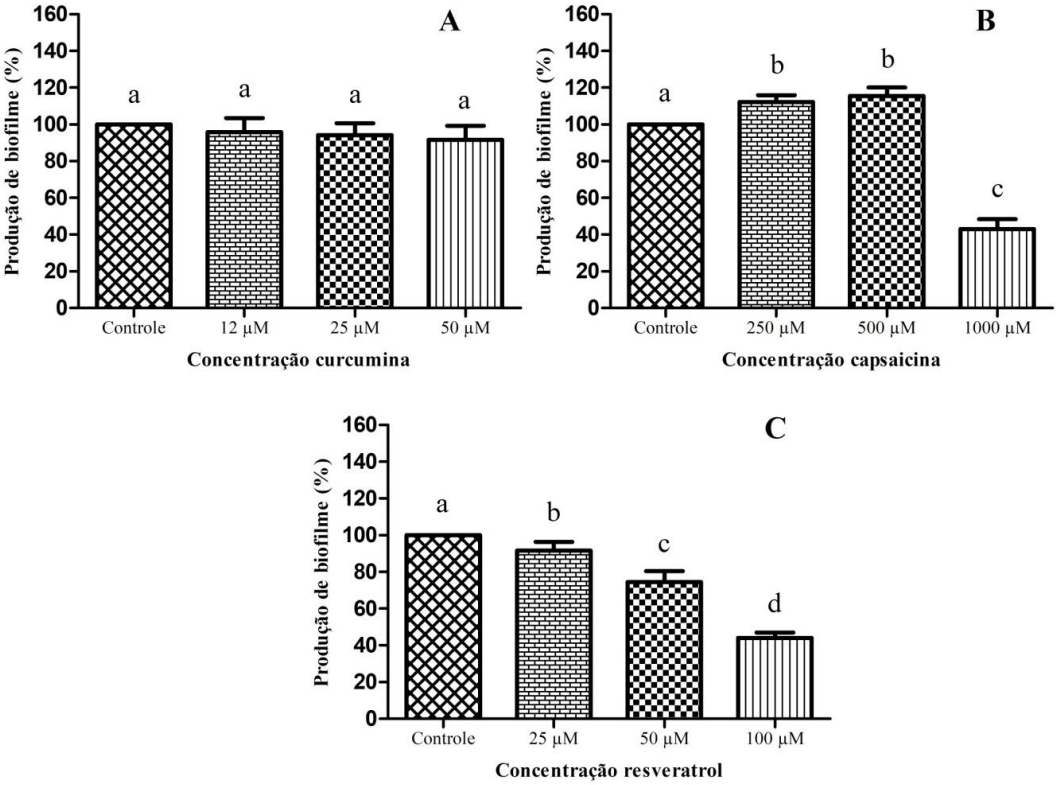

Figura 16: Efeito de diferentes compostos sobre a formação de biofilme de *S. marcescens* MG1. (A) curcumina; (B) capsaicina; (C) resveratrol. Controle = controle crescimento bacteriano; Médias seguidas por diferentes letras diferem estatisticamente (p<0,05).

A capsaicina (**Figura 16B**) e resveratrol (**Figura 16C**) apresentaram inibição nas maiores concentrações, aonde 1000 µM de capsaicina e 100 µM de resveratrol chegaram a inibir 57% do biofilme. Rivera *et al.* (2019) avaliando a inibição de biofilme em *S. marcescens* MG1 por capsaicina, observaram que menores concentrações, 50 a 25 µg/ml (85 a 170 µM), não diferem do controle, podendo até induzir a formação de biofilme, como observado nas concentrações 250 e 500 µM, resultados que corroboram com nosso estudo.

O resveratrol é encontrado em uvas vermelhas, amendoins e algumas plantas lenhosas. Possui propriedades antibacterianas, antioxidantes e QQ. Lee *et al.* (2013) observaram a inibição de biofilme em *E. coli* O157:H7 por trans-resveratrol, componente principal dos extratos de *Carex dimorpholepsis.* Cho *et al.* (2013) também relataram que 50 µg/ml de resveratrol (219 µM) inibiram biofilmes de *P. aeruginosa* PA14 e *E. coli* 0157:H7. Em uma concentração de 100 µg/ml (438 µM), esse composto foi capaz de inibir biofilmes de *S. aureus* (Morán *et al.*, 2014), assim o resveratrol é um potencial anti-biofilme dependente da concentração para diversos micro-organismos formadores de biofilme.

4.6. Resistência ao Antibiótico canamicina

4.6.1. Curcumina

A resistência antimicrobiana é questão crítica para a escolha do melhor tratamento. Uma estratégia que está sendo útil para combater bactérias multirresistentes é a coadministração de agentes modificadores de resistência junto com o antimicrobiano. Diversos medicamentos de grande utilidade foram clinicamente aprovados baseados nessa premissa, como por exemplo, amoxilina combinado com inibidores de beta-lactamase (Ayaz *et al.*, 2019).

A **Figura 17** mostra as curvas de crescimento de *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36 tratadas com diferentes concentrações de antibiótico canamicina (4-512 µg/ml) e curcumina (0-12 µM). Na menor concentração de canamicina (4 µg/ml) não houve inibição do crescimento coadministrado com curcumina (**Figura 17A),** nas concentrações avaliadas comparado com os controles sem os dois agentes e apenas com antibiótico. Nas concentrações de 8 a 128 µg/ml de canamicina (**Figura 17B, 17C, 17D, 17E** e **17F**) não houve inibição do crescimento quando coadministrado com a curcumina. Entretanto, quando comparado com o controle (sem antibiótico e curcumina), houve um retardo no crescimento, mostrando que o crescimento da bactéria foi afetado nessas concentrações de canamicina. Com 256 µg/ml pode-se observar que os tratamentos com curcumina e canamicina tiveram maior inibição comparado ao controle (sem antibiótico e composto) e ao tratamento 0 (sem composto), mostrando essa associação positiva, principalmente a partir do tempo 18h (**Figura 17G**). No tratamento com 512 µg/ml de canamicina (**Figura 17H**) não houve crescimento do micro-organismo em nenhuma das concentrações avaliadas, sendo esta a MBC do antibiótico.

A **Figura 18** apresenta as curvas de crescimento de *S.* Montevideo tratadas com diferentes concentrações de antibiótico canamicina (4-512 µg/ml) e curcumina (0-12 µM). Nas concentrações 4 a 16 µg/ml de canamicina (**Figura 18A, 18B, 18C**) as curvas contendo ambos os agentes cresceram concomitantemente, não apresentando inibição. Já a 32 µg/ml (**Figura 18D**) pode-se observar que a curcumina a 12 µM inibiu completamente o crescimento de *S.* Montevideo, enquanto nas outras concentrações (6 e 3 µM) a bactéria cresceu concomitante com a curva contendo apenas canamicina. Nas concentrações de 64 a 512 µg/ml de canamicina (**Figuras 18 E, F, G, H**) não houve diferença nas curvas de crescimento.

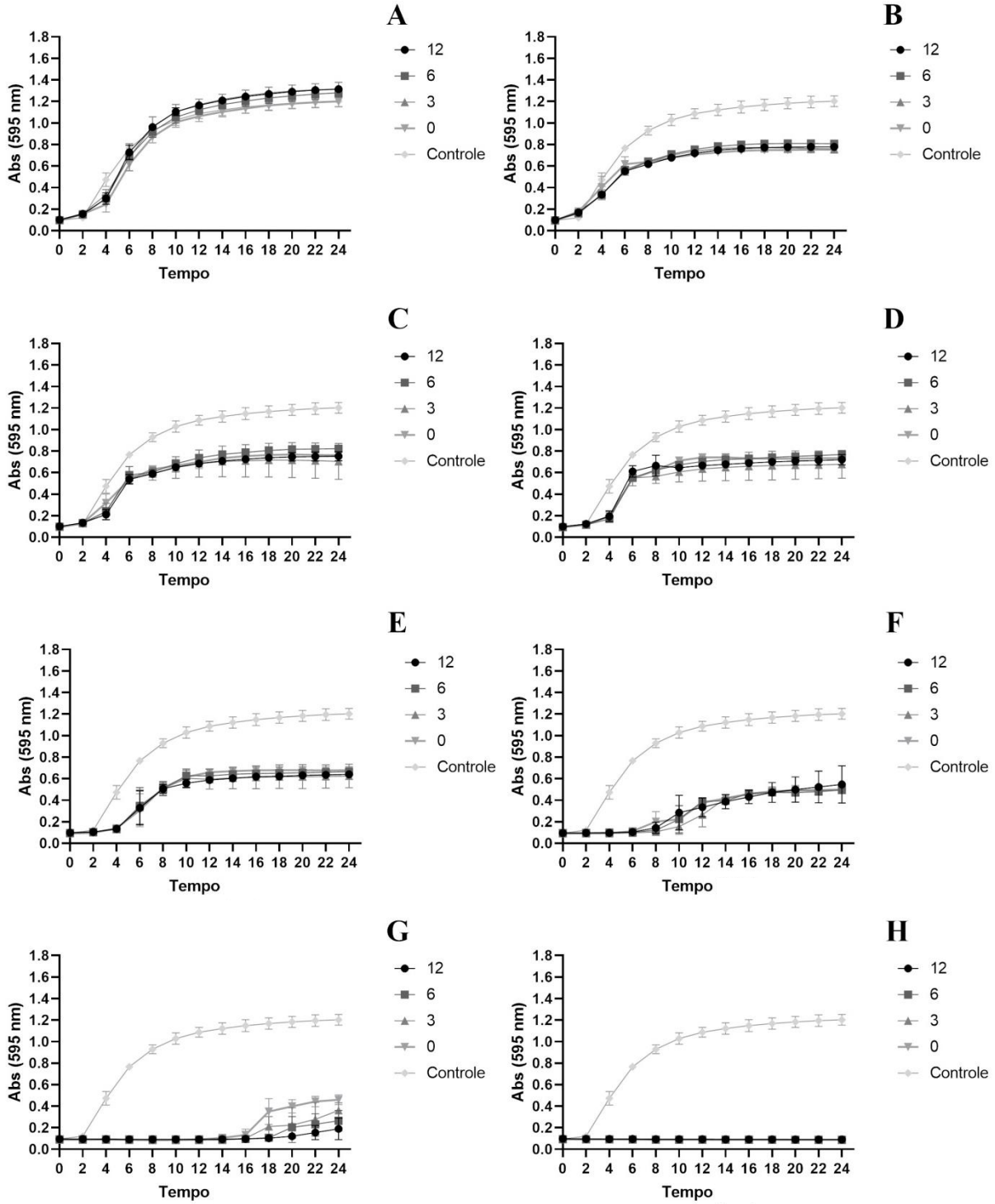

Figura 17: Curvas de crescimento para *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36 durante 24h de incubação a 37°C em diferentes concentrações do composto curcumina em µM (indicado na legenda) e o antibiótico canamicina indicado pelas letras: (A) 4 µg/ml; (B) 8 µg/ml; (C) 16 µg/ml; (D) 32 µg/ml; (E) 64 µg/ml; (F) 128 µg/ml; (G) 256 µg/ml; (H) 512 µg/ml. 0= LB mais canamicina e bactéria; Controle= LB mais DMSO 1%.

A **Figura 19** mostra as curvas de crescimento de *S. marcescens* MG1 tratadas com diferentes concentrações de antibiótico canamicina (4-512 µg/ml) e curcumina (0-50 µM). Nas concentrações 4 a 16 µg/ml de antibiótico canamicina (**Figura 19A, 19B, 19C**), as curvas contendo ambos os agentes não apresentaram inibição, crescendo até mais que o controle. Já na concentração de 32 µg/ml de canamicina (**Figura 19D**) houve inibição dependente da concentração de curcumina, onde a maior concentração (50 µM) teve maior inibição a partir do tempo 16 horas. Nas concentrações de 128 a 512 µg/ml de canamicina não houve diferença nas curvas de crescimento (**Figura 19F, 19G, 19H**).

O QS regula a expressão de genes associados à formação de biofilme, conhecido por estar envolvido em mecanismos de resistência a antimicrobianos. Assim, interromper o QS, pode ser uma alternativa para reduzir a virulência bacteriana e aumentar a eficiência do tratamento com antibióticos (Mion *et al.*, 2019). Nosso estudo mostra que curcumina a 12 µM reduziu pela metade a MIC da canamicina (**Figura 18D**) para *S.* Montevideo. Packiavathy *et al.* (2014) avaliaram a interação da curcumina com diferentes antibióticos e observaram o aumento da sensibilidade de *S. marcescens* a eritromicina na presença de curcumina (67-270 µM). Mun *et al.* (2013) observaram que a curcumina reduziu acentuadamente as MICs dos antibióticos oxacilina, ciprofloxacina, norfloxacina e ampicilina testadas contra *S. aureus* resistente a meticilina. A curcumina também aumentou a sensibilidade de diversas bactérias Gram positivas e Gram negativas frente aos antibióticos ciprofloxacina, amicacina, gentamicina, cefepima (Kali *et al.*, 2016). Esses estudos mostram que a curcumina possui interação com diferentes classes de antibióticos e aumenta a sensibilidade de bactérias patogênicas, inclusive as que possuem resistência, sendo um potencial agente a ser coadministrado em tratamentos com antibióticos.

Estudos mostram que a curcumina interfere na localização de proteínas associadas à membrana e na permeabilidade das membranas celulares. Esse aumento da permeabilidade da membrana pode aumentar a sensibilidade das bactérias aos antibióticos. A curcumina se insere profundamente na membrana em uma orientação transbicamada e ancorada por ligação de hidrogênio ao grupo fosfato dos lipídeos de maneira análoga ao colesterol. A curcumina possui propriedades hidrofóbicas, devido a dois grupos hidroxi fenólico e, semelhante à estrutura do colesterol, ela induz a formação de estruturas oligoméricas na membrana que provavelmente estreitam a bicamada (Zheng *et al.*, 2020). Além disso, estudos mostram uma atividade significativa quando combinada com outros antibióticos em uma dose subinibitória de curcumina o que aumenta a sensibilidade bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos, como penicilina e meticilina para S. *aureus* (Mun *et al.*, 2014).

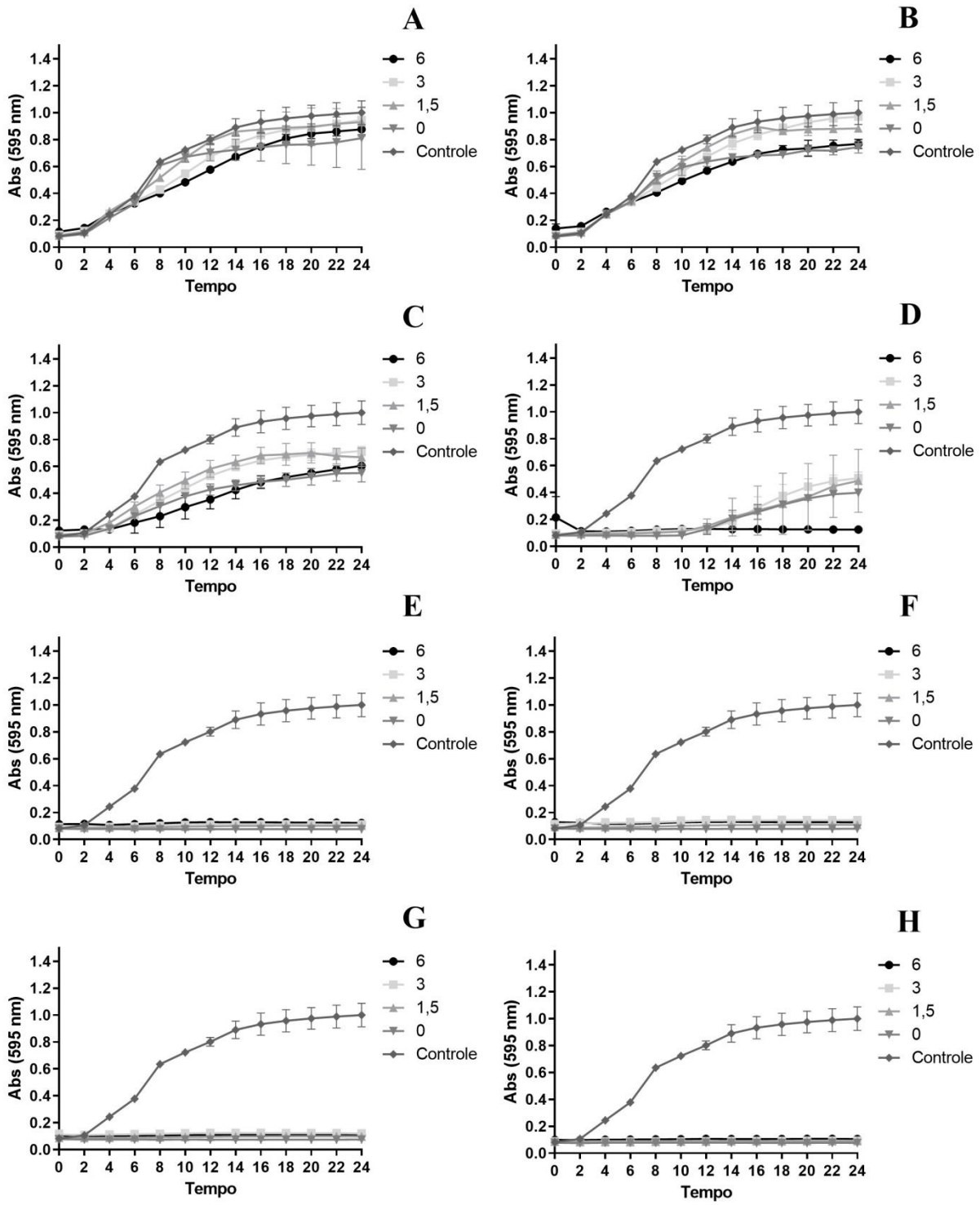

Figura 18: Curvas de crescimento de *S.* Montevideo durante 24h de incubação a 37°C em diferentes concentrações do composto curcumina em µM (indicado na legenda) e o antibiótico canamicina indicado pelas letras (A) 4 µg/ml; (B) 8 µg/ml; (C) 16 µg/ml; (D) 32 µg/ml; (E) 64 µg/ml; (F) 128 µg/ml; (G) 256 µg/ml; (H) 512 µg/ml. 0= LB mais canamicina e bactéria; Controle= LB mais DMSO 1%.

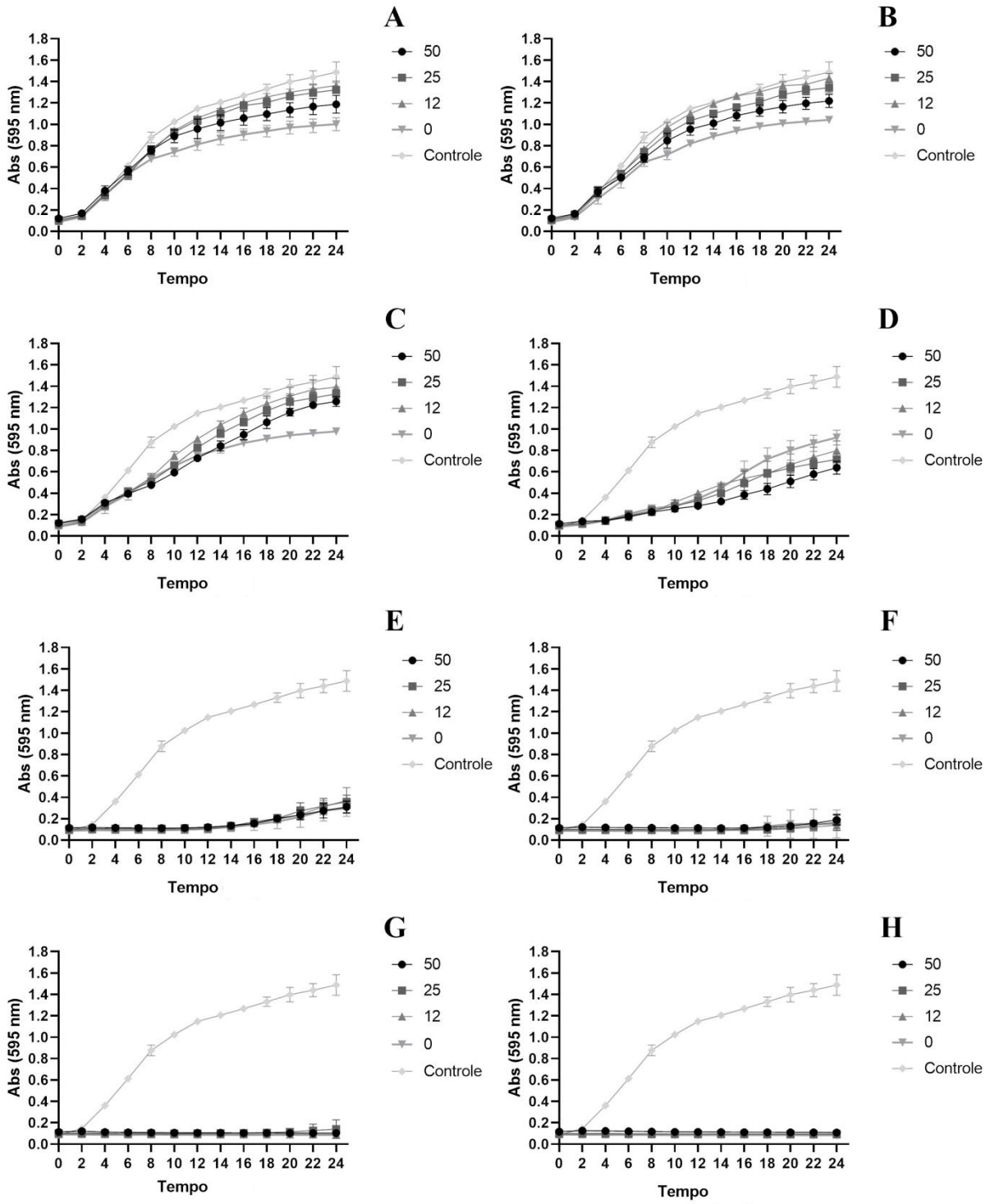

Figura 19: Curvas de crescimento para *S. marcescens* MG1 durante 24h de incubação a 30°C em diferentes concentrações do composto curcumina em µM (indicado na legenda) e o antibiótico canamicina indicado pelas letras: (A) 4 µg/ml; (B) 8 µg/ml; (C) 16 µg/ml; (D) 32 µg/ml; (E) 64 µg/ml; (F) 128 µg/ml; (G) 256 µg/ml; (H) 512 µg/ml. 0= LB mais canamicina e bactéria; Controle= LB mais DMSO 1%.

4.6.2. Resveratrol

A **Figura 20** mostra as curvas de crescimento de *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36 tratada com diferentes concentrações de antibiótico canamicina (4-512 µg/ml) e resveratrol (0-100 µM). Na **Figura 20A, 20B, 20C, 20D** e **20E,** nas concentrações de 4 a 64 µg/ml de canamicina respectivamente**,** as curvas contendo antibiótico e resveratrol inibiram parcialmente o crescimento a partir das 8-10h**,** comparado com a curva contendo apenas canamicina e o controle. Já a 128 µg/ml de canamicina (**Figura 20F**), houve crescimento do micro-organismo em todas as concentrações de resveratrol, porém pode-se observar que nos tratamentos contendo canamicina e resveratrol houve um maior retardo no crescimento, onde passou a se multiplicar a partir das 14h, comparado com o tratamento contendo apenas canamicina, que começou a partir das 8h. Pode-se observar que não houve crescimento do micro-organismo a 256 e 512 µg/ml de canamicina (**Figura 20G** e **20H**) em nenhuma das concentrações avaliadas de resveratrol. As curvas mostram que o resveratrol tornou a *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36 mais sensível à canamicina nas concentrações estudadas.

A **Figura 21** apresenta as curvas de crescimento de *S.* Montevideo tratada com resveratrol (0-100 µM) e canamicina (4-512 µg/ml). Na **Figura 21A** e **21B** não houve inibição por ambos os agentes em comparação com o controle, podendo ser justificado pela baixa concentração de antibiótico (4 e 8 µg/ml). Já na concentração de 32 µg/ml de canamicina (**Figura 21D**), pode-se observar que houve maior retardo de crescimento em todas as concentrações avaliadas, principalmente a 100 µM de resveratrol, onde houve um retardo de 6 horas (tempo 20 h) comparado com os outros tratamentos (tempo 14 h). Nas demais concentrações de antibiótico não houve crescimento (**Figura 21E, 21F, 21G** e **21H**), sendo 64 µg/ml a MBC deste micro-organismo.

A **Figura 22** mostra as curvas de crescimento de *S. marcescens* MG1 tratada com diferentes concentrações de antibiótico canamicina (4-512 µg/ml) e resveratrol (0-100 µM). Nas concentrações de 4 a 16 µg/ml de canamicina (**Figura 22A, 22B** e **22C** respectivamente), as curvas contendo resveratrol foram fortemente inibidas, onde a concentração de 100 µM reduziu em 3 vezes a MIC quando comparadas com a curva contendo apenas canamicina. Nas concentrações de 32 a 128 µg/ml de canamicina (**Figura 22D, 22E**, **22F** respectivamente) o resveratrol inibiu completamente o crescimento do micro-organismo, enquanto a curva apenas com o antibiótico revelou multiplicação do micro-organismo após 8, 16 e 20 horas de cultivo respectivamente, mostrando que a presença do composto tornou o micro-organismo mais sensível.

Pode-se observar que não houve crescimento do micro-organismo a 256 e 512 µg/ml de canamicina (**Figura 22G** e **22H**) em nenhuma das concentrações avaliadas de resveratrol.

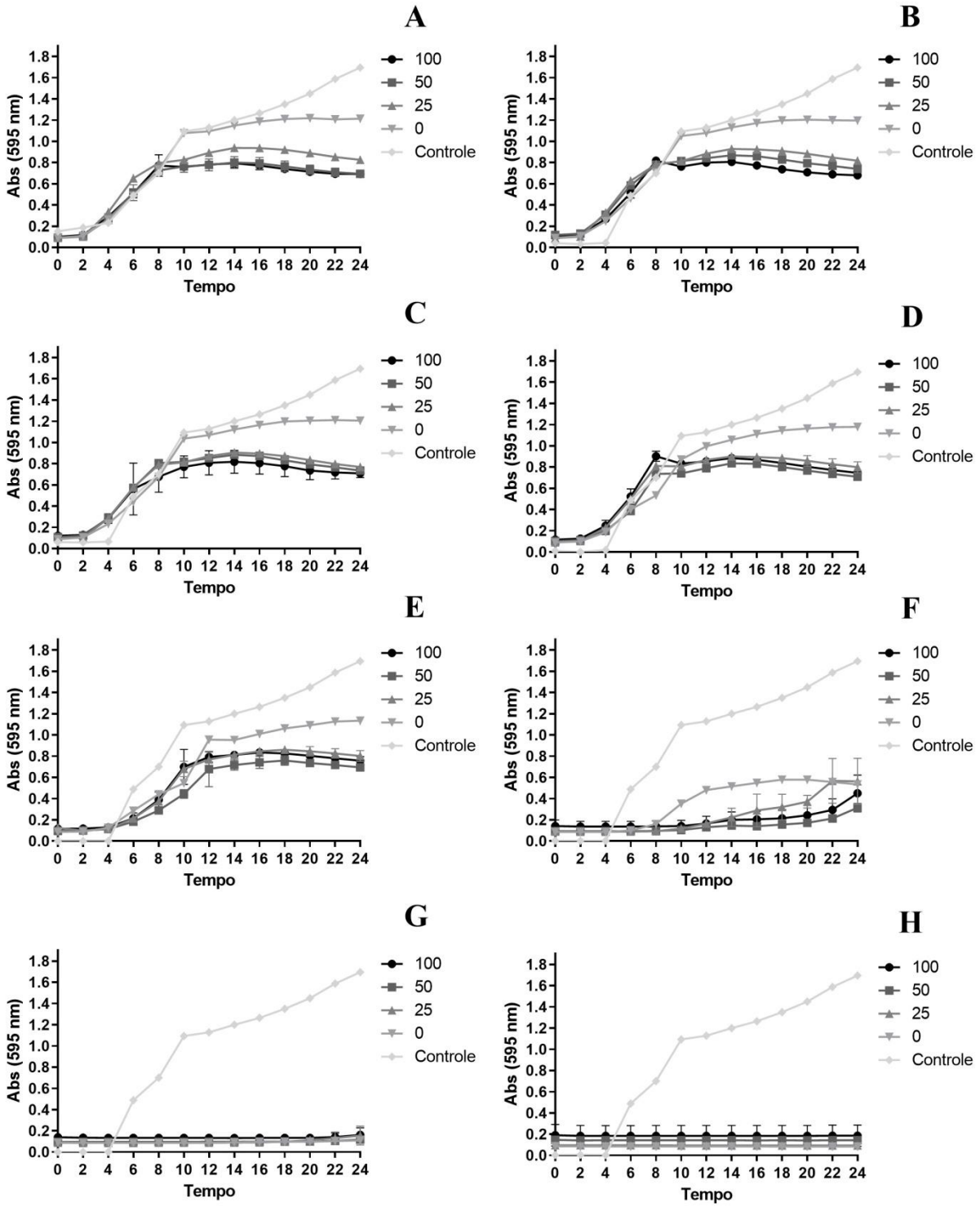

Figura 20: Curvas de crescimento para *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36 durante 24h de incubação a 37°C em diferentes concentrações do composto resveratrol em µM (indicado na legenda) e o antibiótico canamicina indicado pelas letras: (A) 4 µg/ml; (B) 8 µg/ml; (C) 16 µg/ml; (D) 32 µg/ml; (E) 64 µg/ml; (F)

128 µg/ml; (G) 256 µg/ml; (H) 512 µg/ml. 0= LB mais canamicina e bactéria; Controle= LB mais DMSO 1%.

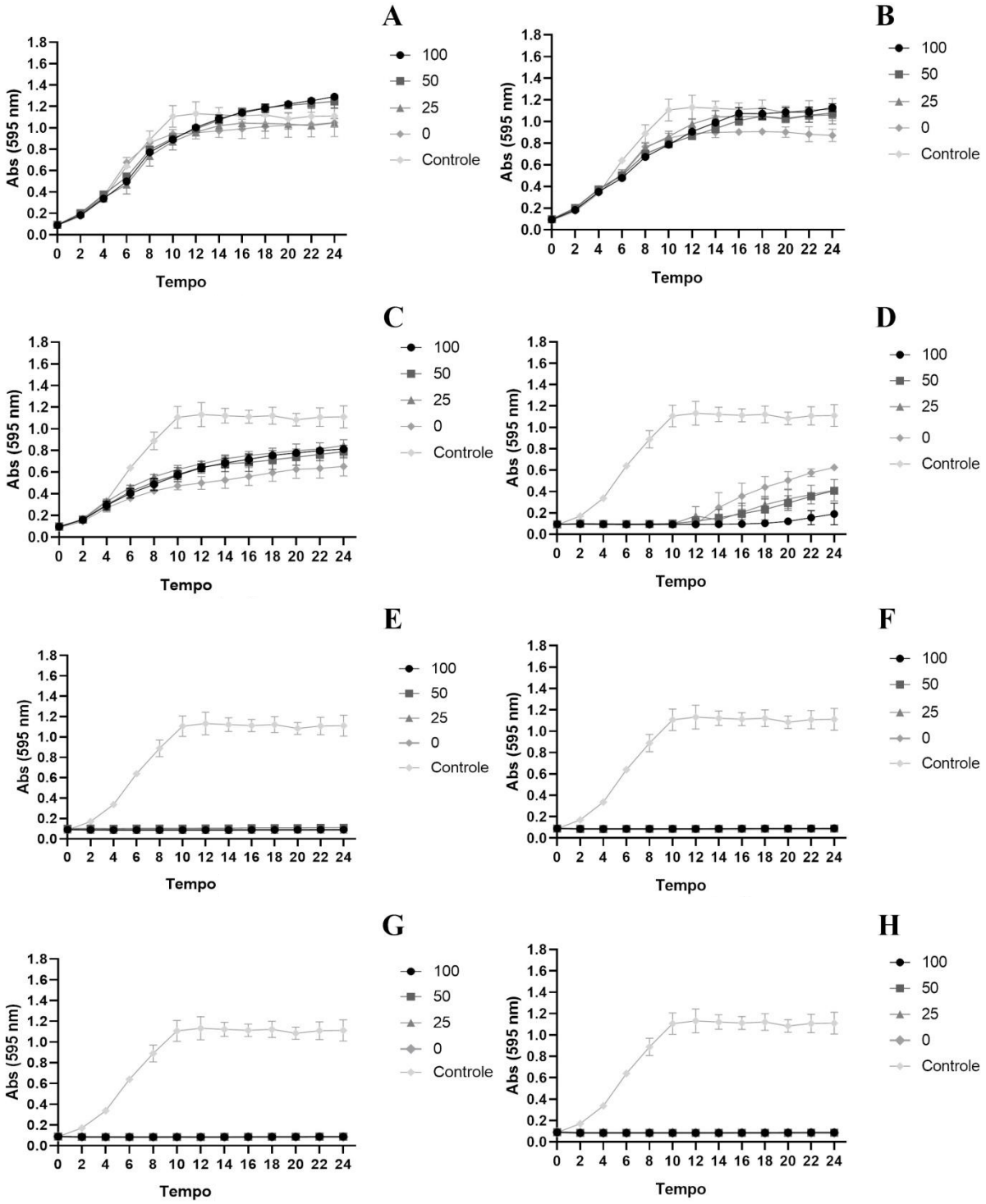

Figura 21: Curvas de crescimento para *S.* Montevideo durante 24h de incubação a 37°C em diferentes concentrações do composto resveratrol em µM (indicado na legenda) e o antibiótico canamicina indicado

pelas letras: (A) 4 µg/ml; (B) 8 µg/ml; (C) 16 µg/ml; (D) 32 µg/ml; (E) 64 µg/ml; (F) 128 µg/ml; (G) 256 µg/ml; (H) 512 µg/ml. 0= LB mais canamicina e bactéria; Controle= LB mais DMSO 1%.

A *S. marcescens* apresenta alta resistência a uma ampla variedade de antibióticos, dificultando o tratamento de infecções causadas por esta bactéria. Ela é capaz de secretar uma enzima beta-lactamase, que confere resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. Nossos estudos corroboram com Cannatelli *et al.* (2018) que observaram que o resveratrol não apresentou uma atividade antimicrobiana satisfatória para *S. marcescens.* Entretanto, ao combinar com o antibiótico colistina, houve uma atividade sinérgica, com diminuição da MIC de colistina, tornando a bactéria mais sensível. O resveratrol também aumenta os efeitos dos aminoglicosídeos, como amicacina, gentamicina, ciprofloxacina nos biofilmes de *P. aeruginosa* PAO1, tornando-os mais sensíveis (Zhou *et al.*, 2018). O tratamento combinado com polimixina B e resveratrol foi mais eficaz do que o tratamento de qualquer agente isolado, aumentando a sensibilidade das cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli* multirresistentes (MDR) com resistência à polimixina B, diminuindo a MIC (Liu *et al.*, 2020b). Essa combinação também pode inativar ATP sintase de *S. aureus*, aumentando sua sensibilidade ao antibiótico polimixina B (Liu *et al.*, 2020a).

Os compostos bioativos vêm demonstando atividade antimicrobiana, sendo uma possível alternativa de combinação com antibióticos já utilizados, de forma a aumentar sua potência antimicrobiana. A combinação do composto carvacrol, presente no orégano, e eritromicina, apresentou redução de 2 a 2048 vezes da MIC de eritromicina em cepas de *Streptococcus* do grupo resistente à eritromicina (Magi *et al.*, 2015). Quercetina, ácido gálico, ácido protocatecuico e luteolina, presentes no extrato do bagaço de uva, também mostraram sinergismo para diferentes classes de antibióticos como beta-lactama, quinolona, tetraciclina e anfenicol, tendo reduções de 4 a 125 vezes na MIC de *E. coli* e *S. aureus* (Sanhueza *et al.*, 2017), mostrando o potencial para recuperar antibióticos hoje inutilizados em tratamentos clínicos contra bactérias multirresistentes. Entretanto, vários são os desafios para transferir estes achados dos testes *in vitro* para a aplicação clínica, sendo necessários mais estudos desta natureza para avaliar a eficácia *in vivo*.

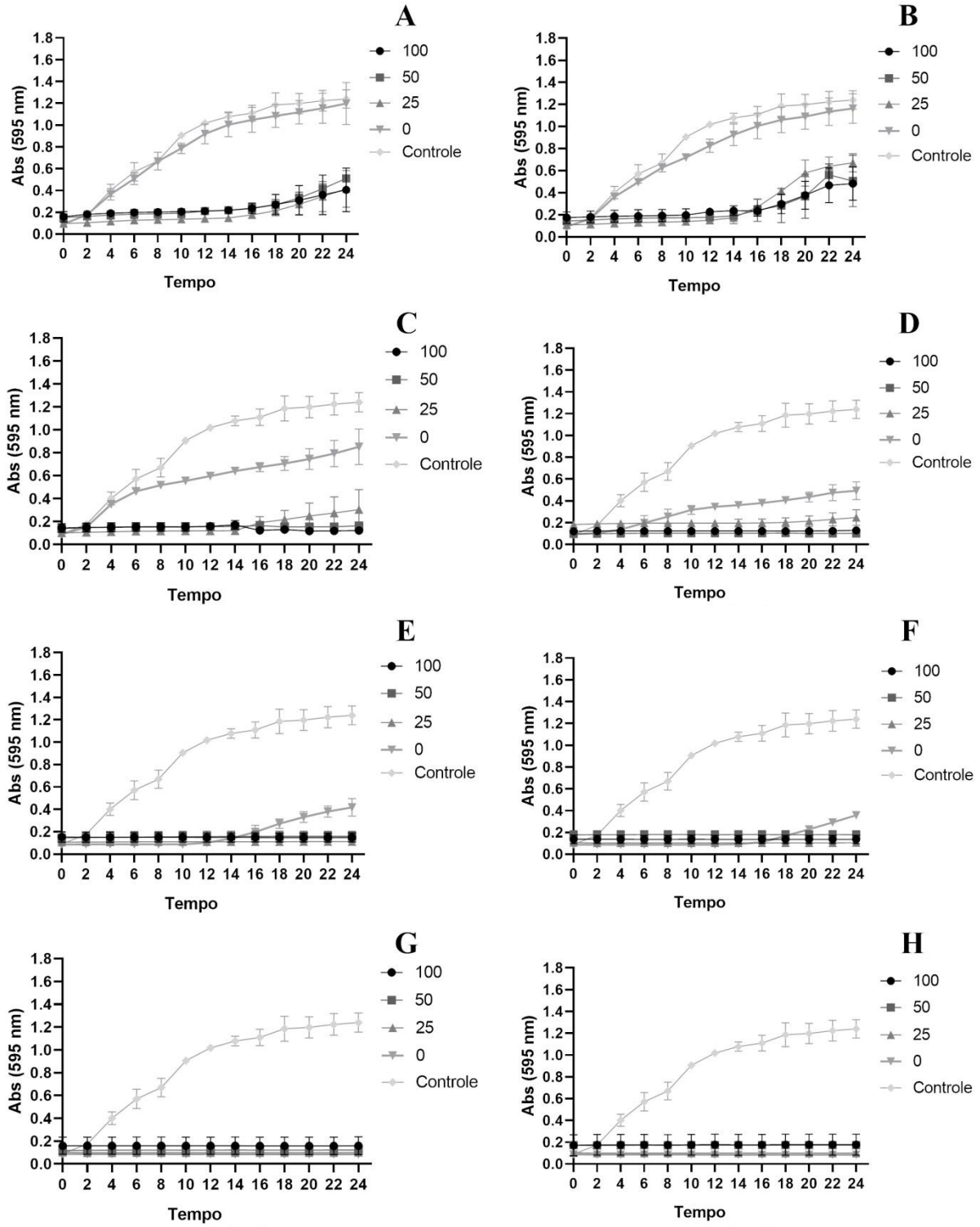

Figura 22: Curvas de crescimento para *S. marcescens* MG1 durante 24h de incubação a 30°C em diferentes concentrações do composto resveratrol em µM (indicado na legenda) e o antibiótico canamicina indicado pelas letras: (A) 4 µg/ml; (B) 8 µg/ml; (C) 16 µg/ml; (D) 32 µg/ml; (E) 64 µg/ml; (F) 128 µg/ml; (G) 256 µg/ml; (H) 512 µg/ml. 0= LB mais canamicina e bactéria; Controle= LB mais DMSO 1%.

4.7. Sensibilidade térmica

O tratamento térmico é um dos métodos mais utilizados para alcançar a segurança microbiana dos alimentos. Entretanto, nos últimos anos, a tendência de aplicação de tratamentos brandos exige uma maior compreensão da dinâmica de inativação térmica para os micro-organismos alvo (Arioli *et al.*, 2019). Os processos de calor tradicionais, objetivando a inativação térmica dos micro-organismos, podem afetar significativamente as propriedades sensoriais dos alimentos. Assim, a segurança microbiológica pode ser alcançada adicionando antimicrobianos às formulações de alimentos. Ultimamente, os consumidores buscam alimentos adicionados de antimicrobianos naturais, como óleos essenciais e compostos fenólicos de plantas, devido à preocupação com os efeitos dos conservantes sintéticos no organismo humano e a busca por um estilo de vida mais saudável (Dogruyol *et al.*, 2020).

Nesse sentido, é necessário buscar novos métodos visando aperfeiçoar os tratamentos antimicrobianos já existentes, bem como melhor entendimento dos mecanismos inibitórios. Reconhecido como fator da fase estacionária de crescimento e na sobrevivência das bactérias diante de condições de estresse, como altas temperaturas, a proteína RpoS é um fator sigma alternativo presente na maioria das bactérias (Gayán *et al.*, 2017). Uma vez que a síntese e atividade RpoS e o mecanismo de QS são relacionados à densidade celular, há uma possível relação entre os dois sistemas regulatórios. Estudos mostram que a expressão do gene AHL sintase *bpsI* e a produção de AHLs são regulados positivamente por RpoS em *Burkholderia pseudomallei* (Wongtrakoongate *et al.* 2012). Em *P. aeruginosa*, RpoS afetou a expressão de mais de 40% de todos os genes regulados por QS (Schuster *et al.*, 2004). Liu *et al.* (2018) também observaram que dois genes homólogos que codificam as AHL sintases continham elementos dependentes de RpoS, sugerindo que RpoS pode ser um regulador chave do QS em *P. fluorescens*.

No presente estudo, foi avaliada a influência dos compostos curcumina e resveratrol na sensibilidade térmica de *A. hydrophila*, S. Montevideo e *S. marcescens*. As **Figuras 23** e **24** mostram o efeito de curcumina e resveratrol adicionados diretamente ao caldo LB sobre a resistência térmica de *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36 em duas temperaturas diferentes, 50° C e 60° C respectivamente. A realização desse ensaio se deve a importância de conhecer a possível resposta bacteriana frente à condição sub-letal do composto fenólico de interesse, aliado a um tratamento comum na indústria alimentícia. É importante, do ponto de vista da indústria, conhecer se a resposta a condição sub-letal induz adaptação e maior resistência térmica ou torna as células mais susceptíveis ao tratamento.

A 50°C, a redução no número das células do controle sem adição de composto foi de 2,15 ciclos logs em 90 minutos, atingindo estabilidade até 120 min, tempo que o experimento durou. Foi possível observar que a adição de curcumina (**Figura 23A**) ao meio de aquecimento proporcionou uma redução dependente da concentração, onde na maior concentração, 12 µM, houve uma redução na população de sobreviventes de 3,06 ciclos log em 120 minutos. A adição de resveratrol (**Figura 23B**) também levou a uma redução dependente da concentração, onde 100 µM reduziram 2,95 ciclos log em 120 minutos de teste. A 60° C, ambos os compostos não apresentaram inibição significativa comparada ao controle (**Figura 24A** e **24B).**

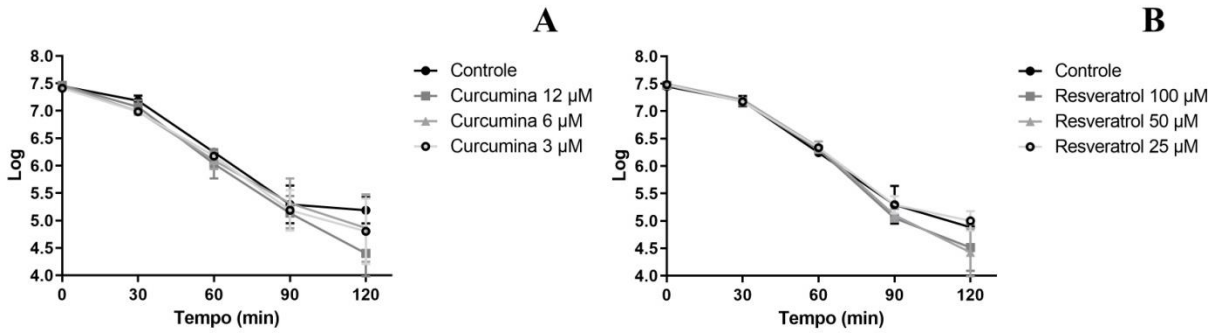

Figura 23: Curvas de sobrevivência de *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36 durante 120 min a 50°C em diferentes concentrações do composto em µM (indicado na legenda); (A) curcumina; (B) resveratrol; Controle= LB mais bactéria.

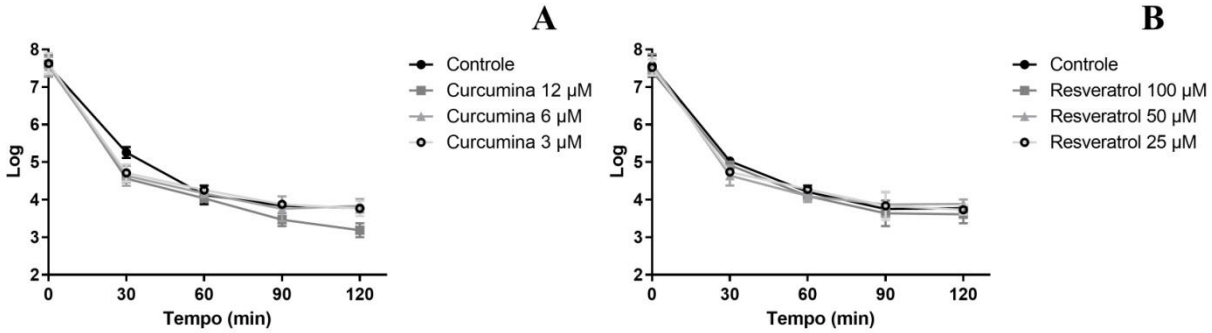

Figura 24: Curvas de sobrevivência de *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36 durante 120 min a 60°C em diferentes concentrações do composto em µM (indicado na legenda); (A) curcumina; (B) resveratrol; Controle= LB mais bactéria.

As **Figuras 25** e **26** mostram o efeito de curcumina e resveratrol adicionados diretamente no caldo LB sobre a resistência térmica de *S.* Montevideo em duas temperaturas diferentes, 50° C e 60° C respectivamente. A 50° C, a redução no número de sobreviventes dos tratamentos avaliados foi de meio ciclo log nos 120 minutos de teste para ambos compostos (**Figura 25**). A

60° C, houve uma redução de 3 ciclos log nos primeiros 30 minutos não apresentando diferença significativa entre os tratamentos e o controle (**Figura 26**).

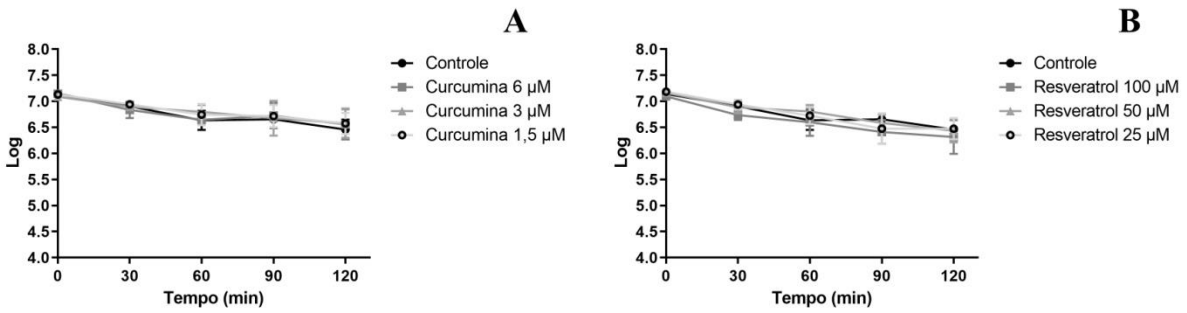

Figura 25: Curvas de sobrevivência *S.* Montevideo durante 120 min a 50°C em diferentes concentrações do composto em µM (indicado na legenda); (A) curcumina; (B) resveratrol; Controle= LB mais bactéria.

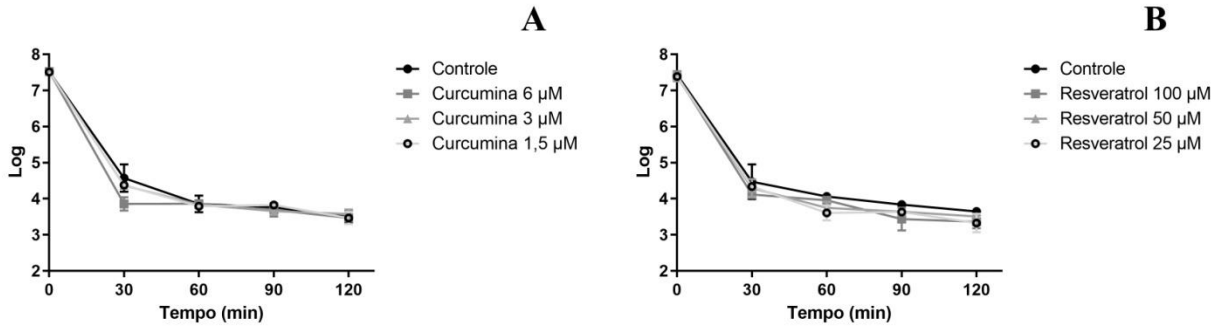

Figura 26: Curvas de sobrevivência *S.* Montevideo durante 120 min a 60°C em diferentes concentrações do composto em µM (indicado na legenda); (A) curcumina; (B) resveratrol; Controle= LB mais bactéria.

As **Figuras 27** e **28** mostram o efeito de curcumina e resveratrol sobre a resistência térmica de *S. marcescens* MG1 a 50°C e 60°C respectivamente. A 50° C, houve uma redução no número de sobreviventes do teste controle de 2,89 ciclos log em 120 minutos. Foi possível observar que a adição de curcumina ao meio favoreceu a redução de forma dependente da concentração, onde a maior concentração, 50 µM, reduziu 3,48 ciclos log em 120 minutos (**Figura 27A**). A adição de resveratrol não apresentou uma redução significativa comparada ao controle (**Figura 27B**). A 60° C, os compostos não apresentaram inibição significativa comparada ao controle (**Figura 28A** e **28B**).

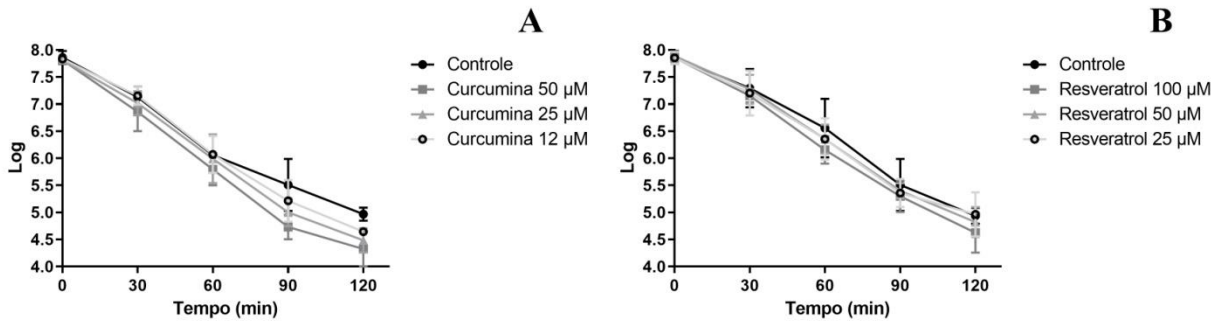

Figura 27: Curvas de sobrevivência *S. marcescens* MG1 durante 120 min a 50°C em diferentes concentrações do composto em µM (indicado na legenda); (A) curcumina; (B) resveratrol; Controle= LB mais bactéria.

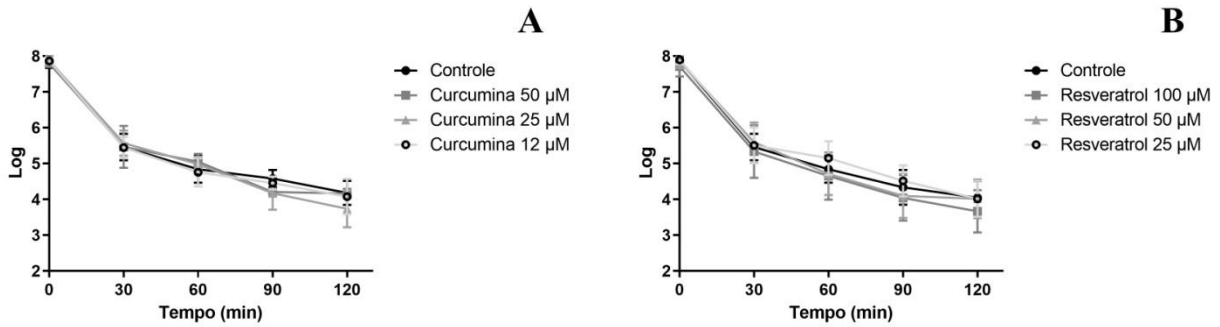

Figura 28: Curvas de sobrevivência *S. marcescens* MG1 durante 120 min a 60°C em diferentes concentrações do composto em µM (indicado na legenda); (A) curcumina; (B) resveratrol; Controle= LB mais bactéria.

Vários autores testaram conbinações de antimicrobianos com temperatura e obtiveram resultados promissores. Um exemplo foi a adição de vanilina ao leite, atingindo uma redução de 25% no tempo necessário para reduzir 4 ciclos log na população de *L. monocytogenes* (Cava-Roda *et al.*, 2012). Reduções na resistência térmica também foram observadas para *E. coli* O157:H7 em suco de laranja ao combinar calor com limoneno ou óleo essencial de laranja (Espina *et al.*, 2014). Esses efeitos podem ser justificados em termos de inativação de células, pela atuação conjunta de calor e compostos antimicrobianos (Maté *et al.*, 2016).

5. CONCLUSÃO

Os experimentos mostram que os compostos fenólicos possuem potencial de atividade *quorum quenching* em bactérias de origem alimentar. Dos compostos selecionados *in silico*, ácido gálico, capsaicina, curcumina, floridzina e resveratrol apresentaram maior interação com a proteína CviR de *C. violaceum*. Destes compostos, curcumina e resveratrol apresentaram melhor atividade frente aos fenótipos avaliados como produção de violaceína por *C. violaceum* ATCC 12472 e 026, motilidade tipo *swarming* e *swimming*, formação de biofilme, resistência ao antibiótico canamicina e sensibilidade térmica de *A. hydrophila* IOC/FDA 110-36, *S.* Montevideo e *S. marcescens* MG1. Pode-se observar que as inibições foram variáveis entre os compostos e suas concentrações e as bactérias estudadas, mostrando que mesmo sendo bactérias Gram negativas suas respostas aos compostos são diferentes. Por fim, este estudo auxilia na compreensão da atividade QQ dos compostos fenólicos frente a diversos fenótipos regulados em diferentes estirpes de importância alimentar, mostrando que ainda não há um composto que atinge efetivamente todos os grupos bacterianos, mas que há uma especificidade nos mecanismos de inibição desses fenótipos.

6. REFERÊNCIAS

AHMED, S. A. K.S.; RUDDEN, M.; SMYTH, T. J.; DOOLEY, J. S. G.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M. Natural quorum sensing inhibitors effectively down regulate gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103, 3521-3535, 2019. doi:10.1007/s00253-019-09618-0

ALLEN, R. C.; POPAT, R.; DIGGLE, S. P.; BROWN, S. P. Targeting virulence: can we make evolution-proof drugs? *Nature Reviews Microbiology*, 12, 300-308, 2014. doi: 10.1038/nrmicro3232

ALMEIDA, F. A.; CARNEIRO, D. G.; MENDES, T. A. O.; BARROS, E.; PINTO, U. M.; OLIVEIRA, L. L. N-dodecanoyl-homoserine lactone influences the levels of thiol and proteins related to oxidation-reduction process in *Salmonella*. *Plos One*, 13 (10), e0204673, 2018a. doi: 10.1371/journal.pone.0204673

ALMEIDA, F. A.; VARGAS, E. L. G.; CARNEIRO, D. G.; PINTO, U. M.; VANETTI, M. C. D. Virtual screening of plant compounds and nonsteroidal anti-inflammatory drugs for inhibition of quorum sensing and biofilm formation in *Salmonella*. *Microbial Pathogenesis*, 121, 369-388, 2018b. doi: 10.1016/j.micpath.2018.05.014

ALMEIDA, F.A.; PINTO, U.M.; VANETTI, M. C. D. Novel insights from molecular docking of SdiA from *Salmonella Enteritidis* and *Escherichia coli* with quorum sensing and quorum

quenching molecules. *Microbial Pathogenesis*, 99, 178-190, 2016. doi: 10.1016/j.micpath.2016.08.024

ALVAREZ, M. V.; ORTEGA-RAMIREZ, L. A.; GUTIERREZ-PACHECO, M. M.; BERNAL-MERCADO, A. T.; RODRIGUEZ-GARCIA, I.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A.; PONCE, A.; MOREIRA, M. R.; ROURA, S. I.; AYALA-ZAVALA, J. F.. Oregano essential oil-pectin edible films as anti-quorum sensing and food antimicrobial agents. *Frontiers in Microbiology*, 5, 699, 2014. doi: 10.3389/fmicb.2014.00699

ARIOLI, S.; MONTANARI,C.; MAGNANI, M.; TABANELLI, G.; PATRIGNANI, F.; LANCIOTTI, R.; MORA, D.; GARDINI, F. Modelling of *Listeria monocytogenes* Scott A after a mild heat treatment in the presence of thymol and carvacrol: Effects on culturability and viability. *Journal of Food Engineering*, 240, 73-82, 2019. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2018.07.014

ASWATHANARAYAN, J. B.; VITTAL, R. R. Inhibition of biofilm formation and quorum sensing mediated phenotypes by berberine in *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella* Typhimurium. *RSC Advances***,** 8, 36133-36141, 2018. doi: 10.1039/c8ra06413j

AYAZ, M.; ULLAH, F.; SADIQ, A.; ULLAH, F.; OVAIS, M.; AHMED, J.; DEVKOTA, H. P. Synergistic interactions of phytochemicals with antimicrobial agents: Potential strategy to counteract drug resistance. *Chemico-Biological Interactions*, 308(1), 294-303, 2019. doi: 10.1016/j.cbi.2019.05.050

BAI, A. J.; RAI, V. R. Bacterial quorum sensing and food industry. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*, 10(3), 183-193, 2011. doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00150.x

BALI, E. B.; TÜRKMEN, K. E.; ERDÖNMEZ, D.; SAGLAM, N. Comparative study of inhibitory potential of dietary phytochemicals against quorum sensing activity of and biofilm formation by *Chromobacterium violaceum* 12472, and swimming and swarming behaviour of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Food Technology and Biotechnology***,** 57(2), 2019. doi:10.17113/ftb.57.02.19.5823

BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; LAGANÁ, G.; GINESTRA, G.; BISIGNANO, C. Biochemical and antimicrobial activity of phloretin and its glycosilated derivatives present in apple and kumquat. *Food Chemistry*, 160(1), 292-297, 2014.doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.118

BASITH, S.; CUI, M.; HONG, S.; CHOI, S. Harnessing the therapeutic potential of capsaicin and its analogues in pain ans other diseases. *Molecules*, 21 (8), 966, 2016. doi: 10.3390/molecules21080966

BELHAOUES, S.; AMRI, S.; BENSOUILAH, M. Major phenolic compounds, antioxidant and antibacterial activities of *Anthemis praecox* Link aerial parts. *South African Journal of Botany*, 131, 200-205, 2020. doi: 10.1016/j.sajb.2020.02.018

BIJTENHOORN, P.; MAYERHOFER, H.; MÜLLER-DIECKMANN, J.; UTPATEL, C.; SCHIPPER, C.; HORNUNG, C.; SZESNY, M.; GROND, S.; THÜRMER, A.; BRZUSZKIEWICZ, E.; DANIEL, R.; DIERKING, K.; SCHULENBURG, H.; STREIT, W. R. A novel metagenomics short-chain dehydrogenase/reductase attenuates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence on *Caenorhabditis elegans*. *Plos One*, 6(10), e26278, 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0026278

BJARNSHOLT, T.; GENNIP, M. V.; JAKOBSEN, T. H.; CHRISTENSEN, L. D.; JENSEN, P. O.; GIVSKOV, M. In vitro screens for quorum sensing inhibitors and in vivo confirmation of their effect. *Nature Protocols*, 5(2), 282-293, 2010. doi: 10.1038/nprot.2009.205

BJARNSHOLT, T.; JENSEN, P. Ø.; RASMUSSEN, T. B.; CHRISTOPHERSEN, L.; CALUM, H.; HENTZER, M.; HOUGEN, H.P.; RYGAARD, J.; MOSER, C.; EBERL, L.; HØIBY, N.; GIVSKOV, M. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology*, 151(12), 3873-3880, 2005. doi: 10.1099/mic.0.27955-0

BOCQUET, L.; SAHPAZ, S.; BONNEAU, N.; BEAUFAY, C.; MAHIEUX, S.; SAMAILLIE, J.; ROUMY, V.; JACQUIN, J.; BORDAGE, S.; HENNEBELLE, T.; CHAI, F.; QUETIN-LECLERCQ, J.; NEUT, C.; RIVIÈRE, C. Phenolic compounds from *Humulus lupulus* as natural antimicrobial products: new weapons in the fight against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma brucei* strains. *Molecules*, 24(6), 1024, 2019. doi:10.3390/molecules24061024

BORGES, A.; FERREIRA, C.; SAAVEDRA, M. J.; SIMÕES, M. Atividade antibacteriana e modo de ação dos ácidos ferúlico e gálico contra bactérias patogênicas. *Microbial Drug Resistance*, 19(4), 256–65, 2013. doi: 10.1089/mdr.2012.0244

BORGES, A.; SERRA, S.; ABREU, A. C.; SAAVEDRA, M. J.; SALGADO, A.; SIMÕES, M. Avaliação dos efeitos de fitoquímicos selecionados na inibição da detecção de quorum e citotoxicidade in vitro. *Biofouling*, 30(2), 183–95, 2014. doi: 10.1080/08927014.2013.852542

BRACKMAN, G.; HILLAERT, U.; VAN CALENBERGH, S.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Use of quorum sensing inhibitors to interfere with biofilm formation and development in *Burkholderia multivorans* and *Burkholderia cenocepacia*. *Research in Microbiology*, 160(2), 144–51, 2009.doi: 10.1016/j.resmic.2008.12.003

CANNATELLI, A.; PRINCIPATO, S.; COLAVECCHIO, O. L.; PALLECCHI, L.; ROSSOLINI, G. M. Synergistic activity of colistin in combination with resveratrol against colistin-resistant gram-negative pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1808, 2018. doi: 10.3389/fmicb.2018.01808

CARETTE, J.; NACHTERGAEL, A.; DUEZ, P.; JAZIRI, M.; RASAMIRAVAKA,T. Natural Compounds Inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by Targeting Quorum Sensing circuitry [Online First], *IntechOpe*n, 2020. doi: 10.5772/intechopen.90833

CARLSON-BANNING, K. M.; SPERANDIO, V. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* outwits hosts through sensing small molecules. *Current Opinion in Microbiology*, 41, 83-88, 2018.doi: 10.1016/j.mib.2017.12.002

CARVALHO, F. M.; MARTINS, J. T. A.; LIMA, E. M. F.; SANTOS, H. V.; PEREIRA, P. A. P.; PINTO, U. M.; CUNHA, L. R. *Pitanga* and *grumixama* extracts: antioxidant and antimicrobial activities and incorporation into cellulosic films against *Staphylococcus aureus*. *Research, Society and Development*, 9 (11), e1759119362, 2020. doi: 10.33448/rsd-v9i11.9362

CASTRO, H. G. *et al. Contribuição ao estudo das plantas medicinais:* metabólitos secundários. 2. ed. Viçosa: UFV, p. 113, 2004.

CAVA-RODA, R.M.; TABOADA, A.; PALOP, A.; LÓPEZ-GÓMEZ, A.; MARIN-INIESTA, F. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in semi-skim Milk supplemented with vanillin. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 314-318, 2012. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.003

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. (2019). Biggest Threat and Data. Disponível em: https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html. Acesso em: 07/12/2020.

CELLINI, A.; DONATI, I.; FIORENTINI, L.; VANDELLE, E.; POLVERARI, A.; VENTURI, V.; BURIANI, G.; VANNESTE, J. L.; SPINELLI, F. N-Acyl homoserine lactones and Lux solos regulate social behavior and virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidae. Microbial Ecology*, 79, 383-396, 2020. doi: 10.1007/s00248-019-01416-5

CHEN, G.; SWEM, L. R.; SWEM, D. L.; STAUFF, D. L.; O'LOUGHLIN, C. T.; JEFFREY, P. D.; BASSLER, B. L.; HUGHSON, F. M. A strategy for antagonizing quorum sensing. *Molecular Cell*, 42 (2), 199-209, 2011. doi: 10.1016/j.molcel.2011.04.003

CHEYNIER, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 223S-9S, 2005.doi: 10.1093/ajcn/81.1.223S

CHO, H. S.; LEE, J. H.; RYU, S. Y.; JOO, S. W.; CHO, M. H.; LEE, J. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation by plant metabolite ε-Viniferin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(29), 7120-7126, 2013. doi: 10.1021/jf4009313

CHRISTENSEN, A. B.; RIEDEL, K.; EBERL, L. FLODGAARD, L. R.; MOLIN, S.; GRAM, L.; GIVSKOV, M. Quorum-sensing-direct protein expression in *Serratia proteamaculans* B5a. *Microbiology***,** 149(2), 2003.doi: 10.1099/mic.0.25575-0

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement. CLSI, M100-S17, Wayne, PA, 29 (3), 2007.

CORRAL-LUGO, A.; DADDAOUA, A.; ORTEGA, A.; URGEL, M. E.; KRELL, T. Rosmarinic acid is a homoserine lactone mimic produced by plants that activates a bacterial quorum-sensing regulator. *Science Signaling*, 9(409), 1-10, 2016.doi: 10.1126/scisignal.aaa8271

DEFOIRDT, T.; BRACKMAN, G.; COENYE, T. Quorum sensing inhibitors: how strong is the evidence? *Trends in Microbiology*, 21 (12), 619-624, 2013. doi: 10.1016/j.tim.2013.09.006

DING, T.; LI, T.; LI, J. Impact of curcumin liposomes with anti-quorum sensing properties against foodborne pathogens *Aeromonas hydrophila* and *Serratia grimesii*. *Microbial Pathogenesis*, 122, 137-143, 2018. doi: 10.1016/j.micpath.2018.06.009

DING, T.; LI, T.; WANG, Z.; LI, J. Curcumin liposomes interfere with quorum sensing of *Aeromonas sobria* and in silico analysis. *Scientific reports***,** 7(8612), 2017.doi: 10.1038/s41598-017-08986-9

DOGRUYOL, H.; MOL, S.; COSANSU, S. Increased thermal sensitivity of *Listeria monocytogenes* in sous-vide salmon by oregano essential oil and citric acid. *Food Microbiology*, 90, 103496, 2020. doi: 10.1016/j.fm.2020.103496

DUARTE, A.; ALVES, A. C.; FERREIRA, S.; SILVA, F.; DOMINGUES, F. C. Resveratrol inclusion complexes: antibacterial and anti-biofilm activity against *Campylobacter* spp. and *Arcobacter butzleri*. *Food Research International*, 77(2), 244-250, 2015. doi: 10.1016/j.foodres.2015.05.047

ESPINA, L.; CONDÓN, S.; PAGÁN, R.; GARCÍA-GONZALO, D. Synergistic effect of orange essential oil or (+)-limonene with heat treatments to inactivate *Escherichia coli* O157:H7 in orange juice at lower intensities while maintaining hedonic acceptability. *Food and Bioprocess Technology*, 7, 471-481, 2014. doi: 10.1007/s11947-013-1076-x

GALIÉ, S.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, C.; MIGUÉLEZ, E. M.; VILLAR, C. J.; LOMBÓ, F. Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Frontiers in Microbiology*, 9, 898, 2018. doi: 10.3389 / fmicb.2018.00898

GAYÁN, E.; CAMBRÉ, A.; MICHIELS, C. W.; AERTSEN, A. RpoS-independent evolution reveals the importance of attenuated cAMP/ CRP regulation in high hydrostatic pressure resistance acquisition in *E. coli*. *Scientific Reports*, 7(8600), 2017. doi: 10.1038/s41598-017-08958-z

GE, C.; SHENG, H.; CHEN, X.; SHEN, X.; SUN, X.; YAN, Y.; WANG, J.; YUAN, Q. Quorum sensing system used as a tool in metabolic engineering. *Biotechnology Journal*, 2020. doi: 10.1002/biot.201900360

GRANDCLÉMENT, C.; TANNIÈRES, M.; MORÉRA, S.; DESSAUX, Y.; FAURE, D. Quorum quenching: role in nature and pplied developments. *FEMS Microbiology Reviews*, 40, 86-116, 2016. doi:10.1093/femsre/fuv038

GUTIÉRREZ-DEL-RIO, I.; FERNÁNDEZ, J.; LOMBÓ, F. Plant nutraceuticals as antimicrobial agents in food preservation: terpenoids, polyphenols and thiols. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52 (3), 309–315, 2018. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.04.024

HAWVER, L. A.; JUNG, S. A., WAI-LEUNG, N. G. Specificity and complexity in bacterial quorum-sensing systems. *FEMS Microbiology Reviews*, 14(40),738–752, 2016.doi: 10.1093/femsre/fuw014

HENSE, B. A.; KUTTLER, C.; MÜLLER, J.; ROTHBALLER, M.; HARTMANN, A.; KREFT, J. U. Does efficiency sensing unify diffusion and quorum sensing? *Nature Reviews Microbiology*, 5, 230-239, 2007. doi: 10.1038/nrmicro1600

HENTZER, M.; GIVSKOV, M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections.*The Journal of Clinical Investigation*, 112(9), 1300-1307, 2003.doi: 10.1172/JCI20074

HUSAIN, F. M., AHMAD, I.; KHAN, F. I.; AL-SHABIB, N. A.; BAIG, M. H.; HUSSAIN, A.; REHMAN, M. T.; ALAJMI, M. F.; LOBB, K. A. Seed extract of *Psoralea corylifolia* and its constituent bakuchiol impairs AHL-based quorum sensing and biofilm formation in food- and human-related pathogens. *Frontiers in Celular and Infection Microbiolody*. 8, 351, 2018. doi: 10.3389/fcimb.2018.00351

HUSAIN, F. M.; AHMAD, I.; KHAN, M. S.; AHMAD, E.; TAHSEEN, Q.; KHAN, M. S.; ALSHABIB, N. A. Sub-MICs of *Mentha piperita* essential oil and menthol inhibits AHL mediated quorum sensing and biofilm of Gram-negative bacteria. *Frontiers in Microbiology*,6, 420, 2015.doi: 10.3389/fmicb.2015.00420

HUSSAIN, M. B. B. M.; ZHANG, H. B.; XU, J. L.; LIU, Q.; JIANG, Z.; ZHANG, L. H. The acyl-homoserine lactone-type quorum-sensing system modulates cell motility and virulence of E*rwinia chrysanthemi* pv. zeae. *Journal of Bacteriology*, 190(3), 1045-1053, 2008. doi: 10.1128/JB.01472-07

JAKOBSEN, T. H.; BRAGASON, S. K.; PHIPPS, R. K.; CHRISTENSEN, L. D.; GENNIP, M. V.; ALHEDE, M.; SKINDERSOE, M.; LARSEN, T. O. HOIBY, N. BJARNSHOLT, T. GIVSKOV, M.. Food as a source for quorum sensing inhibitors: iberin from horseradish revealed as a quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(7), 2410-2420, 2012.doi: 10.1128/AEM.05992-11

JANG, Y. S.; MOSOLYGÓ, T. Inhibition of bacterial biofilm formation by phytotherapeuties with focus on overcoming antimicrobial resistance. *Current Pharmaceutical Design*, 26, 1-10, 2020. doi: 10.2174/1381612826666200212121710

JIMENEZ, P. N.; KOCH, G.; PAPAICANNOU, E.; WAHJUDI, M.; KRZESIAK, J.; COENYE, T.; COOL, R. H.; QUAX, W. J. Role of PvdQ in *Pseudomonas aeruginosa* virulence under iron-limiting conditions. *Microbiology*, 156(1), 49-59, 2010.doi: mic.sgmjournals.org/content/156/1/49.full

KALI, A.; BHUVANESHWAR, D.; CHARLES, P. M. V.; SEETHA, K. S. Antibacterial synergy of curcumin with antibiotics against biofilm producing clinical bacterial isolates. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 7(3), 93-96, 2016. doi: 10.4103/0976-0105.183265

KALIA, V. C. Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnology Advances*, 31(2), 224-45, 2013.doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.10.004

KALIA, V. C.; PATEL, S. K. S.; KANG, Y.C.; LEE, J. K. Quorum sensing inhibitors as antipathogens: biotechnological application. *Biotechnology Advances*, 37(1), 68-90, 2019. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.006

KIM, C. S. *et al.* Characterization of autoinducer-3 structure and biosynthesis in *E. coli. ACS Central Science,* 6(2), 197-206, 2020. doi: 10.1021/acscentsci.9b01076

KIM, H-S.; LEE, S-H.; BYUN, Y.; PARK, H-D. 6-Gingerol reduces *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence via quorum sensing inhibition. *Scientific Reports*, 5(8656), 1-11, 2015.doi: 10.1038/srep08656

KIM, T. J.; WENG, W. L.; SILVA, J. L.; JUNG, Y. S.; MARSHALL, D. Identification of Natural antimicrobial substances in red muscadine juice against *Cronobacter sakazakii. Journal of Food Science,* 75(3), 2010.doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01531.x

KLANCNIK, A.; SIKIÉ, P. M.; TROST, K.; TUSEK, Z. M.; MOZETIC, V. B.; SMOLE, M. S. Anti- Campylobacter activity of resveratrol and an extract from waste *Pinot noir* grape skins and seeds, and resistance of *Camp. jejuni* planktonic and biofilm cells, mediated via the CmeABC efflux pump. *Journal of Applied Microbiology*, 122(1), 65-77, 2017. doi: 10.1111/jam.13315

KUMAR, N. V.; MURTHY, P. S.; MANJUNATHA, J. R.; BETTADAIAH, B. K. Synthesis and quorum sensing inhibitory activity of key phenolic compounds of ginger and their derivatives. *Food Chemistry*, 159, 451–457, 2014.doi: 10.1016/j.foodchem.2014.03.039

LADE, H.; PAUL, D.; KWEON, J. H. Combined effects of Curcumin and (-)-Epigallocatechin gallate on inhibition of N-acylhomoserine lactone-mediated biofilm formation in wastewater bacteria from membrane bioreactor. *Journal Microbiology Biotechnology,* 25(11), 1908-1919, 2015. doi: 10.4014/jmb.1506.06010.

LADE, H.; PAUL, D.; KWEON, J. H. Quorum quenching mediated approaches for control os membrane biofouling. *International Journal of Biological Sciences,* 10, 550-565, 2014.doi: 10.7150/ijbs.9028

LALSIAMTHARA, J.; LEE, J. H. Pathogenic traits of *Salmonella* Montevideo in experimental infections *in vivo* and *in vitro. Scientific Reports,* 7(46232), 2017.doi: 10.1038/srep46232

LASARRE, B.; FEDERLE, M. J. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiology Molecular Biolology Reviews*, 77(1), 73-111, 2013.doi: 10.1128/MMBR.00046-12

LEE, J. H.; CHO, H. S.; JOO, S. W.; REGMI, S. C.; KIM, J. A.; RYU, C. M.; RYU, S. Y.; CHO, M. H.; LEE, J. Diverse plant extracts and trans-resveratrol inhibit biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* O157:H7. *Biofouling*, 29(10), 1189-1203, 2013. doi: 10.1080/08927014.2013.832223

LEE, J. H.; REGMI, S. C.; KIM, J.; CHO, M. H.; YUN, H.; LEE, C.; LEE, J. Apple flavonoid phloretin inhibits *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation and meliorates colon in inflammation in rats. *Infection and Immunity***,** 79(12), 4819-4827, 2011.doi: 10.1128/IAI.05580-11

LEE, J.; ZHANG, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*, 6 (1), 26-41, 2015. doi: 0.1007/s13238-014-0100-x

LEI, Y.; HOU, H. M.; ZHANG, G. L.; WANG, Y. F.; HAO, H. S. AHLs regulate biofilm formation and swimming motility of *Hafnia alvei* H4. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1230, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.01330

LI, T.; CUI, F.; BAI, F.; ZHAO, G.; LI, J. Involvement of acylated homoserine lactones (AHLs) of *Aeromonas sobria* in spoilage of refrigerated turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Sensors*, 16 (7), 1083, 2016.doi: 10.3390/s16071083

LIMA, E. M. F.; QUECÁN, B. X. V.; CUNHA, L. R. FRANCO, B. D. G. .M.; PINTO, U. M. Cell-Cell communication in Lactic Acid Bacteria. In: ALBUQUERQUE, M. A. C. ; LEBLANC, A. M.; LEBLANC, J. G.; BEDANI, R (ed.) **Lactic acid bacteria – A functional approach**. 1. ed. CRC Press, 2020. 14 p. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/339795790_Cell-Cell_Communication_in_Lactic_Acid_Bacteria_Potential_Mechanisms. Acesso em: 22 dez. 2020.

LIMA, M. C.; SOUSA, C. P.; PRADA, C. F.; HAREL, J.; DUBREUIL, J. D.; DOUZA, E. L. A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 130, 259-270, 2019. doi: 10.1016/j.micpath.2019.03.025

LIU, L.; BECK, C.; NOHR-MELDGAARD, K.; PESCHEL, A.; KRETSCHMER, D.; INGMER, H.; VESTERGAARD, M. Inhibition of the ATP synthase sensitizes *Staphylococcus aureus* toward human antimicrobial peptides. *Scientific Reports*, 10(11391), 2020a. doi: 10.1038/s41598-020-68146-4

LIU, L.; YU, J.; SHEN, X.; CAO, X.; ZHAN, Q.; GUO, Y.; YU, F. Resveratrol enhances the antimicrobial effect of polymyxin B on *Klebsiella pneumonia* and *Escherichia coli* isolates with polymycin B resistance. *BMC Microbiology*, 20(306), 2020b. doi: 10.1186/s12866-020-01995-1

LIU, X.; JI, L.; WANG, X.; LI, J.; ZHU, J.; SUN, A. Role of RpoS in stress resistance, quorum sensing and spoilage potential of *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Food Microbiology*, 270, 31-38, 2018. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.011

LIU,M.; GRAY, J.M.; GRIFFITHS, M.W. Occurrence of proteolytic activity and N-acyl-homoserine lactone signals in the spoilage of aerobically chill-stored proteinaceous raw foods. *Journal of Food Protection*, 69 (11), 2729-2737, 2006.doi: 10.4315/0362-028X-69.11.2729

MACHADO, I.; SILVA, L. R.; GIAOURIS, E. D.; MELO, L. F.; SIMÕES, M. Quorum sensing in food spoilage and natural-based strategies for its inhibition. *Food Research International*, 127, 108754, 2020.doi: 10.1016/j.foodres.2019.108754

MAGI, G.; MARINI, E.; FACINELLI, B. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin against clinical erythromycin-resistant Group A *Streptococci. Frontiers in Microbiology*, 6, 165. 2015. doi: 10.3389/fmicb.2015.00165

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L.. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(5),727–47, 2004.doi: 10.1093/ajcn/79.5.727

MANGOUDEHI, H. T.; ZAMANI, H.; SHAHANGIAN, S. S.; MIRZANEJAD, L. Effect of curcumin on the expression of *ahyI/R* quorum sensing genes and some associated phenotypes in pathogenic *Aeromonas hydrophila* fish isolares. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(70), 2020. doi: 10.1007/s11274-020-02846-x

MARTINS, M. L.; PINTO, U. M.; RIEDEL, K.; VANETTI, M. C. D. Quorum sensing and spoilage potential of psychrotrophic *Enterobacteriaceae* isolated from milk. *BioMed Research International*, 2018, 2018. doi: 10.1155/2018/2723157

MATÉ, J.; PEIAGO, P. M.; PALOP, A.When nanoemulsified, D-limonene reduces *Listeria monocytogenes* heat resistance about one hundred times. *Food Control*, 59, 824-828, 2016. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.07.020

MION, S.; RÉMY, B.; PLENER, L.; BRÉGEON, F.; CHABRIÈRE, E., DAUDÉ, D. Quorum quenching lactonase strengthens bacteriophage and antibiotic arsenal against *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Frontiers in Microbiology, 10:2049, 2019. doi: 10.3389/fmicb.2019.02049

MONNET, V.; JUILLARD, V.; GARDAN, R. Peptide conversations in Gram-positive bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*. 43(3), 339-351, 2014. doi: 10.3109/1040841X.2014.948804

MORÁN, A.; GUTIÉRREZ, S.; MARTÍNEZ-BLANCO, H.; FERRERO, M. A.; MONTEAGUDO-MERA, A. RODRÍGUEZ-APARICIO, L. B. Non-toxic plant metabolites regulate *Staphylococcus* viability and biofilm formation: a natural therapeutic strategy useful in the treatment and prevention of skin infections. *Biofouling*, 30(10), 1175-1182, 2014. doi: 10.1080/08927014.2014.976207

MORENO-GÁMEZ, S.; SORG, R.A.; DOMENECH, A.; KJOS, M.; WEISSING, F. J.; DOORN, S. V.; VEENING, J. W. Quorum sensing integrates environmental cues, cell density and

cell history to control bacterial competence. *Nature Communications*, 8, 854, 2017.doi: 10.1038/s41467-017-00903-y

MUKHERJEE, S.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews Microbiology*, 17, 371-382, 2019. doi: 10.1038/ s41579-019-0186-5

MUN, S. H.; JOUNG, D. K.; KIM, Y. S.; KANG, O. H.; KIM, S. B.; SEO, Y. S.; KIM, Y. C.; LEE, D. S.; SHIN, D. W.; KWEON, K. T.; KWON, D. Y. Synergistic antibacterial effect of curcumin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine*, 20(8-9), 714-718, 2013. doi: 10.1016/j.phymed.2013.02.006

MUN, S.H.;KIM, S.B.; KONG, R.; CHOI, J.G; KIM, Y.C.; SHIN, D.W.; KANG, O.H.; KWON, D.Y. Curcumin reverse methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 19(11), 18283-18295, 2014. doi: 10.3390/molecules191118283

NAZIR, N.; NISAR, M.; AHMAD, S.; WADOOD, S.F.; JAN, T.; ZAHOOR, M.; AHMAD, M.; ULLAH, A. Characterization of phenolic compounds in two novel lines of *Pisum sativum* L. along with their in vitro antioxidant potential. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 7639-7646, 2020. doi: 10.1007/s11356-019-07065-y

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R. Quorum sensing and phytochemicals. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 12607-12619, 2013.doi: 10.3390/ijms140612607

NEALSON, K. H.; HASTINGS, J. W. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiology Reviews*, 43(4), 496-518, 1979. PMCID: PMC281490

NG, W. L.; PEREZ, L. J.; WEI, Y.; KRAML, C.; SEMMELHACK, M. F.; BASSLER, B. L. Signal production and detection specificity in *Vibrio* CqsA/CqsS quorum-sensing systems. *Molecular Microbiology*, 79(6), 1407-1417, 2011.doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07548.x

O'MAY, C.; TUFENKJI, N. The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9), 3061-3067, 2011. doi: 10.1128/AEM.02677-10

OH, E. JEON, B. Synergistic ant-*Campylobacter jejuni* activity of fluoroquinolone and macrolide antibiotics with phenolic compounds. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1129, 2015.doi: 10.3389/fmicb.2015.01129

OLIVEIRA, B. D`A.; RODRIGUES, A. C.; CARDOSO, B. M. I.; RAMOS, A. L. C.; BERTOLDI, M. C.; TAYLOR, J.; CUNHA, L. R.; PINTO, U. M. Antioxidant, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of *Rubus rosaefolius* phenolic extract. *Industrial Crops and Products*, 84, 59-66, 2016. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.01.037

PACKIAVATHY, I. A. S. V.; PRIYA, S. S. K. P.; RAVI, A. V. Inhibition of biofilm development of uropathogens by curcumin – An anti-quorum sensing agent from *Curcuma longa*. *Food Chemistry*, 148, 453–460, 2014.doi:10.1016/j.foodchem.2012.08.002

PAPADOPOULOU, C.; SOULTI, K.; ROUSSIS, I. G. Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli* and *Candida Albicans*. *Food Technology and Biotechnology*, 43(1), 41-46, 2005.doi: 663.22:547.56:579.61:616-092

PAPENFORT, K.; BASSLER, B. L. Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14, 576–588, 2016. doi: 10.1038/nrmicro.2016.89

PETROVIÉ, A. D. C.; GLAMOČLIJA, J. M.; SMILJKOVIÉ, M. S.; NIKOLIÉ, M. M.; STOJKOVIÉ, D. S.; SOKOVIÉ, M. D. Natural products as biofilm formation antagonists and regulators of quorum sensing functions: A comprehensive review update and future trends. *South African Journal of Botany*, 120, 65-80, 2019. doi: 10.1016/j.sajb.2018.09.010

QIN, N.; TAN, X.; JIAO, Y.; LIU, L.; ZHAO, W.; YANG, S.; AIQUN, J. RNA-Seq-based transcriptome analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm inhibition by ursolic acid and resveratrol. *Scientific Reports*, 4(5467), 2014. doi: 10.1038/srep05467

QUECÁN, B. X. V.; SANTOS, J. T. S.; RIVERA, M. L. C.; HASSIMOTO, N. M. A.; ALMEIDA, F. A.; PINTO, U. M. Effect of quercetin rich onion extracts on bacterial quorum sensing. *Frontiers in Microbiology*, 10, 867, 2019.doi: 10.3389/fmicb.2019.00867

QUECÁN, B.X.V.; RIVERA, M.L.C.; PINTO, U.M. Bioactive phytochemicals targeting microbial activities mediated by quorum sensing. In: Kalia V. (ed) *Biotechnological Applications of Quorum Sensing Inhibitors*. Springer, Singapore, 2018.

RAVICHANDRAN, V.; ZHONG, L.; WANG, H.; YU, G.; ZHANG, Y.; LI, A. Virtual screening and biomolecular interactions of CviR-based quorum sensing inhibitors against Chromobacterium violaceum. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology*, 8, 292, 2018. doi: 10.3389/fcimb.2018.00292

REIS, P. R.; PINTO, U. M.; RIBON, A. D. O. B.; BAZZOLLI D. M. S.; VANETTI, M. C. D. Quorum sensing regulated phenotypes in *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 deficient in AHL production. *Annals of Microbiology*, 66(3), 1117-1126, 2016. doi: 10.1007/s13213-016-1196-4

RICE, S. A.; KOH, K. S.; QUECK, S. Y.; LABBATE, M.; LAM, K. W.; KJELLEBERG, S. Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *Journal of Bacteriology*, 187 (10), 3477-3485, 2005. doi: 10.1128/JB.187.10.3477-3485.2005

RIVERA, M. L. C.; HASSIMOTTO, N. M. A.; BUERIS, V.; SIRCILI, M. P.; ALMEIDA, F. A.; PINTO, U. M. Effect of *Capsicum frutescens* extract, capsaicin, and luteolin on quorum sensing regulated phenotypes. *Journal of Food Science*, 84:6, 1477-1486, 2019.doi: 10.1111/1750-3841.14648

RODRIGUES A. C; ZOLA, F. G.; OLIVEIRA, B. D'A, SACRAMENTO, N. T. B; SILVA, E. R.; BERTOLDI, M. C; TAYLOR, J. G.; PINTO, U. M. Quorum quenching and microbial control through phenolic extract of *Eugenia uniflora* fruits. *Journal of Food Science*, 81(10), 2016.doi: 10.1111/1750-3841.13431

ROSA, L. A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Fruit and Vegetable Phytochemicals Chemistry, *Nutritional Value and Stability*, Ed. Wiley-Blackwell, 2010.

RÜTSCHLIN, S.; BÖTTCHER, T. Inhibitors of bacterial swarming behavior. *Chemistry – A European Journal*, 26(5), 2019. doi: 10.1002/chem.201901961

RYAN, R. P.; AN, S. Q.; ALLAN, J. H. *et al.* The DSF Family of Cell-Cell Signals: an expanding class of bacterial virulence regulators. *PLoS Pathogens*, 11(7), 2015.doi: 10.1371/journal.ppat.1004986

SAEKI, E. K.; KOBAYASHI, R. K. T.; NAKAZATO, G. Quorum sensing system: Target to control the spread of bacterial infections. *Microbial Pathogenesis*, 142, 104068, 2020.doi: 10.1016/j.micpath.2020.104068

SALINI, R.; PANDIAN, S. K. Interference of quórum sensing in urinary pathogen *Serratia marcescens*by *Anethum graveolens. Pathogens and Disease*, 73(6), ftc038. doi: 0.1093/femspd/ftv038

SANHUEZA, L.; MELO, R.; MONTERO, R.; MAISEY, K.; MENDOZA, L.; WILKENS, M. Synergistic interations between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotic of different classes agains *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli. Plos One*, 12(2), e0172273, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0172273

SANTOS, C. A.; ALMEIDA, F. A.; QUECÁN, B. X. V.; PEREIRA, P. A. P.; GANDRA, K. M. B.; CUNHA, L. R.; PINTO, U. M. Bioactive properties of *Syzygium cumini* (L.) Skeels pulp and seed phenolic extracts. *Frontiers in Microbiology*, 11:990, 2020. doi: 10.3389/fmicb.2020.00990

SCHUSTER, M.; HAWKINS, A. C.; HARWOOD, C. S.; GREENBERG, E.P. The *Pseudomonas aeruginosa* RpoS regulon and its relationship to quorum sensing. *Molecular Microbiology*, 51(4), 973-985, 2004. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03886.x

SILVA, H. T. D.; MAGNANI, M.; SIQUEIRA, S.; SOUZA, E. L.; JÚNIOR, J. P. S. Fruit flavonoids as modulators of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* that overexpresses *norA. LWT- Food Science and Technology*, 85(B), 324-326, 2017. doi: 10.1016/j.lwt.2016.04.003

SILVA, V.; IGREJAS, G.; FALCO, V.; SANTOS, T. P.; TORRES, C.; OLIVEIRA, A. M. P.*et al.* Chemical composition, antioxidante and antimicrobial activity of phenolic compounds extracted from wine industry by-products. *Food Control*. 92, 516–522, 2018. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.05.031

SOLA, M. C.; OLIVEIRA, A. P.; FEISTEL, J. C.; REZENDE, C. S. M. Mecanismos de *quorum sensing* e sua relevância na microbiologia de alimentos. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, 8(14), 1419, 2012.

SORRENTINO, E.; SUCCI, M.; TIPALDI, L.; PANNELLA, G.; MAIURO, L.; STURCHIO, M.; COPPOLA, R.; TREMONTE, P. Antimicrobial activity of gallic acid against food-related Pseudomonas strains and its use as biocontrol tool to improve the shelf life of fresh black truffles. International Journal of Food Microbiology, 266, 183-189, 2018. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.026

STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J.; KEERSMAECKER, S. C. J. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, 45(2), 502-531, 2012. doi: 10.1016/j.foodres.2011.01.038

SURETTE, M. G.; MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: A new family of genes responsible for autoinducer production. *PNAS*, 96 (4), 1633-1644, 1999. doi: 10.1073/pnas.96.4.1639

TIADEN, A.; SPIRIG, T. A.; HILBI, T. H. Bacterial gene regulation by alpha-hydroxyketone signaling.*Trends in Microbiology*, 18, 288-297, 2010.doi: 10.1016/j.tim.2010.03.004

TIWARI, R.; KARTHIK, K.; RANA, R.; MALIK, Y.S.; DHAMA, K.; JOSHI, S.K. Quorum sensing inhibitors/antagonists countering food spoilage bacteria-need molecular and pharmaceutical intervention for protecting current issues of food safety.*International Journal of Pharmacology*, 12 (3), 262-271, 2016.doi: 10.3923 / ijp.2016.262.271

TRUCHADO, P.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; LARROSA, M.; ALLENDE, A. Food phytochemicals act as quorum sensing inhibitors reducing production and/or degrading autoinducers of *Yersinia enterocolitica* and *Erwinia carotovora*. *Food Control*, 24(1-2), 78-85. 2012.doi: 10.1016/j.foodcont.2011.09.006

VAQUERO, M. J. R.; NADRA, M. C. M. Growth parameter and viability modifications of *Escherichia coli* by phenolic compounds and argentine wine extracts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151, 342-352, 2008.doi: 10.1007/s12010-008-8197-0

VASQUEZ-ARMENTA, F. J.; BERNAL-MERCADO, A. T.; TAPIA-RODRIGUEZ, M. R.; GONZALEZ-AGUILAR, G. A.; LOPEZ-ZAVALA, A. A.; MARTINEZ-TELLEZ, M. A.; HERNANDEZ-OÑATE, M. A.; AYALA-ZAVALA, J. F. Quercetin reduces adhesion and inhibits biofilm development by *Listeria monocytogenes* by reducing the amount of extracellular proteins. *Food Control*, 90, 266-273, 2018. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.02.041

VATTEM, D.A; MIHALIK, K.; CRIXELL, S. H.; MCLEAN, RJC.Dietary phytochemicals as *quorum sensing* inhibitors. *Fitoterapia*, 78(4), 302-310, 2007.doi: 10.1016/j.fitote.2007.03.009

VAUGHN, A. R.; HAAS, K. N.; BURNEY, W.; ANDERSEN, E.; CLARK, A. K.; CRAWFORD, R.; SIVAMANI, R. K. Potential role of curcumin against biofilm-producing organisms on the skin: a review. *Phytotherapy Research*, 31(12), 2017. doi: 10.1002/ptr.5912

WANG, W. B.; LAI, H. C.; HSUEH, P. R.; CHIOU, R. Y. Y.; LIN, S. B.; LIAW, S. J. Inhibition of swarming and virulence factor expression in *Proteus mirabilis* by resveratrol. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 1313-1321, 2006.doi: 10.1099/jmm.0.46661-0

WHO- World Health Organization. (2018). High levels of antibiotic resistance found worldwide new data shows. Disponível em: https://www.who.int/news-room/detail/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows. Acesso em: 07/12/2020.

WHO- World Health Organization. (2018). The top 10 causes of death. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death. Acesso em: 07/12/2020.

WIEGAND, I.; HILPERT, K.; HANCOCK.R. E. W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substance.*Nature Protocols*, 3(2),163-175, 2008.doi: 10.1038/nprot.2007.521

WILLIAMS, P.; WINZER, K.; CHAN, W. C.; CÁMARA, M. Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. Philosophical Transactions of The Royal Society, 362, 1119-1134, 2007. doi: 10.1098/rstb.2007.2039

WONGTRAKOONGATE, P.; TUMAPA, S.; TUNGPRADABKUL, S. Regulation of a quorum sensing system by stationary phase sigma factor RpoS and their co-regulation of target genes in *Burkholderia pseudomallei*. *Microbiology and Immunology*, 56(5), 281-294, 2012. doi: 10.1111/j.1348-0421.2012.00447.x

XU, Q.; BARRIOS, C. A.; CUTRIGHT, T.; ZHANG N. B. M. Evaluation of toxicity of capsaicin and zosteric acid and their potential application as antifoulants. *Environmental toxicology*, 20(5), 467-474, 2005. doi: 10.1002/tox.20134

YIN, H.; DENG, Y.; WANG, H.; LIU, W.; ZHUANG, X.; CHU, W. Tea polyphenols as an antivirulence compound Disrupt Quorum-Sensing Regulated Pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*.*Scientific Reports*, 5(1), 61-58, 2015.doi: 10.1038/srep16158

ZHANG, C.; ZHU, S.; JATT, A. N.; ZENG, M. Characterization of N-acyl homoserine lactones (AHLs) producing bactéria isolated from vacum-packaged refrigerated turbot (*Scophthalmus maximus*) and possible influence of exogenous AHLs on bacterial phenotype. *Journal of General and Applied Microbiology*, 62(2), 60-67, 2016. doi: 10.2323/jgam.62.60

ZHANG, J.; RUI, X.; WANG, L.; GUAN, Y.; SUN, X.; DONG, M. Polyphenolic extract from *Rosa rugosa* tea inhibits bacterial quorum sensing and biofilm formation. *Food Control*, 42, 125-131, 2017. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.02.001

ZHANG, T.; LEE, B. W.; CANNON, L. M.; RITTER, K. A.; DAI, S.; REN, D. at al. A naturally occurring brominated furanone covalently modifies and inactivates LuxS. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, 6200-6204, 2009. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.08.095

ZHANG, W.; LI, C. Exploiting quorum sensing interfering strategies in Gram-negative bacteria for the enhancement of environmental applications.*Frontiers in Microbiology*, 6, 1535, 2015. doi: 10.3389/fmicb.2015.01535

ZHENG, D.; HUANG, C.; HUANG, H.; ZHAO, Y.; KHAN, M.R.U., ZHAO, H., HUANG, L. Antibacterial mechanism of curcumin: a review. *Chemistry & Biodiversity*, 17(8), 2020. doi: 10.1002/cbdv.202000171

ZHOU, J. W.; CHEN, T. T.; TAN, X. J.; SHENG, J. Y.; JIA, A. Q. Can the quorum sensing inhibitor resveratrol function as an aminoglycoside antibiotic accelerant against *Pseudomonas aeruginosa*. *Internaational Journal of Antimicrobial Agents*, 52(1), 35-41, 2018. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.03.002

ZHOU, Y.; GUAN, X.; ZHU, W.; LIU, Z.; WANG X.; YU, H. WANG, H. Capsaicin inhibits *Porphyromonas gingivalis* growth, biofilm formation, gingivomucosal inflammatory cytokine secretion, and in vitro osteoclastogenesis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 33, 211-219, 2014. doi: 10.1007/s10096-013-1947-0

ANEXO

Tabela 1: Compostos fenólicos selecionados a partir da literatura.

Composto bioativo	PubChem CID	Atividade benéfica	Doi
Hidroquinona	785	Atividade antibacteriana	10.1089 / mdr.2018.0149
Ácido 4-hydroxybenzoico	135	Atividade antimicrobiana e antifúngica	10.5539 / jas.v1n2p15
Amentoflavona	5281600	Atividade antibacteriana	10.1016/j.foodchem.2018.07.159
Apigenina	5280443	Atividade antibacteriana, atividade anti-biofilme e inibição de AI-1 e AI-2	10.1111/j.1365-2672.2010.04677.x
Arbutina	440936	Atividade antibacteriana e antitumoral	10.1016/j.phytol.2015.05.015
Baicaleina	5281605	Atividade antibacteriana, bactericida e atividade anti-biofilme	10.1371/journal.pone.0153468
Bilobetina	5315459	Atividade antifúngica	10.1515 / znc-2003-1-212
Bisdemethoxycurcumina	5315472		10.1016/j.foodchem.2005.06.037
BR-xanthona	13964005	Atividade antifúngica	10.1021/np970165u
Ácido cafeico	689043	Atividade antimicrobiana e inibição da produção de violaceína	10.1080/08927014.2013.852542
Capsaicina	1548943	Atividade antibacteriana, anti-virulência e anticâncer	10.3389 / fmicb.2015.01281
Ácido Clorogênico	1794427	Inibição da produção de violaceína	10.1016/j.foodcont.2011.09.006
Cianidanol	9064	Atividade antimicrobiana	10.2101/Ajid.12v1S.8
Curcumina	969516	Atividade antibacteriana, anticâncer e anti-inflamatória	10.1016 / j.jgar.2017.03.006
Cianidina	128861	Atividade anti-biofilme, inibição da produção de violaceína e EPS	10.1007 / s13197-015-2031-9
Cianidina-3-glucosideo	441667	Atividade anti-inflamatória	10.1007/s10068-014-0279-x
Daidzeina	5281708	Inibição da produção de violaceína	10.1016/j.foodcont.2011.09.006
Delfinidina-3-	102515359		10.1016/j.foodchem.2009.12.097

glucosideo			
Delphinidina	128853	Atividade anti-inflamatória e anti-biofilme	10.1016/B978-0-12-805417-8.00023-8
Demethoxycurcumin a	5469424	Atividade anti-inflamatória, neuroproteção, atividade anti-infecciosa	10.1002/jcp.28626
Dihydrocapsaicina	107982	Atividade antibacteriana	10.1007 / s11418-011-0579-x
Ácido elágico	5281855	Inibição da produção de violaceína e inibição da produção de AHL	10.1016/j.foodcont.2011.09.006
Epicatequina	72276	Atividade antimicrobiana e inibição da produção de violaceína	10.1080/08927014.2013.852542
Epigallocatequina	72277	Atividade antidiabética	10.1093/jn/136.10.2512
Epigallocatequina (3- gallato)	65064	Inibição da produção de violaceína e anti-biofilme	10.1038/srep16158
Eriodictiol	440735	Inibição da produção de piocianina, elastase e violaceína	10.1099/mic.0.049338-0
Ácido ferulico	445858	Atividade antimicrobiana e inibição da produção de violaceína	10.1080/08927014.2013.852542
Ácido gálico	370	Atividade antimicrobiana	10.1016/j.supflu.2018.07.025
Genisteina	5280961	Atividade bacteriostática e inibição da produção de toxinas	10.1007 / s12272-010-0520-y
Ácido Gentisico	3469	Propriedade radioprotetivas	10.3109/10715762.2011.633518
Gentisin	5281636	Atividade antibacteriana e antioxidante	10.1016/j.micpath.2017.10.049
Ginkgetin	5271805	Anti-inflamatório, antivírus e antifúngica, e efeitos neuroprotetivos	10.3109 / 10715762.2015.1032958
Globuxanthona	60148490		10.1080/14786419.2012.682992
Gliciteina	5317750	Atividade antimicrobiana, antitumoral, anti-câncer e efeitos quimiopreventivos	PMID: 26339345; PMCID: PMC4555673
Hesperidina	10621	Inibição da produção de acil homoserina lactonas e produção de violaceína	10.1021/jf301365a
Isorhamnetina	5281654	Atividade antiviral, anticâncer, antimicrobiano e anti-inflamatório	10.1158 / 0008-5472.CAN-13-0525
Kaempferol	5280863	Atividade antimicrobiana, inibição de AI-1 e AI-2 e atividade anti-biofilme	10.1111/j.1365-2672.2010.04677.x
Lapachol	3884	Anticâncer, atividade antibacteriana e antifúngica antiviral, inseticida e anti-inflamatório	10.1016/j.bmcl.2013.12.049

Luteoforol	114505	Atividade bactericida e fungicida	10.1007/s10658-005-2192-x
Luteolina	5280445	Atividade antibacteriana, inibição da produção de acil homoserina lactonas, atividade anti-biofilme e motilidade	10.1007/s11104-015-2659-2
Malvidina	159287	Atividade anti-biofilme, inibição da produção de violaceína e EPS	10.1016/j.micpath.2015.01.010
Malvidina-3-glucosideo	443652	Atividade antiinflamatória	10.1016/j.foodchem.2009.12.097
Mangiferina	5281647	Antidiabética	10.1078/0944-7113-00009
Mangostin	5281650	Atividade antibacteriana e antifúngica	10.1016/j.phymed.2003.09.012
Matairesinol	119205	Atividade antiinflamatória	10.1007/s11064-017-2301-1
Methyl 4-hidroxicinnamate	5319562	Atividade antibacteriana	10.1111/1750-3841.13302
Morelloflavona	5464454	Anti-inflamatório, antibacteriana e ação hipocolesterolêmica	10.1002/ptr.3286
Miricetina	5281672	Inibição da produção de piocianina e atividade anti-biofilme	10.1016/j.micpath.2017.07.018
Naringenina	932	Inibição da produção de piocianina e elastase, inibição da produção de acil homoserina lactonas e atividade anti-biofilme	10.1099/mic.0.049338-0
Ácido P-coumarico	637775	Atividade antimicrobiana e anti-QS	10.1089/jmf.2012.0197
Pelargonidina	440832	Atividade anti-biofilme	10.1080/14786419.2016.1222386
Peonidina	441773	Atividade prebiótica e atividade antibacteriana	10.1038/s41598-018-23397-0
Peonidina-3-glucosideo	443654	Anti-câncer	10.1080/01635580903441261
Petunidina	441774	Atividade anti-biofilme e EPS	10.1039 / C5RA20677D
Phloretina	4788	Atividade antimicrobiana	10.1016/j.foodchem.2014.03.118
Piceatannol	667639	Anti-inflamatório e anticâncer, potencial terapêutico	10.1089/jmf.2017.3916
Procianidina	107876	Anti hipertensivo	10.1016/j.foodres.2013.01.023
Procianidina B1	11250133	Antiinflamatório	10.1007/s11010-015-2457-4
Pirocatechol	289	Quimiopreventivo	10.1016 / j.fct.2019.02.010
Quercetina	5280343	Atividade antimicrobiana, inibição de AI-1 e AI-2 e atividade anti-	10.1111/j.1365-2672.2010.04677.x

		biofilme	
Quercetina-3,4-diglucosideo	11215769	Antividade antibacteriana	10.3389/fmicb.2019.00867
Quercetina-3-glucosideo	44259229	Atividade antimicrobiana	10.4314 / tjpr.v12i5.23
Quercetina-3-β-D-glucosideo	5280804	Anti-câncer	10.1021/jf8039796
Quercitrin	5280459	Atividade anti-inflamatória	10.1038/sj.bjp.0705941
Resorcinol	5054	Antibacteriana e anti-câncer	10.1016/j.jorganchem.2014.12.042
Resveratrol	445154	Inibição da produção de violaceína e acil homoserina lactonas	10.1016/j.foodcont.2011.09.006
Rutin	5280805	Inibição da produção de piocianina e atividade anti-biofilme	10.1016/j.micpath.2017.07.018Obtenha direitos e conteúdo
Ácido salicílico	338	Inibição da produção de AHL, proteases e motilidade, atividade antimicrobiana	10.1128 / AAC.01283-08
Sciadopitysin	5281696	Anti-inflamatório	10.1002/jat.3620
Secoisolariciresinol	65373	Anticâncer, atividade antidiabética	10.1016/j.biopha.2016.07.041
Ácido sinaptico	637775	Atividade antimicrobiana	10.1016/j.foodchem.2007.07.003
Ácido siríngico	10742	Atividade antimicrobiana e antifúngica	10.5539 / jas.v1n2p15
Taxifolin	439533	Inibição da produção de piocianina e elastase, redução da expressão de genes controlados pelo QS (ex.: lasI, lasR, rhlI, rhlR, lasA, lasB, phzA1 and rhlA) em *P. aeruginosa* PAO1	1 https://doi.org/10.1099/mic.0.049338-0
Theaflavina	135403798	Atividade antimicrobiana	10.1016/j.ijantimicag.2011.07.006
Teograndin	11156985		
Ácido vanilico	8468	Inibição da produção de violaceína	10.1016/j.foodcont.2011.09.006
Vanilina	1183	Antimutagênico, antiangiogenetico, anti-colitis e efeito analgésico	10.1016/j.bbagen.2010.11.004
Viniferina	5315232	Atividade anti-inflamatória e anticâncer	10.3390/molecules22050733
Volkensiflavona	23844069		